

## Eindverslag PPS

### “Preventie van *Ralstonia solanacearum* uitbraken in de Nederlandse land- en tuinbouw.”

Peter Bonants, Odette Mendes, Leo Poleij, Patricia van der Zouwen, Ilse Houwers, Viola Kurm, Cees Waalwijk, Theo van der Lee, Pieter Kastelein en Jan van der Wolf (Wageningen Plant Research)

Adriaan Vermunt en Petra Hollander (Stichting Control in Food & Flowers)

Alexandre Jousset, Pilar Eliana Puentes-Tellez en Jie Hu (Universiteit Utrecht)



T&U Nummer: 1605-082

Looptijd: 1 jan 2017 – 31 dec 2019



**WAGENINGEN**  
UNIVERSITY & RESEARCH

**CONTROL IN**  
**FOOD & FLOWERS**



**Universiteit Utrecht**

# Partners

## Contactgegevens hoofdaanvrager:

Naam private partij: Glastuinbouw Nederland  
Contactpersoon: Mw. Helma Verberkt

## Onderzoeksorganisatie:

Naam onderzoeksorganisatie: Wageningen Plant Research (WPR)  
Contactpersoon: Dr. Peter Bonants

## Partners:

1. LTO Noord Glaskracht/LTO Glaskracht Nederland; nu Glastuinbouw Nederland
2. Stichting Programmafonds Glastuinbouw,
3. Plantum,
4. Naktuinbouw,
5. NAK,
6. Gewascoöperatie Roos,
7. Gewascoöperatie Gerbera,
8. Stichting Wageningen Research,
9. Universiteit Utrecht,
10. Stichting Control in Food & Flowers.



## Overige:

NVWA was geen partner in het project maar heeft wezenlijk bijgedragen in discussie en overleg.

# Inhoudsopgave

Partners	2
Inhoudsopgave	3
Introductie	4
Doel	5
Werkplan	5
Samenvatting Resultaten (NL)	6
A: Ontwikkeling diagnostische methoden	6
A1: Genetische karakterisatie isolaten WUR	6
A2: Alternatief voor pathogeniteitsassay WUR	9
A3: Optimalisatie gevoeligheid WUR	11
B: Epidemiologie <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> in roos	15
B1. Waardplantenonderzoek WUR	16
Supplement. Productie en testen van antibiotica resistente stammen WUR	19
B1. Waardplantenonderzoek SCFF	22
B2. Infectieroutes SCFF	24
C: Preventie en Weerstandshoging	27
C1. Hygiëne- en teeltmaatregelen SCFF	27
C2. Weerstandshoging UU	29
C2. Weerstandshoging SCFF	31
Deliverables, Conclusions	33
Communications, Publications	34
Acknowledgements	35
Results (EN)	35
A: Development Diagnostic Methods	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
A1: Genetic characterization isolates WUR	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
A2: Alternative for the pathogenicity assay WUR	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
A3: Optimization sensitivity WUR	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
B: Epidemiology <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> in rose	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
B1: Host Plant Research WUR	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Supplement. Generation and testing of antibiotic resistant strains WUR	81
B1: Host Plant Research SCFF	92
B2: Routes of Infection SCFF	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
C: Prevention and increase of resilience	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
C1: Hygiene- and culture measurements SCFF	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
C2: Increase of resilience UU	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
C2: Increase of resilience SCFF	115

# Introductie

*Ralstonia solanacearum* (Rsol) is een quarantaine bacterie (2000/29/EG IAI; EPPO A2) die verwelkingsziekten kan veroorzaken in een breed scala aan economisch belangrijke gewassen, waaronder aardappel, tomaat en anthurium. De bacterie kent drie soorten, met daarbinnen isolaten die sterke genetische en fenotypische variatie, waaronder het waardplantenreeks, vertonen. In 2015 is een variant van de ziekteverwekker gevonden in kasrozen bij zowel kwekers als telers. Roos was tot deze besmetting niet bekend als waardplant van Rsol. De schade hiervan liep in de miljoenen door de verplichte vernietiging van plantmateriaal en bijpassende quarantaine- en hygiënemaatregelen. Ook is er reputatieschade opgelopen. Dit incident staat niet op zichzelf, want elk jaar zijn er in de tuinbouw één of meerdere infecties, waarbij uitroeiing van de bacterie gepaard gaat met aanzienlijke kosten. Bij het traceren, toetsen op aanwezigheid, en het instellen van maatregelen om verdere verspreiding te voorkomen, bleek er veel essentiële informatie niet voorhanden. Aan deze kennishiaten wordt gewerkt in dit projectvoorstel.

Binnen dit PPS project wordt innovatieve kennis gegenereerd op drie vlakken: A. Ontwikkeling van diagnostische methoden, B. Epidemiologie van Rsol in roos, C. Preventie. Daarnaast is communicatie van belang voor elk van de drie onderdelen.

Ad A: Een optimale toets voor Rsol is snel, betrouwbaar, gevoelig, goedkoop en kan pathogeniteit en verwantschap aantonen. De nu gebruikte toets kent een trage biotoets en geeft geen informatie over verwantschap.

Ad B: Over met name de epidemiologie van Rsol in de aardappel is al veel kennis beschikbaar. Echter, over de variant die roos kan aantasten is weinig bekend. Om risico's van introductie en verspreiding van Rsol in gewassen die van belang zijn voor de Nederlandse land- en tuinbouw beter te kunnen inschatten wordt het waardplantspectrum van stammen die via uitbraken en intercepties beschikbaar zijn gekomen in kaart gebracht. Ook worden in verband met risico-bepalingen, de infectieroutes, infectieprocessen en overlevingsstrategieën van Rsol in roos nader bestudeerd.

Ad C: Met behulp van resultaten uit A en B kan de preventiestrategie geoptimaliseerd worden. Door deze zo effectief en goedkoop mogelijk in te richten is de kans op voorkomen van nieuwe infecties het grootst. Daarnaast wordt onderzoek verricht naar weerstandsverhoging van de plant m.b.v. probiotica.

Ondernemers, maar ook de NVWA namens de overheid, hebben behoefte aan nieuwe kennis. In het project krijgt dit een serieuze plek. Het project wordt gedragen door de overheid en een breed consortium van vermeerderaars en telers uit de Nederlandse land- en tuinbouw.

Op de diverse onderdelen gaat het project kennis opleveren voor *Ralstonia pseudosolanacearum* in roos:

- kennis van het genoom van de bacterie,
- kennis over verspreiding van de bacterie in de rozenteelt,
- kennis over verbetering diagnostiek,
- kennis over preventie maatregelen en
- kennis over weerstandsverhoging tegen *Ralstonia*.

Daarnaast wordt deze kennis uitgerold naar andere gewassen die waardplant kunnen zijn van *Ralstonia* (o.a. Gerbera en potplanten).

# Doel

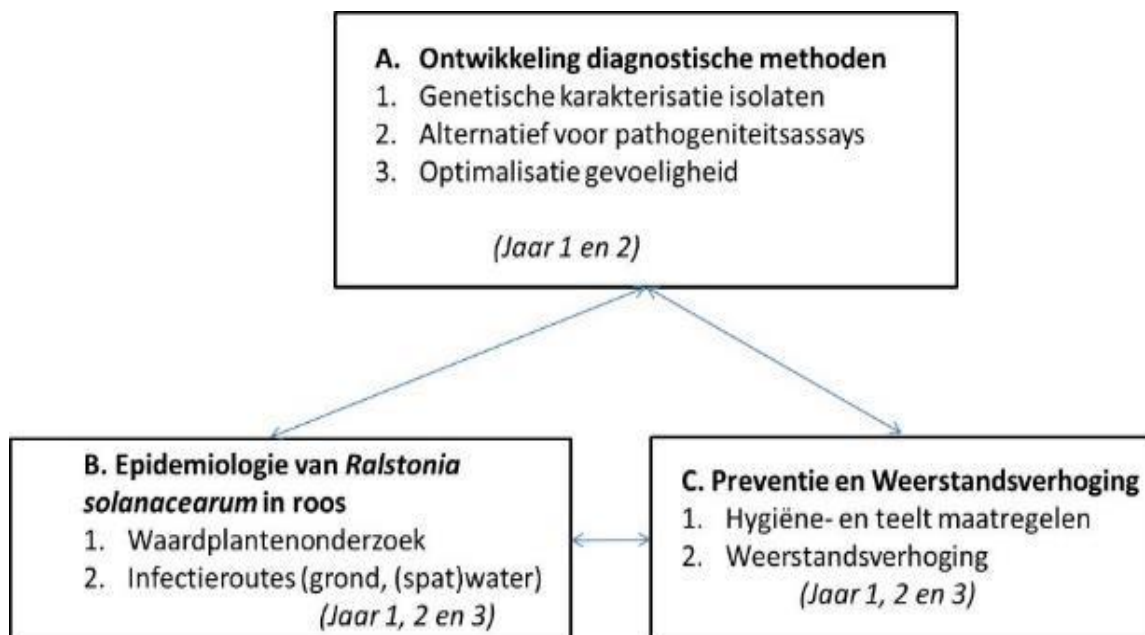
Doel van dit project is om innovatieve kennis te genereren op drie vlakken:

- A. Ontwikkeling van diagnostische methoden;
- B. Epidemiologie van Rsol in roos;
- C. Preventie en weerstandsverhoging.

*Ralstonia solanacearum* (Rsol) is een quarantaine bacterie die verwelkingsziekten kan veroorzaken in een breed scala aan economisch belangrijke gewassen. In 2015 bleek dat kasrozen een nieuwe waardplant zijn voor Ras 1 en er is in één jaar tijd een schade opgelopen van miljoenen euro's door de verplichte vernietiging van plantmateriaal en bijbehorende quarantaine- en hygiënemaatregelen. Op het gebied van diagnostiek, epidemiologie, preventie en weerbaarheid liggen er diverse vragen vanuit de veredelaars, vermeerderaars, telers, keuringsdiensten en NVWA om Rsol uit de rozenketen weg te houden en in geval van nieuwe besmetting snel te kunnen elimineren. Indien Rsol in de Nederlandse rozenketen niet geëlimineerd kan worden, heeft dat zeer grote gevolgen voor met name de Nederlandse afzet van tuinbouwproducten en het Nederlandse uitgangsmateriaal dat een 0-tolerantie kent. Met de huidige kennis en toetsen is er een groot risico op herhaling. Daarbij is het niet uitgesloten dat ook in andere gewassen Rsol kan uitbreken. Rsol speelt bovendien een belangrijke rol in de aardappelteelt. Ras 3 van de bacterie heeft herhaaldelijk gezorgd voor besmettingen in de aardappelkolom. De ontwikkeling van snelle, betrouwbare diagnostische methoden waarmee Rsol op grote schaal tegen lage kosten kan worden gedetecteerd. Voor de ontwikkeling en validatie van deze methoden worden stammen van Rsol genetisch gekarakteriseerd.

# Werkplan

Binnen dit project is aandacht besteed aan drie onderdelen (Figuur 1).



**Fig. 1.** Outline Project PPS *Ralstonia*.

# Samenvatting Resultaten (NL)

## A: Ontwikkeling diagnostische methoden

WUR

### A1: Genetische karakterisatie isolaten

WUR

## Introductie

Voor de fylogenetische classificatie van stammen binnen RSSC (*Ralstonia solanacearum* species complex) zijn verschillende principes gebruikt. Traditioneel was de classificatie gebaseerd op verschillen in host range (gastheerbereik), resulterend in een onderverdeling in vijf races (Buddenhagen, 1962) en op biochemische eigenschappen resulterend in zes biovars of biotypes. Moleculaire fylogenieën op basis van ITS-sequenties differentiëren 4 phylotypes (I, II, III en IV) en phylotype II wordt verder gedifferentieerd in IIA en IIB. Elk phylotype herbergt voornamelijk stammen van een specifieke geografische oorsprong: phylotype I is afkomstig uit Azië, terwijl stammen van phylotype II geïsoleerd zijn in Noord- en Zuid-Amerika en phylotype III komt het meest voor in Afrika. Phylotype IV lijkt het meest divers te zijn, met isolaten uit Japan, de Filipijnen en Australië (Ailloud et al., 2015; Safni et al., 2014). Groepering binnen de phylotypes werd gedaan op basis van endoglucanase-gen (*egl*) sequenties resulterend in 53 sequevars (Albuquerque et al., 2014). Onlangs is deze overlappende classificatie opgelost door Safni et al. (2014) die een polyfasische benadering gebruikte om het soortencomplex te herzien in drie soorten: *R. solanacearum* (phylotypes IIA en IIB), *R. pseudosolanacearum* (phylotypes I en III) en *R. syzygii* (phylotype IV) met drie ondersoorten, *R. syzygii* subsp. *syzygii*, *R. syzygii* subsp. *celebesensis* en *R. syzygii* subsp. *indonesiensis*. De robuustheid van dit classificatiesysteem werd bevestigd door hele genoomsequencing (Ailloud et al., 2015). Enkelvoudige orthologen ( $n = 686$ ) onder de genomen van 39 stammen suggereren dat phylotypes IIA en IIB verschillende ondersoorten kunnen vertegenwoordigen (Zhang en Qiu, 2016). Deze auteurs ondersteunen ook de classificatie van phylotype I en III als ondersoort van *R. pseudosolanacearum*. Hun analyses van in silico-DNA-DNA-hybridisaties ondersteunen echter de verdeling van phylotype IV (*R. syzygii*) in meerdere ondersoorten (Zhang en Qiu, 2016) niet. De herclassificatie in soorten vereist dat de taxonomische positie van in stammen verzamelde bacteriestammen opnieuw wordt onderzocht.

## Methoden

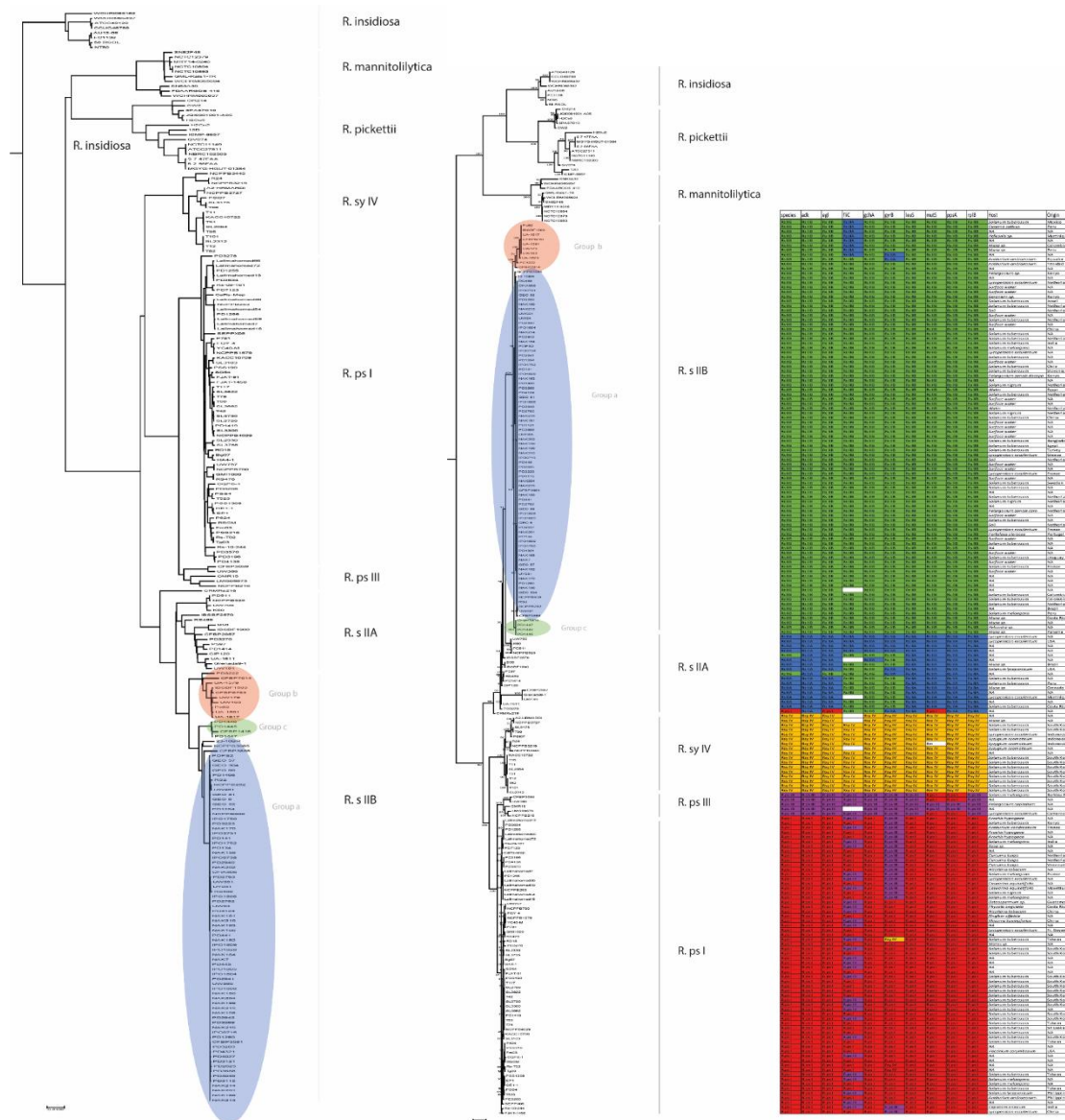
Recente ontwikkelingen in sequencing-technieken evenals in bio-informatica laten toe om een grote hoeveelheid sequencing-gegevens te genereren en te verwerken. Er komen steeds meer complete genoomsequenties beschikbaar die vervolgens kunnen worden gebruikt om eerdere aannames te evalueren en nieuwe inzichten te genereren. Voor de beoordeling van fylogenetische verwantschap kunnen hele genomen worden gebruikt voor de berekening van de gemiddelde nucleotide-identiteit (ANI), die de evolutionaire afstand tussen stammen meet met behulp van alle geconserveerde genen (Arahal et al., 2014). ANI-analyse is al met succes gebruikt om de fylogenetische identificatie van een klein aantal bekende *Ralstonia*-stammen te bevestigen (Remenant et al., 2010; Prior et al., 2016). Met een toenemend aantal sequenties beschikbaar, kan ANI worden gebruikt om bestaande kennis over fylogenie te bevestigen en nieuwe stammen te classificeren. Bovendien is multilocus sequentie analyse (MLSA) met succes toegepast voor de classificatie van stammen in de RSSC.

