

# Primjena RNA interferencije kao biopesticida

---

**Kumek, Lucija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:878830>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2022-01-28**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**PRIMJENA RNA INTERFERENCIJE KAO BIOPESTICIDA**

**APPLICATION OF RNA INTERFERENCE AS A  
BIOPESTICIDE**

**SEMINARSKI RAD**

Lucija Kumek

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular biology)

Mentor: doc. dr. sc. Nenad Malenica

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom doc. dr. sc. Nenada Malenice.

## Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| 1. Uvod.....   | 1  |
| 2. RNA interferencija u biljaka.....   | 2  |
| 2.1. Male regulatorne RNA molekule i mehanizmi RNA interferencije .....          | 2  |
| 2.2. Biljna imunost posredovana endogenim sRNA molekulama .....                  | 5  |
| 2.3. Biotehnološke aplikacije RNAi u poljoprivredi.....                          | 7  |
| 3. Utišavanje gena inducirano domaćinom .....                                    | 8  |
| 3.1. Principi djelovanja strategije HIGS.....                                    | 8  |
| 3.2. Praktična primjena strategije HIGS.....                                     | 10 |
| 3.2.1. Primjena strategije HIGS protiv gljiva i oomiceta.....                    | 11 |
| 3.2.2. Primjena strategije HIGS protiv kukaca .....                              | 12 |
| 3.2.3. Primjena strategije HIGS protiv oblića.....                               | 13 |
| 3.3. Problemi i nedostaci strategije HIGS .....                                  | 13 |
| 4. Izazovi i budućnost RNAi baziranih biotehnoloških metoda u poljoprivredi...15 |    |
| 4.1. Kretanje malih RNA molekula između patogena i biljnih stanica.....          | 15 |
| 4.2. Izvana inducirano utišavanje gena .....                                     | 16 |
| 6. Literatura.....   | 21 |
| 7. Sažetak .....   | 27 |
| 8. Summary .....   | 28 |
| 9. Životopis .....   | 29 |

## Popis kratica

AGO – Argonaut (eng. *Argonaute*)

Cas9 – CRISPR-pridruženi protein 9 (eng. *CRISPR-associated protein 9*)

CRISPR – grupirana uzastopno ponovljena kratka palindromska ponavljanja (eng. *clustered regularly interspaced short palindrome repeats*)

DCL – protein nalik Diceru (eng. *Dicer-like*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*)

HIGS – utišavanje gena inducirano domaćinom (eng. *host-induced gene silencing*)

mRNA – glasnička RNA (eng. *messenger RNA*)

miRNA – mikro RNA (eng. *micro RNA*)

RDR – RNA-ovisna RNA polimeraza (eng. *RNA-dependent RNA polymerase*)

RISC – kompleks za utišavanje induciran s RNA (eng. *RNA-induced silencing complex*)

RNA – ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid*)

RNAi – RNA interferencija (eng. *RNA interference*)

SIGS – utišavanje gena inducirano sprejom (eng. *spray-induced gene silencing*)

siRNA – kratka interferirajuća RNA (eng. *short interfering RNA*)

sRNA – mala regulatorna RNA (eng. *small regulatory RNA*)

## 1. Uvod

Male regulatorne RNA molekule (eng. *small regulatory RNAs* – sRNA) jedni su od glavnih posrednika posttranskripcijske regulacije ekspresije gena u eukariotskih organizama djelujući kao izvršne molekule procesa RNA interferencije (eng. *RNA interference* – RNAi). Biljni organizmi ističu se po iznimno kompleksnom mehanizmu RNAi zahvaljujući postojanju velikog obima proteinskih kompleksa Dicer i Argonaute koji sudjeluju u stvaranju sRNA molekula i obavljanju izvršnih funkcija RNA utišavanja. RNAi je zaštitni mehanizam protiv prijenosnih elemenata i virusa, no u biljaka dodatno igra ulogu i u razvojnim procesima preko regulacije pojedinih gena. Nedavnim istraživanjima ukazana je uloga sRNA molekula kao središnjih regulatora biljne imunosti te posredničkih molekula u interakcijama između biljaka i njihovih patogena. Biljne sRNA molekule mogu pokrenuti mehanizme biljne obrane aktivacijom ili supresijom pojedinih signalnih putova koji aktiviraju imunski odgovor ili prijenosom u patogene i specifičnim utišavanjem gena tijekom procesa nazvanog međuvrsna RNA interferencija.

U današnje vrijeme, široka upotreba kemijskih pesticida u poljoprivrednim metodama postaje sve veća briga moderne zajednice uslijed porasta brojnosti dokaza o njihovim negativnim učincima po okoliš i zdravlje. Javlja se potreba za osmišljavanjem novog poljoprivrednog pristupa za uzgoj biljaka u prehrambene i industrijske svrhe kako bi se smanjio ekološki teret koji predstavljaju kemijski pesticidi. Najnovija otkrića u području urođene biljne imunosti i mehanizmima međuvrsne RNA interferencije dovela su do ideje o biotehnološkoj uporabi RNAi mehanizma u poljoprivrednoj praksi u svrhu dobivanja biljaka otpornih na patogene koji uzrokuju razne bolesti poljoprivrednih kultura ili na njima parazitiraju čime dovode do značajnih ekonomskih gubitaka. Upošljavanje endogenih biljnih mehanizama u borbi protiv poljoprivrednih štetočina moglo bi predstavljati prikladnu alternativu konvencionalnom korištenju kemijskih pesticida koja nadilazi njihove štetne nuspojave.

## 2. RNA interferencija u biljaka

### 2.1. Male regulatorne RNA molekule i mehanizmi RNA interferencije

RNA interferencija je vrsta posttranskripcijske regulacije ekspresije gena zastupljena u mnogim eukariotskim organizmima. RNAi koristi dvolančane RNA molekule za pokretanje mehanizma kontrole genske aktivnosti koji je ovisan o homologiji. Ključnu ulogu pritom ima dorada dvolančanih RNA molekula i nastanak malih regulatornih RNA molekula koje usmjeravaju proteinske komplekse uključene u regulaciju na ciljna mjesta unutar DNA molekula. Primarnu doradu RNA molekula vrši ribonukleaza iz nadporodice RNaza III zvana Dicer kod životinja i insekata ili protein nalik Diceru (eng. *Dicer-like* – DCL) kod biljaka. Fenomen RNAi uključuje i interakciju sRNA molekula s proteinima iz porodice Argonaute (AGO) i nastanak kompleksa za utišavanje inducirano s RNA (eng. *RNA-induced silencing complex* – RISC; Wilson i Doudna 2013).

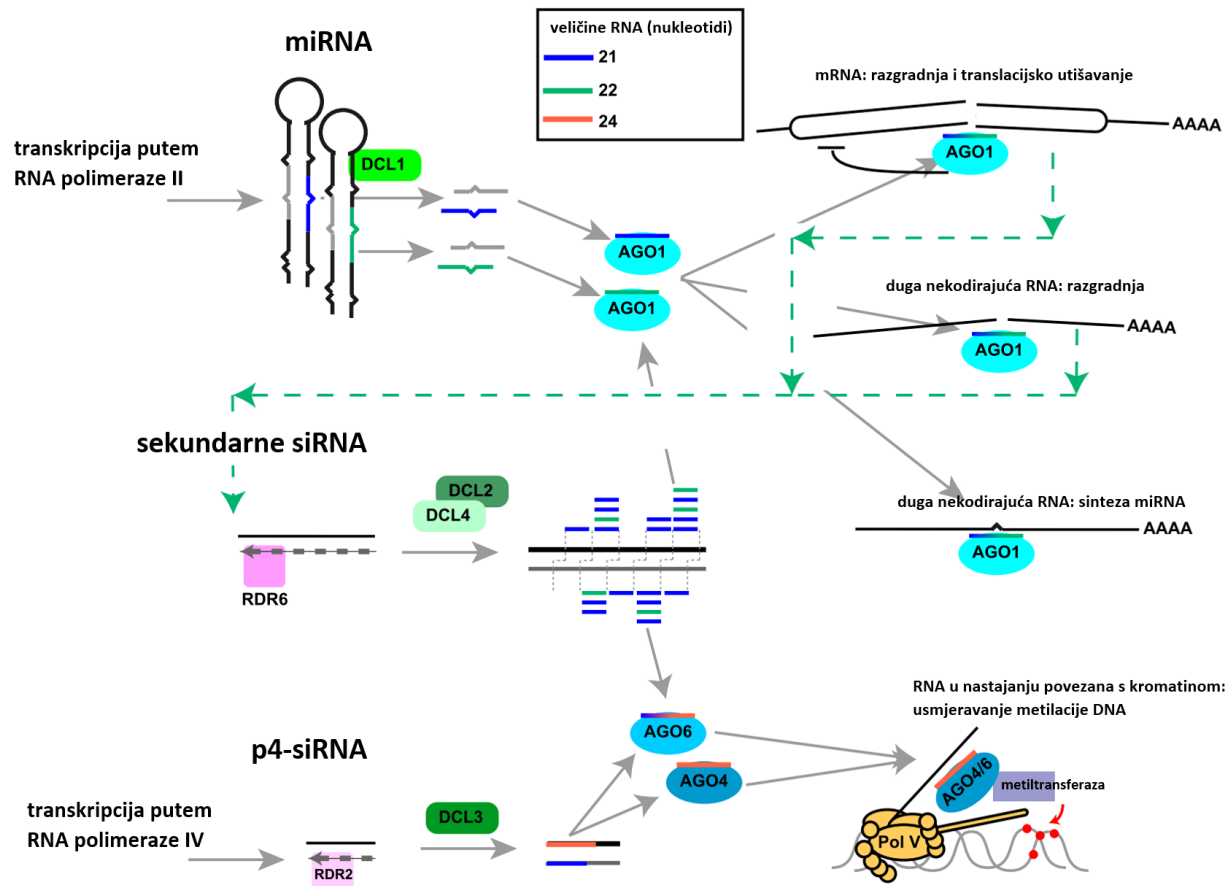
RNA interferencija u biljaka izrazito je kompleksna. Biljke posjeduju više različitih DCL i AGO proteina koji djeluju preko mreže nekoliko vrsta sRNA molekula te posreduju u transkripcijskom i posttranskripcijskom utišavanju gena (Paces i sur. 2017). sRNA molekule u biljaka duge su 21 do 24 nukleotida i sudjeluju u razvojnim procesima, diferencijaciji stanica, odgovoru na abiotičke stresove i utišavanju repetitivnih elemenata (Hudzik i sur. 2020). Prema načinu njihova nastanka i mehanizmu djelovanja, biljne sRNA mogu se podijeliti na microRNA (miRNA) i kratke interferirajuće RNA (eng. *short interfering RNAs* – siRNA) molekule.

