

## **Derleme (Review)**

# **Böceklerle mücadelede yeni bir strateji: RNA interferans**

A new approach to insect pest management: RNA interference

**Aslı DAĞERİ<sup>1</sup>**

**Nurper GÜZ<sup>1\*</sup>**

**M. Oktay GÜRKAN<sup>1</sup>**

### **Summary**

RNA Interference is a technique, known as “gene silencing”, used to suppress the expression of specific genes. Important studies in plant protection have been conducted through RNAi method. In addition to the high cost, insecticides have a negative impact on the environment and upon humans, as well as killing non-target insects, whilst resistance has developed to various types of insecticides. Thus alternative pest management strategies are needed to diminish reliance on insecticides. RNAi mediated gene silencing in insects targets specific genes in order to reduce insect populations and to avoid insect damage. In this review, we give a brief introduction to the discovery of RNAi, describe its molecular mechanisms and the current methods for RNAi delivery as well as the factors affecting successful RNAi applications are discussed. Furthermore the current studies of RNAi-based experiments in insects and the applications of RNAi for species-specific insecticides are reviewed.

**Key words:** Pest management, RNA interference, gene silencing, plant protection

### **Özet**

RNA İnterferans, “gen susturulması” olarak bilinen spesifik genlerin ifadesini engellemede kullanılan bir tekniktir. Geliştirilen bu metod sayesinde Bitki Koruma alanında son yıllarda önemli çalışmalar yapılmıştır. Tarımsal zararlılarla mücadelede kullanılan pestisitlerin insan ve çevre üzerindeki olumsuz etkisi ve böceklerin pestisitlere direnç kazanması ile alternatif mücadele stratejilerinin geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır. RNAi teknolojisi ile zararlıya spesifik hedef gen bölgeleri susturularak, gerek böcek zararının gerekse böcek popülasyonlarının azaltılması hedeflenmektedir. Bu derlemede RNAi'nin tarihçesi, moleküler mekanizması hakkında bilgi verilerek RNAi uygulama metodları ve bu tekniğin başarısını etkileyen faktörler tartışılmıştır. Son olarak böceklerde RNAi teknolojisi kullanılarak yapılan güncel çalışmalar ve türe özgü insektisit geliştirmek için RNAi uygulamalarından bahsedilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Zararlı yönetimi, RNA interferans, gen susturulması, bitki koruma

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 06110, Dışkapı, Ankara, Türkiye

\* Sorumlu yazar (Corresponding author) e mail: nurperguz@agri.ankara.edu.tr

Alınış (Received): 12.09.2012

Kabul ediliş (Accepted): 07.11.2012

## RNA interferansın keşfi

Moleküler biyologlar bazı hücrelerde fonksiyon kaybı sağlamak ve organizmada bulunan çeşitli moleküllerin üretimini durdurmak için, ilgili genlerin ifadesini mRNA seviyesinde azaltmak ya da susturmada son 15 yılda önemli çalışmalar yapmışlardır. Napoli ve Jorgensen (1990) mor renkli çiçeklere sahip petunya bitkisinde, pigmentasyonu katalizleyen kalkon sentaz (CHS) enziminin ekspresyonunu arttırarak, koyu mor çiçekli petunya bitkileri üretmek istemişlerdir. Ancak beklenenin aksine, transgenik petunyalarda CHS'nin baskılandığını ve yabancı tip petunyalardan daha az mor renkli çiçek oluşumunu gözlemişlerdir. Bu şekilde çiçek rengini değiştirme çalışmaları, gen sessizleştirilmesinin ilk sinyallerini vermiştir. Benzer çalışmalar yapılarak bitkide bu mekanizmanın mRNA degradasyonunun artması ve gen ekspresyonunun post transkripsiyonel inhibisyonunun oluşmasıyla birlikte ekspresyonda azalma gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Van et al. 1994). Bu fenomen gen ekspresyonunda eş-baskılama olarak adlandırılmıştır (Mol ve Van Der, 1991).

RNA İnterferans (RNAi) çift zincirli RNA (doublestrand RNA, dsRNA) ile post-transkripsiyonel gen ifadesinin düzenlenmesinde kullanılan bir mekanizmadır. dsRNA'nın gen ekspresyonunu inhibe ettiği ilk defa deneysel olarak, Fire ve Mello (1998) tarafından moleküler genetik çalışmalarında model organizma olarak kullanılan nematod türü *Ceanorhabditis elegans*'la yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Araştırmacıların yayınladıkları çalışma 2006 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülünü beraberinde getirmiştir.

