

ZBK458 Bitki Korumada Moleküler Yaklaşımlar



Hafta 7. Insektisit direnci ve moleküler analizi

Umut Toprak, Ph.D

İnsektisit Direnci?

Direnç, bir zararlıya karşı belirli bir pestisit uzun süre kullanılması sonucunda bu zararlı popülasyonunda pestiside karşı hassasiyet kaybının oluşması durumudur.

- 1914- San Jose Kabuklu bitinin kükürte direnç kazanması
- 1946-Sentetik bileşiklere karşı ilk direnç (DDT x Karasinek)

İNSEKTİSİT DİRENCİ NEDİR?

Direnç; Direnç; "Bir türün normal bir popülasyonundaki bireylerin çoğunu öldürdüğü ispatlanan bir insektisit dozunu, aynı böceğin diğer bir ırkının tolere etme yeteneğinin gelişmesi" olarak tanımlanmaktadır WHO (Dünya Sağlık Örgütü 1957).

Savaşımın ciddi şekilde başarısızlığa uğradığı direnç durumu görülmeden önce, popülasyondaki dayanıklılık genlerine sahip bireylerin öne çıktığı ve çoğaldığı bir hazırlık dönemi bulunmaktadır.

İNSEKTİSİT DİRENCİ

- ① İlk insektisit direnci: 1908
Kireç kükürte karşı San Jose Kabuklu Biti
Quadraspidiotus perniciosus Comstock
- ② 1914-1946 yılları arasında toplam 11 arthropod türünde
- ③ DDT:
 - 1939 yılında keşfedilmiştir.
 - 1946 yılında kara sineklerde direnç
 - 1984 yılında 119 böcek türünde DDT'ye direnç
- ④ 1990'larda 500'ün üzerinde böcek türü insektisitlere dirençli
- ⑤ Günümüzde 540 türün bir ya da daha fazla pestisite karşı dirençli olduğu belirtilmektedir (Anonymous 2002).

Direncin Hızla Gelişmesinde Etkili Olan Faktörler

Populasyonda direnç geninin bulunması ve bu geni taşıyan bireylerin sayısı

Pestisitlerin yoğun bir şekilde kullanılması

Böceklerin hızla üremesi

Göç

Tarımda zararlı böceklere karşı kullanılan kimyasalların dayanıklılığı ve spesifikliğı

Kimyasalların uygulama sayısı, sıklığı ve zamanı

Kullanılacak ilacın etiket tavsiyelerine uyulmaması

İlacın yanlış depolanması

Belli bir kültür bitkisindeki zararlılar için ruhsat almış bir ilacın diğer zararlılara karşı kullanılması

Uygun olmayan iklim koşulları ve çevresel faktörler

Direnç Tipleri

- Morfolojik
- Davranışsal
- Çapraz
- Çok yönlü
- **Fizyolojik (Metabolik)**

Direnç Tipleri

- **Morfolojik:** Böceğin morfolojik özelliklerinden kaynaklanan bir dirençtir. Kütikula kalınlığı ve tüylülük gibi.
- **Davranışsal:** Davranışlardaki farklılıklar sebebi ile böceklerin insektisitlerden etkilenmemesidir.
- **Çapraz:** Bir böceğin bir ilaca direnç kazandıktan sonra etki mekanizması birbirine yakın olan ilaçlara karşı da direnç göstermesi durumudur.
- **Çok yönlü:** Bir ilaca direnç kazanan zararlının bazen birden fazla değişik etkiye sahip ilaca da direnç kazanması durumudur.
- **Fizyolojik (Metabolik):** Toksikantın etkisinin böcekteki bazı fizyolojik özellikler sebebi ile engellenmesidir. Fizyolojik direnç bugün üzerinde en fazla çalışılan direnç tipidir. Bu direnç tipinde biyokimyasal yollarla insektisit zehirli olmayan maddelere dönüştürülür.

