

Beiträge von Forstpflanzenzüchtung und Forstgenetik für den Wald von Morgen

7. Tagung der Sektion Forstgenetik/Forstpflanzen-
züchtung vom 12. bis 14. September 2022 in Ahrensburg

Tagungsband

Mirko Liesebach (ed.)

Thünen Report 105

Bibliografische Information:
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikationen in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet unter www.dnb.de abrufbar.

Bibliographic information:
The Deutsche Nationalbibliothek (German National Library) lists this publication in the German National Bibliography; detailed bibliographic data is available on the Internet at www.dnb.de

Bereits in dieser Reihe erschienene Bände finden Sie im Internet unter www.thuenen.de

Volumes already published in this series are available on the Internet at www.thuenen.de

Zitationsvorschlag – Suggested source citation:

Liesebach M (ed.) (2023) Beiträge von Forstpflanzenzüchtung und Forstgenetik für den Wald von Morgen : 7. Tagung der Sektion Forstgenetik/Forstpflanzenzüchtung vom 12. bis 14. September 2022 in Ahrensburg : Tagungsband. Braunschweig: Johann Heinrich von Thünen-Institut, 318 p, Thünen Rep 105, DOI:10.3220/REP1681451577000

Die Verantwortung für die Inhalte liegt bei den jeweiligen Verfassern bzw. Verfasserinnen.

The respective authors are responsible for the content of their publications.



THÜNEN

Thünen Report 105

Herausgeber/Redaktionsanschrift – Editor/address

Johann Heinrich von Thünen-Institut
Bundesallee 50
38116 Braunschweig
Germany

thuenen-report@thuenen.de
www.thuenen.de

ISSN 2196-2324

ISBN 978-3-86576-265-8

DOI:10.3220/REP1681451577000

urn:nbn:de:gbv:253-202304-dn066221-6

Beiträge von Forstpflanzenzüchtung und Forstgenetik für den Wald von Morgen

**7. Tagung der Sektion Forstgenetik/Forstpflanzen-
züchtung vom 12. bis 14. September 2022 in Ahrensburg**

Tagungsband

Mirko Liesebach (ed.)

Thünen Report 105

Mirko Liesebach (ed.)
Thünen-Institut für Forstgenetik
Sieker Landstr. 2
22927 Großhansdorf
Tel.: +49 4102 696156
E-Mail: mirko.liesebach@thuenen.de

Thünen Report 105

Braunschweig/Germany, April 2023

Mit RNA-Interferenz (RNAi) gegen Krankheitserreger und Schadinsekten?

MATTHIAS FLADUNG, KIRAN SINGEWAR

Zusammenfassung

Im Zuge des fortschreitenden Klimawandels und der damit verbundenen Ausbreitung von Schädlingen wie Insekten und Pilze sind neue, unkonventionelle Strategien erforderlich, um Waldschädlinge zu bekämpfen. Eine Möglichkeit, Waldbäume schnell und effektiv gegen Insekten und Krankheitserreger zu schützen, ist die Anwendung der sogenannten RNA-Interferenz (RNAi). Die RNAi basiert auf der Ausbringung einer doppelsträngigen RNA (dsRNA), die sequenzhomolog zu einem lebenswichtigen Gen des Schädlings ist und dieses in der Ausprägung hemmt, was in Konsequenz zum Absterben des Schädlings führt. Wir haben die RNAi beim Schwammspinner *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), einem wichtigen Waldschädling, getestet. Hierzu haben wir dsRNAs für sieben Kandidatengene entwickelt und auf zwei verschiedene Arten (ektopisch und Fütterung) ausgebracht. Die ektopische Anwendung von drei dsRNAs zeigte keine Mortalität, führte aber zu einer verzögerten Entwicklung der Larven. Die dsRNA-Fütterung über künstliche Nahrung zeigte keinen Einfluss auf die Entwicklung der Larven. Die Gründe hierfür liegen vermutlich in einem sehr schnellen dsRNA-Abbau durch endogene Nucleasen, was die Verwendung einer anderen Formulierung der dsRNA (z.B. Nanopartikel, Lipidverkapselung) nahelegt. Auch müssen noch weitere Kandidatengene in Hinblick auf ihre Wirkung getestet werden. Zusammengefasst hat die Anwendung der RNAi ein großes Potenzial in der Schädlingsbekämpfung. Zukünftige Forschungsschwerpunkte sollten auf weitere, für dsRNA geeignete Gene und/oder auf die Optimierung der Methode der dsRNA-Ausbringung gelegt werden.

Abstract

With RNA interference (RNAi) against pathogens and insect pests?

