



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Špela COLJA

**PRISTOPI ZA TRAJNEJŠO ODPORNOST
KMETIJSKIH RASTLIN NA ŠKODLJIVCE Z
UPORABO GENOV IZ *Bacillus thuringiensis* TER Z
RNA INTERFERENCO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Špela COLJA

**PRISTOPI ZA TRAJNEJŠO ODPORNOST KMETIJSKIH RASTLIN NA
ŠKODLJIVCE Z UPORABO GENOV IZ *Bacillus thuringiensis* TER Z
RNA INTERFERENCO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**SUSTAINABLE APPROACHES TO INSECT PESTS RESISTANT
PLANTS: *Bacillus thuringiensis* GENES AND RNA INTERFERENCE**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2017

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta Bohanca.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Metka HUDINA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Borut BOHANEČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Stanislav TRDAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 15. 9. 2017

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 606:631.528(043.2)
KG	kmetijske rastline/odpornost/škodljivci/žuželke/ <i>Bacillus thuringiensis</i> /Bt-toksini/RNAi/piramidanje
AV	COLJA, Špela
SA	BOHANEČ, Borut (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Univerzitetni študijski program prve stopnje Kmetijstvo - agronomija
LI	2017
IN	PRISTOPI ZA TRAJNEJŠO ODPORNOST KMETIJSKIH RASTLIN NA ŠKODLJIVCE Z UPORABO GENOV IZ <i>Bacillus thuringiensis</i> TER Z RNA INTERFERENCO
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VI, 19 str., 2 sl., 38 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Škodljivci lahko relativno hitro razvijejo odpornost na razne insekticidne snovi in s tem povzročajo velike izgube pridelkov. Piramidiranje večih Bt-genov v rastlini, lahko oteži razvoj odpornosti, pod pogojem, da si piramideni geni niso preveč podobni. V nasprotnem primeru se pri žuželah pojavi navzkrižna odpornost. V izogib temu, lahko uporabimo sintetične (Syn-vip3BR) ali fuzijske gene (Cry2aX1) ali nove Cry in Vip gene namesto trenutno razširjenih (Cry1I, Cry2Af2). Trajnejšo odpornost rastlin se da zagotoviti z RNA interferenco (RNAi). V žuželah, ki absorbirajo dolgo dvoverižno RNA in imajo dovolj specifične mehanizme v telesu, ki sprožijo proces RNAi, se utiša določen gen. To povzroči upočasnen in abnormalen razvoj žuželke, poveča občutljivost na zunanje dejavnike ali smrt. V diplomskem delu so predstavljene tudi raziskave, v katerih so kombinirali oba pristopa hkrati, odpornost izzvano z Bt-toksini in RNAi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1
DC UDC 606:631.528(043.2)
CX crops/resistance/pests/insects/*Bacillus thuringiensis*/Bt-toxins/RNAi/dsRNA/
pyramiding
AU COLJA, Špela
AA BOHANEČ, Borut (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy, Academic
Study Programme in Agriculture - Agronomy
PY 2017
TI SUSTAINABLE APPROACHES TO INSECT PESTS RESISTANT PLANTS:
Bacillus thuringiensis GENES AND RNA INTERFERENCE
DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
NO VI, 19 p., 2 fig., 38 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Development of insect pests resistance is a common problem causing high yield
losses. Different modes of insecticidal actions have been proposed to overcome this
problem. Pyramiding Bt-gene into one plant, can delay evolution of resistance, under
condition that Bt-proteins express low level of similarity. In case of very similar
proteins, insects might exhibit cross-resistance. To avoid this, various Bt- toxins
expressing genes or synthetic genes (Syn-vip3BR), chimeric (Cry2aX1) or Cry and
Vip toxins that are sufficiently different in comparison to those currently used (Cry1I,
Cry2Af2). Another approach, RNA interference, can be used as another pest control in
plants. Insects that absorb long double stranded RNA and have specific cell
machineries to activate the RNAi process, get target gene silenced. Consequences can
be: growth inhibition or abnormal growth, higher sensitivity to external factors or
death. This paper also describes studies, in which both approaches: Bt-toxins and
RNAi, were combined.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
1 UVOD	1
2 Bt-RASTLINE	2
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> IN Bt-INSEKTICIDNI PROTEINI	2
2.1.1 Delovanje Bt-toksinov	3
2.1.1.1 Receptorji	3
2.2 RAZVOJ ODPORNOSTI CILJNIH ŽUŽELK	3
2.3 BIOTEHNOLOŠKI PRISTOPI ZA TRAJNEJŠO ODPORNOST	5
2.3.1 Piramidiranje Bt-genov	5
2.3.2 Novi Bt-geni	5
2.3.2.1 Geni Cry	5
2.3.2.2 Geni Vip	6
3 RNAi	7
3.1 NAČIN DELOVANJA	7
3.1.1 Aplikacija dsRNA	8
3.1.2 Absorpcija dvoverižne RNA in sistemsko širjenje RNAi signala	9
3.2 OBRAMBNI MEHANIZMI, ZAVIRANJE RASTI, PREPREČEVANJE ODPORNOSTI, LETALNA RNAi	10
3.3 PARENTALNA RNAi	11
3.4 TRANSPLASTOMSKA RNAi	12
4 Bt TOKSINI V KOMBINACIJI Z RNAi	13
5 ZAKLJUČEK	15
6 VIRI	16

KAZALO SLIK

Slika 1: Uporaba RNAi kot insekticida.	8
Slika 2: Absorpcija in procesiranje dsRNA v celici koruznega hrošča. Natančna vloga SIL proteinov pri žuželkah ni znana.	10

1 UVOD

Hitro naraščanje človeške populacije zahteva vedno večjo pridelavo hrane, za kar je potrebno nenehno razvijanje novih in boljših kmetijskih tehnologij, hkrati pa je treba minimizirati negativne vplive na okolje. Eden od glavnih vzrokov za izgube v kmetijski proizvodnji hrane so škodljivci, posebej žuželke, ki se prehranjujejo s kmetijskimi rastlinami (Rodrigues in Figueira, 2016). Zato se to diplomsko delo osredotoča predvsem na metode, s katerimi bi se na trajnejši in okolju prijazen način preprečilo velike izgube kmetijskih pridelkov zaradi žuželk.

Trenutno najbolj razširjene metode varstva rastlin pred žužerkami, uporaba insekticidov in transgenih rastlin, ki izražajo *Bacillus thuringiensis* insekticidne proteine, postajajo vedno manj učinkovite. Žuželke zaradi selekcijskega pritiska prej ko slej razvijejo odpornost na kemične insekticide. Prav tako se v zadnjih 10 letih poroča o vedno več populacijah žuželk, ki so postale odporne na do sedaj uporabljane Bt toksine. Intenzivna uporaba kemikalij proti žuželkam povzroča onesnaženje okolja in lahko ogroža zdravje ljudi, koristnih žuželk in ostalih organizmov; prva generacija Bt pridelkov, ki je sicer precej zmanjšala uporabo fitofarmacevtskih sredstev pri določenih kmetijskih rastlinah kot sta bombaž (*Gossypium* spp.) in koruza (*Zea mays*) (Rodrigues in Figueira, 2016), pa prav tako ne predstavlja več zadostnega varstva pred rastlinskimi škodljivci. Zato je potrebno razviti nove metode za varstvo rastlin.

Cilj diplomskega dela je raziskati novejšje biotehnološke načine, ki omogočajo dolgoročnejšo varstvo kmetijskih rastlin pred rastlinojedimi žužerkami. Idealno varstvo, na katero ciljamo, je ekonomično, okolju prijazno, lahko izvedljivo v praksi in specifično za ciljne organizme.