Organik klorlu

Organik fosforlu

Karbamatlı

Sentetik piretroidli

Neonikotinoidli insektisitlere karşı
oluşturulan fizyolojik dirençte en çok
öne çıkan 3 enzim:

1. Sitokrom P₄₅₀ Mono-oksijenazlar

2. Glutasyon S-Transferaz

**3. Esteraz (Asetilkolinesteraz,
Karboksilesterazlar)**

Detoksifikasyon
enzimleri

Sitokrom P450 Mono-oksijenazlar

Microzomal sitokrom P450 mono-oksijenaz enzimleri tüm organizmalarda bulunan önemli metabolik sistemlerden biridir. (Kasai *et.al.* 2000).

Böceklerde bitki toksinlerinin ve pestisitlerin detoksifikasyonu, feromonlar ve hormonların sentezinde bu enzimler kullanılmaktadır. Bir insektisit uygulaması yapıldığında bu enzimler insektisitleri ve diğer yabancı bileşikleri çözünebilir şekillerine dönüştürerek kolaylıkla vücuttan atılabilir hale getirip detoksifiye edilmelerinde görev alırlar.

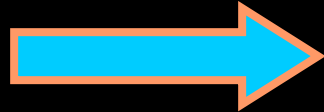
Bu mekanizma ile böceklerde ilaçlara karşı direnci oluşumu böcek vücudunda mono-oksijenaz aktivitesinin artması ile oluşmaktadır.

Sitokrom P₄₅₀ Mono-oksijenazlar

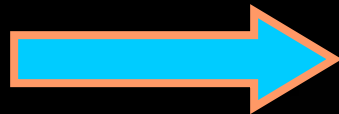
Musca domestica 'nın piretroid insektisitlere direnci çok yüksek olan LPR ırkında mono-oksijenaz aktivitesinin çok yüksek olduğu bulunmuştur Bu enzimler LPR ırkının mikrozomal protein ekstraktlarında fazla miktarlarda bulunurken hassas ırkların ilgili ekstraktlarında daha az sayıda bulunmaktadır(Soderlund, 1997)).

M. domestica 'nın piretroid insektisitlere direnci çok yüksek olan ALHF ırkında sinekler mono-oksijenaz inhibitörü Piperonil bütoksit ile önceden muamele edildiklerinde direnç 6600 kattan 400 kata azalmıştır (Liu et al. 2001).

Sitokrom P450 genlerinin moleküler klonlanması



Rutgers karasineği ırkından *CYP6A1* sitokrom P450 geni izole edilmiştir. Rutgers ırkının hem larva hem de erginlerinde bu genin sinyalinin ürünleri aşırı derecede çoğalmaktadır (Soderlund, 1997).



Karasineklerden karakterize edilen diğer bir sitokrom P450 geni *CYP6D1* geni'dir. Bu gen hassas ırka göre 9 kat daha fazla kopyalanmaktadır (Kasai *et al.* 2000).



Drosophila melanogaster'den *CYP6A2* geni izole edilmiştir (Soderlund, 1997).

Glutation S-Transferazlar

Glutation S-transferazlar (GST), vücuda alınan yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunda önemli bir role sahip olan enzimlerdir. İnsektisit metabolizmasında GST'ların önemi ilk kez organik fosforlu bileşiklerin detoksifikasyonunda belirtilmiştir. GST'lar daha sonra organik klorlu ve siklodien insektisitlere karşı böceklerde çalışılmıştır.

Spodoptera littoralis, *Tribolium castaneum* ve *Aedes aegyptii* 'nin piretroid insektisitlere karşı direncinin yüksek düzeyde olması GST seviyesinin artması ile ilişkili olarak bulunmuştur (Kostaropoulos et al. 2001).

Glutation S-Transferazlar

Spodoptera littoralis'in ortabarsak mikrozoamlarının çeşitli yabancı bileşikleri metabolize edebilecek aktif GST'lar içerdiği belirlenmiştir (Yu, S. J. 2002).

