



Qualitätssicherung. Vom Landwirt bis zur Ladentheke.



Abschlussbericht an den
QS-Wissenschaftsfonds Obst, Gemüse und Kartoffeln

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

1. Aufgabenstellung/Zielsetzung

Der drastische Rückgang der Insektenfauna stellt den Pflanzenschutz vor nie dagewesene Herausforderungen. Dabei wird der Einsatz von chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmitteln als eine der wichtigsten Ursachen des Biodiversitätsverlusts gesehen (Wagner et al., 2021). Vor diesem Hintergrund gilt es, neue innovative Konzepte und Strategien für eine nachhaltiger Pflanzenproduktion zu entwickeln. Der Schutz der Biodiversität hat dabei höchste Priorität und ist von größter gesellschaftspolitischer Relevanz. Dies ist Ziel landes¹-, bundes²- und EU-weiter³ Bioökonomiestrategien und des Europäischen Green Deal⁴. Dabei soll der Einsatz chemisch-synthetischer Pflanzenschutzmittel bis 2030 um 50% reduziert werden. Um diese Ziele zu erreichen und zum Schutz der Biodiversität, bedarf es innovativer Lösungsansätze und Alternativen, wobei RNA Interferenz (RNAi)-basierte Methoden als besonders vielversprechend gelten⁵. Zahlreiche Studien konnten die Effektivität RNAi-basierter Pflanzenschutztechnologien zur Kontrolle von Pathogenen und Schadinsekten in der Landwirtschaft und im Gartenbau bereits eindrucksvoll unter Beweis stellen. In den USA sind bereits erste RNAi-modifizierte Pflanzen zugelassen (SmartStax PRO Mais, Bayer (Head et al., 2017)), jedoch erfährt die Verwendung gentechnisch-modifizierter (GM) Pflanzen in der EU nur geringe Akzeptanz. Hinzu kommt, dass das Erstellen von GM-Pflanzen sehr kompliziert ist und deren Zulassung horrenden Kosten verursacht. Aus diesen und weiteren Gründen ist vor allem die exogene Gentechnik-freie Applikation von RNAi-auslösenden RNAs so revolutionär. Die sogenannte „spray-induced gene silencing“ Technologie (Koch et al., 2016), welche auf der Sprühapplikation von doppelsträngigen RNAs (dsRNA) basiert, triggert dabei den natürlichen RNAi Mechanismus in Zielorganismen, wie beispielsweise Insekten und Pilzen, die dsRNAs besonders gut aus dsRNA-gesprühten Kulturpflanzen aufnehmen.

Das Sprühen von RNA im/zum Pflanzenschutz ist zweifelsohne revolutionär, insbesondere wegen der hohen Selektivität und der Möglichkeit mit Sequenz-basierten Wirkstoffen sehr schnell und präzise auf neue oder plötzlich auftretende Krankheitserreger sowie damit verbundene Epidemien⁶ zu reagieren. Aus den genannten Gründen ist es von größter Relevanz, diese Technologien für den Einsatz unter Freilandbedingungen zu optimieren

¹ Landesstrategie: Ministerium für Ernährung, Ländlichen Raum und Verbraucherschutz Baden-Württemberg ([baden-wuerttemberg.de](https://www.baden-wuerttemberg.de))

² Nationale Bioökonomiestrategie | Bioökonomie.de ([biooekonomie.de](https://www.biooekonomie.de))

³ A sustainable bioeconomy for Europe - Publications Office of the EU ([europa.eu](https://european-council.europa.eu))

⁴ Europäischer Grüner Deal | EU-Kommission ([europa.eu](https://european-council.europa.eu))

⁵ Action CA15223 - COST

⁶ Wie viel Ertrag kostete der Befall mit Gelbrost? :: BW agrar online - landwirtschaftliche Informationen für Baden-Württemberg ::

¹ Nur für den Abschlussbericht



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



und weiterzuentwickeln (Rank und Koch 2021). Dabei gilt es sowohl die Stabilität der exogen applizierten RNAs gegenüber Umweltbedingungen (UV, Regen, Hitze) zu optimieren und sie vor dem Abbau durch bspw. Ribonukleasen auf den behandelten Kulturpflanzen zu schützen als auch Zielorganismen zu schonen. Das Verkapseln von RNA zu deren Schutz ist dabei besonders naheliegend. Im Rahmen eines durch das Ministerium für Ländlichen Raum und Verbraucherschutz Baden-Württemberg geförderten Projektes (SAFEbugBeads) soll die Verkapselung von RNA mittels Alginats untersucht werden. Die Besonderheit der Fusion aus Alginatverkapselungs- und RNAi Technologie besteht darin, dass über den RNA-stabilisierenden Aspekt hinaus zusätzlich die Selektivität der eingesetzten RNA Wirkstoffe weiter gesteigert werden kann. Dabei wird die Selektivität, welche bereits durch Auswahl der Zielgenesequenz determiniert ist, zusätzlich durch die Integration artspezifischer Lockstoffe in die Kapselwand erhöht. Die *attract-and-kill*-Kapseln locken gezielt die Schadwanze *Halyomorpha halys* an, welche durch Aussaugen der Alginatkapsel die dsRNA aufnehmen - ein biointelligentes Konzept, das Art- und Wirkungsort-spezifisch ist und somit mögliche Nebenwirkungen auf Nichtzielorganismen minimiert.

Das zentrale Ziel des durch den QS-Fond geförderten Projekts war die Identifikation von hochwirksamen, insektizid-wirkenden dsRNAs, welche für die spätere Alginatverkapselung (Kooperation mit der Katz Biotech AG) dienen sollen. Der Zielorganismus ist die marmorierte Baumwanze (*Halyomorpha halys*), eine invasive, sich zunehmend ausbreitende Art⁷, 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.

Das geförderte Projekt hatte zum Ziel, RNA-basierte Techniken (ohne gentechnische Veränderung von Organismen) als innovatives, selektives Pflanzenschutzverfahren und als geeignete Alternative zu konventionell-chemischen Pflanzenschutzmitteln im Gartenbau weiter zu etablieren.