2 Bt-RASTLINE

Razvoj in komercializacija transgenih rastlin z vgrajenimi geni *Bacillus thuringiensis* (Bt), ki izražajo insekticidne proteine in jih na kratko poimenujemo s predpono Bt- (Alkalaj in Bohanec, 2015), sta revolucionirala kmetijstvo v zadnjih dvajsetih letih. Osnovo za ta razvoj so omogočila odkritja na področju rastlinskih transformacij in napredek genetskega inženiringa ter določitev in klasifikacija insekticidnih Bt-proteinov.

Prva komercialno dostopna Bt-rastlina je bil krompir (*Solanum tuberosum*) z genom cry3A, NewLeaf (NatureMark), leta 1995, ne dolgo zatem so postali dostopni še transgena koruza in bombaž, ki izraža Cry1Ac (Bollgard I v ZDA in Ingard v Avstraliji) (Castagnola in Jurat-Fuentes, 2012). Od takrat se je komercialna uporaba transgenih Bt-rastlin razširila, vendar le v omejenem številu držav. V teh državah gojenje Bt-poljščin že nadomešča pridelavo konvencionalnih sort, predvsem zaradi višjih pridelkov in občutno manjše porabe insekticidov ter s tem manjših stroškov. Neugodna posledica vedno večje, dolgotrajne pridelave brez upoštevanja določenih ukrepov (kot so dovolj velika območja pribežališča) pa je razvoj odpornosti žuželk na Bt-toksine.

2.1 *Bacillus thuringiensis* IN Bt-INSEKTICIDNI PROTEINI

Bacillus thuringiensis (Bt) je aerobna sporogena Gram-pozitivna paličasta bakterija. (Panevska, 2016). Prisotna je v več okoljih, najdemo jo predvsem v zemlji (Schnepf in sod., 1998). Deluje kot naravni bioinsekticid, saj tvori insekticidne proteine, imenovane Cry, Cyt in Vip, ki so biorazgradljivi. Bt-insekticidni proizvodi so v uporabi že desetletja za zatiranje škodljivcev iz redov metuljev (Lepidoptera), hroščev (Coleoptera) in dvokrilcev (Diptera) ter predstavljajo večino vseh prodanih bioinsekticidnih produktov po svetu. Ker pa so Bt-proteini v okolju hitro razgradljivi, je prišlo do razvoja transformiranih rastlin, ki same izražajo toksine, jih akumulirajo v tkivih in so tako bolj učinkovite in specifične za ciljne žuželke (Castagnola in Jurat-Fuentes, 2012). Danes večina transgenih rastlin odpornih na žuželke vsebuje gene Bt (Rodrigues in Figueira, 2016).

Bakterija *Bacillus thuringiensis* ob sporulaciji tvori insekticidne kristalne strukture. Večinoma so sestavljene iz enega ali večih proteinov ali δ -endotoksinov, ki jih imenujemo tudi Cry in Cyt proteini. Ti so toksični le za specifične žuželke in neškodljivi za vretenčarje in rastline (Bravo in sod., 2007).

Nekateri serotipi Bt proizvajajo poleg Cry in Cyt še drugačne insekticidne proteine, imenovane Vip, ki ne tvorijo parasporalnih kristalov. Izločeni so med vegetativno fazo rasti (Bravo in sod., 2012). Vip toksini imajo drugačen način delovanja na ciljne žuželke kot Cry-toksini, predvsem se razlikujejo po načinu absorpcije v črevesju žuželke.

2.1.1 Delovanje Bt-toksinov

Delovanje Cry proteinov je kompleksno in večstopenjsko. Najprej se morajo raztopiti, nekatere pa je potrebno tudi razgraditi do aktivne insekticidne oblike. To se zgodi v črevesnih votlinah žuželk ob prisotnosti peptidaz. Aktivne Cry molekule se nato vežejo na specifična mesta na epitelu srednjega črevesja žuželke, pod določenimi pogoji oligomerizirajo in omogočijo, da se odprejo kationski kanali ali pore v membranski celici. V celice tako vdrejo ioni in voda, kar povzroči razpad celice in posledično smrt žuželke.

Za delovanje so torej potrebni določeni pogoji v organizmu, ki jim ustreza le relativno majhno število žuželk, večina drugih nevretenčarjev in vretenčarji pa jih ne izpolnjujejo (AgBioWorld, 2001). Cry proteini so toksični za nekatere žuželke iz redov metuljev (Lepidoptera), hroščev (Coleoptera), dvokrilcev (Diptera), kožokrilcev (Hymenoptera) in za gliste (Nematoda). Cyt najdemo v serotipih Bt, ki so večinoma letalni za dvokrilce, npr. za komarje (Culicidae) in ličinke žalovalk (Simuliidae). Vip proteini, ki se izločajo med vegetativno fazo rasti bakterije, delujejo insekticidno na vrste hroščev, metuljev in polkrilcev (Hemiptera) (Koch in sod., 2015). Kljub temu, da imajo vse tri skupine proteinov insekticidni potencial, je pri agrotehničnih ukrepih največji poudarek na Cry insekticidnih proteinih.

2.1.1.1 Receptorji

Aktivne oblike Cry proteinov se v črevesju žuželke vežejo na specifične receptorje. Pri nekaterih vrstah iz reda Lepidoptera, Coleoptera in Diptera je bil kot primarno vezavno mesto Cry molekul (npr. Cry1A) ugotovljen kaderin, skupina transmembranskih glikoproteinov (Wang in sod., 2016). Drugi identificirani receptorji so še glikozilfosfatidilinozitol (sidro GPI), alaninska aminopeptidaza ali alkalna fosfataza. Nekatere študije ugotavljajo, da so tudi ABC-prenašalci, aktivne membranske črpalke, lahko receptorji (Koch in sod., 2015). V raziskavi Zhao in sod. (2017) so poročali, da imajo pri vezavi Cry2A proteinov prav tako pomembno vlogo katalaza, aminopeptidaza-N in alkalna fosfataza.

2.2 RAZVOJ ODPORNOSTI CILJNIH ŽUŽELK

Kljub komercialnim uspehom pridelave Bt-transgenih poljščin, ki je do 2016 presegla 185,1 milijonov hektarjev v skupaj 26 državah (Global ..., 2016), se vedno večkrat pojavlja problem odpornosti žuželk zaradi njihove hitre evolucije.

Nenehna izpostavljenost toksičnim snovem lahko pripelje do odpornosti, saj predstavljajo velik selektivni pritisk, ki daje prednosti odpornim organizmom. Ker se lahko škodljive žuželke na velikih predvsem monokulturnih zemljiščih razmnožijo do zelo številčnih

populacij, hkrati pa se pri nekaterih na sezono izmenja več rodov, je večja verjetnost pojava in širjenja odpornih genotipov v krajšem časovnem obdobju. Razvoj odpornosti se zgodi predvsem tam, kjer ukrepi pri pridelavi transgenih rastlin niso optimalni (Castagnola in Jurat-Fuentes, 2012). Glede na obseg in več kot desetletje pridelave, je pojav odpornosti sicer redek, kljub temu pa so ponekod poročali o razvoju odpornosti pri nekaterih populacijah žuželk, npr. pri *Helicoverpa zea* na Cry1Ab-bombaž v ZDA 2003, *Spodoptera frugiperda* na Cry1F-koruzo v Puerto Ricu, 2006, *Busseola fusca* za Cry1Ab-koruzo v Južni Afriki, 2006, bombaževčev molj za Cry1Ac-bombaž v Indiji, 2008, in koruzni hrošč (*Diabrotica virgifera virgifera*, Coleoptera) na Cry3Bb-koruzo v ZDA leta 2009 (Malthankar in Gujar, 2016).