## RNAi mekanizması

RNAi sürecinde, çift sarmal yapıdaki anlamlı (sense) dizi uzaklaştırılır ve hedef mRNA'ya komplementer (antisense) dizi RISC (RNA - Induced Silencing Complex) faktörü üzerinde, mRNA'nın anlamlı dizisine bağlanır. Gen susturulması, nükleaz aktiviteli bir multiprotein kompleksi olan RISC faktörü ile kontrol edilir. RISC faktöründe bulunan Argonate isimli proteinle etkileşim içerisine giren mRNA kesilip parçalanarak sessizleşme gerçekleşir (Daneshmandi, 2006). Mekanizmada görev alan iki küçük RNA, mikroRNA (miRNA) ve small interfering RNA (siRNA), yakın zamanlarda keşfedilmiştir.

Küçük düzenleyici RNA moleküllerinin sitoplazmazdaki aktif formları tek zincirlidir ve hedefteki nükleotid sekanslarına baz eşleşmesi ile birleşirler. Bu moleküller 20 ila 26 nükleotit uzunluğundadır. miRNA'lar transkripsiyonu baskılayıcı rol üstlenirken, siRNA'lar ise spesifik RNA'ların degradasyonuna neden olur. Small RNA'ların iki çeşidi de aktivitesini gösterebilmek için RISC'te bulunan Argonate multidomain proteinine bağlanmalıdır. Bu küçük RNA'ların büyüme ve gelişme esnasında, hücre farklılaşmasında ve viral enfeksiyona karşı savunmada önemli rol oynadıkları tespit edilmiştir (van den Berg et al. 2008).

## Böceklere uygulanan RNAi metodları

Spesifik bir geni baskılamak amacıyla *C. elegans*'ı oral yoldan dsRNA ile besleme tekniğinin geliştirilmesinin ardından (Timmons & Fire 1998; Timmons et al. 2001), böceklerdeki hedef genleri dsRNA aracılığı ile baskılamada ve susturmada kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

### 1- Mikroenjeksiyon yöntemi

Böceklerle yapılan RNAi çalışmalarının çoğunda önerilen metod, in vitro olarak sentezlenen uzun dsRNA'nın homösol içerisine mikroenjeksiyonudur. dsRNA'nın böceğe doğrudan enjekte edilmesi, sistemik bir RNAi cevabı sağlayarak, böceğin vücudunda etkili bir şekilde yayılmasını sağlayan bir yöntemdir. Ancak mikroenjeksiyon yönteminin bazı sınırlamaları vardır. Örneğin, böceğin ergin dönemine

uygulanması kolay olduğu halde, küçük böceklere uygulanması zordur; özellikle Lepidopter larvalarına yapılan uygulamalar bir takım sıkıntıları beraberinde getirmektedir. Bir başka sorun ise, enjeksiyon baskısıyla ve enjeksiyon sonrası oluşacak yaralanmanın böceklerde savunma reaksiyonlarını devreye sokmasıdır. Bağışıklık sistemine özgü genlerin çalışılması durumunda, bu yaralanma ciddi bir sorun teşkil eder (Yang et al. 2011).

