

Kültür Bitkilerinde Zararlı Olan Böceklerle Biyoteknolojik Mücadelede Son Yöntemler

Erhan KOÇAK* Şevki ERTÜRK Mehmet Oğuz YAMAN

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta

*Sorumlu yazar: erhankocak@isparta.edu.tr

Geliş tarihi:18/07/2018, Yayına kabul tarihi:02/11/2018

Özet: Ekonomik anlamda zarar yapan böceklerle mücadelede, kimyasal mücadele üretici tarafından en fazla tercih edilen yöntemidir. Ancak insektisit uygulamalarının insan, hayvan, çevre sağlığı üzerinde bir çok olumsuz etkilerinin olduğunu ve zararlılarda direnç gelişimine yol açarak gelecek için mücadele gücümüzü zayıflattığını da unutmamak gerekir. Bu nedenle, kültür bitkilerinde zararlı olan böcekler için yeni, çevreye duyarlı ve daha etkili mücadele stratejileri gereklidir. RNA İnterferans (RNAi) teknolojisi ile zararlıda spesifik hedef gen bölgeleri susturularak, başarılı bir şekilde gerek böcek zararının gerekse böcek popülasyonlarının azaltılması hedeflenmektedir. CRISPR/Cas9 sistemi ise; yabancı genetik materyalleri yok etmek için RNA güdümlü nükleazları kullanan bir mikrobiyal immün sistemdir. Gen ekspresyonunu bozan RNAi'nin aksine, CRISPR-Cas9, yalnızca gen ifadesini bozmakla kalmayıp, aynı zamanda kodlama dizilerini değiştiren, birden fazla geni hedef alabilen ve iş gücünü oldukça azaltan güçlü bir DNA düzenleme teknolojisidir. Epigenetik mekanizmalar sayesinde hedeflenen genlerin ekspresyonları artırılabilir ya da azaltılabilir. Epigenetik etkileşimler, RNAi ve CRISPR teknolojileri kullanılarak böcekler için hayati öneme sahip feromonal veya reseptör genler hedef alınabilir. Böylece zararlı böceklerin eş bulma ve besine ulaşabilme davranışları değiştirilerek üreme ve beslenmeleri engellenip popülasyonları baskılanabilir ya da kontrol altına alınabilir. Ayrıca bağışıklık sisteminde rol alan genler hedef alınarak, zararlı böcekler enfeksiyona karşı duyarlı hale getirilebilir.

Anahtar kelimeler: Bitki koruma, Böcekler, CRISPR-Cas9, Epigenetik, RNA interferans.

Recent Methods for Biotechnologic Control on Pest Insects in Cultural Plants

Abstract: In the struggle against pests that cause economic damage, chemical control is the most preferred method by the producer. However, it should not be forgotten that insecticide applications have many negative effects on human, animal and environmental health and weaken our fighting power for the future by causing resistance development in pests. For this reason, new, environmentally sensitive and more effective strategies are needed to control the insects that are pest to cultivated plants. With RNA Interference (RNAi) technology, the specific gene regions of the pests can be targeted and silenced, so that insect damage or insect populations can be successfully reduced. The CRISPR / Cas9 system is; is a microbial immune system that uses RNA-driven nucleases to destroy foreign genetic material. Unlike RNAi, which disrupts gene expression, CRISPR-Cas9 is a powerful DNA regulatory technology that not only disrupts the expression of genes, but also alters coding sequences, can target multiple genes and significantly reduces workload. Expression of genes targeted by the epigenetic mechanisms can be increased or decreased. Using epigenetic interactions, RNAi and CRISPR technologies, phomonal or receptor genes with vital precursors for insects can be targeted. Thus, by changing the behavior of pest insects to match and reach to nutrients, reproduction and feeding can be prevented and their populations can be suppressed or controlled. In addition, by targeting genes involved in the immune system, pest insects can be susceptible to infection.

Key words: Plant protection, Insects, CRISPR-Cas9, Epigenetics, RNA interference.

Giriş

Tarımsal değeri yüksek olan, çeşitli ıslah aşamalarından geçmiş, insan ve/veya hayvanların ihtiyaçlarını karşılayabilmek adına bilinçli olarak yetiştirilen bitkilerin bütününe kültür bitkileri denir. Zararlı böcek türleri; Bitkilerin kök, yumru, soğan, yaprak, gövde, sürgün, çiçek, meyve ve tohumlarını yiyerek kültür bitkilerine zarar verirler.

Böceklerin yarattığı zararları minimum düzeye çekmek amacıyla belirli periyotlarla ilaçlamalar yapılmaktadır. Bunun temel nedeni pestisit uygulamalarının kolay ve göreceli olarak ucuz olmasının yanında ayrıca kısa sürede sonuç vermesi sayılabilir. Ancak pestisit uygulamalarının bu önemli faydalarının yanında zararlılarda direnç gelişimine yol açtığını; insan, hayvan ve çevre sağlığı üzerinde bir çok olumsuz etkilerinin olduğunu da unutmamak gereklidir (Tunçbilek ve ark., 2010).