Tenebrio molitor Linnaeus (Col: Tenebrionidae)'da piretroid insektisitlerden decamethrin'e karşı bir koruma mekanizması olarak GST'ların önemini in vivo değerlendirebilmek için *T. molitor*'un 2 gelişme dönemi olan larva ve pupaların toleransı incelenmiştir. Fakat GSH seviyeleri ile piretroid toleransı arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Ayrıca GST sisteminin ergin böceklerde çok az bir öneme sahip olduğu da belirlenmiştir (Kostaropoulos et al. 2001).

Esterazlar

Genel esteraz, karboksilesteraz gibi enzimler sentetik piretroidler ve malathion gibi insektisitlerin metabolizmasında çok önemli bir role sahip olan enzimlerdir. Bu enzimler metilkarbamatlı insektisitler ve organik fosforlu insektisitlerin oxon grupları tarafından inhibe edilirler. Böceklerde büyük bir enzim grubunu oluşturan karboksilesterazlar elektroforetik hareketlilikleri, substrat ve inhibitör spesifikliklerine göre ayırt edilebilirler.

Böceklerde total esteraz aktivitesinin artması ya da bir veya daha fazla spesifik esteraz enziminin aktivitesinin artması bir direnç mekanizması olarak kabul edilmektedir.

Yeşil Seftali afiti *Myzus persicae* ve Tütün afiti *Myzus nicotianae*'da çoklu insektisit direncine E4 ve FE4 esteraz genlerinin sebep olduğu bulunmuştur (Mullin et al.1992).

Culex pipiens Linnaeus (Dip:Culicidae) kompleksinde organik fosforlu insektisitlere karşı esteraz genlerinin aşırı miktarlarda çoğaltıldığı saptanmıştır (Mullin et al. 1992).

Helicoverpa armigera 'da piretroid direnci bir esteraz enziminin böcekteki miktarının artması ile doğru orantılı olarak bulunmuştur (Soderlund, 1997).

Tribolium confusum ve T. castaneum gibi önemli depolanmış ürün zararlılarının kontrolünde yaygın olarak malathion kullanımından dolayı bu zararlıların kontrolünde de pek çok problemler yaşanmaktadır. T. castaneum ırkları bu insektisite T. confusum ırklarına göre daha dirençli bulunmuştur. T. castaneum'da organik fosforlu insektisitlere karşı görülen dirençte esteraz enzimlerinin rolü araştırılmıştır (Dyte and Rowlands, 1968). Bu zararlının malathiona dirençli ırklarının büyük bir kısmında direncin sebebi olarak karboksilesteraz enzim mekanizması gösterilmektedir.

Dirençli ve hassas ırklar karşılaştırıldığında dirençli ırklarda enzim aktivitesinin yüksek olması, hassas böceklerde ise daha düşük seviyelerde bulunması böcek vücudunda bir enzimin normale göre daha fazla üretilmesinden kaynaklanmaktadır. Genel bir ifade ile hidrolizin artırılması piretroid direncinin önemli bir mekanizması olarak kabul edilmektedir.

Asetilkolinesterazlar

Asetilkolinesteraz enzimi (AChE) böceklerde Ace geni tarafından kodlanan ve asetilkolinin hidrolize olmasını sağlayan çok önemli bir enzimdir.

Organikfosforlu ve karbamatlı insektisitler, arthropodların merkezi sinir sistemlerinde asetilkolinesterazın işlevini engelleyen nörotoksik etkilere sahiptir. Bu bileşiklerin başlıca hedef yeridir.

Dirençli böceklerde asetilkolinesteraz gen dizilimi incelendiğinde aminoasit yapısındaki farklılıkların yani mutasyonların dirence sebep olduğu gösterilmektedir.

