

Begrijpen en bestrijden van bodemgebonden verspreiding van PIAMV en TVX

Maarten de Kock, Casper Slootweg, Hans van Aanholt, Miriam Lemmers, Khanh Pham, Robert Dees, Astrid de Boer & Trees Hollinger

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
PPO nr. 32 361591 00/PT nr. 14774
December 2013

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

PPO Projectnummer: 32 361591 00
PT Projectnummer: 14774

De bloembollensector investeert in dit project via het Productschap  Tuinbouw

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit**

Adres : Postbus 85, 2161 AB Lisse
: Professor van Slogterenweg 2, 2161DW Lisse
Tel. : +31 0252 462148
Fax : +31 0252 462100
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

Inhoudsopgave

SAMENVATTING.....	5
1 INTRODUCTIE.....	7
1.1 Aanleiding en vragenstellingen.....	7
1.2 Doelstelling en afbakening.....	7
1.3 Opzet van het onderzoek.....	8
2 TOETSEN OP PLAMV EN TVX.....	9
2.1 Toetsmethoden.....	9
2.2 Interpretatie van toetsresultaten.....	9
3 GENETISCHE ANALYSE PLAMV EN TVX.....	11
3.1 Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV).....	11
3.2 Tulpenvirus X (TVX).....	13
4 INFECTIE MET PLAMV TIJDENS DOMPELEN EN SPOELLEN, OOK ZONDER VERWONDING.....	15
4.1 Aanleiding en vraagstelling.....	15
4.2 Werkwijze.....	15
4.2.1 Algemene werkwijze.....	15
4.2.2 Risico op PIAMV-infectie bij intacte bollen.....	15
4.2.3 Effect van naspoelen met vers schoon water.....	16
4.3 Resultaten en discussie.....	16
4.3.1 Risico op PIAMV-infectie bij intacte bollen.....	16
4.3.2 Effect van naspoelen met vers schoon water.....	18
5 EFFECTIVITEIT VAN MIDDELEN TEGEN PLAMV.....	19
5.1 Oppervlakte reiniging.....	19
5.1.1 Werkwijze.....	19
5.1.2 Resultaten.....	19
5.2 Verminderen van infectierisico's tijdens spoelen en dompelen.....	21
5.2.1 Werkwijze.....	21
5.2.2 Resultaten.....	21
5.3 Bedrijfshygiëne voor PIAMV en TVX.....	23
6 RISICO'S OP INFECTIE VANUIT DE BODEM.....	25
6.1 Aanleiding en vraagstelling.....	25
6.2 Werkwijze.....	25
6.3 Resultaten en discussie.....	26
6.3.1 Detectie PIAMV in een grondmonster.....	26
6.3.2 Vangplanten.....	26
6.3.3 Hergebruik leliegrond voor lelieteelt.....	27
6.4 Overige praktijkervaringen.....	31
6.4.1 Hergebruik kasgrond.....	31
6.4.2 Kistenproef met PIAMV.....	31
6.5 Analyse van resultaten.....	32
7 ONTSMETTING VAN DE BODEM.....	35

7.1	Aanleiding en vraagstelling	35
7.2	Werkwijze.....	35
7.3	Resultaten & Discussie.....	36
8	VERGELIJKING RESULTATEN VAN PCR-TOETSEN OP SCHUB- EN WORTELMONSTERS BIJ INFECTIE VANUIT DE BODEM	41
8.1	Materiaal en werkwijze	41
8.2	Resultaten en Discussie.....	41
8.3	Impact van resultaten en vervolgonderzoek	42
9	WAARDPLANTENREEKS PLAMV EN TVX.....	45
10	ALGEMENE DISCUSSIE EN CONCLUSIES	53
10.1	Wijze van bodemgebonden verspreiding.....	53
10.2	Stabiliteit/overlevingsmogelijkheden van PIAMV en TVX in de bodem	53
10.3	Risico's van virusopname bij afwezigheid van verwonding	54
10.4	Effectieve ontsmettingsmethoden voor materialen, water en grond	55
10.5	Genetische analyse PIAMV en TVX	56
10.6	Kennisverspreiding en interactie met praktijk.....	57
10.7	En nu verder.....	57
11	MAATREGELEN OM INFECTIE EN VERSPREIDING VAN PLAMV TE VOORKOMEN OF TE BEPERKEN .	59
12	GERAADPLEEGDE DOCUMENTEN.....	65
	BIJLAGE 1 – FACTSHEET ‘GEBRUIK PLAMV-TOETSEN’	67
	BIJLAGE 2 - VRAGENLIJST VOOR BODEMGEBONDEN VERSPREIDING.....	71
	BIJLAGE 3 – RESULTATEN BODEMANALYSE.....	73

Samenvatting

De leliebranche wordt geconfronteerd met een zeer besmettelijk virus dat een grote bedreiging is voor de gehele leliesector, het *Plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV). Naast PIAMV is enkele jaren geleden een vergelijkbaar virus in lelie aangetroffen, het Tulpenvirus X (TVX). De besmettelijkheid van TVX lijkt bij lelie vergelijkbaar groot te zijn als de besmettelijkheid van PIAMV. Het is er alles aan gelegen om de verspreidingsroutes volledig in beeld te hebben om doeltreffende maatregelen te kunnen nemen om verdere verspreiding van het virus in de leliesector te voorkomen. Het onderzoek beschreven in dit rapport is een voortzetting van onderzoek aan PIAMV en TVX dat sinds 2010 wordt uitgevoerd.

Er is uitgebreide ervaring opgebouwd met de mogelijkheden die ELISA- en PCR-toetsen kunnen bieden bij onderzoek, maar vooral ook voor de kwaliteitsbewaking van teeltmateriaal. Omdat de verspreidingsroutes complex zijn, is het belangrijk te weten wat de mogelijkheden en beperkingen zijn van bepaalde bemonsteringsmomenten en monstertype. Hoofdstuk 2 beschrijft de voordelen en beperkingen van de verschillende toetsmethoden en bemonsteringstypes. Daarnaast wordt uitleg gegeven over de interpretatie van toetsresultaten.

Bij lelie kan infectie met PIAMV schadelijke symptomen veroorzaken. PIAMV kan daarentegen ook symptomeloos voorkomen. In Hoofdstuk 3 wordt beschreven dat symptomatische en symptomeloze infecties door hetzelfde PIAMV-virus wordt veroorzaakt. Er is slechts één type PIAMV in de Nederlandse lelieteelt aanwezig. Dit is belangrijke informatie met betrekking tot het gebruik van toetsmethoden voor kwaliteitsbewaking. Wanneer genetische variatie aanwezig zou zijn, dan zouden de toetsen daarop mogelijk aangepast moeten worden.

Infectie met TVX bij lelie worden veroorzaakt door een TVX-stam die op kleine genetische details afwijkt van het TVX dat bij tulp infectie kan veroorzaken. Er zijn geen aanwijzingen dat tulp zelf de infectiebron is geweest voor TVX-infecties bij lelie. Het is momenteel de hypothese dat de tulpenstam van TVX vanuit tulp in een alternatieve waardplant terecht is gekomen. In deze alternatieve waardplant is TVX veranderd in de vorm die uiteindelijk bij lelie infecties kan veroorzaken.

Dompelen van intacte bollen in een bad waarin PIAMV aanwezig was, resulteerde in vergelijkbare virusinfecties als bij dompeling van bollen waarvan de wortels waren afgeknipt. De bollen waren in dit geval slechts drie minuten gedompeld. Er hoeft dus geen verwonding aanwezig te zijn om infectie mogelijk te maken. Bij heftiger verwonding trad meer infectie op. Afspoelen van gespoelde of ontsmette bollen met schoon water kan resulteren in minder infectie, maar dit is niet altijd het geval (Hoofdstuk 4).

Voorkomen van verwonding en aandacht voor wondherstel voor het dompelen is daarom zeker relevant. Tevens moeten lelie verwerkende bedrijven achteraan in de keten er rekening mee houden dat ook tijdens hun werkzaamheden met leliebollen kruisbesmetting en infectie bij partijen kan plaatsvinden wanneer zij gebruik maken van virusbesmet spoelwater of dompelbaden besmet met virus. Inpakbedrijven en exporteurs zijn daarom net zo verantwoordelijk voor een virusvrij eindproduct als veredeling en bollentelers.

PIAMV en TVX zijn vrij hardnekkige virussen die buiten de plant langere tijd besmettelijk blijven. Bedrijfshygiëne is dan extra belangrijk om verspreiding binnen en tussen partijen te voorkomen. In Hoofdstuk 11 worden tips voor bedrijfshygiëne uitgebreid toegelicht. Vuil en plantenresten wegspoelen met (warm) water en eventueel zeep gebruiken om aankoeken van vuiligheid te voorkomen zijn het belangrijkste en het meest effectief. Middelen met virucide werking kunnen eventueel ingezet worden om achtergebleven virusdeeltjes alsnog te inactiveren. Er zijn middelen geïdentificeerd met voldoende virucide activiteit, maar alleen voor Virkon S is een toepassing in bedrijfsruimtes geregistreerd (Hoofdstuk 5). Er zijn tevens middelen geïdentificeerd die ook voldoende en snelle virucide activiteit hebben voor inactivatie van virus aanwezig in dompelbaden of spoelwater. Echter, voor geen van deze middelen is toepassing geregistreerd.

Aanwezigheid van virusdeeltjes in de bodem of in virusbesmette gewasresten kunnen tijdens een nieuwe teelt tot infectie leiden. In Hoofdstuk 6 zijn de risico's beschreven bij hergebruik van een perceel waar de voorafgaande lelieteelt besmet was met PIAMV of TVX.

In de meeste gevallen treedt infectie vanuit het perceel op. De waargenomen percentages zijn niet erg hoog (0-8%), maar een virusvrij aangeplante partij is dan niet meer virusvrij. Tijdens diverse teeltprocessen tot aan de broei kunnen deze beperkte besmettingen via diverse risicovolle handelingen in een partij uitgroeien tot veel hogere percentages.

Tijdens het onderzoek naar hergebruik van grond afkomstig van virusbesmette lelieteelt werd duidelijk dat de waardplantenreeks van PIAMV en TVX veel breder is. Een groot aantal onkruiden en groenbemesters zijn waardplant (Hoofdstuk 9). In relatie tot lelie worden in deze alternatieve waardplanten lagere virusconcentraties aangetroffen. Het is momenteel onduidelijk welke rol deze onkruiden en groenbemesters spelen bij de instandhouding van virusreservoirs in de bodem.

Aanwezigheid van virusdeeltjes in de bodem of in virusbesmette gewasresten kunnen tijdens een nieuwe teelt tot infectie leiden. Stomen van de grond is toepasbaar bij kasteelt. Voor een goede inactivatie van virus in de grond is het belangrijk dat alle grond voldoende lang voldoende heet is geweest (Hoofdstuk 5). Het werken met dataloggers voor temperatuurregistraties is daarom zeker aan te bevelen. Er is tevens een methode ontwikkeld waarmee met ingegraven viruscapsules op een meer biologische wijze de inactivatie van PIAMV of TVX bestudeerd kan worden.

Er zijn geen middelen met virucide activiteit bekend die toegepast kunnen worden in de bodem. Een chemische afdoding is daarom niet mogelijk. Omdat er geen vector betrokken is bij de bodemgebonden virusverspreiding hebben nematiciden of fungiciden geen effect op virusreservoirs in de bodem. Een gezond bodemleven en snelle vertering van plantresten heeft daarentegen zeker wel een functionele bijdrage in een effectieve vermindering van virus in de bodem. Natte grondontsmetting of toepassing van bodemfungiciden zou daarom misschien juist wel eens averechts kunnen werken bij het bestrijden van virusreservoirs in de bodem.

De verspreiding van PIAMV en TVX is complex, de beheersing van dit virus nog complexer. Dit project heeft de sector een paar stappen verder gebracht in het begrijpen van de ervaringen met deze twee virussen. Tevens wordt steeds beter begrepen op welke wijze virusinfectie voorkomen kan worden. Op basis van de laatste inzichten zijn de maatregelen waarmee infectie en verspreiding van PIAMV en TVX voorkomen of beperkt kunnen worden geactualiseerd. Het inzichtelijk maken van de aanwezige besmettingen in partijen door middel van toetsen is van groot belang om de risico's op infectie en verspreiding in te schatten. Immers, bij afwezigheid van virus, is er ook geen risico dat virusinfectie kan optreden. De praktijkadviezen in combinatie met een planmatige beoordeling van de kwaliteit door middel van toetsen heeft geresulteerd in de Kwaliteitssysteem Lelie 2.0, een resultaat van collectieve samenwerking binnen de Nederlandse leliesector.

1 Introductie

1.1 Aanleiding en vraagstellingen

De leliebranche wordt geconfronteerd met een zeer besmettelijk virus dat een grote bedreiging is voor de gehele leliesector, het Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV). Naast PIAMV is enkele jaren geleden een vergelijkbaar virus in lelie aangetroffen, het Tulpenvirus X (TVX). De besmettelijkheid van TVX lijkt bij lelie vergelijkbaar groot te zijn als de besmettelijkheid van PIAMV. Het is er alles aan gelegen om de verspreidingsroutes volledig in beeld te hebben een doeltreffende maatregelen te nemen om verdere verspreiding van het virus in de leliesector te voorkomen.

In de periode 2010-2012 is er uitgebreid onderzoek aan PIAMV uitgevoerd. De kennis dit onderzoek heeft opgeleverd zijn beschreven in de volgende rapporten:

- 2010 Voortgezet Diagnostisch Onderzoek - Identificatie en inventarisatie Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) in lelie. PT project 13891 en 13834.18.
- 2012 Onderzoek naar herkomst en verspreidingsroutes van Plantago asiatica mozaïekvirus (PIAMV). PT project 14135.
- 2012 Onderdrukking symptoomvorming PIAMV tijdens broei van lelies. PT project 14518.
- 2013 Aanvullend onderzoek naar verspreidingsroutes en mogelijkheden voor beheersing van PIAMV. PT-project 14483

Vanuit dit onderzoek zijn inmiddels veel risico's zijn bekend geworden waardoor gerichte praktijkadviezen geschreven konden worden. In 2012 bleek echter dat nog niet alle verspreidingsroutes goed genoeg bekend waren. Verspreidingsroutes van PIAMV zijn erg complex. Tevens is bodemgebonden virusverspreiding aangetoond welke onder specifieke omstandigheden in meer of mindere mate kan optreden. Bij het optreden van deze verspreidingsroute is de schade erg groot. Tijdens bijeenkomsten met telers, handel en broeiers zijn de resultaten besproken. De aanwezigen hebben geconstateerd dat diverse essentiële vragen beantwoord moeten worden om tot oplossingen voor de PIAMV-problematiek te kunnen komen:

- Op welke wijze treedt bodemgebonden virusverspreiding op, en is hier eventueel een vectororganisme bij betrokken?
- Welke omstandigheden bepalen de efficiëntie van bodemgebonden virusverspreiding en de opgelopen schade?
- Hoe lang blijft teelt- en broeigrond besmettelijk na het rooien of oogsten van virusgeïnfecteerde partijen?
- Op welke wijze kan de besmettelijkheid van de bodem bestreden worden?

Om deze vragen te beantwoorden is extra onderzoek noodzakelijk.

1.2 Doelstelling en afbakening

Dit onderzoek richtte zich aanvankelijk op de volgende doelstellingen:

- a) Bepalen van **wijze van bodemgebonden verspreiding** van PIAMV.
- b) Risico's van **virusopname door wortels** bij afwezigheid van verwonding.
- c) Ontwikkelen van **effectieve ontsmettingsmethoden** voor grond uit kistenteelt, vollegronds kasteelt en vollegronds buitenteelt. De focus ligt met name bij stomen en afhankelijk van de geïdentificeerde vector mogelijk ook bij toepassing van fungiciden of nematiciden.
- d) Bepalen van de **stabiliteit/overlevingsmogelijkheden van PIAMV** in de bodem.

- e) Bepalen of symptoomloze infecties met PIAMV veroorzaakt worden door een specifiek virusisolaat dat anders is dan symptomatisch PIAMV (**genetische analyse symptoomloze PIAMV** isolaten).
- f) **Kennisverspreiding** van onderzoeksresultaten en daaruit voortkomende adviezen naar alle schakels in de keten zodat de leliesector gezamenlijk de virusverspreiding een halt toe kan roepen.

Tijdens het onderzoek werd duidelijk dat een aantal aspecten belangrijk waren voor een beter begrip over PIAMV en TVX. Daarom zijn gedurende het onderzoek de volgende onderwerpen een belangrijk onderdeel van het onderzoek geworden:

- Vanwege de toenemende zorgen over **TVX** bij lelie, heeft TVX een grotere rol gekregen in het onderzoek.
- Tijdens het onderzoek naar de stabiliteit en overlevingsmogelijkheden van PIAMV in de bodem werd duidelijk dat de waardplantenreeks van PIAMV niet beperkt is tot weegbree en lelie, maar dat veel meer gewassen vatbaar zijn voor PIAMV. Dezelfde waarneming werd ook gedaan voor TVX. Daarom is onderzoek naar de **waardplantenreeks** van beide virussen onderdeel geworden van dit onderzoek.
- In 2012 is de **Regiegroep Lelie** ontstaan. In 2012 en 2013 heeft PPO input geleverd in de discussies die uiteindelijk geleid hebben tot een kwaliteitssysteem Lelie 2.0.
- Sinds 2010 is er vanuit het onderzoek toenemende interactie met ondernemers. Dit heeft geresulteerd in diverse onderzoeksactiviteiten op het bedrijf van deze ondernemers. Dit **onderzoek in de praktijk** richtte zich op een beter begrip over de aanwezigheid van PIAMV en TVX op oppervlaktes van machines, kisten en fusten, effectiviteit van ontsmettingsmiddelen en inactivatie via hitte. Dit type onderzoek wordt vanwege vertrouwelijkheid en traceerbaarheid in dit rapport niet in detail beschreven. Wel wordt de verkregen verwerkt in de adviezen ter voorkoming van infectie en verdere verspreiding van PIAMV en TVX.

1.3 Opzet van het onderzoek

Het onderzoek is in de periode 2012-2013 uitgevoerd. Diverse grote en kleine proeven en analyses zijn uitgevoerd. De indeling van hoofdstukken van dit rapport komen niet volledig overeen met de aparte doelstellingen die waren geformuleerd. Een aantal doelstellingen konden tegelijkertijd in een complexer opgezette proef onderzocht worden. Voor andere vraagstellingen werden meerdere aparte analyses uitgevoerd.

Het rapport bevat diverse hoofdstukken waarin het onderzoek beschreven is. Tevens zijn enkele hoofdstukken gewijd aan toetsen op PIAMV, bepaling van de virusstatus van partijen gedurende een teeltseizoen en de interpretatie PCR-toetsresultaten. Het rapport sluit af met een update van adviezen voor voorkoming van infectie en verdere verspreiding van PIAMV.

2 Toetsen op PIAMV en TVX

2.1 Toetsmethoden

Tijdens de teelt kan er infectie vanuit de bodem plaatsvinden. Daarnaast kan er vanaf het rooien tot dat de in de bewaring liggen tijdens diverse handelingen met de leliebollen virusverspreiding en infectie plaatsvinden. Het moment van bemonsteren en toetsen, en de toetsmethode die gekozen wordt, bepaalt in sterke mate de informatiewaarde van het toetsresultaat. Het is gebleken dat keuze voor het juiste moment van bemonsteren en de keuze voor de juiste toets van groot belang is voor het betrouwbaar aantonen of er wel of geen sprake is van een infectie met PIAMV of TVX. De toepassing van verschillende toetsen is toegelicht in Figuur 1.

Een ELISA bladtoets toont bij bemonstering van blad na de bloei op betrouwbare wijze aan of er sprake is van een infectie in de bovengrondse delen van de plant. Infecties met PIAMV of TVX die voorafgaand aan het planten hebben plaatsgevonden, worden op betrouwbare wijze aangetoond. Het is de ervaring dat een ELISA bladtoets PIAMV- of TVX infecties die gedurende het teeltseizoen vanuit de bodem hebben opgetreden nagenoeg niet aantoonbaar. Dit heeft niets met de ELISA-toets zelf te maken. Een negatief ELISA-resultaat wordt veroorzaakt door het feit dat PIAMV of TVX tijdens de teelt niet bovengronds komen wanneer er vanuit de bodem een infectie plaats vindt.

Een PCR-toets op schubben van gerooide bollen is wel betrouwbaar voor het aantonen van bestaande infecties in een bol. Dit zijn enerzijds PIAMV- en TVX infecties die al aanwezig waren voorafgaand aan het planten van de bol. Dit zijn anderzijds ook PIAMV- en TVX infecties die tijdens de teelt vanuit de bodem hebben opgetreden. De concentraties PIAMV of TVX zijn bij infectie vanuit de bodem in de wortels het grootst. Maar vanwege de mogelijkheid voor routinematig toetsen is bemonstering van schubben ook voldoende informatief.

Een PCR-toets op schubben is niet bruikbaar voor het aantonen van eventuele recente infecties met PIAMV of TVX die tijdens het rooien, spoelen, verwerken en ontsmetten van bollen heeft kunnen plaatsvinden. In het geval van een recente infectie is de virusconcentratie in de schub waarin de infectie plaatsvond nog laag en waarschijnlijk niet of nauwelijks detecteerbaar met PCR. Daarnaast is het virus nog niet verspreid naar de andere schubben van dezelfde bol waardoor bemonstering niet betrouwbaar is.

Voor het aantonen van infecties die tijdens rooien, spoelen, verwerken en ontsmetten van bollen heeft kunnen plaatsvinden is een nateelt nodig via een opplantmonster. Het is belangrijk dat deze nateelt plaatsvindt in schone kisten, in verse potgrond en dat de teelt los van de ondergrond staat om eventuele virusinfecties vanuit de bodem te voorkomen. Na de bloei kan met een ELISA-bladtoets het viruspercentage betrouwbaar worden bepaald.

Bovenstaande adviezen voor gebruik van toetsmethoden zijn ontstaan na uitgebreid onderzoek aan PIAMV en TVX in lelie en worden vanzelfsprekend ook toegepast in het onderzoek dat in dit rapport is beschreven.

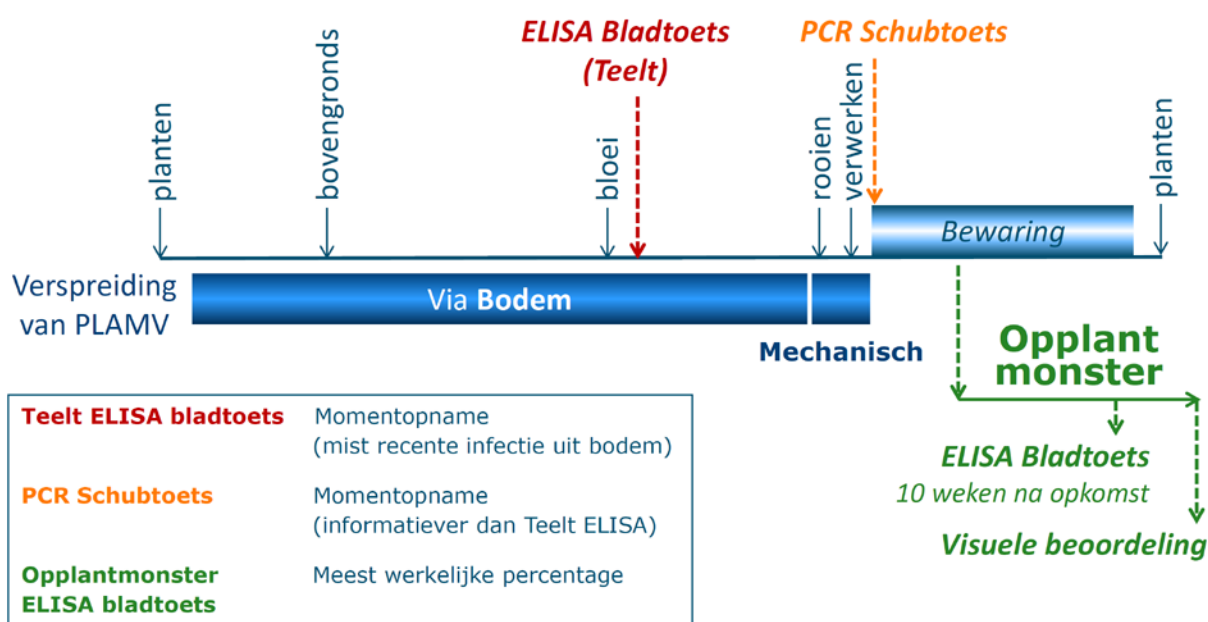
2.2 Interpretatie van toetsresultaten

PCR-toetsen voor PIAMV en TVX worden in dit onderzoek ingezet om de virusstatus van individuele bollen of mengmonsters te bepalen. Op basis van toetsuitslagen worden conclusies getrokken of er wel of geen sprake is van een infectie met virus. Een PCR-toets resulteert in een Cq-waarde voor een monster. Tabel 1 beschrijft de beoordeling van deze Cq-waarden.

Met betrekking tot Cq-waarden lager dan 32 is geen discussie; het monsters is positief. Bij Cq-waarden hoger dan 38 wordt er geconcludeerd dat er geen virus is aangetroffen. Bij Cq-waarden tussen 32-37 is het PCR-resultaat 'zwak-positief'. Dit betekent dat er virus is aangetroffen, de concentratie is echter laag.

Het kan gaan om een recente infectie waarbij de virusconcentratie nog onvoldoende gestegen is voor een duidelijk positief toetsresultaat. Wanneer bijvoorbeeld gespoelde bollen zijn getoetst, dan kan dit zwak-positieve resultaat ook veroorzaakt zijn door virus dat aan de buitenkant van schubben aanwezig is als gevolg van ingedroogd spoel- of ontsmettingswater. Praktijkervaringen leert dat bij praktijkpartijen met een zwak positief toetsresultaat ($C_q = 33-37$) soms wel virusbesmette planten worden aangetroffen, maar dat soms de partij ook in de volgende teelt virusvrij is.

Met betrekking tot het onderzoek uit dit rapport wordt een zwak-positief PCR-resultaat als een positief resultaat beoordeeld. De proefopzet en werkwijze is zo gekozen dat bij analyse van de monsters uit dit onderzoek er geen sprake kan zijn van uitwendig virus dat ongewild voor een zwak-positief toetsresultaat zorgt.



Figuur 1. In alle schakels van de keten zijn er risico's op infectie en verspreiding van PIAMV. Tijdens de teelt kan er infectie vanuit de bodem plaatsvinden. Vanaf het rooien tot dat de lilies in de bewaring liggen kunnen tijdens diverse handelingen virusverspreiding en -infectie plaatsvinden. De ELISA-bladtoets tijdens de teelt en de PCR schubtoets geven belangrijke informatie (zie ook factsheet "Toetsen op PIAMV", Bijlage 1). Het resultaat van beide toetsen is echter een momentopname in het productieproces. Met behulp van een opplantmonster kan het meest werkelijke percentage PIAMV in een partij worden bepaald.

Tabel 1. Beoordeling en toelichting op PCR-resultaat van een (meng)monster.

Cq-waarde	.. tot 32.0	32.0 tot 38.0	38.0 tot en met 40
Beoordeling	Positief	Zwak-positief	Negatief
Interpretatie	<i>HET MONSTER IS VIRUSZIEK</i>	<i>HET MONSTER KAN BESMET ZIJN</i>	<i>HET MONSTER IS VRJ VAN VIRUS</i>
Toelichting	Er is met zekerheid virus aangetroffen	Er is virus aangetroffen, de concentratie is echter laag. <ul style="list-style-type: none"> • een recente infectie? • virus aan de buitenkant van schubben (geen infectie)? Bij doorteelt wordt soms wel en soms geen virusinfectie aangetroffen.	Er is geen virus aangetroffen

3 Genetische analyse PIAMV en TVX

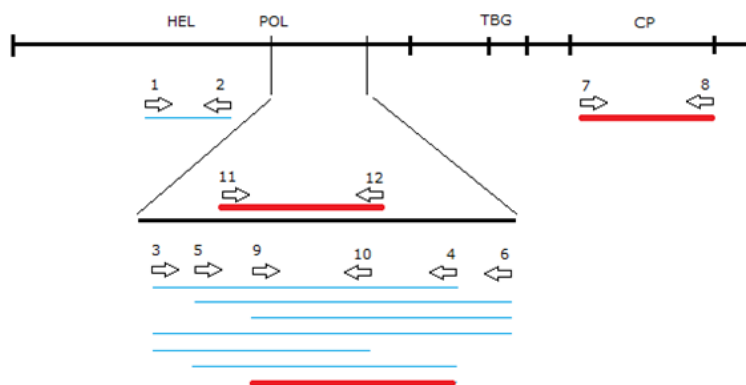
3.1 *Plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV)

Infecties met PIAMV kunnen wisselende type symptomen geven. Er zijn voorbeelden van heftige schade, er is bekend dat bij sommige cultivars de teeltomstandigheden de heftigheid van schade beïnvloed, en er zijn voorbeelden van infectie met PIAMV zonder symptomen. Zowel voor onderzoek als voor keuringen is het van belang te weten of de verschillende schadebeelden of symptoomloosheid wordt veroorzaakt één virusstam van PIAMV, of dat elke type schadebeeld veroorzaakt wordt door een aparte unieke stam van PIAMV.