miRNA molekule nastaju endogeno, doradom primarnih transkripata (pri-miRNA) nastalih prepisivanjem gena od strane RNA polimeraze II (Voinnet 2009). Pri-miRNA molekula sadrži intramolekularnu strukturu ukosnice nastalu uslijed sparivanja nukleotida vodikovim vezama koju prepoznaje Dicer-like 1 (DCL1) endoribonukleaza te je odcjepljuje zajedno s nekoliko pomoćnih proteina. Pritom nastaje miRNA dupleks koji biva metiliran i prenesen u citoplazmu, gdje stupa u interakciju s jednim od nekoliko proteina iz porodice AGO, najčešće AGO1. Jedna od miRNA molekula iz dupleksa se najčešće odvaja od nastalog kompleksa i razgrađuje (Rogers i Chen 2013). AGO/miRNA kompleks utišava translaciju transkripata koji dijele homologiju s pripadnom miRNA.

siRNA molekule su egzogenog porijekla. Ulaskom virusa, pokretnih genetičkih elemenata kao što su traspozoni ili transgena u biljnu stanicu nastaju dvolančani RNA prekursori koje dorađuje biljni DCL / AGO sustav (Kamthan i sur. 2015). siRNA molekule dorađuje više DCL proteina, DCL2,

DCL3 i DCL4, stvarajući molekule duge 22, 24 i 21 nukleotid. Biljne siRNA dijele se u dva glavna razreda koje se razlikuju prema biogenezi i funkciji. Prvi razred obuhvaća skupinu sekundarnih siRNA molekula, čiji nastanak potiče interakcija AGO proteina u kompleksu miRNA ili siRNA molekulom s ciljnim transkriptom. Time se aktivira RNA-ovisna RNA polimeraza 6 (eng. *RNA-dependent RNA polymerase 6* – RDR6) koja sintetizira dvolančane RNA molekule, supstrate DCL4 i DCL2. DCL proteini zatim stvaraju zalihu sekundarnih siRNA molekula koje se pak vežu za AGO protein (Chen i sur. 2010). Sekundarne siRNA u kompleksu sa specifičnim AGO proteinom ciljaju transkripte istih lokusa s kojih su nastale, čime dolazi do amplifikacije signala i postiže se snažan efekt utišavanja gena (Hudzik i sur. 2020). Drugi razred siRNA molekula čine siRNA molekule ovisne od RNA polimerazi IV, tzv. p4-siRNA. Ove molekule nastaju iz transkripata RNA polimeraze IV ili V koje RNA-ovisna RNA polimeraza II (RDR2) dorađuje u dvolančane RNA prekursore. Prekursore cijepa protein DCL3, stvarajući dvolančane p4-siRNA duge 24 nukleotida. Po jedan lanac iz p4-siRNA stupa u interakciju sa specifičnim AGO4 proteinom (Zilberman i sur. 2003). Nastali p4-siRNA / AGO4 kompleks interagira s ciljnom DNA po principu komplementarnosti, a AGO4 protein na specifičan lokus navodi enzime za modifikaciju kromatina. Funkcija p4-siRNA molekula još je uvijek slabo istražena, ali poznato je da je povezana s transkripcijskim utišavanjem gena, pokretnim genetičkim elementima i stvaranjem heterokromatina (Mosher 2010). Sažeti mehanizam nastajanja triju opisanih vrsta biljnih siRNA molekula prikazan je na Slici 1.





**Slika 1.** Pregled biogeneze i molekularnih funkcija biljnih endogenih sRNA molekula (preuzeto iz Hudzik i sur. 2020).

Poznato je da se male RNA molekule mogu kretati kroz biljku na male udaljenosti, od stanice do stanice, ali kretanje sRNA molekula može biti i dugog doseg, tj. sistemsko. Na taj način RNA interferencija stvara mobilne signale koji se prenose unutar biljke i potencijalno sudjeluju u regulaciji fizioloških procesa čitave biljke putem RNA utišavanja. Vjeruje se da se male RNA molekule prenose između stanica putem plazmodezmija, a sistemski prijenos odvija se kroz floemske elemente (Liu i Chen 2018). Kada se prenesu u ciljnu stanicu, sRNA molekule posreduju u RNA-ovisnoj razgradnji DNA ili navode pripadni RISC kompleks na cijepanje ili translacijsku represiju ciljnog transkripta. RNA molekule najznačajnije za širenje i amplifikaciju RNAi signala su sekundarne siRNA, koje na taj način posreduju u sistemskom utišavanju specifičnog gena (Qi i sur. 2019). Ovo svojstvo se danas iskorištava u najnovijim biotehnološkim metodama u agronomiji za stvaranje genetički modificiranih biljaka u kojima siRNA molekule posreduju

utišavanje gena koje vodi do razvoja poželjnih svojstava u biljke, kao što su povećani prihodi ili rezistencija na određene biljne bolesti.

## **2.2. Biljna imunost posredovana endogenim sRNA molekulama**

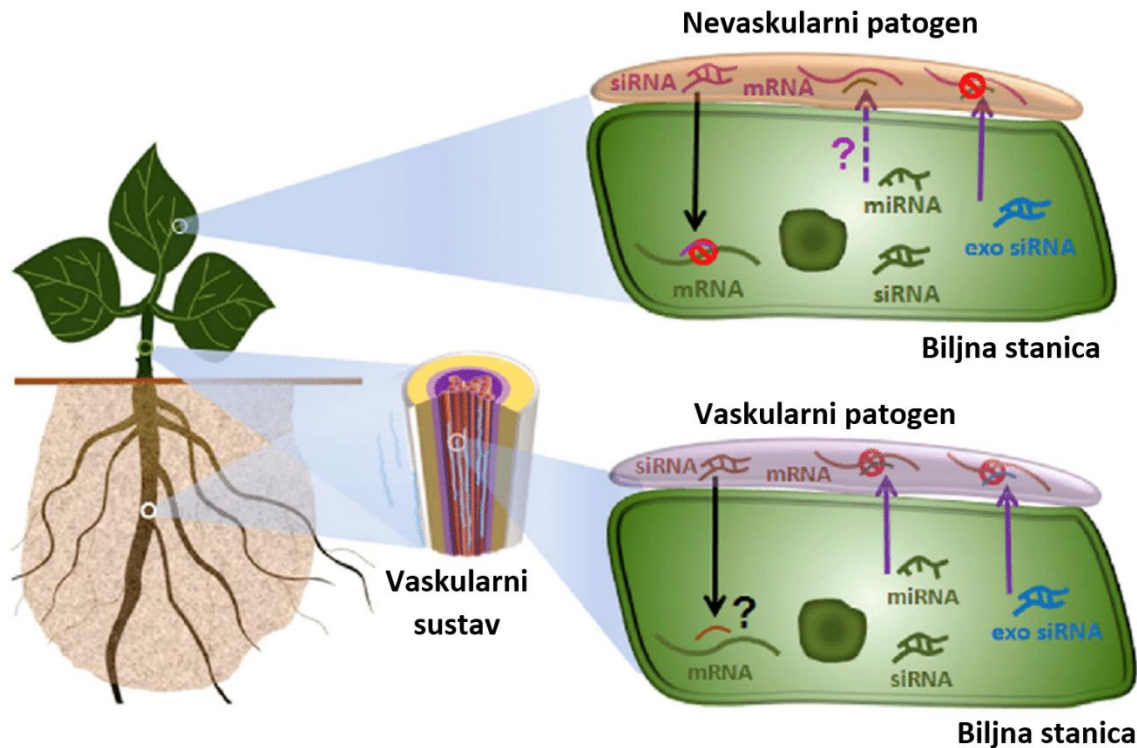
Postoji sve više dokaza o ulozi malih RNA molekula u zaštiti biljaka od patogena. sRNA posredovana imunost najbolje je istražena na primjeru antiviralne obrane, pri čemu biljke stječu imunost na virus kojim su inficirane pokretanjem RNAi mehanizma temeljenog na siRNA molekulama virusnog porijekla. Takve siRNA navode pripadne AGO proteine na ciljne virusne transkripte, uslijed čega dolazi do utišavanja infekcije (Hudzik i sur. 2020). Ovaj mehanizam poznat je i pod nazivom utišavanje gena inducirano virusom (eng. *virus induced gene silencing*, VIGS).

