

Moleculaire karakterisering van *Cercospora beticola* en zijn naaste verwanten

Marizeth Groenewald

Op 19 februari 2007 promoveerde Marizeth Groenewald aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'Molecular characterization of *Cercospora beticola* and its relatives'. Promotoren waren Prof. Dr. P.W. Crous, hoogleraar Evolutionaire Fytopathologie en Prof. Dr. Ir. P.J.G.M. de Wit, hoogleraar Fytopathologie, beiden verbonden aan de leerstoelgroep Fytopathologie van Wageningen Universiteit. Het onderzoek werd financieel ondersteund door de Odo van Vloten Stichting en de Koninklijk Nederlandse Academie van Wetenschappen.

Inleiding

Het geslacht *Cercospora* is een van de grootste en meest heterogene geslachten binnen de hyphomyceten. Over het algemeen wordt aangenomen dat *Cercospora*-soorten waardplant-specifiek zijn op het niveau van plantengeslachten of plantenfamilies, een concept dat heeft geleid tot de beschrijving van meer dan 3000 soorten. Momenteel worden slechts zes- tot zeventienhonderd *Cercospora*-soorten onderscheiden. Daarnaast worden nog 281 soorten gerekend tot *C. apii sensu lato*, de oudste naam voor een groot complex van morfologisch niet te onderscheiden *Cercospora*-soorten met een brede waardplantspecificiteit. In het

onderzoek beschreven in dit proefschrift worden kweekkarakteristieken en moleculair-phylogenetische gegevens gebruikt om soorten behorend tot het *C. apii* soortencomplex beter te onderscheiden. *Cercospora beticola*, één van de soorten behorend tot het *C. apii* complex, veroorzaakt de *Cercospora* bladvlekkenziekte op *Beta vulgaris* (suikerbiet) en heeft wereldwijd een groot effect op de opbrengst en kwaliteit van de suikerbiet. *Cercospora apii*, de veroorzaker van *Cercospora* bladvlekkenziekte op *Apium graveolens* (selderij), is morfologisch identiek aan *C. beticola* en er is gesuggereerd dat *C. beticola* synoniem is aan *C. apii*.

Taxonomische relaties en waardplantspecificiteit van *Cercospora*-soorten voorkomend op selderij en suikerbiet

Door gebruik te maken van multilocus sequentie data, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) -analyses en kweekkarakteristieken bleek het mogelijk om morfologisch identieke *Cercospora*-soorten voorkomend op selderij en suikerbiet, te identificeren en te karakteriseren. Naast *C. apii* en *C. beticola* werd tijdens deze studie een nog onbeschreven *Cercospora*-soort geïsoleerd van selderij. Er werd aangetoond dat deze drie soorten, hoewel morfologisch identiek, verschillende functionele entiteiten zijn

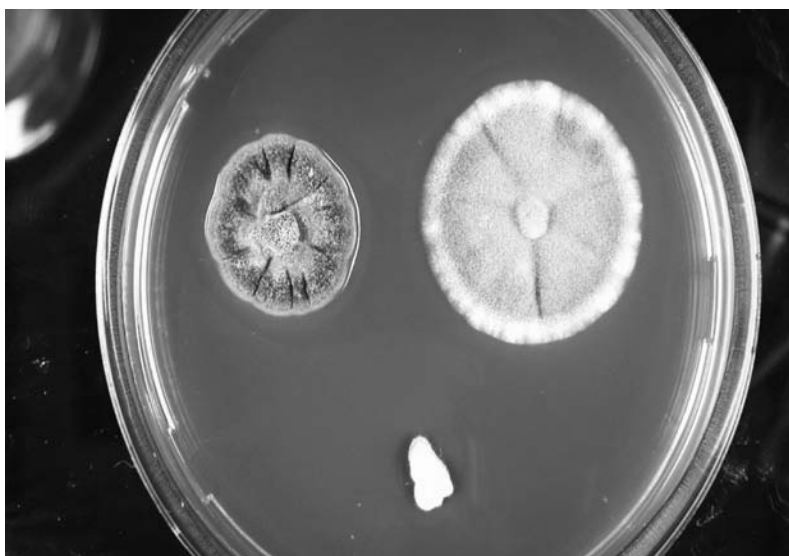


Figuur 1. Symptomen van *Cercospora apii* op selderijblad.

die beschouwd moeten worden als afzonderlijke soorten. Een PCR-protocol werd ontwikkeld om deze drie *Cercospora*-soorten te kunnen onderscheiden. Er werd aangetoond dat *C. apii* en *C. beticola* voorkomen op elkaars waardplant en dat het voorkomen van de derde soort zich beperkt tot selderij. De nieuwe soort werd formeel beschreven en kreeg als naam *Cercospora apiicola*.