## 2- Yapay besi ortamı ile besleme

Son yıllarda yapılan çalışmalar dsRNA'nın bir diyet bileşeni olarak böcek beslenmesinde kullanımının hedef genlerin ekspresyonlarını baskılamada etkili olacağını göstermiştir (Turner et al. 2006, Mao et al. 2007, Baum et al. 2007). Özellikle çok küçük böcekler için mikroenjeksiyon uygulanmasının zor olduğu durumlarda bu yöntem tercih edilebilir. dsRNA böcek vücuduna doğal bir şekilde verildiği için, mikroenjeksiyona göre böceğe daha az zarar verir (Chen et al. 2010). Ancak bu yöntemin de başarısızlıkla sonuçlandığı çalışmalar mevcuttur. Örneğin Rajagopal et al. (2002) *Spodoptera littoralis*'in (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) orta bağırsağında eksprese olan *aminopeptidaz slapn* genini mikroenjeksiyon yöntemi ile susturulamamışken; besleme ve daldırma yöntemleri ile herhangi bir RNAi etkisi saptayamamışlardır. Bu yöntemle, böcek türüne ve hedef gen bölgesine göre, uygulamadaki başarı oranları farklılık göstermektedir. Yapılan bir araştırmada *Epiphyas postvittana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae) larvası, orta bağırsak *karboksilesteraz* geni *EposCXE1*'nin dsRNA'sını içeren yapay besi ortamı ile beslenmiş ve larvada bu genin ekspresyonunun inhibe olduğu görülmüştür (Turner et al. 2006). Başka bir çalışmada ise *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae)'da tükrük bezi transkriptini kodlayan *nitroforin (NP2)* geni hem beslenme yolu ile hem de mikroenjeksiyon yöntemi ile inhibe edilmeye çalışılmıştır. Her iki uygulamayla da *NP2* ekspresyonunda bir azalma tesbit edilmiş ayrıca mikroenjeksiyon yönteminin (%75) besleme yönteminden (%42) daha etkili olduğu belirlenmiştir (Araujo et al., 2006). Çeç sineğinde (*Glossina morsitans morsitans*) RNAi mekanizması ile ilgili yapılan bir çalışmada, *TsetseEP* ve *Transferrin 2A192* genlerinin dsRNA'ları sineğin yapay besi ortamına eklenerek sineğin beslenmesi sağlanmıştır. Orta bağırsakta eksprese olan *TsetseEp* geninin inhibisyonu başarılı olduğu halde, benzer başarı yağ dokusunda bulunan *Transferin 2A192* geni için sağlanamamıştır (Walshe et al. 2009).

## 3- Daldırma yöntemi

Böcekte genellikle belirli hücreler, dokular ve embriyoya uygulanan bir metoddur. Gelişme dönemindeki böcekler, dsRNA'yı solüsyondan kolaylıkla absorbe edebilir. *D. melanogaster* embriyoları dsRNA solüsyonuna daldırılarak hedef gen ekspresyonunun engellenmesi sağlanmıştır (March and Bentley 2007). Daldırma yönteminde diğer yöntemlerden farklı olarak daha az dsRNA kullanılır. Ayrıca bu yöntemin, mikroenjeksiyon yöntemi kadar etkili olabileceği düşünülmüştür (Eaton et al. 2002).

## 4- dsRNA ifadesi üreten bakterilerle besleme yöntemi

Hedef genlerin ekspresyonunu engellemede etkili diğer bir yöntem, böceği dsRNA ifadesi yapan bakterilerle besleme yöntemidir. Diğer metodlara göre en büyük avantajı ise uygulama başına düşük maliyetli olmasıdır. Bu yöntemde RNAaz III ve normal bakteri hücrelerinde dsRNA'yı degrade eden enzimleri içermeyen bakteri suşları kullanılır (Timmons et al. 2001). *Spodoptere exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvasının kitin sentaz geninin dsRNA'sı üreten bakteri ile beslenmesi sonucu 4. ve 5. dönemdeki larvalarında deri değiştirememesi ve çift baş oluşumu fenotipleri gözlenmiştir (Tian et al. 2009).

## 5- dsRNA'nın virüs aracılığı ile alınması

Replikasyon esnasında dsRNA formu taşıyan bir virüsün konukçu hedef genini enfekte etmesi yoluyla kullanılan bir metottur. 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 çıktığı gözlenmiştir (Uhlirova et al. 2003). Virüs aracılığı ile RNAi çalışmaları henüz yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ancak bu yöntemin en önemli bir avantajı enfeksiyonla birlikte virüsün konukçu popülasyonunda hızla yayılmasıdır (Yang et al. 2011).

## 6- Transgenik böceklerin geliştirilmesi

Bu yöntem ilk kez *D. melanogaster*'de fonksiyonel genom bilim çalışmalarının organizmaya aktarılmasında kullanılan GAL4/UAS (upstream activating sequence) transgenik sistemi ile gerçekleştirilmiştir (Kennerdell and Carthew 2000, Tavernarakis et al. 2000). Daha sonra bu teknoloji *Aedes aegypti*'nin (Linnaeus) (Diptera: Culicidae) dsRNA üreten transgenik böceğe uyarlanması ile geliştirilmiştir (Travanty et al. 2004). Bu yöntemin en büyük avantajı, transgenik böceğin dsRNA'yı nesiller boyunca aktarabilecek ve dsRNA'nın ekspresyonunu sürekli ve kalıcı bir şekilde sağlayacak olmasıdır. Teknik transgenik böceklerin popülasyonda değişimler meydana getirmesi ve ortaya çıkan kısır böceklerin popülasyonu azaltması bakımından büyük önem taşır (Yang et al. 2011).