Bu olumsuz etkilerinin artması nedeniyle, zararlılara karşı kimyasal mücadeleye alternatif olabilecek savaşım yöntemleri üzerindeki çalışmalar önem kazanmıştır. Bunların başında da moleküler yöntemler gelmektedir. Genom düzenleme teknolojileriyle yapılan biyoteknolojik çalışmalar sayesinde bitkilerde zararlı böceklerle mücadelede yeni araştırma alanları ortaya çıkmış, zararlı böcekler ile yeni savaş stratejileri geliştirilmiştir (Yorulmaz ve Ay, 2006).

Mücadelede Kullanılan Moleküler Yöntemler

1. RNA İnterferans (RNAi)

RNAi teknolojisi ile zararlıya spesifik hedef gen bölgeleri susturularak, başarılı bir şekilde gerek böcek zararının gerekse böcek popülasyonlarının azaltılması hedeflenmektedir. RNA İnterferans (RNAi) çift zincirli RNA (doublestrand RNA, dsRNA) ile transkripsiyon sonrasında gen ifadesinin düzenlenmesini sağlayan bir yöntemdir (Daneshmandi, 2006).

Spesifik bir geni susturmak amacıyla *Ceanorhabditis elegans*'ı oral yoldan dsRNA ile besleme tekniğinin geliştirilmesinin ardından (Timmons et al., 2001), böceklerdeki hedef genleri dsRNA aracılığı

ile baskılamada ve susturmada kullanılan yöntemler olarak mikroenjeksiyon, yapay besi ortamı ile besleme, daldırma yöntemi, dsRNA ifadesi üreten bakterilerle besleme, dsRNA'nın virüs aracılığı ile alınması, transgenik böceklerin geliştirilmesi ve RNAi ile zararlı böcek türlerine karşı dirençli bitki geliştirilmesi sayılabilir (Güz ve ark., 2012).

2. Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Palindromik Tekrar Kümeleri (CRISPRs) ile İlişkili Cas9 Nükleazları

CRISPR kılavuz bir RNA (gRNA) eşliğinde özgül bir genomik bölgeye hedeflenen Cas9 nükleaz enziminin kullanıldığı bir genom düzenleme sistemidir. CRISPR/Cas9 sistemi, ökaryot genomlarında bulunmazken, prokaryot organizmaların genomlarında yabancı genetik materyalleri yok etmek için RNA güdümlü nükleazları kullanan bir mikrobiyal immün sistem olarak yer alırlar (Cho ve ark., 2013). Gen ifadesini bozan RNAi'nin aksine, CRISPR-Cas9, yalnızca gen ifadesini bozmakla kalmayıp, aynı zamanda kodlama dizilerini değiştiren güçlü bir DNA düzenleme teknolojisidir. Bakterilerde, DNA'ya entegre yabancı viral DNA dizilerini enfeksiyon sonucu tanıyan CRISPR-Cas9 sistemi bu dizileri hedef almaktadır. Dolayısıyla, bakterilerin doğal bir virüs savunma sistemi olarak kabul edilmektedir.

Doğal CRISPR/Cas sistemleri, yabancı bir DNA'nın parçalanmasından sorumlu olan çeşitli enzimlere ve endonükleaz işlevi için gerekli RNA kılavuzlarına sahiptir, ancak ökaryotlarda genom düzenleme çalışmaları için kullanıldığında, gereken tek CRISPR proteini Cas9 endonükleaz enzimi ya da bunun bir varyantıdır. Genom düzenleme yöntemi olarak CRISPR sisteminin kullanımı aslında Cas9 proteinin kısa bir rehber RNA molekülü ile birlikte DNA'ya bağlanarak çift zincir kırıkları oluşturabilme yeteneğine dayanmaktadır (Çetintaş ve ark., 2017).

CRISPR, Cas9 enziminin genom üzerindeki kesilecek noktaya bağlanmasına yardımcı olur. Bu teknikten yararlanan bilim insanları ya genin bir parçasını kesip çıkartarak işlevini kesintiye uğratar, ya da genoma yeni bir dizilim ekleyerek yeni bir işlevi devreye sokar (Perkin et al., 2016).

CRISPR/Cas9 teknolojisi kromozomun düzenlenmesi, transkripsiyonun aktivasyonu veya baskılanması ve epigenetik düzenleme gibi amaçlarla kullanılabilir. CRISPR/Cas9 sisteminin yoğun olarak kullanıldığı uygulamalardan birisi de gen ifadesinin düzenlenmesidir. Cas9 ile birlikte transkripsiyonal bir aktivatör domain veya repressör'ün genomda belirli bir bölgeye taşınması yoluyla gen ifadesinin artırılması veya baskılanması sağlanabilmektedir (Çetintaş ve ark., 2017).

