

Werkgroep Fytobacteriologie

Jan van der Wolf,
secretaris

Verslag en samenvattingen

De werkgroep heeft een voorjaarsbijeenkomst gehouden en heeft, samen met de werkgroep Bodempathogenen en Bodemmicrobiologie de KNPV najaarsvergadering georganiseerd. Het thema daarvan was 'Plant and soil microbiome – relevance for crop protection'. Van deze bijeenkomst is een verslag verschenen in Gewasbescherming 48 (4/5/6): 126-130.

In de voorjaarsvergadering van 2017 van de werkgroep Fytobacteriologie zijn door leden 12 korte presentaties gegeven over lopend of recent afgesloten onderzoek:

- Roland Willmann van Syngenta sprak over de (moleculaire) karakterisering van *Pseudomonas syringae* op courgette.
- Marta Steminska (WUR) gaf een exposé over overmatige wortelgroei in groentegewassen onder glas.

- Wilfried Jonker (Bejo) beschreef een PCR-techniek waarbij *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* rechtstreeks in extracten van *Brassica*-zaden kan worden aangetoond.
- Aansluitend ging Harrie Koenraad (Naktuinbouw) in op directe detectie van *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatenzaadextracten.

- Ellis Meekis (Naktuinbouw) liet resultaten zien van de karakterisering van *Xanthomonas*-soorten in bloemisterij gewassen.
- Tenslotte gaf Leo van Overbeek een toelichting op een nieuw onderzoeksproject (PPS) dat handelt over het Plantenmicrobioom. Van de overige presentaties zijn hieronder korte samenvattingen beschikbaar.

Maria Bergsma-Vlami

Snelle en accurate identificatie van fyto bacteriën met het MALDI-TOF systeem

NVWA

Het MALDI-TOF apparaat (Bruker microflex™ LT/SH) is recent aangeschaft binnen BAC-NRC (NVWA) met als doel geïmplementeerd te worden als identificatietool voor een aantal plant-pathogene bacteriën. Omdat de commerciële database van Bruker vooral gericht is op voedsel en medische bacteriën, komen de meeste (quarantaine) plant-pathogene bacteriën helaas niet of nauwelijks in de database voor. Wij hebben main spectra profiles (MSP's) gecreëerd van, in totaal, tien representatieve isolaten binnen de vijf verschillende ondersoorten van *Clavibacter michiganensis*. Voor het creëren van deze MSP's is een volledige extractiemethode toegepast. Deze MSP's zijn toegevoegd in onze eigen database

en in combinatie met de commerciële database van Bruker gebruikt voor de identificatie van de *C. michiganensis*-ondersoorten. Voor de analytische specificiteit zijn 36 isolaten van de *C. michiganensis*-ondersoorten en een selectie van 10 isolaten van verwanten (namelijk de Cmm-look-alikes) gebruikt. Hierbij is een 'direct formic acid'-methode (mierenzuurextractie) toegepast. Voor 35 van de 36 isolaten van *C. michiganensis*-ondersoorten werden hoge >2,3 (+++, groen) of >2,0 (++, groen) scores verkregen wat inhoudt dat deze isolaten correct zijn geïdentificeerd op ondersoortniveau. Er werden geen vals-positieve uitslagen verkregen met alle tien verwante isolaten in deze validatie, inclusief de Cmm-look-alikes.

Leon Tjou Tam Sin

Assessing the pathogenic ability of *Ralstonia solanacearum* from ornamental *Rosa* plants

