

# Onderzoek naar de virulentie van *Ralstonia pseudosolanacearum* uit kasroos (*Rosa* spp.)

N.N.A. Tjou-Tam-Sin,  
J.L.J. van de Bilt,  
M. Westenberg,  
P.P.M.A. Gorkink-Smits,  
N.M. Landman en  
M. Bergsma-Vlami

NVWA

## Samenvatting

Isolaten van *Ralstonia pseudosolanacearum*, afkomstig uit kasroos (*Rosa* spp.), zijn getoetst op virulentie in twee rozencultivars ('Armando' en 'Red Naomi') en in tomaat, tabak, aubergine en paprika. De toegepaste inoculatiemethoden laten significante verschillen zien in expressie van de ziekte. Hierbij blijkt infectie via mechanische beschadiging significant effectiever te zijn voor expressie van de ziekte dan het aangieten van de potgrond met inoculum. Ook zijn er verschillen gevonden in de gevoeligheid tussen de rozencultivars 'Armando' en 'Red Naomi', waarbij de eerstgenoemde significant gevoeliger is. Dit uit zich in grotere hevigheid van de ziektesymptomen en in het aantal ziektegevallen (de ziekte-incidentie). Ook is er een duidelijk verband waargenomen tussen de temperatuur en de gevoeligheid van beide cultivars, onafhankelijk van de inoculatiemethode. Zowel tomaat, tabak, aubergine als paprika zijn allen vatbaar voor de isolaten van *R. pseudosolanacearum* afkomstig van roos. Verder is gevonden dat beide rozencultivars latent geïnfecteerd kunnen raken met *R. pseudosolanacearum* en *R. solanacearum* isolaten die niet afkomstig zijn uit roos. Latente infecties met *R. pseudosolanacearum* blijken in roos te kunnen optreden bij relatief lage infectietemperaturen (20°C). Dit fenomeen veroorzaakt grote risico's voor de totale sierteeltsector aangezien de mogelijkheid bestaat dat latent geïnfecteerde kasrozen vermeerderd en verspreid worden en na verloop van tijd terechtkomen in een situatie waarbij de klimaatomstandigheden optimaal zijn voor het pathogeen.

## Inleiding

Bacterieverwelkingsziekte veroorzaakt door stammen uit het *Ralstonia solanacearum* Species Complex (RSSC) verloopt zowel bij vatbare siergewassen als bij veldgewassen meestal rampzalig en veroorzaakt grote economische verliezen in veel landen (Hayward, 1991). Sinds 2014 is het *Ralstonia solanacearum* Species Complex (RSSC) opgedeeld in drie organismen, te weten *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* en *R. syzygii* (Safni *et al.*, 2014). Binnen *Ralstonia solanacearum sensu stricto* (zijnde onderdeel van de nieuwe indeling) is er een onderscheidbare variant die goed kan gedijen in de gematigde klimaatzone.