Poglavitni dejavniki, ki vplivajo na hitrost razvijanja odpornosti, so recesivnost ali dominantnost dedovanja alelov za odpornost, pogostost teh alelov in velikost pribežaliških območij, kjer rastejo rastline brez transgenih lastnosti. Pri večini primerov odpornih žuželk, so ugotovili, da so za razvoj odpornosti odgovorne spremembe pri vezavi toksinov na receptorje v črevesju, za katere je največkrat odgovoren recesivno avtosomno dedovan gen (Castagnola in Jurat-Fuentes, 2012). V primerih, kjer je lastnost odpornosti res recesivna, je učinkovita strategija proti razvoju odpornosti uporaba dovolj velikih pribežaliških območij (priporoča se 20% območja, na katerem se sicer goji Bt-poljščine z enim Bt-genom), hkrati pa so Bt-rastline visoko toksične (strategija »high-dose/refuge«). Na ta način lahko na območju Bt-rastlin preživijo le recesivni homozigoti, ki imajo dva alela za odpornost, heterozigoti, ki nosijo neizražen alel pa ne. Tako se zmanjša število alelov za odpornost. Na pribežaliških se medtem ohranjajo neodporne žuželke, s katerimi se preživele odporne žuželke lahko pari, potomci so heterozigoti in tako se število alelov za odpornost še zmanjšuje ter evolucija odpornosti se upočasni. Ta strategija sloni na predpostavkah, da je toksičnost rastlin dovolj visoka, da onemogoči preživetje večine heterozigotov, da je začetna pogostost odpornih alelov zelo nizka in da se bodo preživele žuželke parile z neodpornimi iz pribežališkega območja.

Obstajajo primeri, kjer so odkrili neresesivno dedovanje odpornosti. Vrsta *Busseola fusca* (Lepidoptera), škodljivec koruze, sirka in sladkornega trsa, je v Južni Afriki razvila odpornost na Bt-koruzo izražajočo Cry1Ab toksin, ki se deduje kot dominantna lastnost (Campagne in sod., 2013). Tudi pri populaciji koruznega hrošča v ZDA so v študiji Ingber in Gassmann (2015) ugotovili ne-recesivno dedovanje odpornih genov. Slednje ugotovitve kažejo na večjo problematiko razvoja odpornosti, zaradi katere je potrebno razviti drugačne načine varstva rastlin pred žuželkami ali uporabiti drugačne strategije za zaustavljanje razvoja odpornosti.

Eden od dejavnikov, ki zmanjšuje učinkovitost Bt-poljščin, je tudi navzkrižna odpornost. Izraz označuje pojav, pri katerem organizmi, ki so razvili odpornost na določen toksin, npr. Cry1F, hkrati postanejo odporni še na drug toksin, s katerim niso bile v stiku, npr. Cry1A.105 (Horikoshi in sod., 2016). Do tega pride v primeru, da imata proteina podobno molekulsko zgradbo in se vežeta na enake receptorje v črevesju žuželke.

2.3 BIOTEHNOLOŠKI PRISTOPI ZA TRAJNEJŠO ODPORNOST

Zaradi pojava odpornosti žuželk na trenutno širše uporabljane Bt-toksine, je nujno razvijati nove načine varstva rastlin. Z nadaljnjimi raziskavami insekticidnih lastnosti Bt-serotipov, se stremi predvsem k povečevanju raznolikosti genskega sklada insekticidnih proteinov in kombiniranju oziroma piramidanju večih Bt-genov v eni rastlini.

2.3.1 Piramidanje Bt-genov

V zadnjih letih se tehnologija piramidanja ali kopičenja transgenov postopoma nadgrajuje. Prednost je v sočasnem spreminjanju večih lastnosti poljščine. Te transgene rastline druge generacije, so lahko hkrati odporne na herbicide, škodljivce, bolezni, tolerantne na neugodne razmere itd. V primeru trajnejšega varstva rastlin pred žuželkami je smiselno piramidati gene, ki kodirajo različne Bt-toksine.

Prednosti večih kodiranih Bt-genov je v tem, da je lahko rastlina toksična za več žuželk hkrati. V primeru večih kodiranih toksinov za eno ciljno vrsto, pa je poglavitna prednost, da upočasni evolucijo odpornosti. Žuželke namreč težje razvijejo odpornost na več toksinov naenkrat, saj bi bile za to potrebne mutacije večih alelov hkrati. Da se to zgodi, pa obstaja veliko manjša verjetnost kot za pojav enega odpornega alela v organizmu. Posledično se lahko temu primerno zmanjša obseg območja pribežališča, kar je ugodno za pridelovalce, ki bodo imeli s tem večji izkoristek. Iz priporočenega 20% območja pribežališča, se za poljščino z različnimi Bt-genii pribežališče zmanjša na 5% celotne pridelovalne površine (ISAAA, 2013).

Piramidanje Bt-genov bi vsekakor upočasnilo evolucijo odpornosti in zagotovilo trajnejše varstvo. Vendar kljub temu obstaja možnost, da bodo žuželke sčasoma razvile odpornost. Do tega lahko pride hitreje v primeru uporabe piramidane Bt-poljščine na območjih, kjer obstajajo populacije ciljnih žuželk z že razvito odpornostjo na enega od transgenih toksinov (Fishilevich in sod., 2016). Kjer do tega še ni prišlo, se lahko razvoj odpornosti upočasni s kombiniranjem že razširjenih genov z novimi Bt-genii.

2.3.2 Novi Bt-genii

2.3.2.1 Geni Cry

V različnih serotipih bakterije *Bacillus thuringiensis* so identificirali več kot 700 različnih cry genov, ki se glede na podobnosti v aminokislinskih zaporedjih delijo v 70 skupin (Bravo in sod., 2012). Kot poroča Silva in sod. (2015) večina Bt-cry-genov, ki jih trenutno vsebujejo

komercialno dostopne kmetijske rastline, varuje le proti žuželkam iz reda Lepidoptera. Toksini iz skupine CryII pa imajo nekaj edinstvenih značilnosti, med drugim to, da so toksični tudi za vrste žuželk iz reda Coleoptera (Zhao in sod., 2015). V raziskavi so potrdili, da je lahko CryIIa toksin, ki ga izražajo rastline bombaža, dobra obramba pred bombaževčevim rilčkarjem (*Anthonomus grandis*) in vrsto *Spodoptera frugiperda* hkrati. Za večjo učinkovitost razvijajo še tkivno-specifične promotorje, da bi se toksini v večji meri izražali v delih rastline, s katerimi se žuželke hranijo (npr. v cvetovih) (Silva in sod., 2015).

Zhao in sod. (2015) so identificirali CryIIe2 kot dober gen za piramidanje z CryIAb ali CryIFa v koruzi za varstvo pred ličinkami *Ostrinia* spp. CryIIe2 je visoko toksičen za *Ostrinia* spp. in nima enakega vezavnega mesta v črevesnih membranah kot CryIAb ali CryIFa. S piramidanjem tega gena z CryIAb ali CryIFa bi lahko učinkovito omejili možnosti za razvoj odpornosti koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis*).

Nedavno so iz Bt-izolatov v Indiji odkrili nov Bt-gen, Cry2Af2. Protein, ki ga kodira, je toksičen za vrsto *Helicoverpa armigera* in bo zato, po navedbah avtorjev, uporaben za piramidanje z drugimi Bt-genii v transgenih kmetijskih rastlinah (Katara in sod., 2016).

Ena od rešitev za piramidanje različnih genov, ki ne bodo sprožili navzkrižne odpornosti, so fuzijski proteini, nastali s spojitvijo dveh genov. Cry2aX1 insekticidni fuzijski protein je rezultat združitve sekvenc genov *cry2Aa* in *cry2Ac*. Je bolj toksičen za vrsto *Helicoverpa armigera* kot parentalna gena. V raziskavi Sakthi in sod. (2015) so gen vgradili v genom bombaža, v Chakraborty in sod. (2016) pa so z njim preoblikovali rastline riža, ki so izražale insekticidno aktivnost proti kar trem škodljivcem riža: *Scirpophaga incertulas*, *Cnaphalocrocis medinalis* in *Mythimna separata*.