Osim u antiviralnoj obrani, sRNA molekule sudjeluju i u zaštiti biljnog organizma od zaraze patogenima, uključujući gljive, oomicete, oblice i insekte. Istraživanja u ovom području tek su nedavno zaživjela, obzirom na to da je dugo vremena uloga sRNA molekula u biljnoj imunosti bila pod znakom pitanja. Prva otkrivena miRNA molekula koja sudjeluje u biljnoj imunosti inducirana je bakterijskim membranskim peptidom flg22 te djeluje na način da suprimira auksinski signalni put, čime se pokreće imunosni odgovor koji usporava rast bakterije (Navarro i sur. 2006). Slično tome, prva otkrivena siRNA uključena u regulaciju biljne imunosti specifično je inducirana izvršnim proteinom AvrRpt2 koji nosi bakterijski patogen *Pseudomonas syringae*. Nastala siRNA djeluje na način da utišava protein koji je negativni regulator biljne obrane (Katiyar-Agarwal i sur. 2006). Uskoro nakon toga, utvrđeno je da su biljne endogene sRNA molekule glavni posrednici u smanjenju štete po biljku povezane s imunosnim odgovorom na patogene. Bolje razumijevanje načina na koji sRNA reguliraju izmjenu između biljnih mehanizama zaštite i rasta može pružiti značajnu pomoć u stvaranju rezistentnih biljaka s minimalnim negativnim učinkom na prinose (Huang i sur. 2019).

Osim *de novo* sinteze malih RNA molekula kao odgovor biljke na infekciju, istraživanjem interakcija između biljaka i njihovih patogena otkrivena je i posebna vrsta interakcije nazvana RNA interferencija između različitih vrsta (eng. *trans-species RNAi*). Ona se odnosi na mogućnost da se signali utišavanja, odnosno specifične sRNA molekule, naizmjenično prenose između organizama u djelovanju i posreduju u utišavanju gena druge vrste. Tako, primjerice, pojedine sRNA molekule agresivne gljive *Botrytis cinerea* suprimiraju imunosni odgovor biljke

*Arabidopsis thaliana* (uročnjak) vezanjem na AGO1 protein, čime se selektivno utišavaju domaćinski geni vezani uz imunost (Weiberg i sur. 2013). Zhang i sur. su 2016. godine opisali biljnu strategiju zaštite koja uključuje miRNA na primjeru obrane biljke pamuka (*Gossypium hirsutum*) od patogene gljive *Verticillium dahliae*. Kao odgovor na infekciju, biljke pamuka stvaraju veću količinu molekula microRNA 166 i microRNA 159 koje se prenose do hifa gljive i posreduju u specifičnom utišavanju gena neophodnih za virulenciju gljive (Zhang i sur. 2016). Time je prvi puta dokazana uloga biljnih endogenih sRNA molekula kao posrednika međuvrskog RNAi mehanizma. Slično tome, dokazano je i da miRNA1023 iz pšenice može utišati gen koji kodira za alfa/beta hidrolazu u gljivičnom patogenu *Fusarium graminearum* (Jiao i Peng 2018). Nešto kasnije nakon otkrića uloge biljnih miRNA u utišavanju gena patogena, istraživanja su utvrdila da i siRNA molekule mogu djelovati na sličan način. Biljke uročnjaka stvaraju dvije vrste sekundarnih siRNA molekula s lokusa *TAS1* i *TAS2* koje za metu imaju gene neophodne za patogenost gljive *Botrytis cinerea* te na taj način sudjeluju u biljnom odgovoru na infekciju (Cai i sur. 2018).

Na Slici 2 shematski je prikazan međuvrski prijenos sRNA molekula između biljaka i vaskularnih te između biljaka i nevaskularnih patogena. Pokazano je da se tijekom zaraze vaskularnim patogenom, kao što je gljiva *V. dahliae*, domaćinske miRNA molekule prenose u stanice gljive i inhibiraju gene koji sudjeluju u virulenciji. Za sada još uvijek nisu pronađene siRNA molekule vaskularnih gljivičnih patogena koje se prenose u domaćinske stanice. S druge strane, tijekom infekcije nevaskularnim patogenima kao što je *B. cinerea*, gljivične siRNA molekule ciljaju domaćinske gene koji sudjeluju u zaštiti, ali još nisu pronađene domaćinske miRNA koje se prenose u stanice gljive. Potvrđeno je da siRNA molekule nastale iz egzogenih dvolančanih RNA molekula (exo siRNA) mogu zaštititi biljke od zaraze patogenima (Hua i sur. 2018).



**Slika 2.** Međuvrsni prijenos sRNA molekula tijekom interakcija biljaka s vaskularnim i nevaskularnim patogenima (preuzeto iz Hua i sur. 2018).

Uzevši u obzir dosadašnja saznanja, vrlo je vjerojatno da je međuvrsna RNA interferencija između biljaka domaćina i patogenih gljiva i oomiceta ima sastavnu ulogu u mehanizmima biljne imunosti. S obzirom na to da su endogene funkcije mnogih biljnih sekundarnih siRNA molekula nejasne, smatra se da upravo one imaju glavnu ulogu u međuvrsnom utišavanju gena (Hudzik i sur. 2020).

### 2.3. Biotehnološke aplikacije RNAi u poljoprivredi

Ljudska populacija već 10.000 godina uvelike ovisi o uzgoju biljaka u prehrambene i industrijske svrhe. Uz konvencionalne tehnike korištene u poljoprivredi, u novije doba sve se više ulaže u razvoj biotehnoloških metoda koje mogu pružiti način za jeftiniju i djelotvorniju proizvodnju usjeva (<https://www.usda.gov/topics/biotechnology/biotechnology-frequently-asked-questions-faqs>, 23.7.2020.). Poljoprivredne kulture podložne su zarazama mnogobrojnim patogenima, uključujući viruse, bakterije, parazitske kukce, oblice i brojne gljive, što dovodi do manjih prihoda i ekonomskih gubitaka. Procjenjuje se da su infekcije patogenima odgovorne za 17- 30% svjetskih gubitaka usjeva (Savary i sur. 2019), zbog čega daje posebna pažnja održavanju zdravlja

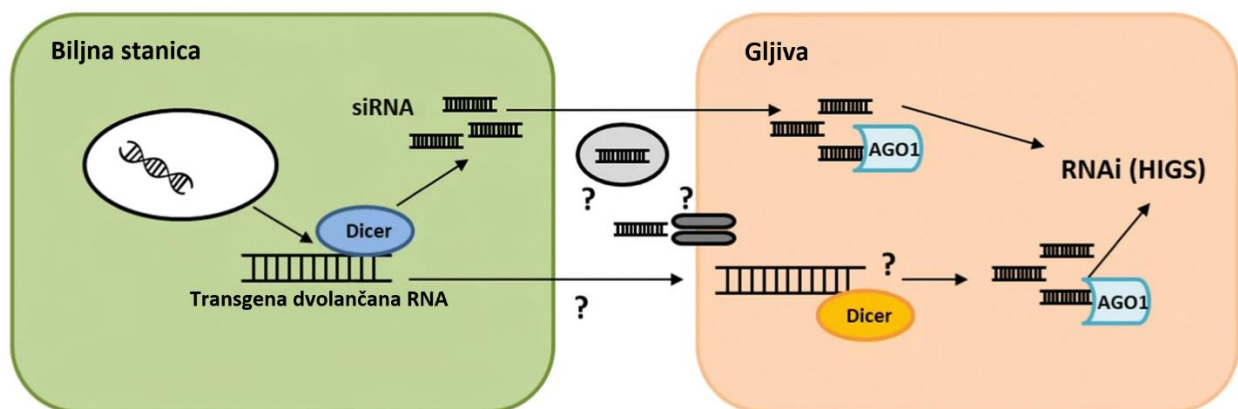
kultiviranih biljaka. U svrhu suzbijanja zaraza koriste se mnogobrojne konvencionalne tehnike, uključujući rotaciju usjeva, uporabu kemijskih pesticida i selekciju rezistentnih biljaka, ali u moderno doba sve je više u koristi biološka kontrola i strategije upravljanja usjevima (Qi i sur. 2019). Veliki problem u današnje vrijeme je prekomjerno korištenje kemijskih pesticida, koji prema mnogim istraživanjima osim koristi predstavljaju i značajnu opasnost za okoliš te zdravlje ljudi i životinja (Aktar i sur. 2009). S obzirom na današnje poznavanje mehanizma RNA interferencije u biljaka i otkrića da se male RNA molekule mogu razmjenjivati između biljaka i njihovih patogena, intenzivno se radi na razvoju biotehnoloških pristupa koje koriste ovu biljnu strategiju u poboljšanju otpornosti usjeva na razne patogene. Zbog postojanja sistemske RNAi, moguće je stvoriti genetički modificiranu biljku rezistentnu na specifični virus ili biljku sposobnu inducirati RNA interferenciju u specifičnom recipijentu, što se može iskoristiti za ciljano i selektivno uništavanje biljnih patogena (Paces i sur. 2017). Takve metode imaju potencijal smanjiti upotrebu kemijskih pesticida i posljedično njihove negativne učinke, te u upotrebu uvesti novu generaciju RNAi-baziranih bioloških pesticida. Prema dosadašnjim saznanjima o mehanizmima interakcija biljaka i njihovih patogena, genetička modifikacija biljaka metodom utišavanja gena induciranog domaćinom (eng. *host-induced gene silencing* – HIGS) predstavlja učinkovit i ekološki prihvatljiv alat za kontrolu zaraze biljaka parazitima, oblicima, gljivama i virusima (Qi i sur. 2019).

### **3. Utišavanje gena inducirano domaćinom**

#### **3.1. Principi djelovanja strategije HIGS**

S obzirom na to da RNA interferencija djeluje na temelju komplementarnosti i može se potaknuti dodatkom egzogenih dvolančanih RNA molekula, ona predstavlja odličan alat za fundamentalnu analizu funkcije pojedinih gena u parazitskom sustavu (Qi i sur. 2019). Strategija HIGS uključuje dizajn biljnih sRNA u svrhu inhibicije zaraze staničnim patogenima i parazitima (Hudzik i sur. 2020). Metoda se temelji na kreiranju transgeničnih biljaka koje proizvode dvolančane RNA molekule kao prekursore koji se pomoću DICER enzima dorađuju u siRNA. Nastale siRNA molekule dijele homologiju u sekvenci s ciljnim mRNA molekulama patogena, zbog čega dolazi do specifičnog utišavanja gena. RNAi mehanizam pritom se najčešće inducira prekursorom u obliku dugačke RNA ukosnice. Prekursor aktivira DCL4/DCL2-ovisan put stvaranja sekundarnih siRNA te DCL3-ovisan put stvaranja p4-siRNA i nastaje zaliha siRNA molekula dugih 21, 22 i

24 nukleotida (Fusaro i sur. 2006). Nastale siRNA molekule potencijalno pokreću mehanizam utišavanja gena u recipijentnom patogenu, međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se potvrdio opisani mehanizam. Transgeni se prenose u patogene prilikom njihovog hranjenja na biljci. Postoje nesuglasice oko toga prenosi li se sam prekursor ili konačna siRNA molekula (Koch i sur. 2018). Opisani način djelovanja strategije HIGS prikazan je na Slici 3.