Climate change is altering the seasonal interplay between long-lived trees and pests. Changing temperatures and prolonged droughts can allow pests such as insects and fungi to colonize new habitats, leading to outbreaks of disease in previously unaffected forests. Conventional forest management strategies face huge challenges, as they are often unable to control severe outbreaks, which occur over a short period. Therefore, new unconventional strategies are required to control forest pests. One way to quickly and effectively protect forest trees against insects and pathogens is to use so-called RNA interference (RNAi). RNAi is based on the release of a double-stranded RNA (dsRNA) that is sequence-homologous to a vital gene of the pest and inhibits its expression, consequently leading to the pest's death. We tested RNAi in the gypsy moth *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), an important forest pest. To do this, we developed dsRNAs for seven candidate genes and delivered them in two different ways (ectopic and feeding). Ectopic application of the dsRNAs resulted in no mortality but delayed larval development. The dsRNA feeding via the artificial diet showed no influence on the development of the larvae. The reasons for this probably lie in a very rapid dsRNA degradation by endogenous nucleases, which suggests the use of a different dsRNA formulation (e.g., nanoparticles, lipid encapsulation). In summary, the application of RNAi has great potential in pest control. Future research should focus on new genes selected for dsRNA and/or on optimizing the method of dsRNA delivery.

1 Einleitung

Der Klimawandel ändert das saisonale Zusammenspiel zwischen langlebigen Bäumen und Schädlingen. Veränderte Temperaturen und ausgedehnte Trockenperioden können dazu führen, dass Schädlinge wie Insekten und Pilze neue Lebensräume besiedeln, was Krankheitsausbrüche in Wäldern zur Folge hat, die bis dato davon

verschont geblieben sind. Herkömmliche Waldmanagement-Strategien stehen vor riesigen Herausforderungen, da sie häufig schwere Ausbrüche, die darüber hinaus auch noch in kurzer Zeit erfolgen, nicht zu kontrollieren in der Lage sind.

Traditionelle Maßnahmen zur Bekämpfung von Schädlingsinvasionen und -ausbrüchen umfassen beispielsweise das Entfernen des infizierten Laubs, das Entnehmen von geschädigten Bäumen oder Abschneiden geschädigter Baumteile (SEIDL et al. 2016), die Zersiedelung von Waldbeständen (ROBERTS et al. 2020), und das Einbringen von Pheromonfallen und vergiftetem Holz (WERMELINGER 2004). Bei wiederkehrenden Ausbrüchen allerdings wurden die angewendeten Managementtechniken hinterfragt (HLÁSNY et al. 2017).

Auch wurden chemische Fungizide und Pestizide eingesetzt, um den Erregerausbruch einzudämmen (OKORSKI et al. 2015). Jedoch sind diese chemischen Maßnahmen nicht erfolgreich, um Krankheiten oder Insektenbefall über längere Zeiträume zu bekämpfen (LIEBHOLD et al. 2019). Stattdessen schaden viele dieser Substanzen der menschlichen Gesundheit, schädigen auch Nichtziel-Organismen (Nützlinge) und können eine Resistenzentwicklung begünstigen (BILLINGS 2011). Diese Strategien, die von der Öffentlichkeit auch abgelehnt werden, werfen somit Fragen einer sinnhaften Anwendung auf (JACTEL et al. 2019). Daher wird der Entwicklung und Anwendung alternativer und effizienterer Bekämpfungsmethoden gegen Schädlinge und Krankheitserreger von Forstbäumen eine sehr hohe Priorität eingeräumt.

Seit einigen Jahren wird die RNA-Interferenz (RNAi) als ökonomisch und ökologisch sinnvolle Möglichkeit eingeschätzt, Waldbäume schnell und effektiv gegen Insekten und Krankheitserreger zu schützen (BAUM et al. 2007). Die RNAi ist ein konservierter, posttranskriptioneller Regulationsmechanismus von Genen, der in fast allen eukaryotischen Organismen vorkommt (SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA et al. 2003). RNAi wird durch Anwesenheit von doppelsträngiger RNA (dsRNA) ausgelöst (FIRE et al. 1998) und wird entweder innerhalb von Zellen gebildet oder ist außerhalb vorhanden und wird in die Zellen transportiert (dsRNA-Impfung). Ist die dsRNA sequenzhomolog zu einem lebenswichtigen Gen des Schädlings, wird dieses in der Ausprägung gehemmt und kein entsprechendes Protein gebildet, was in Konsequenz zum Absterben des Schädlings führt. In verschiedenen Publikationen wird bereits auf die erfolgreiche Anwendung der dsRNA-Impfung zur Schädlingsbekämpfung hingewiesen (RODRIGUES et al. 2018; KYRE et al. 2019; DHANDAPANI et al. 2020a).

Der Mais „SmartStax[®] Pro“ (Mon87411) ist das erste RNAi-basierte Produkt, das von der Firma Bayer entwickelt wurde und 2017 in den USA und 2021 in China zugelassen wurde (DE SCHUTTER et al. 2022). Die dsRNA, die in dem Mais auf das *VACUOLAR SORTING PROTEIN (SNF7)*-Gen des Westlichen Maiswurzelbohrers (*Diabrotica virgifera virgifera*) abzielt, ist mit dem *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry3Bt1-Toxin sowie einer Glyphosfatresistenz gekoppelt (BOLOGNESI et al. 2012). Da es sich allerdings bei dem „SmartStax[®] Pro“-Mais um einen gentechnisch veränderten Mais handelt, ist das Interesse an dem Mais relativ gering. Dem gegenüber hinaus befindet sich das erste „alleinige“ dsRNA-Produkt, Ledprona[®] (RODRIGUES et al. 2021), das durch Spray aufgetragen wird, derzeit in den USA bei der Umweltschutzbehörde (EPA) im Registrierungsprozess. Ledprona[®] zielt auf die Proteasom-Untereinheit Beta-Typ-5 ab, was beim Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) zu einer Sterblichkeit von 90% führt.