## Resultaten

Om de classificatie van het *Ralstonia solanacearum*-soortcomplex (RSSC) op te lossen, gebruiken we hele genoomsequentiegegevens van 120 stammen voor fylogenetische karakterisatie door middel van gemiddelde nucleotide-analyse (ANI) en multilocus-sequentieanalyse (MLSA). Op basis van deze analyses konden alle stammen worden gegroepeerd in drie soorten en vijf phylotypes. MLSA toonde bovendien potentiële recombinatie tussen de phylotypes en beide assays toonden een clustering van phylotype IIB in drie groepen. Bovendien werden de gehele genoomsequenties gebruikt voor een in silico-analyse van 7 TaqMan en 12 conventionele PCR. De analyse toonde een hoog niveau van variatie in mismatches (SNP's) tussen de 120 doelsequenties en de verschillende primersets. Op basis van het aantal SNP's zouden twee TaqMan-assays gericht op de 16S rDNA-sequentie alle phylotypes van de RSSC moeten kunnen detecteren. Binnen phylotype IIB werden verschillen in SNPS gedetecteerd voor



verschillende testen volgens de clustering die werd gevonden door ANI (Figuur 2) en MLSA (Figuur 3), hetgeen primerspecificiteit op een sub-phylotype niveau aangeeft. We concluderen dat hele genomesequenties nuttig zijn voor classificatie van stammen binnen de RSSC en de keuze van geschikte TaqMan- en PCR-testen voor efficiënte detectie van de ziekteverwekker kunnen vergemakkelijken.



**Fig. 2 (links).** Neighbour joining tree van ANI paarsgewijze afstanden.

**Fig. 3 (rechts).** Maxim likelihood tree gegenereerd op basis van de aaneengesochte sequenties van 9 genen die worden gebruikt in de MLSA. De tabel rechts geeft de gastheer, het land van herkomst en het fylotype van de 9 afzonderlijke genen van elke stam aan. Lege velden geven aan dat het gen niet aanwezig is in betreffend isolaat. Verschillende kleuren geven verschillende phylotypes aan. De rozenstam (PD7123) behoort tot groep R.ps I.

**Tabel 1.** Schatting van de geschiktheid voor de PCR- en TaqMan-assays om alle vijf fylotypes en daarnaast de drie subgroepen van fylotype IIB te detecteren. + = gedetecteerd, - = niet gedetecteerd, / = niet doorslaggevend. De rozenstam (PD7123) behoort tot groep R.ps I.

	I	IIA	IIB	IIB	IIB	III	IV
			a	b	c		
<b>Chen</b>	+	-	/	/	/	+	+
<b>Guidot 1</b>	-	-	+	-	-	-	-
<b>Guidot 2</b>	-	-	+	-	-	-	+
<b>Guidot 3</b>	-	-	+	-	-	-	-
<b>Huang</b>	+	/	/	/	/	-	+
<b>Körner</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Massart</b>	-	+	+	+	+	-	-
<b>Nmult 1</b>	+	-	-	-	-	-	+
<b>Nmult 2</b>	-	+	+	+	+	-	-
<b>Nmult 3</b>	-	-	-	-	-	+	-
<b>Nmult 4</b>	-	-	-	-	-	-	+
<b>Opina</b>	+	+	+	+	+	/	+
<b>Ozakman</b>	-	-	+	-	-	-	-
<b>Pastrik</b>	-	+	+	+	+	-	-
<b>Seal</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Nytor</b>	+	+	+	+	+	+	-
<b>Weller</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Weller II</b>	-	-	+	+	+	-	-
<b>Wu</b>	+	+	+	+	+	+	+

## Conclusies

In deze studie demonstreerden we de toepassing van hele genomesequenties voor classificatie van het *Ralstonia solanacearum*-soortencomplex. Door sequenties van 192 stammen van het RSSC te genereren en te verzamelen, konden we de classificatie van de huidige soort bevestigen met behulp van een ANI- en MLSA-benadering. Daarnaast laten we zien dat zowel de gemiddelde nucleotide identiteit (ANI) als de multi locus sequencing analyse (MLSA) groepering van stammen op een subfylotype niveau kan onthullen. De rozenstam (PD7123) behoort tot groep R.ps I. Nieuwe stammen kunnen snel en betrouwbaar in deze classificatie worden geplaatst op basis van hun hele genomesequenties, wat waardevol zal zijn in forensisch onderzoek. Verder hebben we aangetoond dat hele genomesequenties gebruikt kunnen worden om de specificiteit van op PCR gebaseerde diagnostische methoden te



evalueren, waaronder bv. qPCR-assays die ontwikkeld zijn voor de detectie en kwantificering van RSSC. Dit ondersteunt de selectie van de meest betrouwbare assay voor detectie van alle of slechts bepaalde groepen van het RSSC. Verdere studies zullen moeten uitwijzen of volledige genomsequentiegegevens ook kunnen worden gebruikt om gastheer-pathogeeninteracties te beoordelen, bijvoorbeeld door de identificatie van virulentiegerelateerde genen. Aldus is sequentiebepaling van volledig genoom een veelbelovend hulpmiddel voor het beoordelen en vergelijken van fylogenetische en fenotypische eigenschappen van bacteriële taxa, aangezien er steeds meer volledige genomsequenties beschikbaar komen.

## A2: Alternatief voor pathogeniteitsassay

WUR

### Introductie

Niet alle isolaten van *Rsol* zijn ziekteverwekkend. Daarom worden isolaten gecontroleerd op pathogeniteit in bio-toetsen die tot vier weken in beslag kunnen nemen. Er is sterke behoefte aan een sneller alternatief. In verband hiermee is er een literatuurstudie uitgevoerd door DLO naar genen die betrokken zijn bij de virulentie van *Rsol* stammen inclusief regulatoren (Waalwijk & Van der Wolf, 2016). Genen die betrokken zijn bij de productie van extracellulaire polysacchariden, secretiesystemen, celwandafbrekende enzymen, beweeglijkheid, detoxificatie en stress response zijn als mogelijke kandidaten voor de ontwikkeling van moleculaire assays geïdentificeerd. De literatuurstudie omvatte het gehele *Ralstonia solanacearum* species complex en de expressie van pathogeniteitsgenen zowel in planta als ook op artificieel medium.

De studie beschrijft ook de opties voor ontwikkeling van een moleculaire assay op basis van detectie van expressie van pathogeniteitsgenen die de huidige pathogeniteitsassay kan vervangen.

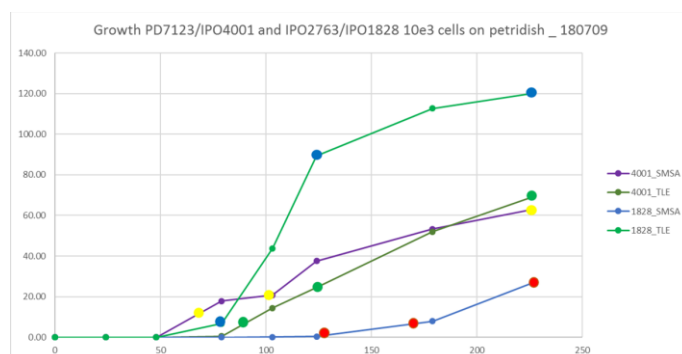
### Doel

Identificatie van genen gerelateerd aan virulentie als doelen voor moleculaire assay om bestaande bio-assay te vervangen. Deze test moet gericht zijn op gen (en) die differentiële expressie tussen algemene en inducerende media, b.v. plantenextracten. Bovendien moet de test alle *Ralstonia*-soorten oppikken.

### Methoden

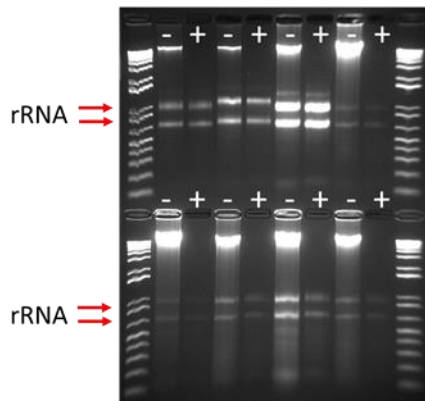
Bacteriën (roos isolaat PD7123 = IPO4001 en aardappelisolaat PD2763 = IPO1828) werden gekweekt op algemene en inducerende media, te weten. SMSA versus SMSA + tomatensap-agar of tomatenbladextract. Dit leek het beste de in planta-toestand na te bootsen op de algemene *R. solanacearum*-host tomaat.

Uit groeicurves op deze media (Figuur 4) is besloten dat RNA uit vroege en mid-log fase fasen moet worden geëxtraheerd (respectievelijk 70-80 uur versus 100-120 uur). Uitzondering was de aardappelstam, gekweekt op SMSA, die ongeveer 48 uur later werd geoogst.



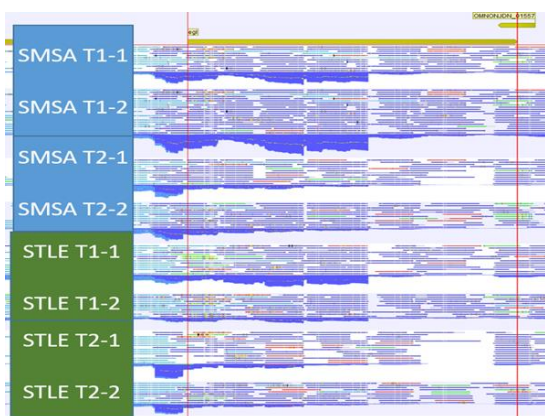
**Fig. 4.** Groeicurves van *R. sol* PD7123 en IPO2763 op SMSA medium aangevuld met tomaten bladextract (TLE).

RNA-extractie werd uitgevoerd volgens het protocol van de fabrikant (Qiagen RNeasy Plant minikit) en DNA werd verwijderd door behandeling met DNase (Figuur 5).



**Fig. 5.** Verwijdering van DNA uit RNA-monsters. RNA-monsters werden onbehandeld (-) of behandeld (+) met DNase. Het is duidelijk dat de verwijdering van DNA succesvol was, zonder interfereren met RNA, zoals beoordeeld op basis van de intensiteiten van de rRNA-banden (met een pijl aangegeven).

RNA-monsters werden verwerkt door de interne sequentiefaciliteit bij BioScience. Ontvangen sequentiegegevens werden geanalyseerd op kwantiteit en kwaliteit. Van alle groeiomstandigheden werden de meest recente lezingen verkregen, variërend van 20 tot 30 miljoen en > 90% voldeed aan het kwaliteitscriterium Q30. Bij het in kaart brengen van de reads naar het genoom van een van de isolaten werd echter een vreemd patroon waargenomen (Figuur 6 en 7). Veel van de toegewezen reads begonnen of eindigden als vaste posities, hetgeen duidt op een niet-willekeurige verdeling van de reads in de gegevensset.



**Fig. 6.** Het in kaart brengen van RNAseq reads van verschillende groeiomstandigheden tot het referentiegenoom. Het *egl*-gen wordt getoond als een voorbeeld van de onregelmatige mapping van de reads.



**Fig. 7.** Afwijkende afbeelding van reads waarvan vele beginnen en of eindigen op dezelfde positie.

Daaropvolgende analyses gaven aan dat een groot deel van de reads werd toegeschreven aan rRNA, wat aangeeft dat het protocol voor verwijdering van rRNA vóór de constructie van de bibliotheek niet succesvol was. De overgrote meerderheid van de reads werden toegeschreven aan een van de vier rDNA-kopieën.

De lage coverage van reads over het genoom maakte het niet mogelijk om te onderzoeken of er gen sequenties zijn die verschillen in expressie tussen groeiomstandigheden vertonen.

Derhalve werd deze benadering niet verder voortgezet.

## Conclusies

1. Beide isolaten reageerden verschillend op de behandelingen.
2. Toevoeging van tomatenblad extract (TLE) aan het standaard medium (SMSA) geeft een duidelijk verbeterde groei van Rsol te zien.
3. Geen van de kandidaat-effectoren was aanwezig in alle phylotype maar afwezig in stammen van phylotype IV. ripAP leek de beste kandidaat met afwezigheid in slechts één stam onder 41 phylotype I en één onder negen IIA-stammen.
4. Effector-kandidaatgenen waren slecht tot expressie gebracht, waardoor ze niet geschikt waren voor vervanging van de bioassay.
5. Potentieel interessante kandidaten die voortkwamen uit differentiële expressie-analyses waren een cluster van genen aanwezig in de rozenstam en afwezig in de aardappelstam. Helaas toonde dit cluster aan dat het was afgeleid van een bacteriofaag-insertie in het genoom van PD7123 zoals werd aangetoond door BLASTx.

## A3: Optimalisatie gevoeligheid

WUR

### Introductie

Het *Ralstonia solanacearum*-soortencomplex (RSSC) kan in veel verschillende plantensoorten bacteriële verwelking veroorzaken, waaronder een aantal siergewassen. Om kasgewassen te testen op de aanwezigheid van de ziekteverwekker, kan bemonstering van water uit een drainagegoot of put een efficiënte strategie zijn, omdat dit water in contact is geweest met het wortelsysteem van veel planten en het bekend is dat RSSC kan vrijkomen uit geïnfecteerde wortels in het water. De dichtheden in het drainwater kunnen laag zijn, vooral in het geval van een gewas zonder symptomen, waardoor het gebruik van protocollen met een hoge diagnostische gevoeligheid noodzakelijk is. In dit onderdeel is derhalve gekeken naar verschillende aspecten ter verbetering van de detectie van Rsol in drainwater:

- Bemonstering drainwater, monster grootte
- Filtreren, centrifugeren
- Verbeteren groeimedium
- TaqMan assay: twee loci incl interne controle

### Methoden

In eerste instantie is geïnventariseerd welke methode door de partners worden gebruikt voor de detectie van Rsol in drainwater. Experimenten zijn uitgevoerd om de detectie te verbeteren in drainwater: Gekeken is naar monstergrootte/filtreren/centrifugeren/verrijken van drainwater. Gebruikmakend van de inventarisatie onder de partners is er verder gewerkt aan het verbeteren van de DNA-extractie en de TaqMan PCR assay om remming van de reactie te voorkomen.

