

MRS J. VEREIJSEN AND J.H.M. SCHNEIDER  
Institute of Sugar Beet Research, P.O. Box 32  
NL- 4600 AA Bergen op Zoom

P 22

## **DETECTION OF CERCOSPORA BETICOLA IN PLANT AND SOIL USING PCR-TECHNIQUES**

### **Abstract**

Molecular detection of plant pathogenic fungi, bacteria and viruses in plant and soil, of both hosts and non-hosts may serve as a decision support tool for farmers, helps unravelling the host range, and can be used as a research tool. Our objective was to develop a detection method based on specific primers to be able to study the epidemiology of the leaf pathogen *Cercospora beticola* in more detail. Genetic variability within *C. beticola* was studied on isolates from the Netherlands, Italy, Germany and the USA using different Operon RAPD primers. RAPD primer N14 showed a band at 650bp, which occurred in all *C. beticola* isolates tested, and which did not occur in *Rhizoctonia solani*, *Pythium*, *Fusarium*, *Aphanomyces cochlioides* and sugar beet. This unique band was cloned and sequenced, where after specific primer sets were designed. The primer sets were then tested on Dutch and international isolates, other *Cercospora* species, other fungal beet pathogens and sugar beet material and amplified only the expected amplicon in *C. beticola* isolates, suggesting specificity. Using this primer we were able to detect *C. beticola* in a conidial suspension containing 100 spores per ml, in one lesion of *Cercospora* infected plant material and in soil that consisted of infected oatmeal (3%) and fine river sand/peat (1:10) soil (97%) diluted to 0.1% with oatmeal/potting soil. A nested PCR reaction increased the sensitivity. Our detection method enables us to study latent infections of *C. beticola*, screen soils for the presence of *C. beticola* and screen potential alternative hosts.

---

## **DETECTION DE CERCOSPORA BETICOLA DANS LE SOL ET LA PLANTE GRACE A L'UTILISATION DE TECHNIQUES PCR**

### **Abrégé**

La détection moléculaire des champignons pathogènes des plantes, des bactéries et des virus dans les plantes et dans le sol, tant des plantes hôtes que non hôtes peut être un outil de prise de décision pour les agriculteurs, une aide pour déterminer les variétés de plantes hôtes et peut être utilisé comme outil de recherche. Notre objectif était de développer une méthode de détection fondée sur des primers spécifiques afin d'étudier plus en détail l'épidémiologie du pathogène de la feuille *Cercospora beticola*. La variabilité génétique de *C. beticola* a été étudiée sur des isolats en provenance des Pays-Bas, d'Italie, d'Allemagne et des Etats-Unis, utilisant différents primers Operon RAPD ; Le primer RAPD N14 a révélé une bande de 650 bp présente dans tous les isolats de *C. beticola* qui ont été testés et absente chez *Rhizoctonia solani*, *Pythium*, *Fusarium*, *Aphanomyces cochlioides* et la betterave. Cette bande unique a été clonée et séquencée après désignation de sets de primer spécifiques. Les sets de primer ont ensuite été testés sur les isolats internationaux et hollandais, sur d'autres espèces de *Cercospora*, sur d'autres pathogènes de la betterave et sur du matériel de betterave sucrière et n'ont amplifié que l'amplicon des isolats de *C. beticola*, suggérant leur spécificité. Utilisant ce primer, nous avons ensuite pu détecter le *C. beticola* dans une suspension conidiale contenant 100 spores par ml, dans une lésion de matériel infesté par le *Cercospora* et dans du sol consistant en farine d'avoine infectée (3%) et sable de rivière/tourbe (1:10) sol (97%) dilué à 0.1% avec de la farine d'avoie/terreau. Une réaction PCR a augmenté la sensibilité. Notre méthode de détection permet d'étudier les infections latentes de *C. beticola*, cribler le sol pour détecter la présence de *C. beticola* et cribler les hôtes alternatifs potentiels.

## DETEKTION VON *CERCOSPORA BETICOLA* IN PFLANZE UND BODEN UNTER ZUHILFENAHME VON PCR-TECHNIKEN

### Kurfassung

Die molekulare Aufspürung von pflanzenpathogenen Pilzen, Bakterien und Viren in Pflanzen und Boden, beides bei Wirten und nicht Wirten, kann als Mittel der Entscheidungshilfe für Anbauer dienen, kann den Umfang der Wirtspflanzen bestimmen und dient ebenfalls als Forschungswerkzeug. Unser Ziel war es eine Detektionsmethode auszuarbeiten die auf spezifischen Primern basierte? die es erlauben die Epidemiologie des Blattpathogens *Cercospora beticola* im Detail zu untersuchen. Genetische Variabilität innerhalb von *C. beticola* wurde in Isolaten aus den Niederlanden, Italien, Deutschland und den USA untersucht unter Zuhilfenahme verschiedener Operon RAPD Primer. Der RAPD Primer N14 zeigte ein Band bei 650bp, daß in allen getesteten *C.beticola* Isolaten vorkam und nicht in *Rhizoctonia solani*, *Pythium*, *Fusarium*, *Aphanomyces cochlioides* und Zuckerrübe zu finden war. Dieses einzigartige Band wurde kloniert und sequenziert, wonach anschließend spezifische Primer Sets entwickelt wurden. Die Primer Sets wurden auf niederländischen und internationalen Isolaten, anderen *Cercospora* Arten, anderen pilzlichen Rübenpathogenen und anderem Zuckerrübenmaterial getestet. Nur der in *C.beticola* vorkommende Amplicon wurde verstärkt wodurch Spezifität vermutet wird. Unter Verwendung dieses Primers waren wir in der Lage *C.beticola* in Konidien-Suspensionen zu detektieren die 100 Sporen pro ml. beinhalteten. Ebenfalls wurde der Pilz in *Cercospora* infiziertem Pflanzenmaterial und in Boden mit infiziertem Hafermehl (3%) und feinem Flußsand/Torf (1:10) und Boden (97%) die zu 0,1% mit Hafermehl/Gartenboden verdünnt war. Eine eingebettete PCR Reaktion verbesserte die Sensibilität. Die Detektionsmethode erlaubte uns latente Infektionen von *C.beticola* zu untersuchen, Böden auf das Vorkommen von *C.beticola* zu prüfen und potenzielle alternative Wirtspflanzen zu charakterisieren.

---