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

a. Identifikation artspezifischer Zielgene

Vielversprechende Zielgene in *H. halys* wurden anhand von Sequenzierungsdaten (Genomdaten verfügbar NCBI *Halyomorpha halys* Annotation Release 100) identifiziert. Insgesamt wurden 25 potenzielle Zielgene identifiziert, wobei zunächst 5 vielversprechende Zielgene für Injektions- und Verfütterungsexperimente ausgewählt wurden. Die Sequenzen der selektierten Zielgene dienten als Ausgangspunkt für das Design sequenzkomple-

⁷ Invasiver Schaderreger - Erstnachweis der Eiablage der Marmorierten Baumwanze *Halyomorpha halys* im Freiland für das Jahr 2021 – Aufruf zu Meldungen !! | ISIP



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



mentärer dsRNAs. Um mögliche off-Target Effekte (Fehlpaarung an ähnliche Gensequenzen) von vornherein auszuschließen wurden bioinformatische Analysen mittels *in silico* Vorhersage unter Verwendung von OfftargetFinder (Good et al., 2016) (internationaler Standard, OECD Empfehlung) und Zhao Bioinformatics Laboratory tool⁸ (Werner et al., 2020) durchgeführt.

b. Zielensequenzen

Name: Homeotic protein sex combs reduced - SCR

Region: 944-1240 bp (XM_014419605.2)

dsRNA Länge: 316 bp

```
TACCAGTTCACGCACCTCACCACCTAACTAGCTTCCGTCATGCCAACAGCCACGACCTCTGGCAGGAGAGGTAT
GAGTGATAGGTCTGTAGGCACCATGACGTACCAATCTGTGATCGTGTCTGCCGACGCGCTGGGCCACCGAACTA
TAGTGCTGTGTTGTGATTGTGAATATTGACATTTACGAATATATCTTCGAAAAGTCCTCAACGAAAGGACAAGAAG
CGCTAAAGACTTCTAAAATATAAATATATATAAATTAATATATCCTTCTCAGTATTGATATAGTCTA
```

Name: Ankyrin-Repeat-Domäne - ARD

Region: 6085 – 6339 bp (XM_024359409.1)

dsRNA Länge: 272 bp

```
GCTGCTGCTGTCTGGGAAAAATCAGTTAACTGCTAAATCGAAGCCTAGCAATAAGACATCTCAACCTAGTGCAA
TAGTTTCATTGAGTAATAAACTACTACCTCTGGTGTATTAAGTGTAGCTCCTTTAATACCACCTAGAAGCTCCG
CATCCTTTCATCCAGTAGGGTGACAGCACCTCGCCTTGCCTCTCATGTTGGTAAGAGGCAAGTTTCTGTATCCTC
CTCAACATGCACCAAAACAACAATG
```

Name: Inhibitor of apoptosis protein - IAP

Region: 229-548 bp (XM_014435389.2)

dsRNA Länge: 343 bp

```
GTC AAGGATTGGAAGTGAATGTTTCAGTTGTGGTGAAGAATATCGGAATGGAATATAGGTGACAGTGTCATGTC
TAAACACAGAGTACTAGACCCATTTTGTCCCTTGTGCAAAACCTATTTTGTCTGGTAATATACCCTTATTAGTGA
TCGTAGAAATTCTCCTAATACTAGCCAGGAAAACCAATCAGTTTATCAAAATGAAAATCAAGACTTGATACCTTTAC
AGCTTGGCCTATTGCGAG
```

Name: - CATalase

Region: 1330 -1564 bp (XM_024360853.1)

dsRNA Länge: 253 bp

```
GCAAGCAGGCTCTCTATCCAGTCTCAGGAATGGTTGCTGCATATGATACAAGCAATGAGGATAATTTAGCCAAGC
TACTTGGTTTTGGAATCAACTCACATCTGATCAAAGAAGCAGGCTGGTAGCTAATATCGCTGCAACGCTAAATTATG
CAGCTCCATTCATTGAGGAGAGAGCAGTCAATAAATACTTGCAGGTGAGTGAGGATTTGGAAACGCCATTGCTGC
GGTTT
```

⁸ <http://plantgrn.noble.org/pssRNAit/>



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



Name: V-type proton ATPase catalytic subunit A - HhvATPaseA

Region: 180 - 539 bp (XM_014417043.2)

dsRNA Länge: 360 bp

```
GGTGTTCCTGGTCCTGTCGTCACAGCTGAAAAGATGTCAGGATCAGCTATGTACGAGCTAGTAAGAGTCGGTTATT
TTGAATTGGTCGGTGAAATTATTCGTCTTGAAGGTGATATGGCAACTATTCAGGTATACGAAGAACTTCTGGTGTA
ACAGTTGGAGATCCTGTCTTACGAACAGGTAACCTCTTTCTGTTGAATTGGGTCCTGGTATTCTCGGGAGTATCTT
TGATGGTATCCAGCGACCTCTGAAGGATATTAACGAAATCTCAAACAGTATTTACATCCCTAAGGGTGTCAACATCC
CTGCATTGTCAAGGAGTGCTGCTTGGGAATCCAGCCAACCAACATCAAGGTC
```

Name: Coatomer subunit alpha - HhAlphaCOP

Region: 1695 - 2020 bp (XM_014431769.2)

dsRNA Länge: 326 bp

```
CTGGTGCTTGGGATGAAAATGGAGTTTTTATTACACAACAAGTAATCATATTAATATGCTATCAATAATGGAGATC
ATGGAATTATTCGAACACTTGATTTGCCTATATACATTACCAAAGTTAAAGGTAATCAAGTGTCTGTTTAGATAGAG
AATGTCAATCCAGAATTTGAGTATTGATCCTACTGAGTACCGTTTCAAACCTGCTTTAATTCATTGGAATTATGAAG
AAGTGTACATATGGTAAGGAATGCGAGACTTGTGGTCAAGCTATTATTGCTTATTACAGCAAAAAGGCTATCCT
GAAGTAGCGCTGCAT
```

Name: Clathrin heavy chain - HhChc

Region: 1013 - 1427 (XM_014431604.1)

dsRNA Länge: 415 bp

```
TTGTTTTGCTTTGCTGTTTCGTACACTTCAAGGAGGAAAGCTTCATATAATTGAGGTTGGACAGCCTCCTACAGGAAA
CCAACCATTCTCAAAAAAGCAGTGGATGTATTTTTCCAGTAGAAGCCCAAATGATTTCCAGTTGCAATGCAGG
TTAGCTCTAAATATGATGTAATCTATCTTATTACAAAGTATGGATACATTCATTTGTATGATTTGGAAACAGCTACAT
GTATTTACATGAACCGTATTAGTATTGATACTATATTTGTAACCGCTCCTCATGAATCAACTGGTGGTATCATAGGTG
TGAATAGAAAAGGCCAGGTGTTATCAGTGAGTGTGAAGAGGACCATATAATCCCATATATCAATAATATATTACAA
AATCCTGATCTAGCATTACGCATGGCTG
```

c. Synthese der dsRNAs

Die Synthese von dsRNA ist zwar in unseren Laboren etabliert, jedoch wäre der Zeitaufwand für die Klonierung der Zielgensequenzen in für die dsRNA Synthese benötigte Ausgangsvektoren zu zeitaufwändig und zu kostspielig gewesen, weshalb wir die Synthese der Targets extern beauftragt haben. Anders als in der Vorhabenbeschreibung beschrieben, wurde für die Synthese der dsRNA das Unternehmen RNA Greentech beauftragt. Die Gründe hierfür liegen in der rasanten Entwicklung kostengünstiger dsRNA Syntheseverfahren, wobei RNA Greentech dsRNA in großen Mengen zu günstigeren Konditionen anbietet. Darüber hinaus versuchen wir eine Kooperation zum derzeit günstigsten Anbieter, Greenlight Bioscience, zu etablieren. Greenlight Bioscience ist das erste Unternehmen, welches ein marktreifes RNA Biopestizid (gentechnikfrei) für die Zulassung in den USA