3. Epigenetik

Bütün hücreler genlerin kontrolünde çalışmayı temel almaktadır. Genler, yeri ve zamanına göre aktif edilip, pasif hale sokulabilir. Bu mekanizma ise "epigenetik" olarak adlandırılır ve genetik koda ilaveten gerçekleşir. Epigenetik bilgi, bir dizi biyolojik işaret ile genlerin içerisine yazılmıştır ve temel DNA dizisini etkilemez. Bu kimyasal işaretlerin şaşırtıcı dizilişi, DNA'yı paketlenen proteinlerin üzerine yapışabilir ve hatta DNA veya RNA'nın kendisine yapışıp genom üzerinde belirli parçaların, hücrelerin gen okuma mekanizması tarafından okunmasını engelleyebilir ya da onları daha okunabilir bir hâle getirebilir (Waterland and Michels 2007).

DNA metilasyonu; gen ifadesini değiştirerek hücre fonksiyonlarını değiştiren, bir metil grubunun kovalent şekilde DNA metiltransferaz (DNMT) katalizinde, bir CpG (SitozinfosfatGuanin) dinükleotidindeki Sitozinin 5-karbonundan yapıya eklenmesini ifade eder. Gen ifadesindeki değişiklikler, DNA dizilimi ile bağlantı göstermeksizin, hücre bölünmesi boyunca bir nesilden diğerine geçebilmektedir. DNA'da promotör bölgelere bağlanacak transkripsiyon faktörü proteinlerin afinitesini etkileyerek, gen ifadesini etkilemektedir. Histon proteinlerinin metilasyon, fosforilasyon, asetilasyon, ubikütilenme gibi post translasyonel modifikasyonları (PTM), kromatin yapısını veya histon modifiye edicileri değiştirerek gen ifadesini etkileyebilir (Luby, 2015).

4. Kültür Bitkilerinde Zararlı Olan Böceklerle Biyoteknolojik Mücadelede Yapılan Çalışmalar

Yapılan bir çalışmada, rekombinant Sindbis virüsü, elektroporasyon yöntemi ile *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) hücrelerine verilerek virüsün dsRNA üretmesi sağlanmıştır. Metamorfozun gerçekleşmesinde gerekli olan BR-C gen ekspresyonunu engelleyen dsRNA, larvaların pupa olmasını engellemiş, erginlerde ise çeşitli bozuklukların ortaya çıkmasına neden olmuştur (Uhlirova et al., 2003).

Mao et al., (2007) RNAi uygulamasında kullanmak üzere *Heliothis armigera*'nın (Lepidoptera: Noctuidae) orta bağırsağında ifade edilen CYP6AE14 adını verdikleri sitokrom P450 genini belirlemişlerdir. Bu gen, pamuğun sekonder metaboliti olan gossipolün detoksifikasyonu ile ilişkili olup *H. armigera*'nın gossipole karşı toleransını sağlamaktadır. Larvanın CYP6AE14 geni dsRNA'sı ifadesi yapan, transgenik *Arabidopsis* ve *Nicotiana* bitkileri ile beslenmesi durumunda, bu genin orta bağırsaktaki transkripsiyonu azalmış ve yapay besinlere geçiş yapıldığında, larvanın gossipole hassasiyetinin arttığı bildirilmiştir.

Bir başka çalışmada Baum et al., (2007) mısır kök kurdu (*Diabrotica virgifera virgifera*)'na ait bir cDNA kütüphanesi oluşturmuş; fonksiyonel olarak önemli genlerin ifadesini engellemek için 290 potansiyel hedef gen tespit etmiş ve bu genlere uygun dsRNA'ları in vitro ortamda sentezlemişlerdir. Sentezlenen dsRNA'lar yapay besi ortamında larva dönemlerine verilmiştir. Bu yöntem izlenerek başlangıçta hazırlanmış listeden 14 farklı genin, düşük miktardaki dsRNA konsantrasyonları ile hedef dizilerin ifadesinde spesifik bir baskılanma gerçekleştirebildiği görülmüştür. Araştırmacılar bu genlerin ifadelerinin azalmasıyla gelişimin engellendiğini ve ölümlerin ortaya çıktığını gözlerken en etkili dsRNA'nın, V-tipi ATPaz-A genine ait olduğunu tespit etmişlerdir.

Termitlerle ilgili olarak yapılan bir çalışmada, termitlerin iki önemli genine özgü dsRNA'ları içeren yapay besi ortamı ile beslenmeleri sağlanmıştır. Bu genlerden ilki selülozu sindirmeye yardımcı olan

selülaz enzimini kodlayan Cell-1, diğeri ise *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae)'de kast sistemi organizasyonundan sorumlu olan hegzamerin depo proteinini kodlayan Hex-2 genleridir. RNAi uygulaması ile termitlerde kast sistemi organizasyonunun bozulması ve ölümlerin meydana gelmesi ile yüksek dozda verilen dsRNA'ların genleri başarılı bir şekilde susturduğu gözlenmiştir (Zhou et al., 2008). Termitlerle yapılan çalışmalar, literatüre ilk kez "sessiz pestisitler" isimli terimin girmesine sebep olmuştur. Böylece RNAi teknolojisi, daha güvenli ve çevre dostu pestisitlerin üretilebileceğine dair farklı bakış açıları geliştirilmesine katkı sağlamıştır.