Im Vergleich zur Schädlingsbekämpfung bei Nutzpflanzen mittels RNAi und dsRNA findet in der Literatur die Anwendung dieser Methodik bei Bäumen nur sehr wenig Beachtung. In unserer Arbeit haben wir uns daher mit dem Schwammspinner *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), der über 300 Baumarten schädigt (JOHNSON et al. 2002), beschäftigt. Wir haben dsRNAs für sieben Kandidatengene entwickelt auf zwei verschiedene Weisen (ektopisch und Fütterung) auf ihre Wirkung getestet. Die Ergebnisse weisen auf das große Potenzial von dsRNA hin, werfen aber auch einige unbeantwortete Fragen auf, die in der Diskussion aufgegriffen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Schwammspinnerlarven

Eier des Schwammspinners wurden freundlicherweise von Dr. SYBILLE UNSICKER, Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena, Deutschland, zur Verfügung gestellt. Die Eier der Insekten stammen aus Laborkulturen, die von HANNAH NADEL beim Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) des US-Landwirtschaftsministeriums (USDA) entwickelt und gepflegt wurden.

Die Larven wurden nach dem Schlüpfen bei Raumtemperatur gehalten und wurden mit einer künstlichen Weizenkeimdiät ernährt. Um die Empfindlichkeit verschiedener Stadien von Schwammspinnerlarven gegenüber dsRNA zu beobachten, wurden Larven im ersten und dritten Stadium in den verschiedenen Experimenten verwendet.

2.2 DsRNA- und PCR-Primer-Entwicklung, und PCR-Amplifikation

Basierend auf bereits publizierten Arbeiten wurden sechs Kandidatengene für die dsRNA-Synthese ausgewählt. Über NCBI-BLAST wurden Schwammspinner-homologe Gene identifiziert (Tabelle 1) und als Grundlage für die dsRNA-Entwicklung verwendet.

Tabelle 1: Primer, die in dieser Studie für PCR, dsRNA-Synthese und qPCR verwendet wurden (für die PCR- und qPCR-Amplifikation wurden die gleichen Primer verwendet). Gennamen, Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärts-Primer sowie die Größe des PCR-Produkts und die T_M -Temperaturen der PCR sind angegeben. *Die T7-Promotorsequenz, die für die dsRNA-Synthese durch MEGAScript® benötigt werden, wurde an die Primer angehängt (5'-GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA-3').

Gen	Vorwärtsprimer 5' - 3'	Rückwärtsprimer 5' – 3'	Größe	Tm
<i>Chitin synthase gene A (CHSA)*</i>	GTCAAATGGCCTGGATCTGGT	TTCGTGCCACATAGTAGCGCA	341	60
<i>Laccase2 (Lac2)*</i>	CTCATCCGTTCCACTTGACAC	GGAGATGGTCGCCGCATGTT	352	59
<i>Protein mesh (MESH)*</i>	TACTTCAGCGATCCACCAGAC	CAGAAGCTGGTGGTGATACC	452	60
<i>Proteasome $\alpha 2$ subunit (Prosa)*</i>	GGTATGGTCTACTCGGAATG	AGT TCT TGC CCA TGG CAG TC	283	59
<i>Proteasome subunit beta 5 (PSBT5)*</i>	GCTGGTGGAGCAGCTGATTG	TGGAGATGTTACCCAACCCTT	426	61
<i>Ribosomal protein S13e (Rsp13)*</i>	CTCAGGGATTCCCATGGAGT	TAAGCCACCAGAGCAGAAGCA	303	59
<i>Shrub ortholog (Snf7)*</i>	CCTGTTCGAGTTCCTCCAATTC	GATGTCGACAAAGTACACGACA	152	59

2.3 RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und Sanger-Sequenzierung

Für jedes dsRNA-Experiment wurde RNA von drei Schwammspinner-Individuen verwendet. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert und mit einem TURBO DNA-freien Kit von Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland) behandelt, um jegliche kontaminierende genomische DNA zu entfernen. Unter Verwendung eines Spektrophotometers wurde eine 1%-ige Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, um die RNA-Integrität und -Konzentration zu überprüfen. Unter Verwendung von GoScript RT Mix, Oligo(dT) (Promega, Walldorf, Deutschland) wurde Gesamt-RNA unter Verwendung von Reverser Transkriptase revers in cDNA transkribiert. Synthetisierte cDNA und entworfene Primer wurden für die Amplifikation des dsRNA-Kandidatengens verwendet. Das PCR-Produkt wurde zur Sanger-Sequenzierung (StarSeq, Mainz, Deutschland) geschickt, um die Länge und Homologie zu der in der NCBI-Genbankdatenbank vorhandenen Sequenz zu bestätigen.