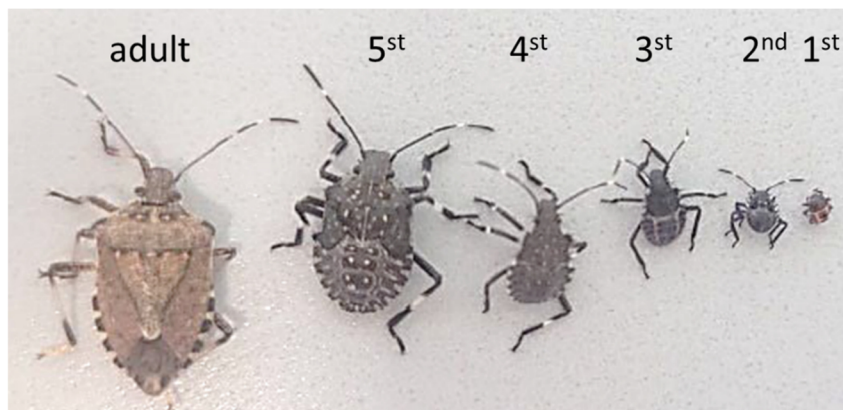
Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



beantragt hat (Rodrigues et al., 2021; Pallis et al., 2022) und aus diesen Gründen womöglich eine Vorreiterrolle hinsichtlich zukünftiger Zulassungsverfahren und Risikobeurteilungen einnehmen wird. Wir planen eine Kooperation hinsichtlich geeigneter Formulierungen für die Anwendung von dsRNA im Freiland. In unserem BMEL-geförderten Projekt hoRtikulturNA⁹ nutzen wir sogenannte Mikrogel-Container zur Stabilisierung der dsRNA. Diese Formulierung wollen wir Greenlight Biosciences für ihre Freilandversuche an Kartoffeln in den USA zur Verfügung stellen. Gleichzeitig profitieren wir zukünftig vom zellfreien dsRNA Produktionssystem, wodurch große Mengen hochreiner dsRNA kostengünstig produziert werden können. Dies ist essenziell für die diesjährig stattfindenden Freilandversuche an Apfelkulturen in Zusammenarbeit mit dem Kompetenzzentrum Obstbau Bavendorf (KOB, Christian Scheer).

d. Injektion *H. halys*-spezifischer dsRNAs

Um die wirksamsten dsRNA- Kandidaten für eine spätere Verkapselung zu ermitteln, wurden die synthetisierten dsRNAs *H. halys* in einer ersten Testphase injiziert. Für die Injektion wurde ein im Labor vorhandenes Mikroinjektionssystem verwendet (World Precision Instruments), das die präzise Injektion von Kleinstvolumina mithilfe von Glaskapillaren erlaubt.



Nach der Injektion wurden die Wanzen beobachtet, um die insektizide Wirkung zu erfassen. Da bekannt ist, dass dsRNA-basierte Insektizide ein verzögertes Wirkungsprofil zeigen, verglichen mit herkömmlichen, chemisch-synthetischen

Insektiziden, wurde der Beobachtungszeitraum auf bis zu 20 Tage erweitert. Solche dsRNAs, die eine insektizide Wirkung besitzen, wurden dann in einem zweiten Schritt an die Wanzen verfüttert, um zu testen, ob die dsRNAs auch bei oraler Verabreichung ihre Effekte entfalten. Hierfür wurden zunächst geeignete Fütterungsverfahren etabliert.

⁹ Themenservice: Detailansicht: Universität Hohenheim (uni-hohenheim.de)



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



3. Zusammenarbeit/Kooperationen

- Katz Biotech AG, Dr. Peter Katz (Vorstand), Jörg Rademacher Leiter F&E und Insektentechnologiecenter, 73642 Welzheim & 12347 Berlin

4. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

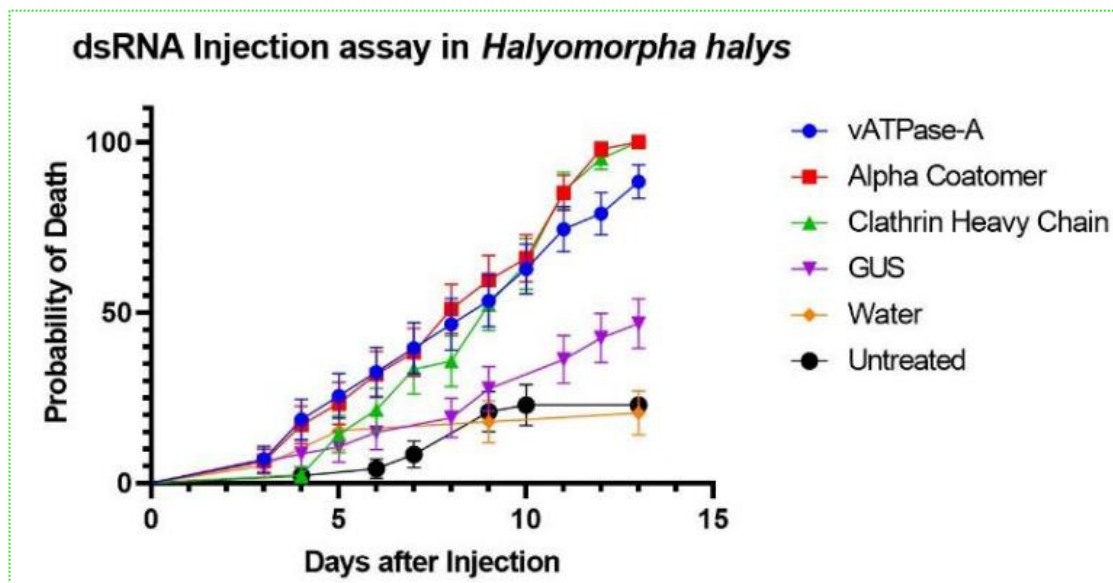
a. Validierung der Injektionsversuche *H. halys*-spezifischen dsRNAs