## 7- RNAi ile zararlı böcek türlerine dirençli bitki üretimi

Fitofag böceklerle karşı bitkilerde dayanıklılık sağlamak amacıyla RNAi teknolojisinin geliştirilmesiyle Coleoptera ve Lepidoptera takımlarına ait pek çok böcekte başarılı uygulamalar yapılmıştır. (Baum et al. 2007, Mao et al. 2007). Bu yaklaşımdan beklenen verimi almak için iki önemli faktör vardır (Price and Gatehouse 2008):

a) Uygun böceğin saptanması

b) dsRNA'nın böcek tarafından alınması için yeterli ve uygun miktardaki dsRNA'nın bitki bünyesinde eksprese olması

Transgenik bitkilerle yapılan çalışmalarda, böcekte eksprese olan spesifik genlere karşı dsRNA'nın ekspresyonuna yönelik, zararlılara karşı bir koruma sağlandığı ve böceklerle dayanıklı bitkilerden yeni bir nesil oluşturulabileceği gösterilmiştir (Baum et al. 2007, Mao et al. 2007). Üretilen transgenik bitkiler ekonomik açıdan önemli tarımsal zararlılardan yeşil pamuk kurdu (*Helicoverpa armigera* Hübner, Lepidoptera: Noctuidae) ve mısır kök kurduna (*Diabrotica virgifera* Leconte, Coleoptera: Chrysomelidae) karşı kullanılmış ve kuvvetli dayanıklılık göstermişlerdir.

## Böceklerde RNA interferansın başarısını etkileyen faktörler

### 1- dsRNA'nın konsantrasyonu

Başarılı bir RNAi uygulaması için hedef gene ve organizmaya özgü optimal bir konsantrasyon belirlenmelidir. RNAi uygulamalarında yüksek konsantrasyonların daha etkili bir susturma sağlayacağına dair yanlış düşünceler vardır (Meyering-Vos ve Muller 2007, Shakesby et al. 2009, Huvenne ve Smaggho 2010).

## 2- Nükleotid dizisi

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* (Say), Coleoptera: Chrysomelidae) başarılı bir şekilde susturulmuşken bu genin ortoloğuna sahip *D. virgifera virgifera*'da ise (LeConte, Coleoptera: Chrysomelidae) aynı başarı sağlanmıştır. (Baum et al. 2007, Huvenne ve Smaghe 2010).

## 3- dsRNA fragmentinin uzunluğu

dsRNA'nın organizma ve hücre kültürleri tarafından alınması, hedef genin susturma başarısını belirleyen önemli bir etkidir (Mao et al. 2007, Saleh et al. 2006). Uygulanan yöntemle göre fragment uzunluğu değişebilir.

## 4- Susturma etkisinin süresi

RNAi çalışmalarında kullanılan yöntemin organizmada oluşturduğu tepki uygulamanın süresine bağlı olarak artış gösterebilir. Turner et al. (2006) elma güvesi larvalarını dsRNA ile besledikten sonra, yeterli düzeyde RNAi etkisi sağlamışlardır. 2 günden fazla bir sürede dsRNA (*EposCXE1*) ile beslenen elma güvelerinde, larva orta bağırsağında eksprese olan karboksilesterazlarının (*CXE1*) transkript seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Maksimum düzeyde baskılanma ise 7 gün sonra meydana gelmiştir.

## 5- Hedef organizmanın biyolojik dönemi

RNA interferans tekniğinin böceğin ergin dönemlerine uygulanması daha kolay olmasına rağmen, genç dönemlerdeki bireylerde her zaman daha iyi susturma etkisi gözlenmiştir. *R. proxilus*'un 4. nimf döneminde tükrük bezini kodlayan *Nitroforin-2* genine dsRNA ile yapılan müdahalede herhangi bir susturma etkisi gözlenmemişken, 2. evresinde % 42'lik bir başarı sağlanmıştır (Araujo et al. 2006).

