

**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

Unatoč učestalosti primjene insekticida, oko 18 % do 20 % ukupne svjetske proizvodnje poljoprivrednih proizvoda gubi se zbog šteta koje čine štetni kukci. 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 zlatnici 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.

**Stručni rad**