Deze variant is in Nederland bekend als de veroorzaker van bruinrot bij aardappelen. De bruinrotbacterie komt in sommige gebieden in Nederland voor in het oppervlaktewater (Janse *et al.*, 2009). Hoewel van oudsher de belangrijkste waardplanten van RSSC vooral te vinden zijn onder de *Solanaceae* en de *Musaceae* (Buddenhagen, 1961; Hayward, 1994b; Elphinstone, 2005; Alvarez *et al.*, 2010; Albuquerque *et al.*, 2014), rapporteerden wij recent de eerste vondst van *R. pseudosolanacearum*, als veroorzaker van bacterieverwelkingsziekte in kasroos (Tjou-Tam-Sin *et al.*, 2017a). Wanneer nieuwe onbeschreven pathogene varianten uit het RSSC via vermeerderingsmateriaal geïntroduceerd worden in een nieuwe omgeving, dan is het effect op lokale gewassen in dat nieuwe milieu lastig te voorspellen (Norman *et al.*, 2009b). Te verwachten is echter dat de toegenomen wereldwijde handel in plantenproducten, in combinatie met de potentie van RSSC om zich snel aan te passen (Genin en Boucher, 2004), kan leiden tot grote uitbraken van deze ziekte bij bekende en nieuwe waardplanten. Omdat de recent gevonden variant van *R. pseudosolanacearum* in kasrozen (Tjou-Tam-Sin *et al.*, 2017a) grote gevolgen kan hebben voor de totale sierteeltsector en daarbuiten, is dit onderzoek gestart. Het hoofddoel is de virulentie te toetsen van isolaten van *R. pseudosolanacearum* verkregen uit natuurlijk geïnfecteerde kasrozen op twee representatieve commerciële cultivars van kasroos, namelijk 'Armando' en 'Red Naomi', alsmede op tomaat (cv. 'Money Maker'), tabak (cv. 'White Burley'), aubergine (cv. 'Black Beauty') en paprika (cv. 'Yolo Wonder'). Aangezien ziekteontwikkeling in planten slechts optreedt bij het gelijktijdig voorkomen van een virulent pathogeen, een vatbare waardplant én de juiste omstandigheden, worden in ons onderzoek ook enkele abiotische parameters meegenomen, zoals de invloed van temperatuur en de inoculatiemethode.

## Methode en resultaten

Acht *R. pseudosolanacearum* en *R. solanacearum* isolaten (Tabel 1) werden onderzocht op hun virulentie in *Rosa* spp. en vier *Solanaceae*. De uit Nederlandse kasroos afkomstige isolaten zijn in 2015 geïsoleerd uit natuurlijk geïnfecteerde planten, met typische symptomen van bacterieverwelkingsziekte.

**Tabel 1.** Bacteriestammen van *Ralstonia solanacearum* en *Ralstonia pseudosolanacearum* gebruikt in dit onderzoek.

Stam	Collectie ID	Ralstonia soort*	Fylotype	Biovar	Ras	Geïsoleerd uit	Geografische oorsprong
PD 1945	LMG 2297	<i>R. pseudosolanacearum</i>	I	3		<i>Casuarina equisetifolia</i>	Republiek Mauritius
PD 7123		<i>R. pseudosolanacearum</i>	I	3	1	<i>Rosa</i> spp. cv. 'Red Naomi'	Nederland
PD 7216		<i>R. pseudosolanacearum</i>	I	3	1	<i>Rosa</i> spp. cv. 'Armando'	Nederland
PD 7195		<i>R. pseudosolanacearum</i>	I	3	1	<i>Rosa</i> spp. cv. 'Maritiem'	Nederland
PD 4500		<i>R. solanacearum</i>	II	1		<i>Begonia</i> spp.	Costa Rica
PD 2762		<i>R. solanacearum</i>	II	2	3	<i>Solanum tuberosum</i>	Nederland
PD 7221	NCPBP 325	<i>R. solanacearum</i>	II	1		<i>Solanum lycopersicum</i>	USA
PD 1940	LMG 9673	<i>R. pseudosolanacearum</i>	III	1		<i>Pelargonium capitatum</i>	Réunion (Frankrijk)

\* Volgens indeling door Safni *et al.*, 2014

Het onderzoek werd uitgevoerd in twee onafhankelijke experimenten.

### Experiment 1

In experiment 1 zijn de acht isolaten van *R. pseudosolanacearum* en *R. solanacearum* geïnoculeerd op twee rozencultivars (cv. 'Armando' en cv. 'Red Naomi') en op vier gewassen uit de familie van de Solanaceae: tomaat (*Solanum lycopersicum* cv. 'Money Maker'), tabak (*Nicotiana tabacum* cv. 'White Burley'), aubergine (*Solanum melongena* cv. 'Black Beauty') en paprika (*Capsicum annuum* cv. 'Yolo Wonder').