Hedef AChE'nde değişikliğe sebep olan nokta mutasyonlar organik fosforlu insektisitlere karşı duyarlılığının azalması şeklinde dirence sebep olmaktadır. *Dropsophila melanogaster*, *Musca domestica* ve *Leptinotarsa decemlineata* 'da değişikliğe uğramış AChE belirlenmiştir (Chen et al. 2001)

Zeytin Sineęi *Bactrocera oleae* Rossi (Dip: Tephritidae)'da organik fosforlu insektisitlerden dimethoate'e karşı direnç mekanizmaları araştırılmış ve değişikliğe uğramış AChE'nin başlıca direnç mekanizması olduğu belirtilmiştir (Vontas et al. 2001)

İnsektisitlerin etkinlikleri böceklerdeki AChE miktarına bağlıdır. Böceklerde bu hipotez böcek vücudunda AChE miktarının düşük olması durumunda böceklerin ilaçlara karşı hassas olduklarını, AChE miktarının yüksek olması ise böceklerin ilaçlara karşı daha dayanıklı olmalarına sebep olduğunu öne sürmektedir. Enzim miktarında meydana gelen 2 kat azalma, dirençte de 2 kat azalmaya sebep olmaktadır. Bu da AChE miktarındaki artışın dirence neden olduğunu göstermektedir (Charpentier et al. 2001).

GABA Reseptör Kompleksi

Siklodienler (aldrin, dieldrin, heptachlor vb.)1950'li yıllardan sonra tarımda zararlı böceklerin savaşımları için çok yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır.

Siklodien direnci ile ilgili olarak yapılan çalışmalar; bu direncin temel mekanizmasının hedef yeri duyarlılığının azalması şeklinde olduğunu göstermektedir.

Siklodien insektisitlerin hedef yeri GABA olarak bilinen Gamma aminobütrik asit reseptörleridir.

Bu reseptörler nöronlarda Cl iyonu geçirgenliğini düzenlemektedir.

Drosophila melanogaster'de ve *D. simulans*'ta dieldrine karşı direnç oluşumuna sebep olan Rdl genleri hassas ve dirençli ırklardan elde edilerek aminoasit dizilimleri karşılaştırılmış ve sonuç olarak dirençli ırklarda 302 aminoasit pozisyonunda alanin aminoasidinin yerini serin veya glycin aminoasidinin aldığı belirlenmiştir (Soderlund, 1997).

Sodyum Kanalı Mutasyonu

Sentetik piretroidler sinir membranlarındaki voltaja-bağımlı sodyum kanallarının fonksiyonunu değiştirerek insektisit etkilerini göstermektedirler.

Böceklerde sodyum kanalının yapısında kdr ve süper kdr direnci olarak adlandırılan birtakım değişiklikler meydana gelir.

Böceklerde DDT ve piretroid insektisitlere karşı görülen dirence knockdown direnç (kdr) adı verilmektedir.

DDT ve bazı piretroidlere karşı görülen ve kdr'ye göre böceklerde daha yüksek oranda dirence sebep olan direnç tipine de süper kdr direnci adı verilmektedir.

Klasik direnç tespit çalışmalarında:

- biyolojik aktivite denemeleri (LC₅₀, LD₅₀)
- detoksifikasyon enzimlerinin biyokimyasal seviyelerindeki artış dirençle ilişkilendirilmiştir. Ve neden-sonuç ilişkisi kurulmuştur.

Ancak ilerleyen yıllarda, yüksek direnç gösteren türlerde her zaman

detoksifikasyon enzimlerinde artışın meydana gelmemesi moleküler metotların kullanımının ve moleküler yaklaşımlarda fosfin örneğinde olduğu gibi yeni direnç mekanizmalarının keşfinin önünü açmıştır.

Biyokimyasal Testler

- Bu testler metabolik bir enzim veya hedef bölgeye spesifik testlerdir.
- Direnç mekanizmasının tanınmasını sağlar
- Bu analizler dissekte edilmiş böcek parçalarının çeşitli homojenatlarla muamele edilmesi sonucu yapılmaktadır.
- Tek bir böcekten direncin belirlenmesi ile ilgili olarak yapılan biyokimyasal denemeler afit, sivrisinek ve akar gibi çok küçük canlılarda başarılı bir şekilde yürütülmektedir.

