



PPS-eindrapportage

Over de PPS'en die afgerond zijn dient een inhoudelijke en financiële eindrapportage te worden opgesteld. Voor de financiële rapportage dient een totaaloverzicht van de projectkosten van de realisatie en de financiering te worden gegeven. Hier is een apart format voor beschikbaar.

De eindrapportages worden integraal gepubliceerd op de websites van de TKI's/topsector. Zorg er s.v.p. voor dat er geen vertrouwelijke informatie in de rapportage staat.

De PPS-eindrapportages dienen voor 1 maart 2020 te worden aangeleverd bij de TKI's via info@tkitu.nl of info@tki-agrifood.nl. Voor Wageningen Research loopt de aanlevering via een centraal punt.

Algemene gegevens

PPS-nummer	KV 1605-082
Titel	Preventie van <i>Ralstonia solanacearum</i> uitbraken in de Nederlandse land- en tuinbouw
Thema	T&U Meer met Minder, Plantgezondheid
Uitvoerende kennisinstelling(en)	WUR, BU Biointeracties & Plantgezondheid
Projectleider onderzoek (naam en e-mailadres)	Dr. P. Bonants, WUR, peter.bonants@wur.nl
Penvoerder PPS (namens private partij, naam)	Mevr. H. Verberkt, Glastuinbouw Nederland
Contactpersoon overheid	Mevr. A. Zweep, LNV-DANK
Adres van de projectwebsite	https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Topsectoren/show/TU-16012-Preventie-Ralstonia-uitbraken.htm
Startdatum	1-1-2017
Einddatum	31-12-2019

Goedkeuring penvoerder/consortium

De eindrapportage dient te worden besproken met de penvoerder/het consortium. De TKI('s) nemen graag kennis van eventuele opmerkingen over de rapportage.

De penvoerder heeft namens het consortium de eindrapportage	<input checked="" type="checkbox"/> goedgekeurd <input type="checkbox"/> niet goedgekeurd
Eventuele opmerkingen over de eindrapportage:	

Consortium

Zijn er wijzigingen geweest in het consortium/de project-partners? Zo ja, benoem deze	Nee
---	-----

Inhoudelijke samenvatting van het project

Probleemomschrijving	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Rsol) is een quarantaine bacterie (2019/2027) 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 vertonen, waaronder het waardplantenreeks. 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 kennislücken is gewerkt in dit project.
Doelen van het project	<i>Ralstonia solanacearum</i> (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, vermeerderders, telers, keuringsdiensten en NVWA om Rsol uit de rozenketen weg te houden en in geval van nieuwe besmetting snel te kunnen elimineren.

Resultaten	
Beoogde resultaten uit het projectplan	<p>Op de diverse onderdelen zou het project kennis opleveren voor <i>Ralstonia solanacearum</i> in roos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - kennis van het genoom van de bacterie, - kennis over host range voor een aantal gewassen - kennis over verspreiding van de bacterie in de rozenteelt, - kennis over verbetering diagnostiek - kennis over preventie maatregelen en - kennis over weerstandsverhoging tegen <i>Ralstonia</i> <p>Daarnaast wordt deze kennis uitgerold naar andere gewassen die waardplant kunnen zijn van <i>Ralstonia</i> (o.a. Gerbera en potplanten).</p>
Behaalde resultaten	<p>Binnen het project is aan verschillende onderwerpen gewerkt:</p> <p>A: Diagnostiek</p> <p>A1: Genetische karakterisatie isolaten:</p> <p>Van 120 isolaten van <i>Ralstonia solanacearum</i> is de genoom sequentie geanalyseerd. Van deze 120 zijn er 31 afkomstig van NAK. Gehele genoom sequenties zijn bepaald van isolaten, afkomstig van diverse landen en waardplanten, met behulp van Illumina HiSeq (86) of PacBio (5) sequencing of afkomstig van NCBI Genbank (29). Relevante regio's voor verwantschap zijn met behulp van al deze genoomsequenties in kaart gebracht. Het rozenisolaat (PD7123) is het meest (99.67%) verwant aan een isolaat van Aubergine uit India (Rs-09-161).</p> <p>Voor <i>Ralstonia solanacearum</i> worden 5 genen gebruikt om isolaten goed te karakteriseren en in te delen in phylotypes. Sequenties van deze vijf genen (egl, ITS, 16S, mutS en fliC) worden uit de genoomsequentie gehaald en aan elkaar gekoppeld (concatenated) en dan gezamenlijk via een zgn. pijplijn geanalyseerd. Duidelijk zijn de verschillende phylotypes (I, IIA, IIB, III en IV) van elkaar te onderscheiden.</p> <p>Ook zijn DNA regio's, die gebruikt worden voor detectie in een TaqMan assay, geanalyseerd. Er zijn in de literatuur 18 TaqMan PCR's beschreven die worden gebruikt voor detectie van <i>Ralstonia solanacearum</i>. De assay beschreven door Weller et al. (2000) wordt vaak gebruikt voor de detectie van <i>R. solanacearum</i> en toont wel alle relevante <i>Ralstonia</i> stammen aan, maar geeft ook een kans op vals positieven. De nieuwe assay van de NAK (Nytor) werd daarom ook meegenomen in het onderzoek. Een gedegen analyse van alle beschreven TaqMan assay detectietoetsen is uitgevoerd en wordt verwerkt in een publicatie.</p>