Zeven PIAMV virusmonsters zijn op basis van symptoomexpressie tijdens de broei verzameld. Deze collectie PIAMV-isolaten is aangevuld met één additioneel PIAMV isolaat waarvan niet bekend was wat de symptoomexpressie is.

Aanwezigheid van PIAMV is in alle monsters met zowel ELISA als TaqMAN PCR bevestigd. In alle monsters werd een hoge concentratie PIAMV aangetroffen. Deze resultaten tonen aan dat zowel de PCR-toets als de ELISA-toets PIAMV in deze acht individuele monsters betrouwbaar aantoonde.

De genetische sequentie is van deze acht monsters bepaald. Hiervoor zijn PCR reacties met diverse primercombinaties uitgevoerd. Primercombinaties waren gericht op het helicase, polymerase- en het manteleiwit gen en waren ontworpen op basis van PIAMV-isolaat Li-1 (oorsprong Japan). Veel van de primercombinaties resulteerden in een PCR-product (Tabel 2). Omdat er bij diverse primercombinaties geen uniforme PCR-resultaten werden verkregen, ontstond de indruk dat er genetische variatie aanwezig kon zijn die de efficiëntie van de PCR-reactie beïnvloedt. Helaas kon met deze strategie geen PCR-product verkregen worden voor het Helicase-gebied. De sequenties van verkregen PCR-producten zijn vergeleken met de referentie-sequentie van PIAMV stam Li-1 afkomstig uit Japan.



Figuur 2. Schematische organisatie van het genoom van PIAMV met daar in aangegeven de oriëntatie van diverse primers die gebruikt zijn voor de genetische karakterisatie van PIAMV-isolaten. Hel=helicase, POL= polymerase, TGB=triple gene block, CP=coat protein.

De verkregen sequenties van Nederlandse PIAMV isolaten hebben 85% nucleotide-identiteit met PIAMV Li-1 (Japan) en 87% nucleotide-identiteit met PIAMV uit primerose. Deze relatief lage homologie verklaart waarom bij voor sommige primercombinaties geen PCR-product is verkregen. In deze gevallen zal de lokale sequentiehomologie tussen de primers en de Nederlandse PIAMV-isolaten te laag zijn geweest.

De verkregen sequenties van Nederlandse PIAMV isolaten zijn onderling >99% identiek. Op vier verschillende locaties in het polymerase-gen zijn genetische verschillen waargenomen (Tabel 3). Deze genetische variatie resulteert niet in een andere aminozuursamenstelling van het polymerase-eiwit. Daardoor heeft deze zeer beperkte genetische variatie geen invloed op ELISA-toetsen.

Daarentegen kunnen deze genetische verschillen wel invloed hebben op primers of probes van PCR-toetsen. De primers en probe van de PIAMV TaqMAN PCR-toets hebben geen overlap met deze locaties. Daarom is de impact van deze genetische variatie op bestaande toetsen afwezig. Deze analyse heeft aangetoond dat er bij deze acht individuele PIAMV-isolaten op de locaties van primers en probe van de PIAMV TaqMAN PCR-toets geen genetische variatie is.

Op basis van de vier variabele genetische posities konden er drie varianten van PLAMV worden aangetoond:

1. isolaat 1, 5, 7 en S zijn genetische gelijk (aanwezig in Sorbonne, Belladone en Tebaldi (2x))
2. isolaat 3, 6 en 10 zijn genetisch gelijk (aanwezig in cv. Laressa, Montezuma en Referentie)
3. isolaat 4 (aanwezig in Belladonna)

Vanuit epidemiologisch oogpunt kan het interessant zijn de herkomst van deze cultivars en de locatie van teelt & verwerking verder te analyseren.

Tabel 2. PCR-resultaten voor verschillende primercombinaties bij verschillende PIAMV-isolaten.

Isolaat	Cultivar	Symptomen	Primer combinatie				
			A	B	C	D	E
1	Sorbonne	?	-	+	+	+	+
3	Laressa	Zeer beperkt	-	+/-	+	+	+
4	Belladonna	Zeer beperkt	-	+	+	+	+/-
5	Belladonna	Zeer beperkt	-	+	+	+	+/-
6	Montezuma	Zeer beperkt	-	+/-	+	+	+/-
7	Tebaldi	Symptoomloos	-	+	+	+	+/-
10	Referentie	Necrose	+	+	+	+	+
S	Tebaldi	symptoomloos	+	+	+	+	+

Tabel 3. Overzicht van genetische variatie die is aangetoond in Nederlandse isolaten van PIAMV en de consequenties die dit eventueel zou hebben voor ELISA- en PCR-toetsen. Alle variatie is gelegen in het polymerase-gen van PIAMV.

positie in AB360790 (PIAMV Li-1)	PIAMV isolaat	Nucleotide	Aminozuur op deze positie	Consequentie voor toetsen
3320	Li-1, 3, 4, 6, 10	C	His	Voor ELISA geen risico Voor primers of probe in deze risico op een mismatch
	1, 5, 7, S	T	His	
3329	Li-1, 1, 3, 5, 6, 7, 10, S	T	Leu	Voor ELISA geen risico Voor primers of probe in deze risico op een mismatch
	4	G	Leu	
3692	Li-1, 5	A	Lys	Voor ELISA geen risico Voor primers of probe in deze risico op een mismatch
	1, 3, 4, 6, 7, 10, S	G	Lys	
3743	Li-1, 1, 5, 7, S	T	Gly	Voor ELISA geen risico Voor primers of probe in deze risico op een mismatch
	3, 4, 6, 10	C	Gly	

3.2 Tulpenvirus X (TVX)

TVX kan bij tulp virusinfecties veroorzaken. Destijds is er op basis van de genetische sequentie van TVX uit tulp een TaqMAN toets ontwikkeld. Ondanks dat deze TVX TaqMAN PCR-toets nooit officieel gevalideerd is, zijn er bij PPO en BKD geen ervaringen bekend dat deze toets bij tulp onvoldoende betrouwbaar is. In 2010 werd bekend dat TVX ook bij lelies voor virusinfecties kon zorgen. Symptomen TVX in lelie zijn (zie ook):

- Ingezonken, lichtgroen gekleurde, langwerpige sectoren in het blad tussen de nerven (enkele millimeters lang)
- Blad- en bloemknop zijn soms gebobbeld of ruwer van structuur dan normaal
- Soms roestbruine verkleuring in de lengterichting van nerven (vergelijkbaar met als PIAMV)
- Bovenkant blad kan lichtgele of lichtgroene vlekjes vertonen
- De bladeren zijn soms aan de randen gegolfd als gevolg van necrose langs de bladeren
- Iets meer spichtig blad



Figuur 3. Symptomen van een infectie met TVX bij lelie.

Vanzelfsprekend werd de TVX TaqMAN PCR-toets ook toegepast bij onderzoek naar TVX bij lelie. Als snel werd op basis van vergelijking van TVX-ELISA- en TVX-PCR-resultaten bekend dat de TaqMAN PCR-toets voor TVX bij lelie onvoldoende betrouwbaar was.

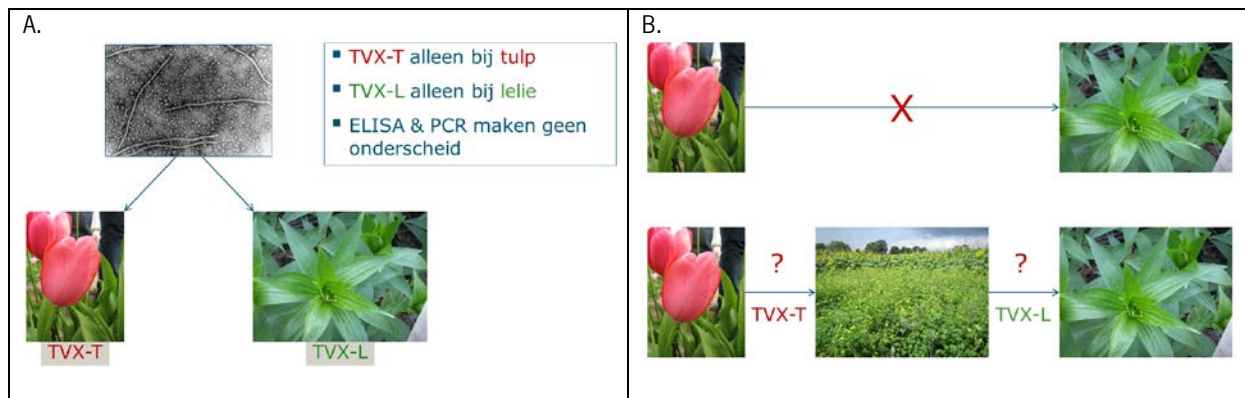
Sequentieanalyse van TVX isolaten uit tulp en lelie toonde enkele specifieke genetische verschillen aan tussen de TVX-stam afkomstig uit tulp en de TVX-stam afkomstig uit lelie. Daarom wordt er nu gesproken van de tulpen-stam van TVX (TVX-T) en de lelie-stam van TVX (TVX-L). Eén van deze genetische verschillen was juist gelegen in een regio waarop ook de probe voor de PCR-toets was gebaseerd. Deze genetische variatie had een dermate groot effect dat de TaqMAN PCR-toets voor TVX opnieuw ontwikkeld moest worden. Deze toetsontwikkeling is in opdracht van de Bloembollenkeuringsdienst uitgevoerd.

Sinds het bekend worden van twee varianten van TVX is onderzocht of TVX-L aanwezig is bij tulp. Dertig individuele monsters van TVX-besmette tulpen uit de monsterkas van de BKD in Dirksborn zijn onderzocht. In alle tulpenmonsters is de tulpenvariant van TVX aangetroffen. Tot nu toe is TVX-L niet bij tulp aangetroffen en is TVX-T niet bij lelie aangetroffen. Onderzoek is ingezet om te onderzoeken of beide stammen in beide gewassen uitwisselbaar zijn en wat de bijbehorende symptomen zijn.

De consequentie van het bestaan van een tulpen- en leliestam is vanuit epidemiologisch oogpunt groot. Ondernemers met TVX-infectie bij lelie telen vaak ook tulpen, waaronder ook TVX-besmette tulpen.

Echter, het is bij deze ondernemers nooit mogelijk geweest via bouwplan of verwerking in de schuur een directe koppeling te leggen tussen partijen tulp met TVX en partijen lelie met TVX.

Met de kennis van twee varianten van TVX wordt het meer aannemelijk te veronderstellen dat TVX-besmette tulp indirect de bron voor TVX bij lelie is geweest. De hypothese is momenteel dat TVX uit tulp in een tussenwaardplant terecht is gekomen. Via natuurlijke variatie en selectie is in deze tussenwaardplant de TVX-T stam veranderd in de TVX-L stam die vervolgens infecties bij lelie heeft veroorzaakt. De tussenwaardplant waar dit hypothetisch heeft plaatsgevonden is niet bekend.



Figuur 4. A. Er zijn twee stammen van TVX bekend. TVX-T komt voor bij tulp, TVX-L komt voor bij lelie. **B.** Vanwege het bestaan van twee TVX-stammen die zover als bekend uitsluitend bij tulp, resp. lelie voorkomen, is het de hypothese dat TVX-T vanuit tulp een infectie heeft veroorzaakt in een tussenwaardplant. Via natuurlijke variatie en selectie is in deze tussenwaardplant de TVX-T stam veranderd in de TVX-L stam die vervolgens infecties bij lelie heeft veroorzaakt. De tussenwaardplant waar dit hypothetisch heeft plaatsgevonden is niet bekend.

4 Infectie met PIAMV tijdens dompelen en spoelen, ook zonder verwonding

4.1 Aanleiding en vraagstelling

In eerder onderzoek is aangetoond dat er een serieus risico op PIAMV-infectie is wanneer beschadigde bollen worden gespoeld met gerecirculeerd spoelwater waarin PIAMV aanwezig is (De Kock 2012 en De Kock 2013). Dit speelt met name tijdens de teelt van bloembollen waarbij tijdens het zandvrij spoelen, sorteren en inkorten van de wortels verwonding bij leliebollen optreedt.

Ter voorbereiding op export of inpakken voorafgaand aan broei worden de lelie bollen opnieuw blootgesteld aan water waarin mogelijk PIAMV aanwezig is. Bij deze spoel- of ontsmettingsactiviteiten vindt niet of nauwelijks verwonding bij leliebollen plaats. Het was onduidelijk of ook bij deze activiteit risico's op PIAMV-infectie aanwezig is wanneer er met gerecirculeerd water spoelt of ontsmet.

4.2 Werkwijze

4.2.1 Algemene werkwijze

Vers gerooide bollen van een LA- en van een OR cultivar zijn gedurende één week in de bewaring bij 2 °C weggezet waarna ze volgens het schema beschreven in Tabel 5 al dan niet zijn verwond en zijn blootgesteld aan verschillende concentraties PIAMV. Alle behandelingen zijn met 120 bollen uitgevoerd. De partijen waren getoetst virusvrij voorafgaand aan het onderzoek. Er zijn verschillende onderwerpen onderzocht:

- Wat is het risico op PIAMV-infectie bij onbeschadigde bollen?
- Kan het risico op PIAMV-infectie worden verminderd door de bollen na te spoelen met vers schoon water?
- Kan het risico op PIAMV-infectie worden verminderd door toevoeging van een middel aan het virusbesmette water?

De werkwijzen voor deze drie verschillende onderdelen staan in drie aparte paragrafen beschreven.

Voor het maken van het dompelbad met virus zijn 2, respectievelijk 20 PIAMV-zieke bollen in een gaaszak gedaan. Het aantal bollen is tot 20 aangevuld met virusvrije bollen. De gaaszak met bollen is vervolgens in een plastic zak gedaan waarna de bollen zijn fijngestampt. Na het fijnstampen is de gaaszak met fijngestampte bollen aan 10 liter water toegevoegd. Na 5 minuten inweektijd waarbij regelmatig de gaaszak als 'theezakje' op een neer werd bewogen, is de 10 liter over een grove zeef (0.5cm) gefilterd. Dit dompelbad met virus is vervolgens gebruikt voor de dompelproeven. Bollen werden gedurende drie minuten gedompeld in het al dan niet PIAMV-besmette dompelbad.

Na de toepassing van de verschillende behandelingen hebben de bollen een koudebehandeling van twee maanden gekregen voordat ze in een opgeplant werden. Er is gebruik gemaakt van kistenteelt waarbij schone kisten en nieuwe potgrond is gebruikt. De kistenteelt stond los van de ondergrond. Bij bewaring en kistenteelt is er voor gezorgd dat lelie(bollen) van verschillende behandelingen niet fysiek met elkaar in contact konden komen. Omdat er bij de vraagstellingen uit dit hoofdstuk sprake is van infectie van de bol voorafgaand aan de bewaring is een ELISA-bladtoets in de nateelt de beste en snelste methode voor de bepaling van opgetreden infecties met PIAMV tijdens de behandelingen.

4.2.2 Risico op PIAMV-infectie bij intacte bollen

Bij het inkorten van de wortels werden de wortels voorafgaand aan dompelen op ca 5 cm van de bolbodem afgeknipt. Bij het beschadigen van de schubben zijn de bollen enkele keren in een gaasbak heen en weer geschud.

4.2.3 Effect van naspoelen met vers schoon water

Na het dompelen van bollen van type LA en OR (n=120) zijn de bollen gedurende 2 minuten nagespoeld met schoon water.

4.3 Resultaten en discussie

Na afloop van de verschillende dompelproeven is met PCR de concentratie virus in de dompelbaden bepaald (duplo analyse). Het dompelbad met een lage virusconcentratie (2 viruszieke bollen in 10 liter water) resulteerde in een Cq-waarde van 19.6, resp. 19.7. Het dompelbad met een hoge virusconcentratie (20 viruszieke bollen in 10 liter water) resulteerde in een Cq-waarde van 12.8, resp. 15.2.

Na een bewaarperiode van 8 weken bij 2°C zijn de lelies in een kistenteelt gebroeid tot bloeiende planten. Net voor de bloei zijn de planten gekopt. Ca. vier weken na de bloei is per behandeling via een ELISA-bladtoets het infectiepercentage bepaald.

4.3.1 Risico op PIAMV-infectie bij intacte bollen

Na het dompelen zijn de bollen 10 minuten weggezet om uit te laten lekken voordat ze ingepakt werden. Voor het LA- en OR-type is bepaald wat de toename in gewicht is als gevolg van het dompelen (Tabel 4). Deze bepaling is uitgevoerd voor intacte bollen en bollen waarvan de wortels tot 5 cm waren ingekort. Bij het LA-type werd een gewichtstoename van 2.7% waargenomen, bij het OR-type een gewichtstoename van 3.8-4.1%. Enerzijds zal dit dompelbadwater aan de buitenkant van de leliebol zijn. Mogelijk kan er ook wateropname door de bol hebben opgetreden. Wanneer in dit water virus aanwezig is, dan wordt er na het dompelen als het ware een coating van virusdeeltje op de bollen achtergelaten en/of kan virusbesmet water door de bol opgenomen zijn.

De opgetreden infecties bij het dompelen van intacte en beschadigde bollen is weergegeven in Tabel 5 en Figuur 5. Bollen van het gebruikte uitgangsmateriaal zijn ook opgenomen in de nateelt. Deze bollen zijn verder niet gedompeld en/of tussentijds op andere wijze behandeld. Zoals verwacht zijn deze lelies op basis van de ELISA-bladtoets virusvrij is de nateelt.

De onbeschadigde bollen en bollen waarvan de wortels zijn ingekort resulteren in virusvrije planten wanneer deze zijn gedompeld in een dompelbad waaraan geen virus is toegevoegd. Dit is een extra controle ten opzichte van de niet behandelde bollen. Er is dus sprake van een partij die virusvrij is.

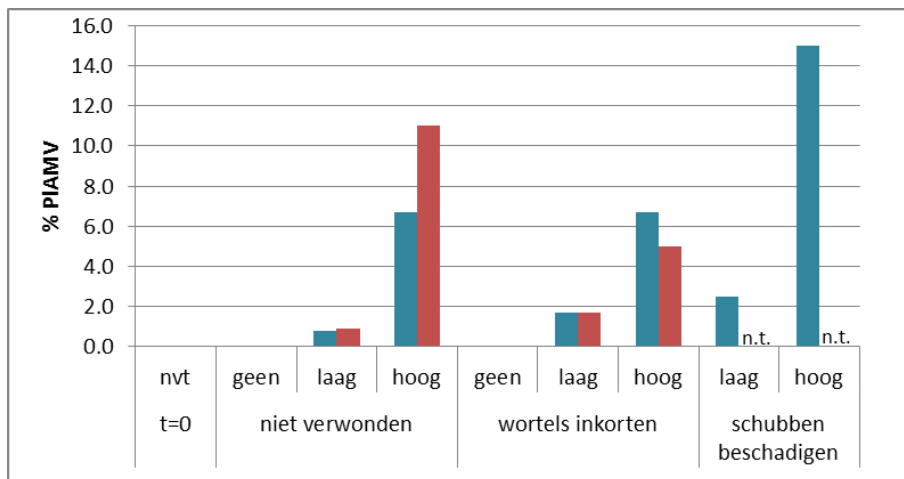
Dompeling van onbeschadigde bollen in een vloeistof met een lage concentratie virus resulteerde voor zowel de LA- als de OR-cultivar in een lichte infectie van 0.8, resp. 0.9 % PIAMV. Er is infectie bij één van de 120, resp. 110 opgekomen lelies aangetoond. Bij dompeling in een bad met een hogere concentratie virus neemt de infectie toe, 6.7, resp. 11.0% PIAMV. Het is duidelijk dat bij een hogere virusdruk er meer infectie optreedt.

Tabel 4. Toename gewicht van 120 bollen van een LA- en OR type na het dompelen.

Type lelie	Behandeling	Gewicht voor dompelen (gram)	Gewicht na dompelen (gram)	Vershil
LA	Niet verwonden	6851	7040	+2.7%
	Wortels inkorten	6822	7010	+2.7%
OR	Niet verwonden	8123	8472	+4.1%
	Wortels inkorten	7681	7989	+3.8%

Tabel 5. Infectie met PIAMV bij dompelen in een water met verschillende concentraties PIAMV (geen, lage concentratie, hoge concentratie). Infectie met virus is bepaald tijdens een nateelt d.m.v. een ELISA-toets aan het blad (n=120).

Behandeling	Concentratie PIAMV in dompelbad	% PIAMV op basis van ELISA bladtoets tijdens de nateelt	
		LA-type	OR-type
1. uitgangsmateriaal	niet dompelen	0.0	0.0
2. niet verwonden	geen	0.0	0.0
	laag	0.8	0.9
	hoog	6.7	11.0
3. wortels inkorten	geen	0.0	0.0
	laag	1.7	1.7
	hoog	6.7	5.0
4. schubben beschadigen	laag	2.5	Niet getest
	hoog	15.0	Niet getest



Figuur 5. Infectie met PIAMV bij dompelen in een water met verschillende concentraties PIAMV (geen, lage concentratie, hoge concentratie). Infectie met virus is bepaald tijdens een nateelt d.m.v. een ELISA-toets aan het blad (n=120) Blauw = LA-type, Rood = OR-type, n.t.= *not tested*, niet getest.

Wanneer de wortels voorafgaand aan het dompelen met een schaar tot 5 cm worden ingekort, vinden er bij zowel de LA- als de OR cultivar vergelijkbare virusinfecties plaats (Tabel 5 en Figuur 5). Het is opvallend dat de infectie bij verwonding enigszins vergelijkbaar is met de opgetreden infecties bij intacte bollen. Deze resultaten suggereren dat infectie met PIAMV kan optreden zonder dat er mechanische beschadiging bij de wortels aanwezig is. De consequentie van deze resultaten is dat bedrijven die lelies export spoelen of ontsmetten ook alert moeten zijn op hergebruik van spoelwater of dompelvloeistoffen. Ook bij deze schakels in de productieketen van lelie is er dus een risico op PIAMV-infectie bij onzorgvuldig hergebruik van virusbesmet spoelwater of dompelbaden.

Wanneer schubben mechanisch worden beschadigd via het rollen in een gaasbak, is het risico op infectie groter dan bij intacte bollen of bollen waarbij de wortels recent zijn ingekort. Dit risico is uitsluitend bepaald voor de LA-cultivar. Bij dompeling van fors beschadigde bollen in een bad met een lage virusconcentratie werd een bij 3% van de lelies PIAMV-infectie waargenomen.

Bij dompeling van fors beschadigde bollen in een bad met een hoge virusconcentratie werd bij 15% van de lelies een PIAMV-infectie waargenomen.

Naar aanleiding van de waarneming dat PIAMV-infectie ook kan optreden bij intacte leliebollen is een extra onderzoek ingezet naar de infectierisico's vanuit het wortelmilieu. *Arabidopsis thaliana* (zandraket) is een plantje dat *het* proefkonijn van de plantenwetenschappen is. Uit recent wetenschappelijk onderzoek was bekend dat *A. thaliana* vatbaar is voor het Japanse isolaat van PIAMV (Yamaji et al 2012). Gesteriliseerd *A. thaliana* zaad is op weefselkweekmedium gezaaid waarvan het weefselkweekmedium was verrijkt met gezuiverd PIAMV (het Nederlandse isolaat). Wortels uit het kiemende zaad nemen voedingsstoffen op vanuit het weefselkweekmedium. Na verloop van tijd ontstonden er kiemplantjes met blaadjes.

Met PCR-diagnostiek kon PIAMV in de blaadjes van deze weefselkweekplantjes worden aangetoond. Deze resultaten tonen aan dat in een weefselkweekmedium, waar geen verwoning van cellen optreedt, ook infectie met PIAMV kan optreden. Tevens tonen deze resultaten aan dat *A. thaliana* ook een waardplant is voor het Nederlandse PIAMV isolaat. Dit vergroot de mogelijkheden voor meer wetenschappelijk getint onderzoek aan virus-plant interacties en infectieprocessen.

4.3.2 Effect van naspoelen met vers schoon water

Het is bekend dat tijdens infectie optreedt bij het dompelen van bollen in water met PLAMV. Mogelijk kan het risico op virusinfectie verminderd worden door de bollen direct na het dompelen in virusbesmet water af te spoelen met schoon water. Het effect van afspoelen met schoon water op infectie met PIAMV na het dompelen van intacte bollen in een dompelbad met een hoge concentratie virus is bepaald voor de LA- en OR-cultivar. De gebruikte partij was bij aanvang virusvrij (§4.3.1).

Bij het LA-type werd er na dompelen een infectie met PIAMV aangetroffen (6.7%, Tabel 6). Hetzelfde viruspercentage werd waargenomen wanneer de bollen werden nagespoeld met schoon water. Bij de OR-cultivar trad bij dompelen meer infectie op dan bij de LA-cultivar (11.6%). Opvallend is dat bij deze cultivar het naspoelen met schoon water resulteerde in een duidelijke reductie in virusinfectie (2.6%).

Naspoelen met schoon water kan dus resulteren in een virusbesmetting die lager is dan wanneer er niet is nagespoeld. Het is niet duidelijk waarom er een verschil van effectiviteit is bij de twee verschillende typen.

Tabel 6. Effect van afspoelen met schoon water op infectie met PIAMV na het dompelen van intacte bollen in een dompelbad met een hoge concentratie virus. Infectie met virus is bepaald tijdens een nateelt d.m.v. een ELISA-toets aan het blad (n=120).

Behandeling	% PIAMV op basis van ELISA bladtoets tijdens de nateelt	
	LA-type	OR-type
1. Niet afspoelen	6.7	11.6
2. Afspoelen met schoon water	6.7	2.6

5 Effectiviteit van middelen tegen PIAMV

5.1 Oppervlakte reiniging

In het knelpuntenonderzoek namens KAVB is in 2012 de virucide activiteit van Virkon S, Jet-5 en Mennoclean bepaald. In 2013 is vanuit dit project op verzoek van de Regiegroep Lelie de virucide activiteit van chloorbleekloog bepaald. In november 2013 is uitsluitend Virkon S geregistreerd als oppervlaktereinigingsmiddel met virucide activiteit voor reiniging van kassen en bedrijfsruimten.

5.1.1 Werkwijze

Voor het bepalen van de virucide werking van een middel m.b.t. PIAMV is gebruikt gemaakt van een gestandaardiseerde werkwijze. De virucide werking wordt getest door middel van reiniging van een plastic en een metalen oppervlak dat besmet is met virus. Na toepassing van het middel wordt de aanwezigheid van besmettelijk virus bepaald via toetsplanten.

De volgende handelingen zijn uitgevoerd voor het bepalen van de virucide werking van een middel m.b.t. PIAMV:

- Een plastic en een metalen oppervlak zijn besmet met plantensap besmet met PIAMV (oppervlakte 37x27 cm).
- Na 24 uur indrogen is het oppervlak ingespoten met 8.5 ml middel. Bij deze hoeveelheid middel is het oppervlakte egaal bevochtigd met middel.
- Na de betreffende inwerktijd is met een veegproef via twee soorten toetsplanten bepaald of er nog virulent/besmettelijk PIAMV op het oppervlak aanwezig is. Als toetsplanten zijn gebruikt: *Nicotiana benthamiana* en *Chenopodium amaranticolor*.
- Per middel zijn doorgaans meerdere combinaties van concentratie en inwerktijd onderzocht.
- Naast de behandelingen met een middel zijn negatieve en positieve controle-behandelingen meegenomen. Negatieve controle: oppervlak niet besmet met PIAMV, 'water' als middel toepassen. Positieve controle: oppervlak besmetten met PIAMV, water als middel toepassen en een inwerktijd toepassen die overeenkomt met de langste inwerktijd van middelen in onderzoek.
- Drie weken na het testen van de virucide werking van een middel zijn de toetsplanten beoordeeld. Aanwezigheid van PIAMV-infectie in toetsplanten wordt zowel visueel als met ELISA bepaald.

5.1.2 Resultaten

Na het ontsmetten van het plastic en metalen oppervlak is eventueel aanwezig besmettelijk virus overgebracht naar toetsplanten *N. benthamiana* en *C. amaranticolor*. Eventuele infectie met resterende virusdeeltjes worden bij *C. amaranticolor* zichtbaar in de vorm van lokale lesies in het blad welke het gevolg zijn van een afweerreactie van de plant op aanwezigheid van PIAMV. Infectie met PIAMV bij *N. benthamiana* is na drie weken met ELISA te bepalen. Tevens is systemische infectie vaak zichtbaar in de vorm van mozaïeksymptomen op het blad. Een verzameling van resultaten van onderzoek naar verschillende middelen is samengevat in Tabel 7. Deze tabel is samengesteld vanuit resultaten die op verschillende momenten zijn verkregen. Bij elke analyse zijn positieve en negatieve controles betrokken bij de proefopzet. Deze controles lieten altijd verwachte resultaten zien. De resultaten van deze controles zijn niet opgenomen in Tabel 7. Bij de beoordeling van resultaten hebben de ELISA-resultaten zwaarder meegeteld, dan de visuele beoordeling van *C. amaranticolor* en *N. benthamiana*.