2.3.2.2 Geni Vip

Vegetativni insekticidni proteini, na kratko Vip, imajo širok spekter delovanja proti žuželkam iz reda metuljev. Predstavljajo alternativo Cry toksinom ali pa so kandidati za piramidanje, saj imajo drugačen način delovanja. Od Cry toksinov se razlikujejo po receptorjih v črevesju žuželk in po tvorjenju ionskih kanalov.

Pradhan in sod. (2016) so razvili linijo riža (*Oryza sativa*), ki vsebuje gen za toksin Syn-vip3BR. Gen je sintetična verzija Vip3BR gena, ki ima izrezane odvečne sekvence, s čimer se poveča insekticidna aktivnost. Optimizirali so tudi zaporedje kodonov, kar pomeni, da so uporabili za rastlino preferenčne kodone. S tem se poveča raven ekspresije gena. Tako spremenjen riž je deloval insekticidno proti vrstam *Scirpophaga incertulas*, *Cnaphalocrocis medinalis* in *Melanitis leda ismene*.

3 RNAi

Eden novejših in trenutno zelo aktualnih pristopov za varstvo rastlin pred škodljivci, je metoda z RNA interferenco (RNAi). Gre za mehanizem za regulacijo genov, ki ga sproži dvoverižna RNA (»double stranded« dsRNA). Uspešna uporaba RNAi pri žuželkah sproži utišanje tarčnega gena in povzroči smrt, abnormalen in upočasnen razvoj ali zmanjša vitalne sposobnosti, poveča občutljivost na insekticide ter prepreči razvoj odpornosti, kar omogoča varstvo pred škodljivcem. (Rodrigues in Figueira, 2016)

Tehnologija RNAi predstavlja alternativno, okolju prijazen in vrstno specifičen pristop za varstvo rastlin. Začetki segajo skoraj 20 let nazaj, ko so RNAi odkrili pri ogorčicah, (*Caenorhabditis elegans*) (Fire in sod., 1998) in od takrat se tehnologija naglo razvija (Yu in sod., 2016). Na področju varstva kmetijskih rastlin je cilj ustvariti genske insekticide ali gensko spremenjene rastline, ki v žuželkah sprožijo okoljsko RNAi, torej RNA interferenco, ki je rezultat vdora tuje dsRNA, največkrat izvirajoče iz drugega taksonomskega kraljestva kot je organizem. Take tehnologije bodo po pričakovanjih na trgu ob koncu tega desetletja.

3.1 NAČIN DELOVANJA

RNAi je evolucijsko ohranjen celični mehanizem evkariontskih celic, ki se je razvil v organizmih kot obramba pred virusni ali pred mobilnimi genetskimi elementi in za regulacijo izražanja genov pri praktično vseh evkariontskih organizmih (Khajuria in sod., 2015).

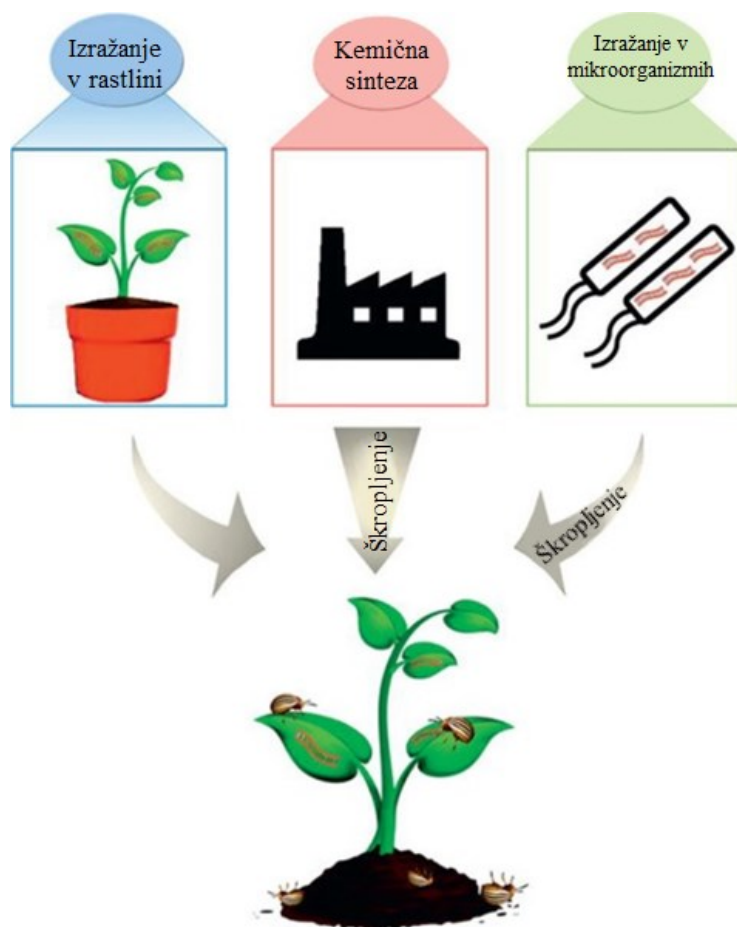
Kot obramba pred virusi deluje tako, da imunski sistem prepozna dvoverižno RNA, ki jo imajo nekateri virusi. Organizem jo prepozna in uniči. Enako se zgodi z vsemi RNA zaporedji, ki so identična virusnemu. Tak mehanizem prepreči podvojitev virusa znotraj celice, lahko pa se ga uporabi tudi za preučevanje funkcije posameznih genov ali varstvo rastlin pred žuželkami.

Večinoma RNAi sprožijo dolge dsRNA verige, ki jih specifične ribonukleaze (Dicer) razrežejo v male interferenčne molekule (siRNA). Te se naložijo na RNA komplekse (RISC – ena od glavnih beljakovinskih komponent je argonavt 2 (AGO2)), ki nato prepoznajo komplementarne mRNA verige, jih razcepijo ali blokirajo njihovo prevajanje (posttranskripcijsko utišanje genov) v citoplazmi, ali pa povzročijo spremembe v histonu pri transkripcijskem utišanju (Abdellatef in sod., 2015; Rodrigues in Figueira, 2016). Rezultat je blokirano proizvodnje tarčnega proteina.

Princip RNA interference deluje zelo specifično, kar je posledica tega, da ima dsRNA specifično zaporedje, ki se ujema le z zaporedjem tarčnega gena. Za namene biotehnoloških raziskav in aplikacij se za tarčni gen izbere takega, ki nima prevelike podobnosti z geni ne-ciljnih vrst.

3.1.1 Aplikacija dsRNA

Za uspešno delovanje RNAi je potrebno določiti način, na katerega žuželke pridejo v stik z dsRNA. V večini dosedanjih študij so RNAi v žužkah vzpodbudili z vbrizgavanjem dolge dsRNA direktno v telesne votline. Medtem, ko je za namene raziskovanja pri funkcijski genomiki to zelo uporabna metoda, je za uporabo pri varstvu rastlin pred škodljivci, nepraktična. Bolj izvedljiva načina sta nanos s škropljenjem dsRNA raztopine ali zaužitje s hrano. Pri tem pa je potrebno vedeti, kakšna je sposobnost ciljnih organizmov za absorpcijo okoljske dsRNA skozi zunanje plasti telesa ali iz črevesja ter sposobnost sistemskega razširjenja in učinkovitega delovanja (Khajuria in sod, 2015). V raziskavi Al-Ayedh in sod. (2016) so pri palmovem rilčkarju (*Rhynchophorus ferrugineus*) ugotovili, da je najbolj učinkovito utišanje gena za katalazo sprožilo injektiranje dsRNA, nanos s škropljenjem pa praktično nič. Vendar je za uporabo na prostem injektiranje najmanj uporabna metoda. Vnos dsRNA z zaužitjem je učinkovit in izvedljiv, vendar pa je pri tem načinu potrebna veliko večja količina dsRNA tarčnega gena. Za nanos s škropljenjem so v nedavnih študijah ugotovili, da je morda le potencialno učinkovita metoda aplikacije dsRNA, problem pa je lahko manjša zmožnost dsRNA, da prodre skozi plasti telesa žuželke.