*R. pseudosolanacearum* isolaat PD7123 (IPO4001) geïsoleerd uit rozenplant in kassen (Tjou-Tam-Sin et al., 2017) en IPO1828 (PD2763) geïsoleerd uit aardappel, zijn gebruikt in deze studie.

Drainwater werd geleverd door telers van kasrozen in Nederland. In totaal zijn vier maal verse drainwatermonsters verzameld. De microbiële achtergrond van de monsters was gemiddeld 500 en 1300 kve / ml, zoals bepaald door uitplaten op YPGA. Voor filtratie werd 250 ml van de drainwatermonsters door een MF-Millipore™ membraanfilter gevoerd met een poriegrootte van 0,45 µm (Mixed Cellulose Esters, 47 mm diameter, HAWP04700), Merck-Millipore (Duitsland) met behulp van een glazen vacuümfiltratie-apparaat, Sartorius (Duitsland).

De groei van *R. solanacearum* IPO1828 (PD2763) en *R. pseudosolanacearum* PD7123 in SMSA werd vergeleken met de groei in SMSA (Elphinstone et al., 1996.) aangevuld met een 20 g / l tomatenbladextract (SMSA-TLE).

De detectie van *R. solanacearum* IPO1828 (PD2763) en *R. pseudosolanacearum* PD7123 werd uitgevoerd met beschreven methodes (Nytor, Weller ) en gebruikmakend van een interne controle.

Er zijn diverse experimenten uitgevoerd om de gevoeligheid van de detectie te verbeteren: monstergrootte/filtreren/centrifugeren/verrijken van drainwater. Het verrijken in een semi-selectief vloeibaar medium leidt niet tot verbetering van de gevoeligheid, maar het concentreren d.m.v. filtratie in een aantal gevallen wel.

## Resultaten

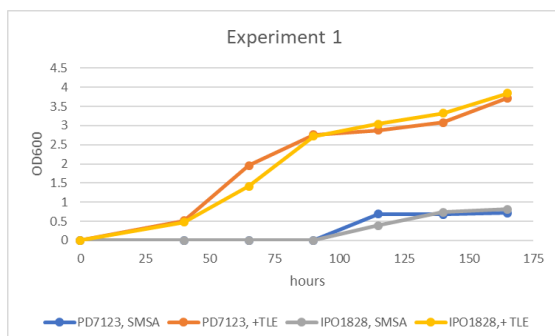
Een eerste inventarisatie van gebruikte methoden bij de partners is gemaakt (Tabel 2).

**Tabel 2.** Gegevens van de partners m.b.t. centrifugatie en filtratie van watermonsters voor de detectie van *R. solanacearum*.

	Reference method 1 = centrifugation			Reference method 2 = filtration	
	NVWA	NAK	GAC		Naktuinbouw
Start volume	2x 50 ml	50 ml	50 ml	Start volume	250 ml
Afdraaien	5 min 7000 xg	10 min 10000 xg	?	Vacuüm filtratie	Filter xx
Pellet opnemen	1 cm onder de rand van buis + 0.5 ml PB 10 mM	1 ml PB 10 mM	1.5-2 ml laten staan	Filter spoelen	in 2 ml xx Buffer
Uitplaten op SMSA	in duplo	2x 100 µl	3x 333 µl	Uitplaten op	in duplo
Incubation °C	26-30 °C	28 °C		Incubatie °C	
Incubation Time	5-6 dagen	3-6 dagen		Incubatie Tijd	
TaqMan	op colonies	op colonies	op colonies	Taqman	op colonies

## Detectie in drainwater

Twee isolaten van Rsol complex zijn opgegroeid in SMSA waaraan wel of geen tomatenblad extract is toegevoegd (Figuur 8). Duidelijk is te zien dat het medium met tomatenblad extract een betere groei te zien geeft voor beide Rsol isolaten.



**Fig. 8.** Groeicurves gebaseerd op metingen van de troebelheid (optische dichtheid bij 600 nm) van *Ralstonia pseudosolanacearum* PD7123 en *R. solanacearum* IPO1828 in SMSA of SMSA met daaraan toegevoegd tomaten blad extract (TLE).

Rsol is in een verdunningsreeks toegevoegd aan drainwater; vervolgens is het drainwater gefiltreerd en is DNA geïsoleerd uit de bacteriecellen op het bacteriefilter. Dit DNA is vervolgens met de twee duplex TaqMan assays (Nytor/IC en Weller/IC) geanalyseerd (Tabel 3). Resultaten laten duidelijk zien dat de combinatie Nytor/IC een verbeterde gevoeligheid oplevert na filtratie.

**Tabel 3.** Resultaten van de duplex TaqMan PCR voor *Ralstonia pseudosolanacearum* toegevoegd aan drainwater, voor en na filtratie. DNA geïsoleerd van reïncultures van *R. pseudosolanacearum* zijn als controle gebruikt.

Density (CFU/ml)	Ct-values			
	Nytor <sup>1</sup>	IC <sup>2</sup>	Weller <sup>3</sup>	IC
<b>Before filtration</b>				
10 <sup>5</sup>	29.2* <sup>4</sup>	30.4*	31.8*	31.6*
10 <sup>4</sup>	33.2±0.7	31.2±0.7	ND <sup>5</sup>	31.2±0.2
10 <sup>3</sup>	ND	31.0±1.2	ND	30.8±0.5
10 <sup>2</sup>	ND	31.5±1.7	ND	30.7±0.2
10 <sup>1</sup>	ND	31.6±2.0	ND	31.7±0.3
10 <sup>0</sup>	ND	32.0±2.5	ND	32±0.9
0	ND	31.4±1.4	ND	31.7±0.7
<b>After filtration</b>				
10 <sup>5</sup>	20.1*	29.7*	20.6*	31.5*
10 <sup>4</sup>	22.9±0.2	29.7±0.6	25.9±0.4	30.5±0.4
10 <sup>3</sup>	26.9±0.2	30.7±0.8	ND	31.0±0.1
10 <sup>2</sup>	31.2±1.0	31.1±1.1	ND	31.8±0.9
10 <sup>1</sup>	36.3±1.9	31.0±0.7	ND	31.1±0.3
10 <sup>0</sup>	ND	31.0±1.2	ND	31.8±1.3
0	ND	31.1±0.9	ND	31.2±0.2
<b>DNA from pure cultures (pg/μl)</b>				
<i>R. pseudosolanacearum</i>	Nytor	IC	Weller	IC
1000	23.1±0.7	31.4±1.4	24.1±0.6	32.1±0.2
100	28.1±1.5	32.1±1.1	29.2±0.7	32.9±0.2
10	31.4±1.2	32.8±1.7	32.9±0.8	32.8±0.7
1	36.6±1.4	33.5±2.3	ND	32.9±0.3
0.1	ND	33.4±2.2	ND	33.3±0.9

<sup>1</sup> Vreeburg et al., 2018; <sup>2</sup> IC = internal extraction and amplification control based on a spike of samples with a low density of *Acidovorax cattleya* (Bonants et al., 2019); <sup>3</sup> Average Ct values with the standard deviations are provided (N=2)

<sup>4</sup> ND = no signal detected; <sup>5</sup> No *A. cattleya* supplemented

In het volgende experiment zijn de gefiltreerde bacteriën verrijkt in een vloeibaar SMSA medium met tomatenblad extract. DNA is vervolgens uit het SMSA-TLE medium geïsoleerd en vervolgens met de duplex (Nytor/IC) TaqMan assay geanalyseerd (Tabel 4)

**Tabel 4.** Resultaten van de duplex TaqMan PCR voor *Ralstonia pseudosolanacearum* toegevoegd aan gefiltreerd drainwater, voor en na incubatie in een SMSA medium met/zonder tomatenblad extract (SMSA-TLE).

Density (CFU/ml)	Before dilution in SMSA-TLE		After incubation in a ten-fold dilution in SMSA-TLE at 25 °C							
			Day 0		Day 2		Day 4		Day 7	
	Nytor <sup>1</sup>	IC <sup>2</sup>	Nytor	IC	Nytor	IC	Nytor	IC	Nytor	IC
<b>efore filtration</b>										
10 <sup>4</sup>	32.4±0.4 <sup>3</sup>	30.9±0.6	35.1±0.3	30.8±1.2	21.4±0.3	30.6±0.2	20.0±0.6	29.6±0.3	20.4±0.3	29.6
10 <sup>3</sup>	ND <sup>4</sup>	30.7±0.9	ND	31.3±1.6	23.7±0.3	30.9±0.2	24±0.4	30.8±0.1	25.3±0.3	30.1±0.1
10 <sup>2</sup>	ND	30.8±0.8	ND	30.5±0.9	25.5±0.3	31.0±0.5	25.2±0.3	30.4	25.3±0.3	29.8±0.2
10 <sup>1</sup>	ND	31.5±1.2	ND	31.0±1.2	30.2±0.4	31.7	29.6±0.2	31.2±0.1	31.1±0.3	30.4
10 <sup>0</sup>	ND	32.4±1.9	ND	31.4±1.3	ND	31.5±0.2	34.0±1.0	31.4±0.2	35.5±3.8	31.4±0.8
0	ND	31.7±1.0	ND	30.3±1.2	ND	31.8±0.1	ND	31.3	ND	30.6±0.6
<b>after filtration</b>										
10 <sup>4</sup>	22.7±0.6	29.9±0.8	29.1±1.0	30.3±1.2	18.0±0.2	30.5±0.2	17.6±0.3	30.3±0.3	17.1±0.8	29.8±0.4
10 <sup>3</sup>	26.8±0.8	30.8±1.0	35.2±2.0	30.4±1.2	21.9±0.4	30.5±0.2	20.9±0.2	30.3±0.3	20.7±0.4	29.4
10 <sup>2</sup>	31.7±0.9	31.8±0.9	ND	30.1±1.0	24.2±0.4	30.6±0.1	23.8±0.3	30.5±0.1	26.6±1.5	29.7±0.1
10 <sup>1</sup>	37.2±0.7	30.9±0.9	ND	30.6±1.4	27.0±0.3	31.1	27.4±0.3	31.1±0.2	29.0±0.7	30.1±0.1
10 <sup>0</sup>	ND	31.0±1.0	ND	31.3±0.3	33.6±0.6	31.7	33.1±0.3	31.4	ND	31.8±1.0
0	ND	31.3±1.3	ND	30.9±0.9	ND	31.4±0.1	ND	31.4±0.2	ND	30.4

Om de ziekteverwekker in een kas te detecteren kan het bemonsteren en analyseren van drainwater een efficiënte strategie zijn. Het verzamelde water is in contact geweest met een groot aantal planten en uit het onderzoek naar de verspreiding en kolonisatie van *R. pseudosolanacearum* in rozen is gebleken dat de wortels de bacteriën kunnen afgeven aan het voedingswater. Er wordt wel verwacht dat de dichtheden in het water laag zullen zijn, zeker in het geval van een symptoomloos gewas. Dit vraagt om protocollen met een hoge diagnostische gevoeligheid. Wij hebben een protocol (zie Sedighian et al. 2020) ontwikkeld waarin we lage dichtheden (~1 cfu/ml) kunnen detecteren. Het protocol is gebaseerd op het concentreren van bacteriën in drainwater door bacteriefilter, het ophopen van *R. pseudosolanacearum* d.m.v. incubatie van het concentraat in een selectief vloeibaar medium en detectie d.m.v. een TaqMan assay.

Water uit een drainput werd verzameld bij een Nederlandse rozenteler. Aan het water dat vrij was van *R. pseudosolanacearum* werden olopemde dichtheden van de ziekteverwekker toegevoegd. Het water (250 ml) werd verzameld door filtratie door een 0.45 µm bacteriefilter. Het filtraat werd losgetrild in 4 ml fosfaatbuffer en overgebracht in een erlemeyer met 36 ml van het vloeibare verrijkmingsmedium, SMSA waaraan een tomatenbladextract aan toe was gevoegd (SMSA-TLE). Tegelijk werd ook een verrijking uitgevoerd zonder op het ongefilterde monster. Uit aanpalend onderzoek was gebleken dat de toevoeging van het extract aan de SMSA de verrijking veel efficiënter deed verlopen. De monsters werden gedurende 2, 4 of 7 dagen bij 25 °C geïncubeerd. Voor DNA extractie werd voor controle op extractie en amplificatie *Acidovorax cattleya* in een vaste dichtheid aan de monsters toegevoegd. Het DNA werd geëxtraheerd m.b.v. een QIAGEN DNeasy PowerWater Kit, waarna detectie m.b.v. een TaqMan assay plaatsvond. Deze werd uitgevoerd in een duplex of een triplex format. In het duplex format werd de detectie van de ziekteverwekker uitgevoerd met een TaqMan assay gebaseerd op de Nytor primers en probe ('Nytor' assay, Vreeburg et al., 2016). Een extractie en amplificatie controle werd uitgevoerd op basis van een *A. cattleya* (Acat) primers en probe beschreven door Bonants et al. (2019). In de triplex format werd hier een TaqMan assay aan toegevoegd gebaseerd op 16S rDNA primers en een (gemodificeerde) probe beschreven door Weller et al. (2000) ('Weller' assay).

De 'Weller' assay bleek een hoge detectiegrens (lage gevoeligheid) te hebben wanneer kunstmatig besmet drainwater werd gebruikt. Bij lage dichtheden resulteerde dit in vals-negatieve resultaten. Daarom werd in vervolg onderzoek de TaqMan in duplex format gebruikt met de 'Nytor' en 'Acat' assay. Filtratie resulteerde in een verlaging van de detectiegrens met ca. een factor 100. Verrijking van zowel gefiltreerd als niet-gefiltreerd monstermateriaal in SMSA-TLE resulteerde ook in een verlaging van de detectiegrens met een factor 100. Een incubatietijd langer dan 2 dagen resulteerde niet in een verbetering van de gevoeligheid. De assay kan in principe ook gebruikt worden voor detectie van *R. solanacearum* in oppervlaktewater, omdat ook deze bacterie wordt gedetecteerd met de 'Nytor' assay en ook goed uitgroeit in SMSA-TLE. Een publicatie (in het Engels) is toegevoegd aan dit verslag.

## Conclusies

Uiteindelijk is een protocol ontwikkeld om lage dichtheden van *Ralstonia pseudosolanacearum* in drainwater van rozentelers te detecteren. Hiervoor werd achtereenvolgens drainwater gefiltreerd door een bacteriefilter, het concentraat werd verzameld en doelbacteriën werden verrijkt gedurende 48 uur in een SMSA-medium aangevuld met gesteriliseerde tomatenplantenextracten (SMSA-TLE). DNA, geëxtraheerd uit het verrijkingsmedium werd geanalyseerd met behulp van TaqMan-testen in een duplex-formaat, gebaseerd op specifieke egl-sequenties van RSSC en het gebruik van een extractie- en amplificatiecontroles. Het geoptimaliseerde protocol stelde ons in staat om zo laag als 1-10 kolonievormende cellen van *R. pseudosolanacearum* per ml drainwater te detecteren.

## Referenties

Bonants P, Griekspoor Y, Houwers I, Krijger M, van der Zouwen P, van der Lee TA et al. (2019) Development and evaluation of a triplex taqMan assay and next-generation sequence analysis for improved detection of *Xylella* in plant material. Plant Disease Doi: 10.1094/ PDIS-08-18-1433-RE.

Sedighian, N., Mendes, O., Poleij, L., Bonants, P., van der Wolf, J. 2020. Detection of *Ralstonia pseudosolanacearum* in drain water based on concentration, enrichment and the use of a duplex TaqMan PCR test. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2020) 50 (2), 340–349.

Vreeburg R, Zendman A, Pol A, Verheij E, Nas M & Kooman-Gersmann M (2018) Validation of four real-time TaqMan PCR s for the detection of *Ralstonia solanacearum* and/or *Ralstonia pseudosolanacearum* and/or *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers using a statistical regression approach. EPPO Bulletin 48, 86-96.

Weller, S., Elphinstone, J., Smith, N., Boonham, N., Stead, D. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. Appl. Environ. Microbiol., 66(7): 2853-2858.

