

**Maja ČAČIJA, Martina KADOIĆ BALAŠKO, Darija LEMIĆ, Helena VIRIĆ  
GAŠPARIĆ, Sandra SKENDŽIĆ, Renata BAŽOK**

*Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zavod za poljoprivrednu zoologiju  
mcacija@agr.hr*

## PRIMJENA RNAI TEHNOLOGIJE U ZAŠTITI BILJA

### SAŽETAK

... citation and similar papers at [core.ac.uk](http://core.ac.uk)

brought to

Smatra se da je glavni uzrok tome rezistentnost kukaca na najčešće primjenjivane insekticide, zbog čega je presudno važan pronalazak novih rješenja u suzbijanju štetnih organizama. Zanimljivu perspektivu predstavlja RNA interferencija (RNAi), tehnologija koja se temelji na utišavanju gena, a primjenjuje se u brojnim znanstvenim područjima. Primjenjiva je i u suzbijanju štetnika jer utišavanje određenih gena dovodi do zastoja u rastu i razvoju kukca, potom i uginuća. Najvažnija je prednost RNAi tehnologije što djeluje na točno određenu vrstu štetnika, jer cilja specifičan gen, a mijenjajući ciljane gene moguće je potpuno izbjeći pojavu rezistentnosti. Do sada se RNAi pokazao uspješnim u suzbijanju štetnika određenih redova, no postoje još brojni izazovi koje treba svladati kako bi to postala učinkovita i ekonomski isplativa mjera zaštite. Uspjeh primjene ovisi o brojnim čimbenicima, a najvažniji su izbor ciljanog gena i način primjene u praksi. Na temelju dosadašnjih istraživanja, RNAi pokazuje velik potencijal u suzbijanju štetnika, a bolje razumijevanje mehanizama koji utječu na učinkovitost omogućit će razvoj ove tehnologije koja će, smatra se, u budućnosti postati dio integrirane zaštite bilja.

**Ključne riječi:** integrirana zaštita bilja, RNA interferencija, štetnici, utišavanje gena

### UVOD

U poljoprivredi štetni kukci uzrokuju velike ekonomske gubitke, a upotreba različitih mjera zaštite dodatno povećava troškove proizvodnje. Tradicionalno korištene agrotehničke, mehaničke i biološke mjere lako su dostupne, praktične za uporabu, ne djeluju štetno na okoliš i kompatibilne su s drugim mjerama. Međutim, uglavnom djeluju sporo, zahtijevaju kvalificirano osoblje i mogu se primijeniti na manjem području u određenu trenutku. Kemijske mjere djeluju brže i učinkovitije na štetnike, te se godinama koriste kao najvažnije mjere zaštite. Glavni su nedostaci uporabe kemijskih pesticida relativno visok trošak proizvodnje, negativan učinak na okoliš, korisne organizme i čovjeka

zbog perzistentnosti i akumulacije u okolišu, te pojava rezistentnosti štetnika zbog široke i dugotrajne primjene (Ansari i sur., 2014.). Zbog rezistentnosti štetnika na pojedine insekticide, poljoprivredni proizvođači ne uspijevaju učinkovito zaštititi poljoprivredne kulture te trpe gubitke, ili moraju primjenjivati skuplje insekticide, čime se umanjuje rentabilnost proizvodnje (Bažok i Lemić, 2017.). Novije mjere zaštite, u kojima se koriste genetički modificirani (GMO) usjevi koji proizvode toksine bakterije *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*), imaju brojne prednosti u usporedbi s agrotehničkim, mehaničkim, biološkim i kemijskim mjerama. GMO usjevi kontinuirano proizvode insekticidne tvari koje su visoko specifične u suzbijanju štetnika, pa su zbog postizanja većih prinosa poljoprivrednicima isplativi. Međutim, sve se više javlja rezistentnost štetnika i na GMO biljke, pa ni ta mjera zaštite više nije dovoljno učinkovita. S obzirom na to da se mogućnosti uspješne zaštite bilja s vremenom smanjuju, važno je razvijati nove pristupe u suzbijanju štetnika. Jedno od mogućih novijih rješenja svakako je utišavanje gena RNA interferencijom (RNAi).