A2. Alternatief voor de pathogeniteitsassay.

Moleculaire toets voor virulentie: van de 120 isolaten zijn 227 potentiële virulentiegenen (uit de literatuur) uit genoom sequenties in kaart gebracht. Virulentiegenen kunnen hiermee worden geselecteerd die aanwezig zijn in alle stammen. In afstemming met de NVWA is een vervoltraject afgestemd om genen te selecteren die tot expressie komen in de interactie Rsol – tomaat. Om genen te selecteren die een relatie met virulentie hebben, zijn er groeiproeven ingezet met Rsol op verschillende media. Op twee tijdstippen met twee Rsol isolaten (IPO4001/PD7123 en IPO1828) en twee media (SMSA +/- tomatenblad extract (TLE)) is in duplo RNA geëxtraheerd. Deze 16 RNA extracten zijn met behulp van Illumina HiSeq gesequenced. Helaas waren de sequentie data niet goed. Een tweede poging leverde ook niet de gewenste resultaten op.

A3. Optimalisatie gevoeligheid bestaande methoden:

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.

Experimenten zijn uitgevoerd om de detectie te verbeteren in drainwater: 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. Een eerste inventarisatie van gebruikte methoden bij de partners is gemaakt.

Gebruikmakend van deze inventarisatie is er verder gewerkt aan het verbeteren van de DNA-extractie en de TaqMan PCR assay om remming van de reactie te voorkomen.

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.

B1: Waardplanten.

WUR:

In het project zijn verschillende cultivars van snijroos getoetst op gevoeligheid voor *Ralstonia*. Verschillende stammen van *R. pseudosolanacearum* zijn op agressiviteit getest, nl. een stam uit snijroos, anthurium en curcuma. 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) 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 en steenwol van de wortel-geïnoculeerde planten. De aanwezigheid van *R. pseudosolanacearum* werd bepaald door uitplaten op een selectief groeimedium en de aanwezigheid van de ziekteverwekker op het groeimedium werd met behulp van een moleculaire toets d.m.v. een TaqMan PCR 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 verspreiden naar de takken, maar niet de stammen uit curcuma en anthurium. Bij inoculatie van wortels via de steenwolmat werden alleen infecties van de wortel gevonden bij hoge dichtheden van de rozenstam. In 2018 werden de proeven uitgevoerd bij 28 °C. In dit jaar 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. Ook de planten besmet met de anthurium-stam lieten duidelijke symptomen zien, maar de curcuma-stam was alleen zwak ziekteverwekkend. Ziekteontwikkeling op steenwol verschilde niet van ziekteontwikkeling in potgrond. Na wortel-inoculatie toonden planten van cultivar 3 de eerste symptomen na 20 dagen. Op de 49^e 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 zelfs in het water uit de steenwolmatten. Opnieuw bleek cultivar 3 het meest gevoelig. Na wortel-inoculatie kon deze stam niet worden gedetecteerd in stengelbasis, maar wel in wortels.

