

1. Thema des Vorhabens

Biointelligente RNA-basierte Pflanzenschutzmittel zur nachhaltigen und umweltschonenden Kontrolle von Schadinsekten im Gartenbau – Akronym: RNAbait

2. Angaben zum Antragsteller mit vollständigen Kontaktdaten

Antragsteller:

Universität Hohenheim, FG Phytopathologie
Dr. Aline Koch (Koordinatorin)
Otto-Sanderstr. 5, D-70599 Stuttgart,
T: 0711-459-23194
aline.koch@uni-hohenheim.de

Projektpartner:

Universität Hohenheim, FG Entomologie
Prof. Dr. Georg Petschenka
Otto-Sanderstr. 5, D-70599 Stuttgart,
T: 0711-459-22400
georg.petschenka@uni-hohenheim.de

3. Hintergrund, Problemstellung und Stand der Forschung

RNA-basierte Techniken im Pflanzenschutz stellen eine vielversprechende Alternative zu chemischen Pflanzenschutzverfahren insbesondere hinsichtlich ihrer Spezifität und der damit verbundenen Schonung von Nichtzielorganismen dar. Ihre Wirksamkeit gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen und anderen Schaderregern ist unzweifelhaft belegt (e.g. Koch und Kogel 2014; Gaffar und Koch 2019; Koch und Wassenegger 2021). Dabei unterscheidet man zwischen Strategien, die auf einer Transgen-basierter Produktion von inhibitorischen RNAs beruhen (host-induced gene silencing = **HIGS**; GMO) (Koch et al. 2013) und Verfahren bei denen sogenannte RNA-Biopestizide durch Sprühen appliziert werden (spray-induced gene silencing = **SIGS**; GMO-frei) (Koch et al. 2016). Beide Verfahren sind vergleichbar effektiv (Höfle et al. 2020; Werner et al. 2020), die Sprühmethode wird jedoch aufgrund der transienten Wirkung im Vergleich zur genetisch modifizierten Pflanze oft bevorzugt. Im Falle des pilzlichen Getreidepathogens *Fusarium graminearum* erwies sich das Sprühen von RNA sogar als effizienter, verglichen mit der Transgen-basierter Kontrolle (Koch et al. 2019). Aus diesem Grund ist das Potential der gentechnik-freien Technologie insbesondere für Deutschland bzw. Europa, wo gentechnische Verfahren stark limitiert sind, hoch. In Anbetracht der gesellschaftlich zunehmenden Forderung nach pestizidfreier Landwirtschaft ist zu erwarten, dass innovativen Pflanzenschutzverfahren wie RNAi-basierten Technologien künftig eine große Bedeutung zukommen wird.

4. Ziel(e) des Vorhabens

Da die Anwendung gesprühter doppelsträngiger (ds)RNA (SIGS-Technologie) unter kontrollierten Laborbedingungen entwickelt wurde, muss insbesondere überprüft werden, wie praktikabel die Methode im Freiland ist. Vor allem muss die Stabilität von applizierten RNAs unter Realbedingungen auf Umwelteinflüsse wie bspw. Regen oder UV-Strahlung optimiert werden. Um RNA-Biopestizide vor Umwelteinflüssen zu schützen, soll hier eine **innovative Verkapselung** von RNA in Alginat getestet werden. Diese Kapseln können so konzipiert werden, dass sie diverse Moleküle, wie beispielsweise RNA aufnehmen und somit schützen und stabilisieren¹. Eine verlängerte Verweilzeit von RNAs auf der Pflanze und direkte Aufnahme der RNA-Biopestizide aus der Kapsel durch Aussaugen bspw. durch Wanzen (Abb.), stellt daher einen vielversprechenden Ansatz dar, um eine möglichst **langanhaltende Schutzwirkung bei gleichzeitig minimal eingesetzter Wirkstoffmenge** zu erzielen. Darüber hinaus können die Schadinsekten durch



¹ Die Entwicklung der Technologie wurde im Rahmen des MLR-Projektes 54-8214.07-FP20-137/1 entwickelt.

einen artspezifischen Lockstoff in der Kapselwand gezielt angelockt werden, was zur unmittelbaren **Risikominimierung für Nichtzielorganismen** beiträgt.