NVWA

Ralstonia solanacearum strains found in stunted, yellowing and wilted plants of ornamental rose (*Rosa* sp.) were investigated on their pathogenic ability in two cultivars of ornamental rose and in four solanaceous crops. The ornamental rose cultivars on which the *R. solanacearum* strains were tested are *Rosa* sp. cv. 'Armando' and *Rosa* sp. cv. 'Red Naomi'. The solanaceous crops used in the comparative study are tomato (*Solanum lycopersicum* cv. 'Money maker'), tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. 'White Burley'), eggplant (*Solanum melongena* cv. 'Black Beauty'), and sweet pepper (*Capsicum annuum*). Differences were observed in susceptibility between the two

ornamental rose cultivars after inoculations with the *R. solanacearum* strains isolated from rose. The cultivar 'Armando' showed to be more conducive to disease expression than cultivar 'Red Naomi'. For both ornamental rose cultivars there was a temperature dependency observed in susceptibility for the *R. solanacearum* strains isolated from rose. The solanaceous crops tested in this study all showed to be susceptible for the *R. solanacearum* strains in concern. Further, both ornamental rose cultivars were able to harbour infections with other *R. solanacearum* strains than those isolated from rose, without showing symptoms after stab inoculated in the stem.

Robert Vreeburg

Ontwikkeling en validatie bruinrot & ringrot multiplex-PCR

NAK

De NAK heeft samen met Nytor een multiplex-PCR ontwikkeld voor de detectie van *R. solanacearum* (veroorzaker van bruinrot) en *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (veroorzaker van ringrot) in asymptomatische aardappelknollen. Deze multiplex is samen met drie andere TaqMan-PCRs gevalideerd. De andere gevalideerde TaqMans zijn een multiplex Rsol+Cms van Massart *et al.* (2014),

een Cms enkelplex van Gudmestad *et al.* (2009) en een Rsol enkelplex van Weller *et al.* (2000). De Rsol specifieke TaqMan's verschilden in welke typen Rsol ze detecteerden. De Massart gaf alleen reactie bij een deel van de phylotype II isolaten, de Nytor PCR bij alle geteste phylotype I, II en III isolaten en de Weller bij alle geteste phylotype I, II en III isolaten en *R. syzygii*-isolaten.

We hebben een nieuw concept gebruikt voor het valideren van de gevoeligheid, herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid, gebaseerd op regressie analyse met schatting van de gemiddelde Ct en standaarddeviatie bij de detectielimiet.

Hiermee is de kans op het positief bevinden van een monster met 5×10^3 kve/ml geschat. Alle TaqMan-PCRs hebben de validatie gehaald en detecteren minimaal 95% van de monsters met 5×10^3 kve/ml.

Bart Geraats

Bayer Crop Science

Agglutinatie-PCR

We gaven een 'proof of principle' van agglutinatie-PCR. Hierin worden voor de PCR, als een voorzuivering, de doelbacteriën vanuit de monsterextracten eerst selectief geprecipiteerd met specifieke antilichamen. TaqMan-PCR werd direct uitgevoerd op

de geprecipiteerde pellets. Details van de methode en de 'proof of concept' werden bediscussieerd. Meer details kunnen op de volgende website worden teruggevonden: www.priorartdatabase.com (title: "agglutination PCR and its application in seed health testing").

Jan van der Wolf

WUR

Overleving van *Ralstonia solanacearum* en *R. pseudosolanacearum* in drain water

De overleving in drainwater werd onderzocht van twee stammen van *Ralstonia solanacearum* en drie stammen van *R. pseudosolanacearum*, waaronder twee stammen die in roos verwelking kunnen veroorzaken. Drainwater, verzameld van een rozengejas op steenwolmatten, werd voorzien van de ziekteverwekker. De overleving werd gevolgd gedurende een periode van 112 dagen bij een temperatuur 4, 12, 20 of 28 °C. Alle stammen konden bij 12 en 20 °C tenminste 112

dagen overleven, hoewel de populatiedichtheden wel sterk daalden. Bij 4 °C kon de ziekteverwekker 56 dagen overleven en bij 28 °C was de overlevingstijd stam-afhankelijk. In steriel (hittebehandeld) drainwater werd nauwelijks een afname in dichtheden gevonden gedurende een periode van 112 dagen. Er werden geen aanwijzingen gevonden voor het ontstaan van cellen in een levende, maar niet kweekbare vorm (VBNC's).