Um diejenigen dsRNAs zu identifizieren, welche die größte Mortalität bewirken, wurden die dsRNAs in *H. halys* injiziert (mit der zuvor etablierten Methode). Dabei wurde ein Volumen von 2µl (Endkonzentration dsRNA 2µg) mit einer Geschwindigkeit von 500 nL/s mit Hilfe eines Mikromanipulators (World Precision Instruments, AG Petschenka) injiziert. Es wurden jeweils 30-40 adulte Wanzen für jedes dsRNA Konstrukt verwendet. Die Tiere wurden randomisiert ausgewählt und nach Injektion randomisiert in verschiedene Anzuchtkäfige zurückgesetzt. Die Mortalitätsrate wurde täglich erfasst und der Versuch über einen Zeitraum von 20 Tagen beobachtet und abschließend ausgewertet. Als Kontrollen wurden injiziert:

- 1) Nuklease-freies Wasser: Wasser-Kontrolle um auszuschließen, dass die Injektion eine unspezifische Sterblichkeit induziert
- 2) dsRNA-GUS: dsRNA-Kontrolle (hergestellt mit Kit Life Techn GmbH), um auszuschließen das die Injektion mit dsRNA einen unspezifischen Effekt (möglich wäre Immunreaktion oder Übersättigung der RNAi Maschinerie) hervorruft. Die ausgewählte dsRNA-Sequenz hat keine Sequenzkomplementarität zum Genom von *H. halys*
- 3) Unbehandelt: ein Teil der Wanzen wurde nicht injiziert, um die natürliche Sterblichkeit abzubilden und um darzustellen, inwiefern bzw. in wieviel Fällen die Injektion (=Stress) selbst den Tod der Tiere zur Folge hatte



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



Für die drei dsRNA Konstrukte ergaben sich folgende Mortalitätsraten:

*Hhv*ATPaseA: 87%

*Hh*AlphaCOP: 100%

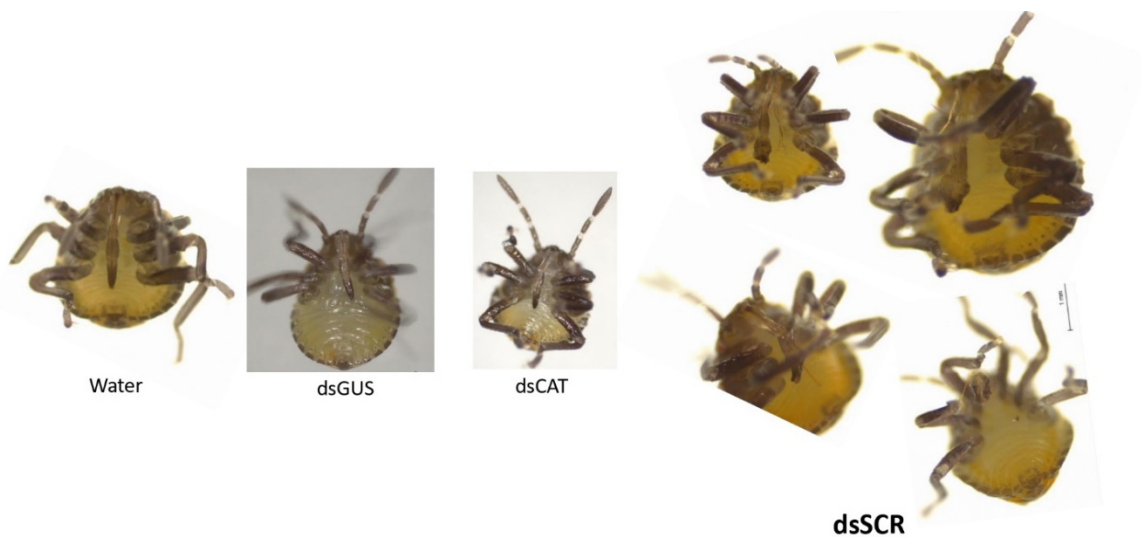
*Hh*Chc: 100%

Kontrollen: Wasser: 28%; unbehandelt: 19% dsRNA-GUS: 52%

Eine sehr interessante Beobachtung wurde nach Injektion der dsRNA *Hh*-SCR (*sex comb reduced*) beobachtet. Die Eier der injizierten Wanzen wurden gesammelt und die daraus hervorgegangenen Larven zeigten eine deutliche Deformation der Mundwerkzeuge (siehe Abbildung unten S. 7). Dieses Ergebnis ist von signifikanter Bedeutung, denn es zeigt die Übertragbarkeit auf die Folgegeneration, wobei die deformierten Mundwerkzeuge eine veränderte/verschlechterte Nahrungsaufnahme bedeuten und somit zum Schutz der Zielkulturen beitragen könnten. Der Effekt wurde verifiziert.



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



Anhand dieser Ergebnisse lässt sich abschließend folgendes feststellen. Die natürliche Sterblichkeit der Tiere unter Zuchtbedingungen liegt stabil bei 20-25%. Darüber hinaus steigt die Sterblichkeit durch die Injektion, was anhand der Kontrolle (Tiere injiziert mit Wasser) deutlich wird. Es zeigt sich, dass die adulten Tiere stressanfälliger sind als bspw. das 5 Nymphenstadium der Wanzen (Abb. S5), weshalb zur Zielgenvalidierung zukünftig nur dieses Stadium injiziert wird.

Eine wichtige Beobachtung und Validierung der RNAi-Effektivität war zudem, dass die Tiere nach dsRNA Injektion nur noch eingeschränkt Nahrung aufnehmen konnten (Abb. S.9), wodurch die Zielkultur (hier Bohnen) geschützt waren.



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



Da die Injektionsversuche artifizell sind und die Aufnahme der dsRNA im Freiland oral erfolgt, haben wir ebenfalls Fütterungsversuche durchgeführt. Die Verfütterungsversuche zeigte keine Wirksamkeit, weshalb wir die Stabilität der dsRNAs im Speichel und Darm der Tiere untersucht haben. Ein Abbau der dsRNA würde erklären, warum wir nach Verfütterung der funktionalen dsRNAs keine Effekte sehen.