- Spektrofotometre ile toplam enzim aktivitesinin incelenmesi
- Elektroforez ile spesifik enzimlerin incelenmesi
- Microplate assay ile toplam enzim aktivitesinin incelenmesi
- Immunoassay ile spesifik enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Bt ve Dayanıklılık

1985'li yıllara kadar Bt'nin sağladığı önemli avantajlarının yanısıra duyarlılık azalmasının olmadığı da kabul görüyordu.

Ancak 1985 yılında *Ephestia kuehniella*'nın laboratuvarında üretilen popülasyonunun 2. dölünde kısa zaman içinde 30 kat, 15 generasyon sonra ise 100 kattan fazla direnç kazandığı bulunmuştur.

Tarla koşullarında ise *Plutella xylostella*'nın, *Bt kurstaki* ye karşı direnç kazandığı saptanmıştır. Bununda fazla sayıdaki uygulamaların sonucu olarak ortaya çıktığı belirtilmiştir.

Dayanıklılık Bt toksininin bir tek grubuyla sınırlıdır. Toksine duyarlılığın azalması Bt toksininin bağlanma mekanizmasındaki değişikliklerle ilgilidir. Bir tip endotoksine dayanıklılık diğer endotoksine olan duyarlılığın artmasına neden olabilir.

Transgenik bitkilerle (Bt toksin içeren patates, mısır, pamuk, domates) yapılan sera ve tarla denemelerinde olumlu sonuçlar alınmıştır. Hepsinin bir tek endotoksin içermesi nedeniyle Bt dayanıklılığının hızla artışı ile karşılaşılabilir. Ayrıca kalıcılığı kısa olan preparatlara oranla böcekler üzerinde daha yüksek bir seleksiyon baskısı meydana getirebilecektir. Dokularında sürekli endotoksin içerdiğinden birden fazla gene ihtiyaç vardır. Fakat bu durum üründe verimi düşürecektir.

Avantajlar: İlaç uygulaması yok, survey yok, kalıcılık sürekli, bitkinin her tarafında etkinlik var.

Dezavantaj: Transgenik bitkilerin kullanımıyla ilgili çalışmaların çerçevesi belirlenmemiştir. Rekombinant organizmaların araştırmaları uzun bir süreci gerektirir. Rekombinant genlerin çevrede yayılması ve mutasyon potansiyeli ile ilgili araştırmalar özel bir deneme prosedürünü gerektirir.

Moleküler Tanılama

Mutasyon veya genetik materyal ile ilişkili direncin belirlenmesini sağlar.

- PCR
- PCR-RFLP
- Omics yaklaşımları
- Real-Time PCR (qPCR)
- Droplet-digital PCR
- RNA interferans

PCR

- In vitro koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanan bir tekniktir.
- Dirençli ve hassas bireyler arasında single nucleotide polymorphisim (SNP) veya mutasyonların taranması: 1 Bazın varlığı ya da yokluğu

- DNA'daki gerek SNP gerekse de mutasyonlar bir varyasyonu işaret eder. Bunlar arasındaki fark görülme sıklığı ile ilişkilidir. Mutasyonun görülme sıklığı çok azdır.
- Örneğin bir populasyonda belli bir gen lokusunda varyasyonun görülme sıklığı %1'den az ise bu durum mutasyona işaret eder. Eğer bu %1'in üzerinde ise SNP olarak değerlendirilebilir. Nitekim insan genomunda her 200-300 bp'de % 1'den fazla oranda SNP görülebilir ki bu toplam genomda 15 milyon bazı bulabilir. Yani pek çok bireyde SNP'ler doğal olarak görülür. Bu varyasyonların çoğu mutasyonların aksine zararlı değildir. **Dolayısıyla direnç çalışmalarında her SNP mutasyon olarak değerlendirilmemelidir.**
- Gerçek mutasyonların oranı düşüktür. Eğer varyasyonun mutasyon olduğunu anlamak için biyoinformatik programlarından, Site directed mutagenesis ve PCR-RFLP gibi rekombinasyon çalışmalarından faydalanılabilir.