Per combinatie (plantensoort × isolaat) zijn drie herhalingen ingezet voor elk van de rozencultivars en tien herhalingen voor elk van de overige gewassen. De toetsplanten zijn na verwonding van de stengel in de wond geïnoculeerd met suspensies ( $10^8$  CFU/ml) van de respectievelijke bacteriestammen. De stengels werden op twee plekken geïnoculeerd, te weten 1-2 cm boven grondniveau en enkele centimeters daarboven. De geïnoculeerde planten zijn gedurende 42 dagen gehouden bij een 24/21°C dag/nacht temperatuursregime.

Het aantal ziektegevallen (de ziekte-incidentie) werd vastgelegd als percentage (%) symptomatische planten binnen een behandelingscombinatie van plantensoort × isolaat. Om infecties te verifiëren en te bevestigen, werden herisolaties verricht door middel van kweek op SMSA, gevolgd door identiteitsverificatietoetsing van de herisolaten met behulp van TaqMan PCR met een aangepaste probe (Vreebrug *et al.*, 2016; Weller *et al.*, 2000).

In tabel 2 is de ziekte-incidentie op 42 dni (dagen na inoculatie) weergegeven voor alle gewassen. Alle plantensoorten waren duidelijk vatbaar voor de isolaten PD 7123, PD 7216, en PD 7195, afkomstig uit kasroos. Bij beide rozencultivars waren op 42dni alle planten ziek (100% incidentie) en vertoonden typische symptomen (Figuur 1).

Ongeacht het isolaat van *R. pseudosolanacearum* dat geïnoculeerd was op 'Armando', werden de eerste symptomatische planten steeds waargenomen op 6-7 dni. Op planten van 'Red Naomi' verschenen de eerste symptomen echter pas op 11-15 dni. Daarnaast werd bij 'Armando' plantsterfte

**Tabel 2.** Ziekte-incidentie (%) van bacterieverwelkingsziekte op twee cultivars van kasroos (n = 3) en vier gewassen uit de familie van de Solanaceae (n = 10) na verwonding en stengelinoeculatie met acht isolaten van *Ralstonia solanacearum* en *Ralstonia pseudosolanacearum* bij 24°C/21°C dag/nacht regime, 42 dni (experiment 1).

Isolaat	Geïsoleerd uit	Ziekte-incidentie (%)					
		<i>Rosa</i> sp. cv. 'Armando'	<i>Rosa</i> sp. cv. 'Red Naomi'	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Solanum melongena</i>	<i>Capsicum annuum</i>
PD 1945	<i>Casuarina equisetifolia</i>	0*	0*	80	20	100	30
PD 7123	<i>Rosa</i> spp.	100	100	100	90	100	100
PD 7216	<i>Rosa</i> spp.	100	100	100	90	100	90
PD 7195	<i>Rosa</i> spp.	100	100	100	90	100	100
PD 4500	<i>Begonia</i> spp.	0*	0*	50	70	100	**no
PD 2762	<i>Solanum tuberosum</i>	0*	0*	100	**no	100	**no
PD 7221	<i>Solanum lycopersicum</i>	0*	0*	100	50	100	100
PD 1940	<i>Pelargonium capitatum</i>	0*	0*	30	10	70	**no

\* latent geïnfecteerd

\*\* no= niet onderzocht



**Figuur 1.** Ziektebeelden van bacterieverwelkingsziekte veroorzaakt door *R. pseudosolanacearum* (fylotype I) in kasroos (*Rosa* sp.). Typische beelden, waaronder: 1. omlaag hangende bladeren, 2. bladnecrose voortschrijdend vanaf de bladranden naar de hoofdbladnerven toe, 3. vergeling van bladeren, 4. onomkeerbare totale verwelking en plantsterfte, 5. donkerbruine tot zwarte necrose van de stengels.