Das zentrale Ziel des hier vorgeschlagenen Projekts ist die **Identifikation von hochwirksamen, insektizid-wirkenden dsRNAs**, welche für die spätere Alginatverkapselung (bestehende Kooperation mit der Katz Biotech AG) dienen sollen. Der **Zielorganismus ist die marmorierte Baumwanze (*Halyomorpha halys*)**, eine invasive Art, die große Schäden in einer ganzen Reihe an Kulturen sowohl im obstbaulichen wie auch im gartenbaulichen Bereich verursachen kann. Die Wanze ist äußerst widerstandsfähig gegenüber chemischen Pflanzenschutzmitteln und kann bisher nur mit breit wirksamen Insektiziden kontrolliert werden.

Mit Hilfe der hier beantragten Förderung verfolgen wir das Ziel, RNA-basierte Techniken (ohne gentechnische Veränderung von Organismen) als innovatives, selektives Pflanzenschutzverfahren und als geeignete Alternative zu chemischen Pflanzenschutzmitteln im Gartenbau zu etablieren. Darüber hinaus kombinieren wir eine kontrollierte, Lockstoff-vermittelte Aufnahme der dsRNA durch die Pflanzenschädlinge (d.h. Aussaugen der Alginatkapsel) - ein biointelligentes Konzept, das Art- und Wirkungsort-spezifisch ist und somit mögliche Nebenwirkungen auf Nichtzielorganismen minimiert.

5. Vorgehensweise und Methodik

Vielversprechende Zielgene in *H. halys* werden anhand von Sequenzierungsdaten (Genomdaten verfügbar NCBI *Halyomorpha halys* Annotation Release 100) identifiziert. Die Sequenzen der selektierten Zielgene dienen als Ausgangspunkt für das Design sequenzkomplementärer dsRNAs, wobei die Vorhersage der effizientesten dsRNAs bei gleichzeitiger Vermeidung von *off-target hits* (Fehlpaarung an ähnliche Gensequenzen) mittels Zhao Bioinformatics Laboratory tool² erfolgt (Werner et al. 2020). Die Synthese der zu testenden dsRNAs wird durch Eupheria Biotech³ durchgeführt. Um die wirksamsten dsRNA-Kandidaten für eine spätere Verkapselung zu ermitteln, werden die synthetisierten dsRNAs *H. halys* in einer ersten Testphase injiziert. Für die Injektion wird ein im Labor vorhandenes Mikroinjektionssystem verwendet (World Precision Instruments), das die präzise Injektion von Kleinstvolumina mithilfe von Glaskapillaren erlaubt. Nach der Injektion werden die Wanzen für eine Woche beobachtet, um die insektizide Wirkung zu erfassen. Solche dsRNAs, die eine insektizide Wirkung besitzen, werden in einem zweiten Schritt dann an die Wanzen verfüttert, um zu testen, ob die dsRNAs auch bei oraler Verabreichung ihre Effekte entfalten. Hierfür werden die dsRNAs in einer Saccharose-Lösung gelöst und den Wanzen per Zwangsfütterung verabreicht. Dieses Verfahren ist in unserem Labor etabliert und wurde von uns schon in anderem Zusammenhang erfolgreich angewandt (Bramer et al. 2015). Abschließend erfolgt die Expressionsanalyse der jeweiligen Zielgene von verschiedenen Gewebeproben mittels qRT-PCR Verfahren.

6. Praxisbezug

Insbesondere seit durch die sogenannte „Krefelder Studie“ (Hallmann et al. 2017) ein drastischer Rückgang der Insektenfauna deutlich wurde und mittlerweile durch weitere Studien sehr gut belegt ist⁴, werden verstärkt Forderungen nach der Reduktion oder sogar einem generellen Verbot chemischer Insektizide laut. Zukunftsweisende Forschung im Pflanzenschutz muss daher zwingend auf innovative, biologisch selektive Methoden fokussieren. Die im beantragten Projekt gewonnenen Ergebnisse werden zu neuen

² <http://plantgrn.noble.org/pssRNAit/>

³ <https://www.eupheria.com/products/rnai-long-rna-silencers/rnai-open/tech>

⁴ <https://doi.org/10.1073/pnas.2023989118>

Erkenntnissen in Bezug auf die gentechnikfreie Anwendbarkeit von RNAi zur Bekämpfung tierischer Schaderreger (Insekten) führen. Insbesondere soll unsere Forschung den Nachweis erbringen, ob der Einsatz von Alginatkapseln eine wirkungsvolle Methode darstellt, um RNAi als Bekämpfungsstrategie für tierische Schaderreger nutzen zu können, ohne Pflanzen gentechnisch modifizieren zu müssen.