Paringstype-genen in verschillende *Cercospora*-soorten

Voor de meeste *Cercospora*-soorten, waaronder *C. beticola*, is het geslachtelijke stadium onbekend. Na fylogenetische analyses bleken *Cercospora*-soorten te plaatsen in een goed te onderscheiden tak van het teleomorfe geslacht *Mycosphaerella*. Daarom kan worden aangenomen dat een mogelijk geslachtelijk stadium van *C. beticola* tot *Mycosphaerella* zal behoren. Tijdens deze promotie-studie werden gedegenererde primers ontwikkeld en vervolgens gebruikt om de paringstype-genen van diverse *Cercospora*-soorten te isoleren. De *MAT1-1-1* en *MAT1-2* genen van *C. beticola*, *C. zaeae-maydis* en *C. zeina* werden gekarakteriseerd. Aangezien slechts één van beide genen werd aangetroffen per isolaat kan worden aangenomen dat deze *Cercospora*-soorten heterothallisch zijn. In natuurlijke populaties van deze drie soorten waren de paringstype-genen ongeveer gelijk verdeeld, hetgeen kenmerkend is voor soorten die zich actief seksueel voortplanten. De gedegenererde primers die ontwikkeld zijn voor deze studie zijn inmiddels ook gebruikt om paringstype-genen van andere *Mycosphaerella*-soorten te amplificeren en zullen ook in toekomstige studies gebruikt



Figuur 2. Koloniekekenmerken op moutextractagar van de drie Cercospora-soorten die werden geïsoleerd van selderij na acht dagen incubatie bij 30°C. Onder: C. apiicola; linksboven: C. apii; rechtsboven: C. beticola.

worden als basis voor de karakterisering van deze genen in gerelateerde soorten.

Paringstype-verhoudingen en genetische variatie van *Cercospora beticola*-populaties

Eerdere studies hadden al laten zien dat binnen *C. beticola* genetische variatie bestaat. Het was echter niet bekend of deze variatie veroorzaakt wordt door chromosomale herschikkingen, ongeslachtelijke of geslachtelijke recombinatie. Gegevens verkregen met AFLP-analyses toonden aan dat de genetische variatie in natuurlijke populaties zeer waarschijnlijk veroorzaakt wordt door recombinatie. Het hoge niveau van de waargenomen genetische variatie, het grote aantal verschillende genotypen, en de gelijke verdeling van paringstype-genen in *C. beticola*-populaties zijn duidelijke aanwijzingen dat geslachtelijke recombinatie een belangrijke rol speelt in de voortplantingscyclus van deze genetisch diverse en heterogene soort.

De AFLP-techniek is duur en arbeidsintensief en daarom werden additionele moleculaire merkers (microsatellieten en SNPs) ontwikkeld en getest op *C. beticola* populaties. Deze merkers zijn zeer polymorf en toonden een hoog niveau van genetische variatie en kunnen een groot aantal haplotypen onderscheiden. Deze merkers kunnen dus gebruikt worden in toekomstige studies om de genetische diversiteit binnen *C. beticola* te meten.

Paringstype-genen van *Dothiostroma septosporum* en *D. pini*, twee verwanten van *Cercospora beticola*

Dothiostroma septosporum en *D. pini*, twee soorten verwant aan *C. beticola*, veroorzaken rode band-naaldenschroeziekte op dennenbomen. Van *D. septosporum* is het geslachtelijke stadium bekend (*Mycosphaerella pini*) maar dit wordt zelden gevonden en daarom wordt aangenomen dat geslachtelijke voortplanting zeldzaam is. Van *D. pini* is geen geslachtelijk stadium

bekend. Gebruikmakend van de genoemde gedegeneerde primers werden de *MAT1-1-1* en *MAT1-2* genen van deze beide soorten geïsoleerd. Tijdens dit onderzoek werden ook *Dothistroma*-specifieke primers ontwikkeld waarmee de twee *Dothistroma*-soorten kunnen