**Slika 3.** Predloženi mehanizam strategije utišavanja gena induciranog domaćinom na primjeru prijenosa transgene RNA molekule iz biljne stanice u patogenu gljivu (preuzeto iz Koch i sur. 2018).

Postoji više faktora koji utječu na uspješnost RNAi posredovane biljkama protiv specifičnih patogena. Genetički modificirane biljke moraju stvarati dovoljno dvolančanih RNA prekursora kako bi se pokrenuo dovoljno snažan odgovor na nametnike. Iz tog je razloga potrebna stabilna ekspresija dvolančanih RNA molekula. Nužno je i eksperimentalno utvrditi učinke molekula dizajniranih u svrhu kontrole patogena na različite ciljane gene kako bi se utvrdilo jesu li postignuti željeni rezultati (Yan i sur. 2020). Postoje istraživanja koja ukazuju na povećanu ekspresiju i stabilnost dvolančanih RNA prekursora u slučaju transformacije plastidnog umjesto jezgrinog genoma (Zhang i sur. 2015), koja sugeriraju potencijalno dobar način za zaobilazjenje problema preslabe ekspresije dvolančanih RNA s kojima se suočava HIGS. Nadalje, pojedine vrste insekata pokazuju različite odgovore ovisno o duljini dvolančanih RNA prekursora. Na primjer, kod ličinke kukuruzne zlatice (*Diabrotica virgifera virgifera*), ekonomski značajnog nametnika na kukuruzu, potrebne su dvolančane RNA molekule koje dijele homologiju s ciljnim genom duge 60 ili više parova baza kako bi pokrenule mehanizam RNA interferencije. Međutim, siRNA duga 21 par baza homolognih ciljnom genu nije dostatna kako bi se pokrenuo RNAi odgovor u kukuruznoj zlatiци (Bolognesi i sur. 2012). Također, kod nekih insekata su pronađene RNaze koje specifično cijepaju

dvolančane RNA molekule, što može dovesti do razgradnje prekursorskih molekula za ciljano utišavanje gena. Supresija gena koji kodiraju za takve enzime vodi smanjenoj aktivnosti RNaza i povećanju efikasnosti RNAi (Yan i sur. 2020). Kada se sve navedeno uzme u obzir, može se zaključiti da je potrebno pažljivo planiranje i temeljito prethodno poznavanje genomskih sekvenci i molekularnih mehanizama vrsta i biljke i patogena kako bi se uspješno provela strategija utišavanja gena induciranog domaćinom.

### 3.2. Praktična primjena strategije HIGS

Tehnologija utišavanja gena induciranog domaćinom prvi puta je uspješno primijenjena na uročnjaku u svrhu obrane od parazitskih oblića korijenovih kvržica (rod *Meloidogyne*). Oblici tijekom zaraze ispuštaju evolucijski konzervirani sekretorni peptid kodiran genom *16D10* koji stupa u interakciju sa specifičnom domenom biljnog SCARECROW-like transkripcijskog faktora i stimulira rast korijena. Pokazano je da *in vivo* ekspresija *16D10* dvolančane RNA u transgeničnom uročnjaku dovodi do uspješnog RNAi utišavanja gena u obliku i uspostavljanju biljne rezistencije (Huang i sur. 2006). Ubrzo nakon tog uspjeha, dizajniran je i transgeni kukuruz s ekspresijom dvolančanih RNA molekula koje ciljaju gene koji kodiraju vakuloranu ATPazu nametnika iz reda kornjaša (*Coleoptera*). Posljedice učinka takvih RNA molekula su povećane smrtnosti ličinki i značajno smanjuju oštećenja na biljkama uzrokovana hranjenjem kukaca (Baum i sur. 2007). Analogno, dvolančane RNA molekule eksprimirane u biljakama pamuka koje kao metu imaju gen za citokrom P450 iz herbivornog insekta *Helicoverpa armigera* dovode do usporenog rasta i smanjene infestacije ovim nametnikom (Mao i sur. 2007). Ovi rani eksperimenti otvorili su uvid u mnogobrojne mogućnosti koje pruža strategija HIGS u zaštiti biljaka od zaraze raznim patogenima te potaknuli daljnji razvoj i pokušaje unaprjeđenja metode u svrhu primjene pri masovnom uzgoju biljaka.

HIGS se može koristiti i za istovremenu kontrolu zaraze od strane više patogena. Za ovo je nužno pažljivo dizajniranje RNA konstrukata koji za metu imaju nekoliko gena iz različitih patogena. Uspješna primjena ovakvog pristupa provedena je na biljkama uročnjaka modificiranim na način da eksprimiraju RNA molekule u obliku ukosnica koje simultano ciljaju DCL gene gljivičnih patogena *B. cinerea* i *V. dhaliae*. Takve transgenične biljke pokazale su povećanu otpornost na obje vrste patogena, dokazujući da je ova RNAi-bazirana strategija zaista efikasna i sigurna u svrhu kontrole više gljivičnih patogena koji koriste izvršne molekule sRNA (Wang i sur. 2016).

U nastavku slijede neki od primjera upotrebe strategije HIGS koji ukazuju na praktičnost ovog alata u agrikulturnoj biotehnologiji. Upravljanje biljnim sRNA molekulama sve se više pokazuje kao vrlo uspješan, ekonomičan i ekološki prihvatljiv pristup za manipulaciju usjeva koji bi potencijalno mogao zamijeniti prekomjernu upotrebu kemijskih pesticida.

### **3.2.1. Primjena strategije HIGS protiv gljiva i oomiceta**

Utišavanje gena inducirano domaćinom se pokazalo kao djelotvorna metoda u borbi protiv biljne infekcije gljivama i oomicetama, dvjema filogenetski različitim ali ekonomski vrlo značajnim grupama eukariotskih mikroba. Ovi organizmi izazivaju ozbiljne biljne bolesti i vode do milijuna dolara štete u gubitcima usjeva (Huang i sur. 2019).

Pokazano je da biljke ječma i pšenice dizajnirane da ekspimiraju dvolančane RNA molekule koje ciljaju efektorski gen *Avra10* gljive *Blumeria graminis*, uzročnika pepelnice, rezultiraju povećanom biljnom rezistencijom na zarazu (Nowara i sur. 2010). Slično tome, biljke ječma postaju visoko otporne na infekciju snijeti *Fusarium graminearum* kada proizvode siRNA molekule koje utišavaju gljivične gene CYP51, koji kodiraju za enzim citokrom P450 lanosterol C-14 $\alpha$ -demetilaza esencijalan u biosintezi ergosterola (Koch i sur. 2013). Još jedan od velikih ekonomskih poteškoća tijekom uzgoja biljaka predstavljaju gljive iz roda *Verticillium*, uzrokujući uvenuće mnogih biljnih vrsta koje je veoma teško za suzbiti. U jednom provedenom istraživanju, biljke uročnjaka genetički su transformirane s RNAi konstruktima dizajniranim da specifično ciljaju transkripte triju esencijalnih gena *V. dahliae*. Nakon inokulacije gljivičnim patogenom, došlo je do redukcije u stopi uvenuća biljke domaćina kod dvije od tri mete. Rezultati istraživanja upućuju na to da je, ovisno o izabranom ciljnom genu, strategija HIGS efikasna protiv gljive *V. dahliae* i može se iskoristiti kako bi se biljke osjetljive na uvenuće modificirale u svrhu postizanja rezistencije (Song i Thomma 2018).

Osim patogenih gljiva, značajne probleme u uzgoju biljaka predstavljaju i njima slične oomicete. *Phytophthora infestans*, uzročnik krumpirove plijesni, jedan je od ekonomski najvažnijih patogena na biljkama krumpira, te godišnje uzrokuje mnoge gubitke u poljoprivredi. Ovaj patogen poznat je po brzom stopi evolucije i brzo prevladavanje rezistentnih varijeteta krumpira (Forbes 2012). Međutim, Jahan i sur. su 2015. godine pokazali da transgeni krumpir koji ekspimirira RNA molekule u obliku ukosnice iz kojih nastaje siRNA homologna jednom od gena za virulenciju *P. infestans* može uspješno suprimirati napredovanje zaraze (Jahan i sur. 2015). Ovaj rad pokazao je



da je HIGS uspješna strategija protiv infekcije oomicetama, te je dodatno proširio spektar strategija za kontrolu biljnih bolesti u svrhu prevencije smanjenja prihoda.