b. Untersuchungen zur dsRNA Stabilität in Darm und Speichel von *H. halys*

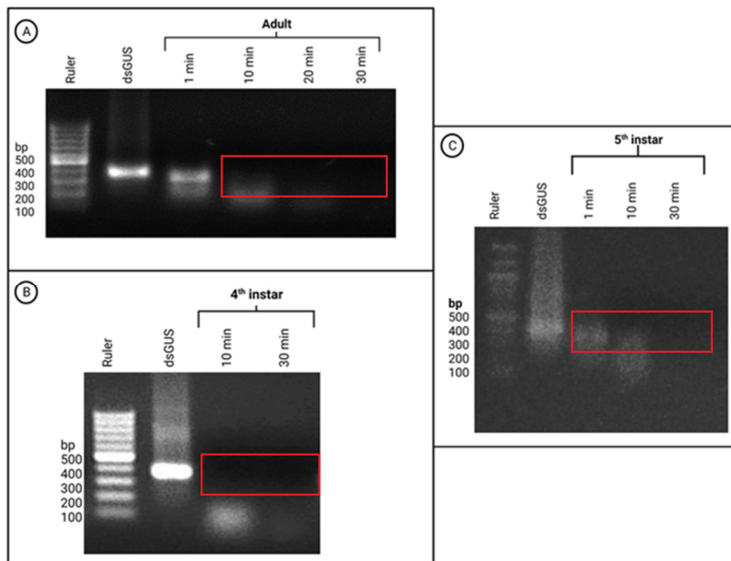
Es ist bekannt, dass verschiedene Insektenordnungen unterschiedlich responsiv auf die Aufnahme insektizid-wirkender dsRNAs reagieren. Dabei reagieren Insekten der Ordnung Coleoptera bereits auf geringe Dosen verabreichter dsRNA besonders anfällig. Beste Beispiele hierfür sind der Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) und der Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*). Deshalb ist es wenig überraschend, dass zur Kontrolle dieser Schadinsekten erste dsRNA-basierte Insektizide bereits zugelassen wurden oder sich aktuell in der Zulassung befinden. Für alle anderen Insektenordnungen (Diptera, Lepidoptera und Hemiptera) wurden sehr unterschiedliche Anfälligkeiten beobachten (eine Übersicht finden sich in Christiaens et al., 2020). Die Gründe hierfür liegen in dem zum Teil sehr aggressiven Darm- und Speichelmilieu vieler Insekten, wobei extreme pH-Werte und Ribonukleasen den vorzeitigen Abbau und damit Unwirksamkeit der dsRNAs bedingen.



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**

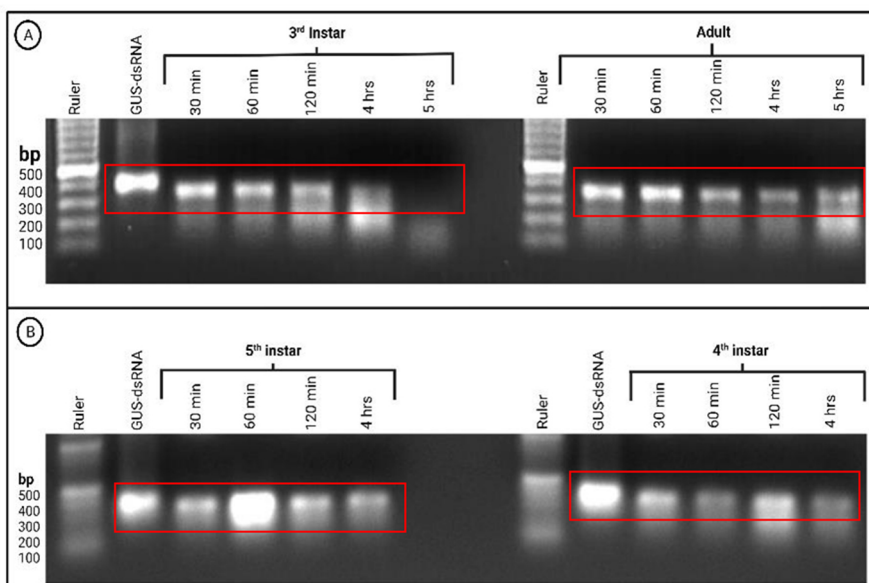


Um herauszufinden inwiefern ein vorzeitiger Abbau der dsRNA in Speichel und Darm von *H. halys* stattfindet, wurden gezielt Speichel- und Darmflüssigkeiten isoliert und die dsRNA künstlich zugesetzt. Dabei hat sich gezeigt, dass sowohl der Speichel als auch der Darm eine sehr schnelle Degradation der dsRNA hervorriefen. Vor allem der Speichel zeigte



sich als überaus aggressiv (hohe Nukleaseaktivität). Hier zeigten 2µl Speichelprobe (unverdünnt) bereits nach 10 min den vollständigen Abbau von 2µg dsRNA (Abb. links S. 10). Verglichen damit zeigte sich der Abbau der dsRNA in isolierter Mitteldarmflüssigkeit weniger schnell, jedoch nicht weniger problematisch. 3 µl unverdünnter Mitteldarmsaft zersetze die 2 µg dsRNA innerhalb von 60 Minuten vollständig, wobei bereits nach 10 Mi-

nuten ein starker Abbau einsetzte (s. Zwischenbericht). Verglichen damit ist der Abbau in der Hämolymphe weniger schnell, dort ist die dsRNA nach 4h weiter nachweisbar (Abb. unten S. 10). Eine Stabilität der dsRNA über diesen Zeitraum ist ausreichend, um einen RNAi Effekt auszulösen und das Gen Silencing der Zielgene zu induzieren (durch Injektionsversuche nachweislich).

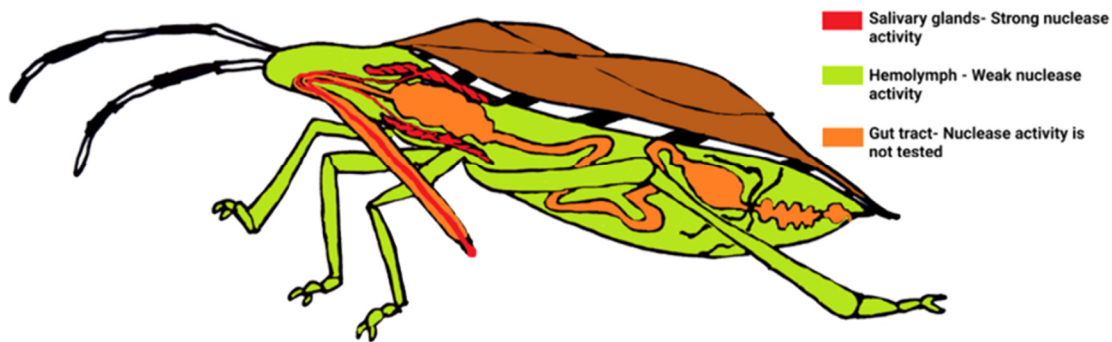




Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



Gründe für den dsRNA Abbau können Nukleasen sein. Um herauszufinden, ob eine hohe Nukleaseaktivität für den dsRNA Abbau verantwortlich ist, haben wir zunächst potenzielle Nukleasen identifiziert und deren Expression im Speichel überprüft. Tatsächlich konnten wir eine dsRNase (DNA/RNA non-specific endonuclease (HhNSE)) identifizieren, welche nach dsRNA-Injektion deutlich hochreguliert wird. Die größte Herausforderung bestand somit in der Stabilisierung der dsRNA gegen dsRNase Abbau.



