

SARAH DUNKER, MARK VARRELMANN
Institute of Sugar Beet Research
Holtenser Landstraße 77
D – 37079 GÖTTINGEN

Original language: English

TRANSFORMATION OF *CERCOSPORA BETICOLA* WITH A FLUORESCENCE MARKER TO INVESTIGATE THE INTERACTION WITH SUGAR BEET

ABSTRACT

Cercospora leaf spot (CLS), caused by the fungal pathogen *Cercospora beticola*, is the economically most important leaf disease in European sugar beet production, leading to severe yield and quality losses. Control of CLS is achieved by fungicide application during the growing season and the cultivation of partial resistant cultivars. The resistance against *C. beticola* in sugar beets is based on 4-5 major genes and is associated with yield penalty under non-diseased conditions. In different studies quantitative trait loci (QTLs) that are linked with *Cercospora*-resistance, were detected, but to date these QTLs were not further characterized.

To specifically visualize fungal structures in plant tissue, *C. beticola* was transformed with a gene for the red fluorescing protein from a coral of the *Discosoma* genus (DsRed) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. For the transformation a mixture of mycelium and conidia of *C. beticola* was used. The transformation construct consisted of the DsRed-gene and a gene coding for resistance against the antibiotic hygromycin as selection marker, both under control of fungal specific regulatory elements. The transformation construct was cloned into the backbone of the binary vector pPK2 and transferred to *C. beticola* using *A. tumefaciens*. After transformation the mycelium as well as conidia displayed red fluorescence. The pathogenicity of the different transformands was tested by spraying a spore suspension on susceptible sugar beet plants. All transformands induced typical CLS symptoms as did the wild-type *C. beticola* isolate. At present the formation of infection structures and the spread of the fungus in the plant tissue are investigated using confocal laser scanning microscopy. In future studies the transformed *C. beticola* isolate can be used to characterise the function of different QTLs in *Cercospora*-resistance based on fungal growth and the formation of histological resistance responses in the plant tissue of sugar beet plants carrying different QTLs for *Cercospora*-resistance.

LA TRANSFORMATION DE *CERCOSPORA BETICOLA* AVEC UN MARQUEUR DE FLUORESCENCE POUR INVESTIGUER L'INTERACTION AVEC BETTERAVES SUCRIÈRES

ABRÉGÉ

La Cercosporiose, causé par le champignon pathogène *Cercospora beticola*, est la maladie foliaire la plus importante de la production européenne de betteraves sucrières et elle provoque des graves pertes de rendement et de qualité. Un contrôle de la Cercosporiose est achevé par une application de fongicides pendant la période de croissance et par la culture de variétés partiellement résistantes. La résistance des betteraves sucrières contre *C. beticola* se base sur 4-5 gènes majeurs et est associée avec des pertes de rendement en absence de la maladie. Différentes investigations ont détecté des loci de caractères quantitatifs (QTLs) qui sont liés avec une résistance contre la Cercosporiose, mais jusqu'à présent ces QTL n'avaient pas été caractérisés.

Afin de visualiser spécifiquement les structures du champignon dans les tissus de plantes, *C. beticola* a été transformé avec le gène de la protéine de fluorescence rouge d'un corail du genre *Discosoma* (DsRed) par une transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. Un mélange de mycélium et de conidies de *C. beticola* a été utilisé pour la transformation. Le constructe de transformation a consisté du gène DsRed et d'un gène codant pour la résistance contre l'antibiotique hygromycine comme

marqueur de sélection, tous les deux étant contrôlés par des éléments de régulation spécifiques du champignon. Le constructe de transformation a été cloné dans le vecteur binaire pPK2 et a été transféré à *C. beticola* en utilisant *A. tumefaciens*. Après la transformation le mycélium autant que les conidies ont manifesté une fluorescence rouge. La pathogénicité des différents transformants a été testée en pulvérisant une suspension de spores sur les betteraves sucrières susceptibles. Tous les transformants ont induit des symptômes typiques pour la Cercosporiose comme l'avait fait l'isolat non-transformé de *C. beticola*. A présent, la formation de structures d'infection et la propagation du champignon dans le tissu de la plante sont étudiées en utilisant la microscopie confocale à balayage laser. Dans les investigations futures l'isolat transformé de *C. beticola* peut être utilisé pour caractériser la fonction de différents QTL de la résistance contre la Cercosporiose, basé sur la croissance du champignon et la formation de réponses histologiques de résistance au niveau des tissus des betteraves sucrières qui portent les différents QTL pour une résistance contre la Cercosporiose.

TRANSFORMATION VON *CERCOSPORA BETICOLA* MIT EINEM FLUORESCENZMARKER ZUR UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION MIT ZUCKERRÜBEN

KURZFASSUNG

Die *Cercospora*-Blattflecken-Krankheit, hervorgerufen durch den Pilz *Cercospora beticola*, ist die wirtschaftlich bedeutendste Blattkrankheit im europäischen Zuckerrübenanbau, die zu starken Ertrags- und Qualitätseinbußen führt. Die Bekämpfung von *Cercospora* erfolgt durch Fungizidapplikationen während der Vegetation sowie durch den Anbau teilresistenter Sorten. Die Resistenz gegenüber *C. beticola* basiert auf 4-5 Genen. Unter Nichtbefall weisen die resistenten Sorten jedoch geringere Erträge als anfällige Sorten auf. In mehreren Untersuchungen konnten quantitative trait loci (QTLs) gefunden werden, die mit der Resistenz gegen *C. beticola* korrelieren. Eine nähere Charakterisierung der verschiedenen QTLs wurde bislang jedoch nicht durchgeführt.

Um die Pilzstrukturen im Pflanzengewebe spezifisch sichtbar zu machen, wurde *C. beticola* mit einem Gen für das rot fluoreszierende Protein aus einer Qualle der Gattung *Discosoma* (DsRed) mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation transformiert. Für die Transformation wurde ein Gemisch aus Myzel und Konidien von *C. beticola* eingesetzt. Das Transformationskonstrukt setzte sich aus dem DsRed-Gen und einem Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin als Selektionsmarker, beide unter der Kontrolle pilzspezifischer Regulationselemente, zusammen. Das Transformationskonstrukt wurde in den binären Vektor pPK2 kloniert und mit Hilfe von *A. tumefaciens* in *C. beticola* transformiert. Sowohl das Myzel als auch die Konidien von *C. beticola* wiesen nach der Transformation eine rote Fluoreszenz auf. Um die Pathogenität der verschiedenen Transformanten zu überprüfen, wurden Zuckerrübenpflanzen einer anfälligen Linie mit einer Sporensuspension inokuliert. Alle Transformanten verursachten, vergleichbar zum nicht transformierten *C. beticola*-Isolat, die typischen *Cercospora*-Blattflecken. Zurzeit wird mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) die Bildung von Infektionsstrukturen und die Ausbreitung des Pilzes im Pflanzengewebe untersucht. In zukünftigen Untersuchungen kann das transformierte *C. beticola*-Isolat zur Charakterisierung der verschiedenen QTLs für *Cercospora*-Resistenz, basierend auf Pilzwachstum und der Ausbildung histologischer Resistenzmechanismen im Pflanzengewebe von Zuckerrübenpflanzen mit unterschiedlichen QTLs, eingesetzt werden.