Algemeen kan gesteld worden dat de reinigende werking van deze middelen op een metalen oppervlak beter is dan de reinigende werking op een plastic oppervlak. Voor Virkon S wordt bij een concentratie van 1% bij een inwerktijd van 5 minuten een volledige inactivatie van PIAMV op metalen en plastic oppervlak waargenomen. Bij Jet-5 wordt een vergelijkbare activiteit gevonden bij 1% met een inwerkduur van 2 uur. Bij de middelen MennoClean is een concentratie van 3% en een lange inwerktijd van 4 uur nodig voor voldoende activiteit op een plastic oppervlak.

Bij een metalen oppervlak is bij hogere concentraties en lange inwerktijd nog steeds geen volledige inactivatie van PIAMV. Voor chloorbleekloog met een concentratie van 125ppm werd enige, maar beperkte activiteit bij een inwerkduur van 10 minuten waargenomen. Voor efficiënte inactivatie zal bij chloorbleekloog een hogere concentratie en/of langere inwerktijd nodig zijn. In november 2013 is uitsluitend Virkon S geregistreerd als oppervlaktereinigingsmiddel met virucide activiteit voor reiniging van kassen en bedrijfsruimten.

Tabel 7. Resultaten van onderzoek naar de virucide werking van diverse middelen. Virucide werking is bepaald door ontsmetting van een met PIAMV besmet plastic en metalen oppervlak. Er zijn twee verschillende concentraties middelen met verschillende inwerktijden toegepast. De aanwezigheid van eventuele aanwezige besmettelijke virusdeeltjes is via toetsplanten bepaald. Per behandeling is het aantal negatieve (virusvrij), zwak positief en positieve (viruszieke toetsplanten) in de tabel weergegeven. Met kleur is per behandeling en toetsplant de interpretatie van de resultaten aangegeven (zie legenda).

ondergrond:	behandeling:	concentratie:	tijd:	ELISA + visuele beoordeling			Visuele beoordeling		
				<i>Nicotiana benthamiana</i>			<i>Chen. amaranticolor:</i>		
				#negatief	#zwak	#positief	#negatief	#zwak	#positief
plastic	Virkon S	1%	5 min	5	0	0	5	0	0
		2%	5 min	5	0	0	5	0	0
		3%	5 min	5	0	0	5	0	0
	Jet-5	0.5%	60 min	0	0	5	0	0	5
			120 min	2	0	2	5	0	0
		1%	60 min	0	0	5	2	2	1
			120 min	4	0	0	5	0	0
	Mennoclean	1%	240 min	0	0	4	0	0	4
		2%		1	0	3	0	1	4
		3%		4	0	0	4	0	0
	Chloorbleekloog	125 ppm	10 min	0	0	3	1	2	0

ondergrond:	behandeling:	concentratie:	tijd:	ELISA + visuele beoordeling			Visuele beoordeling		
				<i>Nicotiana benthamiana</i>			<i>Chen. amaranticolor:</i>		
				#negatief	#zwak	#positief	#negatief	#zwak	#positief
metaal	Virkon S	1%	5 min	5	0	0	5	0	0
		2%	5 min	5	0	0	5	0	0
		3%	5 min	5	0	0	5	0	0
	Jet-5	0.5%	60 min	1	0	4	0	0	5
			120 min	2	0	1	5	0	0
		1%	60 min	2	0	2	3	2	0
			120 min	4	0	0	5	0	0
	Mennoclean	1%	240 min	0	0	4	0	2	3
		2%		0	0	4	3	2	0
		3%		1	0	3	4	0	0
	Chloorbleekloog	125 ppm	10 min	1	0	2	1	2	0

Legenda

	geen virus aangetroffen, bij ontsmetting goede
	In het merendeel van de herhalingen virus
	In alle herhalingenvirus aangetroffen, geen

5.2 Verminderen van infectierisico's tijdens spoelen en dompelen

Gerecirculeerd spoelwater is een belangrijke besmettingsbron voor virusverspreiding binnen en tussen partijen (De Kock e.a., 2012, 2013). Op verzoek van de Regiegroep Lelie heeft het project onderzocht of toevoeging van middelen met virucide activiteit aan spoelwater of dompelbad de risico's op infectie met PIAMV doen verminderen.

5.2.1 Werkwijze

Voor de algemene werkwijze voor de uitvoering van de dompelproeven wordt verwezen naar §4.2.1, pagina 15. De specifieke details voor onderzoek naar middelen staat in de volgende paragrafen uitgeschreven.

Er zijn op dit moment geen middelen met virucide werking geregistreerd voor ontsmetting van een vloeistof. Daarom worden de gebruikte middelen in dit onderzoek niet bij de volledige naam genoemd. De volgende middelen en concentraties zijn getest:

- Middel F 0.5%
- Middel F 1.0%
- Middel VS 1.0%
- Middel CBL 1.0% van een 40 g/liter oplossing (40 ppm)

Het middel is 15 minuten voor dompeling van de bollen toegevoegd aan het dompelbad met een hoge virusconcentratie (20 bollen per 10 liter water).

In de wetenschappelijk literatuur zijn aanwijzingen gevonden voor binding van virusdeeltjes aan kleimineralen. Mineralen die in klei voorkomen zijn bentoniet, kaolinet, sepoliet en vermiculiet. Deze bindende eigenschap zou ingezet kunnen worden voor het 'ontvirussen' van (spoel)water en/of ontsmettingsbaden.

Via precipitatie-experimenten is voor het mineraal sepoliet aangetoond dat er PIAMV virusdeeltjes in een waterige oplossing worden weggevangen. Met behulp van semi-kwantitatieve PCR-methoden kon worden aangetoond dat in aanwezigheid van sepoliet in een vloeistof, de concentratie virusdeeltjes in het supernatant lager werd ten opzicht van controles en toepassing van andere mineralen. De mate/efficiëntie waarin deze precipitatie plaats vond was echter niet volledig; er kon nog steeds kleine hoeveelheden PIAMV in het supernatant worden aangetroffen. Voor kleimineralen kaolinet, bentoniet en vermiculiet is aangetoond dat deze mineralen geen effect hebben op hoeveelheid virusdeeltjes in een vloeistof.

Om meer gevoel te krijgen voor een mogelijk reducerend effect op infectierisico's zijn er vervolgens infectie-experimenten uitgevoerd met virusbesmet water dat wel en niet behandeld is met 1% sepoliet (10 gram per liter). Sepoliet is twee uur voor dompeling van de bollen toegevoegd aan het dompelbad met een lage of hoge virusconcentratie (2, resp. 20 bollen per 10 liter water). Het eerste uur is er regelmatig geroerd zodat het sepoliet egaal in de vloeistof aanwezig was. Het tweede uur werd gebruikt voor het uitzakken van het sepoliet. De heldere oplossing is na het tweede uur overgeheveld in een dompelbad. Bollen waarvan de wortels wel en niet tot 5 cm waren afgeknipt, zijn gebruikt voor het dompelen. De dompeltijd was drie minuten. Na het uitlekken zijn de bollen verpakt voor bewaring.

5.2.2 Resultaten

Er is geen toelating van middelen met virucide activiteit voor de ontsmetting van spoelwater of dompelbaden. Echter, van diverse middelen is bekend dat zij een (potentiele) virucide activiteit hebben. De virucide activiteit van deze middelen is getest door enerzijds de vloeistof direct aansluitend op het dompelen met PCR te testen op aanwezigheid van virusdeeltjes. Anderzijds zijn bollen waarvan de wortels tot 5 cm zijn ingekort gedompeld in virusbesmette dompelbaden die met verschillende middelen behandeld zijn.

Bij afwezigheid van virus in het dompelbad werd zoals verwacht geen virus aangetoond (no Ct, Tabel 8). Daarentegen resulteerde het dompelbad met virus waaraan geen middel was toegevoegd in een relatief lage C_q-waarde hetgeen overeenkomt met een hoge concentratie detecteerbaar virus (C_q=13.6). Bij middel F werd bij beide concentraties een C_q-waarde waargenomen die duidelijk hoger is bij het monster waar geen middel aan toegevoegd is.

Een hogere Cq-waarde komt overeen met een lagere concentratie detecteerbaar virus. Bij middel VS kon geen virus worden aangetroffen. Bij middel CBL werd een kleine reductie in Cq-waarde waargenomen, een kleine reductie in detecteerbaar virus.

Tijdens de teelt is globaal gelet op de stand van het gewas. Wanneer er verschillen tussen behandelingen/middelen zichtbaar waren, dan werden deze standsverschillen in meer details in kaart gebracht. Omdat er geen visuele effecten van middelen zichtbaar waren, zijn kwantitatieve gegevens van gewasstand en –opbrengst niet bepaald.

Er zijn duidelijke effecten van middelen aanwezig wanneer de opgetreden infecties met PIAMV met een ELISA-bladtoets worden bestudeerd. De controle-behandelingen laten zoals verwacht geen infectie, of een duidelijke infectie met PIAMV zien (0%, resp. 6.7%, Tabel 8). Toepassing van middel F laat bij zowel 0.5 als 1% een reductie in virus zien ten opzichte van dompeling zonder toevoeging van een middel. Deze reductie in infectie sluit aan bij de lagere hoeveelheid detecteerbaar PIAMV in het dompelbad na behandeling met middel F.

Bij middel VS blijft de partij virusvrij (0% PIAMV). Dit resultaat sluit aan het feit dat er met TaqMAN PCR geen detecteerbaar PLAMV werd aangetoond (No Ct). Bij Middel CBL werd op basis van PCR-analyse een kleine reductie in concentratie detecteerbaar virus in het dompelbad. Deze kleine reductie werd niet terug gezien in het infectiepercentage bij de lelies afkomstig van deze behandeling (8.3% PIAMV).

De resultaten uit dit deel van het onderzoek tonen aan dat toevoeging van middel VS aan een dompelbad een zeer goede curatieve activiteit heeft en middel F redelijk goede curatieve activiteit. Toepassing van CBL bij een concentratie van 40 ppm is te laag voor een effectieve bestrijding van infectie met PIAMV.

Het effect van het kleimineraal sepoliet in een vloeistof waarin PIAMV aanwezig is op concentratie detecteerbaar virus en infectie bij lelie tijdens dompelen is weergegeven in Tabel 9 en Tabel 10. Bij afwezigheid van PIAMV in het dompelbad wordt geen virus gedetecteerd (No Ct). Bij aanwezigheid van PIAMV maar afwezigheid van sepoliet zijn relatief lage Cq-waarden verkrijgen. De Ct waarde van de hoge concentratie PIAMV is zoals verwacht lager dan de Cq-waarde verkrijgen bij de lage concentratie PIAMV. Bij toevoeging van sepoliet werden na uitzakken van het mineraal in de heldere vloeistof Cq-waarden van 32 verkregen hetgeen er op duidt dat er reductie heeft plaatsgevonden. Bij de vloeistof waarin sepoliet niet was uitgezakt werden Cq-waarden verkregen die duiden op geen (Cq=17.98) of enige afname (Cq= 24.05).

Tabel 8. Effect van middelen in een PIAMV-besmet dompelbad op de hoeveelheid detecteerbaar PIAMV en infectie tijdens het dompelen van beschadigde bollen. Infectie met virus is bepaald tijdens een nateelt d.m.v. een ELISA-toets aan het blad (n=120).

Toegevoegd aan dompelbad	Cq-waarde PIAMV TaqMAN PCR-toets op water uit dompelbad na dompelen	% PIAMV in nateelt (ELISA aan blad)
geen virus, geen middel	No Ct	0.0
geen middel	13.6	6.7
middel F (0.5%)	22.7	0.8
middel F (1.0%)	25.3	0.8
middel VS (1.0%)	No Ct	0.0
middel CBL (40ppm)	16.6	8.3

De vloeistof waarin het sepoliet was uitgezakt is gebruik voor dompelproeven met virusvrije lelies. De verkregen infectiepercentages zijn vermeld in Tabel 10. Kort samengevat worden vergelijkbare viruspercentages waargenomen bij de verschillende behandelingen waarbij de dompelvloeistof wel of niet behandeld is met sepoliet. Ondanks dat met PCR-diagnostiek aanwijzingen voor een verlaagde virusconcentratie zijn waargenomen, resulteerde dit niet in een reductie in infectie tijdens het dompelen.

Op basis van deze resultaten wordt daarom geconcludeerd dat sepoliet geen toegevoegde waarde heeft in het verlagen van infectierisico's tijdens het dompelen/spoelen.

Tabel 9. Cq-waarde PIAMV TaqMAN PCR-toets op water uit dompelbad na dompelen bij verschillende concentraties sepoliet.

Behandeling	Concentratie PIAMV in dompelbad		
	Geen	laag	hoog
Geen sepoliet	No Ct	18.86	13.59
1% sepoliet, geroerd in de vloeistof	No Ct	17.98	24.05
1% sepoliet, uit laten zakken	No Ct	32.68	32.56

Tabel 10. Effect van sepoliet (1%) in een PIAMV-besmet dompelbad op infectie tijdens het dompelen van beschadigde bollen. Infectie met virus is bepaald tijdens een nateelt d.m.v. een ELISA-toets aan het blad (n=120).

Behandelingen		% PIAMV op basis van ELISA bladtoets tijdens de nateelt	
Verwonden	Concentratie PIAMV in het dompelbad	Geen toevoeging aan dompelbad met PIAMV	Toevoeging van 1% Sepoliet aan dompelbad met PIAMV
Nee	Laag	0.8	0.0
Nee	Hoog	6.7	8.3
Ja	Laag	1.7	0.0
Ja	Hoog	6.7	11.7

5.3 Bedrijfshygiëne voor PIAMV en TVX

Virusdeeltjes op oppervlakten en in water kunnen weer nieuwe infecties veroorzaken. Dergelijke virusinfecties kunnen voorkomen worden door oppervlakten regelmatig te reinigen. Een goede reiniging begint eerst met het wegwassen of wegspoelen van gewas- en grondresten met ruim water, eventueel verwarmd en aangevuld met een zeep. Wanneer een oppervlak er op het oog al schoon uit ziet, is het overgrote deel van de infectiebron al weggewassen. Eventueel kan een reinigingsmiddel als Virkon S ingezet worden voor de laatste inactivatie van virusdeeltjes die niet weggewassen zijn. Geef bij eventueel gebruik van middelen voldoende aandacht aan arbo-richtlijnen en wees alert op de potentiële corrosieve activiteit op machines.

Het werken met dunne plastic zakken of ander wegwerpmateriaal in kisten of kratten is een alternatieve strategieën om versmering van PIAMV/TVX te voorkomen. Bij een nieuwe partij wordt er een nieuwe zak in de kist of krat gehangen/gelegd.

Er zijn geen middelen met de juiste een registratie beschikbaar voor het reinigen van spoelwater of dompelbaden. PIAMV kan effectief echter wel effectief geïnactiveerd worden door middel van hitte (>65°C voor minimaal 10 minuten doodt PIAMV volledig af).

Wanneer er zowel PIAMV/TVX-besmette partijen als virusvrije partijen op een bedrijf in omloop zijn, dan is het erg belangrijk om aandacht te geven aan gescheiden productstroom en gescheiden verkeer van materialen, spoelwater en dompelbaden. Dit is de meest effectieve manier om virusvrije partijen virusvrij te houden.

6 Risico's op infectie vanuit de bodem

6.1 Aanleiding en vraagstelling

Verspreiding van PIAMV kan ook via de bodem plaatsvinden. Het lijkt erop dat bij deze vorm van virusverspreiding geen bodemgebonden vector betrokken is (De Kock e.a., 2012a). Immers, in grond behandeld met fungiciden en in gestoomde grond vindt ook virusoverdracht van PIAMV plaats. In gesteriliseerde grond is de efficiëntie van overdracht zelfs groter dan in een grond waarin het bodemleven intact is.

Voor een duurzame teelt zonder risico's op infectie is het van belang meer details te kennen over deze bodemgebonden virusverspreiding. Het belangrijk om de risico's te kennen van hergebruik van teeltgrond waarin in een voorgaand jaar PIAMV- of TVX besmette lelies zijn geteeld. Wat is de stabiliteit van PIAMV in de bodem? Tevens wordt onderzocht op welke wijze virusverspreiding plaats vindt. Neemt de mate van virusinfectie toe bij aanwezigheid van viruszieke lelies tijdens de teelt en neemt de mate van virusinfectie toe bij aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in de bodem.

6.2 Werkwijze

Een enquête is opgesteld om praktijkervaringen vanuit teelt en broei in kaart te brengen (Bijlage 2). Op basis van de reacties op deze enquête zijn diverse ondernemers benaderd voor hergebruik van grond van teeltlocaties waar in 2012 PIAMV-besmette lelieteelt plaats vond. Aansluitend op het rooien van de virusbesmette lelies is grond afgegraven voor teeltproeven in een kas. Dit heeft geresulteerd in de volgende herkomsten van grond:

Tabel 11. Herkomst van teeltgrond voor onderzoek met bijbehorende teeltgeschiedenis.

Herkomst grond	Teelt geschiedenis
#1 - Westerbork (Esgrond)	2012: lelieteelt met hoog% PIAMV
#2 - Dwingeloo	2012: lelieteelt met ±75% PIAMV
#3 - Tiendeveen-11	2011: lelieteelt met ±25% PIAMV 2012: maïs
#4 - Tiendeveen-12	2012: lelieteelt met hoog% PIAMV, in de zomer al gefreesd
#5 - Julianadorp (Duinzand)	2012: lelieteelt met ±75% PIAMV
#6 - Oostrum (Dekzand)	2012: lelieteelt met hoog% TVX
#7 - Hasselt	2012: lelieteelt met hoog% PIAMV
#8 – potgrond	Controle - verse potgrond
#9 - zandgrond PPO	Controle - bollenland zonder teelt van lelies

Als grond voor controlebehandelingen is potgrond en zandgrond van de proeftuin van PPO meegenomen in het onderzoek. Met deze herkomsten van grond zijn drie verschillende teeltproeven uitgevoerd.

- A. Van elke grond zijn in 10 kisten per grondherkomst 120 bollen van een getoetst virusvrije LA-partij geteeld. Tijdens de teelt werd er geen onkruidbeheersing uitgevoerd. Er is geen aanvullende virusbron aangeplant. Na een teeltseizoen van 6 maanden zijn de bollen geroid. Per bol is een schub bemonsterd. Aanwezigheid van PIAMV is met een TaqMAN PCR-toets voor PIAMV, respectievelijk TVX bepaald met mengmonsters van 5 schubben. Een serie van 120 bollen per grondsoort resulteerde in 24 PCR-analyses op 24x5 schubben. *Met deze behandeling werd onderzocht wat het risico is op hergebruik van een grond waar recent PIAMV- of TVX-besmette lelies zijn geteelt.*

- B. Op grond van herkomst 1, 4, 5, 6 en 8 zijn in 8 kisten 8 bollen van een getoetst virusvrije LA-partij geteeld. De 8 virusvrije bollen per kist werden in de linker en rechter rij van een kist geplant. Op de middellijn van de kist werden 4 bollen van een 100% PIAMV-besmette cultivar geplant. In totaal werden er per kist dus 12 bollen geplant en grond werden 8 kisten geteelt. Na een teeltseizoen van 6 maanden zijn de bollen geroid. Per bol is een schub bemonsterd. Aanwezigheid van PIAMV is met een TaqMAN PCR-toets voor PIAMV bepaald met mengmonsters van 5 schubben. Een serie van 64 bollen per grondsoort resulteerde in 16 PCR-analyses op 16x4 schubben. *Met deze behandeling werd onderzocht of er een relatie is tussen de grondsoort en de mate van virusoverdracht via de grond bij aanwezigheid van een virusbron tijdens de teelt.*
- C. Op grond van herkomst 1, 4, 5, 6 en 8 zijn in 8 kisten 8 bollen van een getoetst virusvrije LA-partij geteeld. De 8 virusvrije bollen per kist werden in de linker en rechter rij van een kist geplant. Op de middellijn van de kist werden vijf buizen ingegraven. De buizen waren aan de onderkant open en de opening van de buis was ter hoogte van de bolbodem van de geplante lelies. Na opkomst van de lelies is gedurende 10 weken elke week elke kist aangegoten met plantensap gemaakt van PIAMV-besmette lelies. Plantensap werd gemaakt door eerst 20 viruszieke bollen te vermalen in een gaaszak. Na het fijnstampen is de gaaszak met fijngestampde bollen aan 10 liter water toegevoegd. Na 5 minuten inwektijd waarbij regelmatig de gaaszak als 'theezakje' op een neer werd bewogen, is de 10 liter over een grove zeef (0.5cm) gefilterd. Elke week is per kist 200 ml virussap in 5 ingegraven buisjes gegoten (40 ml per buisje). Na een teeltseizoen van 6 maanden zijn de bollen geroid. Per bol is een schub bemonsterd. Aanwezigheid van PIAMV is met een TaqMAN PCR-toets voor PIAMV bepaald met mengmonsters van 5 schubben. Een serie van 64 bollen per grondsoort resulteerde in 16 PCR-analyses op 16x4 schubben. *Met deze behandeling werd onderzocht of er een relatie is tussen de grondsoort en de mate van virusoverdracht via de grond bij aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in de bodem tijdens de teelt.*

6.3 Resultaten en discussie

6.3.1 Detectie PIAMV in een grondmonster

De stabiliteit van PIAMV in de bodem kan via meerdere routes bestudeerd worden: enerzijds via labtoetsen, anderzijds via opplant van lelies of andere vangplanten.

Als eerste is geprobeerd labtoetsen voor virusdetectie in de bodem te ontwikkelen. Potgrond en zandgrond van de Proeftuin Lisse werden verrijkt met een concentratiereeks PIAMV. Tevens is kasgrond gebruik waarop PIAMV-besmette lelie geteeld zijn. Aansluitend op verschillende incubatieperiodes en verschillende bewaartemperaturen zijn verschillende RNA-extractieprotocollen toegepast die nodig zijn voorafgaand aan PCR-detectie van PIAMV. Diverse optimalisatie-activiteiten zijn uitgevoerd maar heeft uiteindelijk niet geleid tot een betrouwbaar en functioneel protocol voor virusdetectie in grond. Ook in de wetenschappelijke literatuur zijn zeer beperkt protocollen beschreven voor directie virusdetectie in grond.

6.3.2 Vangplanten

De alternatieve methode voor onderzoek naar stabiliteit van PIAMV en de overdracht via de bodem is gebruik te maken van vangplanten zoals lelie en alternatieve waardplanten zoals *Arabidopsis*.

Virusopname vanuit de bodem zonder betrokkenheid van een biologische vector is o.a. bestudeerd met *Arabidopsis thaliana* plantjes (Tabel 12). Twee gangbare ecotypes zijn geteeld op nieuwe potgrond. Beide ecotypes zijn vatbaar voor PIAMV wanneer deze handmatig geïnfecteerd worden. Wanneer de potgrond 3 weken wekelijks werd aangegoten met een 1:5 verdunning van PIAMV-besmet plantensap, dan werd op het moment van zaadzetting PIAMV zowel in de wortels als in een bladmonster met PCR aangetoond (Tabel 12). Vergelijkbare resultaten zijn vanuit project BO-25.08-001-015 (Beheersing grondovergedragen virussen, De Kock & Stijger) voor het gebruik van Vogelmuur (*Stellaria media*) als vangplant. Tevens is aangetoond dat *A. thaliana* en *S. media* geschikte vangplanten zijn voor infectie vanuit de bodem met TVX.

Het gebruik van vangplanten zoals *A. thaliana* en *S. media* voor onderzoek naar bodemgebonden infectie van PIAMV en TVX versnelt het onderzoek. De gewascyclus van deze gewassen is slechts 2 maanden en daarmee een stuk korter dan die van lelie (6-7 maanden). Deze gewassen worden als vangplant in meer detail ingezet in projecten BO-25.08-001-011 (Weerbaarheid tegen plantenvirussen, De Kock & Stijger) en BO-25.08-001-015 (Beheersing grond-overgedragen virussen, De Kock & Stijger).

Tabel 12. Infectie met PIAMV bij *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0 en *Landsberg erecta* na handmatige inoculatie en aangieten van PIAMV-virussap op de grond. Aanwezigheid van PIAMV is bestudeerd met TaqMAN PCR analyse voor PIAMV en resulteert in een Cq-waarde. Planten zijn geteeld in verse potgrond.

Ecotype – monstertype	Aanwezigheid van PIAMV bepaald met TaqMAN PCR-diagnostiek (Cq-waarde)		
	Controle	Handmatig inoculeren	Aangieten PIAMV
Col-0 – blad	No Cq	27.4	28.3
Col-0 – wortel	No Cq	21.1	22.0
Ler – blad	No Cq	31.0	25.6
Ler – wortel	No Cq	27.1	23.1

6.3.3 Hergebruik leliegrond voor lelieteelt

Bij het onderzoek naar de risico's op hergebruik van grond voor virusvrije lelieteelt is gebruik gemaakt van grond afkomstig van zeven herkomsten. Als controle is gebruik gemaakt van verse potgrond en grond afkomstig van de Proeftuin van PPO. Grond van deze locaties is afgegraven aansluitend op het rooien van de lelies in het najaar van 2012. De afgegraven grond is bij ca 5°C bewaard totdat in februari 2013 getoetst virusvrije lelies op deze grond werden geteeld. Van alle typen grond (incl. potgrond) is de fysische en mineralen samenstelling bepaald. Tevens is zijn de aanwezige nematoden in detail bestudeerd. Resultaten van deze analyses zijn weergegeven in Bijlage 3.

In Tabel 11 is beschreven wat de virusbesmetting in lelie is geweest in het voorafgaande teeltjaar. Van een aantal herkomsten is het type grond bekend (bijv. esgrond, duinzand, etc.). Voor een aantal grondherkomsten zijn aanvullende opmerkingen te maken:

- #3 Tiendeveen: De twee grondmonsters uit Tiendeveen (#3 en #4) zijn van dezelfde regio afkomstig. Bij #3 stond er in tegenstellen tot de andere grondherkomsten in 2011 een lelieteelt die met PIAMV besmet was. In 2012 werd er maïs geteeld op dit perceel. Na de oogst van de maïs is grond voor onderzoek afgegraven.
- #4 Tiendeveen: Op dit perceel werd in 2012 een partij lelies geteeld. Toen in de zomer duidelijk werd dat het viruspercentage in deze partij te hoog was geworden, is de partij gefreesd en door de grond verwerkt. In november is de grond van dit perceel afgegraven voor nader onderzoek.
- #6 Oostrum: Dit is het enige perceel waar in 2012 TVX-besmette lelies zijn geteeld. Op de overige percelen waren de lelies besmet met PIAMV
- #8 Potgrond. In dit onderdeel van het onderzoek, maar ook in andere onderdelen van het onderzoek is de virusvrij getoetste partij lelies geteeld op potgrond. In totaal zijn er voor vier verschillende teelten vier batches potgrond gebruikt. Op basis van de verkregen resultaten was het belangrijk dat resultaten van deze verschillende teelten gecombineerd en vergeleken werden.
- Als negende grondsoort is grond van de proeftuin in Lisse gebruikt. De afgegraven grond is afkomstig van een deel van de proeftuin waar afgelopen jaren geen lelieteelt heeft plaatsgevonden.

Er zijn drie verschillende behandelingen met de grond uitgevoerd:

- A. Teelt van virusvrije lelies op hergebruikte grond, er is geen aanvullende virusbron aangeplant.
- B. Teelt van virusvrije lelies op hergebruikte grond, aangevuld met 1/3 extra virusplanten.
- C. Teelt van virusvrije lelies op hergebruikte grond, gedurende 10 weken is virussap aan de grond toegevoegd.

Tijdens de teelt groeide er spontaan diverse soorten onkruid op grond afkomstig van praktijkpercelen. De aanwezigheid van PIAMV en TVX in deze onkruiden is in detail bestudeerd.

Dit onderzoek is beschreven in Hoofdstuk 9 (Waardplantenreeks). Deze resultaten suggereerden al tijdens de teelt van de lelies dat er infectie vanuit de bodem op kon treden.

Uit eerder onderzoek is bekend geworden dat bij het optreden van een infectie vanuit de bodem, de nieuwe infectie pas na het rooien met PCR-diagnostiek op een schubmonster is te bepalen. Daarom is aansluitend op het rooien de aanwezigheid van PIAMV met een TaqMAN PCR-toets voor PIAMV, respectievelijk TVX bepaald met mengmonsters van 5 schubben. Een serie van 120 bollen per grondsoort resulteerde in 24 PCR-analyses op 24x5 schubben. Op basis van de PCR-resultaten kon een infectiepercentage per behandeling bepaald worden. De resultaten zijn samengevat in Tabel 13.