2.4 Doppelsträngige RNA-Synthese und statistische Analyse

Primer, die mit einer T7-Promotorsequenz (5'-GAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA-3') verknüpft sind, wurden für die dsRNA-Synthese der ausgewählten Kandidatengene verwendet (Tabelle 1). Die Reinigung der PCR-Produkte wurde unter Verwendung eines PCR-Reinigungskits (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Das MEGAscript RNAi-Kit (Invitrogen von Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen) wurde verwendet, um die *in vitro*-Transkription von dsRNA gemäß dem bereitgestellten Protokoll durchzuführen. Eine ANOVA mit Messwiederholungstests unter Verwendung von Dunnett (Vergleich aller Säulen mit der Kontrolle) wurde für eine statistisch signifikante Analyse durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl von Kandidatengenen für die dsRNA-Synthese

Sieben zuvor in der Literatur beschriebene Gene wurden für diese Studie in Betracht gezogen (Tabelle 2). Die Chitinsynthase A (*CHSA*) wurde gegen *Spodoptera exigua*, *Laccase 2* (*Lacc2*) für *Cylas brunneus* und *Protein Mesh* (*MESA*) für *Leptinotarsa decemlineata* getestet. Diese Gene sind wichtig für den strukturellen zellulären Gerüstaufbau (TIAN et al. 2009; CHRISTIAENS et al. 2016; PETEK et al. 2020). Darüber hinaus sind die Proteasom-Untereinheiten Beta und Alpha (*PSBT5* und *Prosa*) an der Zellzyklusprogression beteiligt, und die Apoptose wurde gegen *C. brunneus* bzw. *L. decemlineata* getestet (CHRISTIAENS et al. 2016; RODRIGUES et al. 2021). Das ribosomale Protein (*Rsp13*) und das endosomale Sortierprotein (*Snf7*) (Christiaens et al. 2016) zeigten einen signifikanten Effekt gegen *C. brunneus*. Die Herunterregulierung dieser Gene durch Injektion von dsRNA führte entweder zur Sterblichkeit oder zu einer verminderten Entwicklung des jeweiligen Insekts. Homologien aller Gene zu Genen des Schwammspinners wurden mit der NCBI-Gendatenbankbank abgeglichen und spezifische PCR-Primer entwickelt.

Tabelle 2: Detaillierte Beschreibung der verwendeten Kandidatengene. Aufgeführt sind die Abkürzungen der ausgewählten Gene zusammen mit ihrem vollständigen Namen und ihrer biologischen Funktion, gefolgt von der Referenz.

Gen	Vollständiger Name	Biologische Funktion	Referenz
<i>CHSA</i>	<i>Chitin synthase A</i>	Scaffold material, supporting the cuticles	TIAN et al. (2009)
<i>Lacc2</i>	<i>Laccase 2</i>	Adult cuticle tanning	CHRISTIAENS et al. (2016)
<i>MESH</i>	<i>Protein Mesh</i>	Important for the structural integrity of the midgut epithelium	PETEK et al. (2020)
<i>Prosa2</i>	<i>Proteasome α2 subunit</i>	Protein regulation in cell-cycle progression and apoptosis	CHRISTIAENS et al. (2016)
<i>PSBT5</i>	<i>Proteasome subunit beta 5</i>	Protein regulation in cell-cycle progression and apoptosis	RODRIGUES et al. (2021)
<i>Rsp13</i>	<i>Ribosomal protein S13e</i>	Protein synthesis in ribosomal subunit	CHRISTIAENS et al. (2016)
<i>Snf7</i>	<i>Shrub ortholog</i>	A part of the Endosomal Sorting Complex Required for the Transport	CHRISTIAENS et al. (2016)

3.2 Versuchsaufbau

Direkt nach dem Schlüpfen der Larven aus den Eiern nehmen Schwammspinner Nahrung auf und durchlaufen 6-7 Larvenstadien (Abb. 1). Es wurden zwei verschiedene dsRNA- Applikationen auf die Larven im 3. Larvenstadium getestet, (i) die ektopische Ausbringung der dsRNA und (ii) dsRNA durch Beigabe zum künstlichen Futter.



Abb. 1: Verschiedene Entwicklungsstadien der Larven des Schwammspinners in der Laborzucht (Größenvergleich mit einer Euro-Münze).

3.3 Qualitätskontrolle der synthetisierten dsRNA

Die synthetisierten cDNAs aller sieben Gene wurden Sanger-sequenziert, um die artspezifische Nukleotidsequenz der Fragmente zu bestätigen (Daten nicht gezeigt). Die Größen der synthetisierten dsRNAs wurde auf Agarosegelen geschätzt (Abb. 2). Die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und des Agarosegels dienten zur Validierung der dsRNAs, die für die verschiedenen Experimente verwendet wurden.

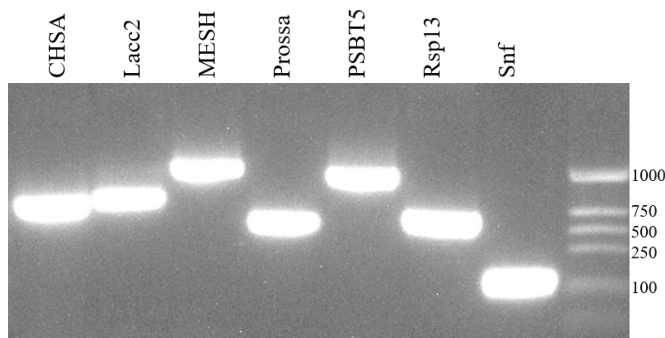


Abb. 2: Das Agarosegel zeigt die Fragmentgröße sowie die Qualität der synthetisierten dsRNAs. Zur Abschätzung der Größen der dsRNAs wurden Kontrollfragmente mit einem Bereich von 0,1 bis 1 kb aufgetragen (rechten Seite).