### 3.2.2. Primjena strategije HIGS protiv kukaca

Ekspresija transgeničnih siRNA molekula u biljaka može pružiti zaštitu različitih komercijalno upotrebljivanih biljaka protiv različitih vrsta insekata koji parazitiraju na usjevima (Qi i sur. 2019). Mnogobrojnim istraživanjima utvrđeno je da red kornjaša (*Coleoptera*) najosjetljiviji na inhibitorne efekte RNA interferencije, dok redovi dvokrilaca (*Diptera*), polukrilaca (*Hemiptera*) i leptira (*Lepidoptera*) pokazuju različite stupnjeve osjetljivosti (Wytinck i sur. 2020). Od posebnog je interesa kontrola lisnih ušiju, nametnika iz nadporodice *Aphidoidea* (red *Hemiptera*), zbog iznimne štete koju ovi kukci nanose usjevima globalno i brze stope evolucije koja vodi ubrzanom razvoju rezistencije na kemijske pesticide (Simon i Peccoud 2018). Postoji više primjera primjene strategije HIGS protiv ovih nametnika. Abdellatef i sur. 2015. godine pokazali su da je moguće djelovati na pad u rastu, reprodukciji i preživljavanju lisnih ušiju vrste *Sitobion avenae*, nametnika na žitaricama, ukoliko se kao meta za RNAi izabere protein SHP (eng. *structural sheath protein*) koji je neophodan u procesu hranjenja insekata. U svom istraživanju, lisne uši hranili su transgeničnim ječmom koji eksprimira 491 par baza dugu dvolančanu RNA molekulu homolognu *shp* genu. Morfološke i fiziološke posljedice na insektima mogle su se opaziti kroz sedam generacija, što, zajedno s činjenicom da se dvolančane RNA nasljeđuju u biljkama, upućuje na mogućnost kontinuirane kontrole zaraze usjeva (Abdellatef i sur. 2015). Slično tome, utišavanje devet esencijalnih gena lisne uši *Myzus persicae* korištenjem RNA molekula u obliku ukosnice kao RNAi prekursora pokazalo se kao djelotvorna strategija za postizanje rezistencije biljaka duhana na ovog insekta koji je nametnik na širokom rasponu domaćina (Guo i sur. 2014). Osim za kontrolu zaraze lisnim ušima, strategija HIGS pokazala se uspješna i protiv drugih skupina kukaca. Transgenične biljke kukuruza dizajnirane da proizvode dvolančane RNA molekule koje kao metu imaju gene koji kodiraju za podjedinice ATPaze kukuruzne zlatice (*Diabrotica virgifera virgifera*) pokazuju smanjeno oštećenje korijena uzrokovano hranjenjem ličinki nametnika na korijenu (Li i sur. 2015). Također, zaraza biljaka pamuka kukcima iz porodice stjenica (*Miridae*) može se značajno reducirati korištenjem gena za proteine iz porodice *FAR* uključene u metabolizam masnih kiselina kao cilj mehanizma efekta RNAi (Luo i sur. 2017). Upotreba HIGS u svrhu kontrole

zaraza poljoprivrednih kultura nametničkim insektima vrlo brzo postaje komercijalno primamljiv pristup s minimalnim posljedicama po okoliš.

### **3.2.3. Primjena strategije HIGS protiv oblića**

Parazitski oblići predstavljaju značajan teret za agrokulturalni uzgoj biljaka. Procjenjuje se da su oblići koji parazitiraju na biljkama odgovorni za približno 80-118 milijardi dolara štete na usjevima godišnje (Nicol i sur. 2011). Jasni simptomi zaraze često nisu prisutni do dok infestacija ne postane ozbiljna, zbog čega je lako previdjeti prisutnost oblića na uzgajanim biljkama. Najznačajnije skupine oblića koje uzrokuju velike ekonomske gubitke spadaju u rodove *Meloidogyne*, *Heterodera* i *Globodera* (Lilley i sur. 2007). Sljedeći uspješnost primjene strategije HIGS u borbi protiv oblića korijenovih kvržica koji su demonstrirali Huang i sur. iz 2006. godine, daljnja istraživanja utvrdila su efikasnost istih *16D10* RNAi konstrukata i u suzbijanju oblića korijenovih kvržica na transgeničnim linijama grožđa (Yang i sur. 2013) i krumpira (Dinh i sur. 2014). Utišavanje dvaju esencijalnih gena *pat-10* i *unc-87* oblića *Pratylenchus thornei*, značajnog nametnika na korijenu pšenice, putem upotrebe dvolančanih RNA molekula dovodi do značajne redukcije u stopi reprodukcije oblića (Tan i sur. 2013). Kao potencijalno dobri kandidati za korištenje strategije HIGS u postizanju rezistencije na oblice pokazalo se više različitih faktora, uključujući veći broj esencijalnih gena i gena koji uvjetuju parazitizam. Većina istraživanja RNAi efekta na oblicima pokazuje slične fenotipske efekte, kao što su smanjenje broja jedinki u ukupnoj populaciji ili povećanje udjela muške populacije, što ukazuje na štetne učinke na potomstvo (Qi i sur. 2019). Uz veća ulaganja u genetička istraživanja u području nematologije kako bi se pronašli novi geni-kandidati kao potencijalne mete za postizanje učinkovitog RNAi efekta, strategija HIGS pokazuje obećavajuću mogućnost stvoriti linije biljaka rezistentne na ovu agresivnu skupinu parazita te na taj način pružiti olakšanje budućoj poljoprivrednoj praksi.

### **3.3. Problemi i nedostaci strategije HIGS**

Strategija HIGS je biotehnoška metoda koja se može iskoristiti u svrhu stvaranja modificiranih usjeva rezistentnih na biotičke, ali i abiotičke stresove te za stvaranje usjeva povećanog prinosa, produljenog roka trajanja, poboljšanog prehrambenog sastava, te promijenjenog fenotipa (Saurabh i sur. 2014). Međutim, postoji još mnogo otvorenih pitanja vezanih uz mehanizam i sigurnost korištenja takve tehnologije prije početka uporabe iste pri uzgoju kultiviranih biljaka. Pojedini

biljni patogeni i paraziti stvaraju sRNA molekule koje suprimiraju obrambeni odgovor biljke domaćina, a biljka domaćin također prenosi sRNA molekule u patogene i parazite kako bi inhibirala njihovu rezistenciju (Cai i sur. 2018). Fenomen prijenosa sRNA molekula između različitih organizama zasad je slabo istražen. Mehanizmi prijenosa nisu sasvim poznati, kao ni međusobna interakcija RNAi mašinerije iz taksonomski različitih jedinki. Iz tog razloga, unaprjeđenje efikasnosti strategije HIGS ovisi o daljnjim istraživanjima u tom području.

Specifično utišavanje samo jednog gena ponekad nije dostatno za dovoljno snažnu inhibiciju patogenosti i sprječavanje širenja zaraze određenim patogenom. Razlog tomu je što je nerijetko više gena uključeno u mehanizam virulencije, ali i specifično utišavanje jednog tipa mRNA molekule ne mora nužno rezultirati deaktivacijom efektorskog proteina. Kako bi se identificirale prikladne ciljane RNA molekule potrebno je prethodno provesti detaljne transkriptomске analize. Zbog načina na koji funkcionira RNAi mehanizam, javlja se i problem nespecifičnog, tzv. *off-target*, utišavanja RNA molekula sa sekvencom koja dijeli veliku homologiju s ciljnom. Transgene sRNA molekule na taj način mogu nespecifično vezati i utišavati gene i u genomu domaćina i u genomu patogena. Efekti takvog utišavanja mogu biti raznoliki, od pojave neželjenih svojstava do pogoršanih agronomskih svojstava. Danas postoje određeni računalni alati za dizajn koji se koriste za specifičnu i sistemsku procjenu nespecifičnih i neželjenih efekata RNAi mehanizama, ali potrebno ih je potvrditi koristeći dodatna ispitivanja (Yan i sur. 2020).

Daljnji problem koji se javlja je da HIGS nije aktivan u pojedinim tkivima, kao što su korijenje i plodovi. Poznate su i pojedine skupine gljiva i insekata koji sprječavaju unos siRNA molekula, što također onemogućava utišavanje gena inducirano domaćinom (Qi i sur. 2019). Još uvijek postoji manjak dostupnih protokola za transformaciju mnogih kultiviranih biljnih vrsta, a kod nekih biljaka se ne može efikasno genetički modificirati genomska DNA. Jedan od načina na koji bi se mogla zaobići ova prepreka je transformacija plastidne DNA, koja se ističe kao potencijalno više komercijalno i ekološki privlačnija metoda za zaštitu kultiviranih biljaka od infekcija patogenima (Zhang i sur. 2015).

Osim ograničenja u tehničkoj izvedbi metode, još jednu od značajnih prepreka u primjeni predstavlja i činjenica da strategija HIGS zahtjeva stvaranje genetički modificiranih biljaka. U javnosti danas i dalje postoji snažan otpor prema konzumaciji takvih biljaka, što je vrlo vjerojatno jedna od najvećih prepreka koje se moraju nadvladati kako bi se metoda mogla početi primjenjivati kao prikladna zamjena za kemijske pesticide.

## 4. Izazovi i budućnost RNAi baziranih biotehnoloških metoda u poljoprivredi

### 4.1. Kretanje malih RNA molekula između patogena i biljnih stanica

Male RNA molekule posjeduju svojstvo visoke mobilnosti, s mogućnošću lokalnog i sistemskog kretanja na razini biljke (Liu i Chen 2018). Međutim, sRNA se u prirodu mogu kretati i između nametnika i biljke domaćina. Danas je znanje u ovom području još uvijek oskudno, te postoje mnoge nepoznanice. Podrobnije upoznavanje mehanizama kretanja RNAi efektora između taksonomski različitih jedinki važno je kako bi se omogućilo napredovanje tehnologija koje upošljavaju RNAi mašineriju te uspješno na tržište uvela nova vrsta visoko efikasnih i ekološki prihvatljivih RNAi-baziranih biopesticida kao zamjena za kemijske.