Tabel 13. Risico's op infectie bij teelt op grond met een geschiedenis van lelieteelt besmet met PIAMV of TVX. Een virusvrij getoetste partij (LA-type) is geteeld op grond van diverse herkomsten. Bij behandeling A heeft normale teelt plaatsgevonden zonder aanvullende virusbron in de grond. Bij behandeling B was er tijdens de teelt per twee virusvrij getoetste lelies één PIAMV-besmette leliebol aanwezig. Bij behandeling C heeft normale teelt plaatsgevonden waarbij gedurende 10 weken wekelijks plantensap van PIAMV-besmette lelies werd aangegoten. Het viruspercentage is bepaald door middel van PCR-analyse op schubben van gerooide bollen.

	Behandeling	Herkomst grond	Teelt geschiedenis	% Infectie	Virus
A	Op elke grond zijn 120 bollen van een getoetst virusvrije partij geteeld. Tijdens de teelt wordt er geen onkruidbeheersing uitgevoerd. Er wordt geen aanvullende virusbron aangeplant	#1 - Westerbork (Esgrond)	2012: lelieteelt met hoog% PIAMV	8%	PIAMV
		#2 - Dwingeloo	2012: lelieteelt met ±75% PIAMV	1%	PIAMV
		#3 - Tiendeveen-11	2011: lelieteelt met ±25% PIAMV 2012: maïs	6%	PIAMV
		#4 - Tiendeveen-12	2012: lelieteelt met hoog% PIAMV, in de zomer al gefreesd	1%	PIAMV
		#5 - Julianadorp (Duinzand)	2012: lelieteelt met ±75% PIAMV	1%	PIAMV
		#6 - Oostrum (Dekzand)	2012: lelieteelt met hoog% TVX	0%	TVX
		#7 - Hasselt	2012: lelieteelt met hoog% PIAMV	3%	PIAMV
		#8 – potgrond – batch a	Verse potgrond	0%	PIAMV
		#8 – potgrond – batch b	Verse potgrond	3%	PIAMV
		#8 – potgrond – batch c	Verse potgrond	0%	PIAMV
#8 – potgrond – batch d	Verse potgrond	0%	PIAMV		
#9 - zandgrond PPO	Bollenland zonder teelt van lelies	1%	PIAMV		
	Behandeling	Herkomst grond	Teelt geschiedenis	% Infectie	Virus
B	Op elke grond zijn 64 bollen van een getoetst virusvrije partij geteeld. Per kist waren aanvullend 33% PIAMV bollen aanwezig	#1 - Westerbork (Esgrond)	2012: lelieteelt met hoog% PIAMV	2%	PIAMV
		#4 - Tiendeveen-12	2012: lelieteelt met hoog% PIAMV, in de zomer al gefreesd	0%	PIAMV
		#5 - Julianadorp (Duinzand)	2012: lelieteelt met ±75% PIAMV	2%	PIAMV
		#6 - Oostrum (Dekzand)	2012: lelieteelt met hoog% TVX	2%	PIAMV
		#8 – potgrond – batch b	Verse potgrond	0%	PIAMV
	Behandeling	Herkomst grond	Teelt geschiedenis	% Infectie	Virus
C	Op elke grond zijn 64 bollen van een getoetst virusvrije partij geteeld. Gedurende 10 weken is virussap aan de grond toegevoegd	#1 - Westerbork (Esgrond)	2012: lelieteelt met hoog% PIAMV	0%	PIAMV
		#4 - Tiendeveen-12	2012: lelieteelt met hoog% PIAMV, in de zomer al gefreesd	0%	PIAMV
		#5 - Julianadorp (Duinzand)	2012: lelieteelt met ±75% PIAMV	0%	PIAMV
		#6 - Oostrum (Dekzand)	2012: lelieteelt met hoog% TVX	0%	PIAMV
		#8 – potgrond – batch b	Verse potgrond	1%	PIAMV

Behandeling A. Teelt van virusvrije lelies op hergebruikte grond, er is geen aanvullende virusbron aangeplant.

Bij de teelt van virusvrije lelies op diverse grond werd op basis van de analyse van schubben verschillende percentages infectie waargenomen. De infecties die opgetreden hebben, varieerden van 0% tot 8%. Alleen lelies geteeld op grond met een TVX-lijegeschiedenis bleven volledig vrij van virus. Bij de overige 6 locaties met een PIAMV-lijie werd 1%, 3%, 6% of 8% infectie met PIAMV waargenomen. De virusvrij aangeplante partij werd in dit geval als virusbesmette partij gerooid.

Met name infectiepercentages hoger dan 1% zijn zorgelijk.

Het is op basis van de analyse van de bodem- en nematodensamenstelling niet te achterhalen wat de reden is waarom bij grond #1 en #3 relatief veel infectie heeft plaatsgevonden (8%, resp. 6%). Het valt op dat bij grond #1 relatief veel vrijlevende wortelaaltjes aanwezig waren (Bijlage 3). Ook waren deze vrijlevende aaltjes bij grond #3 in ruime mate aanwezig, maar een stuk lager dan bij grond #1. In eerder onderzoek is betrokkenheid van aaltjes niet aannemelijk gevonden. In het wetenschappelijk onderzoek zijn vrijlevende *Pratylenchus* aaltjes (nog) niet in verband gebracht met virusoverdracht.

De vondst van 6% infectie bij grond #3 is opmerkelijk. Op dit perceel werd ruim een jaar voor dit onderzoek PIAMV-besmette lelies geteeld. In 2012 is er op dit perceel maïs geteeld. Anderhalf jaar na het rooien van de PIAMV-besmette lelies, treedt er nu infectie vanuit de bodem op. Inmiddels is bekend geworden dat maïs een waardplant is voor PIAMV en TVX. Het is niet uit te sluiten dat de maïsteelt in 2012 vanuit de besmet is geraakt met PIAMV afkomstig van de lelieteelt in 2011. De potentieel met PIAMV besmette maïs is vervolgens de virusbron geworden voor de lelieteelt uit dit onderzoek. Deze resultaten zouden een aanwijzing kunnen zijn dat virusreservoirs in alternatieve waardplanten kunnen ontstaan en dat deze potentiële virusreservoirs bijdragen aan langdurige besmettelijkheid van een perceel. Voor een duurzame en virusvrije teelt van lelie-uitgangsmateriaal is het van groot belang te onderzoeken wat voor virusreservoirs kunnen ontstaan na een teelt van PIAMV-/TVX-besmette lelies en welke risico's deze opleveren wanneer er opnieuw lelie op een dergelijk perceel wordt geteeld. Nog belangrijker is de ontwikkeling van methoden of strategieën waarop aanleg van deze potentiële virusreservoirs voorkomen kunnen worden.

Er zijn twee type controles betrokken bij dit onderzoek (teelt op potgrond en teelt op grond van proeftuin PPO). Bij beide controles zijn opvallende zaken te melden.

Potgrond als controle. Bij dit onderdeel is potgrond 'batch b' gebruikt voor opplant van 120 lelies van een virusvrij getoetste partij lelies. Opvallend was dat 3% infectie in de bollen werd waargenomen. Voor de teelt werden kisten gebruikt die anderhalf uur bij 70°C waren gekookt. Bij deze temperatuur moet een eventuele aanwezigheid van PIAMV volledig zijn afgedood. Daarnaast werden de kisten los van de ondergrond geteeld met worteldoek en ondoorlatend plastic op de ondergrond. Doorworteling naar de ondergrond werd hierdoor volledig voorkomen. Daarnaast stonden kisten van verschillende behandelingen vergenoeg uit elkaar om zodat onderling contact tussen planten en wortels niet plaats kon vinden.

Toch werd verrassend 3% besmetting aangetoond. Dezelfde partij is ook in drie andere onderzoeksonderdelen op potgrond geteeld waarbij de bollen/schubben uiteindelijk ook met PCR-diagnostiek zijn onderzocht. In deze drie andere teelten zijn andere batches (leveranties) potgrond gebruikt. In deze drie andere gevallen bleven de geogste bollen na een volledige teelt wel vrij van PIAMV.

Suggesteren deze resultaten dan dat er infectie vanuit potgrond kan optreden? Dit is helaas nog onbekend, al is bij onderzoek met de vangplanten vogelmuur en *Arabidopsis* ook onverwachte (onverklaarbare) infectie vanuit potgrond waargenomen. Het is niet mogelijk geweest om te achterhalen of de gebruikte potgrond 'batch b' inderdaad de bron voor infecties is geweest.

De gebruikte potgrond is samengesteld uit o.a. baltische veen, turf en boomschors van *Pinus pinaster*. Zowel veen als turf zijn 'oude' verteerde plantenresten. Het is niet aannemelijk dat dit deze componenten een bron voor virussen is. Wanneer de schors afkomstig is vanuit Portugal dan wordt deze vanwege potentiële aanwezigheid van schadelijke aaltjes verplicht gestoomd. Daarmee is de aanwezigheid van besmettelijke virusdeeltjes niet aannemelijk. Wanneer de schors afkomstig is van bijv. Spanje, dan wordt er ongestoomde schors verwerkt. Het is volledig onduidelijk of *Pinus* waardplant voor PIAMV is, en of besmette gewasresten in potgrond een risico vormen voor een virusvrije teelt. Alertheid en overleg tussen ketenpartijen is echter op z'n minst gewenst.

Grond Proeftuin Lisse als controle. Op deze grond heeft de laatste jaren geen lelieteelt plaatsgevonden. Toch werd 1% infectie met PIAMV waargenomen. Het is onduidelijk hoe deze infectie vanuit deze grond kan komen. Het is onaannemelijk dat de infectie al in de gebruikte partij aanwezig was. De gebruikte partij LA-lijes was als getoetst virusvrij aangekocht. Voorafgaand aan dit onderzoek zijn 240 bollen met een PCR-10 toets volledig negatief getoetst. Ook zijn 240 bollen voorafgaand aan dit onderzoek geteeld in verse potgrond, in schone kisten en los van de ondergrond.

ELISA-analyse na de bloei toonde afwezigheid van PIAMV aan. Een aanvullende ELISA-analyse na 5 maanden teelt was tevens volledig negatief voor PIAMV.

Het is onduidelijk of het onkruid dat voorafgaand aan dit onderzoek op dit perceel heeft gegroeid, mogelijk besmet was met PIAMV. Het onkruid dat tijdens de teelt van dit onderzoek spontaan opkwam in de kisten is in ieder geval met PCR negatief getoetst voor PIAMV.

Teelt van virusvrije lelies op hergebruikte grond.

Behandeling B: aangevuld met 1/3 extra virusplanten. *Met deze behandeling werd onderzocht of er een relatie is tussen de grondsoort en de mate van virusoverdracht via de grond bij aanwezigheid van een virusbron tijdens de teelt.*

Behandeling C: gedurende 10 weken virussap aan de grond toegevoegd. *Met deze behandeling werd onderzocht of er een relatie is tussen de grondsoort en de mate van virusoverdracht via de grond bij aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in de bodem tijdens de teelt.*

Bij hergebruik van grond afkomstig van een virusbesmette lelieteelt werd bij diverse typen grond infectie met PIAMV, resp. TVX waargenomen. De infectie percentages waren doorgaans laag (1%-3%) en op twee gronden werd een infectie met 6%, resp. 8% waargenomen. Bij onderdeel B en C is tijdens de teelt op deze grond een aanvullende virusbron toegevoegd in de vorm van PIAMV-besmette lelies (behandeling B) en een aanvullende virusbron als vrije virusdeeltjes in de bodem (behandeling C).

In Tabel 14 zijn de resultaten van behandeling B en C weergegeven waaraan de resultaten van behandeling A met dezelfde grond zijn toegevoegd. Dit zijn feitelijk dezelfde resultaten als weergegeven in Tabel 13, maar dan gesorteerd op grond in plaats van behandeling. Behandeling B en C zijn bij 4 verschillende grondherkomsten en potgrond toegepast. Per behandeling/grondtype zijn 64 virusvrije lelies aangeplant.

Tabel 14. Risico's op infectie bij teelt op grond met een geschiedenis van lelieteelt besmet met PIAMV of TVX. Een virusvrij getoetste partij (LA-type) is geteeld op grond van diverse herkomsten. Bij behandeling A heeft normale teelt plaatsgevonden zonder aanvullende virusbron in de grond. Bij behandeling B was er tijdens de teelt per twee virusvrij getoetste lelies één PIAMV-besmette leliebol aanwezig. Bij behandeling C heeft normale teelt plaatsgevonden waarbij gedurende 10 weken wekelijks plantensap van PIAMV-besmette lelies werd aangegoten. Het viruspercentage is bepaald door middel van PCR-analyse op schubben van gerooide bollen. Dit zijn dezelfde resultaten als weergegeven in Tabel 13, maar dan gesorteerd op grond in plaats van behandeling.

Grond	Behandeling	Aanvullende virusbron	Aantal virusvrij opgeplante lelies	infectie percentage (PIAMV)
#1-Westerbork (Esgrond)	A	-	120	8.3%
	B	bollen	64	1.6%
	C	virussap	64	0.0%
#4-Tiendeveen-12	A	-	120	0.8%
	B	bollen	64	0.0%
	C	virussap	64	0.0%
#5-Julianadorp (Duinzand)	A	-	120	0.0%
	B	bollen	64	1.6%
	C	virussap	64	0.0%
#6-Oostrum (Dekzand)	A	-	120	0.0%
	B	bollen	64	1.6%
	C	virussap	64	0.0%
#8-potgrond (batch b)	A	-	120	2.5%
	B	bollen	64	0.0%
	C	virussap	64	1.6%

Bij behandeling B werd in drie gevallen een infectie van 1.6% waargenomen. Bij grond uit Tiendeveen en potgrond werd in geen infectie met PIAMV waargenomen. De waargenomen infectiepercentages zijn erg laag en zijn statistisch vergelijkbaar met de waargenomen infecties wanneer er geen infectiebron in de kist was aangeplant (behandeling A).

Bij de behandeling waarbij de verschillende grondsoorten werden aangegoten met vrije virusdeeltjes werd alleen bij de behandeling met potgrond 1.6% infectie waargenomen. Dit infectiepercentage is significant gelijk aan de waargenomen infectie bij behandeling A (2.5%). De lelies uit de overige behandelingen bleven virusvrij. Ook deze resultaten zijn laag en zijn statistisch vergelijkbaar met de waargenomen infecties wanneer er geen infectiebron in de kist was aangeplant (behandeling A). Het is opvallend dat in deze proef nagenoeg geen infectie is waargenomen terwijl bij onderzoek met vangplanten zoals *Arabidopsis* aangieten van virussap leidde tot efficiënte infectie (Tabel 12).

6.4 Overige praktijkervaringen

In 2013 zijn er met twee contacten vanuit de praktijk kleine proeven uitgevoerd die betrekken hebben op PIAMV- en TVX besmetting via de bodem.

6.4.1 Hergebruik kasgrond

In een kas heeft op de eerste anderhalve meter van een bed in het voorjaar van 2013 PIAMV-besmette lelies gestaan (100% infectie). De lelies die daarachter op dit bed stonden waren visueel vrij van virus. Na het rooien van de lelies zijn op de eerste 4 a 5 meter van dit bed getoetst virusvrije lelies geplant (LA-type, dezelfde partij als gebruikt in dit onderzoek).

Na een volledig teeltseizoen zijn de leliebollen gerooid waarbij per halve meter de bollen in een apart netzakje zijn gedaan. Per halve meter zijn schubben van deze bollen bemonsterd voor PCR-analyse. Per halve meter zijn 4 mengmonsters van 6-8 schubben gemaakt.

In de eerste anderhalve meter (de plek waar de 100% besmette lelies hebben gestaan) is bij 3 bollen infectie met PIAMV aangetoond (verdeeld over de 1,5 meter). In de bollen die in de overige 7 zakken aanwezig waren (de aansluitende ca 3.5 meter van dit bed) zijn 9 geïnfecteerde bollen aangetroffen. Er heeft dus infectie vanuit de bodem opgetreden en de infectie vanuit de bodem heeft zich niet beperkt tot de eerste anderhalve meter waar oorspronkelijk de virusbesmette lelies hebben gestaan.

Het is onbekend wat de echte virusstatus is geweest van de overige partijen lelie die op dit bed hebben gestaan. Visueel vrij van PIAMV-symptomen wil niet zeggen dat er echt geen PIAMV-aanwezig is. PIAMV kan ook symptomeloos voorkomen.

6.4.2 Kistenproef met PIAMV

Een kistenproef is uitgevoerd waarbij per behandeling vier kisten met per kist acht getoetst virusvrije lelies zijn aangeplant (LA-type, dezelfde partij als gebruikt in dit onderzoek). De acht lelies per kist stonden aan de buitenrijen van de kist. Op de middenrij van de kist zijn vier PIAMV-zieke bollen geplant (OR-type). Naast een controle is in twee behandelingen een bodemfungicide toegepast. In twee andere behandelingen zijn biologische bodemverbeteraars toegevoegd (Tabel 15). De grond die voor dit onderzoek is gebruikt, is afkomstig uit Oostrum (Dekzand) (dezelfde grond als #6, Tabel 11). De voorgaande teelt was lelie met een hoge besmetting met TVX.

De resultaten in Tabel 15 laten zien dat er in de controle slechts beperkte mate van infectie heeft opgetreden; één zwak positieve plant voor PIAMV en een zwak-positieve plant voor TVX. Infectie via de bodem heeft opgetreden, maar in beperkte mate. Bij aanwezigheid van middelen tegen *Pythium*, *Phytophthora* en *Rhizoctonia* werd bij meer planten een infectie met PIAMV waargenomen (behandeling 2 en 3). De mate van infectie met TVX is bij deze behandelingen gelijk aan de mate van infectie bij de controle.

Wanneer een bodemverbeteraar werd toegepast (behandelingen 4 en 5), werden vergelijkbare resultaten verkregen als met toepassing van bodemfungiciden.

Tabel 15. Risico's op infectie bij teelt op grond met een geschiedenis van lelieteelt besmet met TVX en aanvullend aanplant van PIAMV-besmette lelies.

Behandeling	Omschrijving	Infectie met PIAMV (aantal planten van de 40)		Infectie met TVX (aantal planten van de 40)	
		Positief Cq<32	Zwak Positief 32>Cq>38	Positief Cq<32	Zwak Positief 32>Cq>38
1. Controle	-	0	1	0	1
2. Ridomil gold (1.5l/ha)	Preventief en curatief in de bestrijding van Pythium en Phytophthora doorgaans betere beworteling bij lelie	2	0	0	1
3. Amistar (10l/ha)	Middel tegen Rhizoctonia	3	0	0	1
4. Vivisol (1000kg/ha)	Bodemverbeteraar op basis van druivenpittenkoek + suikers	2	0	0	1
5. BioFeed VAST (350kg/ha)	Bodemverbeteraar op basis van plantaardige grondstoffen, inclusief zeewier delfstoffen toegestaan in de biologische landbouw	2	0	0	1

Deze mate van infectie waargenomen in dit onderdeel bij de controle (behandeling 1) is enigszins vergelijkbaar met de mate van infectie vanuit de bodem beschreven in §6.3.3, Behandeling b, grond #6. Bij toepassing van bodemfungicides en bodemverbeteraars worden voor PIAMV meer virusbesmette lelies aangetroffen. Dit verschil is echter niet significant. Het valt echter op dat bij de controle slechts 1 zwak-positief toetsresultaat is verkregen, en dat bij behandeling 2-5 meerdere planten duidelijk positief toetsen. De virusconcentratie in deze planten is aanzienlijk hoger dan in de viruspositieve plant van de controle.

Bodemfungicides onderdrukken de bodemschimmels. Op basis van deze resultaten is het speculeren of dit tot gevolg heeft dat er een groter risico op infectie met PIAMV vanuit de bodem is. Bodemverbeters hebben met betrekking tot lelie tot gevolg dat het wortelstelsel groter zou zijn (kwantitatieve resultaten ontbreken). Op basis van deze resultaten is het speculeren of een groter wortelstelsel tot gevolg heeft dat er een groter risico op infectie met PIAMV vanuit de bodem is. Dit klinkt echter wel aannemelijk.

De infectie met TVX vanuit deze bodem is van beperkte omvang. Echter, een virusvrije partij blijft niet virusvrij. De behandelingen van deze proef hebben geen invloed gehad op de mate van infectie met TVX.

6.5 Analyse van resultaten

In eerder onderzoek werd bij aanplant van een virusbron naast een virusvrije plant een relatief efficiënte mate van virusverspreiding via de bodem waargenomen (De Kock e.a., 2013). Dit betrof onderzoek in potten.

Bij aanplant van twee viruszieke bollen in een 5 literpot en één virusvrije lelie, werd 36% infectie bij zandgrond waargenomen en 98% infectie bij teelt op potgrond (De Kock e.a., 2013). In dit onderzoek is gebruikt gemaakt van kistenteelt waarbij één viruszieke plant en twee virusvrije planten zijn aangeplant. Het is onduidelijk waarom in deze proefopzet de waargenomen virusverspreiding via de bodem relatief beperkt is ten opzichte van eerder uitgevoerd onderzoek. De virusvrije cultivar is het zelfde als in het vorige onderzoek. De virusbron is in dit onderzoek echter een andere cultivar. Mogelijk dat cultivarverschillen er toe bijgedragen aan verschillende mate van virusdruk tijdens de teelt.

Deze hypothese kan aannemelijk zijn omdat bij onderzoek naar infectie tijdens dompelen ook veel lagere virusinfecties werden waargenomen dan in eerder uitgevoerd onderzoek (De Kock e.a., 2013).

Het is een algemene ervaring dat de kwaliteit en kwantiteit van een virusbron voor een belangrijk deel bepalend is voor de resultaten. Bij eventueel vervolgonderzoek naar verspreidingsroutes van PIAMV en TVX is het daarom belangrijk de keuze te hebben uit meerdere viruszieke partijen waarbij de virusconcentraties en eventuele andere fysiologische parameters (bijvoorbeeld hardheid bol, omvang wortelpruik, uitscheiding van virus) bepalend kunnen zijn voor het uiteindelijke resultaat.

Deze onvoorspelbaarheid van resultaten (met name van de positieve controles) in dit onderzoek sluiten aan bij de ervaringen vanuit de praktijk met bodemgebonden virusverspreiding. Ook in de praktijk zijn er geluiden dat bij op voorhand verwachte risico's de uiteindelijke infectie mee valt. Daarentegen zijn er ook veel verrassingen waarbij infectie werd waargenomen terwijl dit op basis van uitgebreide risicoanalyse juist niet te verwachten was.

7 Ontsmetting van de bodem

7.1 Aanleiding en vraagstelling

Niet alleen tijdens teelt in vollegrond, maar ook tijdens teelt in de kas kan er vanuit de bodem een infectie met PIAMV optreden wanneer de voorgaande teelt besmet was met PIAMV. Voor bloemproductie zonder risico's op PIAMV-schade is het belangrijk om infectie vanuit de bodem te kunnen voorkomen. Stomen van grond is een gebruikelijke handeling om kasgrond tussentijds vrij te maken van ziektekiemen. Het is bekend dat PIAMV geïnactiveerd wordt door middel van hitte (> 65°C, minimaal 10 minuten) (De Kock e.a. 2013). Stomen van grond zou daarom een effectieve manier zijn om infecties vanuit de bodem vanuit een voorgaande teelt te voorkomen.

In dit onderdeel wordt onderzocht in hoeverre stomen effectief is om virusinfectie vanuit PIAMV-besmette kasgrond te voorkomen. Tevens zijn tools (trucjes) ontwikkeld waarmee indirect aanwijzingen verkregen worden of er effectief tegen PIAMV gestoomd wordt.

7.2 Werkwijze

Voor onderzoek naar effectief stomen is samengewerkt met vier bedrijven. Twee bedrijven passen vijzelstomen toe (bedrijf 1 en 2), de andere twee bedrijven gebruiken celstomen als methode om grond vrij van ziektekiemen te maken (bedrijf 3 en 4).

Voorafgaand aan het stomen is een besmetting met PIAMV in de kasgrond afkomstig van de vier bedrijven aangebracht. De manier waarop de virusbesmetting werd toegevoegd was afhankelijk van de manier van stomen:

Vijzelstomen: netzakjes met enkele viruszieke bollen zijn in de vijzel meegestuurd. Nadat deze netzakjes uit het vijzelstoomsysteem kwamen, zijn individuele schubben van de gestoomde bollen door de grond vermengd. Per kist werden de schubben van twee gestoomde bollen vermengd.

Celstomen: voorafgaand aan het stomen van kisten grond zijn per kist twee viruszieke bollen toegevoegd. Na het stomen zijn de schubben van deze gestoomde bollen door de grond vermengd. Bij bedrijf 2 is een extra behandeling toegevoegd waarbij de bollen eerst gepeld zijn voordat ze via de stoomvijzel zijn behandeld.

Naast teelt op gestoomde grond met gestoomde virusbollen zijn twee controles aan de proefopzet toegevoegd:

Controle 1: Niet-gestoomde schubben van PIAMV-besmette bollen zijn door gestoomde grond gemengd.

Controle 2: Niet-gestoomde schubben van PIAMV-besmette bollen zijn door niet-gestoomde grond gemengd.

Na het stomen is per bedrijf de gestoomde grond gebruikt voor de teelt van 100 getoetst virusvrije lelies (LA-type). De lelieteelt vond plaats in vooraf schone kisten die los van de ondergrond in een kas zijn geplaatst.

Tijdens het stomen waren dataloggers voor temperatuurregistratie aanwezig. Tevens zijn gestoomde viruszieke bollen gebruikt ELISA-analyse aan schubben aansluitend op het stomen. Hitte-geïnactiveerd PIAMV wordt niet meer gedetecteerd met ELISA. Daarnaast zijn capsules met plantensap van PIAMV-besmette lelies in de stoomvijzel meegestuurd of waren tijdens het celstomen aanwezig in de kratten met grond. Met ELISA is aansluitend op het stomen onderzocht of er in de capsules effectieve afdoding van PIAMV is geweest tijdens het stomen.

De virusvrij geplante lelies van Controle 1 zijn in maand 5 van de teelt met ELISA aan het blad getoetst.

De virusvrij geplante lelies van alle behandelingen zijn na 6 maanden teelt gerooid en met PCR aan de schub getoetst. Bij de PCR-analyse op schub vond plaats op mengmonsters van 5 schubben en is uitgevoerd door BQ Support.

7.3 Resultaten & Discussie

Tijdens het stomen in een vijzelstoomsysteem of een stoomcel waren dataloggers voor temperatuurregistratie aanwezig. De resultaten van deze temperatuurregistratie staan afgebeeld in Figuur 6. Bij bedrijf 1 (vijzelstomen) valt op dat zeven van de tien dataloggers enige tot geruime tijd boven de ingestelde temperatuur van 70°C aangeven. Er zijn twee dataloggers die een temperatuur geregistreerd hebben die de kritische temperatuur van 65°C bij lange na niet gehaald hebben (blauwe en rode lijn). Eén datalogger heeft een temperatuur geregistreerd die langzaam de 70°C heeft behaald. Tijdens het vijzelstomen bij deze ondernemer blijkt de temperatuur in de vijzel dus niet altijd de ingestelde temperatuur te behalen. Bij bedrijf 2 zijn de dataloggers helaas beschadigd tijdens het vijzelstomen waardoor data ontbreken. Bij bedrijf 3 en 4 (celstomen) werd door alle drie dataloggers voor langere tijd een hoge temperatuur geregistreerd die voldoende zou moeten zijn voor het effectief afdoden van PIAMV.

ELISA analyse aan de schubben van niet-gestoomde en gestoomde bollen die geïnfecteerd zijn met PIAMV kan een indicatie geven over de efficiëntie van stomen. Allereerst zijn individuele schubben van 20 bollen van een PIAMV-zieke partij per stuk met ELISA getoetst (Figuur 7A). Deze figuur geeft aan dat de concentratie PIAMV in een leliebol niet gelijkmatig is verdeeld. Met ELISA wordt PIAMV in gemiddeld 35% van de schubben gedetecteerd. In de overige 65% van de schubben is de concentratie PIAMV lager dan de detectiegrens van ELISA. Ook varieert de concentratie PIAMV tussen bollen. Er zijn bollen waar 65% van de schubben ELISA-positief zijn, maar er zijn ook bollen waarvan 0%, of slechts 5% of 10% van de schubben ELISA-positief is. Met nadruk wordt aangegeven dat deze partij voor 100% besmet is (bepaald m.b.t. bladtoets tijdens een teelt).