Diese Ergebnisse verdeutlichen, warum unsere Verfütterungsversuche bislang wenig erfolgreich waren. Aktuell integrieren wir diese Erkenntnisse zur Entwicklung und Etablierung geeigneter Formulierungsstrategien zum Schutz der dsRNA vor Abbau im Speichel und Darm der Wanzen. Dabei wollen wir neben Nuklease-inhibitorische Formulierungen die Möglichkeit der Verkapselung in biobasierte-Mikrogelcontainer untersuchen. Letzteres soll durch Anbindung an ein durch das BMEL-geförderten Verbundprojektes¹⁰ erfolgen.

¹⁰ Themenservice: Detailansicht: Universität Hohenheim (uni-hohenheim.de)

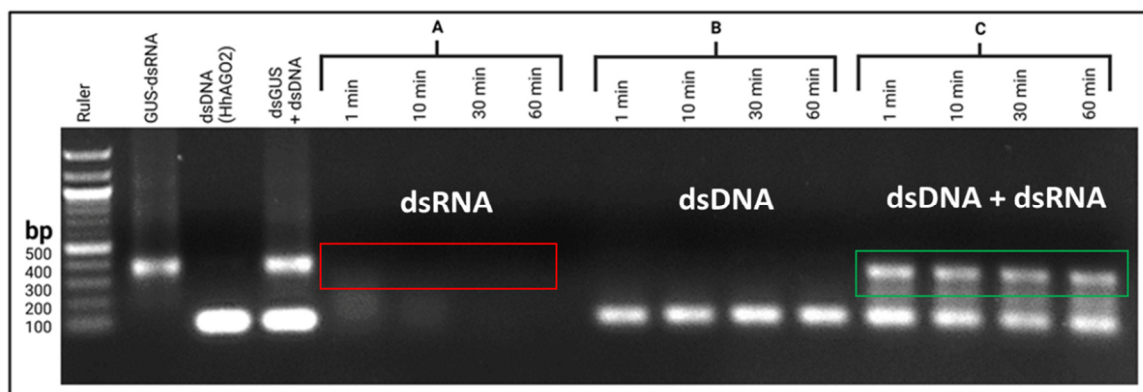


Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



c. Stabilisierung der dsRNA durch DNA-Formulierung

Eine der größten Herausforderungen in der Anwendung der RNAi Technologie zur Kontrolle von Schadinsekten ist nicht nur die Stabilisierung und das Sicherstellen der Effektivität unter Umweltbedingungen (UV, Hitze, Regen etc.), sondern auch der Schutz der dsRNA vor vorzeitigem Abbau im Schadinsekt. Aktuell werden viele Formulierungen aus der medizinischen RNAi-Anwendung übertragen, um dsRNAs zu stabilisieren und deren Aufnahme zu verbessern. Dies ist nicht unkritisch, denn die Nanopartikel-basierten Formulierungen bringen neue Risiken mit sich. Bspw. ist der Abbau der dsRNA in Nichtzielorganismen gewünscht, damit keine unbeabsichtigten Effekte auftreten. Zum anderen müssen therapeutisch eingesetzte RNAi Wirkstoffe im menschlichen Körper stabil bleiben. Dies sind gegenläufige Interessen, weshalb für die Anwendung von dsRNAs in der Landwirtschaft spezifische Formulierungsstrategien entwickelt werden müssen, welche mögliche Gefahren für Anwender, Verbraucher und Nichtzielorganismen von vornherein ausschließen. Insbesondere die Stabilisierung der dsRNA gegenüber Nukleasen ist eine Herausforderung, denn Nuklease-Inhibitoren können auch Nichtzielorganismen beeinträchtigen. Aus diesem Grund haben wir nach einer Lösung gesucht, die zum einen unschädlich ist und zum anderen kostengünstig. Hierzu nutzen wir das Prinzip der kompetitiven Hemmung, wodurch die Aktivität der unspezifischen dsRNase im Speichel von *H. halys* durch die Beigabe von DNA herabgesetzt wird. Auf diese Weise bleibt die dsRNA länger stabil (Abb. unten S. 12). Die Ergebnisse wurden vor kurzem im Rahmen der Entomologentagung am 21.02.2023 an der Freien Universität Bozen in Südtirol (Italien) präsentiert und zeitnah publiziert (Titel: *Double-stranded DNA is a potential competitor for dsRNA degrading nucleases in the watery saliva of the stink bug Halyomorpha halys*; Einreichung März 2023).





Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



5. Liste der angefertigten und in Bearbeitung befindlichen Qualifikationsarbeiten

Teilergebnisse und vor allem Erkenntnisse des geförderten Projektes werden im Rahmen zweier Promotionsarbeiten (von Herrn Venkata Amineni (gefördert durch das MLR Projekt SAFEbugBEads) und Frau Aline Pereira Rank (gefördert durch das BMEL Projekt ho[RtikulturNA])) und zweier Bachelorarbeiten ((1) Maximilian Riedel: Untersuchungen zur Mikroinjektion und Verfütterung doppelsträngiger RNA zur Kontrolle der Schadwanze *Halyomorpha halys* im Gartenbau; (2) Leo Richter: Untersuchung der RNAi-Wirksamkeit für das zweite Entwicklungsstadium von *Halyomorpha halys*) verwertet.

6. Liste der eingereichten bzw. veröffentlichten oder geplanten Publikationen

Es wurde ein Übersichtsartikel mit dem Titel „Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications – How Far Are We?“ in einer Sonderausgabe „Advances and Challenges of RNAi Based Technologies for Plants“ des Fachjournals *Frontiers in Plant Science* platzieren. Der Artikel wurde seit seinem Erscheinen im Oktober 2021 bereits 24-mal zitiert (>6700 views). Damit sind wir einer Einladung der Editoren (u.a. Antje Dietz-Pfeilstetter (JKI), Guy Smagge (Universität Ghent)) gefolgt. Dieser Artikel ist sehr entscheidend für die zukünftige Beurteilung und Zulassung RNAi-basierter Pflanzenschutztechnologien.

- Rank, A. P., and Koch, A. (2021). *Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications – How Far Are We?*. *Front. Plant Sci.* 12, 2243. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2021.755203>.

Ein weitere Übersichtsartikel wurde im Journal für Kulturpflanzen (JKI, Herausgeber Prof. Dr. Frank Ordon). Damit sind wir einer Einladung des Julius-Kühn Instituts (Dr. Torsten Meiners, Dr. Torsten Will) gefolgt. In dem Übersichtsartikel werden vor allem die aktuellen Herausforderungen beim Transfer von „RNA sprays“ vom Labor ins Feld diskutiert sowie verschiedenen Lösungsansätze aufgezeigt.