Slika 1: Uporaba RNAi kot insekticida (Mamta in Rajam, 2017)

Za metodo nanosa s škropljenjem je dsRNA ali siRNA sintetizirana *in vitro* in poškropljena na rastline. V nedavni študiji koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata*), kjer so z dsRNA poškropili liste rastlin, je dsRNA učinkovala proti hroščem še 28 dni (v rastlinjaku). Obetavne rezultate sta pokazali tudi podobni študiji proti glivam in virusnim patogenom. Škropljenje zahteva velike količine dsRNA ali siRNA za učinkovito delovanje, zaradi česar so stroški s takšnim načinom uporabe lahko zelo visoki (Mamta in Rajam, 2017).

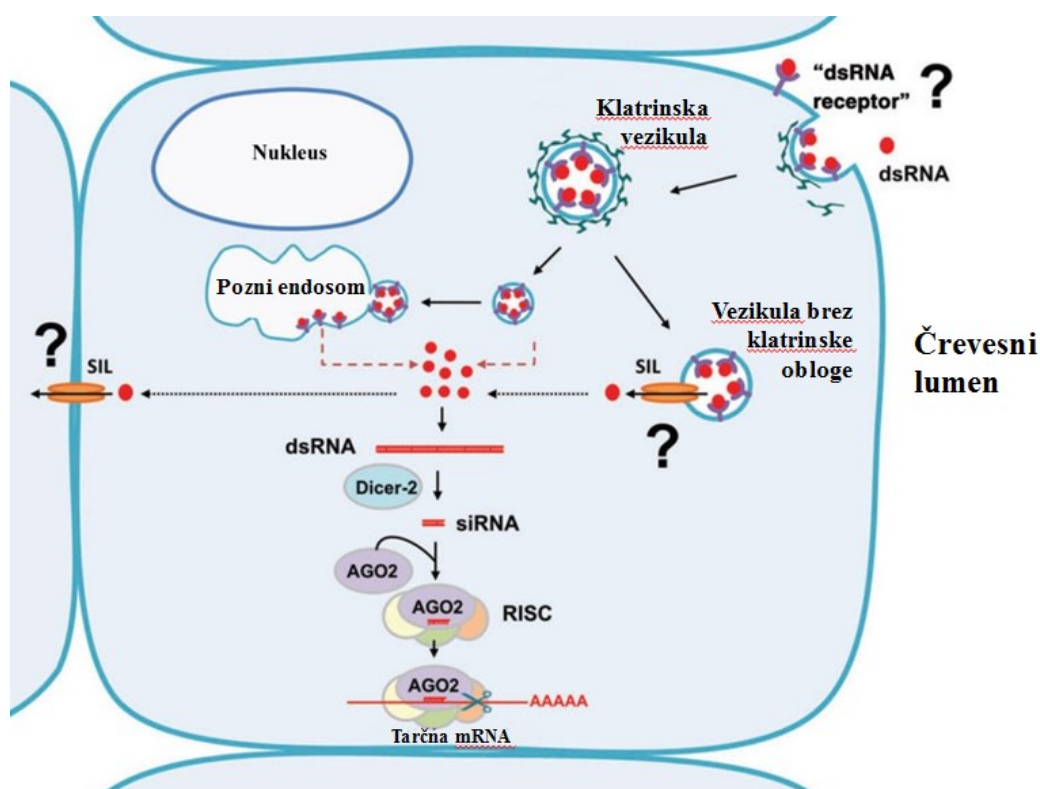
Da žuželke dsRNA zaužijejo s hrano, je najbolj praktičen način za varstvo rastlin z RNAi v primerjavi z ostalimi načini aplikacije. Hrana lahko predstavlja dsRNA, ki jo izražajo bakterije, ali umetna hrana, ki vsebuje dsRNA, za kmetijske namene pa so najobetavnejše gensko spremenjene rastline. Za varstvo poljščin pred rastlinojedimi žuželkami je potrebno preoblikovati rastlinski genom tako, da izraža tarčno dsRNA. Mamta in Rajam (2017) poročata, da se transformacijo navadno izvede z RNAi vektorjem, ki vsebuje zapisan tarčni gen in komplementarno zaporedje. Ta metoda je lahko izvedljiva in ekonomična, težava je le v določevanju količine, ki je potrebna za učinkovitost, saj je težko natančno izmeriti koliko dsRNA je zaužite z rastlinskimi deli.

3.1.2 Absorpcija dvoverižne RNA in sistemsko širjenje RNAi signala

S hranjenjem na rastlinah, ki izražajo dsRNA, žuželke zaužijejo procesirane in neprocesirane dolge interferenčne RNA molekule. Pri uspešnem RNAi signalu jih absorbirajo in razširijo po telesu. Natančni mehanizmi absorpcije dsRNA pri žuželkah še niso popolnoma znani in se razlikujejo med vrstami. Eden od bolj raziskanih mehanizmov je absorpcija z endocitozo, pri drugem pa ima verjetno pomembno vlogo protein podoben SID-1 proteinu ogorčice, *C. elegans* (Mamta in Rajam, 2017).

Oviro pri učinkoviti absorpciji dsRNA iz črevesja predstavljajo nukleaze v prebavnem traktu nekaterih žuželk, ki molekule razgradijo. Zato bi bilo za nadaljnji razvoj smiselno raziskati načine, ki bi minimizirali vpliv nukleaz, za povečanje učinka RNAi (Spit in sod., 2017).

Pomembna je tudi dolžina dvoverižne interferenčne RNA verige. Minimalna potrebna dolžina je odvisna od vrste žuželke. V študiji koruznega hrošča, Fishilevich in sod. (2016) poročajo o minimalni dolžini dsRNA, ki je sprožila RNAi, 60 bp. siRNA, dolga 21nt, pa ni bila učinkovita, verjetneje, ker RISC ali Dicer ne moreta delovati na tako majhnih molekulah. V večini drugih študij žuželk so za učinkovitejšo RNAi uporabljali zaporedja dolga od 50 do 500 bp. Nekatere študije ugotavljajo, da so daljše neprocesirane verige RNA, bolj uspešne pri utišanju genov, vendar pri nekaterih vrstah (*H. armigera*) to ne drži vedno.



Slika 2: Absorpcija in procesiranje dsRNA v celici koruznega hrošča. Natančna vloga SIL proteinov pri žuželkah ni znana (Fishilevich in sod., 2016).

3.2 OBRAMBNI MEHANIZMI, ZAVIRANJE RASTI, PREPREČEVANJE ODPORNOSTI, LETALNA RNAi

Pojav odpornosti žuželk na toksine je povezan z učinkovitostjo njihovega obrambnega sistema v telesu.

Eden od glavnih delov obrambnega sistema je antioksidantni obrambni mehanizem. Antioksidantni encimi imajo pomembno vlogo pri omejevanju posledic oksidativnega stresa. Če ta obrambni sistem ne deluje ustrezno, reaktivne kisikove vrste/radikali povzročijo negativne strukturne in funkcionalne spremembe v celicah in telesu. Pri žuželkah antioksidantni obrambni mehanizem sestavljajo encimi, kot so superoksid dismutaza, katalaza (KAT), in glutation peroksidaza. V študiji Al-Ayedh in sod. (2016), so se osredotočili na utišanje gena za katalazo, da bi ugotovili, ali je to smiseln pristop za varstvo rastlin pred palmovim rilčkarjem, načine aplikacije dsRNA in insekticidni potencial. Palmov rilčkar je eden najpomembnejših škodljivcev palm (Arecaceae) po svetu in njegova odpornost na sintetične insekticide še pripomore k problemu. V raziskavi so ugotovili, da je delovanje dsRNA za gen katalaze, uporabljene v zgodnejši fazi razvoja, uspešnejše. RNAi za katalazo je povzročila zaviranje rasti in smrt ličink, kar kaže, da je utišanje gena za katalazo smiselno za varstvo pred palmovim rilčkarjem.