7. Zeitplan

Arbeitsschritte (6 Monate)	1	2	3	4	5	6
Identifikation von Zielgenen						
Design von Zielgen-spezifischen dsRNAs						
Synthese der dsRNAs						
Injektion der dsRNAs & Validierung						
Verfütterung der dsRNAs & Validierung						
Expressionsanalyse Zielgene						

8. Kostenplan inkl. Art der benötigten Finanzierung

Für die Projektlaufzeit soll ein/e technische/r Assistent/in (E9, 50 %) zur Durchführung der Experimente beschäftigt werden. Aufgrund der Beschränkung der Projektlaufzeit auf sechs Monate planen wir, eine/n bereits angestellte/n Mitarbeiter/in (50 %) für die Dauer des Projekts aufzustocken. Die Beschäftigung weiteren Personals im Rahmen des Projekts ist notwendig, da die Untersuchungen (Verfütterung von dsRNA, Injektion von dsRNA, Evaluierung der Effekte, Betreuung der Insektenzucht) sehr arbeits- und zeitintensiv sein werden. Insgesamt werden Personalkosten von 19.426 € veranschlagt. Für die Auftrags-synthese von dsRNA sowie für Verbrauchsmaterial (RNA Extraktion, qRT-PCR) benötigen wir 10.000 €.

9. Verwertungsform(en) der Forschungsergebnisse

Der Einsatz einer Kombination aus RNAi- und Kapseltechnologie hat das Potential, zukünftig eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung invasiver Schadwanzen zu spielen, die sich derzeit nicht oder nur sehr eingeschränkt mit den bestehenden Strategien bekämpfen lassen. Neben wissenschaftlichen Erkenntnissen und vor allem aufgrund der gesellschaftlichen Forderung nach der Reduktion chemischer Insektizide, gehen wir davon aus, dass die Methode über ein großes wirtschaftliches Potential verfügt. Basierend auf unseren Erkenntnissen wird es möglich sein, Produkte zu entwickeln, die chemischen Insektiziden in mehrerer Hinsicht überlegen sein werden. Zum einen ist nicht damit zu rechnen, dass mit dsRNA-beladene Alginatkapseln eine hohe Persistenz in der Umwelt aufweisen. Vielmehr ist davon auszugehen, dass freigesetzte dsRNA als Wirkstoff sehr schnell abgebaut wird. Darüber hinaus wird die Methodik sehr wahrscheinlich eine verbesserte Selektivität gegenüber herkömmlichen Insektiziden aufweisen. Aus den genannten Gründen werden die Forschungsergebnisse zur Vorbereitung eines größeren Verbundprojektes mit der KBAG genutzt, welches darauf abzielt ein RNA-Alginatkapsel-Produkt zu entwickeln (BMBF KMU-innovativ: Bioökonomie⁵).

10. Form(en) der Veröffentlichung

Die erarbeiteten Ergebnisse des skizzierten Forschungsvorhabens werden in internationalen Fachjournalen publiziert. Zusätzlich sollen die Ergebnisse auch auf Konferenzen und bei Fachveranstaltungen (z.B. Pflanzenschutztagung) bzw. in Arbeitskreisen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft e.V. verbreitet werden. Auch in aktuelle Lehrformate werden die Erkenntnisse eingebracht und sollen im Rahmen von studentischen Forschungsprojekten

⁵ <https://www.bmbf.de/de/kmu-innovativ-biooekonomie-11267.html>

des *Humboldt reloaded* Programms auch für andere Schadinsekten und mögliche Kombinationspräparate weiterentwickelt werden.