- Koch, A., and Petschenka, G. (2022). *Exogene Anwendung von RNA zur umweltfreundlichen Bekämpfung von Schadinsekten Exogenous application of RNA for the eco-friendly control of insect pests* 74, 75–84. doi:10.5073/JfK.2022.03-04.05.

Außerdem wurde ein Buchkapitel zur Entwicklung und Kommerzialisierung von RNA Biopestiziden angefertigt:

- Koch, A (2023) *Elsevier Buch: Development and Commercialization of Biopesticides: Costs and Benefits; Buchkapitel: Development of RNAi-based Biopesticides, Regulatory constraints and Commercial Prospects*

Außerdem werde ich (Aline Koch) im März 2023 einer weiteren Einladung der DLG Agro-Food Medien GmbH folgen und einen Beitrag für die Fachzeitschrift KARTOFFELBAU in der Ausgabe 4/23 publizieren:



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



- *RNA-basierte Wirkstoffe zur Kontrolle des Kartoffelkäfers - Zulassungsperspektiven*

Darüber hinaus werden Forschungsergebnisse zur DNA-Formulierung als *research article* publiziert (Einreichung März 2023):

- *Double-stranded DNA is a potential competitor for dsRNA degrading nucleases in the watery saliva of the stink bug *Halyomorpha halys**

7. Liste der (geplanten) Fachbeiträge (Vortrag, Poster u.a.) auf Fachkonferenzen

- Eingeladener Vortrag am Kompetenzzentrum für Obstbau Bavendorf (KOB) am 13.07.2022 mit dem Titel „Umweltfreundliche Regulierung von Schadinsekten mit RNA – Perspektiven für die Praxis“ (Aline Koch und Georg Petschenka)
- Eingeladener Vortrag im Rahmen der Fortbildungsveranstaltung „Integrierter Pflanzenschutz im Obstbau“ des Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg am 31.01.2023 an der Landesanstalt für Landwirtschaft, Ernährung und Ländlichen Raum in Schwäbisch Gmünd mit dem Titel „RNAi-basierte Kontrolle von Schadinsekten“ (Aline Koch)
- Vortrag im Rahmen der Entomologentagung am 21.02.2023 an der Freien Universität Bozen in Südtirol (Italien) mit dem Titel „Double stranded (ds) DNA is a potential competitor for dsRNA degrading nucleases in the saliva of *Halyomorpha halys*“ (Projektmitarbeiter Venkata partha sarathi Amineni)
- Eingeladener Vortrag im Rahmen des landwirtschaftlichen Hochschultages der Universität Hohenheim unter dem Motto: Landwirtschaft und Biodiversität - (k)ein Widerspruch am 20.10.2022 mit dem Titel „RNA-basierte Pflanzenschutztechnologien“ (Aline Koch)
- Eingeladener Vortrag der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie e.V. im Rahmen der Mitgliederversammlung der Gesellschaft für Pflanzenbiotechnologie 7.10.2022 mit dem Titel „RNAi-basierte Pflanzenschutz-Strategien“ (Aline Koch, vertreten durch Venkata partha sarathi Amineni)
- Eingeladener Vortrag an das Esteburg Obstbauzentrum nach Jork im März 2023 mit dem Titel „RNAi als wirkungsvolle Alternative zu chemischen Pflanzenschutzmitteln im Obstbau“ (Aline Koch und Georg Petschenka)
- Eingeladener Vortrag im Rahmen des SFB Symposiums RNP Dynamics am 7.7.2022 in Regensburg mit dem Titel „Uptake and transport of sprayed RNAs in plants – The great barrier leaf“ (Aline Koch)
- Vortrag im Rahmen der 25. Jahrestagung des Arbeitskreises Biologischer Pflanzenschutz (DPG) am 09./10.03.2023 am Julius Kühn-Institut in Dossenheim mit dem Titel „RNAi-basierte Kontrolle der Schadwanze *Halyomorpha halys*“ (Projektmitarbeiter Venkata partha sarathi Amineni)



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



- Eingeladener Vortrag im Rahmen der Fortbildungsveranstaltung "Nützlingseinsatz im geschützten Anbau" in Herrenberg am 08.02.2024 zum Thema RNA-basierter Pflanzenschutz (der genaue Titel steht noch nicht fest) (Aline Koch)
- Vortrag im Rahmen des XII European Congress of Entomology im Oktober 2023 in Griechenland (Kreta) zum Thema RNA-basierte Kontrolle von Schadinsekten (der genaue Titel steht noch nicht fest)

8. Liste von beantragten Folgeprojekten und geplanten Forschungskooperationen

a. Geförderte Folgeprojekte

Es wurden folgenden Projekte gefördert, die einen komplementären Nutzen zum geförderten Projekt darstellen und darüber hinaus die Verwertung der Forschungsergebnisse wechselseitig maximal begünstigen.

Ho[RtikulturNA]

Drittmittelgeber/Projektträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)

Antragstellerin (Projektinitiation und -koordination): Dr. Aline Koch, FG Phytopathologie (360a)

Projektpartner: Prof. Petschenka (360c); Prof. Pich (DMI Leibniz Institut Aachen); Prof. Conrath (RWTH Aachen)

Projektlaufzeit: 10/2021-07/2024

SAFEbugBeads

Drittmittelgeber/Projektträger: Ministerium für Ländlichen Raum und Verbraucherschutz Baden-Württemberg

Antragstellerin (Projektkoordination): Dr. Aline Koch, FG Phytopathologie (360a)

Projektpartner: Prof. Petschenka (360c); Katz Biotech AG (Dr. Peter Katz, Jörg Rademacher)

Projektlaufzeit: 01/2022-12/2023

b. Geplante Forschungskooperationen

- Kompetenzzentrum für Pflanzengesundheit der Freien Universität Bozen; Forschungskooperation mit Partnern der Freien Universität Bozen zur Weiterentwicklung und Anwendung RNAi-basierter Wirkstoffe zur Bekämpfung von Schadwanzen in Südtirol (Italien).