Chikate in sod. (2016), so raziskovali, kateri geni za encime, povzročijo največje spremembe oziroma najboljše varstvo pred južno plodovrtno (*Helicoverpa armigera*), če so utišani: proteaze kot npr. tripsini in kimotripsini, cisteinske proteaze, kot so katepsin, glutation S-transferaze, esteraze, katalaze, superoksid dismutaze, vezavni protein maščobnih kislin in hitin deacetilaza. Največjo smrtnost je povzročila dsRNA esteraze (HaAce4). Študija je ugotovila nekaj potencialnih genov za utišanje z RNAi, ki v ličinkah žuželk sproži abnormalno, zaostalo rast ali povzroča smrtnost.

Koruzni hrošč je najpomembnejši škodljivec koruze v ameriškem Koruznem pasu, ki vsako leto povzroči za več kot 1 milijardo ameriških dolarjev škode. Študija Fishilevich in sod. (2016) je zbrala najnovejše izsledke raziskav o varstvu koruze pred koruznim hroščem z RNAi. Enega najuspešnejših rezultatov je dalo utišanje gena za *V-ATPaza-A* (vakuolarna ATPaza je encim, ki deluje kot protonska črpalka). Zaužitje koruze z dsRNA *V-ATPaze* je pri ličinkah hitro zaustavilo rast in povzročilo smrt. Druga uspešna dsRNA je bila za gen *Snf7*, vakuolarni encim za razvrščanje beljakovin (Fishilevich in sod., 2016). Koruza, ki izraža dsRNA *Snf7* koruznega hrošča (*DvSnf7*), je že v postopku pridobivanja dovoljenj za komercialno uporabo. Junija 2017 je tudi Ameriška Agencija za varovanje okolja (EPA) izdala odobritev za gojenje koruze SmartStax Pro, kar pomeni, da bo najverjetneje do konca desetletja že na trgu (Zhang, 2017).

3.3 PARENTALNA RNAi

Pristop s parentalno RNAi (pRNAi) je transgeneracijski, kar pomeni, da se dsRNA vključi v genom odraslega organizma, spremembe pa so vidne pri naslednjem rodu.

Prve študije s parentalno RNAi so bile namenjene raziskovanju razvoja žuželk, sedaj pa se ugotavlja, kako je mogoče pRNAi uporabiti tudi kot praktično metodo pri varstvu rastlin, še posebej kot dodatno lastnost za varstvene načine, na katere so žuželke začele razvijati odpornost, kot so kemični insekticidi in insekticidni proteini Bt.

V študiji Khajuria in sod. (2015) pri koruznem hrošču kjer je bilo jasno sistemsko delovanje RNAi, so prvič zabeležili učinkovito delovanje zaužite dsRNA v primeru pRNAi (predhodne študije pRNAi so temeljile na vbizgavanju dsRNA v telesno votlino). Tarčna gena sta bila *brahma* in *hunchback*, ki sta pomembna za embriogenalni razvoj. Način širjenja dsRNA oz. siRNA ni bil jasno identificiran. Samice, hranjene z dsRNA za *brahma* gen, so izlegle jajčeca, iz katerih se niso izlegle ličinke, z dsRNA za *hunchback* gen pa se jih je izleglo 2,4%. Poleg tega so se pri embrijih pojavljale razvojne napake oz. so bili zaostali v razvoju. Študija je torej pokazala visoko stopnjo utišanja obeh tarčnih genov v samicah in v embrijih.

Širjenje poljščin z Bt-geni, ki so odporne na poglavitne škodljivce, kot so žuželke iz redov Lepidoptera in Coleoptera, lahko sproži porast populacij sekundarnih škodljivcev, ki se prehranjujejo s sokom rastlin, na primer iz reda Hemiptera (Alkalaj in Bohanec, 2015). Na primer, nekatere vrste pravih listnih uši (Aphididae) povzročajo veliko škodo na gostiteljskih rastlinah, saj neposredno škodijo rastlinam z izsesavanjem sokov iz floema ali posredno s prenašanjem virusov. Ko se hranijo, izločijo gelasto snov, ki tvori varovalni ovoj okrog sesala, s katerim prodrejo v apoplast. Večina rastlinojedih polkrilcev (Hemiptera) izloča podoben ovoj med hranjenjem. V študiji Abdellatef in sod. (2015) so z RNAi utišali gen za strukturni ovojni protein *shp*, ki tvori ta ovoj pri veliki žitni ali ovsovi uši (*Sitobion avenae*). Izražanje *shp* gena je bilo občutno manjše pri ušeh, ki so jih hranili z transgenim ječmenom, ki je izražal *shp* dsRNA, kar je pomenilo učinkovit prenos RNA za utišanje *shp* gena. Izražanje *shp* se ni povečalo tudi, ko so jih začeli hraniti z divjim tipom rastlin, in kar je še pomembnejše, učinki utišanja *shp*, so se prenašali v naslednjih sedmih rodovih, ki so jih sicer hranili z divjim tipom ječmena. To pomeni, da ima lahko pRNAi dolgotrajen učinek.

3.4 TRANSPLASTOMSKA RNAi

Večina okoljske RNAi v rastlinskih škodljivcih deluje tako, da dolga lasnična hpRNA (»hairpin« RNA) veriga nastane v jedru rastlinskih celic, se transportira v citoplazmo, kjer jo endogeni RNAi mehanizmi razgradijo v malo interferenčno RNA (siRNA) dolgo ~21nt, še preden jo ciljni organizem zaužije. Čeprav obstaja povezava med višjo koncentracijo siRNA, ki jih rastlina proizvede, in učinkovitejšo RNA interferenco, ugotavljajo, da je dejanski pogoj za učinkovito RNAi nepredelana dolga dsRNA.

V genomu kloroplasta ni kodiran oz. ni v kloroplast prenesen noben do sedaj znan mehanizem RNAi, ki bi dsRNA predelal v krajše interferenčne RNA verige. Posledično bi se lahko nepredelane dolge dsRNA v kloroplastih akumulirale do visokih koncentracij. Poleg tega je kloroplast idealen organel za izražanje transgenov (Bally in sod., 2016).

Bally in sod. (2016) so rastlino *Nicotiana benthamiana* preoblikovali, da se je hpRNA za tarčni gen izražal v genomu jedra ali v kloroplasta. Rezultati so potrdili zgoraj navedene trditve: v rastlinah s preoblikovanim jedrnim genomom so bile prisotne siRNA, v transplastomskih rastlinah pa je bila večja količina nepredelanih RNA transcriptov, siRNA niso zasledili. hpRNA konstrukti so bili v kloroplastih stabilni še vsaj 3 generacije rastlin.

Ciljni organizem v študiji je bila južna plodovrtna in z RNAi so ciljali na gen za acetilholin-esterazo (ACE). Pri žuželah, ki so jih hranili s transplastomskimi rastlinami so bile spremembe v fenotipu najbolj očitne. Ličinke so bile manjše in vidna je bila manjša škoda na listih rastlin. Študija je pokazala, da je hpRNA ali dsRNA izražena v kloroplastih bolj učinkovita pri utišanju genov rastlinam škodljivih organizmov, v primerjavi z jedrno dvoverižno RNA.

4 Bt TOKSINI V KOMBINACIJI Z RNAi

Za preprečevanje razvoja odpornosti žuželk na različne metode varstva rastlin in s tem zagotovitev trajnejše učinkovitosti, je potrebno čim bolj zmanjšati možnosti za pojav alelov za odpornost. S kombiniranjem večih metod, kot sta RNAi in Bt toksini, je smrtnost večja in verjetnost za hkraten pojav alelov za odpornosti na vsako od metod je tako veliko manjša.