Tijekom infekcije, patogeni iskorištavaju male RNA molekule kao jednu od brojnih molekularnih strategija u svrhu zaobilaženja obrambenih mehanizama domaćina i njihove modifikacije u vlastitu korist. Čini se da takva taktika uglavnom uključuje unos sRNA u tkivo domaćinske biljke kako bi se utišali domaćinski transkripti (Hudzik i sur. 2020). Ovaj mehanizam upošljava patogena gljiva *Botrytis cinerea*, uzročnik sive plijesni, otpuštajući nekoliko različitih sRNA molekula koje se prenose u domaćinsku biljku i utišavaju gene uključene u biljnu imunost. sRNA u procesu interagiraju s biljnim AGO1 protein, a mutanti u *ago1* genu rezistentni su na infekciju od strane *B. cinerea*, što dodatno potvrđuje međudjelovanja mašinerije za utišavanja gena između organizama (Weiberg i sur. 2013). Genetičke analize upućuju na to da je nastanak takvih fungálnih sRNA molekula ovisan o DCL1 i DCL2 proteinima *B. cinerea*. Sojevi s mutacijama koje inaktiviraju ove proteine ne mogu stvarati izvršne sRNA molekule, uslijed čega im je patogenost značajno oslabljena (Wang i sur. 2016). Postoji još mnogo identificiranih gljivičnih izvršnih sRNA molekula koji djeluju na sličan način, primjerice u gljivi *V. dahliae*, čije sRNA molekule također stupaju u interakciju s biljnim AGO1 proteinom tijekom infekcije (Wang i sur. 2016). Opisani fenomen nije ograničen samo na gljivične patogene. Parazitska biljka *Cuscuta campestris* stvara mnogo miRNA molekula koje akumuliraju u haustorijima te specifično ciljaju domaćinske mRNA molekule uključene u obranu od patogena, signalizaciju i funkcioniranje vaskularnog sustava (Hudzik i sur. 2020).

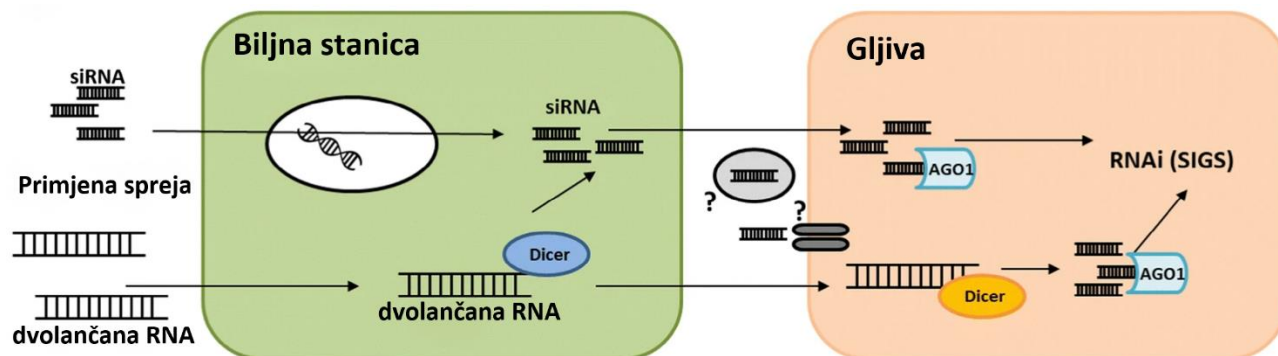
Mehanizam prijenosa sRNA molekula između različitih skupina organizama zasad je slabo istražen i nejasan. Nedavna istraživanja upućuju na to da ulogu u transferu imaju vanstanični mjehurići ili ekstracelularne vezikule (eng. *extracellular vesicles*) te na mogućnost da međuvrsna

RNA interferencija djeluje dvosmjerno. Ekstracelularne vezikule su membranske čestice ispunjene topivim molekulama i transmembranskim proteinima koje donorske stanice otpuštaju u okoliš (Hudzik i sur. 2020). U istraživanju iz 2018. godine, Cai i sur. pokazali su da stanice uročnjaka luče ekstracelularne vezikule kako bi prenijele sRNA molekule, uključujući miRNA i siRNA, u stanice patogena tijekom infekcije gljivom *B. cinerea* (Cai i sur. 2018). Utvrđeno je da vezikule akumuliraju na mjestima infekcije, gdje ih u sebe unose stanice *B. cinerea*. Mnoge od prenesenih biljnih sRNA molekula potencijalno utišavaju gljivične gene uključene u virulenciju, posebice gene uključene u vezikularni prijenos. Delecijom tih gena nastaju sojevi *B. cinerea* sa smanjenom virulencijom, što doprinosi hipotezi da takve sRNA mete imaju važnu ulogu u patogenosti gljive (Cai i sur. 2018). Ovaj rad govori u prilog teoriji o međuvrsnoj RNA interferenciji posredovanoj ekstracelularnim vezikulama, međutim, sam mehanizam njihova lučenja od strane domaćina i endocitoze od strane patogena i dalje je nerazjašnjen (Hudzik i sur. 2020). Potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjeli detalji mehanizma pokretanja malih regulatornih RNA molekula između taksonomski odvojenih skupina. S obzirom na to da se međuvrsna RNAi odvija kao prirodni proces razmjene sRNA između određene biljke i patogena, ciljano utišavanje gena patogena u tom slučaju ne zahtjeva stabilnu genetičku transformaciju. Iz tog razloga, buduća istraživanja imaju potencijal razriješiti brojne prepreke s kojima se suočava razvoj metoda koje upošljavaju proces RNA interferencije kao biopesticida u biotehnološkoj agronomiji te ubrzati uvođenje takvih metoda u široku primjenu.

#### **4.2. Izvana inducirano utišavanje gena**

Izvana inducirano utišavanje gena (eng. *spray-induced gene silencing* – SIGS) druga je inovativna strategija za kontrolu bolesti biljaka bazirana na RNA interferenciji. Metoda počiva na istom mehanizmu kao i HIGS, ali razlikuje se u tome što SIGS ne zahtjeva stabilnu genetičku transformaciju. SIGS uključuje aplikaciju dvolančanih RNA ili malih RNA molekula koje ciljaju gene za virulenciju patogena u okoliš putem spreja, tj. njihovu vanjsku aplikaciju na biljku. Poprskane dvolančane RNA molekule se unose u biljku još nedovoljno poznatim mehanizmima i dorađuju u siRNA molekule koje se zatim prenose u stanice patogena. Nakon što patogen unese RNA molekule, u njegovom organizmu se postiže RNAi efekt i posljedični učinci na virulenciju ili vijabilnost (Wang i Jin 2017). Patogene gljive mogu u sebe unijeti i prekursorske dvolančane RNA i siRNA molekule koje nastaju nakon dorade (Koch i sur. 2016). Nije sasvim poznato na koji

način se odvija ovaj transfer, ali moguće je da u njemu sudjeluju ekstracelularne vezikule ili RNA-prijenosni proteini. U gljivi *Fusarium graminearum*, AGO1 i DICER2 proteini smatraju se ključnim medijatorima u odvijanju procesa utišavanja gena (Chen i sur. 2015). Model djelovanja strategije utišavanja gena induciranog sprejom prikazan je na Slici 4.



**Slika 4.** Predloženi mehanizam strategije izvana induciranog utišavanja gena na primjeru prijenosa transgene RNA molekule iz biljne stanice u patogenu gljivu (preuzeto iz Koch i sur. 2018).

Strategiju su prvi puta primijenili Koch i sur. u istraživanju objavljenom 2016. godine kako bi pokušali suzbiti infekciju biljaka ječma od strane patogene gljive *Fusarium graminearum*, nakon uspješne primjene strategije HIGS u istu svrhu nekoliko godina ranije (Koch i sur. 2013). Listove ječma poprskali su puferom koji je sadržavao 791 pb duge dvolančane RNA molekule, prekursore za siRNA homologne trima genima čiji produkti sudjeluju u biosintezi ergosterola u stanicama gljive, a česta su meta (supstrat) fungicida. Nakon aplikacije takvog spreja, došlo je do snažne inhibicije daljnjeg rasta patogena i širenja infekcije. Nadalje, gljive mutirane u DCL-1 proteinu pokazale su se neosjetljive na efekte spreja, čime je dodatno potvrđeno da mehanizam inhibicije ovisi o funkcionalnoj mašineriji RNA interferencije (Koch i sur. 2016). Primjena strategije kasnije se pokazala uspješnom i pri suzbijanju gljivičnih infekcija na raznom voću, povrću i cvijeću (Wang i sur. 2016).

Uspješnost primjene strategije SIGS ovisi o sposobnosti pojedinog patogena za unos stranih sRNA molekula. Eukariotski mikrobi koji uzrokuju bolesti usjeva pokazuju različitu efikasnost unosa RNA iz okoliša. Obzirom da je SIGS baziran na prskanju dvolančanih RNA kao prekursora za siRNA molekule koje pokreću mehanizam utišavanja gena, metoda nije učinkovita protiv patogena koji nemaju sposobnost unosa okolišnih RNA (Qiao i sur. 2021). Problem se javlja i u formulaciji spreja za aplikaciju dvolančanih RNA molekula na biljku. Najjednostavnija, površinska, aplikacija

predstavlja problem za primjenu protiv insekata zbog slabe sposobnosti dvolančanih RNA da prodru kroz kutikulu pojedinih vrsta (Yan i sur. 2020). Jedan od predloženih načina na koji se može zaobići ovaj problem je doprema RNAi efektora u biljku putem navodnjavanja. Dvolančane RNA molekule dopremljene kroz korijenje mogu inducirati RNAi efekt u kukcima nametnicima, a metoda je vrlo povoljna i za razvoj sustava supresije nametnika na većem području (Yan i sur. 2020). Svi navedeni načini dopreme RNAi prekursora u domaćinsku biljku suočavaju se s problemom okolišne razgradnje dvolančanih RNA molekula. Dvolančane RNA podložne su djelovanju nukleaza koje su sveprisutne u prirodi te je pokazano da do njihove razgradnje dolazi približno dva dana nakon dospijevanja u tlo bez obzira na tip i međusobne razlike različitih vrsta tala (Dubelman i sur. 2014). Iz ovog razloga, mnoga istraživanja usmjeravaju se na razvoj sustava dopreme dvolančanih RNA posredstvom nanočestica. Nanočestice stabiliziraju dvolančane RNA i pružaju im zaštitu RNA od okolišnih učinaka te potiču njihovo prenošenje preko kutikule insekata i staničnih membrana (Kumar i sur. 2019). Iako su potrebna detaljnija istraživanja o potencijalnim rizicima primjene tehnologije nanočestica na okoliš i ljudsko zdravlje, formulacija spreja za SIGS koja uključuje nanočestice čini se kao vrlo obećavajuća metoda za stvaranje efikasnog RNAi-baziranog biopesticida.