### MEHANIZAM DJELOVANJA

U normalnom procesu u stanicama gen proizvodi glasničku RNA (mRNA) koja se potom prepisuje u protein. Mehanizam djelovanja RNAi-a temelji se na utišavanju gena, zbog čega ne dolazi do stvaranja proteina. Utišavanje gena postiže se unosom kratke dvolančane RNA (dsRNA) u stanice kukca. Nakon ulaska u stanicu, dsRNA veže se na komplementarnu mRNA koju proizvodi gen i razgrađuje ju. Uništenjem mRNA-a više ne dolazi do stvaranja proteina. Budući da dsRNA ometa ili interferira mRNA, proces je nazvan RNA interferencija. Radi se o visokoočuvanu prirodnu procesu kod eukariota, jer se njime reguliraju geni, a služi i kao poseban oblik obrambenog mehanizma protiv virusa i transpozona (Cooper i sur., 2018.). Zbog specifična mehanizma djelovanja kojim se utišava gen, RNAi najviše se koristi u temeljnim istraživanjima funkcije i regulacije gena raznih organizama. Budući da je RNAi prisutan kod kukaca, utišavanje gena uključenih u razne fiziološke procese negativno utječe na rast i razvoj kukaca, što dovodi do smanjenja vitalnosti ili do uginuća kukca. Upravo to svojstvo može se iskoristiti u suzbijanju štetnika (Agrawal i sur., 2003.).

### NAČINI UNOSA

Osim odabira ključnoga gena koji se želi utišati, vrlo je važan i način unosa dsRNA-a u stanice kukca. Pokazalo se da RNAi ima različitu učinkovitost s obzirom na način unosa, odnosno jedan način može biti učinkovit za određenu vrstu štetnika, a za neku drugu vrstu nije učinkovit. To je iznimno važno sa stajališta primjene RNAi-a u poljoprivrednoj praksi. Unos dsRNA-a u stanicu

može se provesti mikroinjektiranjem, inkubacijom, oralnom primjenom, tretiranjem biljaka, ishranom na GMO biljkama koje stvaraju dsRNA, razvojem transgenih kukaca i drugim metodama (Yang i sur., 2011.).

**Mikroinjektiranje** se dsRNA unosi iglicom izravno u tkivo kukca, i to je jedan od najučinkovitijih načina unosa i utišavanja gena. Međutim, mikroinjektiranje pojedinih jedinaka kukaca u svrhu suzbijanja nije izvedivo u poljoprivrednoj praksi, a i oštećuje tijelo kukca. Metoda ima važnost uglavnom u istraživanjima funkcije gena zbog svoje učinkovitosti. **Inkubacija** se izvodi natapanjem tkiva ili stanica u otopini koja sadržava dsRNA. Prikladna je za određene stanice i tkiva te određene stadije kukaca, pa se koristi u temeljnim istraživanjima i nije primjenjiva u praksi.