3.4 dsRNA-Fütterung mit der Nahrung

Die Wirkung der mit der Nahrung aufgenommenen dsRNAs wurde an Larven im 3. Stadium phänotypisch evaluiert. Für die vergleichende Analyse wurden die behandelten Larven mit einer Kontrolllarven verglichen, die keine dsRNA mit der Nahrung aufnahmen. Insgesamt wurden fünf verschiedene dsRNAs in zwei Kombinationen getestet: (A) PSBT5 und Lacc2, (B) Snf7, CHSA und Prossa 2. Für jedes Experiment wurden pro Kombination zehn Larven verwendet und Futter mit und ohne dsRNA vermischt bereitgestellt. In jeder Kombination wurden auf 300 ng/ μ l dsRNA in 100 μ l verdünnt, gemischt mit 25 mg Futter, das jeder Larve zugeführt wurde. Es wurde täglich kontrolliert, ob die Larven das Futter auch vollständig aufgenommen haben. Das Gewicht aller Larven wurde nach 1, 4, 8, 12, 16 und 18 Tagen bestimmt. Bei keiner Kombination wurden Gewichtsveränderungen bei den behandelten im Vergleich zu unbehandelten Larven festgestellt (Abb. 3).

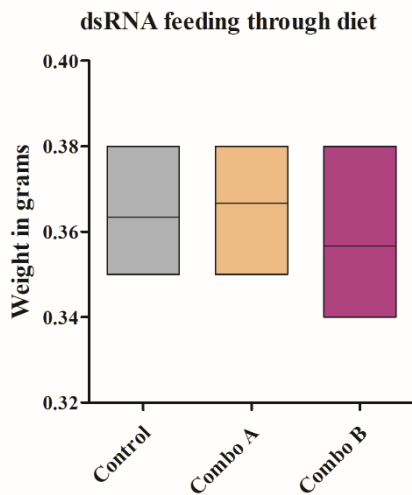


Abb. 3: Die synthetisierten dsRNAs wurden den Larven im 3. Stadium mit künstlicher Nahrung in zwei Kombinationen zugeführt. Kombination A: PSBT5- und Lacc2-dsRNA, Kombination B: Snf7, CHSA und Prossa 2. Die Abbildung zeigt das Gewicht der Larven in Gramm in Abhängigkeit zur Kombination (mittlere Abweichung von drei experimentellen Wiederholungen). Bei behandelten Larven wurden im Vergleich zur Kontrolle keine Gewichtsveränderungen festgestellt.

3.5 Ektopische Anwendung von dsRNA

Drei dsRNA-Kandidaten, CHSA, Rsp13 und PSBT5 jeweils separat sowie CHSA + Rsp13 kombiniert, wurden in wässriger Lösung mittels einer Pipette auf den Körper von Larven im 3. Stadium aufgetragen. Für jedes Experiment wurden zehn Larven pro Kombination verwendet. Das Experiment wurde 12 Tage lang durchgeführt, wobei jeder Larve täglich 1.400 ng/ μ l dsRNA mit 0,1 ng/ μ l TWEEN 20 verabreicht wurde. TWEEN 20 dient als

Topical application of dsRNA on 3rd instar larvae

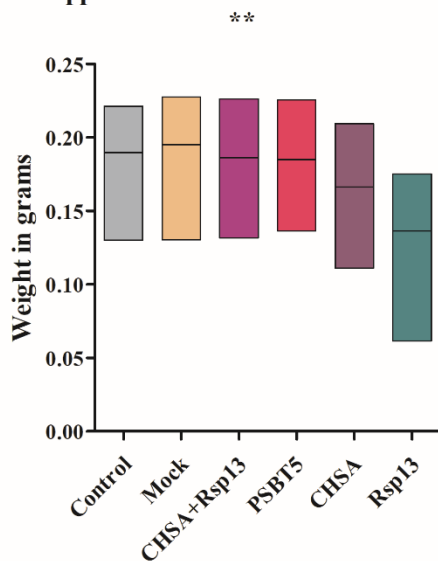


Abb. 4: Die synthetisierten dsRNAs wurden den Larven im 3. Stadium in wässriger Lösung mit TWEEN 20 ektopisch einzeln (CHSA, Rsp13 und PSBT5) und in Kombination (CHSA + Rsp13) verabreicht. Die Abbildung zeigt das Gewicht der Larven in Gramm in Abhängigkeit zur Behandlung (mittlere Abweichung von drei experimentellen Wiederholungen). Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle (unbehandelte und nur mit Wasser (Mock) behandelte Larven) wurde nur bei Larven festgestellt, die mit dsRNA-Rsp13 beträufelt wurden.