Yapılan bir başka çalışmada ise *T. castaneum*'un MMP1 ve MMP-2 genleri dsRNA aracılığı ile hedef alınmıştır. MMP-1'in ifadesi susturulduğunda anormal yapıda antenler, bileşik gözler, kanatlar, bacaklar ve baş yapısı meydana geldiğini saptamışlardır. MMP-1 ve MMP-2'nin birlikte susturulması ile trakeal yapıda deformasyonlar ve anormal bağırsak yapısına sahip bireylerin oluştuğu kaydedilmiştir (Knorr et al., 2009).

Zha et al., (2011) pirinç zararlısı olan *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)'in nimf ve erginlerinin orta bağırsağında aşırı miktarda ifade olan hegzos taşıyıcısı (NIHT1), karboksipeptidaz (Nlcar) ve tripsin-benzeri serin proteaz (Nltry) proteinlerini kodlayan genleri karakterize etmişlerdir. Daha sonra pirinç bitkisine aktarmak üzere dsRNA yapıları oluşturulmuş ve bitkide dsRNA ifadesinin gerçekleştiği northern blot analizi ile kanıtlanmıştır. Transgenik bitki ile beslenen böceklerde bu genlerin ifadesinin baskılandığı gözlenmiştir. Ancak herhangi letal fenotipik etkiye rastlanmamıştır.

Okada et al., (2016) *Gnatoscerus cornutus* (Boynuzlu un böceği) üzerinde yaptıkları bir çalışmada larva döneminde uygulanan RNAi ile HDAC1 geni susturulunca ergin dönemde mandibulada küçülme görülürken, HDAC3 geni susturulunca tam tersi olarak mandibulada aşırı büyüme gerçekleştiğini, mandibulada oluşan bu fiziksel etkinin HDAC genleri tarafından yönetildiğini ortaya koymuşlardır.

Susturulması hedeflenen gen dizisinin doğru bir şekilde tespit edilmesi, uygulamanın sağlıklı sonuç vermesi açısından önemlidir. Ancak dizisi bilinmeyen genlerin susturulması hedeflendiğinde benzer diziler ya da gen ortologlarından yararlanılabilir. Bu durumda RNAi'nin başarısı dsRNA'nın uygulanma metoduna göre değişecektir. Örneğin V tipi-ATPaz geni patates böceğinde (*Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera: Chrysomelidae) başarılı bir şekilde susturulmuşken bu genin ortologuna sahip *D. virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae)'da da aynı başarı sağlanmıştır (Baum et al., 2007; Huvenne and Smagghe 2010).

Böceklerde larva, pupa ve erişkin gibi biyolojik dönemler yani metamorfoz, Juvenil hormon (JH) ile yönetilir. Araştırmacılar Metopren toleranslı (Met) reseptörün metamorfik değişimlerde rol aldığını ve bu reseptörü kodlayan genin BR-C geni olduğunu saptamışlardır. Bu genin dsRNA enjeksiyonu ile susturulması *T. castaneum*'da biyolojik evre geçişlerinde bireylerde yapısal anormalliklere ve biyolojik evre geçişlerinin süresinde gecikme veya hızlanma meydana getirdiğini bildirmişlerdir (Konopova and Jindra, 2008).

Vallier et al., (2009) tahıl depolarında ve arazilerinde önemli bir ekonomik zararlı grubu olan *Sitophilus spp.* (*Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais* ve *Sitophilus granarius*) cinsi böcekler ile yürüttükleri bu RNAi çalışmasında peptidoglikan tanıma proteinini kodlayan gen olan wpgrp1 genini susturmayı hedeflemişlerdir. Her ne kadar böcek bağışıklık sisteminde birden fazla gen rol alsada bu genler arasında wpgrp1 geninin bağışıklık sisteminde çok önemli bir etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Çünkü wpgrp1 geni larva dönemindeki *Sitophilus* cinsi böceklerde dışardan dsRNA enjeksiyonu ile ifadesi susturulduğunda bu böceklerin bazı bakteri türlerine karşı savunmasız kaldıklarını yaptıkları analizler sonucu ortaya koymuşlardır.