## B: Epidemiologie *Ralstonia pseudosolanacearum* in roosWUR/SCFF

Over de epidemiologie van de Rsol variant die in gematigde klimaatzones in de aardappel voorkomt (biovar 2, race 3) is al veel bekend (Elphinstone, 2005). Ook bestaat er veel literatuur over de epidemiologie van de tropische varianten (biovar 1 en biovar 3) van Rsol (Elphinstone, 2005). Rsol kan zowel ondergronds, vanuit het substraat, als bovengronds, via teelthandelingen, de waardplant binnendringen. Rsol koloniseert deze daarna effectief waarbij vaatbundels verstopt raken, celwanden worden afgebroken en er verwelking optreedt. In de tropen komt de tropische variant in veel teeltgebieden als grondgebonden pathogeen voor. Bij lagere temperaturen, overleeft Rsol slechts beperkte tijd (maximaal 12 maanden) in de grond (van Elsas et al., 2000). Infecties kunnen ook optreden vanuit besmet oppervlaktewater waarin Rsol enkele maanden kan overleven (van Elsas et al., 2001). Onkruiden, die als waardplant van Rsol optreden, kunnen een belangrijke rol spelen bij besmetting vanuit oppervlaktewater. Echter, over de epidemiologie van Rsol in kasteelten is relatief weinig bekend en over Rsol in roos, en welke biovars, is niets bekend. Er is slechts één publicatie uit Taiwan waarin Rsol isolaten gevonden zijn op roos (Lee & Wang, 2000). Er leven in de praktijk veel vragen over overleving, schade-drempels, infectieroutes, incubatietijden en waardplantspecificiteit van de variant die in roos gevonden is.

De NVWA heeft in navolging van de diagnosestelling van verwelkingsziekte door Rsol in snijroos een onderzoek ingezet naar het infectiegedrag bij deze combinatie van waardplant en pathogeen. De pathogeniteit van Rsol wordt bestudeerd in snijroos en enkele andere tuinbouw gewassen waaronder gerbera. Bij snijroos wordt specifiek ook studie gedaan naar infectie bij kweken van stekplanten in kunstmatig besmette potgrond, waarbij ook het lot van de populatie Rsol in de potgrond en haar overleving in die grond onder kas-omstandigheden bestudeerd wordt. Dit levert al de eerste informatie op over de epidemiologie van de bacterie.

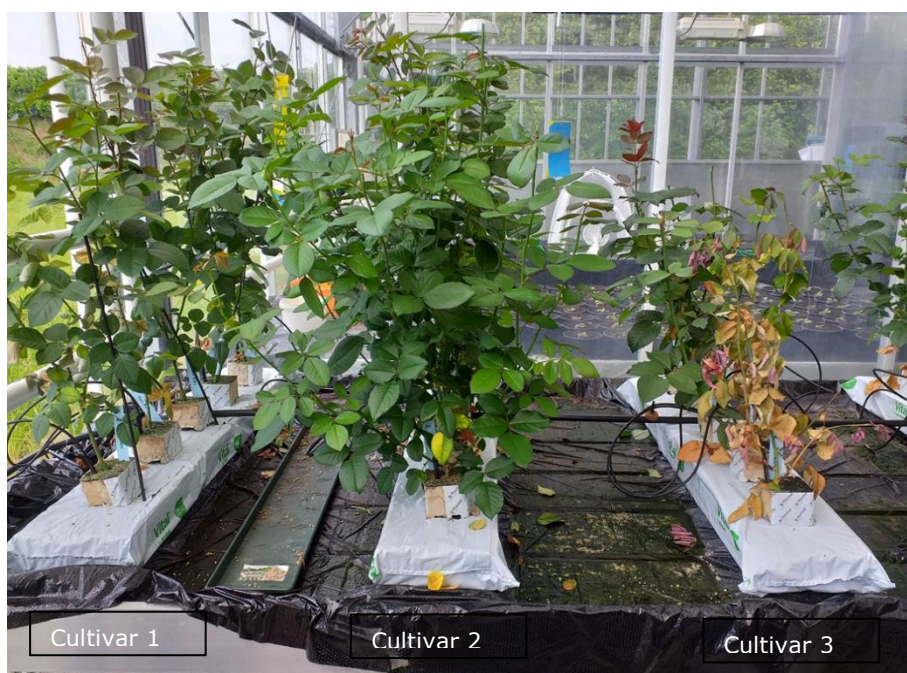


**Doel:**

Maximaal tien door het bedrijfsleven geselecteerde (potentiële) waardplanten worden geselecteerd en getoetst op gevoeligheid voor Rsol uit roos en andere gewassen door stengel- en wortelinoculaties uit te voeren. De keuze en het aantal planten wordt in de begeleidingscommissie van het project vastgesteld. De verdeling van het pathogeen in de plant wordt bepaald met het oog op bemonstering van deze gewassen. Ook wordt de minimale dichtheid vastgesteld waarbij symptoomontwikkeling verwacht kan worden onder omstandigheden die voor de bacterie optimaal zijn. In alle experimenten wordt de incubatietijd gemeten en de populatiedynamica bestudeerd m.b.v. kwantitatieve technieken (uitplaten en TaqMan assays). De symptomen veroorzaakt door Rsol in de verschillende waardplanten worden vastgelegd en voor gebruikers via een website beschikbaar gesteld. In ieder geval worden meegenomen: roos, gerbera en kalanchoe.

**Resultaten kasproeven naar *Ralstonia pseudosolanacearum* in roos WUR**

In het kader van de PPS project "Preventie van *Ralstonia solanacearum* uitbraken in de Nederlandse land- en tuinbouw" werden de risico's onderzocht op infectie en ziekteontwikkeling van drie cultivars (Figuur 9) van snijroos na stengel- en wortel-inoculatie met verschillende stammen van de ziekteverwekker *Ralstonia pseudosolanacearum*. Uit dit onderzoek blijkt dat alle stammen zich kunnen verspreiden in de plant en bij planten met symptomen ook naar het water in de steenwolmat.



**Fig. 9.** Gevoeligheid van verschillende cultivars van roos voor Rsol isolaat PD7123.

De transmissie van de bacterie vanuit symptomatische planten naar de steenwolmat leidt maar in beperkte mate verspreiding in de steenwolmat en tot infectie van naburige, aanvankelijk pathogeen-vrije planten. Ziekteontwikkeling is sterk afhankelijk van de temperatuur, de bacteriestam en de cultivar van de roos. Er zijn ook infecties aangetoond in symptomovrije planten.

Van 2017 t/m 2019 zijn verschillende cultivars van snijroos getoetst op gevoeligheid voor *Ralstonia*. In 2017 werd het experiment bij een temperatuur van 20 °C uitgevoerd, In 2018 en 2019 bij 27 °C. Verschillende stammen van *R. pseudosolanacearum* op agressiviteit getest, nl. een stam uit snijroos

(PD7123), anthurium en kurkuma. Het onderzoek werd voornamelijk uitgevoerd met planten in steenwol, het meest gebruikte materiaal in de teelt van snijrozen. Daarnaast werden ook planten in potgrond gebruikt.

De bacteriën werden aangebracht in de stengelbasis (stengel-inoculatie) of rond de wortels in de steenwolmat (wortel-inoculatie). Bij stengel-inoculatie werd de basis van de hoofdstengel aangesneden met een scalpeermes, waarna een bacteriesuspensie met een hoge dichtheid cellen ( $\sim 10^8$  CFU/ml =  $\sim 10^4 - 10^5$  kve/gram stengel) met behulp van een injectienaald in de snee werd aangebracht. Wortel-inoculatie is alleen uitgevoerd bij planten op steenwol. Op de steenwolblok rond de rozenplanten werd per plant 50 ml suspensie van de rozenstam met een dichtheid van  $10^8$ ,  $10^6$  of  $10^4$  CFU/ml gegoten. Als controle is bacterievrij fosfaatbuffer gebruikt. Enkele maanden na inoculatie werden de takken en stengels van de stengel-geïnoculeerde planten bemonsterd en de hoofdwortels, het steenwol en in één jaar ook de stengelbasis van de wortel-geïnoculeerde planten. De aanwezigheid van *R. pseudosolanacearum* werd bepaald m.b.v. een directe TaqMan assay of door uitplaten op een selectief groeimedium waarbij de aanwezigheid van de ziekteverwekker op het groeimedium werd bepaald met behulp van een TaqMan assay vastgesteld.

In 2017 werden de proeven in een kas met twee cultivars uitgevoerd bij 20 °C, een daglengte van 16 uur en 70% relatieve luchtvochtigheid. In deze proeven, die 81 dagen duurden vertoonden de planten geen symptomen. Echter voor de planten geïnoculeerd in de stengelbasis, liet de laboratoriumtoets zien dat alleen de *Ralstonia*-stam uit roos zich systemisch verspreidden naar de takken, maar niet de stammen uit kurkuma en anthurium. Bij inoculatie van wortels via de steenwolmat werden alleen infecties van de wortel gevonden bij hoge dichtheden van de rozenstam.

In 2018 werd de proeven uitgevoerd bij 28 °C. In deze jaren werd ook een derde cultivar gebruikt. Bij deze hoge temperatuur verliep de symptoomontwikkeling na stengel-inoculatie snel. Binnen 14 dagen na inoculatie met de rozenstam waren de eerste symptomen te zien bij het meest gevoelige cultivar 3 en na 49 dagen waren veel planten van cultivar 3 dood. Cultivar 2 bleek gevoeliger dan cultivar 1 (Figuur 9). Ook de planten besmet met de anthurium-stam lieten duidelijke symptomen zien, maar de kurkuma-stam was alleen zwak ziekteverwekkend. Ziekteontwikkeling op steenwol verschilde niet van ziekteontwikkeling in potgrond. Na wortelinoculatie toonden planten van cultivar 3 de eerste symptomen na 20 dagen.

Op de 49<sup>e</sup> dag na inoculatie zijn stengelbasis, takken, zijscheuten en hoofdwortels bemonsterd. In de planten die geïnoculeerd waren met de rozenstam in de stengelbasis werd de ziekteverwekker *R. pseudosolanacearum* aangetoond in alle onderzochte plantdelen (stengelbasis, zijscheuten, takken en wortels) en ook in het water uit de steenwolmatten. Opnieuw bleek cultivar 3 het meest gevoelig. Na wortelinoculatie kon deze stam niet worden gedetecteerd in de stengelbasis, maar wel in wortels.

In 2019 werd het experiment van 2018 herhaald. Dit jaar werd na inoculatie van de wortelmat wel een systemische verspreiding gevonden en waren de wortels en de stengelbasis besmet. De hoger gelegen delen van de plant waren niet bemonsterd. Na stengel-inoculatie van de meest gevoelige cultivar (3) bleek opnieuw de rozenstam na stengel-inoculatie agressiever dan de stam uit anthurium en deze was weer agressiever dan de stam uit kurkuma. Voor alle drie stammen werd een systemische verspreiding gevonden; er werden ook hoge aantallen bacteriën in de stengeltop teruggevonden. De cultivars verschilden opnieuw sterk in vatbaarheid voor de rozenstam waarbij cultivar 3 het gevoeligst was, en cultivar 2 gevoeliger dan cultivar 1.

Er werd ook onderzoek gedaan naar de risico's van verspreiding van de ziekteverwekker vanuit een symptomatische plant door steenwolblokken na naburige planten. Er werd gebruik gemaakt van het meest gevoelige cultivar en van de rozenstam. Het experiment werd in drievoud uitgevoerd (3 steenwolblokken). In elk blok werden 5 planten opgekweekt, waarvan één plant aan het begin van de rij in de stengelbasis werd geïnoculeerd. Deze planten werden 2 weken na inoculatie sterk symptomatisch. In alle drie steenwolblokken werd 7 weken na inoculatie verspreiding geconstateerd in de steenwolblokken tot en met de derde plant in de rij. Slechts in één blok werd infectie van niet-geïnoculeerde planten waargenomen. Van de tweede en derde plant in de rij was het wortelstel geïnfecteerd en in de tweede plant in de rij ook de stengelbasis. Geconcludeerd werd dat de bacterie zich vanuit een symptomatische plant niet snel verspreid in een steenwolblok en dat de risico op infectie van naburige planten via besmette steenwolblokken gering is. Waarschijnlijk wordt de bacterie snel verspreid via snoeien en het knippen van bloemen.

## Slotconclusies

Dit onderzoek bevestigt de resultaten van onderzoek door de NVWA, waarin bleek dat commerciële cultivars van snijrozen sterk verschillen in gevoeligheid voor *Ralstonia pseudosolanacearum*. Stammen van deze bacterie geïsoleerd uit verschillende waardplanten verschillen in agressiviteit voor roos, waarbij de stam uit roos het meest agressief is. Bij lage temperaturen (20°C) verlopen infecties veelal zonder zichtbare symptomen, maar de bacterie kan zich wel verspreiden naar de takken. Deze latente infecties zijn problematisch, omdat de kans bestaat op onopgemerkte verspreiding van de ziekteverwekker via vermeerdering van geïnfecteerde planten.

Bij hoge temperaturen (28°C) vindt er, na stengelinoculatie systemische verspreiding in de plant plaats. Daarbij werd aangetoond dat er ook verspreiding naar het afvoerwater in de steenwolmat mogelijk is. Planten kunnen vanuit geïnculeerd steenwol besmet raken, maar het risico hierop is afhankelijk van de dichtheid van de ziekteverwekker. Tijdens de rozenteelt is het dus gewenst om ook water uit steenwol op de ziekteverwekker te toetsen en verspreiding via voeding- en drainwater te voorkomen.

## Referenties

Bonants P, Griekspoor Y, Houwers I, Krijger M, van der Zouwen P, van der Lee TA *et al* (2019). Development and Evaluation of a Triplex TaqMan Assay and Next-Generation Sequence Analysis for Improved Detection of Xylella in Plant Material. *Plant disease* **103**: 645-655.

Elphinstone JG (2005). The current bacterial wilt situation: a global overview. American Phytopathological Society (APS Press): St. Paul. pp 9-28.

Lee Y-A, Wang C-C (2000). The design of specific primers for the detection of *Ralstonia solanacearum* in soil samples by polymerase chain reaction. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **41**.

van Elsas Jan D, Kastelein P, van Bekkum P, van der Wolf Jean M, de Vries Philippine M, van Overbeek Leo S (2000). Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology [print] December, 2000*; **90**: 1358-1366.

van Elsas Jan D, Kastelein P, de Vries Philippine M, van Overbeek Leo S (2001). Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Canadian Journal of Microbiology [print] September, 2001*; **47**: 842-854.

Vreeburg R, Bergsma-Vlami M, Bollema R, de Haan E, Kooman-Gersmann M, Smits-Mastebroek L *et al* (2016). Performance of real-time PCR and immunofluorescence for the detection of *C. lavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *R. alstonia solanacearum* in potato tubers in routine testing. *EPPO Bulletin* **46**: 112-121.

Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N, Stead DE (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2853-2858.

## Supplement. Productie en testen van antibiotica resistente stammen WUR

### Introductie

Detectie en isolatie van bacteriën die behoren tot het *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) in complexe substraten door verdunningsplaten op het semi-selectieve medium SMSA wordt belemmerd door de groei van 'look-a-likes' en andere storende achtergrondbacteriën. Experimenteel onderzoek zou baat hebben bij het gebruik van antibioticaresistente stammen die dit probleem grotendeels kunnen oplossen. Het doel van deze studie was het genereren van rifampicine-resistente mutanten van de bacteriesoort *R. solanacearum* en *R. pseudosolanacearum* voor gebruik bij overlevingsexperimenten in verschillende gewortelde teeltsubstraten.

### Materialen

De volgende phylotype I-stammen van *R. pseudosolanacearum* werden meegenomen: PD7123 (= IPO7123) geïsoleerd uit een rozenplant in Nederland (Tjou-Tam-Sin et al., 2017), PD7123-rif (= IPO4144), een natuurlijke rifampicineresistente transformant van PD7123, *R. solanacearum* IPO 1828, een Phylotype IIB-stam geïsoleerd uit aardappel in Nederland, werd ook gebruikt om de natuurlijke rifampicine-resistente mutant IPO1828-rif (= IPO4145) te genereren.

De volgende onderdelen zijn meer in detail beschreven in het Engelstalige deel van dit eindverslag (81-91):

- Effect antibiotica op achtergrondbacteriën in verschillende substraten.
- Selectie van spontane mutanten
- UV-mutagenese
- Transformatie door homologe recombinatie
- Virulentietesten bij tomaten
- Virulentietesten bij rozenplanten
- Inoculaties, Monsternamen en Detectie van *R. pseudosolanacearum*

### Resultaten

*Effect antibiotica op wildtype stammen van RSSC.* Wild-type stammen (PD7123 en IPO1828) groeiden niet bij een concentratie van 25 µg / ml rifampicine en 30 µg / ml naladixine aangevuld met YPGA.