Detergens und hilft dabei, dass die dsRNA-Tropfen auf dem Larvenkörper zerlaufen. Das Gewicht aller Larven wurde nach 1, 4, 8 und 12 Tagen bestimmt. Als Ergebnis wurden Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen verwendet (Abb. 4). Wir konnten eine unterschiedliche Entwicklung der einzelnen Larven beobachten: während die mit CHSA- + Rsp13-, PSBT5- und CHSA-dsRNA behandelten Larven gleiche Gewichte wie die unbehandelten und nur mit Wasser (Mock) behandelten Larven aufwiesen, zeigten Rsp13-dsRNA behandelte Larven geringere Körpergewichte sowie eine verzögerte Entwicklung, was zu einer späteren Häutung führte.

4 Diskussion

Die RNA-Interferenz (RNAi) stellt eine der zellulären, posttranskriptionellen Genstilllegungsmechanismen dar, indem sie verhindert, dass mRNA in ein entsprechendes Protein umgewandelt wird (FIRE et al. 1998). Die RNAi-Technologie basiert auf der Anwesenheit von doppelsträngiger RNA (dsRNA), die entweder innerhalb von Zellen gebildet wird oder außerhalb von Zellen vorhanden ist und in diese transportiert wird. Ist die dsRNA sequenzhomolog zu einem lebenswichtigen Gen des Schädlings, werden über einen komplizierten Mechanismus 21-24 bp-lange einzelsträngige RNAs gebildet (siRNAs), die komplementär zur mRNA des lebenswichtigen Gens sind (DAS et al. 2020). An die siRNA binden verschiedene Proteine und Enzyme und bilden einen sogenannten *Silencing-Komplex* (RISC), der an die mRNA bindet und deren Abbau initiiert, was in Konsequenz zum Absterben des Schädlings führt (dsRNA-Impfung). Das Ausbringen der dsRNA ist daher als Methode, die nicht unter die gesetzlichen Gentechnik-Regelungen fällt, eine interessante, agroökosystemfreundliche Alternative zu herkömmlichen Methoden der Schädlingsbekämpfung (WANG et al. 2017).

In Kulturpflanzen wurden bereits mehrere Verfahren zur Anwendung der dsRNA-Technologie für die Bekämpfung wichtiger Pflanzenschädlinge (Insekten, Pilze) getestet. Hierbei stehen Fragen einer optimalen Ausbringung der dsRNA im Fokus, wie beispielsweise über Sprühen, Fütterung, Infiltration oder Injektion (DAS et al. 2020). Die dsRNA kann aber auch in Wasser gelöst über die Wurzel aufgenommen oder mittels Bakterien, Pilze oder Viren übertragen werden. Für Gehölze allerdings gibt es nur sehr wenige Berichte über die exogene Ausbringung der dsRNA (FLADUNG et al. 2021).

In unseren Arbeiten haben wir dsRNA von bis zu sieben verschiedenen Genen einzeln oder in Kombination in Fütterungsversuchen über die Nahrung sowie in Wasser gelöst per Aufträufeln ektopisch auf Schwammspinnerlarven im 3. Stadium des (*Lymantria dispar*) appliziert. Wir konnten keine negativen Auswirkungen jeglicher dsRNA beobachten, wenn wir die dsRNAs über die Nahrung den Larven verabreicht haben (Abb. 3). Die Larven wiesen vergleichbare Gewichte sowie eine ähnliche Entwicklung wie unbehandelte Larven auf. Unsere Ergebnisse decken sich mit Erkenntnissen anderer Autoren, dass im Speichel von Schmetterlingslarven Nukleasen dafür verantwortlich sein können, dass dsRNAs schnell abgebaut werden (CHEN et al. 2021; NISHIDE et al. 2020).

Allerdings zeigen andere Studien, dass dsRNAs im Fütterungsstudien durchaus eine schädigende Wirkung auf Insekten haben (GOSH et al. 2017). Bemerkenswert ist die Studie von GOSH et al. (2017) am Schwammspinner, in der auf Basis von Transkriptom-Sequenzierdaten nicht weiter charakterisierte Gene für das dsRNA-Design ausgewählt wurden, die, in Fütterungsversuchen angewendet, zu einer Verringerung des Körpergewichts der Larven führten. Mögliche weitere Gründe für die widersprüchlichen Ergebnisse könnten in Unterschieden in der Fütterungsstrategie, der Formulierung der angebotenen dsRNA sowie der verwendeten dsRNA-Menge liegen (SINGEWAR und FLADUNG, unveröff.).

Die ektopische Applikation der dsRNA über einen Wassertropfen hat zunächst die Schwierigkeit ergeben, dass der Tropfen an den Härchen der Larven hängenblieb und nicht auf die Haut gelangte. Erst als wir TWEEN 20 dem Wasser beigemischt haben, verlief der Tropfen nach Ausbringung und benetzte auch die Haut der Larven. Mit Ausnahme der Rsp13-dsRNA zeigten alle von uns getesteten dsRNAs keinen Effekt auf die

Schwammspinnerlarven (Abb. 4). Rsp13-dsRNA behandelte Larven wiesen signifikant geringere Körpergewichte sowie eine verzögerte Entwicklung auf, was zu einer späteren Häutung führte (SINGEWAR und FLADUNG, unveröff.).