Böceklerde pestisitlere karşı direncin moleküler mekanizmasını açığa çıkarmak için *T. castaneum* kullanılan bir çalışmada 12 bireyin RNA-Seq yöntemi ile RNA dizileri ortaya konulmuştur. Pestisite duyarlı

ve dirençli bireyler arasında karşılaştırma yapılarak dirençli bireylerde 8 genin farklı ifade düzeyi gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmacılar bu genlerin sitokrom P450 enzimlerini kodlayan gen familyası içinde yer aldıklarını tespit etmişlerdir. Pestisite karşı dirençli bireyler büyük olasılıkla P450'de oluşan bu ifade artışına bağlı olarak piretroidler ve deltametrine karşı dirençli olabileceklerini ifade etmişlerdir. Belirlenen bu genler ileride yapılacak çalışmalarda gen bozma teknolojileri kullanılarak depo zararlısı böceklerin kimyasal mücadeleye karşı korundukları direnç genlerini hedef alabileceği iddia edilmiştir (Oppert et al., 2015).

2013 yılında Gratz ve arkadaşları CRISPR/Cas9 teknolojisini *Drosophila melanogaster* genomunda ilk olarak kullananlardır. İki hedef sgRNA ve tek iplikçikli bir oligonükleotid verici (ssODN) şablonu kullanılarak sarı lokusta bir 4.6 kb büyüklüğünde gen silimi (delesyon) oluşturmuşlardır (Gratz et al., 2013).

Gilles et al., (2016) *T. castaneum*'un U6 ve hsp68 promotörleri üzerinde kılavuz RNA'ların ve Cas9'un verimli knock-out ve knock-in yaklaşımlarının etkinliğini test etmişlerdir. Enjekte edilen bireylerin %58-80'inde mutasyonlar oluşurken bu bireylerin %71-100'ü oluşan bu mutasyonları bir sonraki kuşağa aktarabildiğini kaydetmişlerdir. Transgenleri gözlemlemek için EGFP (yeşil florasan proteini) kullanmışlardır. Ayrıca E-cadherin geninin CRISPR yöntemi ile susturulması (knock-out) sonucu fenotipte dorsal sıkışma kusuruna yol açtığını bildirmişlerdir.

CRISPR / Cas9 temelli teknoloji ile *Drosophila suzukii*'nin üreme öldürücü (Sxl) geninde bölgeye özgü mutasyonlar meydana getirerek dişi bireylerde anormal genital organ gelişmesi sağlanmıştır (Li ve Scott, 2016). Meccariello ve arkadaşları ise *Ceratitis capitata*'nın göz pigmentasyonunu değiştirebildiklerini rapor etmişlerdir (Meccariello et al., 2017).

Spodoptera littoralis ve *Plutella xylostella*'da CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak Slabd-A geni hedef alınmış ve anormal vücut segmentasyonu ve anormal pigmentasyon sergileyen Slabd-A eksikliği

olan bireyler elde edilmiştir (Bi et al., 2016 , Huang et al., 2016).

Chang et al., (2017) ise CRISPR/Cas9 sistemini kullanarak çiftleşme zamanının antagonist-aracılı optimizasyonunun *Helicoverpa armigera*'da maksimum doğurganlık sağladığını göstermişler ve bunun da zararlı çiftleşmesini yok etmek için yeni bir strateji olabileceğini belirtmişlerdir. *Spodoptera littoralis*'de olfaktor reseptör ko-reseptör (Orco) genini hedeflemek için CRISPR/Cas9 genom düzenleme araçları kullanılmış ve genom değişikliğine uğramış bireyler bitki kokularına ve üreme feromonlarına cevap verememişlerdir (Koutroumpa et al., 2016).

Locusta migratoria'nın fonksiyonel genlerini in vivo olarak incelemek için araştırmacılar, koku reseptörü ko-reseptör (Orco) genini hedefleyen bir sgRNA kullanarak genomunu modifiye etmişlerdir. Bu çalışma, CRISPR / Cas9 sisteminin, genom düzenlemesi için çekirgelede ilk çalışma olmuş ve sonuçları çekirge kontrolü için yeni fikirler önermiştir (Li et al., 2016).

Awata et al., (2015) Cırcır böceklerinde (*Gryllus bimaculatus*) CRISPR/Cas9 teknolojisini kullanarak tip 1 dopamin reseptör genini (Dop1) baskılamaya çalışmışlardır ve böylece öğrenme yetilerini olumsuz etkilemişlerdir. *Tribolium castaneum*'da 2015 yılında Gilles ve arkadaşları CRISPR-Cas9 sistemini kullanmışlardır. Çalışmalarında E-cadherin genini mutasyona uğratılmasının sonucunda böceklerde dorsal kapanmada ciddi sorunlara neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Gilles et al., 2015).

Olgun miRNA'lar, hedef gene baz eşleşmesiyle bağlanarak mRNA degradasyonu veya transkripsiyon inhibisyonu yoluyla transkripsiyon sonrası gen susturulmasında (PTGS) rol oynayarak gen ifadesini düzenlerler. Yapılan bazı çalışmalarda, gen susturulmasının yalnızca PTGS yoluyla değil aynı zamanda ilgili gen bölgelerinde DNA metilasyonu ile transkripsiyonel gen susturulmasında da (TGS) rol oynadıkları gösterilmiştir (Rogers and Chen, 2013).