*Effect antibiotica op achtergrondpopulaties van substraten.* Achtergrondpopulaties van niet-doelwitbacteriën die op SMSA groeien zonder toegevoegde antibiotica waren hoog, met name voor gebruikte steenwol en potgrond (Tabel 5).

**Tabel 5.** Effect van antibiotica in SMSA op de achtergrond bacterien aanwezig in verschillende substraten.

		zonder AB		R25		N30	
		1	2	1	2	1	2
PottingSoil	und	>>	>>	6F	10F	11B 5F	6B 10F
	10x	18B	8B	0	0	2B	0
	100x	0	2B	0	0	0	0
	1000x	0	0	0	0	0	0
	10000x	0	0	0	0	0	0
RockWool	und	>>	87B	0	0	57B	61B
	10x	19B	19B	0	0	5B	5B
	100x	1B	1B	0	0	2B	2B
	1000x	2B	0	0	0	0	0
	10000x	0	0	0	0	0	0
Cocopeat	und	>>	>>	3F	8F	79B 2F	55B
	10x	10B	12B	0	0	2B	2B
	100x	0	3B	0	0	0	0
	1000x	0	0	0	0	0	0
	10000x	0	0	0	0	0	0
DrainWater	und	3B	1B	0	0	0	1B
	10x	0	0	0	0	0	0
	100x	0	0	0	0	0	0
	1000x	0	0	0	0	0	0
	10000x	0	0	0	0	0	0

B= bacteria, F= fungi

Toevoegen van rifampicine aan de verschillende substraten was zeer effectief en elimineerde de microflora in de achtergrond op SMSA; in het onverdunde extract van potgrond en cocopeat groeiden nog maar enkele schimmels. Supplement van 30 µg / ml nalidixine verminderde de bacteriegroei op de SMSA-platen met gemiddeld 67%, 75%, 84% en 92% in suspensies van respectievelijk cocopeat, drainwater, potgrond en steenwol.

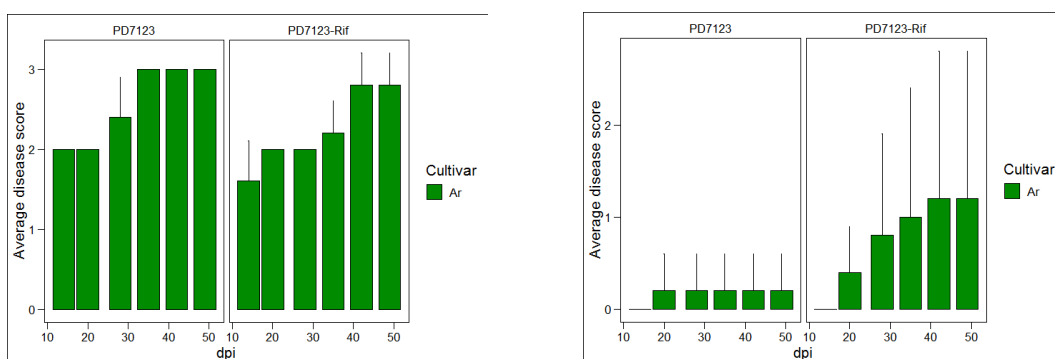
*Spontane mutanten.* Spontane mutanten kwamen naar voren op platen die nalidixinezuur bevatten, waarvan er twee van elke *Ralstonia*-stam werden geselecteerd voor daaropvolgende virulentietests. Er waren geen spontane mutanten op platen die rifampicine bevatten.

*Transformatie door UV-mutagenese.* Mutanten voor beide *Ralstonia*-stammen werden gevonden op nalidixinezuur bevattende platen na blootstelling aan UV-straling gedurende 10-40 sec. Voor stam PD7123, zelfs na bestraling gedurende 60 s, bleken mutanten te groeien op nalidixinezuur (resultaten niet getoond). Er waren echter geen spontane mutanten op platen die rifampicine bevatten. Geen van de mutante stammen werd bij volgende experimenten gebruikt.

*Transformatie door homologe recombinatie.* Alle platen die waren geïnoculeerd met verdunningen van bacteriële suspensies die niet waren getransformeerd, vertoonden na 3 dagen bacteriegroei. Bovendien vertoonden alle platen die waren geïnoculeerd met bacteriën die geen DNA ontvingen, groei na 3 dagen. Op de platen die waren geïnoculeerd met suspensies die DNA hadden ontvangen van *R. solanacearum* UW551-rif, werden kolonies gevonden voor beide stammen, wat wijst op succesvolle transformatie. De transformatie-efficiëntie van stam IPO1828 was hoger dan die van PD7123. Er was geen significant verschil in de transformatie-efficiëntie tussen suspensies die werden uitgedaagd met een lage of hoge hoeveelheid DNA.

*Virulentietest bij tomaat.* In 2018 waren er verschillen in symptoomontwikkeling tussen de verschillende mutante stammen voor beide soorten (*R. pseudosolanacearum*:  $F = 3.0$ ,  $p = 0.03$ ; *R. solanacearum*:  $F = 11.8$ ,  $p < 0.01$ ), maar voor *R. pseudosolanacearum* een volgende posthoc test toonde geen significante paarsgewijze verschillen. Voor *R. solanacearum* veroorzaakten de stammen Nal1, Nal2 en Rif2 significant minder symptomen dan het wildtype, terwijl symptomen veroorzaakt door Rif1-mutant niet significant verschilden van het wildtype. In 2019 veroorzaakte de Rif1-mutant van IPO4145 echter significant minder symptomen dan de wild-type ouderstam PD7123 ( $F = 90.6$ ,  $p < 0.1$ ). Ook voor *R. solanacearum* veroorzaakten alle Rif-mutanten minder symptomen dan het aardappel-wildtype IPO 1828. Planten geïnoculeerd met de buffercontrole vertoonden tijdens het experiment geen symptomen.

*Virulentietest bij rozenplanten.* In tweejarige kasexperimenten (2018 en 2019) werd de virulentie van IPO 4144 (PD7123-RIF1) vergeleken met de wildtype (ouder) stam met stam- en wortelinoculatie van rozenplanten (cultivar 3). In 2018 waren de ziektescores na stengelinoeculatie grotendeels vergelijkbaar (Figuur 10). Daarentegen was de transformant na wortelinoculatie iets virulenter dan de ouderstam (Figuur 11).



**Fig. 10 (links).** Disease development after stem inoculation of rose plants (cv. Armando) with *R. pseudosolanacearum* strain PD7123 from rose and a natural rifampicin resistant transformant (PD7123-Rif) (experiments 2018)

**Fig. 11 (rechts).** Disease development after root inoculation of rose plants (cv. Armando) with *Ralstonia pseudosolanacearum* strain PD7123 from rose and a natural rifampicin resistant transformant (PD7123-Rif)

Beide stammen systemisch gekoloniseerde rozenplanten en hoge dichtheden van de ziekteverwekker werden 8 weken na inoculatie gevonden in de stengelbasis nabij het inoculatiepunt, in de stengeltop en in de zijtakken (resultaten niet getoond). In 2019 waren de resultaten met stengelgeënte rozenplanten grotendeels vergelijkbaar als in 2018 (gegevens niet getoond). In 2019 bleek PD7123-Rif na wortelinoculatie echter minder agressief te zijn dan de ouderstam. Wortelinoculatie met de mutant resulteerde niet in symptoomexpressie en er werden geen bacteriën gedetecteerd door verdunning op SMSA vanaf de wortels bij 49 dpi, terwijl wortelinoculatie met de ouderstam resulteerde in de ontwikkeling van zwakke symptomen en hoge dichtheden werden geïsoleerd uit wortels bij 49 dpi (gegevens niet getoond).

## Conclusies

We concluderen dat natuurlijke transformatie door homologe recombinatie een geschikte, zeer efficiënte methode is om rifampicine-resistente stammen van *R. solanacearum* en *R. pseudosolanacearum* te genereren. Deze mutante stammen kunnen een virulentie tot uitdrukking brengen die grotendeels vergelijkbaar is met de wildtype stammen, hoewel de verminderde virulentie van een geselecteerde stam van *R. pseudosolanacearum* in een herhaald experiment meer aandacht behoeft. Rifampicine-resistente stammen die zijn afgeleid via homologe recombinatie worden beschouwd als 'spontane' mutanten (niet-GMO) en als de virulentie niet wordt aangetast, kunnen ze efficiënt worden gebruikt in studies over ecologie en ziektebeheer.

We hebben aangetoond dat rifampicine superieur is aan naladixine bij het verminderen van achtergrondbacteriën die aanwezig zijn in potgrond, steenwol, cocopeat en drainwater. Naladixine, maar niet rifampicine-resistente stammen van *R. pseudosolanacearum* en *R. solanacearum* zouden gemakkelijk kunnen worden gegenereerd door suspensies van de bacteriën op een medium met antibiotica uit te platen, zelfs zonder een UV-behandeling om resistentie te induceren. Rifampicine-resistente mutanten van beide bacteriesoorten werden met succes gegenereerd via homologe recombinatie waarbij DNA van een rifampicine-resistente stam van *R. solanacearum* werd gebruikt voor transformatie. In een eerste proef waren de virulentie van enkele van de rifampicine-resistente mutanten en de ouderlijke wildtype stam van *R. pseudosolanacearum* in tomaat grotendeels vergelijkbaar, terwijl naladixine-resistente stammen een verminderde virulentie vertoonden. In een herhaald experiment werd echter ook voor een geselecteerde rifampicine-resistente stam een lagere virulentie gevonden. In een eerstejaars experiment was de virulentie van een geselecteerde rifampicine-resistente stam in roos grotendeels vergelijkbaar met die van de ouderstam, zowel na stam- als wortelinoculatie. Bij een herhaald experiment was de virulentie echter lager dan bij de wildtype stam, in het bijzonder na wortelinoculatie. Desondanks kon de mutante stam na stengelinoeculatie nog steeds planten met ernstige symptomen voortbrengen. Bij herhaalde experimenten konden rifampicine- en naladixine-resistente stammen van *R. solanacearum* symptomen veroorzaken bij tomaten, maar de virulentie van de mutanten was lager dan die van de ouderlijke wildtype-stam.

# Waardplantenonderzoek SCFF

## Introductie

In 2015 is er een uitbraak geweest van Rsol in kasrozen, een gewas dat tot dan toe niet bekend stond als waardplant van Rsol. Om meer inzicht te krijgen in het risico van introductie van Rsol in andere tuinbouwgewassen, is onderzocht welke planten nog meer gevoelig zijn voor Rsol. Hierbij is ook onderzocht hoe lang het duurt voordat symptomen zichtbaar zijn nadat planten geïnfecteerd zijn geraakt. In planten waarin Rsol wel is aangetoond, maar geen symptomen zijn opgetreden, is bepaald hoe de verspreiding van Rsol binnen de plant was, met oog op het ontwikkelen van een bemonsteringsstrategie voor het detecteren van latente infecties.

## Methode

Zes potentiële waardplanten zijn getoetst op gevoeligheid voor Rsol: Kurkuma cv1, Kalanchoe cv1, Geranium cv1, Anthurium cv1, Gerbera cv1 en Gerbera cv2. Tomaat cv1, een plant waarvan de gevoeligheid voor Rsol al eerder is aangetoond, is ingezet als positieve controle. Omdat na de eerste proef geen conclusies konden worden getrokken m.b.t. de gevoeligheid van gerbera voor Rsol, is het waardplantenonderzoek voor dit gewas herhaald met vier cultivars.

De geselecteerde waardplanten zijn geïnoculeerd met twee Rsol stammen: een stam geïsoleerd uit kasrozen (rozenstam, PD7123, IPO4001) en een stam geïsoleerd uit kurkuma (kurkumastam, PD2272, IPO4009). Beide stammen behoren tot race 1, de tropische variant van Rsol. De planten zijn besmet door stengel- of rhizoominoculaties uit te voeren door met behulp van een injectiespuit en een naald een Rsol suspensie ( $10^8$  kve ml<sup>-1</sup>) in de plant te brengen. Voor elk gewas zijn beide stammen getest op vijf planten. Ter controle zijn twee planten per gewas alleen geïnoculeerd met PBS (een fosfaat gebufferde zoutoplossing). De planten zijn geïncubeerd bij een dagtemperatuur van 28 °C en een nachttemperatuur van 20 °C, omstandigheden die gunstig zijn voor de ontwikkeling van Rsol. De symptoomontwikkeling in de planten is voor een periode van acht weken gemonitord. Na afloop zijn de planten bemonsterd en geanalyseerd op aanwezigheid van Rsol door middel van uitplaten op een semi-selectief SMSA medium.

## Resultaten

Een overzicht van de aanwezigheid van symptomen ten gevolge van Rsol in elk van de onderzochte gewassen is weergegeven in tabel 6. In alle gewassen die gescoord zijn met een '+' is ook daadwerkelijk Rsol aangetroffen. In de gewassen gescoord met een '-' zijn geen symptomen waargenomen, al is in sommige gevallen wel Rsol gedetecteerd. In geen van de controleplanten is Rsol aangetroffen.

**Tabel 6.** Aanwezigheid van symptomen ten gevolge van aantasting door Rsol in zeven potentiële waardplanten, acht weken na inoculatie met de rozenstam of de kurkumastam van Rsol. (+) wel door Rsol veroorzaakte symptomen zichtbaar (-) geen symptomen zichtbaar (?) geen conclusie mogelijk.

	Rozenstam (PD7123)	Kurkumastam (PD2272)	Negatieve controle (geen inoculatie)
Tomaat cv. 1	+	-	-
Kurkuma cv. 1	-	+	-
Kalanchoe cv. 1	+	-	-
Pelargonium cv. 1	+	+	-
Anthurium cv. 1	+	+	-
Gerbera cv. 1	?	?	-
Gerbera cv. 2	?	-	-



Uit de resultaten blijkt dat de rozenstam en de kurkumastam van Rsol verschillen met betrekking tot hun virulentie voor de verschillende gewassen. Een gewas dat gevoelig is voor de ene stam van Rsol is dat niet per definitie ook voor de andere stam, ondanks het feit dat beide stammen tot hetzelfde ras van Rsol behoren. In de meeste gevallen dienden de eerste symptomen zich binnen één tot twee weken na inoculatie aan en ontwikkelden deze zich in de loop van de acht weken dusdanig dat het bij verscheidene gewassen heeft geleid tot afsterving van de gehele plant (figuur 12).

De tomatenplanten lieten zoals verwacht al snel verwelkingsymptomen zien na geïnfecteerd te zijn met de rozenstam van Rsol. Bij het bemonsteren van de planten was aanwezigheid van Rsol in de vaatbundels duidelijk zichtbaar in de vorm van bruinverkleuring. Ook in kalanchoe zijn alleen symptomen waargenomen na besmetting met de rozenstam. Ongeveer anderhalve week na de besmetting traden de eerste symptomen van verwelking op en na acht weken was elk van de behandelde planten afgestorven. In kurkuma heeft juist alleen infectie door de kurkumastam van Rsol tot symptomen geleid. Binnen enkele dagen na het binnendringen van de bacterie, waren de eerste symptomen zichtbaar in de vorm van opkrulling en geelverkleuring van de bladeren, gevolgd door verwelking en uiteindelijk afsterving van de plant. In geranium en anthurium zijn symptomen veroorzaakt door zowel de rozenstam als de kurkumastam van Rsol. In beide gewassen begonnen de symptomen met geelverkleuring van de bladeren, om uiteindelijk te leiden tot afsterving van de plant. In geranium waren de eerste symptomen binnen een week na besmetting zichtbaar, in anthurium na één tot twee weken.

In de planten die geen symptomen lieten zien, is in een gedeelte wel een vermeerdering van Rsol aangetoond. Vaak was dit alleen het geval in het onderste deel van de stengel en de onderste bladeren, dicht bij het punt waar de infectie heeft plaatsgevonden. In een enkele plant is ook in de wortels Rsol gemeten. Bovenin de planten was Rsol niet aanwezig.

Voor gerbera was in eerste instantie geen conclusie mogelijk m.b.t. de gevoeligheid voor Rsol, onder andere vanwege een *Fusarium* aantasting die het niet mogelijk maakte om onderscheid te maken tussen symptomen veroorzaakt door Rsol en symptomen veroorzaakt door *Fusarium*. In een vervolgprouf met vier rassen is in drie rassen geen Rsol gedetecteerd. In het vierde ras is Rsol wel gedetecteerd. In dit ras zijn geen typische Rsol symptomen waargenomen, maar is wel een groeivertraging geconstateerd.