Bu faktörlere ek olarak yapılan araştırmalar doğrultusunda başka etkenlerden de bahsetmek mümkündür. Farklı dokularda regüle olan genlerin susturulmasındaki dsRNA etkisi, dokulara göre değişik oranlarda başarı sağlayabilir. Örneğin *B. germanica*'nın yağ dokusunda lipoforin reseptörünün susturulması ovarye göre daha hızlı meydana gelmiştir. (Ciudad et al., 2007).

## 6- Susturulması hedeflenen genin ekspresyon düzeyi

Belli dokularda mRNA'nın yüksek miktarlarda eksprese olması, hedef genin baskılanmasını engelleyen bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. *Blatella germanica*'da L. (Orthoptera: Blattellidae) sadece birkaç saat süreyle eksprese olan, korion oluşumundan sorumlu *yellow-g* genini eksprese olduğu bu kısa süre içerisinde susturmak mümkün olmamıştır (Irles et al. 2009).

Ayrıca dsRNA'nın degrade olması, yetersiz amplifikasyon ve yetersiz RNA sinyali, dsRNA uygulanmasından sonra RNA'nın az miktarda etkilenmesi, dokunun dsRNA'yı az geçirmesi, belli dokularda ekspresyonu az olan genlerin bulunması ve hedef mRNA'nın RNAaz'lar tarafından korunması gibi etkenler RNAi uygulamalarının başarısını etkileyen diğer faktörler olarak sıralanabilir.

Son olarak RNAi uygulamalarının ardından hedef genin ekspresyon düzeyinin Northern blot analizi ya da Real time PCR analizleri ile kontrol edilmesi önerilmektedir.

## RNA interferans teknolojisinin bitki koruma alanında uygulanması

*Drosophila melanogaster*'in genom dizisinin çıkarılmasının ardından pek çok genin fonksiyonu RNAi metodu sayesinde keşfedilmiştir (Mathey-Prevot and Perrimon, 2006). Pek çok alanda kullanım olanağına sahip RNAi genom bilim çalışmalarının yanı sıra böceklerle mücadelede kullanım potansiyeli olan bir teknolojidir. RNA interferans teknolojisinin bitki koruma alanında uygulanmasına yönelik örnekler vermek mümkündür.

Mao et al. (2007) RNAi uygulamasında kullanmak üzere *Heliothis armigera*'nın (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) orta bağırsağında eksprese olan *CYP6AE14* adını verdikleri *sitokrom P450* genini belirlemişlerdir. Bu gen, pamuğun sekonder metaboliti olan gossipolün detoksifikasyonu ile ilişkili olup *H. armigera*'nın gossipole toleransını sağlar. 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.

Başka bir çalışmada Baum et al. (2007) mısır kök kurduna ait bir cDNA kütüphanesi oluşturmuş; fonksiyonel olarak önemli genlerin ekspresyonunu 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 dizilerde spesifik bir baskılanma gerçekleştirildiği görülmüştür. Araştırmacılar bu genlerin ekspresyonlarının azalmasıyla ile gelişimin engellendiğini ve ölümlerin ortaya çıktığını gözlerken en etkili dsRNA'nın, *V-tipi ATPaz-A* genine ait olduğu tespit edilmiştir.

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*'de (Kollar) (Isoptera: Rhinotermitidae) kast sistemi organizasyonundan sorumlu olan heksamerin 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 fenomenin girmesine sebep olmuştur. Böylece RNAi teknolojisi, daha güvenli ve çevre dostu pestisitlerin üretilebileceğine dair farklı bakış açıları geliştirilmesine katkı sağlamıştır.