11. Nachweis der Fachkompetenz und Qualifikation für die Bearbeitung des Themas

Die Arbeitsgruppe von **Dr. Aline Koch** gehört zu den international führenden auf dem Gebiet RNA-basierter Pflanzenschutz als Alternative zu chemischen Pflanzenschutzverfahren. Internationales Renommee erlangte unsere Forschung insbesondere durch die Entwicklung eines GMO-freien RNA-basierten Pflanzenschutzverfahrens, welches auf der Sprühapplikation von sogenannten RNA-Biopestiziden beruht⁶. Alle Forschungsergebnisse wurden in international führenden Fachzeitschriften wie „*Proceedings of the National Academy of Sciences*“, „*New Phytologist*“ oder „*Plos Pathogens*“ veröffentlicht.

Prof. Dr. Georg Petschenka leitet seit 01. März 2020 das Fachgebiet Angewandte Entomologie am Institut für Phytomedizin der Universität Hohenheim. Herr Petschenka ist ein international renommierter Experte für Insekt-Pflanze-Interaktionen, der 2016 für seine Forschung mit dem Early Career Award der International Society of Chemical Ecology ausgezeichnet wurde. Die Arbeitsgruppe von Prof. Petschenka verfügt über eine breite Expertise mit unterschiedlichen Insektengruppen. Das am Institut für Phytomedizin angesiedelte FG Angewandte Entomologie verfügt über eine hervorragende Infrastruktur, technische Expertise sowie alle Ressourcen, die für die erfolgreiche Durchführung der geplanten Forschung nötig sind.

12. Literaturverzeichnis

- A. Koch** and M. Wassenecker, Tansley insight on the topic of 'Host-induced gene silencing - mechanisms and applications. *New Phytologist*, DOI: 10.1111/nph.17364 (2021).
- A. Koch**, K. H. Kogel, New wind in the sails: Improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnol. J.* **12**, 821–831 (2014).
- F. Y. Gaffar, **A. Koch**, Catch me if you can! RNA silencing-based improvement of antiviral plant immunity. *Viruses*. **11** (2019), doi:10.3390/v11070673.
- A. Koch**, N. Kumar, L. Weber, H. Keller, J. Imani, K. H. Kogel, Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to Fusarium species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 19324–19329 (2013).
- A. Koch**, D. Biedenkopf, A. Furch, L. Weber, O. Rossbach, E. Abdellatif, L. Linicus, J. Johannsmeier, L. Jelonek, A. Goesmann, V. Cardoza, J. McMillan, T. Mentzel, K. H. Kogel, 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 Pathog.* **12**, 1–22 (2016).
- L. Höfle, D. Biedenkopf, B. T. Werner, A. Shrestha, L. Jelonek, **A. Koch**, Study on the efficiency of dsRNAs with increasing length in RNA-based silencing of the Fusarium CYP51 genes. *RNA Biol.* **17**, 463–473 (2020).
- B. T. Werner, F. Y. Gaffar, J. Schuemann, D. Biedenkopf, **A. Koch**, RNA-Spray-Mediated Silencing of Fusarium graminearum AGO and DCL Genes Improve Barley Disease Resistance. *Front. Plant Sci.* **11** (2020), p. 476.
- A. Koch**, L. Höfle, B. T. Werner, J. Imani, A. Schmidt, L. Jelonek, K. H. Kogel, 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. *Mol. Plant Pathol.* **20**, 1636–1644 (2019).
- C. Bramer, S. Dobler, J. Deckert, M. Stemmer, **G. Petschenka**, Na⁺/K⁺-ATPase resistance and cardenolide sequestration: basal adaptations to host plant toxins in the milkweed bugs (Hemiptera: Lygaeidae). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **282**, 20142346 (2015).
- C. A. Hallmann, M. Sorg, E. Jongejans, H. Siepel, N. Hofland, H. Schwan, W. Stenmans, A. Müller, H. Sumser, T. Hörrén, D. Goulson, H. de Kroon, More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLoS One*. **12**, e0185809 (2017).

⁶ Nature Research Highlights: RNA spray fights fungus. *Nature* 538, 293 (2016)
<https://doi.org/10.1038/538293d>