Wanneer schubben van gestoomde bollen met ELISA worden onderzocht, dan blijkt dat bij het vijzelstomen nog steeds ELISA-positieve schubben aanwezig zijn (Figuur 7B). Het percentage ELISA-positieve schubben is lager dan 35%, maar er zijn nog steeds relatief veel viruszieke schubben die een potentiële infectiebron kunnen vormen. Bij celstomen is ca. de helft van de schubben dermate beschadigd dat ELISA-analyse niet meer mogelijk is. Bij de overgebleven schubben is het percentage ELISA-positief lager, maar bij bedrijf 3 zijn er nog steeds ELISA-positieve schubben in de grond aanwezig. Bij bedrijf 4 lijkt het celstomen het meest effectief te zijn, slechts 1 van de schubben is zijn ELISA-positief.

Tijdens het stomen zijn capsules met plantensap van PIAMV-besmette lelies meegestuurd in de stoomvijzel of waren tijdens het celstomen aanwezig in de kratten. Met ELISA aansluitend op het stomen is onderzocht of er in de capsules effectieve afdoding van PIAMV is geweest tijdens het stomen:

- o Bedrijf 1 (vijzelstomen): 6 van de 10 capsules ELISA-positief
- o Bedrijf 2 (vijzelstomen): 3 van de 8 capsules ELISA-positief
- o Bedrijf 3 (celstomen): 0 van de 10 capsules ELISA-positief
- o Bedrijf 4 (celstomen): 0 van de 10 capsules ELISA-positief

Op basis van het onderzoek aan gestoomde virusgeïnfecteerde schubben en onderzoek aan viruscapsules zijn indirecte aanwijzingen verkregen die er op duiden dat vijzelstomen minder effectief is in het inactiveren van PIAMV dan celstomen.

Uiteindelijk gaat het in dit onderzoek om de teelt van virusvrije lelies en niet om indirecte aanwijzingen voor effectief stomen. Getoetst virusvrije lelies zijn geteeld op kisten met grond van de diverse behandelingen. Vijf maanden na het planten zijn de lelies aan het blad getoetst met ELISA. In geen van de behandelingen werd PIAMV met de bladtoets aangetoond, behalve bij Controle 2. Bij Controle 2 was één van de 95 getoetst planten ELISA-positief.

Het is bekend dat bij infectie vanuit de bodem PIAMV tijdens het eerste teeltseizoen niet of nauwelijks bovengronds detecteerbaar is. Daarom zijn de bollen na 6 maanden teelt in de kas gerooid en is eventuele infectie met PIAMV via een PCR-toets op de schubben onderzocht. De analyse op mengmonsters van 5 schubben resulteerde in Cq-waarden. Een Cq-waarde lager dan 38 werd beschouwd als een infectie met PIAMV. Deze PCR-analyse op schubben heeft geresulteerd in Figuur 8A. Bij Controle 1 en Controle 2 heeft duidelijk infectie vanuit de bodem plaatsgevonden. Wanneer schubben van viruszieke bollen in gestoomde grond aanwezig waren, dan werd een infectie van 16.7% waargenomen (Controle 1).

Aanwezigheid van viruszieke schubben in ongestoomde grond resulteerde in een infectie van 6.9% (Controle 2). Deze resultaten suggereren opnieuw dat in gestoomde grond waarin elk bodemleven is afgedood, meer risico op bodemgebonden verspreiding aanwezig is, dan in ongestoomde grond. Tevens tonen deze resultaten aan dat een infectie vanuit de bodem wel met PCR aantoonbaar is in de schubben, maar niet met ELISA in het blad. Deze lokale aanwezigheid van PIAMV tijdens de teelt, heeft impact op de informatiewaarde van de ELISA bladtoets die tijdens de kwaliteitskeuring wordt toegepast.

Wanneer de virusbron gestoomd werd, dan werd er minder virusinfectie waargenomen dan in de controles (Figuur 8A). Het vijzelstomen op bedrijf 1 was echter onvoldoende effectief en resulteerde in een infectie van 4.9%. Onderzoek met viruscapsules en ELISA-analyse op de gestoomde schubben zelf suggereerde ook al deze beperkte effectiviteit. Bij bedrijf 2, 3 en 4 was het stomen nagenoeg volledig effectief. Echter, er vond nog steeds een beperkte infectie plaats (1% infectie), de partij bleef niet virusvrij. In geen van deze gevallen werd deze infectie tijdens de teelt met ELISA aan het blad aangetoond.

Tijdens de teelt is ook de opslag in kaart gebracht (uitgroei van lelieplantjes uit schubben, Figuur 8B). Tevens is met ELISA bepaald of er in deze jonge plantjes PIAMV aanwezig was (Figuur 8C). De kleinste plantjes van de opslag waren te klein voor onderzoek met ELISA.

Bij niet gestoomde grond ontstaat er relatief veel opslag. Bij Controle 1 kon ook nog relatief frequent PIAMV worden aangetoond. Waarom bij Controle 2 veel minder vaak PIAMV in de opslag werd aangetoond, is onduidelijk. Er werd verwacht dat in gestoomde grond geen opslag meer zou optreden; de schubben zouden immers volledig afgedood zijn waardoor er geen nieuw lelieplantje meer kan uitgroeien. Het is opvallend dat bij grond gestoomd bij bedrijf 1, 2 en 3 nog steeds opslag optrad. Dit is een aanwijzing dat het stomen onvoldoende effectief is geweest en dat lelieschubben relatief hoge temperaturen kunnen doorstaan. Bij bedrijf 1 en 2 kon in een klein gedeelte van de opslag met ELISA PIAMV worden aangetoond. Deze virusbesmette opslag functioneert daarmee als 'levende' infectiebron tijdens een teelt. De infectiebron is echter afkomstig vanuit de voorgaande teelt.

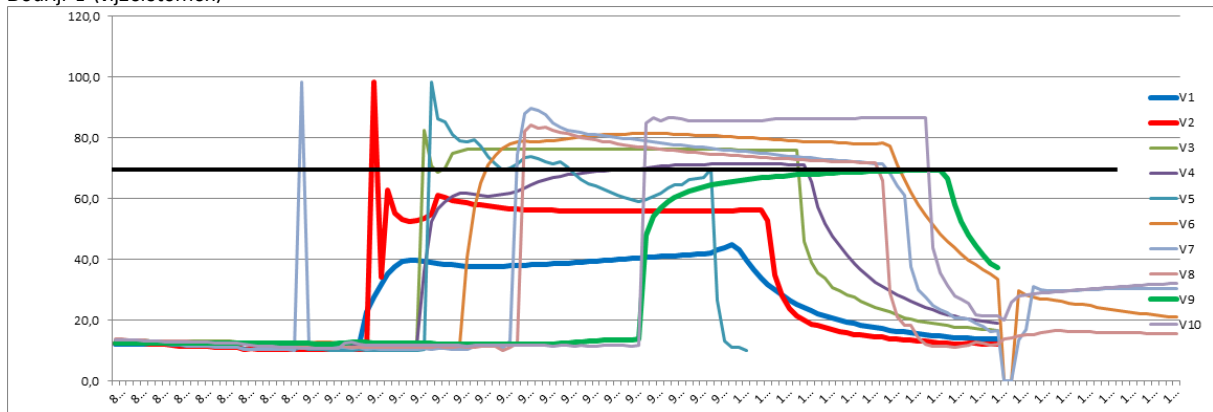
Er is geen directe correlatie te maken tussen de hoeveelheid opslag, de hoeveelheid ELISA-positieve opslag en de waargenomen infectie in de lelies zelf. Echter, de hoeveelheid opslag is opnieuw een indicatie voor de effectiviteit van stomen. De aanwezigheid van PIAMV-besmette opslag geeft in ieder geval aan dat er ondanks stomen nog steeds een levende virusbron tijdens de teelt aanwezig kan zijn.

Het is bekend dat bij infectie vanuit de bodem PIAMV tijdens het eerste teeltseizoen niet of nauwelijks bovengronds detecteerbaar is. In dit geval zal de recent geïnfecteerde lelie tijdens de teelt ook vrij van PIAMV-symptomen blijven. De broei heeft daarom relatief weinig schade als gevolg van bodemgebonden infectie. Echter, wanneer infectie vanuit de bodem optreedt bij een lelie die al besmet is met LMoV of LSV, dan verspreidt PIAMV zich tijdens het teeltseizoen wel meteen door de hele plant en is de schade aanzienlijk. Daarom is het voor de broei nog steeds van belang om grond afkomstig van een PIAMV-besmette teelt te stomen. Effectief stomen is echter minder eenvoudig dat aanvankelijk gedacht.

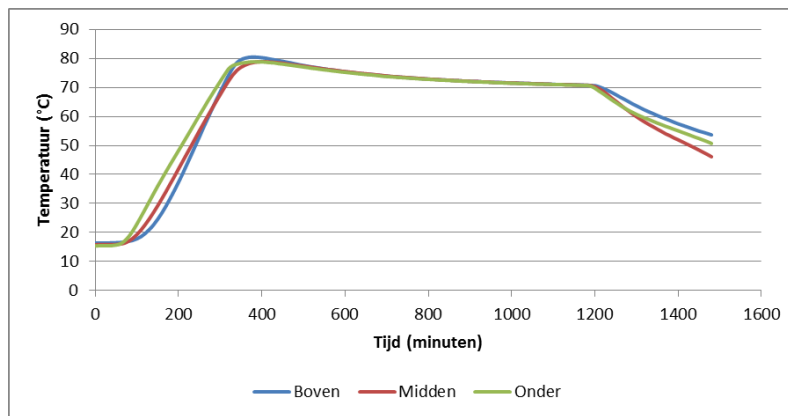
Bij de teelt van virusvrije weefselkweekplanten of virusvrije schubbenteelt moet men afvragen of men daarvoor al dan niet gestoomde grond van een eerdere lieweteelt wilt hergebruiken. Nu blijkt dat effectief stomen lastig is, is het werken met verse grond zonder lelie-geschiedenis aan te bevelen. Virusvrije weefselkweekplanten of virusvrije schubbenteelt moeten immers absoluut virusvrij blijven om hun marktwaarde te behouden.

Het is opvallend dat de viruszieke schubben in gestoomde grond tot meer infectie leidt, dan de viruszieke schubben in ongestoomde, hergebruikte grond. Deze waarneming is eerder gedaan (De Kock e.a. 2012a). Het is een hypothese dat het bodemleven in de hergebruikte, niet-gestoomde grond er voor zorgt dat er minder bodemgebonden infectie met PIAMV optreedt.

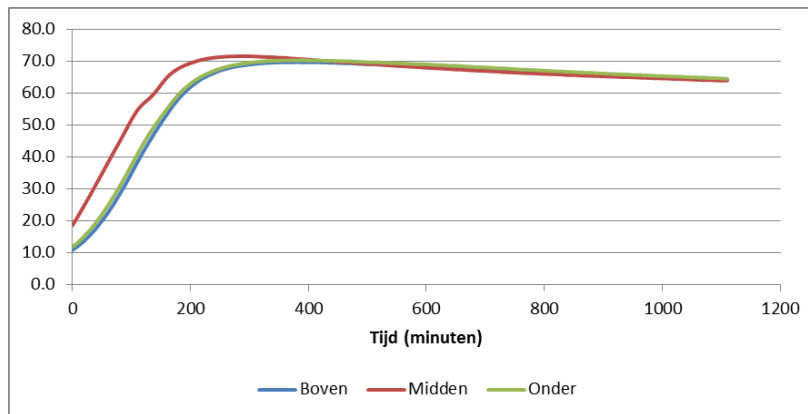
Bedrijf 1 (vijzelstomen)



Bedrijf 3 (celstomen)

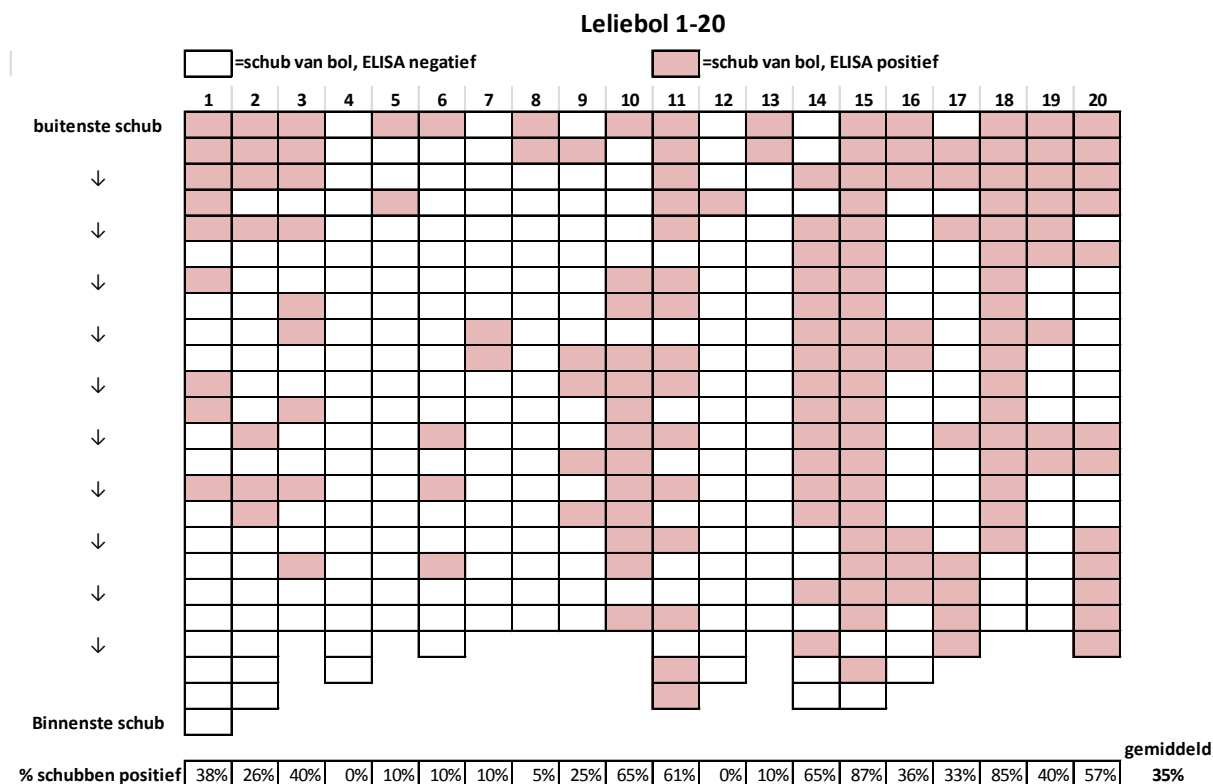


Bedrijf 4 (celstomen)



Figuur 6. Temperatuur geregistreerd door dataloggers tijdens het vijzel- en celstomen van grond. Bij bedrijf 2 zijn de dataloggers beschadigd tijdens het vijzelstomen waardoor data ontbreken. Bij het vijzelstomen (bedrijf 1) zijn 10 dataloggers apart door de vijzel gestuurd. Bij het celstomen zijn drie dataloggers in de cel geplaatst (boven, midden en onder in de stoomcel).

A.



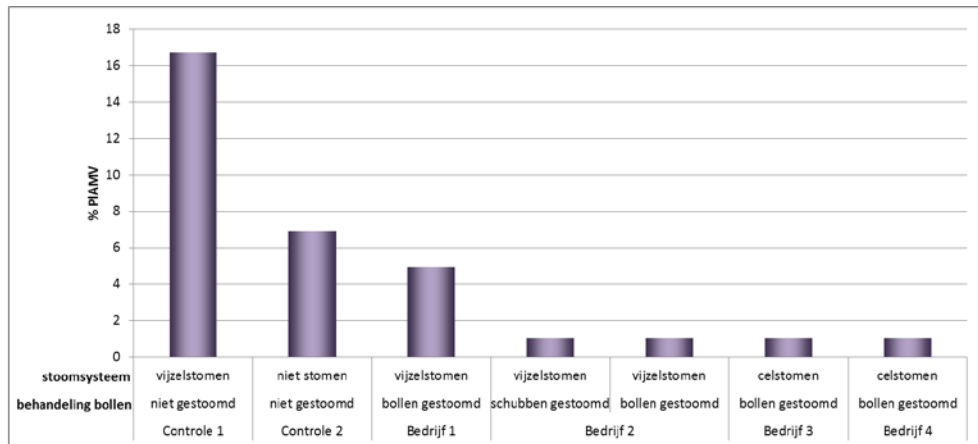
B.

Bedrijf	Aantal schubben getoetst	Aantal schubben ELISA-positief	% schubben positief
Bedrijf 1 (vijzelstomen)	112	29	26%
Bedrijf 2 (vijzelstomen)	102	7	7%
Bedrijf 3 (celstomen)	47 ¹	3	6%
Bedrijf 4 (celstomen)	53 ¹	1	2%

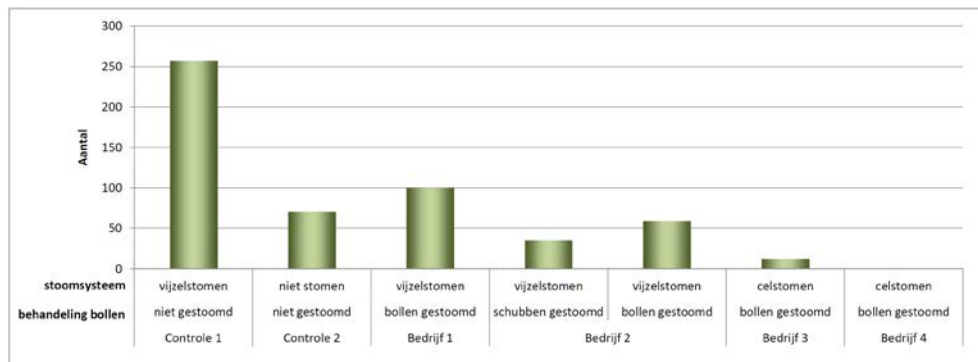
¹ Ongeveer de helft van de schubben was te ver vergaan door het stomen dat slechts de overige helft nog geschikt was voor ELISA-analyse.

Figuur 7. A. ELISA-analyse voor PIAMV voor schubben afkomstig van 20 leliebollen die besmet zijn met PIAMV. De 20 kolommen van links naar rechts komen overeen met de 20 leliebollen. De rijen komen overeen met individuele schubben per bol. Sommige bollen hebben meer schubben (langere rij) dan andere bollen (kortere rij). Het percentage ELISA-positieve schubben is onder aan een kolom weergegeven. **B.** ELISA-analyse van schubben afkomstig van gestoomde bollen.

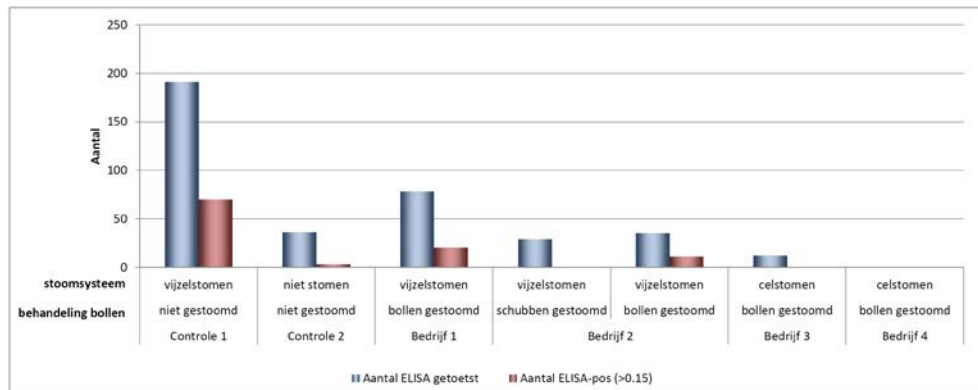
A.



B.



C.



Figuur 8. Effect van stomen van grond op voorkomen van infectie vanuit de bodem. **A.** Percentage PIAMV-besmetting na teelt op grond verrijkt met wel of niet gestoomde PIAMV-bollen. **B.** Aantal lelieplantjes als opslag tijdens de teelt op grond verrijkt met wel of niet gestoomde PIAMV-bollen. **C.** ELISA analyse op opslag tijdens de teelt op grond verrijkt met wel of niet gestoomde PIAMV-bollen.

8 Vergelijking resultaten van PCR-toetsen op schub- en wortelmonsters bij infectie vanuit de bodem

8.1 Materiaal en werkwijze

In Hoofdstuk 6 en 7 is het wel of niet optreden van een infectie met PIAMV vanuit de grond bepaald door middel van PCR-analyse op schubmonsters. De waargenomen Cq-waarden zijn doorgaans 40, hetgeen resulteert in de conclusie dat er in dit monster geen infectie met PIAMV is aangetroffen. Detectie van PIAMV bij een nieuwe infectie vanuit de bodem resulteerde in Cq-waarden tussen 20 en 38.

Infectie vanuit de bodem vindt zeer waarschijnlijk in de wortels plaats. Daarom wordt verwacht dat de detectiekans van PIAMV in de wortels groter zal zijn dan de detectiekans in een schubmonster. Vanuit de partij leliebollen afkomstig van het onderzoek naar effectief stomen zijn 9 series van 10 bollen geselecteerd voor aanvullend onderzoek met de PIAMV-TaqMAN PCR. De selectie is gebaseerd op PCR-resultaten van de eerste analyse op mengmonsters van 5 bollen. Diverse analyses zijn met de leliebollen uitgevoerd en de resultaten zijn Tabel 16 weergegeven:

- Negen series van 10 leliebollen zijn opnieuw aan de schub bemonsterd voor een PCR-analyse op twee mengmonsters van 5 schubben.
- Op basis van de verkregen Cq-waarde van de twee mengmonsters per serie van 10 bollen zijn de 5 bollen geselecteerd waarvan het mengmonster de laagste Cq-waarde had. In totaal zijn er 9x5 bollen geselecteerd.
- Van deze 9x5 bollen is opnieuw een schub bemonsterd. Tevens is er van elke bol een wortelmonster genomen. De aanwezigheid van PIAMV is in deze 9x5 schubmonsters en 9x5 wortelmonsters bepaald met de TaqMAN PCR-toets voor PIAMV.
- Alle PCR-toetsen zijn uitgevoerd door BQ Support

8.2 Resultaten en Discussie

Van de negen series van tien bollen zijn twee keer mengmonsters van vijf schubben gemaakt voor PCR-diagnostiek (kolom 1 en 2 van Tabel 16). In zeven van de negen series wordt in beide analyses bij één van de twee mengmonsters een Cq-waarde verkregen die lager is dan 38, een (zwak) positief resultaat. Bij de tweede analyse werd bij serie 8 en 9 in beide mengmonsters een Cq-waarde van 40 verkregen terwijl bij de eerste analyse Cq-waarden van 40/32 resp. 40/32 werden verkregen. In dit geval lijkt het erop dat in de eerste bemonstering/analyse wel viruszieke bollen zijn gedetecteerd en in de tweede bemonstering/analyse beide series als virusvrij zijn getoetst.

In de geselecteerde series van tien bollen werd in eerste bemonstering/analyse bij één van de twee mengmonsters van vijf bollen een Cq-waarde lager dan 40 verkregen. In de tweede bemonstering/analyse werden bij dezelfde partijen bollen bij serie 4, 5, 6 en 7 bij beide mengmonsters van 5 schubben Cq-waarden lager dan 40 verkregen. Het kan goed zijn dat er in een dergelijke serie van tien bollen minimaal twee bollen virusziek zijn en dat door toeval deze viruszieke bollen bij de eerste analyse in hetzelfde mengmonster terecht zijn gekomen, terwijl deze twee viruszieke bollen bij de tweede analyse verdeeld waren over de twee mengmonsters van 5.

Op basis van de resultaten van de tweede bemonstering/analyse zijn per serie de vijf bollen geselecteerd die behoorden bij het mengmonster dat een (zwak) positief PCR-resultaat had opgeleverd. Deze bollen (in totaal 45) zijn voor de derde keer aan de schub bemonsterd voor PCR-diagnostiek. Tevens zijn van deze 45 bollen wortelmonsters voor PCR-diagnostiek bemonsterd. De Cq-waarden en de score van deze 2x 45 PCRs staan vermeld in Tabel 16.

Van de Cq-waarden afkomstig van individuele schubben is een gemiddelde berekend dat vergeleken kan worden met de Cq-waarden afkomstig van het mengmonster van schubben afkomstig van dezelfde bollen.

Bij de 5 bollen uit series 1, 3, 4 en 6 werden enigszins vergelijkbare Cq-waarden verkregen die tot vergelijkbare PCR-scores zouden leiden. Bij de analyse van individuele bollen van serie 2 en 5 werden uitsluitend negatieve toetsresultaten verkregen (Cq=40) terwijl het mengmonster van dezelfde bollen resulteerde in Cq=36. Tegenovergesteld resulteerde de analyse van individuele bollen van serie 9 wel in twee (zwak) positieve toetsresultaten terwijl het mengmonster van dezelfde bollen resulteerde in Cq=40. De reproduceerbaarheid van het toetsresultaat bij deze lage concentraties PIAMV in schubben is niet optimaal.

Van 45 bollen is de aanwezigheid van PIAMV in zowel het schubmonster als het wortelmonster bepaald. Vergelijking van beide datasets resulteert in een aantal opvallende zaken (Tabel 16). Bij de analyse van wortelmonsters werd veel frequenter virus aangetoond dan in het bijbehorende schubmonster. Bij 17 schubmonsters die negatief getoetst zijn (Cq=40) werd in het wortelmonster wel virus aangetoond:

- Bij 5 wortelmonsters was de Cq-waarde lager dan 32, een duidelijk positief toetsresultaat.
- Bij 12 wortelmonsters lag de Cq-waarde tussen de 32 en 38, een zwak-positief toetsresultaat.
- Bij 3 bollen was de schub zwak positief getoetst (Cq=36) en de bijbehorende wortel negatief (Cq=40).

Vergelijking van Cq-waarden van de 45 schub- en wortelmonsters resulteerde in de volgende inzichten:

- Bij 3 van de 45 bollen resulteerde het wortelmonsters in een Cq-waarde die ca. 4 eenheden lager is. In dit geval zijn de wortels negatief getoetst.
- Bij 20 van de 45 bollen was de Cq-waarde van het wortel- en schubmonster vergelijkbaar (+/-3 eenheden).
- Bij 22 van de 45 bollen was de Cq-waarde van het wortelmonster duidelijk lager dan het bijbehorende schubmonster (verschil van >3 eenheden). In deze monsters was de virusconcentratie in de wortels duidelijk hoger dan in de schub die van dezelfde bol is bemonsterd. Bij 4 bollen werd in de wortel een relatief lage Cq-waarde / hoge concentratie virus waargenomen.

Op basis van de analyse van 45 bollen waarbij tijdens de teelt infectie vanuit de bodem heeft opgetreden was de Cq-waarde van een wortelmonster ca. 4 eenheden lager dan van het bijbehorende schubmonster. De virusconcentratie in wortels is blijkaar hoger dan in schubben, hetgeen de hypothese ondersteund dat infectie via de wortels plaats vindt.

8.3 Impact van resultaten en vervolgonderzoek

Deze uitgebreide analyse toont aan dat onderzoek aan het wel of niet optreden van bodemgebonden infectie via PCR-diagnostiek niet zwart-wit is. Toetsing aan hetzelfde monster resulteert niet altijd in hetzelfde toetsresultaat. Dit is lastig voor onderzoek en dit is nog lastiger voor ondernemers die PCR-diagnostiek inzetten voor partijbeheer. Er zijn een aantal zaken die men moet realiseren:

1. De suboptimale reproduceerbaarheid van toetsresultaten wordt veroorzaakt door de niet egale verdeling van PIAMV in de wortels en bol. Dit wordt veroorzaakt door de interactie tussen de plant en het virus en maakt bemonstering lastig. Bij een recente infectie is de virusconcentratie nog erg laag en op sommige plekken in de plant is het virus nog helemaal afwezig. De trefkans om met PCR-diagnostiek het virus te detecteren is dan erg laag. Bij bemonstering van een recent geïnfecteerde plant wordt soms wel dat deel bemonsterd waar het virus (al) aanwezig is, maar soms wordt ook juist dat deel bemonsterd waar het virus nog niet aanwezig is. De interactie tussen plant en virus is niet te veranderen en bemonstering is daarom niet te verbeteren.
2. Men moet zich realiseren dat deze suboptimale reproduceerbaarheid zich met name voordoet wanneer men informatie wilt krijgen over virusinfectie die recent vanuit de bodem heeft opgetreden. Kort na infectie van een wortel kost het tijd voordat de virusconcentratie in de wortel hoog genoeg is voor verdere verspreiding van het virus in de plant. Eenmaal in andere onderdelen van de plant aangekomen, moet het virus ook daar eerst vermeerderen voordat het via PCR-diagnostiek aangetoond kan worden.