Nach Kenntnis der Autoren ist dies die erste Studie, in der die ektopische Anwendung von dsRNA bei Schwammspinnern versucht wurde. Weitere Studien müssen durchgeführt werden, in denen sowohl unterschiedliche dsRNA-Konzentrationen als auch dsRNAs auf Basis anderer Gene getestet werden.

5 Schlussfolgerungen

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürliches System, mit dem Zellen die Aktivität von Genen regulieren. RNAi ist ein Mechanismus der posttranskriptionellen Geninaktivierung in Eukaryoten und dient Pflanzen vor allem als natürlicher Abwehrmechanismus gegen Viren und Transposons. RNAi ist nicht nur gegen Viren einsetzbar, sondern auch gegen Pilze und Insekten denkbar. Verfügt eine Pflanze über ein bestimmtes dsRNA-Fragment, das genau zu der mRNA eines Schädlings passt, wird die mRNA des Schädlings „neutralisiert“. Auf dsRNA-basierende Pestizide stellen daher für die Schädlingsbekämpfung eine interessante Alternative zu chemischen Pestiziden dar. Sie wirken äußerst spezifisch, schädigen bevorzugt Ziel-Schädlinge und verschonen Nicht-Ziel-Organismen, und reichern sich anders als chemische Pflanzenschutzmittel nicht in der Natur und Umwelt an. Es finden keine Resistenzbildungen statt, nur wenn sich in Schädlingen die Sequenz der Zielgene durch spontane Mutationen verändert, könnten dsRNA-Pestizide nicht mehr wirken. DsRNA-Pestizide unterliegen nicht der Gentechnikgesetzgebung, allerdings sind dennoch Fragen zur biologischen Sicherheit zu klären, da die dsRNA auch auf im Boden lebende, potentiell noch unbekannte Organismen trifft. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur dsRNA-Anwendung gegen den Schwammspinner stellen einen ersten, vielversprechenden Schritt zur Entwicklung einer völlig neuen Methodik der Schädlingsbekämpfung dar. Aber noch sind offene praktische Fragen wie Art der Zielgene, Formulierung der dsRNA zum Schutz gegen endogene Nukleasen und die effizienteste Methode der dsRNA-Ausbringung zu beantworten.

Danksagung

Wir danken MARIKA PUSCH, Thünen-Institut für Forstgenetik, Großhansdorf, für die großartige Unterstützung im Labor, sowie allen Mitarbeitern der Gärtnerei für die Kultur und Pflege der Pflanzen. BIRGIT KERSTEN, NIELS A. MÜLLER, HANS HÖNICKA, TOBIAS BRÜGMANN, HILKE SCHRÖDER und FRANZISKA ORGEL, Thünen-Institut für Forstgenetik, Großhansdorf, danken wir für hilfreiche Diskussionen. Das Projekt TreeHarm wird von der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) im Programm Waldklimafond (FKZ: 2219WK30X4) durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft und das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Deutschland, gefördert.

Referenzen

- BAUM JA, BOGAERT T, CLINTON W, HECK G, FELDMANN P, ILAGAN O, JOHNSON S, PLAETINCK G, MUNYIKWA T, PLEAU M, VAUGHN T, ROBERTS J (2007): Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25: 1322-1326, <https://doi.org/10.1038/nbt1359>
- BILLINGS R (2011): Use of chemicals for prevention and control of Southern Pine Beetle infestations. Southern Pine Beetle II. Gen. Tech. Rep. SRS-140. Asheville, NC: U.S. Department of Agriculture Forest Service, Southern Research Station: 367-379. In: US Department of Agriculture Forest Service SRS (ed). https://www.srs.fs.usda.gov/pubs/gtr/gtr_srs140/gtr_srs140_367.pdf.
- BOLOGNESI R, RAMASESHADRI P, ANDERSON J, BACHMAN P, CLINTON W, FLANNAGAN R, ILAGAN O, LAWRENCE C, LEVINE S, MOAR W, MUELLER G, TAN J, UFFMAN J, WIGGINS E, HECK G, SEGERS G (2012): Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLOS ONE* 7: e47534, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047534>.