U usporedbi s prethodne dvije metode, unos dsRNA-a **oralnim putem** (hranom) jednostavan je i lakše primjenjiv na sitnim kukcima ili mlađim razvojnim stadijima. Pokazao se uspješnim u utišavanju gena kod raznih vrsta iz redova Hemiptera, Coleoptera i Lepidoptera. Molekule RNA-a mogu se proizvesti *in vitro*, u kvascu ili u bakterijama te primijeniti miješanjem s hranom ili otopinom. U novije vrijeme istražuje se i „pakiranje“ dsRNA-a u liposome ili nanočestice koje molekulama RNA-a daju veću stabilnost, te se također miješaju s hranom. Međutim, kod nekih se vrsta (*Spodoptera littoralis*), utišavanje gena ne događa kada se dsRNA unese oralno, a mikroinjektiranjem istoga dsRNA-a u stanice postiže se uspjeh (Rajagopal i sur., 2002.). Kod nekih je kukaca (*Glossina morsitans*) oralna primjena učinkovita na gene koji se nalaze u probavilu, ali geni u masnim stanicama nisu utišani zbog nedostatka prijenosa RNA molekula između tkiva (Walshe i sur., 2009.). Ovi primjeri ukazuju na to da nisu svi kukci jednako osjetljivi na oralnu primjenu dsRNA-a. Uspjeh RNAi-a ovisi i o koncentraciji dsRNA-a unesena hranom, no ne zna se točno koja količina molekula uđe u stanice. Unos ishranom moguć je i putem **GMO biljaka** koje imaju ugrađen gen za stvaranje specifična dsRNA-a. Prednost je takvih modificiranih biljaka što kontinuirano proizvode stabilan dsRNA materijal kojim djeluju na sve štetnike koji se njima hrane. Ovaj način unosa praktičan je za uporabu u praksi.

Osim u biljke, geni koji proizvode dsRNA mogu se unijeti i u kukce (**transgeni kukci**); nastaju sterilne jedinice koje bi se mogle koristiti u SIT tehnicima. RNAi može se potaknuti i unosom dsRNA-a putem virusa. Taj se način tek istražuje, no prednost mu je u tome što se virus brzo širi i uzrokuje RNA interferenciju unutar cijele populacije.

Najpraktičniji je i u praksi primjenjiv način unosa dsRNA-a **folijarno tretiranje** biljaka. Isprva se smatralo da će se molekule RNA-a razgraditi na površini biljke, no uspješno provedena suzbijanja potvrdila su da je folijarna primjena moguća. U istraživanju na krumpirovoj zlatici pokazalo se da je dsRNA nakon sušenja bio stabilan, pa je postignuta učinkovita zaštita tijekom 28 dana od primjene (Miguel i Scott, 2016.). Slični rezultati dobiveni su i prilikom suzbijanja

patogenih gljiva i virusa. Izravnim tretiranjem gusjenica vrste *Ostrinia furnalis* postignuta je učinkovitost od 40 % do 100 %. Zbog čvrstog egzoskeleta kukaca, smatra se da dsRNA primijenjen folijarno zapravo ulazi u kukca ishranom ili dišnim putem, a neki smatraju da može proći i kroz kožu. Za razliku od tretiranja biljaka koje zahtijeva veći utrošak RNAi insekticida, postoje ideje i o uporabi kombinacije otopine dsRNA-a s atraktantom, koji bi se mogli postavljati u obliku dispenzora, pa ne bi trebalo tretirati veće površine.

## PRIMJERI PRIMJENE

Brojna su istraživanja pokazala učinkovitost RNA interferencije u zaštiti bilja od štetnih kukaca. Prvi uspješan primjer bio je suzbijanje kukuruzne zlatice (*Diabrotica virgifera virgifera*) na GMO kukuruzu koji je proizvodio dsRNA. Ličinke zlatice zaostajale su u razvoju i ugibale, a štete su bile višestruko manje nego na nezaštićenu kukuruzu (Baum i sur., 2007.). Zbog uspješne primjene, Europska agencija za okoliš (EPA) registrirala je 2017. godine prvo genski modificirano sjeme na bazi RNAi-a (SMARTSTAX PRO). I drugi kornjaši (Coleoptera) pokazali su osjetljivost na RNAi putem ishrane: *Diabrotica undecimpunctata*, *Leptinotarsa decemlineata*, ličinke *Tribolium* sp. Primjera iz reda Lepidoptera još je više: *Helicoverpa armigera*, *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella*, *Bombyx mori*, *Manduca sexta*, *Epiphyas postvittana*, *Diatraea saccharalis* i neke druge vrste (Swevers i Smaghe, 2012.). Leptiri pokazuju veću varijabilnost u osjetljivosti na RNAi. Razna istraživanja pokazala su različiti uspjeh primjene RNAi-a kod leptira s obzirom na način unosa dsRNA-a u stanice, stadij kukca, količinu primijenjena dsRNA-a, ciljani gen i tkivo u kojemu se gen nalazi. Od ostalih štetnika, RNAi tehnologijom uspješno su suzbijene vrste iz reda Hemiptera (*Myzus persicae*, *Acyrtosiphon pisum*, *Bemisia tabaci*, *Nilaparvata lugens*, *Laodelphax striatellus*). Potencijalno se, s pomoću RNAi-a mogu suzbijati i vrste iz redova Orthoptera, Isoptera, Dictyoptera, Hymenoptera i Diptera jer pokazuju osjetljivost na RNAi. Premda ne pripadaju razredu kukaca, RNAi uspješno je proveden i na grinjama *Ixodes scapularis* te, još važnije, na koprivinoj grinji (*Tetranychus urticae*).

