

HEIKE THIEL¹, MARK VARRELMANN^{1,2}

¹ University of Göttingen, DNPW, Section Plant Virology, Grisebachstr. 6, D – 37077 GÖTTINGEN

² Institute of Sugar Beet Research, Holtenser Landstrasse 77, D – 37079 GÖTTINGEN

Original language: English

SUGAR BEET PROTEINS INTERACTING WITH RNA-3 ENCODED PATHOGENICITY FACTOR OF *BET* NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS

ABSTRACT

In Europe, 700.000 ha cultivated with sugar beets are infected with Rhizomania, a disease caused by *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV). For high yielding sugar beet cultivation, genotypes with partial BNYVV resistance are available. The resistance genes (*Rz1*, *Rz2* and *Rz3*) limit virus replication and spread from infected hair roots to the tap root. RNA-3 encoded pathogenicity factor P25, involved in symptom expression and virus translocation in the root system displays highly variable composition and is supposed to be responsible for recently observed resistance breaks in limited geographic regions. For a better understanding of P25 pathogenicity functions and in order to identify interacting plant proteins from resistant genotypes able to recognize and target P25, a yeast two hybrid (YTH) screen with an *Rz2*-derived cDNA library was carried out. After several de-selection steps of false-positive P25 interactors (i.e. transcriptional autoactivator proteins), database comparison and selection of genes with known functions, cDNA clones displaying high homology to actin, annexin, f-box proteins and *tortifolia-1* mRNA, were applied for further characterisation. The P25 actin, annexin and *tortifolia 1* interaction was verified using *in planta* Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay. As plant actin is part of the cytoskeleton and participates in signal transduction from membranes to the nucleus, BNYVV might interfere with such pathways via actin interaction. This is supported by the interaction with annexin, building a putative linker in dynamic membrane-cytoskeleton interactions and being part of a multifunctional multigene family with response to stress. Additionally, annexin-actin interaction, previously shown in tomato, was verified here in YTH and BiFC. *Tortifolia 1* is associated with microtubules in *Arabidopsis* and known to bind potyviral encoded pathogenicity factor in potato. Transient F-Box protein similar candidate expression in leaf tissue resulted in cell-death, supporting its putative involvement in ubiquitin-proteasome pathway. At present the isolation of full-length cDNA clones and verification of the YTH and BiFC interactions is in progress.

PROTÉINES DE BETTERAVES SUCRIÈRES INTERAGEANT AVEC LE FACTEUR DE PATHOGÉNIE ENCODÉ ARN-3 DU VIRUS DES NERVURES JAUNES NÉCROTIQUES DE LA BETTERAVE

ABRÉGÉ

En Europe, 700.000 ha de surface cultivée de betteraves sucrières sont infestés par la Rhizomanie, une maladie causée par le virus des nervures jaunes nécrotiques de la betterave (BNYVV). Les géotypes portant une résistance partielle contre le BNYVV existent pour une culture profitable de betteraves sucrières. Les gènes de résistance (*Rz1*, *Rz2* et *Rz3*) limitent une réplication du virus et sa propagation des racelles fines infectées vers la racine pivotante. Le facteur de pathogénité P25 encodé par l'ARN-3 qui joue un rôle pour l'expression des symptômes et pour la translocation du virus dans le système racinaire possède une composition largement variable. Il est supposé être responsable pour les ruptures de résistance récemment observées dans des régions géographiques limitées. Pour mieux comprendre les fonctions de la pathogénité de P25 et pour identifier les protéines des plantes interagant des géotypes résistants capables d'identifier et de viser P25, un "Yeast two hybrid (YTH) screen" avec une librairie ADNc dérivée de *Rz2* a été exécuté. Après plusieurs pas de désélection des interacteurs P25 faux-positives (p. ex. des protéines transcriptionales auto-activateurs), une comparaison avec une banque de données et une sélection des gènes de fonction connue, les clones ADNc qui ont manifesté une homologie forte à actine, annexine, aux protéines f-box et *tortifolia-1* ARNm ont été appliqués pour une caractérisation ultérieure. L'actine P25,