Dit onderzoek bevestigt de resultaten van onderzoek door 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. 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 stengel-inoculatie systemische verspreiding in de plant plaats. Daarbij werd aangetoond dat er ook verspreiding naar het afvoerwater in de steenwolmat mogelijk is. Planten

kunnen vanuit geïnoculeerd steenwol besmet raken, maar het risico hierop is afhankelijk van de dichtheid van de ziekteverwekker. Tijdens de rozenteelt is het dus belangrijk om ook water uit steenwol op de ziekteverwekker te toetsen en verspreiding via voeding- en drainwater te voorkomen door sanitaire maatregelen.

SCFF:

Om inzicht te krijgen in het risico van introductie van Rsol in andere tuinbouwgewassen dan roos, zijn zes potentiële waardplanten getoetst op gevoeligheid voor Rsol. Hierbij is ook de incubatietijd bepaald (het aantal weken tussen de infectie en het optreden van symptomen). In planten waarin Rsol wel is aangetoond, maar geen symptomen zijn opgetreden, is daarnaast bepaald hoe de verspreiding van Rsol binnen de plant was, met oog op het ontwikkelen van een bemonsteringsstrategie voor het detecteren van latente infecties.

Zes potentiële waardplanten zijn getest op gevoeligheid voor Rsol: Curcuma cv1, Kalanchoe cv1, Pelargonium 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. De gevoeligheid van de planten is getest met twee stammen van Rsol: een stam geïsoleerd uit roos en een stam geïsoleerd uit Curcuma. De planten zijn besmet door een hoge concentratie Rsol met behulp van een injectienaald in de stengel of het rhizoom in de plant te brengen. 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. Omdat na de eerste proef geen conclusies konden worden getrokken m.b.t. de gevoeligheid van gerbera voor Rsol, is het onderzoek voor dit gewas herhaald met vier cultivars.

Uit de resultaten is gebleken dat de rozenstam en de curcumastam van Rsol verschillen met betrekking tot hun virulentie voor de verschillende gewassen. Zo lieten Pelargonium cv1 en Anthurium cv1 symptomen zien in reactie op zowel de rozenstam als de curcumastam van Rsol. In Kalanchoe cv1 daarentegen, waren alleen symptomen zichtbaar na inoculatie met de rozenstam, terwijl Curcuma cv1 juist alleen symptomen liet zien na inoculatie met de curcumastam. In elk van deze gewassen zijn typische Rsol symptomen waargenomen, vaak beginnend met verwelking of vergeling van de plant, en uiteindelijk in veel gevallen resulterend in afsterving van de plant. Van de vier geteste gerberacultivars is in één cultivar een vermeerdering van Rsol aangetoond. In deze cultivar was geen sprake van typische Rsol symptomen, maar is wel een groeivertraging waargenomen. In de overige drie cultivars zijn geen symptomen gevonden en is ook geen latente infectie aangetoond. In een gedeelte van de planten van Curcuma cv1 en Kalanchoe cv1, die geen symptomen lieten zien na inoculatie met een van de Rsol stammen, zijn wel latente infecties aangetoond. Deze infecties vormen een risico voor ongewenste verspreiding van Rsol.

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.

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.

B2: Infectieroutes.

SCFF:

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.

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. De besmette materialen zijn geïncubeerd bij kamertemperatuur en maandelijks uitgeplaat om de overleving te bepalen. Onder de geteste omstandigheden werd na één maand (tijdstip 1) geen Rsol meer gedetecteerd in potgrond, kokos, zemelen en mesjes. Op deze materialen is Rsol dus niet in staat om langere tijd te overleven. 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. Ondanks dat op mesjes geen langdurige overleving is aangetoond, zijn gereedschappen wel een belangrijke infectiebron bij het uitvoeren van gewashandelingen. Een goede en regelmatige desinfectie blijft dus belangrijk. In drainwater was er sprake van een snelle afname van Rsol. Na één maand was de concentratie levende Rsol al afgenomen met >99,9%, maar na zes maanden konden er nog steeds enkele levende Rsol cellen worden gedetecteerd. Dit betekent dat desinfectie van drainwater belangrijk is wanneer het water gerecirculeerd wordt.