Martin et al. (2006) *B. germanica*'nın ergin dişi bireylerinde eksprese olan *vitellogenin* genini in vivo başarılı bir şekilde susturmuşlardır. Susturma sonrası kontrol grubuna kıyasla gelişimi sekteye uğramış küçük ovarylerin oluştuğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada böceğin ekdizon hormonunu kodlayan genin susturulması sonucunda, böceğin nimften ergine geçişini tamamlayamadığı, ergin dönemdeki böceklerde ise kanatlarda renk ve uzama anomalilerinin gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Farklı bir çalışmada ise sivrisinekte (*Culex pipiens* Say, Diptera: Culicidae) diyapozun regülasyonunu araştırmak için RNAi tekniği kullanılmıştır (Sim and Denlinger, 2008). Diyapozda olmayan sivrisinekte insülin reseptörünün uyarılması ile juvenil hormonunun salgılanması ardından ergin dişi bireylerde normal yumurta gelişimi gözlenmektedir. Diyapozda olan sivrisineklerde ise, insülin alınmamasına bağlı olarak, reseptörün uyarılması ile juvenil hormonun salgılanması söz konusu olamayacağı için, bu durumda FOXO transkripsiyon faktörü devreye girmektedir. Böylece sivrisinek diyapoz süresince yağ depolamakta ve soğuk gibi çevresel stres faktörlerine direnç göstermektedir. Aynı çalışmada sivrisineğin diyapozda olmayan döneminde eksprese olan insülin reseptör genininin susturulmasıyla, ovarylerin tıpkı diyapozdaki böceklerdeki gibi gelişimini tamamlayamayıp küçük kaldığı gözlenmiştir. Ayrıca diyapozdaki sivrisineğin FOXO transkripsiyon faktörü baskılanarak, böceğin vücudunda yağ depolanmasının engellen-

diği gözlenmiştir. Bu durum RNAi uygulaması ile böceğin fizyolojisinde meydana gelen değişikliklerle, stres faktörlerine karşı dayanıksız fenotiplerin geliştirilmesinin, mücadelede başarı sağlayabileceği sonucunu gözler önüne sermektedir.

Zha et al. (2011) pirinç zararlısı olan *Nilaparvata lugens*'in Stal (Hemiptera: Delphacidae) nimf ve erginlerinin orta bağırsağında aşırı miktarda eksprese olan hekzos 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 ekspresyonunun gerçekleştiği northern blot analizi ile kanıtlanmıştır. Transgenik bitki ile beslenen böceklerde bu genlerin ekspresyonunun baskılandığı gözlenmiştir. Ancak herhangi letal fenotipik etkiye rastlanmamıştır.

## Sonuç

RNA interferansın keşfedilmesiyle böcek fonksiyonel genombilim alanındaki çalışmaların sayısı hızla artmıştır. RNAi yaklaşımı böceklerde hem in-vivoda, hem in-vitroda farklı uygulama alanları bulmuştur. RNAi'den yararlanarak böceklerde pek çok fizyolojik ve karmaşık biyokimyasal mekanizmalar aydınlatılmıştır. 'Sessiz pestisitler' olarak isimlendirilen, zararlılara spesifik genlerin hedeflendiği RNAi tekniğinin tek başına ya da *Bacillus thuringiensis* kombinasyonu ile pestisit kullanımını azaltarak entegre savaşım yaklaşımı içerisinde yer alacağına inanılmaktadır. RNAi teknolojisinin kullanımı ve iyileştirilmesi konusunda halen çalışmalar sürmektedir.

## Yararlanılan Kaynaklar

- Araujo, R. N., A. Santos, F. S. Pinto, N. F. Gontijo, M. J. Lehane & M. H. Pereira, 2006. RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 683–693.
- Baum, J. A., T. Bogaert, W. Clinton, G. R. Heck, P. Feldmann, O. Ilagan, S. Johnson, G. Plaetinck, T. Munyikwa, M. Pleau, T. Vaughn, J. Roberts, 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25(11): 1 322-326.
- Bucher, G. J. Scholten, M. Klingler. 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology*.12, R85–R86
- Chen, J, D. Zhang, Q. J. Zhang, X. Dong, H. Tian, J. Chen, W. Zhang, 2010. Feeding-based RNA interference of a trehalose phosphate synthase gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 19(6): 777–786.
- Ciudad, L, X. Bellés & M. Piulachs, 2007. Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationships of lipoprotein receptors. *BMC Molecular Biology*, 8:53
- Daneholt, B., 2006. "Advanced Information: RNA interference". The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. Archived from the original on 2007-01-20. Retrieved 2007-01-25.
- Eaton, B. A., R. D. Fetter, G. W. Davis, 2002. Dynactin is necessary for synapse stabilization. *Neuron*, 34(5): 729-741.
- Fire, A, Xu S, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
- Huvenne, H. & G. Smagghe, 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control *Journal of Insect Physiology*, 56: 227–235
- Irls, P, Bellés X. & M. D. Piulachs, 2009. "Identifying genes related to choriogenesis in insect panoistic ovaries by Suppression Subtractive Hybridization" *BMC Genomics*, 10:206
- Kennerdell, J. R., R. W. Carthew, 2000. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature Biotechnology*, 18(8): 896-98.
- Mao, Y B, W. J. Cai, J. W. Wang, G. J. Hong, X. Y. Tao, L. J. Wang, Y. P. Huang, X. Y. Chen, 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25(11):1 307-313.