## ZAKLJUČAK

Iako u počecima razvoja, tehnologija RNA interferencije pokazuje velik potencijal primjene u suzbijanju raznih vrsta štetnika. No, potrebna su još mnoga istraživanja prije nego što primjena RNAi-a u poljskim uvjetima postane učinkovita i ekonomski isplativa mjera zaštite. Genomi mnogih kukaca, uključujući i ekonomski važne štetnike, sekvenciraju se i postaju dostupni za bolje razumijevanje RNAi procesa i identifikaciju novih ciljanih gena. Uspjeh

primjene trenutačno je ograničen različitom učinkovitosti na različite vrste štetnika, i posljedica je nedovoljna poznavanja čimbenika koji na nju utječu. Jedan je od važnijih čimbenika način primjene, odnosno način unosa RNA molekula u stanice kukaca. Bolje poznavanje ciljanih gena, načina primjene, očuvanja i prijenosa RNA molekula unutar organizma nužni su za bolje razumijevanje mehanizama koji utječu na uspjeh primjene RNAi-a. Trenutačna istraživanja usmjerena su na zaštitu bilja od štetnih kukaca, a mnogi smatraju da bi u budućnosti RNAi mogao postati dio integrirane zaštite bilja te se primjenjivati i za suzbijanje korova, nematoda, bakterija i gljiva.

## LITERATURA

**Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., and Mukherjee, S. K. (2003).** RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 657-685.

**Ansari, M. S., Moraiet, M. A., and Ahmad, S. (2014).** Insecticides: impact on the environment and human health. U: *Environmental Deterioration and Human Health*. Akhtar, R., Grohmann, E. (ur.). Dordrecht, Springer, 99-123.

**Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., Roberts, J. (2007).** Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25, 1322-1326.

**Bažok, R., Lemić, D. (2017).** Rezistentnost štetnika na insekticide. *Glasilo biljne zaštite*, 17 (5), 429-438.

**Cooper, A. M. W., Silver, K., Zhang, J., Park, Y., Zhu, K. Y. (2018).** Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science*, 75, 18-28.

**Miguel, S. K., Scott, J. G. (2016).** The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. *Pest Management Science*, 72, 801-809.

**Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K. (2002).** Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (49), 46 849-46 851.

**Swevers, L., Smagghe, G. (2012).** Use of RNAi for Control of Insect Crop Pests. U: *Arthropod-Plant Interactions*. Smagghe, G., Diaz, I. (ur.). Progress in Biological Control, 14, Springer, Dordrecht.

**Walsh, D. P., Lehane, S. M., Lehane, M. J., Haines, L. R. (2009).** Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Molecular Biology*, 18 (1), 11-19.

**Yang, G., You, M., Vasseur, L., Zhao, Y., Liu, C. (2011).** Development of RNAi in Insects and RNAi-Based Pest Control. U: *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. Stoytcheva, M. (ur.). IntechOpen, DOI: 10.5772/17260.