3. Het is onduidelijk of een virusinfectie die uitsluitend in de wortel is aangetoond en niet in de schub altijd tot een viruszieke plant zal leiden. Er zijn praktijkervaringen die suggereren dat dit niet altijd het geval hoeft te zijn. De 45 bollen die in dit hoofdstuk in detail zijn bemonsterd en getoetst worden per stuk nageteeld voor ELISA-analyse aan het blad. Deze aanvullende resultaten zullen belangrijke informatie toevoegen aan Tabel 16.
4. Bemonstering van schubben en RNA-extractie vanuit schubben is praktisch uitvoerbaar en relatief eenvoudig op te schalen tot een betaalbare routinetoets. Dit is helaas voor bemonstering en verwerking van wortelmonsters technisch gezien niet mogelijk. Daarom is een routinematige PCR-toets op wortelmonsters vooralsnog niet beschikbaar.
5. Bij bemonstering van schubben van bollen waarin recent tijdens de teelt infectie heeft opgetreden blijkt dat PCR-toetsresultaten van individuele schubben niet altijd gelijk zijn. Een leliebol heeft meerdere hoofdwortels. Het is onduidelijk hoe representatief toetsuitslagen voor individuele wortelmonsters zijn wanneer deze van één bol worden bemonsterd.
6. Naar aanleiding van de uitputtende bemonstering en analyse beschreven in dit hoofdstuk kan men suggereren dat de resultaten beschreven in Hoofdstuk 7 niet volledig overeenkomen met de werkelijkheid. Er wordt immers via PCR-diagnostiek aan wortelmonsters meer infectie waargenomen dan op basis van de eerste analyse met schubmonsters in Hoofdstuk 7 is beschreven. Dit klopt, maar er moet gerealiseerd worden dat budgetten ontoereikend zijn om de paar duizend bollen die in Hoofdstuk 6 en 7 geteeld zijn per stuk op de wortels te toetsen, of als bollen op pot na te telen voor ELISA-onderzoek op het blad. Op basis van deze analyse beschreven in dit hoofdstuk moet men zich daarom realiseren dat de resultaten op basis van PCR-diagnostiek in Hoofdstuk 6 en 7 de echte waarheid benaderen, maar dat waarschijnlijk enkele bollen onjuist negatief zijn getoetst. Deze onnauwkeurigheid in deze analyse is onvermijdbaar maar heeft verder weinig impact op de conclusies die het onderzoek heeft opgeleverd.
7. Bij de humane diagnostiek worstelt men met dezelfde suboptimale reproduceerbaarheid van virusdetectie kort na infectie. Een infectie met HIV is bijv. pas op z'n vroegst na 3 maanden met zekerheid vast te stellen. De leliesector wil het liefs enkele dagen/weken na infectie al betrouwbaar kunnen aantonen of er wel of geen infectie aanwezig is. Men moet accepteren dat het tijd kost voordat de virusconcentratie in een monster hoog genoeg is voor betrouwbare detectie. Het jaarlijks doortoetsen van partijen biedt uiteindelijk de zekerheid dat partijen (nagenoeg) vrij van virus geproduceerd zijn.

Tabel 16. Vergelijking van PIAMV TaqMAN PCR-toetsresultaten voor schubmonsters bij twee onafhankelijke bemonsteringen van een partij bollen. Tijdens de tweede bemonstering zijn bollen zowel aan de schub als aan de wortel bemonsterd en met de PIAMV-TaqMAN PCR getoetst op aanwezigheid van PIAMV. PCR-analyse heeft op mengmonsters van vijf schubben, en op individuele schub- en wortelmonsters plaatsgevonden. Er is een vergelijking gemaakt van Cq-waarden afkomstig van schub- en wortelmonsters. Score PCR: - negatief, +/- zwak positief, + positief.

	Cq-waarde 1ste analyse op 2 mengmonsters van 5 schubben van 10 bollen	Cq-waarde 2de analyse op 2 mengmonsters van 5 schubben van 10 bollen. Onderstreept de serie van 5 bollen die per stuk op schub en wortel is onderzocht	toets op individuele schubben		Toets op individuele wortels		Gemiddelde Cq-waarde PLAMV PCR op 5 schubmonsters van 5 bollen	Gemiddelde Cq-waarde PLAMV PCR op 5 wortelmonsters van 5 bollen	Verschil Cq schub-versus wortel monster van dezelfde bol	schub virusvrij getoetst terwijl wortel virusziek getoetst
			Cq-waarde	Score PCR	Cq-PIAMV	Score PCR				
1	33 / 40	40 / <u>35</u>	31	+	32	+	37	34	-1	
			33	+/-	34	+/-			-1	
			40	-	40	-			0	
			40	-	35	+/-			5	
			40	-	29	+			11	ja
2	36 / 40	<u>36</u> / 40	40	-	40	-	40	38	0	
			40	-	37	+/-			3	
			40	-	37	+/-			3	
			40	-	40	-			0	
			40	-	36	+/-			4	
3	40 / 30	40 / <u>35</u>	34	+/-	32	+	32	24	2	
			37	+/-	30	+			7	
			20	+	12	+			8	
			36	+/-	18	+			18	ja
			32	+	30	+			2	
4	40 / 36	<u>37</u> / 36	40	-	40	-	39	39	0	
			36	+/-	40	-			-4	
			40	-	40	-			0	
			40	-	40	-			0	
			40	-	36	+/-			4	
5	40 / 36	37 / <u>36</u>	40	-	36	+/-	40	36	4	
			40	-	40	-			0	
			40	-	32	+			8	ja
			40	-	33	+			7	
			40	-	40	-			0	
6	32 / 40	<u>33</u> / 37	14	+	8	+	29	20	6	
			33	+/-	28	+			5	
			32	+	26	+			6	
			33	+/-	14	+			19	ja
			31	+	26	+			5	
7	32 / 40	<u>33</u> / 37	40	-	33	+/-	39	33	7	
			40	-	33	+/-			7	
			35	+/-	36	+/-			-1	
			40	-	32	+			8	
			40	-	33	+/-			7	
8	40 / 32	<u>40</u> / 40	40	-	40	-	40	35	0	
			40	-	34	+/-			6	
			40	-	19	+			21	ja
			40	-	40	-			0	
			40	-	40	-			0	
9	40 / 32	40 / <u>40</u>	36	+/-	40	-	38	39	-4	
			40	-	40	-			0	
			40	-	36	+/-			4	
			40	-	37	+/-			3	
			36	+/-	40	-			-4	

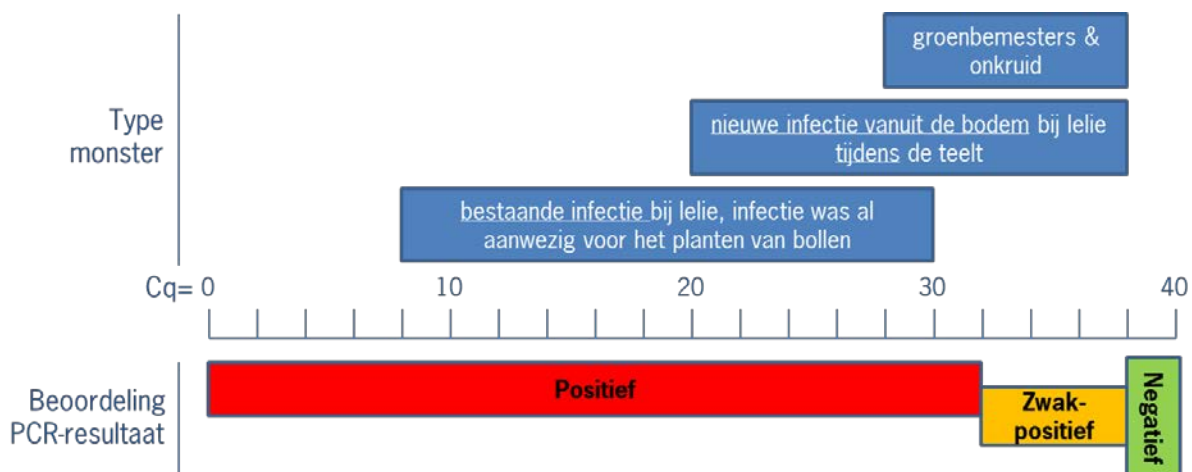
Gemiddeld 3.9

9 Waardplantenreeks PIAMV en TVX

Tijdens de teeltproeven met grond waarop in 2011 of 2012 virusbesmette lelies zijn geteeld (Hoofdstuk 6), kwam diverse onkruid spontaan op. Van dit onkruid zijn wortelmonsters met PCR en ELISA getoetst. ELISA-analyse resulteerde in negatieve toetsresultaten. Daarentegen werd met PCR-analyse frequent de aanwezigheid van virus in onkruid aangetroffen. Nadat duidelijk werd dat de waardplanten reeks voor TVX en PIAMV breder was dan lelie (en tulp voor TVX), zijn ook diverse monsters uit de praktijk aangeleverd voor onderzoek naar aanwezigheid van PIAMV of TVX. Deze gewasmonsters waren met name groenbemesters die in 2013 geteeld werden aansluitend op de teelt van een partij lelie met PIAMV of TVX in 2012.

Uit dit onderzoek blijkt dat PIAMV en TVX een brede waardplantenreeks hebben. Helaas behoren diverse onkruiden en groenbemesters tot deze lijst van waardplanten (Tabel 17 en Tabel 18). Ook bij virusvrij aangeplante lelies die op deze gronden met virusgeschiedenis geplant zijn, is virusinfectie vanuit de bodem geconstateerd (Hoofdstuk 6). Blijkbaar worden er tijdens de teelt van PIAMV- en TVX besmette lelies virusreservoirs in de bodem aangelegd die in een aansluitend teeltseizoen bij lelies, onkruiden, groenbemesters en enkele akkerbouwgewassen tot infecties met PIAMV, resp. TVX kunnen leiden. Op basis van ervaringen zijn al deze infecties bij alternatieve waardplanten symptomeloos; aan de plant zelf is niet te zien dat er sprake is van een infectie met PIAMV of TVX.

Bij de PCR-analyse van PIAMV- of TVX-besmette lelieschubben worden doorgaans relatief lage Cq-waarden verkregen variërend van Cq=10-30. Het gaat dan om een bestaande infectie die al aanwezig was voor het planten van bollen en de virusconcentratie in de plant is hoog. Bij een recente infectie vanuit de bodem worden bij analyse van schubben Cq-waarden verkregen die hoger zijn, Cq=20-38. TaqMAN PCR-analyse bij onkruiden en groenbemesters resulteerde in een (zwak) positieve resultaten met Cq-waarden die varieerden tussen 28 en 38 (Figuur 9).



Figuur 9. Schematisch overzicht van Cq-waarden verkregen uit een TaqMAN PCR analyse van verschillende type monsters. Cq-waarden tot en met 32 worden als 'positief, virusziek' beoordeeld. Cq-waarden tussen 32 en 38 worden als zwak-positief beoordeeld; er is een lage concentratie virus aanwezig. Cq-waarden boven 38 zijn 'negatief'; er is geen virus aangetroffen.

Deze nieuwe kennis resulteert in nieuwe inzichten en scenario's voor infectieroutes en roept nieuwe vragen op.

Dit is inmiddels bekend:

- Tot de waardplantenreeks van PIAMV en TVX behoren ook diverse onkruiden en groenbemesters (Tabel 17 en Tabel 18).
- Op percelen waar 1 of 2 jaar geleden virus besmette lelies hebben gegroeid, is in onkruiden PIAMV of TVX aangetroffen. Deze symptoomloze infecties bij onkruiden zijn natuurlijke virusreservoirs.
- Getoetst virusvrije lelies die op deze percelen geplant zijn, raken vanuit bodem en/of virusreservoirs besmet met PIAMV, resp. TVX. Afhankelijk van het perceel, varieert de infectie in het onderzoek tussen 1 en 8% (Hoofdstuk 6).
- Het is aannemelijk dat de bodemgebonden virusbesmetting (bij lelie, groenbemesters en onkruid) heeft opgetreden vanuit achtergebleven gewasresten van de lelieteelt.
- Ook tijdens de teelt van virusbesmette lelies kan infectie bij andere waardplanten optreden via bodemgebonden virusverspreiding.
- Aanwezigheid van PIAMV of TVX in een alternatieve waardplant kan het beste met PCR op wortelmateriaal aangetoond worden. Zorg ervoor dat het wortelmonster zandvrij is bij verwerking in het lab.
- De TVX-stam die in lelie voorkomt (TVX-L) is anders dan de TVX-stam die bij tulp voorkomt (TVX-T). Er zijn geen aanwijzingen dat een TVX-besmette tulp direct de virusbron is voor een nieuwe TVX-infectie bij lelie. De gangbare PCR- en ELISA-toetsen voor diagnostiek bij BKD, BQ-Support en PPO maken geen onderscheid tussen de TVX-T en TVX-L stam.
- Er is aangetoond dat tulp, Zantedeschia/Calla en diverse vaste planten geen waardplant zijn voor PIAMV. Zantedeschia/Calla is ook geen waardplant voor TVX-T.

Deze zaken zijn nog onbekend:

- Welke andere gewassen en onkruid die in rotatie met lelie worden geteeld zijn een waardplant
- Wat is het risico op virusoverdracht via zaad bij onkruiden en groenbemesters die waardplant voor deze virussen zijn?
- Wat voor risico's op virusinfecties zijn er wanneer en na een teelt van bijv. een virusbesmette groenbemester weer lelie of tulp (in het geval van TVX) wordt geteeld? De waarneming dat de virusconcentraties in groenbemesters en onkruiden op basis van Cq-waarden lager is dan dat wordt waargenomen suggereert dat lelie een veel betere waardplant is dan groenbemesters en onkruiden. Immers, hoe beter de waardplant hoe meer vermeerdering van virus kan plaatsvinden. Mogelijk dat lelie voor PIAMV en TVX vanwege de hoge virusconcentraties een 'actieve waardplant' is wat resulteert in risico op infectie vanuit de bodem. Veel groenbemesters en onkruiden zijn waardplant voor PIAMV en TVX, maar de virus concentratie is relatief laag. Groenbemesters en onkruiden zouden daarmee 'passieve waardplanten' kunnen zijn. Omdat de virusconcentratie relatief laag is zou het risico op infectie via de bodem ook relatief laag kunnen zijn. Deze hypothese krijgt volle aandacht in vervolgonderzoek.

Voorkom een besmetting met PIAMV- of TVX via de grond:













- Verdiep u in de Igeschiedenis van percelen die u voor de teelt van tulp en lelie gaat gebruiken. Wanneer er in het verleden TVX- of PIAMV besmette bollenteelt heeft gestaan, kunt u met PCR-toets op wortels van verschillende waardplanten van PIAMV of TVX bevestigen of er een virusreservoir is op dit perceel aanwezig is.
- Is de virusgeschiedenis van een perceel onbekend en u wilt meer zekerheid over de afwezigheid van virusreservoirs (bijvoorbeeld vanwege virusvrije schubbenteelt)? Gebruik hiervoor dan PCR-toetsen op wortelmateriaal van waardplanten die op dit perceel groeien.
- Overleg met de leverancier van het zaad van de groenbemester in hoeverre hij aandacht heeft voor TVX- of PIAMV-vrije productie van dit zaad. Mogelijk weet deze leverancier nog weinig over PIAMV en TVX.
- Vermijd vooralsnog de teelt van lelie en tulp op een perceel waar minimaal twee jaar daarvoor PIAMV- of TVX-besmette bollen zijn geteeld.

- Eventueel opgetreden PIAMV- of TVX-besmetting vanuit de grond kan bij lelie het beste aangetoond worden door schubben of wortels van lelies met behulp van PCR te toetsen op PIAMV of TVX. Diverse toetslaboratoria kunnen u hierover adviseren.
- Bij het testen van wortelmateriaal van onkruid of een groenbemester moet het onkruid minimaal 8 weken oud zijn. Hoe ouder het onkruid of groenbemester is, hoe groter de detectiekans.

Voorkom de aanleg van virusreservoirs voor PIAMV en TVX

1. Hou bij een PIAMV- of TVX-besmette partij het perceel tijdens de teelt zo goed als mogelijk onkruidvrij. Let daarbij vooral op de onkruiden die waardplant zijn voor deze twee virussen. Voorkom zaadzetting bij (deze) onkruiden.
2. Verwijder bij het rooien van een PIAMV- of TVX-besmette partij zo veel mogelijk wortelresten uit het perceel.
3. Houd aansluitend op de teelt van een PIAMV- of TVX-besmette partij het perceel zo goed als mogelijk onkruidvrij. Voorkom ook zaadzetting bij onkruiden. Plant eventueel een groenbemester die *GEEN* waardplant is in plaats van onkruid en zorg voor een gezond bodemleven met voldoende microbiële activiteit. Vatbaarheid van groenbemers voor PIAMV en TVX is op dit moment een grote onzekerheid en heeft volle aandacht in onderzoek.
4. Houd er rekening mee dat PIAMV- en TVX besmettingen ook in de kas in de grond achter kunnen blijven en ben alert op onkruid dat de kas voor virusreservoirs kan zorgen. Met stomen kunnen deze besmettingen en onkruiden bestreden worden.

Tabel 17. Waardplantenreeks van PIAMV.

		
<p>Lelie (<i>Lilium</i> spp.)</p>	<p>Aziatische weegbree (<i>Plantago asiatica</i>)</p>	<p>Smalle weegbree (<i>Plantago lanceolata</i>)</p>
		
<p><i>Nandina domestica</i></p>	<p>Primrose (<i>Primula vulgaris</i>)</p>	<p><i>Nicotiana benthamiana</i></p>
		
<p>Melganzevoet (<i>Chenopodium album</i>)</p>	<p>Kleine brandnetel (<i>Urtica urens</i>)</p>	<p>Zandraket (<i>Arabidopsis thaliana</i>)</p>
		
<p>Herderstasje (<i>Capsella pastoris-bursa</i>)</p>	<p>(Vogel)muur (<i>Stellaria media</i>)</p>	<p>Oost-Indische kers (<i>Tropaeolum majus</i>)</p>

Tabel 17 Waardplantenreeks van PIAMV (vervolg).



Wilgenroosje
(*Chamerion angustifolium*)



Harig wilgenroosje
(*Epilobium hirsutum*)



Levermos
(*Marchantiophyta*)



Straatgras
(*Poa annua*)



Bollenmix (40% festulolium, 30% westerwoldsraai, 30% it.raai.)



Japanse Haver
(*Avena strigosa*)



Mais
(*Zea mays*)

Tabel 18. Waardplantenreeks van TVX. Dit betreft soorten waarin PPO d.m.v. onderzoek daadwerkelijk TVX heeft aangetoond.



Tulp
(*Tulipa* spp.)



Lelie
(*Lilium* spp.)



Melganzevoet
(*Chenopodium album*)



Kleine brandnetel
(*Urtica urens*)



Herderstasje
(*Capsella pastoris-bursa*)



(vogel)muur
(*Stellaria media*)



Klein Kruiskruid
(*Senecio vulgaris*)



Zwarte nachtschade
(*Solanum nigrum*)



Hanepoot
(*Panicum crusgalli*)



Japanse Haver
(*Avena strigosa*)



Gele en bruine mosterd
Brassica juncea en *Sinapis alba*



Bladrammenas
(*Raphanus sativus* subsp. *oleiferus*)

Tabel 18. Waardplantenreeks van TVX (vervolg).



Mais
(*Zea mays*)

In literatuur uit de jaren '80 van de vorige eeuw zijn aanvullende waardplanten voor TVX beschreven. In dit geval zijn de planten handmatig geïnfecteerd met TVX-T. Het is niet bekend of deze planten van nature ook via bodemgebonden virusoverdracht met TVX besmet kunnen raken.

Moeskruid, tamme kervel	<i>Anthriscus cerefolium</i>	Sla	<i>Lactuca sativa</i>
Selderij	<i>Apium graveolens</i>	Tomaat	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Snijbiet	<i>Beta vulgaris</i>	Citroen melisse	<i>Melissa officinalis</i>
Ganzevoet	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Nicotiana benthamiana	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Gierstmelde	<i>Chenopodium quinoa</i>	Peterselie	<i>Petroselinum crispum</i>
Koriander	<i>Coriandrum sativum</i>	Vlambloem	<i>Plox drumondii</i>
Japanse Peterselie	<i>Cryptotaenia japonica</i>	Naaldenkervel	<i>Scandix pecten-veneris</i>
Komkommer	<i>Cucumis sativus</i>	Spinazie	<i>Spinacia oleracea</i>
Wortel	<i>Daucus carota</i>	Nieuwzeelandse spinazie	<i>Tetragonia tetragonioides</i>
Kogelamaranth	<i>Gomphrena globosa</i>	Inkarnaatklaver	<i>Trifolium incarnatum</i>
Strobloem	<i>Helichrysum bracteatum</i>	Maarts viooltje	<i>Viola odorata</i>
Berenklauw	<i>Heracleum sphondylium</i>	Driekleurig viooltje	<i>Viola tricolor</i>

10 Algemene discussie en conclusies

Dit onderzoek richtte zich aanvankelijk op zes doelstellingen.

1. Bepalen van **wijze van bodemgebonden verspreiding** van PIAMV.
2. Bepalen van de **stabiliteit/overlevingsmogelijkheden van PIAMV** in de bodem.
3. Risico's van **virusopname door wortels** bij afwezigheid van verwonding.
4. Ontwikkelen van **effectieve ontsmettingsmethoden** voor grond uit kistenteelt, vollegronds kasteelt en vollegronds buitenteelt.
5. Bepalen of symptoomloze infecties met PIAMV veroorzaakt worden door een specifiek virusisolaat dat anders is dan symptomatisch PIAMV (**genetische analyse symptoomloze PIAMV** isolaten).
6. **Kennisverspreiding** van onderzoeksresultaten en daaruit voortkomende adviezen naar alle schakels in de keten zodat de leliesector gezamenlijk de virusverspreiding een halt toe kan roepen.

In dit hoofdstuk staat een algemene discussie over de inzichten die de resultaten van dit onderzoek hebben opgeleverd.

10.1 Wijze van bodemgebonden verspreiding

Het onderzoek heeft opnieuw geen aanwijzingen gevonden voor de directe betrokkenheid van specifieke organismen die als vector optreden tijdens de bodemgebonden verspreiding en infectie van PIAMV en TVX. Ook zonder specifieke aaltjes treedt verspreiding en infectie op. Ook in een steriele omgeving zoals weefselkweek treedt infectie vanuit het medium op. Het is niet uit te sluiten dat de aanwezigheid van vrij levende aaltjes in de bodem een bijdrage kan leveren aan de mate van bodemgebonden verspreiding van PIAMV of TVX. Bij veelvuldig knagen aan wortels beschadigen plantencellen waaruit bij een virusbesmette plant virusdeeltjes vrij kunnen komen. Veelvuldig knagen aan wortels van een virusvrije plant kan juist in beschadigingen resulteren waar infectie vanuit het bodemmilieu plaats vindt. In de grond waar de meeste infectie vanuit de bodem optrad, waren ook relatief veel *Pratylenchus* aaltjes aanwezig. In de grond waarin juist de meeste *Pratylenchus penetrans* aaltjes aanwezig waren, werd juist beperkte infectie waargenomen.

In onderzoek naar weerbaarheid tegen plantenvirussen (project BO-25.08-001-011) zijn diverse pottenproeven met potgrond en vangplanten gedaan waarbij duidelijk werd dat aangieten van plantensap met PIAMV en TVX efficiënt tot infecties leidt. Deze ervaringen suggereren opnieuw dat er geen vector betrokken is bij infectie met PIAMV of TVX.

Hosta Virus X (HVX) is net als PIAMV en TVX een potexvirus. Deze drie virussen zijn relatief veel verwant aan elkaar. In 2012 is in onderzoek op praktijkpercelen met Hosta-HVX geschiedenis infectie vanuit de bodem geconstateerd. Ook op dit perceel waren geen schadelijke vrijlevende aaltjes aanwezig.

10.2 Stabiliteit/overlevingsmogelijkheden van PIAMV en TVX in de bodem

Het onderzoek heeft aangetoond dat aansluitend op een PIAMV- of TVX-besmette lilieteelt er op nieuw infectie vanuit de bodem kan optreden. Deze infectie treedt op bij lelies, maar ook bij groenbemesters en diverse onkruiden. Bij lilië is het evident dat de infectie vanuit de bodem optreedt; de lelies waren immers virusvrij aangeplant. Bij groenbemesters en onkruiden is het belangrijk te onderzoeken of de waargenomen infectie niet vanuit het zaad meegekomen is. Bij onderzoek naar aanwezigheid van PIAMV of TVX in de bodem worden ook regelmatig negatieve toetsuitslagen verkregen hetgeen suggereert dat er ook virusvrije onkruiden of groenbemesters zijn. Wanneer er geen teelt geschiedenis met TVX of PIAMV is, zijn er ook geen virusbesmette onkruiden of groenbemesters gevonden.

Deze resultaten geven aan dat een virusreservoir in de bodem minimaal enkele maanden aanwezig kan blijven en dat teelt van een nieuwe waardplant resulteert in voortzetting van het virusreservoir.

Een voorbeeld van deze voortzetting van een virusreservoir is bijvoorbeeld waargenomen met de grond waarop in 2011 PIAMV-besmette lelies hebben gestaan en in 2012 maïs. Het is aannemelijk dat maïs in 2012 vanuit de bodem virusbesmet is geraakt en bij de oogst weer een virusreservoir heeft achtergelaten welke in 2013 bij lelie in een virusbesmetting van 6% heeft geleid (Tabel 13).

In samenwerking met diverse ondernemers is inmiddels meer gevoel gekregen voor de stabiliteit en overlevingsmogelijkheden van TVX en PIAMV. Virusreservoirs blijven doorgaans achter na een virusbesmette lelieteelt en infectie bij groenbemesters en onkruid is het gevolg. Inundatie lijkt geen effect te hebben gehad omdat bij de aansluitende teelt van Japanse haver infectie met PIAMV werd waargenomen. Het is nog niet uit te sluiten of PIAMV via zaad van Japanse haver over kan gaan naar een nieuwe generatie. Dit is momenteel in onderzoek.

Overleving en stabiliteit van PIAMV en TVX zal met name afhankelijk zijn van een paar factoren:

1. De virusdruk in de lelie. Een hoog percentage besmetting geeft een hogere virusdruk dan een laag besmettingspercentage.
2. Het eigenschappen van het leliegewas zelf. Er zijn aanwijzingen dat de ene cultivar makkelijker een virusreservoir achter laat dan andere cultivars. Dit is echter lastig concreet in kaart te brengen.
3. De hoeveelheid wortelresten die bij het rooien op het perceel achter blijven.
4. De samenstelling en hoeveelheid micro-organismen in de bodem die betrokken zijn bij de vertering van organisch materiaal. Hoe eerder plantresten zijn verteerd hoe eerder ook het virus is verteerd. De bodemgezondheid is daarom direct gekoppeld aan de overlevingsmogelijkheden van een virusreservoir in de bodem.
5. Aanwezigheid van waardplanten op het perceel. Zodra er een waardplant aanwezig is, kan er infectie optreden en daardoor opnieuw productie van nieuwe virusdeeltjes. De brede waardplantenreeks voor beide virussen is een onverwacht en verontrustend resultaat van dit project. Nieuw onderzoek wordt ingezet om te achterhalen wat de feitelijke risico's zijn virusbesmette groenbemesters in rotatieteelt met lelie.

Omdat er minimaal vijf complexe factoren betrokken zijn bij de stabiliteit en overlevingsmogelijkheden van PIAMV en TVX is er geen eenduidige uitspraak te doen over de stabiliteit en overlevingsmogelijkheden van deze virussen.

Een hoopgevend resultaat is dat op een perceel waar na PIAMV-besmette lelies eerst nog een tulpenteelt heeft plaatsgevonden bij diverse groenbemesters geen virus werd aangetroffen. Zonder tussentijdse teelt van tulp (nietwaard voor PIAMV) werd wel infectie met PIAMV bij deze groenbemesters waargenomen. Dit resultaat suggereert dat bij afwezigheid van een waardplant het virusreservoir in de bodem na een jaar is verdwenen. Vervolgonderzoek is ingezet om meer ervaring te krijgen met gewasrotatie om virusreservoirs snel te doen verdwijnen.

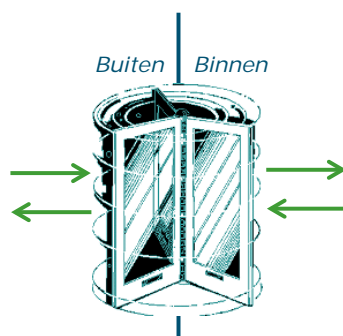
10.3 Risico's van virusopname bij afwezigheid van verwonding

Dompelen van bollen waar de wortels van waren afgeknipt resulteerde in vergelijkbare virusinfecties als bij intacte bollen. De bollen waren in dit geval slechts 3 minuten gedompeld. Er hoeft dus geen verwonding aanwezig te zijn om infectie mogelijk te maken. Bij heftiger verwonding (ook de schubben zijn beschadigd), trad meer infectie op. Voorkomen van verwonding en aandacht voor wondherstel voorafgaand aan dompelen is daarom zeker relevant. Tevens moeten lelie verwerkende bedrijven achteraan de keten er rekening mee houden dat ook tijdens hun werkzaamheden met leliebollen kruisbesmetting en infectie bij partijen kan plaatsvinden wanneer zij gebruik maken van virusbesmet spoelwater of dompelbaden besmet met virus. Inpakbedrijven en exporteurs zijn daarom net zo verantwoordelijk voor een virusvrij eindproduct als veredeling en bollentelers.