**Fig. 12.** Vergevorderde symptomen in tomaat, kurkuma, kalanchoe, pelargonium en anthurium, veroorzaakt door Rsol.

## Conclusies

- Dit waardplantenonderzoek heeft aangetoond dat zowel de rozenstam als de kurkumastam van Rsol meerdere waardplanten heeft, al waren er wel verschillen tussen beide stammen met betrekking tot hun virulentie voor verschillende gewassen. In kurkuma, kalanchoe, pelargonium en anthurium zijn typische Rsol symptomen waargenomen. In gerbera is in één van de vier geteste cultivars alleen een groeivertraging waargenomen. In kurkuma en kalanchoe zijn ook latente infecties aangetoond. Deze infecties vormen een risico voor ongewenste verspreiding van Rsol. Het feit dat meerdere gewassen gevoelig zijn gebleken voor de rozenstam van Rsol, in combinatie met de ernst van de symptomen die zijn opgetreden, benadrukt het belang van het ontwikkelen van een goede strategie. In de eerste plaats om een nieuwe uitbraak te voorkomen, maar ook om bij een nieuwe infectie, verspreiding naar andere gewassen tegen te gaan.
- Met betrekking tot de incubatietijd kan gesteld worden dat, onder de geteste omstandigheden, binnen één tot twee weken na inoculatie de eerste symptomen optreden. De omstandigheden waaronder getest is (een hoge temperatuur in combinatie met een hoge concentratie bacteriën die rechtstreeks in de stengel zijn ingebracht), zijn gunstig voor een snelle ontwikkeling van Rsol in de plant. In de praktijk zullen incubatietijden afhankelijk zijn van factoren zoals temperatuur, concentratie van Rsol en wijze van besmetting.
- Om ook latent aanwezige infecties in de praktijk te kunnen signaleren, is het nuttig om een strategie te ontwikkelen voor het bemonsteren van symptoomloze planten. In het kader hiervan is de verdeling van Rsol in de planten, die in de proef geen symptomen lieten zien, vastgesteld. De resultaten hiervan hebben echter niet tot een eenduidige conclusie geleid. De aanwezigheid van Rsol in de verschillende plantdelen lijkt voornamelijk afhankelijk te zijn van de plek waar de besmetting heeft plaatsgevonden. In veel planten zonder symptomen werd Rsol bijvoorbeeld wel aangetroffen in het onderste deel van de stengel en de onderste bladeren (dicht bij het inoculatiepunt), maar niet in de top van de plant.

## B2. Infectieroutes

## SCFF

### Introductie

De risico's van infectie vanuit besmet water, besmette grond, hulpbronnen in het productieproces zoals biologische bestrijding en via mechanische overdracht (machines, gereedschappen), worden in kaart gebracht. Meer specifiek wordt onderzoek gedaan naar:

- *Schadedrempels*. Voor roos worden schadedrempels bepaald door wortelinoculaties uit te voeren met oplopende dichtheden van Rsol ( $10^4$  –  $10^8$  cellen per gram substraat).
- *Infecties via messen en spatwater*. Ook worden tijdens het enten besmette messen gebruikt om de infectie-incidentie te bepalen. Tenslotte worden bovengrondse delen van de roos besproeid met Rsol, waarbij de ondergrond wordt afgedekt om infecties via blad te kunnen bepalen.
- *Overleving*. De overleving van de stam uit roos wordt bepaald in (gebruikt) steenwol en kokos, en andere hulpbronnen in het productieproces, waarbij overleving in steriel water als controle dient (uitvoering in drievoud).
- *Gevoeligheid roos voor Rsol stammen*. Roos wordt getoetst op gevoeligheid voor drie andere Rsol stammen geïsoleerd uit Kurkuma (NL), Anthurium (NL) en aardappel (NL). Ook hierbij wordt tomaat als positieve controle in het onderzoek gebruikt.

Het besmette plantmateriaal wordt gebruikt voor evaluatie van ontwikkelde diagnostische methoden (zie A). Ook worden in parallelle experimenten, planten gebruikt voor onderzoek naar de effectiviteit probiotica op plantweerbaarheid (zie C). Voor detectie van Rsol in plantmateriaal wordt gebruik gemaakt van uitplaattechnieken en (kwantitatieve) TaqMan PCR assays. In alle proeven worden de incubatietijden bepaald. De proeven worden onafhankelijk herhaald.

De risico's van infectie vanuit besmet water, besmette grond en via mechanische overdracht (machines, gereedschappen) worden in kaart gebracht. Ook wordt de overleving van Rsol in diverse substraten onder kasomstandigheden en in de volle grond bestudeerd. Op basis hiervan wordt een risicoanalyse gemaakt. Onderdelen B1 en B2 zijn in samenwerking uitgevoerd worden met de stichting Control in Food & Flowers.

## Onderzoek SCFF

### Introductie

Er is tot nu toe weinig bekend over de epidemiologie van *Rsol* in kasteelten. Informatie over infectierisico's vanuit besmet water, substraat of andere hulpbronnen in het productieproces ontbreekt. Om het risico van deze potentiële infectiebronnen vast te stellen en passende hygiënemaatregelen te kunnen nemen, is de overleving van *Rsol* in verschillende materialen bepaald. Daarnaast is ook de overlevingskans van *Rsol* buiten de kas onder winterse omstandigheden bepaald, en is de effectiviteit van ontsmettingsmiddelen op besmette mesjes getest.

### Methode

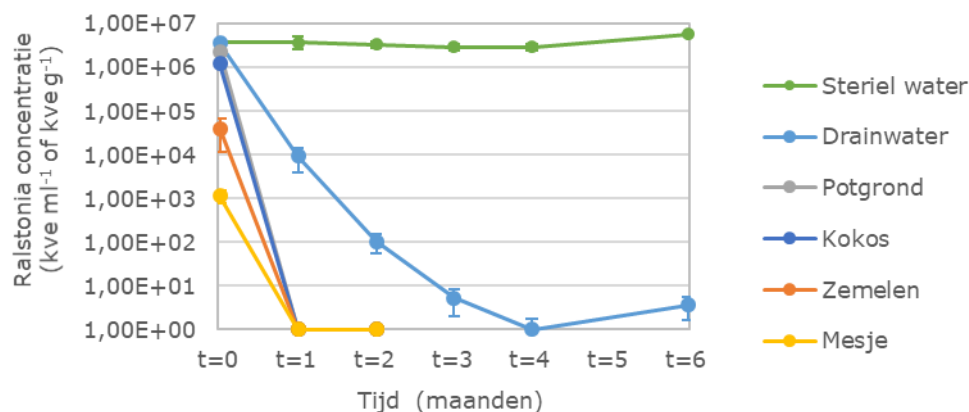
Het infectierisico van verschillende materialen is bepaald door de overleving van *Rsol* in drainwater, potgrond, kokos, zemelen (dragermateriaal van biologische bestrijders) en mesjes (gereedschap voor gewashandelingen) te bepalen. Als controlebehandeling is de overleving in steriel water bepaald. De besmette materialen zijn geïncubeerd bij kamertemperatuur en maandelijks uitgeplaat om de overleving te bepalen. Elke behandeling is uitgevoerd met drie herhalingen.

De overwintering van *Rsol* buiten de kas is bepaald door slootwater, grond en rozenstokjes te besmetten met de rozenstam van *Rsol* en te incuberen bij verschillende temperaturen: 20°C (controle), 5°C, -10°C en een afwisseling tussen vriezen (48 uur bij -10°C) en dooien (48 uur bij 5°C). De materialen zijn op verschillende momenten uitgeplaat om de overleving vast te stellen. Monsters waarin geen *Rsol* meer kon worden gedetecteerd, zijn geïncubeerd in tomatenplanten om vast te stellen of er sprake was van een levensvatbare, maar niet cultiveerbare staat van de cellen (viable but non culturable state; VBNC state).

Ontsmetting van besmette mesjes is getest door mesjes te besmetten met *Rsol* en volgens voorschrift onder te dompelen in 1% Hyperclean X (5 minuten) of 4% Menno Florades (3 minuten). Om de praktijksituatie na te bootsen, is gebruik gemaakt van gebruikte mesjes met opgedroogd organisch materiaal. De aanwezigheid van organisch materiaal kan namelijk effect hebben op de effectiviteit van een middel. De behandelingen zijn in drievoud ingezet.

### Resultaten

Een overzicht van de overleving van *Rsol* op de verschillende materialen is weergegeven in figuur 13. Na één maand werd er geen *Rsol* meer gedetecteerd in potgrond, kokos, zemelen en mesjes. Op deze materialen is *Rsol* dus niet in staat om langere tijd te overleven. In steriel water bleef de concentratie *Rsol* stabiel over de tijd. Dit is vastgesteld tot 6 maanden na besmetten. In drainwater was sprake van een snelle afname van *Rsol*. Na één maand was de concentratie *Rsol* al afgenomen van  $3,6 \cdot 10^6$  kve ml<sup>-1</sup> tot  $1,0 \cdot 10^2$  kve ml<sup>-1</sup>, een afname van >99,9%. Na vier maanden was de concentratie afgenomen tot zeer lage aantallen van <10 kve ml<sup>-1</sup>. Op dit punt leek de concentratie te stabiliseren, aangezien er na zes maanden nog steeds enkele levende cellen werden gedetecteerd.

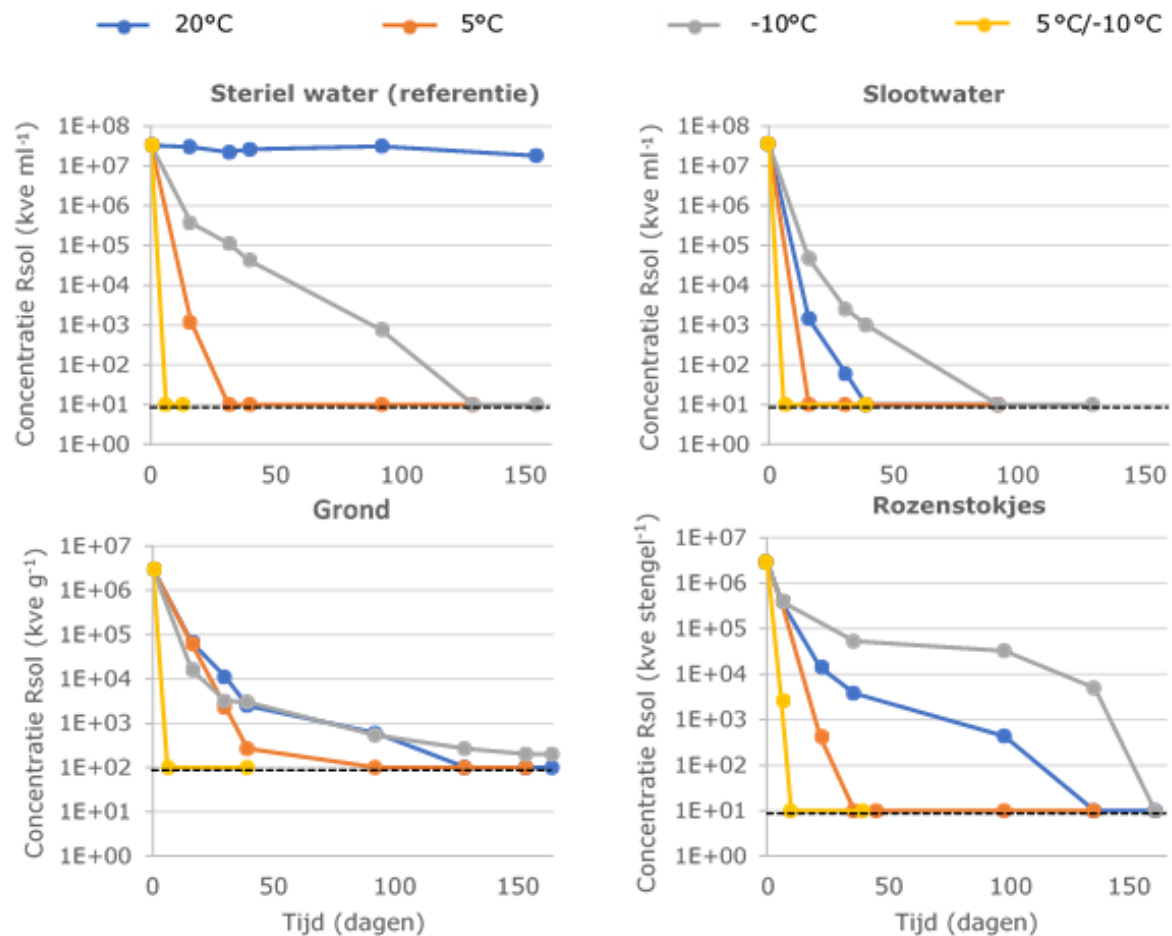


**Fig. 13.** Overleving van *Rsol* in verschillende materialen gedurende zes maanden. Elke waarde is de gemiddelde *Rsol* concentratie  $\pm$  standaardafwijking, gemeten in drie herhalingen.

De resultaten van de overleving van Rsol onder verschillende temperatuurbehandelingen, zijn weergegeven in figuur 14. De behandeling waarbij de monsters afwisselend werden blootgesteld aan fluctuerende temperaturen van 5°C en -10°C, resulteerde in elk van de materialen in een snelle afsterving van Rsol, zelfs wanneer Rsol beschermd was door plantmateriaal. Binnen één tot twee weken werd geen Rsol meer gedetecteerd in de monsters. Dit maakt de overwinteringskans van Rsol erg klein.

Daarnaast hebben ook constante temperaturen van -10°C en met name 5 °C geleid tot een snelle afname van Rsol, in de meeste gevallen gevolgd door volledige afsterving. De snelheid waarmee dit gebeurde, was wel afhankelijk van het type materiaal. Er is onderzocht of de monsters waarin geen Rsol meer werd gedetecteerd nog wel cellen in een VBNC state bevatten, maar de cellen bleken niet meer levensvatbaar te zijn.

Op de mesjes die besmet waren met Rsol, werd een gemiddelde Rsol concentratie van  $6,1 \cdot 10^4$  kve per mesje gemeten. Op besmette mesjes die werden gedompeld in water (controlebehandeling), nam de concentratie Rsol af naar  $4,0 \cdot 10^2$  kve per mesje. Na behandeling met Hyperclean X of Menno Florades werd geen levende Rsol meer aangetoond op de mesjes. Ook op gebruikte mesjes met organisch materiaal zijn de middelen dus effectief in het ontsmetten van besmette mesjes, wanneer toegepast volgens gebruiksvorschrift.



**Fig. 14.** Overleving van de rozenstam van Rsol in steriel water, sloopwater, grond en rozenstokjes. De gestippelde zwarte lijn geeft de detectielimiet weer ( $10^1$  kve ml<sup>-1</sup> in watermonsters,  $10^2$  kve g<sup>-1</sup> in grond,  $10^1$  kve stengel<sup>-1</sup> in rozenstokjes).

## Conclusies

- Om meer inzicht te krijgen in het risico van potentiële infectiebronnen, is de overleving van Rsol in verschillende materialen onderzocht. Onder de geteste omstandigheden kan Rsol niet voor langere tijd overleven in potgrond, kokos en zemelen. Deze proef is echter wel uitgevoerd met relatief droge materialen. Wanneer de materialen meer water bevatten, of bij een andere temperatuur geïncubeerd worden, kan dit invloed hebben op de overleving. Ook op mesjes is

geen langdurige overleving aangetoond, maar gereedschappen zijn wel een belangrijke infectiebron bij het uitvoeren van gewashandelingen. Een goede en regelmatige desinfectie blijft dus belangrijk. In drainwater namen concentraties Rsol snel af, maar zelfs na zes maanden waren niet alle cellen afgedood. Dit betekent dat desinfectie van drainwater belangrijk is wanneer het water gerecirculeerd wordt.