– ongeacht het geïnoculeerde isolaat – voor het eerst waargenomen op 21 dni. Bij ‘Red Naomi’ werd geen plantsterfte geconstateerd binnen dit experiment (tot 42 dni). Deze resultaten illustreren het verschil in gevoeligheid tussen de twee rozen-cultivars voor het RSSC.

Een andere opmerkelijke constatering is dat na verwonding en stengelinoctulatie met een selectie van RSSC isolaten afkomstig uit andere gewassen dan roos en behorend tot de fylotypen I, II, en III (Tabel 1) zowel ‘Armando’ als ‘Red Naomi’ latent

geïnfecteerd waren met al die isolaten, maar ze vertoonden geen symptomen tot 42 dni (Tabel 2). Bij alle vier de Solanaceae geïnoculeerd met *R. pseudosolanacearum* isolaten geïsoleerd uit kasroos was de incidentie 90 tot 100% op 42 dni (Tabel 2). Ongeacht het geïnoculeerde isolaat en de plantensoort werden de eerste symptomen bij deze vier gewassen binnen 4 dni waargenomen. Plantsterfte werd waargenomen tussen 6 en 11 dni bij tomaat, aubergine en paprika, en op 21 dni bij tabak.





**Figuur 2.** Bepaling van de hevigheid van ziekte-expressie d.m.v. een schaalindeling voor de symptomen veroorzaakt door *Ralstonia pseudosolanacearum* waargenomen op *Rosa* spp. volgens niveau 0 - 3 (corresponderend met afbeeldingen A - D): A (0 = geen symptomen), B (1 = beginnende symptomen), C (2 = duidelijke, typische symptomen), D (3 = plantsterfte).

### Experiment 2

In dit experiment zijn twee isolaten van *R. pseudosolanacearum* (PD 7123 en PD 7216) geïnoculeerd in roos (cv. 'Armando' en cv. 'Red Naomi') en in tomaat (cv. 'Money Maker'). De geïnoculeerde planten werden gehouden bij respectievelijk 20 en 28°C. Daarnaast is nog gevarieerd in inoculatiemethode ("stengelinoculatie na verwonding" versus "aangieten van de potgrond"). De inoculaties werden gedaan met bacteriesuspensies ( $10^7$  CFU/ml) in fosfaatbuffer.

Per combinatie (plantensoort × isolaat × temperatuur × inoculatiemethode) zijn tien tot twaalf herhalingen ingezet. Gedurende het experiment werden op gezette tijden de ziektesymptomen van de geïnoculeerde planten bekeken om de ontwikkeling van de ziekte-expressie kwantitatief te kunnen volgen. De geïnoculeerde planten zijn gevolgd tot 116 dni. Bij elk waarnemingsmoment werd de hevigheid van ziekte-expressie bij één plant per behandelingscombinatie bepaald (Figuur 2). Hierbij is gekozen voor de plant met de verst gevorderde symptomen. Aan het eind van experiment 2 (op 116 dni), werden de ziekte-incidentie (%) en de hevigheid van ziekte-expressie vastgesteld voor alle planten binnen de behandeling. Om infecties te verifiëren en te bevestigen werden herisolaties d.m.v. kweek op SMSA verricht, gevolgd door identiteitsverificatietoetsing van de herisolaten d.m.v. TaqMan PCR met een aangepaste probe (Vreebrug *et al.*, 2016; Weller *et al.*, 2000).

Er zijn in dit experiment geen significante verschillen ( $P = 0,078$ ) in hevigheid van ziekte-expressie tussen de isolaten PD 7123 en PD 7216

waargenomen (Tabel 3). Echter zijn er wel significante verschillen gevonden in hevigheid van ziekte-expressie tussen variabelen van de hoofd-factoren temperatuur, inoculatiemethode en botanische variatie, en de interactie tussen deze drie factoren (Tabel 3). Dit wordt ondersteund door de ziekte-ontwikkelingscurven (Figuur 4). Hevigheid van ziekte-expressie was lager bij behandelingscombinaties met 'Red Naomi' – zoals ook waargenomen in experiment 1-, bij 20°C, en bij aangieten van potgrond (Figuur 3).