Koch i sur. razvili su strategiju SIGS kao alternativu za strategiji utišavanja gena inducirano domaćinom zbog upitne primjenjivosti HIGS-a uslijed opozicije opće populacije prema genetički modificiranim biljkama kao izvoru hrane, te zbog nedostatka efikasnih protokola za transformaciju velikog broja kultiviranih biljaka. S obzirom na to da ne uključuje stvaranje transgeničnih biljaka, SIGS predstavlja jednostavno i elegantno rješenje za najveće prepreke s kojima se suočava strategija HIGS. Unatoč tome, neovisno koriste li se egzogeno ili endogeno dodane dvolančane RNA molekule dizajnirane da ciljaju specifičan gen i pokreću RNAi odgovor, primjena i HIGS i SIGS tehnologije pokazala se kao obećavajuća alternativa konvencionalnoj uporabi pesticida prilikom uzgoja biljaka (Koch i sur. 2019).

## 5. Zaključak

Uz rastući broj dokaza o štetnom učinku kemijskih pesticida po okoliš te mnogobrojnim i ozbiljnim posljedicama na ljudsko zdravlje, postoji hitna potreba za osmišljavanjem pogodne alternative koja će istovremeno omogućavati prijeko potrebnu zaštitu poljoprivrednih kultura od biljnih zaraza uzrokovanim patogenima i uvesti održivost u poljoprivrednu praksu. S obzirom na sve veći broj istraživanja i širenje znanja u području biljne urođene imunosti, kao jedna od takvih alternativna nameće se primjena RNAi-baziranih bioloških pesticida. Sustav biljne RNA interferencije iznimno je kompleksan i obavlja mnogobrojne funkcije, među kojima je i obrana od infekcije patogenima. Biljne sRNA molekule djeluju kao glavni posrednici u odgovoru na zarazu, aktivirajući mehanizme biljne obrane i ciljano utišavajući gene invadirajućih patogena. Osim toga, biljke i njihovi patogeni tijekom interakcija međusobno razmjenjuju male regulatorne RNA molekule preko zamršenog sustava međuvrsne RNA interferencije. Upravo ova saznanja dovela su do ideje o upošljavanju RNAi sustava u biotehnološkoj agronomiji kako bi se razvile metode specifičnog suzbijanja patogena s minimalnim cijenama po okoliš i čovjeka.

Jedna od osmišljenih metoda je utišavanje gena inducirano domaćinom ili HIGS. Strategija je bazirana na stvaranju transgeničnih biljnih linija sa stabilnom ekspresijom sRNA molekula koje ciljano utišavaju gene patogena pokretanjem mehanizma RNAi i na taj način dovode do regresije bolesti. Uz dobro prethodno poznavanje genomskih sekvenci i molekularnih funkcija ciljnih gena te precizan dizajn RNAi prekursora, ova se metoda pokazalo vrlo uspješnom u suzbijanju raznih ekonomski značajnih patogena na kultiviranim biljkama. Kao pogodna alternativa genetičkoj modifikaciji biljaka predložena je i okolišna primjena sRNA molekula koje ciljaju gene biljnih patogena. Ova najmodernija strategija, nazvana izvana inducirano utišavanje gena ili SIGS, predstavlja jednostavan način za zaobilazanje potrebe za stabilnom ekspresijom transgena s kojom se suočava HIGS uvođenjem spreja kao sredstva dostave izvršnih molekula RNAi. Pomoću takvih tehnologija, suzbijene su infekcije mnogobrojnim patogenim gljivama i oomicetama, kao što su *Verticillium* i *Phytophthora*, te infestacije parazitskim insektima, među kojima se ističe uspješno suzbijanje vrsta iz nadporodice *Aphidoidea* koji su među najzloglasnijim nametnicima na usjevima. Suzbijanje zaraza parazitskim oblicima također je moguće, međutim, istraživanja u ovom području su manjkava i postoji potreba za produblivanjem baza podataka o esencijalnim



genima i genima koji posreduju virulenciju oblića kako bi se metode mogle uposliti i za suzbijanje ovih biljnih patogena.

Postoji još mnogo otvorenih pitanja prije početka ere komercijalne primjene RNAi kao biopesticida. Buduća istraživanja imaju zadatak proučiti univerzalne i specifične mehanizme koje upošljavaju različiti patosustavi, utvrditi načine kretanja sRNA molekula između vrsta i njihove izvršne mehanizme te bolje razumjeti ulogu sRNA u sustavu biljne imunosti. Takva saznanja vode boljim optimizacijama RNAi-baziranih metoda u poljoprivredi te smanjenju nespecifičnih i neželjenih efekata. Također, potrebno je bolje ispitati učinke malih regulatornih RNA molekula na okoliš i ljudsko zdravlje kako bi se utvrdila njihova sigurnost u komercijalnoj primjeni. Uz dovoljno ulaganja u navedena unaprjeđenja, moderna biotehnologija može osigurati efikasnu, sigurnu i održivu zamjenu za kemijske pesticide u poljoprivrednoj praksi.

## 6. Literatura

- Abdellatef, E., Will, T., Koch, A., Imani, J., Vilcinskis, A. i Kogel, K.H. (2015) Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid *Sitobion avenae*. *Plant biotechnology journal*, **13**, 849-857.
- Aktar, M.W., Sengupta, D. i Chowdhury, A. (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, **2**, 1.
- Baum, J.A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M. i Vaughn, T. (2007) Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature biotechnology*, **25**, 1322-1326.
- Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., Ilagan, O., Lawrence, C., Levine, S., Moar, W. i Mueller, G. (2012) Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS ONE*, **7**, e47534
- Borrelli, V.M., Brambilla, V., Rogowsky, P., Marocco, A. i Lanubile, A. (2018) The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology. *Frontiers in plant science*, **9**, 1245.
- Cai, Q., Qiao, L., Wang, M., He, B., Lin, F.M., Palmquist, J., Huang, S.D. i Jin, H. (2018) Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, **360**, 1126-1129.
- Chen, H.M., Chen, L.T., Patel, K., Li, Y.H., Baulcombe, D.C. i Wu, S.H. (2010) 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 15269-15274.
- Chen, Y., Gao, Q., Huang, M., Liu, Y., Liu, Z., Liu, X. i Ma, Z. (2015) Characterization of RNA silencing components in the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Scientific reports*, **5**, 1-13.
- Dinh, P.T., Brown, C.R. i Elling, A.A. (2014) RNA interference of effector gene Mc16D10L confers resistance against *Meloidogyne chitwoodi* in *Arabidopsis* and potato. *Phytopathology*, **104**, 1098-1106.

- Dubelman, S., Fischer, J., Zapata, F., Huizinga, K., Jiang, C., Uffman, J., Levine, S. i Carson, D. (2014) Environmental fate of double-stranded RNA in agricultural soils. *PloS One*, **9**, e93155.
- Forbes, G.A. (2012) Using host resistance to manage potato late blight with particular reference to developing countries. *Potato Research*, **55**, 205-216.
- Guo, H., Song, X., Wang, G., Yang, K., Wang, Y., Niu, L., Chen, X. i Fang, R. (2014) Plant-generated artificial small RNAs mediated aphid resistance. *PLoS One*, **9**, e97410.
- Hua, C., Zhao, J.H. i Guo, H.S. (2018) Trans-kingdom RNA silencing in plant–fungal pathogen interactions. *Molecular plant*, **11**, 235-244.
- Huang, G., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J. i Hussey, R.S. (2006) Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 14302-14306.
- Huang, C.Y., Wang, H., Hu, P., Hamby, R. i Jin, H. (2019) Small RNAs–big players in plant–microbe interactions. *Cell host & microbe*, **26**, 173-182.
- Hudzik, C., Hou, Y., Ma, W. i Axtell, M.J. (2020) Exchange of small regulatory RNAs between plants and their pests. *Plant physiology*, **182**, 51-62.
- Jahan, S.N., Åsman, A.K., Corcoran, P., Fogelqvist, J., Vetukuri, R.R. i Dixelius, C. (2015) Plant-mediated gene silencing restricts growth of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of experimental botany*, **66**, 2785-2794.
- Kamthan, A., Chaudhuri, A., Kamthan, M. i Datta, A. (2015) Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Frontiers in plant science*, **6**, 208.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J.K., Staskawicz, B.J. i Jin, H. (2006) A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 18002-18007.

- Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatef, E., Linicus, L., Johannsmeier, J., Jelonek, L., Goesmann, A. i Cardoza, V. (2016) An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLoS pathogens*, **12**, e1005901.
- Koch, A., Höfle, L., Werner, B.T., Imani, J., Schmidt, A., Jelonek, L. i Kogel, K.H. (2019) SIGS vs HIGS: a study on the efficacy of two dsRNA delivery strategies to silence *Fusarium* FgCYP51 genes in infected host and non-host plants. *Molecular plant pathology*, **20**, 1636-1644.
- Koch, A., Kumar, N., Weber, L., Keller, H., Imani, J. i Kogel, K.H. (2013) Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 $\alpha$ -demethylase–encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 19324-19329.
- Koch, A., Stein, E. i Kogel, K.H. (2018) RNA-based disease control as a complementary measure to fight *Fusarium* fungi through silencing of the azole target Cytochrome P450 Lanosterol C-14  $\alpha$ -Demethylase. *European journal of plant pathology*, **152**, 1003-1010.
- Kumar, S., Nehra, M., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Hassan, A.A. i Kim, K.H. (2019) Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *Journal of Controlled Release*, **294**, 131-153.
- Mao, Y.B., Cai, W.J., Wang, J.W., Hong, G.J., Tao, X.Y., Wang, L.J., Huang, Y.P. i Chen, X.Y. (2007) Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature biotechnology*, **25**, 1307-1313.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. i Jones, J.D. (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, **312**, 436-439.
- Li, H., Khajuria, C., Rangasamy, M., Gandra, P., Fitter, M., Geng, C., Woosely, A., Hasler, J., Schulenberg, G., Worden, S. i McEwan, R. (2015) Long ds RNA but not si RNA initiates RNAi in western corn rootworm larvae and adults. *Journal of Applied Entomology*, **139**, 432-445.