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



- Kompetenzzentrum für Obstbau Bavendorf (KOB); Freilandversuche in Apfelkulturen zur Überprüfung der Wirksamkeit alginatverkapselter dsRNA auf die Schadwanze *H. halys* (und weitere Schadwanzen *Lygus rugulipennis* und *Pentatoma rufipes*)

9. Liste aller Aktivitäten der Öffentlichkeitsarbeit zum Projekt

- Einladung vom Bund Ökologische Lebensmittelwirtschaft e.V. (BÖLW) zur Vorstellung Forschung: Austausch zu RNA-Technologie im Pflanzenschutz und Ökolandbau am 14.11.2022 zum Thema RNA-basierter Pflanzenschutz mit dem Ziel zentrale Fragen für den Ökolandbau bei der Bewertung von RNA-Wirkstoffen zu klären. Teilgenommen haben:
 - BÖLW und Mitglieder des BÖLW (Anbauverbände)
 - Forschende aus dem Projekt ho[RtikulturNA]
 - Vertreter*innen von BioAustria und BioSuisse
 - Vertreter*innen der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)
 - Vertreter*innen des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)
 - Vertreter*innen des Umweltbundesamtes (UBA)
- Austausch mit dem Sächsisches Landesamt für Umwelt, Landwirtschaft und Geologie (LfULG; Referate Pflanzenschutz und Obst-, Gemüse und Weinbau) zum Thema RNA Pflanzenschutztechnologie am 14.2.2022
- Darüber hinaus haben wir viele Einladungen für Vorträge vor Vertreter:innen aus der Praxis, Vertreter:innen von Landes- und Bundesministerien sowie Zulassungsbehörden (s. Punkt 7) wahrgenommen und verfolgen dies intensiv weiter
- Interviews:
 - RNA-Sprays gegen Schädlinge – der biologische Pflanzenschutz der Zukunft? [RNA-Sprays gegen Schädlinge – der biologische Pflanzenschutz der Zukunft? - Forschung - transgen.de](#)
 - Kein Gift als Pestizid, aber was dann? Dutch magazine Vrij Nederland [Geen gif als bestrijdingsmiddel, maar wat dan wel? \(vn.nl\)](#)
 - Maßgeschneiderte Wirkstoffe gegen Schädlinge [Pflanzenproduktion: Maßgeschneiderte Wirkstoffe gegen Schädlinge \(agrarzeitung.de\)](#)
 - [Joachim Budde Radiobeitrag](#) zum Thema RNAi (noch nicht veröffentlicht)
- Beratungsfunktionen:
 - Ich (Aline Koch) berate das Forum Genforschung der Schweizerischen Akademie der Naturwissenschaften zum Erstellen eines für das Schweizer Bundesamt für Umwelt und die Eidgenössische Fachkommission für biologische Sicherheit technischen Berichts zu RNA-Technologien



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



- Vor dem Hintergrund der Risikobewertung und Zulassung bin ich (Aline Koch) in beratender Funktion an der JKI Initiative „RNAi_safe“ Sicherheit der RNAi Technologie im Pflanzenschutz: Evaluierung von Methoden zum Nachweis von Effektivität und potentiellen Effekten auf Ziel- und Nicht-Zielorganismen, beteiligt (Projektzeitraum: 01.10.2021 – 30.09.2024). Dies ist unmittelbar relevant für die langfristige Beurteilung und die damit verbundenen Chancen (Marktpotenzial) von RNA Biopestiziden in der Zukunft. Vor allem ist die Kommunikation (Austausch, Aufklärung, Beratung) mit Zulassungsbehörden entscheidend, denn nur wenn es uns gelingt, die Notwendigkeit der Differenzierung bei der Zulassung von RNA Wirkstoffen zu verdeutlichen, wird die Entwicklung von RNA Biopestiziden für KMUs rentabel.
- Zusätzlich zur Kommunikation der Forschungsergebnisse innerhalb oder mit der *scientific community* erstellen wir im Kontext Öffentlichkeitsarbeit ein Aufklärungs-/Imagevideo, welches die breite Öffentlichkeit, potenzielle, zukünftige Anwender und Verbraucher sowie Zulassungsbehörden gleichermaßen adressieren wird. Das Video wird konzeptionell die Hintergründe (warum brauchen wir Alternativen im Pflanzenschutz), die Wirkprinzipien/-mechanismen (wie funktionieren RNA Biopestizide) und die entscheidenden Vorteile von RNA Biopestiziden (warum ist diese Technologie besonders vielversprechend) hervorheben, insbesondere im Vergleich zu bestehenden Maßnahmen (chemisch-synthetische Pestizide). Vor allem letzteres wird entscheidend sein, um zukünftige Zulassungsverfahren für RNA Wirkstoffe gegenüber der Zulassung konventionell-chemischer Pflanzenschutzmittel abzugrenzen.

10. Erklärung zur Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Hiermit versichern wir, den Ausgaben- und Zeitplan eingehalten zu haben.

Prof. Dr. Aline Koch

Prof. Dr. Georg Petschenka



Qualitätssicherung. **Vom Erzeuger bis zur Ladentheke.**



Referenzen

- Christiaens, O., Whyard, S., Vélez, A. M., and Smagghe, G. (2020). Double-Stranded RNA Technology to Control Insect Pests: Current Status and Challenges. *Front. Plant Sci.* 11, 1–10. doi:10.3389/fpls.2020.00451.
- Good, R. T., Varghese, T., Golz, J. F., Russell, D. A., Papanicolaou, A., Edwards, O., et al. (2016). OfftargetFinder: a web tool for species-specific RNAi design. *Bioinformatics* 32, 1232–1234. doi:10.1093/bioinformatics/btv747.
- Head, G. P., Carroll, M. W., Evans, S. P., Rule, D. M., Willse, A. R., Clark, T. L., et al. (2017). Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. *Pest Manag. Sci.* 73, 1883–1899. doi:10.1002/ps.4554.
- Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatef, E., et al. (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 Pathog.* 12, 1–22. doi:10.1371/journal.ppat.1005901.
- Pallis, S., Alyokhin, A., Manley, B., Rodrigues, T. B., Buzza, A., Barnes, E., et al. (2022). Toxicity of a novel dsRNA-based insecticide to the Colorado potato beetle in laboratory and field trials. *Pest Manag. Sci.* n/a. doi:https://doi.org/10.1002/ps.6835.
- Rank, A. P., and Koch, A. (2021). Lab-to-Field Transition of RNA Spray Applications – How Far Are We?. *Front. Plant Sci.* 12, 2243. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2021.755203>
- Rodrigues, T. B., Mishra, S. K., Sridharan, K., Barnes, E. R., Alyokhin, A., Tuttle, R., et al. (2021). First Sprayable Double-Stranded RNA-Based Biopesticide Product Targets Proteasome Subunit Beta Type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Front. Plant Sci.* 12. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2021.728652>.
- Wagner, D. L., Grames, E. M., Forister, M. L., Berenbaum, M. R., and Stopak, D. (2021). Insect decline in the Anthropocene: Death by a thousand cuts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 118, e2023989118. doi:10.1073/pnas.2023989118.
- Werner, B. T., Gaffar, F. Y., Schuemann, J., Biedenkopf, D., and Koch, A. M. (2020). RNA-Spray-Mediated Silencing of *Fusarium graminearum* AGO and DCL Genes Improve Barley Disease Resistance. *Front. Plant Sci.* 11, 476. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.00476>.