Hoewel alle planten van 'Armando' bij 20°C typische symptomen vertonen na stengelinoculatie is het opvallend dat bij deze behandelingscombinatie geen plantsterfte werd waargenomen gedurende het experiment. Daarnaast werden na stengelinoculatie binnen 116 dni bij de 20°C behandeling milde symptomen waargenomen bij slechts één plant van 'Red Naomi'. Herisolaties van de symptoomloze planten van 'Red Naomi' uit de behandelingscombinatie van stengelinoculatie na verwonding bij 20°C, brachten echter hoge niveaus aan latente infecties aan het licht (Tabel 4).

Bij planten van zowel *Rosa* sp. cv. 'Armando' als bij *S. lycopersicum* cv. 'Money Maker' werd er een statistisch significant ( $P < 0,0005$ ) effect geconstateerd van temperatuur op de hevigheid van ziekte-expressie na aangieten van de potgrond (Tabel 3). Bij 20°C werd bij beide soorten slechts een enkele of geen zieke plant geconstateerd (Tabel 4) en geen of een geringe hevigheid van ziekte-expressie (Figuur 3C). Beide waarden waren bij de 28°C behandeling fors hoger (Tabel 4/Figuur 3D). Dit effect van temperatuur op hevigheid van ziekte-expressie is statistisch onderbouwd (Tabel 3).

Na aangieten van de potgrond bij 28°C werd bij de meeste planten van 'Armando' plantsterfte waargenomen binnen de observatieperiode. Ongeacht de temperatuur werden bij planten van 'Red Naomi' na aangieten van de potgrond totaal geen symptomen waargenomen (Figuren 3C, D). Uit latentietoetsing van de symptoomloze planten van 'Red Naomi' bleken geen latente infecties te zijn opgetreden bij deze behandelingscombinaties (Tabel 4). Dit illustreert dat mechanische beschadiging doelmatiger is om infectie door *R. pseudosolanacearum* in kasroos te bewerkstelligen.

## Discussie

Uit dit onderzoek is duidelijk naar voren gekomen dat temperatuur, botanische variatie en inoculatiemethode, op zich of in combinatie, de mate van symptoomexpressie in roos significant kunnen beïnvloeden na inoculatie met isolaten van *R. pseudosolanacearum* (fylotype I, race 1, biovar 3) afkomstig uit natuurlijk geïnfecteerde rozenplanten. Zowel tomaat, tabak, aubergine als paprika zijn allen vatbaar voor de isolaten van *R. pseudosolanacearum* afkomstig uit roos. Verder is gevonden dat beide rozencultivars latent geïnfecteerd kunnen raken met *R. pseudosolanacearum* en *R. solanacearum* isolaten die niet afkomstig zijn uit roos. Bovendien is aan het licht gekomen

**Tabel 3.** ANOVA analyse van hoofdeffecten en interacties op de hevigheid van ziekte-expressie van bacterieverwelkingsziekte veroorzaakt door *Ralstonia pseudosolanacearum* na verwonding en stengel inoculatie ( $n = 10$ ) of aangieten van potgrond ( $n = 12$ ) (experiment 2).

Effect <sup>a</sup>	df	Error df	F value	P value
Inoc	1	240	3,127	0,078
Temp	1	240	347,333	< 0,0005#
BV	2	240	87,003	< 0,0005#
IM	1	240	257,673	< 0,0005#
Temp*Inoc	1	240	0,666	0,415
Temp*BV	2	240	1,125	0,326
Temp*IM	1	240	0,907	0,342
Inoc*BV	2	240	2,170	0,116
Inoc*IM	1	240	1,184	0,278
BV*IM	2	240	0,882	0,415
Temp*Inoc*BV	2	240	2,165	0,117
Temp*Inoc*IM	1	240	0,666	0,415
Temp*BV*IM	2	240	60,876	< 0,0005#
Inoc*BV*IM	2	240	0,643	0,527
Temp*Inoc*BV*IM	2	240	2,165	0,117