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 en dooien (48 uur bij -10°C gevolgd door 48 uur bij 5°C). De materialen zijn op verschillende momenten uitgeplaat om de overleving vast te stellen. Hieruit is gebleken dat bij vriestemperaturen en met name ook temperaturen van een paar graden boven het vriespunt, een snelle afname van Rsol plaatsvindt. Bij afwisselende temperaturen in de vorm van vriezen en dooien, werd Rsol zelfs binnen enkele dagen afgedood. Deze fluctuerende omstandigheden zijn typerend voor een gematigd klimaat zoals in Nederland. Het is daarom onwaarschijnlijk dat Rsol in staat is om te overwinteren buiten de kas.

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. Uit de resultaten is gebleken dat Hyperclean X en Menno Florades, wanneer toegepast volgens gebruiksvoorschrift, effectieve middelen zijn 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.

C1. Hygiëne- en teeltmaatregelen

SCFF:

Risicoanalyses zijn uitgevoerd om 'critical control points' te definiëren. De risicoanalyses zijn ondersteund door experimenteel onderzoek naar infectieroutes (zie B2). 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 de te nemen maatregelen wanneer infecties toch optreden. Maatregelen om infectie te voorkomen zijn met name gericht op binnenkomend plantmateriaal en hygiënemaatregelen tijdens de teelt. 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 alert te zijn bij binnenkomend plantmateriaal en tijdens de teelt de nodige hygiënemaatregelen te treffen om eventuele verspreiding te voorkomen.

C2: Weerstandsverhoging.

Ralstonia solanacearum is een bodemgebonden bacterie die op dit moment de Nederlandse glastuinbouwsector bedreigt. Tot op heden zijn er zeer weinig preventiestrategieën beschikbaar, waardoor uitbraken dramatisch zijn voor telers en hen dwingt tot het gebruik van drastische hygiëne- en quarantaine maatregelen. Het idee om gunstige microben te gebruiken is diverse keren onderzocht, maar tot op heden zijn er slechts enkele toepassingen die betrouwbaar werken onder veldomstandigheden. De Universiteit van Utrecht heeft onlangs een doorbraak bereikt met de ontwikkeling van zeer efficiënte strategieën om de bodem- en plantweerbaarheid van tomaat te vergroten tegen deze ziekteverwekker met behulp van speciaal ontworpen mixen van microben. Een goed ontworpen mengsel van bacteriën kon *R. solanacearum* in de natuurlijke bodem tot 100x onderdrukken. Wanneer tomaat en roos met dezelfde subsoort van *R. solanacearum* besmet worden, kunnen de resultaten gemakkelijk vertaald worden naar verhogen van de plantweerbaarheid in andere gewassen. Deze benadering dient als basis voor een robuuste en kosteneffectieve methode om de weerstand/weerbaarheid van de plant tegen de bacterie te verhogen.

In dit onderdeel werd onderzocht of behandeling van wortels/planten met weerstandsverhogende middelen, (mengsels van) antagonisten en probiotica kan bijdragen aan een reductie van het aantal uitbraken. Doel is, moederplanten in Afrika te behandelen, om zo stekken *Ralstonia*-vrij de houden, die naar Nederland voor veredeling worden geëxporteerd. Ook