Drosophila melanogaster ile yapılan epigenetik bir çalışmada DNA metilasyonu araştırılmış ve CpG bölgelerindeki artışın

gen ifadesi üzerinde büyük etkiye sahip olduğu ve ayrıca DNA metilasyonunun çoğunlukla embriyonik dönemin erken döneminde olduğunu gözlemlemişlerdir (Collins et al., 2010).

Tribolium castaneum ile yapılan epigenetik bir çalışmada DNA metilasyonu, ısı stresi uygulanarak araştırılmış ve heterokromatin yapısının etkilendiği saptanmıştır (Felicello et al., 2013).

Araştırmacılar *Galleria mellonella*'nın DNA metilasyonu yöntemi ile incelemişler ve parazitik funguslar kullanarak tepkilerine bakmışlardır. Bu durumun larvada metil transferaz genlerinin ifadesine neden olduğunu ortaya koymuşlardır (Vilcinskas, 2016).

Yapılan kapsamlı bir araştırmada *T. castaneum*, *D. melanogaster*, *Anopheles gambia*, *Bombyx mori*'de DNMT1, DNMT2, DNMT3 DNA metilasyon sistemi için gerekli olup olmadığı incelenmiştir. Sonuç olarak ise DNMT3 yokluğunda DNA metilasyonunun gerçekleşmediği belirlenmiştir (Yan et al., 2015).

Sonuç

Genetik mühendisliği teknolojileri kullanılarak feromonal veya reseptör genler hedef alınabilir. Böylece zararlı böceklerde eşlerini bulma, dolayısıyla üreme engellenerek zararlı böcek popülasyonu düşürülebilir. *T. castaneum* ve *T. molitor* gibi ambar zararlı böcekler besinlerini sindirebilmek için sistein peptidaz enzimlerini kullanırlar. Bu enzimleri kodlayan genler hedef alınarak bu iki önemli depo zararlısının sindirim sistemi bloke edilip büyüme yavaşlatılabilir. Ayrıca bağışıklık sisteminde rol alan genler hedef alınarak, enfeksiyona karşı zararlı böceklerin direnci zayıflatılabilir. Böylece entegre zararlı mücadelesi (IPM) uygulanarak *Bacillus thuringiensis*'in ürettiği böcek öldürücü toksinlere karşı direnci zayıflayan zararlılar enfeksiyona karşı savunmasız bırakılabilir. Bu yöntemlerin pestisit kullanımını azaltarak entegre savaşım yaklaşımı içerisinde yer alacağına inanılmaktadır.

Kaynaklar

- Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K.J., Specht, C.A., Tomoyasu, Y., Lorenzen, M.D., Kanost, M., Beeman, R.W., The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix, respectively. *Insect Molecular Biology*. 2005;14:453–463.
- Arakane, Y., Specht, C.A., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W., Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2008;38:959–962.
- Aras, S., Aydın, S.S., Fazlıoğlu, A., Duman, D.C., Büyük, İ., Dericci, K., 2015. Bitkilerde RNA interferans. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(3): 255-262s.
- Aronstein, K., Oppert, B., Lorenzen, M.D., 2011. RNAi in Agriculturally-Important Arthropods. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, August 29, 2011 DOI: 10.5772/832.
- Awata, H., Watanabe, T., Hamanaka, Y., Mito, T., Noji, S., ve Mizunami, M., 2015. Knockout crickets for the study of learning and memory: Dopamine receptor Dop1 mediates aversive but not appetitive reinforcement in crickets. *Scientific Reports* 5:15885.
- Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J., Voytas, D.F., 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*. 2011Jul;39(12):e82.doi: 10.1093/nar/gkr218. Epub 2011 Apr 14.
- Chang, H., Liu, Y., Ai, D., Jiang, X., Dong, S., ve Wang, G., 2017. A pheromone antagonist regulates optimal mating time in the moth *Helicoverpa armigera*. *Current Biology* 27, 1610–1615.

- Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S., Kim, J.S., 2014. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. Article published online before print. Article, supplemental material, and publication date are at <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.162339.113>.
- Collins, L.J.; Schönfeld, B.; and Chen, X.S. The epigenetics of non-coding RNA. In: Tollefsbol, T., Ed. Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. New York: Elsevier, pp. 49–61, 2010.
- Çetintaş, V.B., Kotmakçı, M., Kaymaz, B.T., 2017. Bağışıklık Yanıtından Genom Tasarımına; CRISPR-Cas9 Sistemi. Derleme. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 37(1):27-42 İzmir, Türkiye.
- Dağeri, A., Güz, N., Gürkan, M.O., 2012. Böceklerle Mücadelede Yeni Bir Strateji: RNA İnterferans. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Türkiye Entomoloji Bülteni, 2(3):223-230s. Ankara.
- Dönitz, J., Engel, C.S., Grossmann, D., Gerischer, L., Tech, M., 2015. iBeetle-Base: a Database for RNAi Phenotypes in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research, Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D720-5.
- Emekçi, M., Ferizli, A.G., 2010. Depolanmış Ürün Zararlılarıyla Savaşım, Sorunlar ve Çözüm Yolları. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi 11-15 Ocak 2010 Ankara, Bildiriler Kitabı 2, 579-587.
- Fabrick, J.A., Kanost, M.R., Baker, J.E., 2005. RNAi-Induced Silencing of Embryonic Tryptophan Oxygenase in the Pyralid moth, *Plodia interpunctella* 9pp. Journal of Insect Science, 4:15.
- Feliciello, I., Parazajder, J., Akrap, I., Ugarkovic, D., 2013. First evidence of DNAmethylation in insect *Tribolium castaneum*: environmental regulation of DNAmethylation within heterochromatin. Epigenetics 8, 534–541.
- Gaj, T., Gersbach, C.A., Barbas, C.F., 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in Biotechnology, Volume 31, Issue 7, July 2013, Pages 397-405.
- Gilles, A.F., Schinko, J.B., Averof, M., 2015. Efficient CRISPR-Mediated Gene Targeting and Transgene Replacement in the Beetle *Tribolium castaneum*. Development 2015. 142: 2832-2839.
- Gök, Z.G., Tunalı, B.Ç., 2016. CRISPR-Cas İmmün Sisteminin Biyolojisi, Mekanizması ve Kullanım Alanları. Kırıkkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, Uluslararası Mühendislik Araştırma ve Geliştirme Dergisi, International Journal of Research and Development, Vol.8, No.2.
- Gündoğdu, R., Çelik, V., 2009. RNA İnterferans(RNAi). Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 25(1-2):34-47s. Kayseri.
- Hatipoğlu, R., 2016. Transgenik Bitkilerin Dünü Bugünü ve Geleceği. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü. Tarla Bitkileri Merkezi Araştırma Enstitüsü Dergisi, Özel sayı:2, 346-356s. Adana, Türkiye.
- Huang, Y., Chen, Y., Zeng, B., Wang, Y., James, A. A., Gurr, G. M., vd., 2016. CRISPR/Cas9 mediated knockout of the abdominal-A homeotic gene in the global pest, diamondback moth (*Plutella xylostella*). Insect Biochemistry and Molecular Biology 75, 98–106.
- Jasrapuria, S., Specht, C.A., Kramer, K.J., 2013. Gene Families of Cuticular Proteins Analogous to Peritrophins (CPAPs) in *Tribolium castaneum* Have Diverse Functions. PLoS ONE 7(11): e49844.doi:10.1371/journal.pone.0049844.

- Joga, M.R., Zotti, M.J., Smaghe, G.S., Christiaens, O., 2016. RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Front. Physiol.* 7:553. doi: 10.3389/fphys.2016.00553.
- Karagüzel, A., Kalay, E., Celep, F., 2007. RNAi Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 33(1):41-44s. Bursa.
- Knorr, E., Schmidberg, H., Vilcinskas, A., Altıncicek, B., 2009. MMPs Regulate both Development and Immunity in the *Tribolium* Model Insect. *PLoS ONE* 4(3): e4751. doi:10.1371/journal.pone.0004751.
- Kocagöz, T., 2014. Genleri Değiştirmek Hiç Bu Kadar Kolay Olmamıştı. 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. Konferans:1.
- Konopova, B., Jindra, M., 2008. Broad-Complex acts downstream of Met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive holometabolism metamorphosis. *Development* 2008 135: 559-568; doi: 10.1242/dev.016097.
- Koutroumpa, F. A., Monsempe, C., François, M. C., De Cian, A., Royer, C., Concordet, J. P., vd., 2016. Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 induces anosmia in a crop pest moth. *Scientific Reports* 6:29620.
- Li, F., Scott, M. J., 2016. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the White and Sex lethal loci in the invasive pest, *Drosophila suzukii*. *Biochemistry Biophysics Research Communications*. 469, 911–916.
- Li, Y., Zhang, J., Chen, D., Yang, P., Jiang, F., Wang, X., vd., 2016. CRISPR/Cas9 in locusts: successful establishment of an olfactory deficiency line by targeting the mutagenesis of an odorant receptor co-receptor (Orco). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 79, 27–35.
- Luby J.L., 2015. Poverty's Most Insidious Damage: The Developing Brain. *JAMA Pediatr.* Sep;169(9):810-1. doi: 10.1001/jamapediatrics.2015.1682.
- Meccariello, A., Monti, S. M., vd., 2017. Highly efficient DNA-free gene disruption in the agricultural pest *Ceratitidis capitata* by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Scientific Reports* 7: 10061.
- Miller, S.C., Miyata, K., Brown, S.J., Tomoyasu, Y., 2012. Dissecting Systemic RNA Interference in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*: Parameters Affecting the Efficiency of RNAi. *PLoS ONE* 7(10): e47431. doi:10.1371/journal.pone.0047431.
- Noh, M.Y., Kramer, K.J., Muthukrishnan, S., 2015. Loss of function of the yellow-e gene causes dehydration-induced mortality of adult *Tribolium castaneum*. *Developmental Biology*. Volume 399, Issue 2, 15 March 2015, Pages 315–324.
- Oppert, B., Guades, R.N.C., Aikins, M.J., Philips, T.W., Perkin, L., Chen, Z., 2015. Genes Related to Mitochondrial Functions are Differentially Expressed in Phosphine-Resistant and Susceptible *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*. 2015 Nov 18; 16:968.
- Ozawa, T., Mizuhara, T., Arata, M., Shimada, M., Niimi, T., 2016. Histone Deacetylases Control Module-Specific Phenotypic Plasticity in Beetle Weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113: 15042-15047.
- Patnaik, B.B., Patnaik, H.H., Seo, G.W., Jo, Y.H., Lee, Y.S., Lee, B.L., Han, Y.S., 2014. Gene Structure, cDNA Characterization and RNAi-based Functional Analysis of a Myeloid Differentiation Factor 88 Homolog in *Tenebrio molitor* Larvae Exposed to *Staphylococcus aureus* Infection. *Dev Comp Immunol.* 2014 Oct; 46(2): 208-21.
- Perkin, L.C., Adrianos, S.L., Oppert, B., 2016. Gene Disruption Technologies Have the Potential to Transform Stored Product Insect Pest Control. *Insects*, 7, 46.