V Guan in sod., 2016, študiji so kombinirali tehnologiji RNAi in Bt insekticidni protein v transgeni koruzi, da bi povečali Bt toksičnost in zmanjšali odpornost vrste *Ostrinia furnacalis*. Z RNAi so bili utišani geni za kimotripsine, glavno skupino proteoliznih encimov pri metuljih. Ti so pomembni pri inaktivaciji zaužitih toksičnih proteinov, med drugim lahko tudi Bt-toksinov pri nekaterih vrstah žuželk, kar vodi do njihove manjše toksičnosti in razvoja odpornosti. V študiji je bilo iz genoma žuželk vrste *Ostrinia furnacalis* izoliraliranih sedem različnih genov kimotripsinskih proteaz in nato sintetiziranih sedem ujemajočih se dsRNA. Z umetno prehrano, ki je vsebovala določeno dsRNA so hranili ličinke vrste *Ostrinia furnacalis*. Rezultati so potrdili, da je utišanje kimotripsinskih genov močno povečalo smrtnost ličink zaradi Bt proteina, Cry1Ab. Pokazali so, da je smiselno z RNAi ciljati na gene peptidaz in to strategijo kombinirati z Bt-toksini.

V drugi študiji, ki se koncentrira na kombinacijo RNAi in Bt toksinov pri varstvu rastlin pred žuželkami, Ni in sod. (2017), je bila ciljna žuželka južna plodovrtna, preizkušali pa so kombiniranje utišanja dveh genov za juvenilna hormona (JH) in Bt-toksinov (Cry1Ac/Cry1Ab fuzijski protein) v bombažu. Uporabljena sta bila dva kontrolna tipa bombaža, eden z Bt-genom, dva RNAi tipa (eden z utišanim genom juvenilne hormonsko kislinke metiltransferaze (JHAMT), ki je ključna za sintezo mladostnih hormonov in drugi z genom za JH-vezavni protein (JHBP), ki JH transportira v organe) ter dva tipa s piramidanjem Bt-gena in z vsako od interferenčne RNA. Ugotovljeno je bilo, da oba RNAi modificirana tipa bombaža povzročata smrtnost pri južni plodovrtni, tudi pri biotipu odpornem na Cry1Ab toksin. Prav tako povzročata smrtnost oba kombinirana tipa. Naredili so še računalniško simulacijo evolucije odpornosti glede na tip bombaža in velikost pribežališča, ki je pokazala, da je kombiniranje Bt in RNAi veliko trajnejše kot samo Bt geni, tudi v primeru, da se pristop z RNAi doda šele po razvoju odpornosti na Bt-protein. V vseh primerih pa je večji procent območja pribežališča upočasnil razvoj odpornosti. Kombiniranje RNAi z Bt-proteini v kmetijskih rastlinah ima vsekakor potencial za trajnejše varstvo pred škodljivci, tudi ob manjših pribežališčih.

Od leta 2014 je v nekaj državah po svetu delno odobrena koruza MON87411, ki izraža Bt protein cry3Bb1 in dsRNA transcript *Snf7* gena koruznega hrošča (ISAAA, 2017). *Snf7* je gen za sortiranje vakuolarnih beljakovin. V študiji Levine in sod. (2015), ki je ugotavljala potencialno interakcijo med Cry3Bb1 in *Snf7*-dsRNA, so prišli do zaključka, da med tema

dvema lastnostima ni sinergičnega delovanja oz. delujeta samostojno in nudita dvojno obrambo rastlin pred koruznim hroščem.

Prej omenjena SmarStax Pro koruza, ki je dobila zeleno luč za komercialno uporabo v ZDA, poleg dsRNA *DvSnf7* gena vsebuje tudi Bt-gene: Cry3Bb1, Cry34Ab1/Cry35Ab1. Glede na rezultate študije Head in sod., 2017, dsRNA *DvSnf7* gen v SmartStax Pro omejuje škodo v koreninah, ki jo povzročajo ličinke koruznega hrošča, in podaljša učinkovitost insekticidnega delovanja Bt-proteinov, skratka deluje boljše kot SmartStax koruza, ki ne vsebuje dsRNA. Kako se bo tehnologija kombiniranja RNAi z Bt-toksini obnesla v praksi pa bomo verjetno lahko videli že v nekaj letih.

5 ZAKLJUČEK

Prva generacija transgenih rastlin je v kmetijstvu prinesla velik napredek in mnoge prednosti. V boju proti žuželkam, ki se hranijo s poljščinami, namenjenim za prehrano ljudi, ponekod Bt-rastline prve generacije ne nudijo več zadostne obrambe. Razvoj transgenih rastlin z insekticidnim potencialom je zato nujen, če nočemo uporabljati še več kemičnih insekticidov.

Ena od poti razvoja gre v smeri odkrivanja novih genov, ki jih izražajo različni serotipi bakterije *Bacillus thuringiensis*. Raziskuje se insekticidni potencial Vip proteinov, ki še niso v pogosti uporabi, sintetični geni, ki so predelani tako, da zagotavljajo optimalno izražanje toksinov ali pa izražajo fuzijski protein – kombinacijo dveh insekticidnih proteinov. Za upočasnjevanje razvoja odpornosti pri žuželkah, je dober pristop piramidanja večih Bt-genov z insekticidnim potencialom.

Na drugi strani je novejši biotehnološki pristop RNA interferenca. RNAi deluje na podlagi utišanja genov. Glede na gen, ki ga utišamo pri ciljnih žuželkah, je lahko posledica za žuželko, ki pride v stik z dsRNA molekulami, smrt, abnormalna ter upočasnjena rast in razvoj, lahko pa so posledice vidne še v naslednjih generacijah. Z RNAi lahko onemogočimo žuželkine gene, ki povzročajo odpornost na toksine, kot so Bt-toksini. Kombiniranje RNAi z Bt-proteini, bi lahko zelo upočasnila razvoj odpornosti žuželk.

Poleg samega kombiniranja biotehnoloških metod je za trajnejše varstvo rastlin pred žuželkami, zelo priporočljivo upoštevanje strategij kot so pribežališčna območja ter ohranjanje tradicionalnih kmetijskih praks kot je kolobarjenje. Z vrstjenjem pridelkov se onemogoči nastanek zelo velikih populacij določenih škodljivcev, kar se sicer zgodi ob gojenju vedno iste vrste kmetijske rastline več let zaporedoma.

6 VIRI

- Abdellatef E., Will T., Koch A., Imani J., Vilcinskis A., Koge K. H. 2015. Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid *Sitobion avenae*. *Plant Biotechnology Journal*, 13, 6: 849-857
- AgBioWorld. 2001. SAFETY OF *Bacillus thuringiensis* Proteins Used to Control Insect Pests in Agricultural Crops: 21 str.
http://www.agbioworld.org/pdf/bt-short_safet.pdf (19. avg. 2017)
- Al-Ayedh H., Rizwan-ul-Haq M., Hussain A., Aljabr A. M. 2016. Insecticidal potency of RNAi-based catalase knockdown in *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliver) (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science*, 72, 11: 2118-2127
- Alkalaj M., Bohanec B. 2015. Kaj je res o GSO. 1. Izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnenje rastlin: 88 str.
- Bally J., McIntyre G. J., Doran R. L., Lee K., Perez A., Jung H., Naim F., Larrinua I. M., Narva K. E., Waterhouse P. M. 2016. In-Plant Protection against *Helicoverpa armigera* by Production of Long hpRNA in Chloroplasts. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1453, doi: 10.3389/fpls.2016.01453: 9 str.
- Bravo A., Gill S. S., Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 4: 423-435
- Bravo A., Gómez I., Porta H., García-Gómez B. I., Rodríguez-Almazan C., Pardo L., Soberón M. 2012. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, 6, 1: 17-26
- Campagne P., Kruger M., Pasquet R., Le Ru B., Van den Berg J. 2013. Dominant Inheritance of Field-Evolved Resistance to *Bt* Corn in *Busseola fusca*. *PLoS ONE*, 8, 7: e69675, doi: 10.1371/journal.pone.0069675: 7 str.
- Castagnola A. S., Jurat-Fuentes J. L. 2012. Bt crops: past and future. V: *Bacillus thuringiensis* biotechnology. Sansinenea E. (ur.). Dordrecht, Springer: 283-304
- Chakraborty M., Reddy P. S., Mustafa G., Rajesh G., Narasu V. M. L., Udayasuriyan V., Rana D. 2016. Transgenic rice expressing the cry2AX1 gene confers resistance to multiple lepidopteran pests. *Transgenic Research*, 25, 5: 665-678
- Chikate Y. R., Dawkar V. V., Barbole R. S., Tilak P. V., Gupta V. S., Giri A. P. 2016. RNAi of selected candidate genes interrupts growth and development of *Helicoverpa armigera*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133: 44-51

- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811
- Fishilevich E., Vélez A. M., Storer N. P.; Li H., Bowling A. J., Rangasamy M., Worden S. E., Narva K. E., Siegfried B. D. 2016. RNAi as a management tool for the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Pest Management Science*, 72: 1652-1663
- Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. 2016. ISAAA Brief No. 52. Ithaca, NY, ZDA, ISAAA: 135 str.
<https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016.pdf> (4. sep. 2017)
- Guan R., Li H., Miao X. 2016. RNAi pest control and enhanced BT insecticidal efficiency achieved by dsRNA of chymotrypsin-like genes in *Ostrinia furnacalis*. *Journal of Pest Science*, 90, 2: 745-757
- Horikoshi R. J., Bernardi D., Bernardi O., Malaquias J. B., Okuma D. M., Miraldo L. L., de A. e Amaral F. S., Omoto C. 2016. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. *Scientific Report*, 6: 34864, doi: 10.1038/srep34864: 8 str.
- Ingber D. A., Gassmann A. J. 2015. Inheritance and Fitness Costs of Resistance to Cry3Bb1 Corn by Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, 108, 5: 2421-2432
- ISAAA. 2013. Pocket K No. 42: Stacked Traits in Biotech Crops. Philippines, ISAAA: 6 str.
<http://isaaa.org/resources/publications/pocketk/document/Doc-Pocket%20K42.pdf> (5. sep. 2017)
- ISAAA. 2017. MON87411, ISAAA's GM Approval Database. ISAAA.
<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/event/default.asp?EventID=367> (30. avg. 2017)
- Katara J. L., Kaur S., Kumari G. K., Singh N. K. 2016. Prevalence of *cry2*-type genes in *Bacillus thuringiensis* isolates recovered from diverse habitats in India and isolation of a novel *cry2Af2* gene toxic to *Helicoverpa armigera* (cotton boll worm). *Canadian Journal of Microbiology*, 62, 12: 1003-1012
- Khajuria C., Vélez A. M., Rangasamy M., Wang H., Fishilevich E., Frey M. L. F., Carneiro N. P., Gandra P., Narva K. E., Siegfried B. D. 2015. Parental RNA interference of genes involved in embryonic development of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 63: 54-62
- Koch M. S., Ward J. M., Levine S. L., Baum J. A., Vicini J. L., Hammond B. G. 2015. The food and environmental safety of *Bt* crops. *Frontiers in Plant Science*, 6: 283, doi: 10.3389/fpls.2015.00283: 22 str.

- Levine S. L., Tan J., Mueller G. M., Bachman P. M., Jensen P. D., Uffman J. P. 2015. Independent Action between DvSnf7 RNA and Cry3Bb1 Protein in Southern Corn Rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* and Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. PLoS ONE, 10, 3: e0118622, doi:10.1371/journal.pone.0118622: 15 str.
- Malthankar P. A., Gujar G. T. 2016. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab and the inheritance of Cry2Ab resistance in the Pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders). Indian Journal of Experimental Biology, 54: 586-596
- Mamta B., Rajam M. V. 2017. RNAi technology: a new platform for crop pest control. Physiology and Molecular Biology of Plants, 23, 3: 487-501
- Ni M., Ma W., Wang Xiof., Gao M., Dai Y., Wei X., Zhang L., Peng Y., Chen S., Ding L., Tian Y., Li J., Wang H., Wang Xiaol., Xu G., Guo W., Yang Y., Wu Y., Heuberger S., Tabashnik B. E., Zhang T., Zhu Z. 2017. Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insect resistance. Plant Biotechnology Journal, 15: 1204-1213
- Panevska A. 2016. Interakcije rekombinantnega proteina cry34Ab1 z umetnimi in biološkimi membranami. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske in funkcionalne biologije: 79 str.
- Pradhan S., Chakraborty A., Sikdar N., Chakraborty S., Bhattacharyya J., Mitra J., Manna A., Gupta S. D., Sen S. K. 2016. Marker-free transgenic rice expressing the vegetative insecticidal protein (Vip) of *Bacillus thuringiensis* shows broad insecticidal properties. Planta, 244, 4: 789-804
- Rodrigues T. B., Figueira A. 2016. Management of insect pest by RNAi - A new tool for crop protection. V: RNA Interference. Abdurakhmonov I. Y. (ur.). Rijeka, InTech: 371-390
- Sakthi A. R., Naveenkumar A., Deepikha P. S., Balakrishnan N., Kumar K. K., Kokila Devi E., Balasubramani V., Arul L., Singh P. K., Sudhakar D., Udayasuriyan V., Balasubramanian P. 2015. Expression and inheritance of chimeric *cry2AX1* gene in transgenic cotton plants generated through somatic embryogenesis. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 51, 4: 379-389
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R., Dean D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 3: 775-806
- Silva C. R. C., Monnerat R., Lima L. M., Martins É. S., Filho P. A. M., Pinheiroa M. P. N., Santos R. C. 2015. Stable integration and expression of a *cryIIa* gene conferring resistance to fall armyworm and boll weevil in cotton plants. Pest Management Science, 72, 8: 1549-1557
- Spit J., Philips A., Wynant N., Santos D., Plaetinck G., Broeck J. V. 2017. Knockdown of nuclease activity in the gut enhances RNAi efficiency in the Colorado potato beetle,

Leptinotarsa decemlineata, but not in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 81: 103-116

Wang J., Zhang H., Wang H., Zhao S., Zuo Y., Yang Y., Wu Y. 2016. Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 76: 11-17

Yu X., Jones H. D., Sun Y., Wang G., Xia L. 2016. Cross-species silencing: Plant-mediated RNAi for insect control. V: Biotechnology of major cereals. Jones H. D. (ur.). Wallingford, CABI: 151-164

Zhang S. 2017. The EPA Quietly Approved Monsanto's New Genetic-Engineering Technology. The Atlantic.
https://www.theatlantic.com/science/archive/2017/06/monsanto-rna-interference/531288/?utm_source=twb (5. sep. 2017)

Zhao C., Jurat-Fuentes J. L., Abdelgaffar H. M., Pan H., Song F., Zhang J. 2015. Identification of a New *cryII*-Type Gene as a Candidate for Gene Pyramiding in Corn To Control *Ostrinia* Species Larvae. Applied and Environmental Microbiology, 81, 11: 3699-3705

Zhao M., Yuan X., Wei J., Zhang W., Wang B., Khaing M. M., Liang G. 2017. Functional roles of cadherin, aminopeptidase-N and alkaline phosphatase from *Helicoverpa armigera* (Hübner) in the action mechanism of *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa. Science Reports, 7: 46555, doi: 10.1038/srep46555: 9 str.