l'annexine et l'interaction tortifolia 1 ont été vérifiées en utilisant un essai *in planta* de complémentarité bimoléculaire fluorescence (*in planta* „Bimolecular fluorescence complementation assay“, BiFC). Étant donné que l'actine des plantes fait partie du cytosquelette et participe à la traduction de signaux des membranes au noyau cellulaire, BNYVV pourrait être associé à ces processus de signaux cellulaires par une interaction d'actine. Cela est supporté par l'interaction avec annexine, laquelle probablement constitue un lien dans des interactions dynamiques membrane-cytosquelette et fait partie d'une famille de gènes multifonctionnelles induit par le stress. En plus, l'interaction annexine-actine, manifestée déjà en tomates, a été vérifiée ici en YTH et BiFC. Tortifolia 1 est une protéine associée aux microtubules en Arabidopsis qui interagit avec les facteurs de pathogénicité potyviralement encodés en pommes de terre. À une expression transiente dans des tissus foliaires, le candidat d'homologie aux protéines F-Box a induit une réaction de mort cellulaire, ce qui supporte sa participation putative dans le procédé ubiquitine-protéosome. Des travaux pour isoler des clones ADNc entières et de vérifier les interactions trouvées par YTH et BiFC sont actuellement en cours.

INTERAKTIONEN VON ZUCKERRÜBENPROTEINEN MIT DEM RNA3-KODIERTEN PATHOGENITÄTSFAKTOR DES *BET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS*

KURZFASSUNG

In Europa sind 700.000 ha Zuckerrübenanbaufläche mit Rizomania infiziert, einer Krankheit, die durch das *Bet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) verursacht wird. Für einen wirtschaftlichen Zuckerrübenanbau werden BNYVV teilresistente Sorten angebaut. Die Resistenzgene (*Rz1*, *Rz2* und *Rz3*) verringern die Virusreplikation und Ausbreitung aus infizierten Haarwurzeln in die Hauptwurzel. Der sehr variable RNA-3 kodierte Pathogenitätsfaktor P25 ist an der Symptomausprägung und Virustranslokation im Wurzelsystem beteiligt und es wird angenommen, dass die variable P25-Zusammensetzung für die in bestimmten geographischen Regionen auftretende Resistenzbrechung verantwortlich ist. Um die Funktionen von P25 besser verstehen zu können und Pflanzenproteine eines resistenten Genotyps, die mit P25 interagieren, identifizieren und charakterisieren zu können, wurde ein „Yeast two hybrid (YTH) screen“ mit einer *Rz2* resistenten cDNA Bibliothek durchgeführt. Nach mehreren Selektionsschritten zur Aussonderung von falschpositiven P25 Interaktionspartnern (z.B. Transkriptionsaktivatoren), Datenbankanalysen und Auswahl von Genen mit bekannter Funktion, wurden cDNA Klone mit Homologie zu Actin, Annexin, F-Box Proteinen und Tortifolia 1 mRNA für die weitere Charakterisierung ausgewählt. Die P25 Actin, Annexin und Tortifolia 1 Interaktionen konnten durch das *in planta* „Bimolecular fluorescence complementation assay“ (BiFC) bestätigt werden. Pflanzliches Actin, Teil des Cytoskeletts, ist an der Signaltransduktion von Membranen in den Zellkern beteiligt. BNYVV könnte an Signalvorgängen in der Zelle mittels Actin Interaktion beteiligt sein. Dies wird durch die nachgewiesene P25 Interaktion mit Annexin unterstützt, welches Funktionen als Verbindungsglied zwischen dynamischen Membran-Zytoskelle Interaktionen besitzt und Mitglied einer stressinduzierten Multigenfamilie ist. Zusätzlich konnte eine Annexin-Actin Interaktion, welche bereits in Tomate gezeigt werden konnte, in diesen Untersuchungen mit YTH und BiFC bestätigt werden. Arabidopsis Tortifolia 1 stellt ein Mikrotubuli assoziiertes Protein dar, dessen Ortholog in Kartoffeln mit einem potyviralen Pathogenitätsfaktor interagiert. Der Kandidat mit Homologie zu F-box Proteinen induzierte bei transientscher Expression in Blattgewebe eine Zelltod Reaktion, welches seine vermutete Beteiligung am Ubiquitin-Proteosom Abbauweg unterstützt. Zurzeit werden Arbeiten zur Herstellung von vollständigen cDNA Klonen unternommen, um die gefundenen Interaktionen mittels YTH und BiFC zu bestätigen.