- Om het risico van overleving van Rsol buiten de kas te bepalen, is de overleving onder winterse omstandigheden bepaald. Bij vriestemperaturen en met name ook temperaturen van een paar graden boven het vriespunt, vindt een snelle afname van Rsol plaats. Bij afwisselende temperaturen in de vorm van vriezen en dooien, wordt de Rsol zelfs binnen enkele dagen afgedood. Deze fluctuerende omstandigheden zijn typisch voor een gematigd klimaat zoals in Nederland. Het is daarom onwaarschijnlijk dat Rsol in staat is om te overwinteren buiten de kas.
- Wanneer toegepast volgens gebruiksvoorschrift, zijn Hyperclean X en Menno Florades effectieve middelen voor het ontsmetten van mesjes die besmet zijn met Rsol. Ontsmetting van gereedschappen die gebruikt worden bij gewashandelingen, kan de verspreiding van (latente) infecties voorkomen of vertragen.

## C: Preventie en Weerstandshoging

## SCFF / UU

In 2015 is een "Advieskaart *Ralstonia solanacearum*" opgesteld door LTO Glaskracht Nederland en Groen Agro Control. Hierin is achtergrondinformatie over deze plantpathogene bacterie uiteengezet, zoals verschillende eigenschappen waaronder o.a. verspreiding en symptomen. Daarnaast zijn er adviezen aangedragen om besmettingen te voorkomen en opgetreden besmettingen te elimineren. De advieskaart is met name gericht op de productieteelt. Daarnaast zijn diverse telersbijeenkomsten georganiseerd door LTO Glaskracht ism GAC en de NVWA om de telers te informeren over de laatste stand van zaken. Het in kaart brengen van kritische punten in de hele keten van veredeling-vermeerdering/opkweek-productieteelt ontbreekt nog. Bijbehorende adviezen hoe hiermee om te gaan zijn gewenst om in dit project uit te werken.

### C1. Hygiëne- en teeltmaatregelen

### SCFF

Risicoanalyses worden uitgevoerd om 'critical control points' te definiëren. De risicoanalyses worden ondersteund door experimenteel onderzoek naar infectieroutes (zie B2).

#### Introductie

In 2016 hebben Groen Agro Control en LTO Glaskracht Nederland een advieskaart voor Rsol ontwikkeld, gefinancierd door het Productschap Tuinbouw. Deze advieskaart bevat informatie over de eigenschappen van Rsol, het voorkomen van infecties en te nemen maatregelen wanneer infecties toch optreden. Maatregelen om infectie te voorkomen zijn met name gericht op binnenkomend plantmateriaal en hygiënemaatregelen tijdens de teelt.

Aan de hand van de resultaten in onderdeel A en B van dit project, kan de preventiestrategie voor Rsol in roos geoptimaliseerd worden. Met betrekking tot de hygiëne- en teeltmaatregelen lag de aandacht op:

- Inzicht krijgen in de risico's voor Rsol infecties op verschillende punten in de keten
- Inzicht krijgen in het risico van potentiële infectiebronnen
- Advies geven over het voorkomen en elimineren van infecties

## Resultaten

- Een potentiële bron voor introductie van Rsol is de import van materialen. In de experimenten is geen langdurige overleving van Rsol gevonden op kokos, wat een potentiële infectiebron kan zijn wanneer deze wordt geïmporteerd uit landen met Rsol. Deze resultaten kunnen echter wel afhankelijk zijn van factoren zoals watergehalte en temperatuur. Om die reden is het alsnog belangrijk om alert te zijn bij het importeren van hulpbronnen in het productieproces. In zemelen, gebruikt als dragermateriaal voor biologische bestrijders, en in potgrond, is eveneens geen langdurige overleving aangetoond.
- De overleving van Rsol buiten de kas is onderzocht om inzicht te krijgen in het risico van nieuwe infecties voortkomend uit bronnen dicht bij de kas. Uit de resultaten is gebleken dat het niet waarschijnlijk is dat Rsol in slootwater, grond of plant materiaal een winter buiten de kas overleeft in een gematigd klimaat.
- De meest belangrijke bron van infectie, zijn mechanische handelingen. Stengelinoctulaties met Rsol hebben in verschillende rozencultivars geleid tot hoge infectiepercentages. Infecties vanuit besmet water vinden minder efficiënt plaats, en zijn afhankelijk gebleken van cultivar en temperatuur. Echter, hoewel wortelinfecties niet zo gemakkelijk plaatsvinden als verwacht, is het alsnog belangrijk om goede maatregelen te treffen. Wanneer wortels beschadigd zijn geraakt, is de kans groter dat infecties optreden, en zelfs wanneer slechts een enkele plant geïnfecteerd raakt, kan de ziekte eenvoudig verspreid worden naar andere planten door middel van gewashandelingen. Bovendien is Rsol in staat om lange tijd te overleven in drainwater. Dat bevestigt de noodzaak om drainwater te ontsmetten indien het water gerecirculeerd wordt. Meer informatie over het ontsmetten van besmet drainwater is te vinden in de advieskaart.
- Hygiënemaatregelen om introductie en verspreiding van Rsol te voorkomen, blijven belangrijk. De advieskaart bevat informatie over hygiënemaatregelen en ontsmettingsmiddelen die gebruikt kunnen worden voor het ontsmetten van materialen of oppervlaktes. In dit project is de effectiviteit van twee ontsmettingsmiddelen getest, namelijk Hyperclean X en Menno Florades. Deze proef is uitgevoerd onder omstandigheden die beter overeenkomen met de praktijk, door de werking te testen op gebruikte mesjes die groen zijn door resten van organisch materiaal. Ook onder deze omstandigheden waren de ontsmettingsmiddelen effectief wanneer toegepast volgens gebruiksvoorschrift.

## Conclusies

- De resultaten van dit project hebben geen gevolgen voor de bestaande hygiëneprotocollen. De resultaten hebben meer inzicht gegeven in het belang van verschillende infectiebronnen, maar om infecties te voorkomen blijft het noodzaak om tijdens de teelt de nodige hygiënemaatregelen te treffen en alert te zijn bij binnenkomend plantmateriaal.

## Onderzoek UU

### Kort rapport over bacteriële weerstand tegen *Ralstonia pseudosolanacearum* verhogen

#### Inleiding

In dit onderzoek hebben we de rol van aan roos-geassocieerde bacteriën onderzocht in preventie van bruinrot.

Gewassen leven in samenleving met miljarden van bacteriën en schimmels die de groei en weerbaarheid van de plant beïnvloeden. In eerdere studies hebben we onderzocht hoe natuurlijk voorkomende microben de gewasweerbaarheid tegen bruinrot en andere ziekten verhogen. Doel is, het microbioom van rozen te optimaliseren om hun natuurlijke weerbaarheid tegen bruinrot te verhogen.

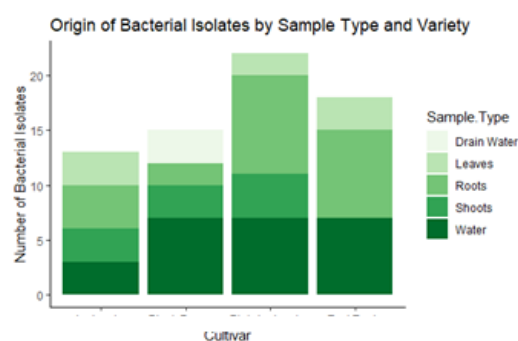
#### Materiaal en methoden

We hebben een totaal van 69 bacteriën geïsoleerd, die binnen rozen (endofyten), om de wortels en in het drainagewater voorkomen.

We hebben het vermogen van deze bacterie getoetst om de groei van *Ralstonia pseudosolanacearum* onder lab-condities te remmen. Aansluitend hebben we de beste bacteriën in rozen gekweekt en getoetst of door hun aanwezigheid de weerbaarheid omhoog gaat. Hiervoor hebben we de rozen massaal met *R. pseudosolanacearum* geïnoculeerd middels injectie in de stengel (ca 1,000 x de dichtheid, die in besmette kassen te vinden is) en we hebben de ontwikkeling van symptomen gevolgd. Verder hebben we de aanwezigheid en dichtheid van de ziekteverwekker middels qPCR en uitplaten aangetoond.

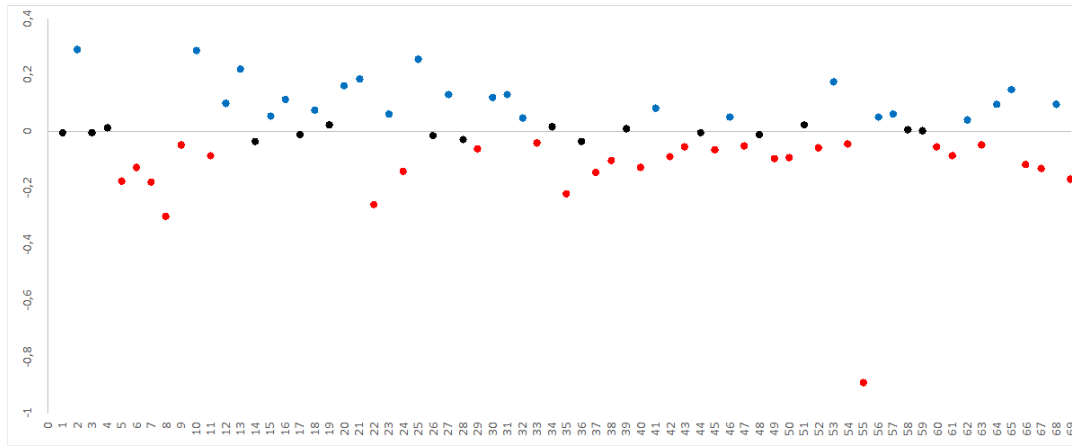
#### Resultaten

We konden de bacterie uit alle cultivars en hun omgeving isoleren (Figuur 15). Ongeveer de helft van alle getoetste isolaten toont een remmend effect op de groei van *Ralstonia pseudosolanacearum* (Figuur 16). In contrast konden ook verschillende isolaten de groei van *R. pseudosolanacearum* stimuleren. Dit laat zien, dat gewas-associeerde bacteriën potentieel een grote rol in de weerbaarheid spelen, van bescherming tot het kwetsbaarder maken van de roos.



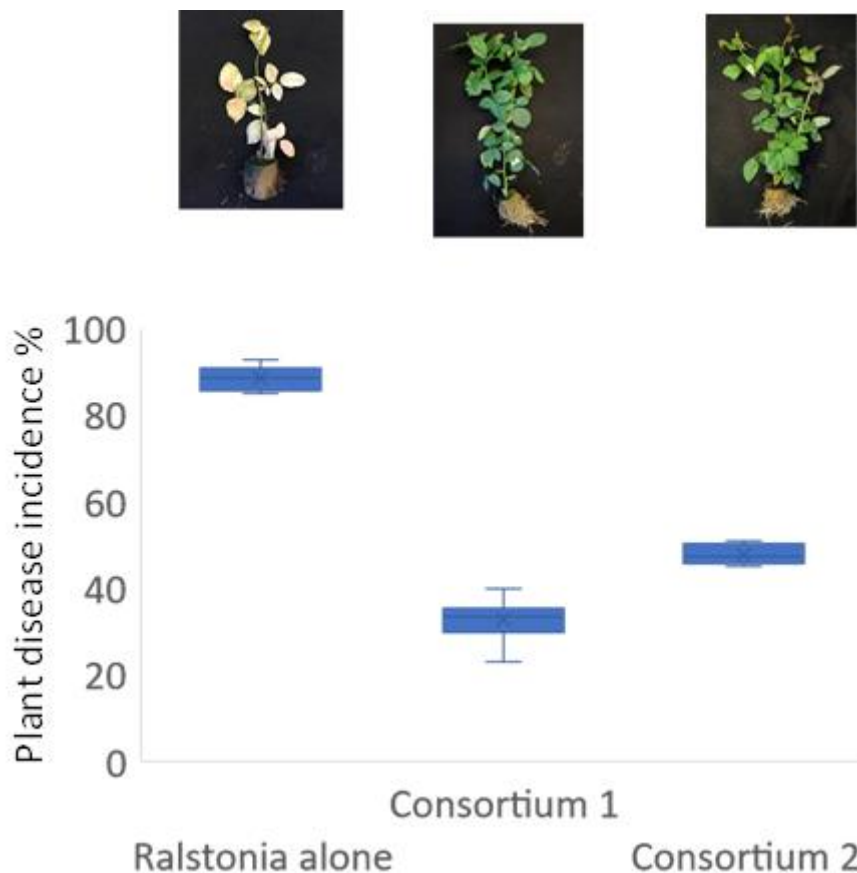
**Fig. 15.** Oorsprong van de 69 natuurlijk voorkomende bacteriecultures gebruikt in deze studie. Elke column toont een van de cultivars, de kleur toont de bron (water, afwater, stengels, bladeren, wortels) aan.





**Fig. 16.** Effect van extracten van natuurlijk voorkomende bacteriën op de groei van *Ralstonia pseudosolanacearum* in vitro. Elk nummer geeft een enkele bacterieisolaat weer. De waarde op de Y as toont het effect in drievoud van hun extract op de groei van *Ralstonia* vergeleken met de controle (positieve waarde in blauw: stimulatie van de groei, negatieve waarde in rood: remming van de groei).

In de volgende stap hebben we onderzocht, of *Ralstonia*-remmende bacteriën in rozen de plant helpt om de weerbaarheid tegen bruinrot te verhogen. Hiervoor hebben we jonge rozen met twee consortia van bacteriën geïnculeerd middels steminjectie. Consortium 1 was een commercieel product van probacteria en Consortium 2 was een mengsel van 7 bacteriën (Figuur 56) geïsoleerd uit roos. Daarna hebben we de planten met *R. pseudosolanacearum* geïnculeerd middels stengel injectie en is de ontwikkeling van symptomen en de groei van het pathogeen gemonitord (Figuur 17).



**Fig. 17.** Effect van de inoculatie van rozen met commerciële biocontrol bacteriën, die tegen bruinrot in tomaat en tabak ingezet worden (Consortium 1), of met een consortium uit roos-geïsoleerde bacteriën (Consortium 2)

Het is belangrijk om te weten dat de infectie (wondinfectie met enorm veel *Ralstonia*) veel zwaarder was dan onder gewone kasconditie. We verwachten dus dat de weerbaarheid onder commerciële condities nagenoeg 100% is.

## Conclusie en discussie

Ons studie laat zien dat roos-geassocieerde bacteriën een integrale deel van de weerbaarheid van rozen tegen *Ralstonia pseudosolanacearum* vormen.

Door het kweken van de goedaardige bacteriesoorten konden we de planten efficiënt beschermen en het niveau van commerciële biopesticide bereiken, die het "state of the art" in de bestrijding van bruinrot zijn (maar in de EU niet commercieel beschikbaar zijn).

Door het verbeteren van het Microbioom blijkt het dus mogelijk rozen tegen ziekte resistent te maken. Of dit ook geldt bij snijhandelingen met besmette mesjes is niet onderzocht.

## Onderzoek SCFF

### Introductie

Rozentelers hebben vastgesteld dat jongere planten gevoeliger lijken voor Rsol infecties dan oudere planten. Het is niet bekend wat de oorzaak van dit verschijnsel is. Een mogelijke verklaring is dat jongere planten gevoeliger zijn voor Rsol door eigenschappen van de plant zelf, bijvoorbeeld omdat het weefsel zachter is of de stengel minder houtig dan in oudere planten, of omdat het afweersysteem minder ontwikkeld is. Een andere mogelijke verklaring is dat de verhoogde gevoeligheid gerelateerd is aan het substraat, waarbij met name het microbioom een belangrijke factor is. Als de microbiële gemeenschap minder ontwikkeld of minder stabiel is in jongere planten, kan dit bijdragen aan een verhoogde gevoeligheid voor ziektes zoals Rsol. Het doel van dit experiment was om de oorzaak van verschillen in gevoeligheid te achterhalen met een relatief eenvoudige proefopzet.

### Methode

Jonge (5-6 weken oud) en oude (1 jaar oud) rozenplanten van een veel geteelde cultivar zijn geplant op een nieuw substraat (microbieel arm) of op een gebruikt substraat (microbieel rijk). Een overzicht van de behandelingen is weergegeven in Tabel 7. In elke behandeling zijn 12 planten getest, verdeeld over drie steenwolmatten. In de negatieve controle zijn vier planten getest.