- Seo, G.W., Jo, Y.H., Seong, J.H., Park, K.B., Patnaik, B.B., Tindwa, H., Kim, S., Lee, Y.S., Kim, Y.J., Han, Y.S., 2016. The Silencing of a 14-3-3ε Homolog in *Tenebrio molitor* Leads to Increased Antimicrobial Activity in Hemocyte and Reduces Larval Survivability. *Genes* 2016, 7, 53; doi:10.3390/genes7080053.
- Shah, M.V., Namigai, E.K.O., Suzuki, Y., 2011. The role of canonical Wnt signaling in leg regeneration and metamorphosis in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.mod.2011.07.001.
- Tang, W., 2015. A unique gene regulatory network resets the human germline epigenome for development. *Cell* 161, 1453–1467.
- Tereshchenkova, V.F., Goptar, I.A., Kulemzina, I.A., Zhuzhikov, D.P., Serebryakova, M.V., Belozersky, M.A., Dunaevsky, Y.E., Oppert, B., Filippova, I.Y., Elpidina, E.N., 2016. Dipeptidyl Peptidase 4 – An Important Digestive Peptidase in *Tenebrio molitor* Larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (76) 38-48s.
- Ulrich, J., Dao, V.A., Majumdar, U., Engel, C.S., 2015. Large Scale RNAi Screen in *Tribolium* Reveals Novel Target Genes for Pest Control and the Proteasome as Prime Target. *BMC Genomics* 16:674.
- Vallier, A., Monegat, C.V., Laurençon, A., Heddi, A., 2009. RNAi in the Cereal Weevil *Sitophilus* spp: Systemic Gene Knockdown in the Bacteriome Tissue. *BMC Biotechnology*, 9, pp.44.
- Vilcinskas A., The role of epigenetics in host–parasite coevolution: lessons from the model host insects *Galleria mellonella* and *Tribolium castaneum* *Zoology*, 119 (2016), pp. 273–280.
- Walski, T., Damme, E.J.M.V., Smargiasso, N., Christiaens, O., 2016. Protein N-glycosylation and N-glycan trimming are required for postembryonic development of the pest beetle *Tribolium castaneum*. *Scientific Reports* 6, Article number: 35151.
- Watanabe, T., Ochiai, H., Sakuma, T., Horch, H.W., Hamaguchi, N., Nakamura, T., Bando, T., Ohuchi, H., Yamamoto, T., Noji, S., Mito, T., 2012. Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nature Communications*, (3:1017) DOI: 10.1038/ncomms2020.
- Yan, H., Bonasio, R., Simola, D.R., Liebig, J., Berger, S.L., Reinberg D., DNA methylation in social insects: how epigenetics can control behavior and longevity *Annu. Rev. Entomol.*, 60 (2015), pp. 435–452.
- Yılmaz, S.Z., 2010. Gen Susturulmasında Plazmit-siRNA ile Lentivirüs-siRNA Temelli Sistemlerin Etkinliklerinin Karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Yorulmaz, S., Ay, R., 2006. Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların (GDO) Entomoloji Alanındaki Uygulama Olanakları. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 1(2):53-59.