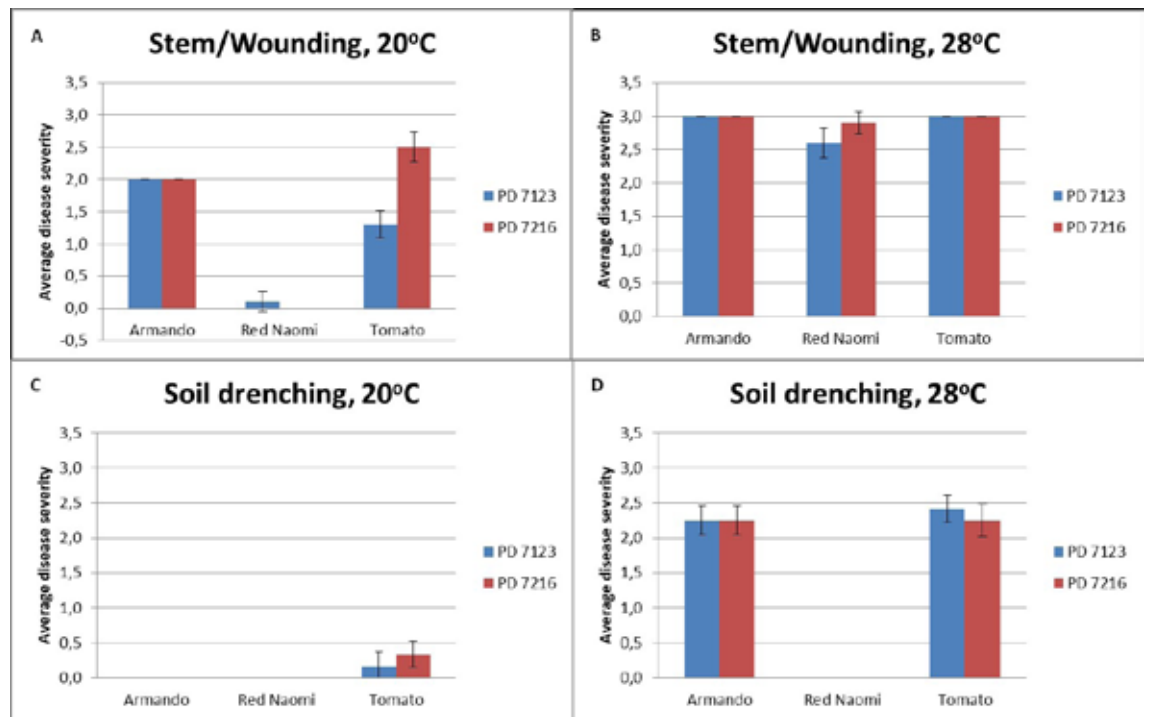
<sup>a</sup> Inoc = Inocula (isolaten PD 7123 en PD 7216); Temp = Temperatuur (20°C en 28°C); BV = Botanische variatie (*Rosa* sp. cv. 'Armando', *Rosa* sp. cv. 'Red Naomi' en tomaten cv. 'Money Maker'); IM = Inoculatiemethode (stengel inoculatie na verwonding en aangieten van potgrond)

# significant bij  $\alpha = 0,01$

**Tabel 4.** Ziekte-incidentie (%) van bacterieverwelkingsziekte veroorzaakt door *Ralstonia pseudosolanacearum* isolaten PD 7123 en PD 7216 bij 20°C en 28°C op *Rosa* sp. cv. 'Armando', *Rosa* sp. cv. 'Red Naomi', en *Solanum lycopersicum*, cv. 'Money Maker', na verwonding en stengel inoculatie ( $n = 10$ ) of aangieten van de potgrond ( $n = 12$ ) 116 dni (experiment 2).