	<p>kunnen deze micro-organismen zo wellicht verdere verspreiding van <i>Ralstonia</i> voorkomen.</p> <p>Universiteit Utrecht (UU): UU onderzoekt organismen die de weerstand tegen Rsol kunnen verhogen en waarmee de infectiedruk kan worden verlaagd. Zeventien (17) Rsol isolaten van roos geven verschillen te zien in o.a. groeisnelheid, metabolisme, virulentie (middels vorming van biofilms, EPS productie en beweeglijkheid) en antibioticaresistentie. <i>Pseudomonas</i>, bacteriofagen en protozoa zijn geïsoleerd die in potentie gebruikt kunnen worden in een strategie ter verhoging van de plantweerstand. In 2018 is het volledige genoom van 17 <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i>-isolaten van Rosa sp. bepaald. Resultaten duiden op lokale adaptieve genomische diversificatie van het pathogeen. Er zijn bacteriofagen geïsoleerd die een verbeterde effect laten zien tegen alle Rsol isolaten wanneer ze worden toegevoegd in een mengsel. Bovendien zijn er verschillende bacterieel-endofytische stammen verkregen, uit materiaal van gezonde rozenplanten en uit water, met antagonistische effecten tegen Rsol. Eerste experimenten met een mengsel van bacteriofagen en antagonistische bacteriën hebben effectieve pathogeen-onderdrukking aangetoond. De effectieve mixen en de beste methode van toediening zijn in 2019 i.s.m. WUR gebruikt in planta-experimenten in Q-kassen om de plantenresistentie tegen <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> te beoordelen.</p> <p>Twee consortia zijn getest om de ontwikkeling van ziekten door <i>Ralstonia</i> te voorkomen.</p> <p>Consortium 1: Commerciële mix van <i>Pseudomonas</i> spp. gebruikt tegen <i>Ralstonia</i> verwelkt in tomaat</p> <p>Consortium 2: Mix van zeven bacteriën geïsoleerd uit rozen.</p> <p>Resultaten laten zien dat beide microbiële consortia rozenziekte kunnen verminderen, maar niet tot nul.</p> <p>Conclusies:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Beide microbiële consortia kunnen de incidentie van plantenziekten en de pathogene dichtheid verminderen - Veelbelovende methode om de roosweerstand tegen <i>Ralstonia</i>-infectie te verhogen.
Geef een toelichting op eventuele wijzigingen t.o.v. het projectplan.	

Wat heeft het project opgeleverd voor	
Betrokken kennis instellingen (wetenschappelijk, nieuwe technologie, samenwerking)	<p>Kennis over genomen (DNA sequenties) en hun variatie tussen verschillende phylotypen.</p> <p>Inzicht in welke TaqMan assays het beste voldoen</p> <p>Verbeterd protocol voor de detectie van de bacterie in drainwater</p> <p>Kennis over pathogeniteit van verschillende stammen van Rsol op verschillende gewassen</p> <p>Kennis over pathogeniteit verschillende stammen van Rsol op verschillende cv's van roos.</p> <p>Kennis over verspreiding van de Rsol bacterie door de plant en in steenwolmatten</p>

	Hygiëne protocol Kennis over gebruik van verschillende organismen om Rsol te reduceren
Betrokken bedrijven (toepassing van resultaten in de praktijk, en op welke termijn?)	Kennis over detectietoetsen Verspreiding van de bacterie Kennis over gevoeligheid van verschillende cv's Richtlijnen voor sanitaire zaken Gebruik micro-organismen ter verhoging weerbaarheid tegen Rsol
Maatschappij (sociaal, milieu, economie)	
Evt. andere stakeholders (spin offs)	NVWA, Keuringsdiensten (Naktuinbouw, NAK)

Follow-up	
Is er sprake van een of meer octrooi-aanvragen (first filings) vanuit deze PPS?	Nee
Komen er vervolg projecten? Zo ja, geef een toelichting (bv. contractonderzoek dat voortkomt uit dit project, aanvullende subsidies die zijn verkregen, nieuwe PPS)	Niet bekend

Opgeleverde producten gedurende de gehele looptijd van de PPS (geef de titels en/of omschrijvingen van de producten / deliverables of een link naar de producten op de projectwebsite of andere openbare websites)
<u>Wetenschappelijke artikelen:</u> 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 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 In voorbereiding Jan van der Wolf, Pieter Kastelein, Leo Poleij, Patricia van der Zouwen, Odette Mendes, Peter Bonants Epidemiologie in roos studies In voorbereiding Hu J., Puentes-Tellez PE., Ravanbakhsh M.H., Jousset A. Changes of Rose plant Microbiome after probiotic consortium inoculation based Miseq data. In voorbereiding
<u>Externe rapporten:</u>

SCFF: Onderzoeksrapport In voorbereiding
WUR: Onderzoeksrapport In voorbereiding
UU: Onderzoeksrapport In voorbereiding

Artikelen in vakbladen:

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

Inleidingen/posters tijdens workshops, congressen en symposia:

Presentations:

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, presentatie 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.

Presentaties voor telers en veredelaars/vermeerderaars: 7 nov 2016, 30 jun 2017, 27 feb 2020.

TV/ Radio / Social Media / Krant:

Overig (Technieken, apparaten, methodes etc.):

- Verbeterde detectiemethode