Bij *Arabidopsis* in weefselkweek trad ook infectie met PIAMV op. Weefselkweekmedium is 98.5% water dat door een bindmiddel (agar) tot gelei wordt gevormd. Tijdens de groei van een plantje op dit weefselkweekmedium treedt geen verwonding van wortels op. Toch vindt infectie met PIAMV plaats.

Onderzoekers van de BKD hebben aangetoond dat wanneer intacte viruszieke bollen in een bekersglas met water worden gedompeld, de virusconcentratie in dit water in een korte tijd snel toeneemt. PPO heeft eerder ook al aangetoond dat bij een HVX-besmette Hosta relatief veel vrije virusdeeltjes op de buitenkant van wortels aanwezig is.

Deze verschillende resultaten hebben tot de hypothese geresulteerd dat infectie met PIAMV en uitscheiding van PIAMV via een soort draaideur constructie plaatsvindt. Op cellulair niveau kan een dergelijke draaideurconstructie een transport-eiwit of transportcomplex in de celwand/celmembraan zijn. Er is nog geen wetenschappelijk onderzoek dat deze hypothese onderbouwt. Helaas vindt er nagenoeg geen fundamenteel wetenschappelijk onderzoek aan dit type potexvirussen plaats waardoor verdiepende kennis ontbreekt.



Figuur 10. Hypothetisch model over de draaideurconstructie voor uitscheiding van PIAMV-virusdeeltjes en virusopname zonder verwonding

10.4 Effectieve ontsmettingsmethoden voor materialen, water en grond

PIAMV en TVX zijn vrij hardnekkige virussen die buiten de plant langere tijd besmettelijk blijven. Bedrijfshygiëne is dan extra belangrijk om verspreiding binnen en tussen partijen te voorkomen. In Hoofdstuk 11 worden tips voor bedrijfshygiëne uitgebreid toegelicht. Vuil en plantenresten wegspoelen met (warm) water en zeep gebruiken om aankoeven van vuiligheid te voorkomen zijn het belangrijkste en het meest effectief. Eventueel kunnen middelen met virucide werking ingezet worden om eventueel achtergebleven virusdeeltjes alsnog te inactiveren.

In dit onderzoek en in eerder onderzoek uitgevoerd vanuit het KAVB-Knelpuntenoverleg zijn middelen geïdentificeerd die een effectieve oppervlakte-reinigende werking hebben. Voor slechts één middel is registratie voor deze toepassing bekend (Virkon S).

Ondernemers die actief met reinigen van machines, kisten en fusten aan het experimenteren waren, zijn ondersteund met onderzoek vanuit dit project. M.b.v. veegproeven op al dan niet besmette en/of gereinigde oppervlakten werd snel duidelijk dat PIAMV en TVX doorgaans op veel plekken op het bedrijf aangetroffen werd. Daarnaast werd met veegproeven duidelijk dat goed reinigen niet eenvoudig was.

Er moet gerealiseerd worden dat de middelen met virucide werking over het algemeen ook schadelijk voor de mens zijn. Het opvolgen van de arbo-richtlijnen is daarom onlosmakelijk gekoppeld aan het gebruik van middelen met virucide werking. Ook kunnen middelen met virucide werking corrosieve activiteit hebben en daardoor schadelijk zijn voor machines. Wees hiervan bewust.

Virus in water kan door middel van hitte worden geïnactiveerd (minimaal 10 minuten verhitten bij minimaal 65°C). Er zijn geen middelen geregistreerd die toegepast kunnen worden voor de afdoding van PIAMV of andere virussen in water. Dit onderzoek laat echter zien dat middel VS en middel F een reductie in PIAMV-infectie bij gedompelde bollen laat zien. De inwerktijd was in dit onderzoek 15 minuten. Er zijn discussies over de effectiviteit van middel CBL van de andere middelen.

Belangrijke aspecten om rekening te houden bij onderzoek naar de effectiviteit van middelen in water zijn:

- de hoeveelheid organisch materiaal in het water en de stabiliteit van het middel
- de minimale concentratie actieve component voor effectieve afdoding
- de minimale inwerkduur van het middel
- de mogelijkheid om middel continue toe te voegen om afgebroken middel te compenseren

Onderzoek naar virucide activiteit van een middel voor de ontsmetting van water (spiegelwater of dompelbad) kan alleen goed onderzocht te worden door gebruik te maken van lelies tijdens het spoelen/dompelen. In een nateelt kan dan bepaald worden of er in specifieke behandelingen minder infectie heeft opgetreden dan in controlebehandelingen.

PCR-analyse op behandeld water is alleen informatief wanneer na de vastgestelde inwerktijd meteen de RNA extractie wordt uitgevoerd. Wanneer monsters met toevoeging van een middel voor PCR-diagnostiek naar een extern lab worden opgestuurd, vindt tussen het uitvoeren van de behandeling en de uitvoering van de RNA-extractie in het lab nog steeds (rest-)activiteit van het middel plaats. Deze restactiviteit is o.a. afhankelijk van de stabiliteit van het middel. Deze restactiviteit zorgt er vooral voor dat er minder virus gedetecteerd wordt dan dat na de vastgestelde inwerktijd nog aanwezig was.

Virusbesmetting in de grond kan tot infectie leiden. Stomen van de grond is toepasbaar bij kasteelt. Het is zeer belangrijk dat alle grond voldoende lang voldoende heet is geweest. Het werken met dataloggers voor temperatuurregistraties is daarom zeker aan te bevelen. Tevens heeft dit onderzoek een werkwijze opgeleverd waarmee met ingegraven viruscapsules op een meer biologische wijze de inactivatie van PIAMV of TVX gevolgd kan worden.

Er zijn geen middelen met virucide activiteit bekend die toegepast kunnen worden in de bodem. Een chemische afdoding is daarom niet mogelijk. Van fungiciden of nematiciden is geen virucide activiteit bekend of te verwachten. Omdat er geen vector betrokken is bij de bodemgebonden virusverspreiding hebben deze middelen geen effect tegen virusreservoirs in de bodem.

Een gezond bodemleven en snelle vertering van plantresten hebben zeker een functionele bijdrage aan een effectieve ontsmetting van de bodem. Natte grondontsmetting of toepassing van bodemfungiciden zou daarom misschien juist wel eens averechts kunnen werken bij het bestrijden van virusreservoirs in de bodem. In het project Weerbaarheid tegen plantenvirussen gefinancierd door Ministerie van Economische Zaken (BO-25.08-001-011) worden micro-organismen geïdentificeerd die actief ingezet kunnen worden voor afbraak van virusdeeltjes in de bodem, maar mogelijk ook in spiegelwater.

10.5 Genetische analyse PIAMV en TVX

Dit project heeft aangetoond dat er slechts één variant van PIAMV in Nederland aanwezig is. De mate van visuele schade wordt daarom niet door het virus bepaald maar door de interactie tussen plant/cultivar, virus en teeltomstandigheden.

Het Nederlandse PIAMV wijkt vrij veel af van het Japanse PIAMV-isolaat. Het is niet aannemelijk dat het Japanse PIAMV destijds de infectie bij Nederlandse lelies heeft veroorzaakt. Het is veel aannemelijker dat een andere waardplant dan lelie de infectiebron is geweest voor het Nederlandse PIAMV.

Bij langdurige aanwezigheid van een virus in een gewas vindt verdere evolutie van virus plaats waardoor er nieuwe varianten kunnen ontstaan. Omdat er in Nederland nagenoeg geen genetische variatie bij PIAMV in lelie wordt aangetroffen, wordt verwacht dat de infectie relatief recent heeft plaatsgevonden. Waar en wanneer de eerste Nederlandse lelies met PIAMV zijn besmet blijft onduidelijk. Vanwege de brede waardplantenreeks is er een scala aan potentiële infectiebronnen aanwezig.

De TVX-stam die bij lelie wordt aangetroffen wijkt op kleine details af van de TVX-stam die bij tulp wordt waargenomen. Op basis van dit gegeven wordt verondersteld dat een TVX-besmette tulp zelf niet de infectiebron voor TVX bij lelie is geweest. Onderzoek wordt uitgevoerd of de TVX-stam uit tulp een infectie bij lelie kan veroorzaken en of de TVX-stam uit lelie infectie bij tulp kan veroorzaken.

Belangrijk gegeven is dat op basis van de beschikbare genetische informatie van PIAMV en TVX geen knelpunten te verwachten zijn voor de PCR-diagnostiek.

10.6 Kennisverspreiding en interactie met praktijk

Vanwege de complexiteit van de verspreiding en beheersing van PIAMV- en TVX is intensief contact met de leliesector van belang. Op het moment dat dit onderzoeksproject van start ging, zomer 2012, werd ook de Regiegroep Lelie geformeerd. De Regiegroep Lelie was samengesteld door vertegenwoordigers uit veredeling, teelt, export en broei. Tevens hadden BKD en PPO zitting in de regiegroep.

Tijdens de bijeenkomst van de Regiegroep werd tweemaandelijks een update over het onderzoek gegeven. Nieuwsfeiten vonden via diverse kanalen snel hun plek in de sector. Daarnaast zijn diverse specifieke factsheets of andere communicatie via de brancheorganisaties gedeeld met hun achterban. Dit was een effectieve manier van snel communiceren.

Gedurende het onderzoek aan PIAMV en TVX is er de afgelopen jaren met ruim 70 verschillende ondernemers direct persoonlijk contact geweest. Dit contact varieerde van het beantwoorden van een mailtje of een kleine vraag via de telefoon tot uitgebreide samenwerking in praktijkonderzoek. Vooral de interactie met ondernemers waarbij zij op hun bedrijf gerichte activiteiten uitvoerden en 'wij' vanuit het onderzoek technische ondersteuning met ELISA- of PCR-analyse konden bieden, heeft snel veel inzicht opgeleverd.

Vanwege het frequente contact met ondernemers uit de sector was er ook veel input richting het onderzoek. Discussies hielden de onderzoekers scherp en inspireerden hen tot nieuwe gedachten. Ook werden nieuwe onderzoeksactiviteiten geïnitieerd die al dan niet nog binnen dit project uitgevoerd konden worden.

In de periode 2012/2013 zijn diverse kleine en grote bijeenkomsten voor ondernemers uit teelt en bloemproductie georganiseerd. Daarnaast werden teeltadviseurs en middenleveranciers via aparte communicatiekanalen frequent op de hoogte gesteld over de laatste inzichten. Deze vorm van communicatie heeft diverse initiatieven tot samenwerking en praktijkonderzoek opgeleverd.

De Regiegroep Lelie heeft in 2012/2013 gewerkt aan een systeemaanpak voor virusarme teelt van lelies. Dit heeft geresulteerd in het kwaliteitssysteem Lelie 2.0. De kennis verkregen uit onderzoek en ervaring die vanuit de praktijk is gedeeld, heeft een bijdrage geleverd aan de uiteindelijke richtlijnen voor virusvrije start en virusarme productie van leverbare leliebollen.

10.7 En nu verder...

In de periode 2010-2013 heeft de sector veel kennis verkregen hoe om te gaan met PIAMV en TVX. Veel ondernemers zetten grote stappen in de goede richting. Helaas worden zij ook nog wel eens geconfronteerd met onverwachte resultaten. Met een systematische aanpak zoals beschreven in Lelie 2.0 moet een virusarme teelt zeker mogelijk worden.

Ondanks dat in de periode 2010-2013 ontzettend veel kennis en ervaring over PIAMV en TVX bij lelie is opgebouwd, zijn er een aantal onderzoeksvragen die nog steeds aandacht vragen:

1. Wat is de betrokkenheid van virusbesmette groenbemesters bij de instandhouding van virusreservoirs op een perceel en de risico's op infectie bij een volgende teelt van lelie.
2. Welke niet-waardplanten van TVX en PIAMV kunnen functioneel ingezet worden om infectierisico's vanuit een perceel te verminderen?
3. Wat zijn de effecten van inundatie of braak liggen op de risico's vanuit virusreservoirs aanwezig in de bodem?
4. Kunnen bodemgebonden micro-organismen functioneel ingezet worden voor de afbraak van virusreservoirs in de bodem?
5. Zaadproductie van groenbemesters vindt nog wel eens plaats aansluitend op de teelt van virusbesmette lelies. Wat zijn de risico's van zaadoverdracht van PIAMV en TVX bij groenbemesters? Men moet voorkomen dat zonder dat men er erg in heeft, deze virussen via het zaad van groenbemesters worden verspreid.
6. Infectie kan via verwonding plaats vinden. Efficiënt wondherstel kan het weglekken van virus en

infectie bij virusvrije bollen verminderen. Wondherstel is een fysiologisch complex proces. Optimale omstandigheden voor wondherstel tijdens de bewaring ter voorkoming van virusinfecties mag echter niet leiden tot achteruitgang van de fysiologische kwaliteit van de bol op toenemende risico's op infectie met bijv. schimmel.

7. Vanwege de complexiteit van de materie is interactie met ondernemers uit de sector van groot belang. Interactie vanuit onderzoek naar de ondernemers toe voor kennisoverdracht. Interactie vanuit de ondernemers naar het onderzoek toe om met die zaken bezig te zijn die aansluiten bij de vragen die in de praktijk aanwezig zijn en oplossingsmaatregelen die haalbaar zijn. Het kwaliteitssysteem Lelie 2.0 vraagt om een ondersteuning bij de uitvoering van dit protocol. Hierbij kunnen workshops en trainingen helpen. Deze zouden beschikbaar moeten komen.
8. Wanneer ondernemers actief met volgens de systeemaanpak Lelie 2.0 gaan werken, is het belangrijk dat zij mogelijkheden krijgen om tussentijds op het bedrijf risico's op virusinfecties in te kunnen schatten. Hiervoor kunnen methoden en protocollen voor risicoanalyses geschreven worden.

Diverse onderzoeksprojecten besteden in 2014 direct of indirect aandacht aan PIAMV en TVX:

- System approach virussen in Lily (gefinancierd door Topsector Uitgangsmaterialen)
- Effectieve wondheling bij lelie (gefinancierd door het KAVB Leliecollectief)
- Weerbaarheid tegen plantenvirussen (gefinancierd door Topsector Tuinbouw)
- Beheersing van grondgebonden virusoverdracht (gefinancierd door Topsector Tuinbouw)

Voor vragen die nog niet ondergebracht zijn in huidige projecten, zal additionele financiering gezocht moeten worden.

11 Maatregelen om infectie en verspreiding van PIAMV te voorkomen of te beperken

Versie 2.2 - Deze versie is een update van eerdere versies

Veredelaars, lelietelers, broeiers, handelaren, exporteurs, voorlichters, toetslaboratoria, keuringsdienst en onderzoek hebben vanwege PIAMV nu 2,5 jaar een intensieve interactie met elkaar. Het is de ervaring dat een lichte besmetting met PIAMV vroeg of laat oncontroleerbaar binnen een partij verspreidt en grote risico's voor andere virusvrije partijen oplevert. PIAMV leidt uiteindelijk tot schade tijdens teelt, export en groei. Onderstaande adviezen zijn opgesteld om PIAMV-infecties te voorkomen en verdere verspreiding van het virus tegen te gaan.

De Top-10 adviezen

1. Geef PIAMV en TVX hoge prioriteit en werk met virusvrij materiaal.
 - Er zijn goede ELISA- en PCR-toetsen beschikbaar om de virusstatus van uw partijen te bepalen.
 - Verdiep uzelf in de achtergrond van toetsmethoden en de interpretatie van toetsresultaten.
2. Ruim PIAMV- en TVX-besmette partijen zo snel mogelijk op. Wacht niet totdat het te laat is en de problemen voor uw bedrijf oncontroleerbaar worden.
 - Hoe strenger u voor uzelf en uw bedrijf bent in het beleid omtrent PIAMV en TVX, hoe eerder u eventuele PIAMV- of TVX-problemen hebt opgelost.
 - Veel van de onderstaande bedrijfshygiëne maatregelen en gewasbeschermende maatregelen komen ten gunste van de algehele gewasgezondheid van uw leliepartijen.
3. Zorg voor een goed risico-management systeem op uw bedrijf en geef zoveel mogelijk aandacht aan de aanbevelingen beschreven op de volgende pagina's. Een goede planning en registratie is belangrijk.
4. Verwerk allereerst getoetst virusvrije partijen, daarna risico-partijen, en als laatste PIAMV-of TVX-geïnfecteerde partijen.
5. Virusvrij getoetste partijen die in een omgeving zijn geteeld, verwerkt of ontsmet waar ook PIAMV-of TVX-geïnfecteerde partijen aanwezig zijn (geweest), moeten worden beschouwd als verdachte partijen en verdienen extra aandacht in een volgende teeltseizoen. Controleer met toetsen of deze partijen daadwerkelijk virusvrij blijven.
6. PIAMV en TVX verspreiden o.a. als gevolg van verwonding en beschadiging. Zorg voor een goede afrijping van bollen voorafgaand aan de oogst en zorg voor voldoende wondherstel voordat verwerkte bollen worden gekookt of ontsmet.
7. Ben ervan bewust dat een teelt van virusvrije lelies op een perceel waar voorheen PIAMV- of TVX-besmette lelies gestaan hebben kan leiden tot infecties vanuit de bodem in de nieuwe virusvrije teelt.
8. Bedrijfshygiëne is essentieel. Reinig werkoppervlaktes, machines, kisten, spoelwater, kook- en dompelbaden, handen en handschoenen frequent met ruim water, eventueel aangevuld met zeep.
9. PIAMV is met hitte af te doden (minimaal 10 minuten minimaal 65°C).
10. Deel uw ervaring met uw collega's en onderzoekers; alleen door samenwerking en goede communicatie kunnen we als sector deze complexe puzzel oplossen.

Onderstaande adviezen zijn tot stand gekomen op basis van onderzoek en uitgebreide interactie met veredelaars, lelietelers, broeiers, handelaren, exporteurs, voorlichters, toetslaboratoria en keuringsdienst.

Ervaringen m.b.t. virustoetsen en bemonstering

- Reeds aanwezige virusinfecties zijn betrouwbaar met ELISA in het blad te detecteren.
- Het is de ervaring dat recente infecties met PIAMV of TVX slechts lokaal en niet altijd in de volledige plant betrouwbaar detecteerbaar zijn.
- Infecties die vanuit de grond ontstaan zijn tijdens de teelt aan het blad, en na het rooien van bollen in schubben soms nog lastig aantoonbaar.
- Infecties die tijdens het rooien, spoelen, shaven, verwerken, koken en/of ontsmetten ontstaan, zijn tijdens de aansluitende bewaring van bollen lastig in de bollen of wortels aantoonbaar. Houdt hiermee rekening bij de selectie van bollen voor schubbenteelt of weefselkweek. Een virusvrij getoetste plant of bol is niet gegarandeerd virusvrij. Blijf de virusstatus van dergelijke partijen volgen.
- Verdiep uzelf in de achtergrond van toetsmethoden en de interpretatie van toetsresultaten. Hiervoor organiseert PPO/BQ-Support een cursus.

Adviezen m.b.t. zaadoverdracht PIAMV

- PIAMV is in pollen van virusgeïnfecteerde lelies aanwezig. Vanuit de veredeling is de ervaring gedeeld dat nakomelingen van zaad van PIAMV-besmette lelies ook besmet zijn. Er lijkt daarom een risico te zijn op PIAMV-overdracht tijdens kruisingsactiviteiten en via zaad. Er wordt geadviseerd om de veredelingspopulatie volledig vrij te houden van virus, inclusief PIAMV en TVX.

Adviezen m.b.t. inzet van schubbenteelt of weefselkweek

- Infecties die tijdens het rooien, spoelen, shaven, verwerken, koken en/of ontsmetten ontstaan zijn, of infecties die in een laat stadium vanuit de bodem zijn ontstaan, zijn tijdens de aansluitende bewaring van bollen in de bollen of wortels met ELISA of PCR nog niet betrouwbaar aan te tonen. Houdt hiermee rekening bij de selectie van bollen voor schubbenteelt of weefselkweek. Een virusvrij getoetste plant of bol is niet gegarandeerd virusvrij.
- Een PCR-toets is veel gevoeliger dan een ELISA-toets. Bij de selectie van virusvrij uitgangsmateriaal voor grootschalige vermeerdering verdient PCR-screening de voorkeur boven ELISA-screening.
- Controleer verkregen planten uit schubbenteelt of weefselkweek van aanvankelijk virusvrij getoetste bollen gaandeweg het teeltproces herhaaldelijk met ELISA of PCR om te bevestigen dat deze partij inderdaad virusvrij is.

Adviezen m.b.t. aanwezigheid PIAMV buitenkant blad en bol

- Bij een infectie met PIAMV of TVX is het virus aanwezig op de buitenkant van bladeren, bollen en wortels. Kijk met de ogen en zo min mogelijk met de handen om versmering van het virus te voorkomen.
- Let op werkvolgorde: eerst getoetst virusvrij, daarna risico-partijen, als laatste PIAMV- of TVX-geïnfecteerde partijen.

Adviezen m.b.t. 'kijken met de hand'

- Er zijn vooralsnog geen aanwijzingen dat via besmette handen nieuwe planten besmet kunnen raken. Echter, reinig handen na het aanraken van PIAMV- of TVX-geïnfecteerde planten en bollen grondig met water en zeep of werk bij elke nieuwe partij met nieuwe handschoenen. Let op vuilresten die in poriën, huidrimpels en onder nagels achterblijven.

Adviezen m.b.t. aanwezigheid PIAMV op oppervlakten

PIAMV komt voor aan de buitenkant van bollen en wortels. In onderzoek is PIAMV en TVX aangetroffen op de shaver, rollers, weegtellerbakjes, de telmachine, handschoenen van medewerkers en in leliekratten.

- Let op werkvolgorde: eerst getoetst virusvrij, daarna risico-partijen, als laatste PIAMV- of TVX-geïnfecteerde partijen.
- Reinig oppervlakten regelmatig, maar in ieder geval voorafgaand aan de verwerking van virusvrije partijen met (veel) water, eventueel verwarmd, eventueel aangevuld met zeep. Zorg dat alle plant-, bol- en grondresten verwijderd zijn. Eventuele nareiniging met een geschikt ontsmettingsmiddel of desinfectans kunnen de laatste restjes virus verwijderen.

Adviezen m.b.t. aanwezigheid PIAMV of TVX in (spoel)water

- Let op werkvolgorde: eerst getoetst virusvrij, daarna risico-partijen, als laatste PIAMV- of TVX-geïnfecteerde partijen spoelen/dompelen.
- Spoel met zo laag mogelijke waterdruk om verwonding te voorkomen.
- Gebruik indien mogelijk gescheiden spoellijnen en waterbassins om vuil- en virusbesmet water uit de eerste spoellijnen gescheiden te houden van relatief schoon water uit opvolgende spoellijnen.
- PIAMV in water is af te doden bij verhitting tot 65°C gedurende 10 minuten of 60°C gedurende 30 minuten. Bij een 55°C wordt PIAMV bijna niet afgedood, ook al wordt het virus vele uren verhit. Het is zeer aannemelijk dat deze adviezen ook gelden voor TVX.
- Helder water dat vrij is van zwevende deeltjes kan eventueel ontsmet worden met ozon en/of UV-licht. Vraag de leverancier van ozon en/of UV-licht naar technische details.

Adviezen m.b.t. waardplantenreeks PIAMV en TVX

De waardplantenreeks voor PIAMV en TVX is groot. PIAMV en TVX kunnen ook infecties veroorzaken bij tal van groenbemers, grassen en onkruiden. Zie Hoofdstuk 9 (Waardplantenreeks) voor de details. Er zijn nog geen aanwijzingen dat PIAMV infecties kan veroorzaken bij tulp, Zantedeschia, Agapanthus, Anemone, Aster, Astilbe, Convallaria, Dicentra, Echinacea, Geranium, Hosta, Hemerocallis en Iris.

- Houd bij een PIAMV- of TVX-besmette partij het perceel tijdens de teelt zo goed als mogelijk onkruidvrij. Let daarbij vooral op de onkruiden die waardplant zijn voor deze twee virussen. Voorkom zaadzetting bij (deze) onkruiden.
- Verwijder bij het rooien van een PIAMV- of TVX-besmette partij zo veel mogelijk wortelresten uit het perceel.
- Houd aansluitend op de teelt van een PIAMV- of TVX-besmette partij het perceel zo goed als mogelijk onkruidvrij. Voorkom ook zaadzetting bij onkruiden. Plant eventueel een groenbemester die *GEEEN* waardplant is in plaats van onkruid en zorg voor een gezond bodemleven met voldoende microbiële activiteit. Vatbaarheid van groenbemers voor PIAMV en TVX is op dit moment een grote onzekerheid en heeft volle aandacht in onderzoek.
- Houd er rekening mee dat PIAMV- en TVX besmettingen ook in de kas in de grond achter kunnen blijven en ben alert op onkruid dat in de kas voor virusreservoirs kan zorgen. Met stomen kunnen deze besmettingen en onkruiden bestreden worden.

Een aantal zaken m.b.t. virusreservoirs in onkruiden en groenbemers wordt nader onderzocht:

- Wat is het risico op virusoverdracht via zaad bij onkruiden en groenbemers die waardplant voor deze virussen zijn?
- Wat zijn de korte termijn en lange termijn risico's op virusinfecties wanneer er na een teelt van bijv. een virusbesmette groenbemester weer lelie of tulp (in het geval van TVX) wordt geteeld?

Adviezen m.b.t. machinale teeltwerkzaamheden (planten, koppen, afmaaien en rooien)

Ondanks dat het risico voor virusverspreiding tijdens planten, machinaal koppen, afmaaien en rooien beperkt lijkt te zijn, wordt geadviseerd rekening te houden met werkvolgorde:

- Verwerk eerst virusvrije partijen, daarna verdachte partijen en als laatste virusgeïnfecteerde partijen.
- Reinig machines regelmatig, maar in ieder geval voorafgaand aan de verwerking van virusvrije partijen met (veel, eventueel verwarmd) water, eventueel aangevuld met zeep. Zorg dat alle plant-, bol- en grondresten verwijderd zijn. Eventuele nareiniging met een geschikt ontsmettingsmiddel of desinfectans kunnen de laatste restjes virus verwijderen.

Advies m.b.t koppen en afmaaien

- Kop en maai partijen besmet of verdacht voor infectie met PIAMV of TVX wanneer het gewas droog is en indien mogelijk bij warm weer, blauwe hemel en enige wind. Onder deze omstandigheden is het risico op verspreiding het minst.

Adviezen m.b.t. spoelen, shaven en verwerken van bollen

- Verwerk eerst virusvrije partijen, daarna verdachte partijen en als laatste virusgeïnfecteerde partijen. Realiseer de omvang van de kapitaalvernietiging wanneer virusvrije partijen virusgeïnfecteerd raken wanneer deze na viruszieke partijen gespoeld worden. Vraag u echt af of u überhaupt nog met viruszieke partijen wilt blijven werken en virusrisico's op uw bedrijf wilt behouden.
- Rooi PIAMV- of TVX-geïnfecteerde partijen zo laat mogelijk zodat de bol zo veel mogelijk in rust is en weinig vocht (en virus) verliest tijdens het spoelen, shaven en verwerken. Laat gerooide partijen lijken in sommige gevallen minder gevoelig te zijn voor infectie.
- Werk met zo laag mogelijke waterdruk om beschadiging van bollen te voorkomen.
- Bouw de waterdruk op de spoellijn in de loop van de spoellijn op zodat eerst met een lage waterdruk en beperkte beschadiging het grootste gedeelte van zand van de bollen wordt afgespoeld.
- Maak van het spoelwater geen 'virussoep'. Werk daarom met grote volumes water, en indien mogelijk, met verschillende watercircuits. Gebruik liefst gescheiden watersystemen voor plantgoed en leverbaar. Gebruik relatief vuil water aan het begin van de spoellijn en (relatief) schoon water voor de laatste stappen van de spoellijn.
- Reinig de verwerkingslijnen regelmatig, maar in ieder geval tussen het verwerken van verdachte of PIAMV-geïnfecteerde partijen. Het grondig verwijderen van alle grond- en plantresten met ruim water moet voldoende zijn. Nareiniging met een effectief reinigingsmiddel kan wenselijk zijn.
- Laat de wondjes en beschadigingen die tijdens spoelen, shaven en verwerken van bollen ontstaan eerst ruim voldoende herstellen voordat de bollen aansluitend worden ontsmet in een dompelbad. De duur van dit wondherstel is van vele factoren afhankelijk en moet op locatie beoordeeld worden.