Temperatuur	Inoculatiemethode	Ziekte-incidentie (%)					
		<i>Rosa</i> sp. cv. 'Armando'		<i>Rosa</i> sp. cv. 'Red Naomi'		<i>Solanum lycopersicum</i>	
		PD 7123	PD 7216	PD 7123	PD 7216	PD 7123	PD 7216
20°C	stengel inoculatie	100	100	10/(60)*	0/(70)*	50	100
20°C	aangieten potgrond	0	0	0	0	8/(17)*	17/(17)*
28°C	stengel inoculatie	100	100	90	100	100	100
28°C	aangieten potgrond	75	75	0	0	92	83

\* % ziekte-incidentie/(% latent geïnfecteerd)

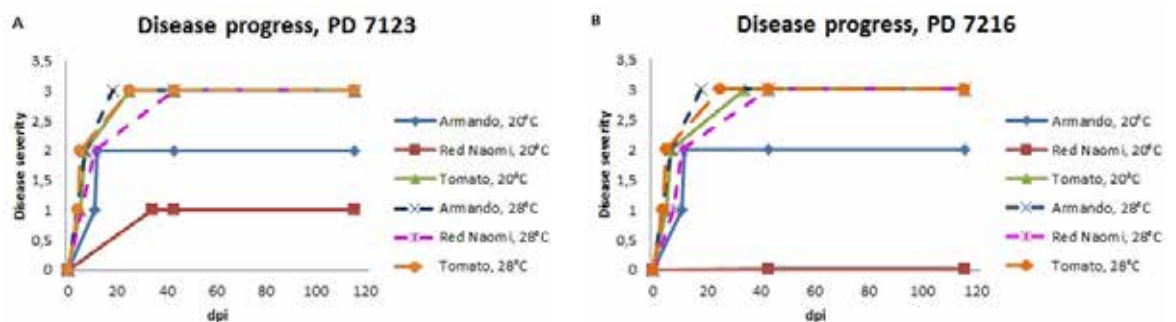


**Figuur 3.** Gemiddelde hevigheid van bacterieverwelkingsziekte veroorzaakt door *Ralstonia pseudosolanacearum* isolaat PD 7123 en PD 7216 op planten van *Rosa* sp. cv. 'Armando', *Rosa* sp. cv. 'Red Naomi' en *Solanum lycopersicon*, cv. 'Money Maker', bij 20°C (A en C) en 28°C (B en D) 116 dni. Hevigheid van ziekte-expressie is weergegeven als het gemiddelde van  $n = 10$  planten bij behandelingen met stengelinoeculatie na verwonding (A en B) en  $n = 12$  planten bij aangieten van potgrond (C en D). De intervalaanduidingsbalken markeren de vastgestelde standaardfout.

dat na optreden van infectie in rozenplanten bij relatief lage temperatuur (20°C), deze isolaten met grote frequentie als latente infectie in de planten kunnen voorkomen. Dit betekent fyto-sanitair een grote uitdaging voor de gehele sierteeltsector wereldwijd. De mogelijkheid bestaat dat latent geïnfecteerde kasrozen vermeerderd en verspreid worden en na verloop van tijd terechtkomen in een situatie waarbij de klimaatomstandigheden optimaal zijn voor het pathogeen. Hoewel onze onderzoeksresultaten aanzienlijk bijdragen aan

de kennis over de epidemiologie van *R. pseudosolanacearum* afkomstig uit roos, is er door het beperkte aantal onderzochte waardplanten nog steeds relatief weinig kennis over de exacte waardplantenreeks van dit pathogeen.

In deze publicatie is het onderzoek op hoofdpunten beschreven. Gedetailleerde beschrijvingen van het onderzoek zijn te raadplegen in: Tjou-Tam-Sin, van de Bilt, Westenberg, Gorkink-Smits, Landman, & Bergsma-Vlami (2017).