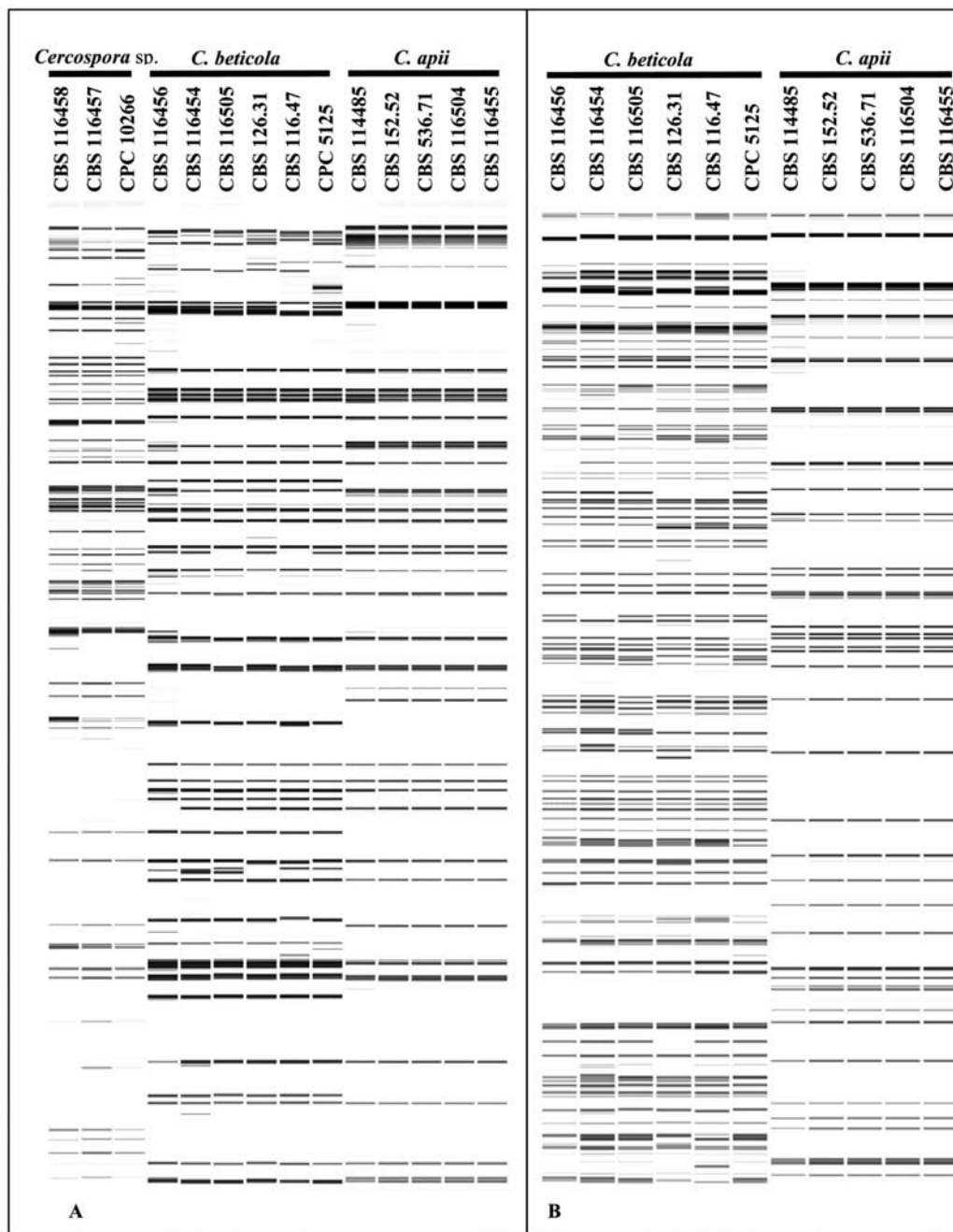
onderscheiden en het parings-type kan worden bepaald.

Conclusies

De resultaten beschreven in dit proefschrift hebben geleid tot een duidelijke verbetering van

het inzicht over de taxonomische relaties tussen *C. beticola* en verwante soorten, de mate van genetische variatie die bestaat in en tussen geografisch verschillende *C. beticola*-populaties en de mogelijke voortplantingsstrategieën van *C. beticola* en zijn naaste verwanten.

PROMOTIES



Figuur 3. AFLP-bandenpatronen verkregen met verschillende primer-combinaties
 A: AFLP-bandenpatronen van verschillende isolaten van *Cercospora apiicola*, *C. beticola* en *C. apii* gegenereerd met primer-combinatie *EcoRI-A* [FAM] / *MseI-CT*.
 B: AFLP-bandenpatronen van *C. beticola* en *C. apii* isolaten gegenereerd met primer-combinatie *EcoRI-AT* [JOE] / *MseI-C*.