

Project No. 12-05

BLADVLEKKENZIEKTEN

Ontwikkelen van een model tot bestrijding van *Cercospora beticola* in suikerbieten

Projectleider: J. Vereijssen

1. Inleiding

De bladvlekkenziekte cercospora heeft zich in de afgelopen vijftientig jaar vanuit Limburg over het hele land verspreid. De laatste twee jaar heeft een snelle uitbreiding in noordelijke en westelijke richting plaatsgevonden. In 2002 moest zelfs op de noordelijke, centrale en zuidwestelijke kleigebieden een bespuiting uitgevoerd worden. Een vroege en ernstige aantasting kan leiden tot een verlies van 50% in suikeropbrengst. De mate en ontwikkeling van aantasting hangen voor een groot deel af van de weersomstandigheden. Droog en koud weer vertragen de ontwikkeling, maar een combinatie van vochtig en warm weer stimuleert deze. Dit project heeft als doel meer inzicht te krijgen in de overleving en bestrijding van cercospora. Inzicht in overleving kan leiden tot nieuwe beheersingsmogelijkheden en bij de bestrijding is het streven een minimale, maar tevens optimale fungicideninzet.

2. Werkwijze

2.1 Kasexperimenten plaats eerste infectie cercospora

In een klimaatkamer zijn proeven uitgevoerd omtrent de bepaling van de mogelijke plaats van de eerste infectie.

2.2 Bepaling genetische variatie

Op het IRS is een collectie Nederlandse *Cercospora beticola*-isolaten aanwezig, evenals een kleine collectie buitenlandse isolaten en isolaten van een andere cercosporasoort (*C. apii*, *C. coffeicola*, *C. gerberae*, *C. nicotianae*). Hiermee kunnen de (eventuele) genetische verschillen tussen Nederlandse isolaten vergeleken worden en tussen Nederlandse en buitenlandse. De cercospora-isolaten van een andere soort kunnen we gebruiken bij de ontwikkeling van een specifieke primer voor *C. beticola*.

Genetische variatie

Voor het bestuderen van de infectie en overleving van *C. beticola* en voor de ontwikkeling van een snelle en eenduidige detectiemethode is het essentieel de genetische variabiliteit te onderzoeken. Bij cercospora hebben we variatie in het DNA onderzocht met RAPD-fingerprinttechnieken, waarmee bandjespatronen verkregen worden op een gel. De variatie in bandjes is een hulpmiddel bij de identificatie en kan een hulpmiddel zijn bij de ontwikkeling van een specifieke primer voor *C. beticola*.

Ontwikkeling specifieke primer

Met behulp van verschillende RAPD-primers (B1 t/m B20 en N1 t/m N20) werden DNA-patronen (barcodes) gemaakt van een kleine selectie cercospora-isolaten en andere ziekteverwekkers. Nadat het op een agarose-gel was gezet, werd gekeken of een bandje uniek voor cercospora aanwezig was. De primercombinatie die het unieke cercosporabandje gaf, werd vervolgens getoetst op een groot aantal *C. beticola*-isolaten. Werde hetzelfde bandje gevonden, dan werd dit uit de gel gesneden. Uit het bandje werd DNA geëxtraheerd en daarna gesequenced. Met behulp van de sequentie kon een specifieke primer voor cercospora gemaakt worden. De primer werd teruggetoetst met *C. beticola*-isolaten, cercospora-isolaten van een andere soort, andere ziekteverwekkers en bietenplantmateriaal.

Cercospora-DNA aantonen in plantmateriaal

Zaailingen die geïnfecteerd waren met *C. beticola*, zijn ingevroren na symptoomvorming. Uit de ingevroren zaailingen is met behulp van een DNA-extractiekit DNA geïsoleerd. Om de aanwezigheid van *C. beticola*-DNA te bepalen, werd een PCR ingezet met ITS-4- en ITS-5-primers die specifiek zijn voor schimmel-DNA.

3. Resultaten

3.1 Kasexperimenten plaats eerste infectie cercospora

In 2002 hebben we dezelfde resultaten behaald als in 2001. In 2003 zullen de resultaten worden gepubliceerd.

3.2 Bepaling genetische variatie

Genetische variatie

Met behulp van de verschillende RAPD-primers zijn bandjespatronen verkregen, die per primer sterk verschillen binnen Nederlandse isolaten. Zelfs isolaten uit hetzelfde gebied geven bij dezelfde primer een ander bandjespatroon. De bandjespatronen verkregen bij buitenlandse isolaten, verschillen ook sterk binnen een primer en per primer.

Ontwikkeling specifieke primer

De ontwikkeling van een specifieke primer is in een gevorderd stadium. Uit de serie getoetste RAPD-primers (40) is een primer naar voren gekomen die bij alle *C. beticola*-isolaten een duidelijk bandje geeft en niet bij rhizoctonia. Na sequensen van het verkregen bandje, is een specifieke *C. beticola*-primer ontwikkeld. We kunnen nu cercospora-isolaten onderscheiden van plantma-

teriaal en andere ziekteverwekkers (aphanomyces, rhizoctonia, fusarium en trichoderma) van de suikerbiet. De ontwikkelde primer lijkt nog niet specifiek genoeg, omdat ook een andere cercosporasoort, *C. apii*, wordt aangetoond. Met behulp van restrictie-enzymen is geprobeerd een verschil tussen *C. beticola* en *C. apii* te verkrijgen, maar er is een zelfde RAPD-patroon te zien. Misschien is *C. apii* onjuist geïdentificeerd door verstrekker. Het ontwikkelen van de specifieke primer gaat verder in 2003.

Cercospora-DNA aantonen in plantmateriaal

In het geïnfecteerde ingevroren plantmateriaal is met behulp van de hierboven beschreven 'specifieke' primer *C. beticola*-DNA aangetoond. De bandjes waren zeer dun,

maar optimalisatie van de PCR verbeterde de bandjes niet. Er was blijkbaar zeer weinig *C. beticola*-DNA in het plantmateriaal aanwezig dat wel aangetoond kon worden. Bij een herhaling met vers geïnfecteerd veldmateriaal werd veel meer DNA geïsoleerd. Waarschijnlijk ligt het probleem bij de kleine hoeveelheid schimmel-DNA aanwezig in de zaailingen. In 2003 wordt verder aan dit onderzoek gewerkt.

4. Conclusie

De resultaten van de veldproeven uitgevoerd in de periode 1999-2001 worden verwerkt in een Cercospora-adviesmodel.