- Lilley, C.J., Bakhetia, M., Charlton, W.L. i Urwin, P.E. (2007) Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. *Molecular Plant Pathology*, **8**, 701-711.
- Liu, L. i Chen, X. (2018) Intercellular and systemic trafficking of RNAs in plants. *Nature plants*, **4**, 869-878.
- Luo, J., Liang, S., Li, J., Xu, Z., Li, L., Zhu, B., Li, Z., Lei, C., Lindsey, K., Chen, L. i Jin, S. (2017) A transgenic strategy for controlling plant bugs (*Adelphocoris suturalis*) through expression of double-stranded RNA homologous to fatty acyl-coenzyme A reductase in cotton. *New Phytologist*, **215**, 1173-1185.
- Marraffini, L.A. i Sontheimer, E.J. (2010) CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, **11**, 181-190.
- Mosher, R.A. (2010) Maternal control of Pol IV-dependent siRNAs in *Arabidopsis* endosperm. *New Phytologist*, **186**, 358-364.
- Nicol, J.M., Turner, S.J., Coyne, D.L., den Nijs, L.J.M.F., Hockland, S. i Maafi, Z.T. (2011) Current nematode threats to world agriculture. U: *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*. Springer, Dordrecht, str. 21-43.
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J. i Schweizer, P. (2010) HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell*, **22**, 3130-3141.
- Paces, J., Nic, M., Novotny, T. i Svoboda, P. (2017) Literature review of baseline information to support the risk assessment of RNA i-based GM plants. *EFSA Supporting Publications*, **14**, 1246E.
- Qi, T., Guo, J., Peng, H., Liu, P., Kang, Z. i Guo, J. (2019) Host-induced gene silencing: a powerful strategy to control diseases of wheat and barley. *International journal of molecular sciences*, **20**, 206.
- Qiao, L., Lan, C., Capriotti, L., Ah-Fong, A., Sanchez, J.N., Hamby, R., Heller, J., Zhao, H., Glass, N.L., Judelson, H.S. i Mezzetti, B. (2021) Spray-induced gene silencing for disease control is

- dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal*, DOI: 10.1111/pbi.13589
- Qiao, Y., Liu, L., Xiong, Q., Flores, C., Wong, J., Shi, J., Wang, X., Liu, X., Xiang, Q., Jiang, S. i Zhang, F. (2013) Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. *Nature genetics*, **45**, 330-333.
- Rogers, K. i Chen, X. (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, **25**, 2383-2399.
- Saurabh, S., Vidyarthi, A.S. i Prasad, D. (2014) RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*, **239**, 543-564.
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N. i Nelson, A. (2019) The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution*, **3**, 430-439.
- Simon, J.C. i Peccoud, J. (2018) Rapid evolution of aphid pests in agricultural environments. *Current opinion in insect science*, **26**, 17-24.
- Song, Y. i Thomma, B.P. (2018) Host-induced gene silencing compromises *Verticillium* wilt in tomato and *Arabidopsis*. *Molecular plant pathology*, **19**, 77-89.
- Tan, J.A.C., Jones, M.G. i Fosu-Nyarko, J. (2013) Gene silencing in root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) significantly reduces reproduction in a plant host. *Experimental Parasitology*, **133**, 166-178.
- Voinnet, O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, **136**, 669-687.
- Wang, M. i Jin, H. (2017) Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection. *Trends in microbiology*, **25**, 4-6.
- Wang, M., Weiberg, A., Lin, F.M., Thomma, B.P., Huang, H.D. i Jin, H. (2016) Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature plants*, **2**, 1-10.

- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.D. i Jin, H. (2013) Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, **342**, 118-123.
- Wilson, R.C. i Doudna, J.A. (2013) Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics*, **42**, 217-239.
- Wytinck, N., Manchur, C.L., Li, V.H., Whyard, S. i Belmonte, M.F. (2020) dsRNA uptake in plant pests and pathogens: Insights into RNAi-based insect and fungal control technology. *Plants*, **9**, 1780.
- Yan, S., Ren, B., Zeng, B. i Shen, J. (2020) Improving RNAi efficiency for pest control in crop species. *BioTechniques*, **68**, 283-290.
- Yang, Y., Jittayasothorn, Y., Chronis, D., Wang, X., Cousins, P. i Zhong, G.Y. (2013) Molecular characteristics and efficacy of 16D10 siRNAs in inhibiting root-knot nematode infection in transgenic grape hairy roots. *PloS one*, **8**, e69463.
- Yin, K. i Qiu, J.L. (2019) Genome editing for plant disease resistance: applications and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **374**, 20180322.
- Zhang, J., Khan, S.A., Hasse, C., Ruf, S., Heckel, D.G. i Bock, R. (2015) Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, **347**, 991-994.
- Zhang, T., Zhao, Y.L., Zhao, J.H., Wang, S., Jin, Y., Chen, Z.Q., Fang, Y.Y., Hua, C.L., Ding, S.W. i Guo, H.S. (2016) Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature plants*, **2**, 1-6.
- Zilberman, D., Cao, X. i Jacobsen, S.E. (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**, 716-719.
- <https://www.usda.gov/topics/biotechnology/biotechnology-frequently-asked-questions-faqs>  
(pristupljeno 23.7.2020.)

## 7. Sažetak

Naglo širenje spoznaja u području biljne RNA interferencije dovelo je do ideje o primjeni tog mehanizma u poljoprivrednom uzgoju biljaka u svrhu povećanja prinosa kultiviranih biljaka. U posljednje vrijeme intenzivno se radi na razvoju metoda koje koriste biljni RNAi mehanizam u svrhu postizanja otpornosti na brojne ekonomski važne biljne patogene. Jedna takva metoda je utišavanje gena inducirano domaćinom ili HIGS. HIGS uključuje stvaranje transgeničnih biljaka sposobnih da proizvode sRNA molekule koje ciljaju gene određenog patogena odgovorne za virulenciju ili njegove esencijalne gene. Ova metoda se pokazala kao uspješna strategija za dobivanje biljaka rezistentnih na različite skupine patogena, uključujući insekte, oblice, gljive i oomicete. Varijacija ove strategije, izvana inducirano utišavanje gena ili SIGS, razvijena je kako bi se zaobišli problemi uvođenja genetički modificiranih biljaka u komercijalnu proizvodnju i zahtjevan proces genetičke transformacije. Umjesto biljaka modificiranih da stvaraju specifične sRNA, strategija SIGS koristi izvana dodane sRNA molekule koje ciljaju gene patogena. Upošljavanje mehanizma RNAi kako bi se postigla otpornost ispostavljeno je kao moderna taktika koja uspješno nadilazi većinu problema proizašlih ih prekomjernog korištenja kemijskih pesticida. Tako je stvorena nova generacija djelotvornih i ekološki prihvatljivih RNAi-baziranih bioloških pesticida, s velikim potencijalom za primjenu u masovnom uzgoju biljaka u okviru poljoprivredne prakse.

Ključne riječi: RNAi, sRNA, interakcije biljaka i patogena, biopesticidi, HIGS



## **8. Summary**

The rapid expansion of knowledge in the field of plant RNA interference has brought up many ideas concerning the use of this mechanism in plant agriculture to increase the yield of cultivated plants. Lately, intensive work has been put in developing methods which use the plant RNAi mechanism for the purpose of developing resistance on numerous economically important plant pathogens. One such method is host-induced gene silencing or HIGS. HIGS includes generating transgenic plants with the ability to produce sRNA molecules which target virulence or essential genes of a specific pathogen. This method has been shown as a successful strategy for obtaining plants resistant to different groups of pathogens, including insects, nematodes, fungi and oomycetes. A variation of this strategy, spray-induced gene silencing or SIGS, has been developed to bypass the problems of introducing genetically modified plants in commercial production and the challenging process of genetic transformation. Instead of producing plants which synthesize specific sRNA, SIGS strategy uses externally applied sRNA molecules which target pathogen genes. The employment of RNAi mechanism to achieve resistance has been shown as a modern tactic that successfully overcomes most of the notorious problems which the overuse of chemical pesticides faces. Thus, scientists have created a new generation of effective and sustainable RNAi-based biological pesticides with a great potential of application in agriculture.

Key words: RNAi, sRNA, plant-pathogen interactions, biopesticides, HIGS

## **9. Životopis**

Rođena sam 20.7.1999. godine u gradu Varaždinu u Republici Hrvatskoj, gdje sam i odrasla i živim s roditeljima i bratom. U razdoblju od 2006. do 2014. godine pohađala sam VI. Osnovnu školu Varaždin, nakon čega sam četverogodišnje srednjoškolsko obrazovanje nastavila u Prvoj gimnaziji Varaždin, prirodoslovno-matematički smjer. Odličan uspjeh i kontinuiran trud u obrazovanju omogućili su mi 2018. godine postizanje dobrih ocjena na maturi i upis smjera Molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje trenutno završavam treću godinu preddiplomskog studija. Iznimno se dobro služim engleskim jezikom u govoru i pismu, a trenutno učim i talijanski. Navedene vještine omogućile su mi postizanje radnog iskustva u području marketinga kojim sam se bavila tijekom ljetnih mjeseci tokom školovanja.