Behandeling 1 en 2 zijn ingezet om te bepalen of jonge planten op een nieuw substraat inderdaad gevoeliger zijn voor een Rsol infectie dan oude planten op een gebruikt substraat. In behandeling 3 zijn jonge planten niet geplant op een nieuw substraat, maar op het gebruikte substraat waar de eenjarige planten van verwijderd zijn. Als de verhoogde gevoeligheid veroorzaakt wordt door eigenschappen van de plant zelf, is de verwachting dat de planten in deze behandeling nog steeds een verhoogde gevoeligheid hebben, ondanks dat ze geplant zijn op een substraat met een verder ontwikkeld microbioom. Als de verhoogde gevoeligheid wordt veroorzaakt door verschillen in de wortelomgeving, is de verwachting dat de planten in deze behandeling minder gevoelig zijn dan de planten die geplant zijn op een nieuw substraat. In behandeling 4 zijn jonge planten geplant op een nieuw substraat met toevoeging van antagonistische micro-organismen (een mix van *Pseudomonas* soorten, 30 ml/plant,  $10^8$  kve/ml, toegevoegd aan de voet van de plant) die geselecteerd en aangeleverd zijn door Universiteit Utrecht. Behandeling 5 en 6 zijn de negatieve controles, die niet behandeld zijn met Rsol.

**Tabel 7.** Behandelingen om de gevoeligheid voor Rsol van jonge en oude rozenplanten in relatie tot het substraat te bepalen.

Behandeling	Rsol	Leeftijd planten	Substraat	Aantal geteste planten
1	+	Oud	Gebruikt	12
2	+	Jong	Nieuw	12
3	+	Jong	Gebruikt	12
4	+	Jong	Nieuw + antagonisten	12
5	-	Oud	Gebruikt	4
6	-	Jong	Nieuw	4

De planten zijn behandeld met de rozenstam van Rsol (PD7123) door 50 ml van een Rsol suspensie ( $10^8$  kve  $\text{ml}^{-1}$ ) aan te gieten op het steenwolblok bij de voet van de plant. Rsol zou de planten dan via de wortels binnen moeten dringen. De toediening van Rsol is twee keer herhaald (na 1 week en na 11 weken), omdat de cultivar die gebruikt is in dit experiment een veel geteelde cultivar is, maar niet erg gevoelig voor Rsol infecties via de wortel. De planten zijn geïncubeerd bij een temperatuur die gunstig is voor de ontwikkeling van Rsol ( $28^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ ). Na 18-20 weken zijn de planten bemonsterd en geanalyseerd om aanwezigheid van Rsol in wortel- en stengelmateriaal te bepalen. Hiervoor zijn de monsters eerst aan de buitenzijde ontsmet, daarna gemalen in fosfaatbuffer en vervolgens uitgeplaat op SMSA. De monsters zijn ontsmet om alle Rsol aan de buitenzijde van de plant te verwijderen en alleen te beoordelen in welke planten Rsol daadwerkelijk binnen is gedrongen. In de eerste mat van elke behandeling is de ontsmetting uitgevoerd met 70% ethanol, maar dit bleek geen voldoende ontsmettende werking te hebben. In de overige matten is de ontsmetting daarom uitgevoerd met een combinatie van 0.5% chloor en 70% ethanol.

## Resultaten

Gedurende 18 weken zijn geen symptomen waargenomen in de rozenplanten. Na 18 weken zijn de planten bemonsterd en geanalyseerd om latente infecties aan te tonen.

In de planten van de eerste steenwolmat van elke behandeling werd geen Rsol gevonden in de stengel. In de wortels werd Rsol wel bij elke behandeling gedetecteerd, maar daarbij moet opgemerkt worden dat de oppervlakterilistatie bij deze planten niet voldoende was. Het is daarom niet mogelijk om met zekerheid vast te stellen dat de Rsol die gedetecteerd is, daadwerkelijk de wortels binnen is gedrongen, en niet alleen maar aan de buitenzijde heeft gezeten. In de eerste mat van zowel behandeling 1 (oude planten op gebruikt substraat) als behandeling 2 (jonge planten op nieuw substraat) is Rsol gedetecteerd in twee van de vier planten, in een concentratie van  $10^1$ - $10^2$  kve  $\text{g}^{-1}$ . Op basis van de resultaten van deze eerste mat, is er dus geen verschil in gevoeligheid tussen jonge en oude planten vastgesteld. In jonge planten op een gebruikt substraat (behandeling 3), werd Rsol gedetecteerd in het wortelmateriaal van drie van de vier planten, in een concentratie van  $10^1$ - $10^3$  kve  $\text{g}^{-1}$ . In jonge planten op een nieuw substraat met toevoeging van antagonisten, is Rsol in het wortelmonster van één van de vier planten gevonden, in een concentratie van  $10^3$  kve  $\text{g}^{-1}$ .

Echter, in de twee andere steenwolmatten van elke behandeling, waarbij de oppervlakterilistatie van het plantmateriaal is uitgevoerd met zowel ethanol als chloor, is geen Rsol gedetecteerd in het plantmateriaal, met uitzondering van de wortels van één oude plant op gebruikt substraat. Het is daarom aannemelijk dat de Rsol die gedetecteerd is in de planten van de eerste matten, alleen aan de buitenzijde van de wortels heeft gezeten, en niet de plant binnen is gedrongen om een infectie te veroorzaken.

## Conclusies

- De hoge concentratie van Rsol die is toegevoegd aan de wortels van de plant, de drievoudige toediening en de gunstige omstandigheden voor de ontwikkeling van Rsol, hebben niet geresulteerd in een efficiënte besmetting van Rsol. Het is daarom niet mogelijk om conclusies te trekken met betrekking tot de oorzaak van verschillen in gevoeligheid tussen jonge en oude rozenplanten.
- Dit experiment bevestigt dat het veel geteelde rozencultivar dat gebruikt is slechts een minimale gevoeligheid heeft voor Rsol. Zelfs onder gunstige omstandigheden, is er een lage kans op infectie, zoals ook gevonden in eerdere experimenten. De kans dat een infectie ontstaat via verwonding van de stengel, bijvoorbeeld tijdens gewashandelingen, is groter, zoals aangetoond in eerdere proeven. Omdat deze cultivar geen duidelijke symptomen laat zien bij een infectie door Rsol, blijft het risico op verspreiding van latente infecties aanwezig.

## Deliverables

- Kennis over genomen (DNA sequenties) en hun variatie tussen verschillende phylotypen.
- Inzicht in welke TaqMan assays het beste voldoen
- Verbeterd protocol voor de detectie van de bacterie in drainwater
- Kennis over pathogeniteit van verschillende stammen van Rsol op verschillende gewassen
- Kennis over pathogeniteit verschillende stammen van Rsol op verschillende cv's van roos.
- Kennis over verspreiding van de Rsol bacterie door de plant en in steenwolmatten
- Hygiëne protocol
- Kennis over gebruik van verschillende organismen om Rsol te reduceren
- Database van genomsequenties van Rsol
- Publicaties
- Uitgebreid Eindverslag

## Conclusies

- Momenteel worden steeds meer gehele genomsequenties bepaald van belangrijke plantpathogenen. Zo ook voor *Ralstonia (pseudo)solanacearum*, wat een genomgrootte van ong 5.5 Mb heeft, 5.5 miljoen baseparen. Genomische analyse van sequenties van 120 verschillende isolaten van *R. solanacearum* van over de gehele wereld laten dan ook goede mogelijkheden zien voor diagnostiek en track en trace. Er zijn nl. basenverschillen aan te wijzen die gebruikt kunnen worden voor specifieke detectietoetsen.
- In de literatuur zijn momenteel 18 TaqMan PCR's detectietoetsen gepubliceerd die verschillende stukjes van het genoom van *Ralstonia solanacearum* aantonen. Door gebruik te maken van alle genomsequenties van de 120 isolaten kunnen deze 18 toetsen 'in silico' goed geëvalueerd worden. De assay beschreven door Weller et al. (2000) wordt vaak gebruikt voor de detectie van *R. solanacearum* en toont wel alle relevante *Ralstonia* stammen aan, maar geeft ook een kans op vals positieven.
- Uit deze 18 toetsen worden de beste twee (Weller et al, 2000 en Vreeburg et al. 2018) gekozen en deze worden samen met een interne controle gecombineerd in een zgn. triplex TaqMan PCR. Door deze combinatie leidt dit tot een verbeterde detectie, iets wat de NAK graag wil. Zij zien bij een enkele toets soms vals positieve uitslagen.
- Bacteriën hebben elk een eigen medium waarop ze het beste groeien, zo ook *Ralstonia*. We hebben gekeken of we het medium voor *Ralstonia* nog kunnen verbeteren. Het verrijken in een semi-selectief vloeibaar medium leidt echter niet tot verbetering van de detectie gevoeligheid, maar het concentreren d.m.v. filtratie in een aantal gevallen wel.
- Uit waardplantenonderzoek is gebleken dat kurkuma, kalanchoe, pelargonium en anthurium allen waardplanten zijn van Rsol. Er kunnen heftige symptomen optreden, leidend tot afsterving van de plant. Per gewas is er verschil in gevoeligheid voor de rozenstam (PD7123) en de kurkumastam (PD2272) van Rsol.

- De gevoeligheid van vier gerberarassen voor de rozenstam van *Ralstonia* (PD7123) is bepaald. In een van de rassen was sprake van een groeivertraging. In de overige drie rassen zijn geen symptomen gevonden en is ook geen latente infectie aangetoond.
- Bij een temperatuur van 20°C is Rsol niet in staat om voor langere tijd te overleven in potgrond, kokos, zemelen en mesjes. In drainwater is er sprake van een snelle afname van Rsol, maar zijn er ook na enkele maanden nog enkele cellen in leven.
- De overleving van *Ralstonia* buiten de kas onder Nederlandse winterse omstandigheden is getest in slootwater, grond en plantmateriaal. Onder gemiddelde Nederlandse omstandigheden zijn de overwinteringskansen van *Ralstonia* buiten de kas klein. Er was geen sprake van een viable but non culturable state (VBNCs) van de cellen.
- De effectiviteit van Menno Florades en Hyperclean X m.b.t. het ontsmetten van besmette mesjes met opgedroogd plantensap is bepaald. Beide middelen waren effectief wanneer gebruikt volgens voorschrift.
- De resultaten van dit project hebben geen gevolgen voor de bestaande hygiëneprotocollen. De resultaten hebben meer inzicht gegeven in het belang van verschillende infectiebronnen, maar om infecties te voorkomen blijft het noodzaak om tijdens de teelt de nodige hygiënemaatregelen te treffen en alert te zijn bij binnenkomend plantmateriaal.
- Wanneer we verschillende cultivars van roos testen op gevoeligheid op *R. pseudosolanacearum* blijkt dat er duidelijke verschillen bestaan. Dit onderzoek bevestigt derhalve de resultaten van de NVWA, waarin bleek dat commerciële cultivars van snijrozen verschillen in gevoeligheid voor *Ralstonia pseudosolanacearum*. Stammen van deze bacterie geïsoleerd uit verschillende waardplanten verschillen in agressiviteit voor roos, waarbij de stam uit roos het meest agressief is.
- Elk pathogeen heeft ook zijn antagonisten, zo ook *R. pseudosolanacearum*. Eén ervan zijn bacteriofagen. Een bacteriofaag of kortweg faag is een klein virus dat alleen een specifieke bacterie infecteert. Deze specifieke bacteriofagen kunnen geïsoleerd worden. Eerste experimenten met een mengsel van dergelijke bacteriofagen en antagonistische bacteriën hebben een effectieve pathogeen-onderdrukking aangetoond. Verdere proeven met fagen konden niet worden uitgevoerd wegens gelimiteerd budget.

## Communicatie

De volgende communicatie activiteiten zijn uitgevoerd binnen de looptijd van het project:

- Project meetings PPS Ralstonia: Kick off meeting 8 feb 2017, 20 nov 2017, 19 sep 2018,
- Bilaterale meeting met Univ Utrecht, 12 sep 2018
- Presentaties voor telers en veredelaars/vermeerderders: 7 nov 2016, 30 jun 2017, 27 feb 2020
- Overleg WUR – NVWA mbt onderdeel A2, 19 sep 2017
- Overleg met WUR, Keuringsdiensten NAK en Naktuinbouw, SCFF en NVWA mbt Taqman PCRs
- Jan vd Wolf meldt een AIO project met TU Delft (NWO) waarin de populatiedynamica van *Ralstonia* in aquifers (ondergrondse waterreservoirs voor irrigatie) wordt bestudeerd
- Er is in Euphresco verband een project opgestart met 11 projectpartners op het gebied van vervanging biologische virulentie assay voor Rsol door een moleculaire toets (A2).
- Meetings, presentaties publicaties (wetenschappelijke publicaties en vakbladen)
- Website: <https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Topsectoren/show/TU-16012-Preventie-Ralstonia-uitbraken.htm>

## Publicaties, Presentaties

### Publicaties wetenschappelijk:

Viola Kurm, Ilse Houwers, Claudia Coipan, Peter Bonants, Cees Waalwijk, Theo van der Lee, Balazs Brankovics and Jan van der Wolf. Whole genome characterization of strains belonging to the *Ralstonia solanacearum* species complex and in silico analysis of TaqMan assays for detection in this heterogenous species complex. In voorbereiding zie blz 36-51.

Nasim Sedighian, Odette Mendes, Leo Poleij, Peter Bonants, Jan van der Wolf. Detection of *Ralstonia pseudosolanacearum* in drain water based on concentration, enrichment and a duplex TaqMan assay. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin (2020) 50 (2), 340–349. zie blz 56-66.

Jan van der Wolf, Pieter Kastelein, Leo Poleij, Patricia van der Zouwen, Odette Mendes, Peter Bonants. Epidemiologie in roos studies. In voorbereiding zie blz 66-80.

Viola Kurm, Luc Stevens, Odette Mendes, Patricia van der Zouwen, Marjon Krijger, Pieter Kastelein, Leo Poleij, P. Bonants, C. Allen & Jan van der Wolf. Generation and testing of antibiotic resistant strains. In voorbereiding zie blz 81-91.

Hu J., Puentes-Tellez PE., Ravanbakhsh M.H., Jousset A. Changes of Rose plant Microbiome after probiotic consortium inoculation based Miseq data. In voorbereiding.

### Publicaties vakbladen:

Viola Kurm en anderen, Hans Neefjes. Variatie in vatbaarheid snijroos voor *Ralstonia*, Vakblad Bloemisterij 23 nov 2018.

Kurm, V., Kastelein, P., Van der Wolf, J., & Bonants, P. (2019). Niet elke snijroos is even vatbaar voor *Ralstonia*. Vakblad voor de bloemisterij.

### Presentaties:

Viola Kurm, Odette Mendes, Peter Bonants, Jan van der Wolf, Claudia Coipan, Ilse Houwers, Cees Waalwijk. Use of whole genome sequencing data in the taxonomy and diagnostics of plant pathogenic *Ralstonia* species, KNPV werkgroep phytobacteriën, 18 oktober 2018.

Van der Wolf, J., Kurm, V., Mendes, O., Bonants, P., Coipan, C., Houwers, I. and Waalwijk, C. 2018. Diagnostics and epidemiology of the *Ralstonia solanacearum* species complex. Meeting of the Plant Pathology Organization of Chile (SOCHIFIT) from 28-30 November 2018 in Valdivia, Chile.

Gewascommissie roos, nov 2018. Preventie van *Ralstonia solanacearum* uitbraken in de Nederlandse land- en tuinbouw.

### Posters:

Puentes-Tellez PE., Jousset A. Evolutionary training of bacteriophages as an strategy to obtain enhanced-virulence consortium against a diversified bacterial pathogen. International Society of Microbial Ecology, ISME2018, Leipzig, Germany, 12-17 August 2018.

Puentes-Tellez PE., Jousset A. Evolutionary training of bacteriophages as an strategy to obtain enhanced-virulence consortium against a diversified bacterial pathogen. Microbial Eco-Evolutionary Dynamics , IGC Symposium 2018 . Oeiras, Portugal, 22-24 October 2018.

## Acknowledgements

Leon Tjou-Tam-Sin, Maria Bergdsma - Vlami en Martijn Schenk (NVWA) voor inhoudelijke discussie m.b.t. met name het onderdeel A2.

NVWA, NAK en Naktuinbouw voor inhoudelijke discussie m.b.t. met name onderdeel A1 en A3.

De projectcommissie voor hun bijdragen in de diverse meetings gedurende de looptijd van het project. Stichting Programmafonds Glastuinbouw, Topsector T&U en de private partijen voor hun cash en in kind bijdragen.