- March, J. C., W. E. Bentley, 2007. RNAi-based tuning of cell cycling in *Drosophila* S2 cells: Effects on recombinant protein yield. *Applied Microbiology Biotechnology*, 73(5): 1 128-1 135.
- Martin, D, O. Maestro, J. Cruz, D. Mane-Padros, X. Belles, 2006. RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology*, 52(4): 410-416.
- Mathey-Prevot, B, N. Perrimon, 2006. *Drosophila* genome-wide RNAi screens: are they delivering the promise? *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 71,141–148.
- Mol, J. N. M. & A. R. van der Krol, 1991. *Antisense Nucleic Acids and Proteins: Fundamentals and Applications*. M. Dekker. pp. 4, 136. New York. ISBN 0-8247-8516-9.
- Napoli, C., C. Lemieux & R. Jorgensen, 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279–289.
- Price, D. R. G. & J. A. Gatehouse, 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology* Vol.26 No.7 Pages: 393-400
- Rajagopal, R., S. Sivakumar, N. Agrawal, P. Malhotra, R. K. Bhatnagar, 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.
- Saleh, M. C., R. P. Van Rij, A. Hekele, A. Gillis, E. Foley, P. H. O'Farrell, R. Andino, 2006. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology* 8, 793–802.
- Sim, C. and D. L. Denlinger, 2008. Model for diapause regulation in the mosquito *C. pipiens*. *National Academy of Sciences of the USA*, Vol:105, No:18:6777-6781
- Tavernarakis, N., S. L. Wang, M. Dorovkov, A. Ryazanov & M. Driscoll, 2000. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nature Genetics*, 24(2): 180-183.
- Tian, H., H. Pen, Q. Yao, H. Chen, Q. Xie, B. Tang, W. Zhang, 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS One*, 4:1–13.
- Timmons, L., A. Fire, 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395: 854.
- Timmons, L., D. L. Court, A. Fire, 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263: 103–112.
- Tomoyasu, Y. & R. E. Denell, 2004. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development Genes and Evolution*, 214, 575–578.
- Turner, C. T., M. W. Davy, R. M. Macdiarmid, K. M. Plummer, N. P. Birch, R. D. Newcomb, 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology* 15:383–391.
- Uhlirva, M., B. D. Foy, B. J. Beaty, K. E. Olson, L. M. Riddiford, M. Jindra, 2003. Use of Sindbis virus-mediated RNA interference to demonstrate a conserved role of Broad-Complex in insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26): 15 607-15 612.
- Walshe, D. P., S. M. Lehane, M. J. Lehane, L. R. Haines, 2009. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Molecular Biology*, 18(1):11-19.
- Winston, W. M., C. Molodowitch, C. P. Hunter, 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295: 2456-2459.
- Yang, G., M. You, L. Vasseur, Y. Zhao & C. Liu, 2011. "Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment, 27-38". In: *Agricultural and Biological Sciences*. (Ed. M. Stoytcheva) DOI: 10.5772/17260, CC BY-NC-SA 3.0 license.
- Van Blokland, R., N. Van der Geest, J. N. M. Mol, J. M. Kooter, 1994. Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant Journal* 6: 861–77.
- Van den Berg, A., J. Mols, J. H. Han, 2008. RISC-target interaction: cleavage and translational suppression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1779:668–677
- Zha, W., X. Peng, R. Chen, B. Du, L. Zhu, G. He, 2011. Knockdown of Midgut Genes by dsRNA-Transgenic Plant-Mediated RNA Interference in the Hemipteran Insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE* 6(5): e20504. doi:10.1371/journal.pone.0020504
- Zhou, X., M. M. Wheeler, M. F. Oi, E. M. Scharf, 2008. RNA interference in the termite *Reticulitermes flavipes* through ingestion of double-stranded RNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38:8, 805–815