Adviezen m.b.t. schubbenteelt bij lelies

Bij mechanisch ontschubben vindt veel verwonding van weefsel plaats. Ondanks dat dit niet met onderzoek is bevestigd, wordt verwacht dat er tijdens het mechanisch schubben van PIAMV- of TVX-geïnfecteerde bollen virusverspreiding binnen partijen, maar ook tussen partijen kan optreden.

- Let op werkvolgorde bij mechanisch schubben: eerst getoetst virusvrij, daarna risico-partijen, als laatste PIAMV-geïnfecteerde partijen.
- Vraag u ernstig af of schubbenteelt van PIAMV- of TVX-geïnfecteerde partijen (zelfs lage percentages infectie) ongewenste risico's voor uw bedrijf veroorzaken.
- Wanneer er tijdens spoelen, shaven, en/of verwerken virusverspreiding heeft opgetreden, dan is het aannemelijk dat deze infecties in de buitenste schubben heeft opgetreden (de buitenste schubben beschadigen meer dan de binnenste schubben). Gebruik indien mogelijk niet de buitenste beschadigde schubben bij schubbenteelt.
- Reinig machines voor mechanisch schubben tussen (PIAMV- of TVX-geïnfecteerde) partijen grondig met veel water (eventueel verwarmd, eventueel aangevuld met zeep). Zorg dat alle plantresten verwijderd zijn. Eventuele nareiniging met een geschikt ontsmettingsmiddel of desinfectantia kunnen de laatste restjes virus verwijderen.
- Bij het uitschudden van nieuwe bolletjes ontstaan er wondjes. De risico's van beschadiging bij schubbenteelt in potgrond zijn lager dan bij gebruik van Vermiculite. De risico's op beschadiging zijn het grootst bij gebruik van Perlite. Er lijkt aanzienlijke virusverspreiding op te kunnen treden wanneer aansluitend op het uitschudden een ontsmetting in een dompelbad plaats vindt. Laat daarom wondjes lang genoeg herstellen voordat de bolletjes eventueel ontsmet worden in een dompelbad.
- Bij kale schubbenteelt treedt virusverspreiding tijdens het uitschudden van nieuwe bolletjes niet op en is daarmee waarschijnlijk veiliger ter voorkoming van virusverspreiding.
- Vanuit virusvrije partijen treedt geen virusverspreiding op. Let wel op bij hergebruik van ontsmettingsbaden.

Adviezen m.b.t. koken en ontsmetten van leliebollen

- Zorg ervoor dat bollen voldoende zijn hersteld zijn van recente verwondingen of beschadigingen voordat bollen gekookt of ontsmet worden. Alleen dan kan het risico op infectie met PIAMV of TVX worden beperkt.
- Het is onduidelijk of er tijdens het koken en ontsmetten van bollen virusopname door wortels plaats vindt. Houd daarom rekening met werkvolgorde: allereerst partijen vrij van virus koken en/of ontsmetten, aansluitend risicovolle partijen en als laatste virusgeïnfecteerde partijen. Vraag u echter af of u überhaupt nog met viruszieke partijen wilt blijven werken en virusrisico's op uw bedrijf wilt behouden.
- Houd er rekening mee dat gedurende het koken en/of ontsmetten van geïnfecteerde bollen de virusconcentratie in het kook- en ontsmettingsbad toe zal nemen. Ververs daarom op tijd dit bad.
- PIAMV in water is af te doden bij verhitting tot 65°C gedurende 10 minuten of 60°C gedurende 30 minuten. Bij een 55°C wordt PIAMV bijna niet afgedood, ook al wordt het virus vele uren verhit. Het is zeer aannemelijk dat deze adviezen ook gelden voor TVX. Raadpleeg de leverancier/fabrikant van de middelen in het kook- of dompelbad of de middelen bestand zijn tegen deze temperatuursverhoging. Controleer of bij verhitting daadwerkelijk de 65°C wordt bereikt.

Adviezen ter voorkoming van virusinfectie vanuit de grond en verspreiding via de bodem

Er zijn omstandigheden waarbij verspreiding en infectie van PIAMV of TVX via de bodem optreedt. Deze bodemgebonden virusverspreiding kan tijdens de teelt op het veld en in de broei binnen een partij plaatsvinden, maar ook tussen treks en dus tussen opeenvolgende partijen. Er zijn geen aanwijzingen dat een bodemgebonden vector betrokken is bij deze virusverspreiding. De volgende preventieve maatregelen worden voorgesteld om bodemgebonden virusverspreiding te beperken of te voorkomen:

- Werk zo veel als mogelijk met schone grond waarop niet eerder PIAMV- of TVX-geïnfecteerde lelies hebben gegroeid.
- Vraag af of hergebruik van grond waarop PIAMV- of TVX-geïnfecteerde partijen hebben gestaan vermeden kan worden. Registreer duidelijk de teelt- of broeilocatie van PIAMV- of TVX-geïnfecteerde partijen.
- Houd tijdens buitenteelt en broei rekening met goede afwatering en voorkom te vochtige grond.
- Zorg voor een goede onkruidbestrijding in verband met mogelijke alternatieve waardplanten voor PIAMV en TVX.
- Eventuele betrokkenheid van *Pratylenchus* aaltjes bij de bodemgebonden verspreiding is vooralsnog niet aannemelijk. Bestrijd desondanks dit aaltje zorgvuldig bij teelt van PIAMV- en TVX-geïnfecteerde partijen.
- Voorkom doorwortelen in de ondergrond van onderuit de kist. Plaats kistenteelt eventueel los van de ondergrond.
- Infectieuze (kas)grond kan ontsmet worden door goed te stomen. Zorg ervoor dat de temperatuur overal voldoende lang voldoende hoog is geweest (minimaal 10 minuten minimaal 65°C).
- Reinig ook de kisten grondig met veel water, en eventueel zeep. Een warmwaterbehandeling van kisten is effectief (minimaal 10 minuten minimaal 65°C).
- Let op de virusstatus (LMOV en LSV) van de nieuwe partij lelies bij hergebruik van grond waarop eerder een PIAMV-geïnfecteerde partij is gebroeid. Wanneer grondgebonden infectie optreedt in een partij die reeds met LMOV en/of LSV is geïnfecteerd (maar desondanks weinig visuele schade geeft), ontstaat alsnog grote gewasschade als gevolg van dubbelinfecties met PIAMV of TVX.

TVX-besmetting vanuit voorgaande tulpenteelt

Het is aannemelijker dat TVX-infectie bij lelie vanuit een groenbemester of een onkruid zijn ontstaan, dan dat een TVX-besmette tulp zelf de directe infectiebron is geweest.

- Hergebruik tulpengrond waarop in het verleden TVX-tulpen zijn geteeld niet aansluitend voor lelieteelt
- Hergebruik tulpengrond waarop in het verleden TVX-tulpen zijn geteeld en aansluitend een groenbemester vatbaar voor TVX is geteeld niet voor lelieteelt.
- Hergebruik kookbaden en ontsmettingsbaden die potentieel besmet kunnen zijn met TVX nooit voor de ontsmetting van leliemateriaal. Reinig deze baden eerst grondig.

Een opplantmonster is minstens zo informatief als een boltoets

Voor het aantonen van infecties die tijdens rooien, spoelen, verwerken en ontsmetten van bollen hebben kunnen plaatsvinden is een nateelt nodig via een opplantmonster. Het is belangrijk dat deze nateelt plaatsvindt in schone kisten, in verse potgrond en dat de teelt los van de ondergrond staat om eventuele virusinfecties vanuit de bodem te voorkomen. Na de bloei kan met een ELISA-bladtoets het viruspercentage betrouwbaar worden bepaald.

Adviezen voor broeierij

Bij de aankoop van partijen kunnen potentiële risico's op PIAMV- en TVX-schade op voorhand mogelijk al voorkomen worden door rekening te houden met de volgende zaken en daarover met de leverancier over te communiceren:

- Koop virusvrij. Vraag naar toetsuitslagen, ook voor PIAMV en TVX (bladtoets, boltoets, overige informatie)
- Wees alert bij 'probleem' cultivars die relatief snel/eenvoudig schade vertonen
- Laat je informeren over de PIAMV- en TVX-status op teelt- en verwerkingslocatie (zowel op productielocatie als op verwerkingslocatie).
- Laat je informeren over het moment van rooien (rooidatum), laat gerooide partijen lijken in sommige gevallen minder gevoelig te zijn voor infectie.
- Laat je informeren over de manier van verwerken – een rusttijd tussen verschillende stappen lijkt PIAMV-infectie te beperken.

Een PIAMV-infectie bij lelie veroorzaakt lang niet altijd de visuele symptomen. Met diverse maatregelen kan symptoomvorming in beperkte mate onderdrukt worden:

- Teel niet bij te lage kasttemperatuur (lager dan 12°C).
- Voorkom grote temperatuurschommelingen door voldoende bij te warmen bij lage (buiten) temperaturen
- Zorg voor voldoende licht op dagen dat de dagen kort of donker zijn
- Bij suboptimale bemesting vindt minder symptoomontwikkeling plaats t.o.v. (te) veel bemesting
- Bij lagere luchtvochtigheid worden minder symptomen waargenomen dan tijdens teelt bij hoge luchtvochtigheid
- Er zijn duidelijke verschillen in schade en type symptomen tussen cultivar.
- Let op de virusstatus (LMoV en LSV) van de nieuwe partij lelies bij hergebruik van grond afkomstig van een PIAMV-geïnfecteerde partij. Wanneer grondgebonden infectie optreedt in een partij die al met LMoV en/of LSV is geïnfecteerd (en desondanks weinig visuele schade geeft), ontstaat alsnog grote gewasschade als gevolg van dubbelinfecties met PIAMV.

12 Geraadpleegde documenten

- De Kock M, Vink P, Lemmers M, Pham, K, Kok, H (2010) Voortgezet Diagnostisch Onderzoek - Identificatie en inventarisatie *Plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV) in lelie. PT project 13891 en 13834.18.
- De Kock M, Kok H, Van Aanholt H, Lemmers M, Pham K (2012a) Onderzoek naar herkomst en verspreidingsroutes van *Plantago asiatica* mozaïekvirus (PIAMV). PT project 14135.
- De Kock M, Kok H, Van Aanholt H, Van der Lans A, Lemmers M & Slootweg C (2012b) Onderdrukking symptoomvorming PIAMV tijdens broei van lelies. PT project 14518.
- De Kock M, Kok H, Van Aanholt H, Lemmers M, Lommen S, Pham K, Hollinger T, De Boer A & Slootweg C (2013) Aanvullend onderzoek naar verspreidingsroutes en mogelijkheden voor beheersing van PIAMV. PT-project 14483.
- Mowat, W. P. (1982), Pathology and properties of tulip virus X, a new potexvirus. *Annals of Applied Biology*, 101: 51–63.
- Yamaji Y, Maejima K, Komatsu K, Shiraishi T, Okano Y, Himeno M, Sugawara K, Neriya Y, Minato N, Miura C, Hashimoto M, and Namba S (2012) Lectin-Mediated Resistance Impairs Plant Virus Infection at the Cellular Level. *Plant Cell* 24(2): 778–793.

Bijlage 1 – Factsheet ‘Gebruik PIAMV-toetsen’

Factsheet gebruik PIAMV-toetsen

Toetsen voor PIAMV zijn een onderdeel van een kwaliteitssysteem om virusrij materiaal te produceren. Op basis van toetsuitslagen worden beslissingen gemaakt over de bestemming en gebruik van een partij. Het onderstaande overzicht met beschikbare toetsen voor PIAMV helpt bij het begrijpen van de verschillende toetsen die voor PIAMV beschikbaar zijn. In het tweede overzicht wordt per moment in de productiefase van lelies advies gegeven welke PIAMV-toetsen ingezet zouden moeten worden om met de grootst mogelijke betrouwbaarheid de virusstatus van een partij lelies te bepalen.

Beschikbare toetsen voor PIAMV	
	Omschrijving
1. ELISA-toets blad	Betrouwbare toets, toont PIAMV-infecties aan welke aanwezig waren voorafgaand aan het planten van de bol. Recente infecties kunnen mogelijk deels met een bladtoets aangetoond worden. Het is echter ook bekend dat, met name infectie via de bodem, nog onvoldoende goed gedetecteerd worden door de ELISA-toets op blad. Geschikt voor percentage bepaling en opgenomen in de jaarlijkse bladtoets van de BKD.
2. ELISA-toets schubben	Minder geschikte toets die weinig toevoegt ten opzichte van de bladtoets voor het bepalen van een percentage PIAMV. Hoewel de toets in principe nieuwe infecties kan aantonen, valt dit in de praktijk tegen. Slechts een deel van schubben van een geïnfecteerde bol tonen ELISA positief. Daarom worden PIAMV-zieke bollen gemist.
3. PCR-toets blad	Betrouwbare toets maar minder gangbaar dan ELISA. Toont PIAMV-infecties aan welke aanwezig waren voorafgaand aan het planten van de bol aan. Toont waarschijnlijk ook al recente PIAMV-infecties aan welke tijdens de teelt hebben opgetreden. Analyse van bulkmonsters of mengmonsters is goed mogelijk. Hygiëne tijdens bemonsteren van blad is erg belangrijk.
4. PCR-toets schubben	Betrouwbare toets, toont PIAMV-infecties aan welke tijdens de teelt reeds aanwezig waren en infecties welke tijdens de teelt zijn opgetreden als gevolg van bodemgebonden en mechanische verspreiding. Recente infecties die tijdens het rooien, spoelen, aquagrader, shaver, ontsmetten, koken zijn opgetreden kunnen soms ook al met de PCR-toets op schubben worden aangetoond. Hygiëne tijdens bemonsteren van schubben, en het maken van mengmonsters is erg belangrijk. Gangbare toetsen zijn: A. per stuk, geschikt voor selectie B. als bulk (mengmonster van 240 schubben), uitslag ziek of gezond C. mengmonsters van 12 stuks (120 schubben als 10 x12 stuks), geeft inzicht in percentage besmetting, tevens selectie mogelijk.
5. Nateelt gevolgd door ELISA-toets op blad	Dit geldt als de gouden standaard m.b.t. inzicht krijgen over de PIAMV-status van een partij. Infecties die tijdens het rooien, spoelen, aquagrader, shaver, ontsmetten, koken zijn opgetreden, kunnen enkele weken na opkomst van het gewas in een nateelt met ELISA op bladmonsters worden aangetoond. Houd er bij de nateelt rekening mee dat zelfs tijdens teelt in nieuwe potgrond er virusstof binnen een partij kan plaatsvinden (de partij is dan al wel PIAMV-besmet).



PRAKTIJKONDERZOEK
PLANT & OMGEVING
WAGENINGEN UR



BKD
UN-SCHAPEL IN KWALITEIT



BQ Support

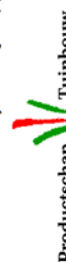


Productschap
Tuinbouw

Moment in productiefase lelies	Opmerkingen	Meest geschikte toets voor bepalen PIAMV-status
Veredeling	Veredeling uitsluitend met PIAMV-vrije vader- en moederplanten	<ul style="list-style-type: none"> ELISA-toets blad
Inzetten van weefselweek	Zowel de ondernemer als het weefselweekbedrijf hebben de verantwoordelijkheid om getoetst PIAMV-vrij materiaal in te (laten) zetten voor vermeerdering.	<ul style="list-style-type: none"> PCR-toets schubben
Vermeerdering via weefselweek	Tijdens weefselweek moet de virusvrijstatus gemonitord worden.	<ul style="list-style-type: none"> PCR-toets op weefselweekmateriaal
Aankoop van weefselweekmateriaal	Zowel de ondernemer als het weefselweekbedrijf hebben de verantwoordelijkheid om getoetst PIAMV-vrij materiaal in de markt te zetten of aan te kopen.	<ul style="list-style-type: none"> PCR-toets op weefselweekmateriaal
Schubbenteelt (kale schub)	Selectie van virusvrije partijen op basis van ELISA-uitslag bladtoets tijdens voorafgaande teelt. De virusvrije status moet voorafgaand aan het inzetten van de schubbenteelt herbevestigd worden met een PCR-toets op schubben. Zodra plantgoed bovengronds komt, is het verstandig de virusvrije status te herbevestigen met een ELISA-toets op blad.	<ol style="list-style-type: none"> ELISA-toets op blad, gevolgd door Herbevestiging met PCR-toets schubben. Herbevestiging met ELISA-toets op blad in volgend seizoen.
Schubbenteelt (in potgrond, vermiculite, perlite)	Selectie van virusvrije partijen op basis van ELISA-uitslag bladtoets tijdens voorafgaande teelt. De virusvrije status moet voorafgaand aan het inzetten van de schubbenteelt herbevestigd worden met een PCR-toets op schubben. Het is verstandig om de virusvrije status van de nieuw gevormde bolletjes na ontsmetten te herbevestigen met een PCR-toets op een mengmonster van nieuwe bolletjes.	<ol style="list-style-type: none"> ELISA-toets op blad, gevolgd door Herbevestiging met PCR-toets schubben. Herbevestiging met PCR-toets op nieuwe bolletjes na ontsmetten (kan mengmonster zijn).

Moment in productiefase lelies	Opmerkingen	Meest geschikte toets voor bepalen PIAMV-status
Kwaliteitskeuring te velde	Naast het toetsen van een aselekt monster, kan het gericht toetsen van planten met afwijkende symptomen de kans vergroten PIAMV-geïnficeerde planten te identificeren.	<ul style="list-style-type: none"> ELISA-toets blad
Kwaliteitsbepaling na rooien, spoelen, aquagrader, shaver, ontsmetten, koken.	<p>Tijdens het rooien, spoelen, aquagrader, shaver, ontsmetten, koken kan virusverspreiding binnen partijen plaatsvinden. Ook kan er infectie vanuit andere partijen virusinfecties optreden. Houdt strikte werkolgorde aan waarbij men de virusstatus van een partij baseert op basis van de ELISA-toets op blad uit afgelopen teelt. Laat virusvrije partijen niet in aanraking komen met partijen die PIAMV-besmet zijn. Laat virusvrije partijen ook niet in aanraking komen met machines, water, kookbaden, kisten, enz. die gebruikt zijn voor PIAMV-geïnficeerde partijen.</p> <p>Bij elke risicovolle handeling kan er virusinfectie optreden. Het risico wordt met name bepaald door de virusbesmetting op machines, oppervlakten en dompel/kookbaden. Het gebruik van PCR-toetsen moet met verstand toegepast worden en alleen wanneer er aanleiding is om recente infecties met toetsen zichtbaar te krijgen.</p> <p>Er wordt geadviseerd opplantmonsters voor nateelt achter te houden wanneer partijen van eigenaar veranderen. De gouden standaard (opplant gevolgd door ELISA-toets op blad) kan worden toegepast om discussies over virusinfectie op specifieke locaties in de keten te ondersteunen. Een goede tracking and tracing en onderling vertrouwen is bij dergelijke discussies van essentieel belang.</p>	<ul style="list-style-type: none"> PCR-toets schubben Gouden standaard: nateelt in kas gevolgd door ELISA-toets op blad
Broei – voorafgaand aan planten	Een broeier kan voorafgaand aan het inzetten van de broei m.b.v. een PCR-toets op een mengmonster van schubben bepalen of de partij virusvrij is.	<ul style="list-style-type: none"> PCR-toets schubben
Broei – tijdens de teelt	Een broeier kan tijdens de broei m.b.v. een ELISA-toets op blad bepalen of de partij virusvrij is.	<ul style="list-style-type: none"> ELISA-toets blad

1 augustus 2012
Maarten de Kock (PPO)
Ton van Schadewijk (BKD)
Dirk Frijlink (BQ Support)



Bijlage 2 - Vragenlijst voor bodemgebonden verspreiding

Vragenlijst t.b.v. in beeld brengen bodemgebonden verspreiding tijdens teelt & broei

Om het onderzoek naar bodemgebonden verspreiding van PIAMV voort te zetten, hebben wij uw hulp nodig en informatie. Zou u zo vriendelijk willen zijn de onderstaande tabel in te vullen en deze retour te sturen aan maarten.dekock@wur.nl of casper.slootweg@wur.nl.

Let op: alle gegevens worden vertrouwelijk behandeld. Er zal nooit worden gecommuniceerd over cultivar- en/of bedrijfsnamen.

Basis info:

Naam:	
Telnr.	
Email.	
Teler/export/broei	
1. Zieke partij geteeld?	
2. Zo ja: Cultivar(s)?	
3. Zo ja: Symptomen	
4. Zo ja: Aanwijzingen voor virustoename tijdens teelt	
5. Visueel, of ook met toetsen bevestigd?	
6. Zo ja: virusinfectie in volgende trek?	
7. Zo ja: welke cultivar(s)?	
8. Visueel, of ook met toetsen bevestigd?	
9. Is er ondertussen gestoomd na PIAMV-trek?	
10. Onkruidgroei in kas of veld?	
11. Type grond?	
12. Kistenteelt of vollegrond (broei)?	
13. Opvallende zaken omtrent teelt- of broeisomstandigheden?	
14. Aanwijzingen voor <i>Pratylenchus penetrans</i> in de partij of bodem?	
15. Stomen: op welke wijze wordt er gestoomd?	
16. Opvallende zaken te melden bij grond?	
17. Bij kistenteelt: alleen grond en kisten of ook ondergrond?	
18. Teeltgrond beschikbaar voor onderzoek?	
19. Broeierijgrond beschikbaar voor onderzoek?	
20. Kasruimte beschikbaar voor onderzoek?	

Bijlage 3 – Resultaten bodemanalyse

Tabel 19. Bodemanalyse van negen teeltlocaties welke gebruikt zijn voor onderzoek naar de risico's op infectie vanuit een perceel waarin in het verleden PIAMV-besmette lelies zijn geteeld (Hoofdstuk 0). Locatie #3 ontbreekt.

		Eenheid	Streef traject	Gemiddelde	Locatie								
					1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hoofd-elementen	Stikstof-totaal	mg N/kg			2100	1030	1510	1320	810	930	8550	4210	350
	C/N-ratio		13-17	14	18	17	13	19	7	12	16	42	12
	N-leverend vermogen	kg N/ha	93-147	75	108	65	125	67	101	84	227	-30	34
	Zwavel-totaal	mg S/kg			330	150	290	260	210	170	2100	1780	220
	C/S-ratio		50-75		114	115	69	96	28	64	66	100	19
	S-leverend vermogen	kg S/ha	20-30	29	10	5	22	13	27	15	45	26	31
	P-beschikbaar	mg P/kg	1.6-4.5	4.5	4	1.2	3.6	4.1	5.5	19.5	26.2	37	3
	P-bodemvoorraad (P _{mg} P2O5/100)		20-35	38	69	36	90	44	42	116	107	38	23
	P-buffering		17-27		17	30	25	11	8	6	4	1	8
	Pw	mg P2O5/l			62	34	72	48	50	125	136	124	33
	K-beschikbaar	mg K/kg	70-110		92	15	134	109	55	54	238	323	28
	K-getal			18	28	7	36	31	14	15	60	25	9
	K-bodemvoorraad	mmol+/kg	1.9-3.0		2	1.2	3.3	1.7	2.6	1.6	10	21.6	1.4
	Ca-beschikbaar	kg Ca/ha	214-499		<24	<27	212	26	29	56	216	<30	236
Ca-bodemvoorraad	kg Ca/ha	2925-4390		2460	1485	5440	2325	2780	1785	18735	9430	1920	
Mg-beschikbaar	mg Mg/kg	20-30	36	125	28	75	54	48	36	738	1040	48	
Na-beschikbaar	mg Na/kg	49-77	11	7	9	11	5	11	<6	99	94	6	
Sporen-elementen	Mn-beschikbaar	ug Mn/kg	5800-8000		2220	2820	1420	5070	350	3330	550	2330	530
	Cu-beschikbaar	ug Cu/kg	40-65		29	<20	20	21	<20	58	34	37	<20
	Co-beschikbaar	ug Co/kg	25-50		12	8.9	<2.5	35	<2.5	17	3.7	10	2.8
	Se-beschikbaar	ug Se/kg	3.5-4.5		2	<2.1	<2.1	<2.1	<2.1	<2.1	<2.2	<2.3	<2.1
	B-beschikbaar	ug B/kg	113-160		<76	<76	<76	<76	<76	<76	560	282	<76
	Zn-beschikbaar	ug Zn/kg			1750	1190	1080	3490	320	5910	390	650	480
	Zn-getal		35-45		36	37	38	42	42	54	31	20	46
	Si-beschikbaar	ug Si/kg	6000-32000		10330	<3020	3810	<3020	5610	6390	19930	12710	6330
	Mo-beschikbaar	ug Mo/kg	100-5000		<4	<4	<4	3	<4	<4	269	5	<4
	Fe-beschikbaar	ug Mn/kg	2500-4500		8890	<3020	<3030	<3020	<3020	<3020	<3170	<3340	<3020
Fysisch	Zuurgraad		>5.4	7.1	5	4.9	5.6	4.6	6.5	5	7.1	5.8	6.9
	C-organisch	%			3.8	1.7	2	2.5	0.6	1.1	13.9		0.4
	Organische stof	%		1.6	7.5	3.5	4	5	1.2	2.2	27.8	35.5	0.8
	C-anorganisch	%			0.03	0.03	0.04	0.03	0.04	0.03	0.54	0.2	0.2
	Koolzure kalk	% CaCo3			<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	3.8	1.1	1.1
	Klei	%			1	<1	2	1	1	<1	8	5	<1
	Silt	%			7	10	12	6	12	9	18	3	2
	Zand	%			85	87	82	88	86	89	42	55	96
Klei-humus (CEC)	mmol+/kg	>100	70	60	32	97	57	46	34	547	389	30	
CEC-bezetting	%	>95	92	84	85	99	78	100	92	99	100	100	
Biologisch	Bodemleven	mg N/kg	60-80		76	23	30	28	37	23	149	<1	22
Fysisch	Klei-humus (CEC)	mmol+/kg	>100		60	32	97	57	46	34	547	389	30
	Ca-bezetting	%			69	69	85	64	83	74	82	75	87
	Mg-bezetting	%			11	11	9.6	9.8	11	12	14	16	8.3
	K-bezetting	%			3.3	3.8	3.4	3	5.7	4.7	1.8	5.6	4.7
	Na-bezetting	%			1	1.3	0.6	0.9	1.1	0.9	1.6	3.2	<0.1
	H-bezetting	%			0.2	0.3	<0.1	0.5	<0.1	0.3	<0.1	<0.1	<0.1
	Al-bezetting	%			<0.1	0.2	<0.1	2.9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	verslemping	rapport cijfer	6.0-8.0		8.5	7.7	7.8	8	7.2	7.4	10	10	7.2

Tabel 20. Nematode-analyse van negen teeltlocaties welke gebruikt zijn voor onderzoek naar de risico's op infectie vanuit een perceel waarin in het verleden PIAMV-besmette lelies zijn geteeld (Hoofdstuk 0). Locatie #3 ontbreekt.

Soort	type aaltje	Locatie, aantal per 100 ml grond								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aphelenchoidesgroep	Bladaaltje	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ditylenchus destructor	Destructoraaltje	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ditylenchus dipsaci **)	Stengelaaltje	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ditylenchusgroep	Ditylenchusgroep	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Helicotylenchusgroep	Vrijlevend wortelaaltje	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemicycliophoragroep	Vrijlevend wortelaaltje	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Meloidogynegroep	Wortelknobbelaaltje	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paratrichodorus pachydermus	Vrijlevend wortelaaltje	0	3	0	33	0	0	0	0	0
Paratrichodorus teres	Vrijlevend wortelaaltje	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Meloidogyne naasi	Graswortelknobbelaaltje	96	0	0	0	7	0	1	0	0
Paratylenchus projectus	Vrijlevend wortelaaltje	335	0	0	0	0	0	0	0	0
Paratylenchus crenatus	Graanwortellesieaaltje	39	5	64	2	0	0	0	0	0
Paratylenchus neglectus	Bietenwortellesieaaltje	2	0	4	0	0	0	0	0	0
Paratylenchus penetrans	Gewoon wortellesieaaltje	0	11	3	4	0	0	0	0	0
Radopholusgroep	Wortelnecroseaaltje	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rotylenchusgroep	Vrijlevend wortelaaltje	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trichodorus simillis	Vrijlevend wortelaaltje	0	7	0	0	0	0	0	0	0
Trihodoridaegroep	Vrijlevend wortelaaltje	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tylenchorhynchus dubius	Vrijlevend wortelaaltje	0	0	20	0	0	0	0	0	0
Tylenchorhynchus spp	Vrijlevend wortelaaltje	5	0	0	0	0	0	0	0	0

Soort	type aaltje	Locatie, aantal per 200 ml grond								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Longidorusgroep	Vrijlevend wortelaaltje	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Xiphinemagroep	Vrijlevend wortelaaltje	0	0	0	0	0	0	0	0	0