Bacillus thuringiensis'e dirençte ABC (ATP Binding Cassette) Proteinlerinde Mutasyon

Bt toksinlerine direçli olan lepidopterlerde mide epitel hücrelerinde yer alan ABC proteinlerinde Tirosin mutasyonu saptanmıştır. Tirosin bir fosforilasyon ajanıdır. Böylece toksin fosforilize edilmek suretiyle böcek toksini bertaraf etmektedir.

Gahan et al., 2010. Plos Genetics
16;6(12):e1001248.



PCR-RFLP

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması **RFLP** (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır. Bu yöntem polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. **RFLP** tek nokta mutasyon analizlerinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Genomiks

DNA İzolasyonu



Fragmentasyon



Dizi Analizi



Bioinformatik



BLAST

Genom analizleri ile hem ekzon hem de intron alanlarındaki SNP ya da mutasyonlar hakkında da bilgi sahibi olunabilir. Gen ekspresyonuna yönelik bilgi elde edilmez.

Transkriptomiks

Total RNA İzolasyonu



mRNA İzolasyonu



cDNA'ların oluşturulması



Dizi Analizi



Bioinformatik



BLAST

Hassas populasyon



Fat body diseksiyonu



cDNA Library

Dirençli populasyon



Fat body diseksiyonu



cDNA Library

Transkriptomiks

Karşılaştırma



RPKM (Read of per kilobase exon per million reads): Bir örnekteki tek bir mRNA fragmantına karşılık gelen toplam okumaların sayısını bildiren bir değerdir.

FPKM (Fragments Per Kilobase Million): İki taraflı okumalarda kullanılır. Böylece genin tahmini ekspresyon düzeyi hakkında bilgi alınır.

Transkriptom analizleri ile ekzon alanlarındaki SNP ya da mutasyonlar hakkında da bilgi sahibi olunabilir.

Transkriptom Analizi Sonucunda ekspresyon değişimi tahminleri yapılır. Örneğin, 20 generasyon boyunca insektisit ile selekte edilen populasyon ile hassas populasyondan yapılan transkriptom analizi sonucunda:

Ekspresyon Deęiřimi (RPKM=Dirençli/Hassas)	Gen
45.9	A
9.5	B
-3.85	C

RPKM tahminlerinin Real-time ya da dd-PCR gibi tekniklerle verifikasyonu faydalı olacaktır.

Proteomiks

Detoksifikasyon enzimleri

Hassas vs Dirençli

1. Sitokrom P450 Mono-oksijenazlar

?

.....

.....

.....

2. Glutasyon S-Transferaz

?

.....

.....

.....

3. Asetilkolinesteraz

?

.....

.....

.....

4. Karboksilesterazlar

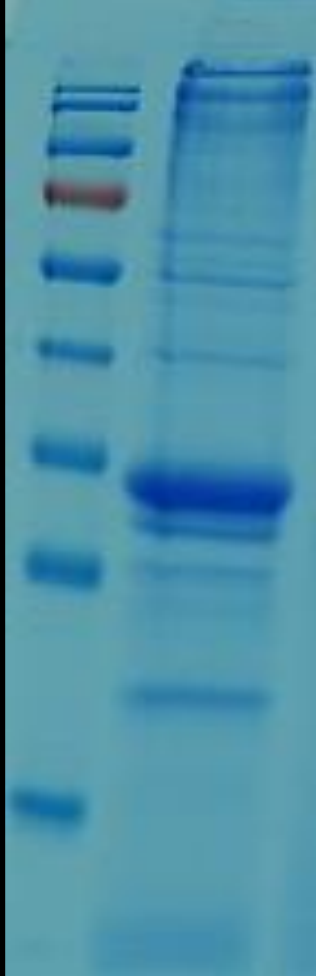
?