**Figuur 4.** Hevigheid van bacterieverwelkingsziekte door *Ralstonia pseudosolanacearum* isolaat PD 7123 (A) en PD 7216 (B) op planten van *Rosa* sp. cv. 'Armando', *Rosa* sp. cv. 'Red Naomi' en *Solanum lycopersicon*, cv. 'Money Maker' in de tijd, bij 20°C en 28°C tot 116 dni. Op elk observatiemoment, werd de hevigheid van ziekte-expressie vastgesteld bij één plant (per behandeling) die in het meest vergevorderde stadium van ziekte-expressie was.

Assessing the Pathogenic Ability of *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Ralstonia solanacearum* Phylotype I) from Ornamental *Rosa* spp.

Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1895.  
<http://doi.org/10.3389/fpls.2017.01895>.

## Referenties

- Albuquerque G.M., Santos L.A., Felix K.C., Rollemberg C.L., Silva A.M., Souza E.B., et al. (2014). Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* from Brazil extend known diversity in paraphyletic phylotype II. *Phytopathology* 104, 1175–1182.
- Alvarez B., Biosca E.G., López M.M. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen, in *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Vol. 1, ed Mendez-Vilas A., editor. (Badajoz: Formatex; ), 267–279.
- Buddenhagen I.W. (1961). Bacterial wilt of bananas: history and known distribution. *Trop. Agric.* 38, 107–121.
- Elphinstone J.G. (2005). The current bacterial wilt situation: a global overview, in *Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex*, eds Allen C., Prior P., Hayward A.C., editors. (St. Paul, MN: The American Phytopathological Society; ), 9–28.
- Genin S., Boucher C. (2004). Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 107–134.
- Hayward A.C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 65–87.
- Hayward A.C. (1994b). The hosts of *Pseudomonas solanacearum*, in *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum**, eds Hayward A.C., Hartman G.L., editors. (Wallingford: CAB International; ), 9–24.
- Janse J.D., Bergsma-Vlami M., Beuningen A. van, Derks H., Hendriks H., Horn N., Janssen E., Kavelaars J., Roenhorst A., Schoeman M., Steeghs M., Tjou-Tam-Sin N.N.A., Verdel M., Wenneker M. (2009). Bruinrot bij aardappel. *Gewasbescherming* 40, 176–187.
- Norman D.J., Zapata M., Gabriel D.W., Duan Y.P., Yuen J.M.F., Mangravita-Novo A., et al. (2009b). Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. *Phytopathology* 99, 1070–1077.
- Safni I., Cleenwerck I., De Vos P., Fegan M., Sly L., Kappler U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 3087–3103.
- Tjou-Tam-Sin N.N.A., van de Bilt J.L.J., Westenberg M., Korpershoek H.J., Vermunt A.M.W., Meekes E.T.M., et al. (2017a). First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in ornamental *Rosa* sp. *Plant Dis.* 101:378
- Tjou-Tam-Sin, N.N.A., van de Bilt, J.L.J., Westenberg, M., Gorkink-Smits, P.P.M.A., Landman, N.M., & Bergsma-Vlami, M. (2017b). Assessing the Pathogenic Ability of *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Ralstonia solanacearum* Phylotype I) from Ornamental *Rosa* spp. *Plants. Frontiers in Plant Science*, 8, 1895. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.01895>
- Vreeburg R.A.M., Bergsma-Vlami M., Bollema R.M., de Haan E.G., Kooman-Gersmann M., Smits-Mastebroek L., Tameling W.I.L., Tjou-Tam-Sin N.N.A., van de Vossen B.L.T.H. & Janse J.D. (2016). Performance of real-time PCR and immunofluorescence for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Ralstonia solanacearum* in potato tubers in routine testing. *EPPO Bull.* 46, 112–121.
- Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N., Stead D.E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2853–2858