- CHEN JZ, JIANG YX, LI MW, LI JW, ZHA BH, YANG G (2021): Double-stranded RNA-degrading enzymes reduce the efficiency of RNA interference in *Plutella xylostella*. *Insects* 12 (8): 712. <https://doi.org/10.3390/insects12080712>
- CHRISTIAENS O, PRENTICE K, PERTRY I, GHISLAIN M, BAILEY A, NIBLETT C, GHEYSEN G, SMAGGHE G (2016): RNA interference: a promising biopesticide strategy against the African Sweetpotato Weevil *Cylas brunneus*. *Sci Rep* 6: 38836. <https://doi.org/10.1038/srep38836>
- DAS PR, SHERIF SM (2020) Application of exogenous dsRNAs-induced RNAi in agriculture: challenges and triumphs. *Frontiers in Plant Science* 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.00946>
- DHANDAPANI RK, DUAN JJ, PALLI SR (2020): Orally delivered dsRNA induces knockdown of target genes and mortality in the Asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 104: e21679, <https://doi.org/10.1002/arch.21679>
- FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811, <https://doi.org/10.1038/35888>
- FLADUNG M, HÄGGMAN H, SUTELA S (2021): Application of RNAi technology in forest trees. In: Mezzetti B, Sweet JB, Burgos L (eds) RNAi for plant improvement and protection. Wallingford: CABI: 54-71, <https://doi.org/10.1079/9781789248890.0007>
- GHOSH BSK, GUNDERSEN-RINDAL ED (2017) Double strand RNA-mediated RNA interference through feeding in larval gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebidae). *European Journal of Entomology* 114: 170-178, <http://dx.doi.org/10.14411/eje.2017.022>
- HLÁSNY T, BARKA I, KULLA L, BUCHA T, SEDMÁK R, TROMBIK J (2017): Sustainable forest management in a mountain region in the Central Western Carpathians, Northeastern Slovakia: the role of climate change. *Regional Environmental Change* 17: 65-77, <https://doi.org/10.1007/s10113-015-0894-y>
- JACTEL H, VERHEGGEN F, THIÉRY D, ESCOBAR-GUTIÉRREZ AJ, GACHET E, DESNEUX N; Neonicotinoids Working Group. (2019): Alternatives to neonicotinoids. *Environment International* 129: 423-429, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.045>
- JOHNSON DM, LIEBHOLD AM, BJORNSTADT ON, MC MANUS ML (2005): Circumpolar variation in periodicity and synchrony among gypsy moth populations. *Journal of Animal Ecology* 74: 882-892. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2005.00980.x>
- KYRE BR, RODRIGUES TB, RIESKE LK (2019): RNA interference and validation of reference genes for gene expression analyses using qPCR in southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis*. *Scientific Reports* 9: 5640, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42072-6>
- LIEBHOLD AM, KEAN JM (2019): Eradication and containment of non-native forest insects: successes and failures. *Journal of Pest Science* 92: 83-91, <https://doi.org/10.1007/s10340-018-1056-z>
- NISHIDE Y, KAGEYAMA D, TANAKA Y, YOKOI K, JOURAKU A, FUTAHASHI R, FUKATSU T (2021): Effectiveness of orally-delivered double-stranded RNA on gene silencing in the stinkbug *Plautia stali*. *PLoS One* 16 (1): e0245081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245081>
- OKORSKI A, PSZCZÓŁKOWSKA A, OSZAKO T, NOWAKOWSKA JA (2015): Current possibilities and prospects of using fungicides in forestry. *Forest Research Papers*:76: 191-206. <https://www.ibles.pl/web/lesne-prace-badawcze/-/doi-10-1515-frp-2015-0019>
- PETEK M, COLL A, FERENC R, RAZINGER J, GRUDEN K (2020): Validating the potential of double-stranded RNA targeting Colorado Potato Beetle mesh gene in laboratory and field trials. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01250>
- ROBERTS M, GILLIGAN CA, KLECZKOWSKI A, HANLEY N, WHALLEY AE, HEALEY JR (2020): The effect of forest management options on forest resilience to pathogens. *Frontiers in Forests and Global Change* 3, <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/ffgc.2020.00007>
- RODRIGUES TB, DUAN JJ, PALLI SR, RIESKE LK (2018) Identification of highly effective target genes for RNAi-mediated control of emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. *Scientific Reports* 8: 5020, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23216-6>
- RODRIGUES TB, MISHRA SK, SRIDHARAN K, BARNES ER, ALYOKHIN A, TUTTLE R, KOKULAPALAN W, GARBY D, SKIZIM NJ, TANG YW, MANLEY B, AULISA L, FLANNAGAN RD, COBB C, NARVA KE (2021): First sprayable double-stranded RNA-based biopesticide product targets proteasome subunit beta type-5 in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.728652>

- SEIDL R, SPIES TA, PETERSON DL, STEPHENS SL, HICKE JA (2016): Review: Searching for resilience: addressing the impacts of changing disturbance regimes on forest ecosystem services. *Journal of Applied Ecology* 53: 120-129, <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12511>
- SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z, JARMOŁOWSKI A FAU-FIGLEROWICZ M, FIGLEROWICZ M (2003): RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 53: 39-46. <https://bibliotekanauki.pl/articles/1043669>
- TIAN H, PENG H, YAO Q, CHEN H, XIE Q, TANG B, ZHANG W (2009): Developmental control of a Lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLOS ONE* 4: e6225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006225>
- WANG M, JIN H (2017): Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection. *Trends in Microbiology* 25: 4-6, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.011>
- WEN R, WANG B, WANG B, MA L (2018): Characterization and expression profiles of juvenile hormone epoxide hydrolase from *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantridae) and RNA interference by ingestion, *Journal of Insect Science*, Volume 18, Issue 1: 13, <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey002>
- WERMELINGER B (2004): Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* - a review of recent research. *Forest Ecology and Management* 202: 67-82, <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.07.018>

Autoren

MATTHIAS FLADUNG, KIRAN SINGEWAR

Thünen-Institut für Forstgenetik, Sieker Landstr. 2, 22927 Großhansdorf

Kontakt: matthias.fladung@thuenen.de