.....

.....

.....

170
130
95
72
55
43
34
26
17



⇒ LC-MS/MS

Hassas populasyon



Fat body diseksiyonu



Protein

Dirençli populasyon



Fat body diseksiyonu



Protein

Proteomiks

Karşılaştırma



Real-Time PCR (qPCR)



- DNA'nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve ürünlerinin miktarını tespit etmeye yönelik bir yöntemdir.
- Real-time PCR floresan tabanlı deteksiyon yöntemi ile amplifiye edilen ürünün gerçek zamanlı takip edilebilmesini sağlar. qPCR, bir referans gene göre normalizasyon gerektirdiği için relatif kantitasyon yapabilmektedir.
- Real time PCR, mRNA ekspresyon analizleri, DNA kopya sayısı ölçümleri, allellerin ayırımı veya SNP genotiplemelerini tespit edebilir.
- Direnç çalışmalarında referans gen olarak kabul edilen ekspresyonu sabit olan bir gen baz alınarak hedef genin ekspresyon seviyesi hakkında bilgi sahibi olunabilir.

Droplet-digital PCR (Dijital damlacıklı PCR, ya da ddPCR)

- Geleneksel PCR temelinde, DNA'nın bir yağ emülsiyonu içerisinde damlacıklara parçalanması sonucu, teker teker floresan detektör tarafından tespit edilmesi metoduna dayanır. Bu yöntem, teker teker okuma aldığından örneklerin mutlak kantitasyonunu sağlar ve referans gene ihtiyaç duymaz.
- 20µl örnekten 20.000 damlacık oluşturularak, her bir damlacıktan ayrı bir okuma elde edilerek hassasiyet ve doğruluk artar. Bu şekilde düşük varyant fraksiyonuna sahip mutasyonlar da tespit edilebilir.
- Bu teknikte özellikle yüksek kopya sayısındaki küçük sayıda değişimleri tespit etmek mümkündür.

RNA interferans (Gen susturma)

RNAi yönteminin entomolojide kullanımı yenidir.

RNA interferans (RNAi), mRNA degradasyonuna dayalı fonksiyonel bir genom analiz tekniğidir. Diğer bir deyişle genlerin ne işe yaradığını anlamamızı sağlar.

RNAi, gene spesifik iki sarmallı RNA'lar (dsRNA'lar) kullanılarak, ökaryot modellerde ilgili mRNA'nın parçalanması sağlanır.

RNAi gene spesifiktir.

Günümüzde direnç çalışmalarında en popüler teknik hale gelmiştir. Bu metotta dirençten sorumlu olduğu düşünülen gen spesifik olarak hedeflenmektedir!

RNA interferans'ın Etki Mekanizması

1. Hücre içerisine giren dsRNA, dicer adı verilen bir RNaz III enzimi tarafından 21-23 nükleotitten oluşan siRNA adı verilen küçük RNA'lara parçalanır.
2. siRNA'lar "RNA induced silencing complex (RISC)" olarak bilinen endonükleaz komplekslerine bağlanır.
3. siRNA'lar, tek sarmallı RNA'lara dönüşür ve RISC komplekslerini, eşlenikleri olan mRNA'ya yönlendirerek bu mRNA'ları parçalar. Böylece protein sentezi gerçekleşmez.

RNAi ve Direnç Tespiti

- Metabolik dirençte rol alabilecek olan genlerin susturulması hassasiyetin geri kazanılmasını dolayısıyla LC50 değerinin düşmesini sağlar.
- Böcek genom çalışmalarıyla dizi bilgileri elde edilen ve metabolik dirençte rol aldığı düşünülen farklı genler RNAi ile hedeflenerek bu genlerin gerçekten direnç mekanizmalarında rol alıp almadığı anlaşılabilir.