PRAKTIJKONDERZOEK
PLANT & OMGEVING
WAGENINGEN UR

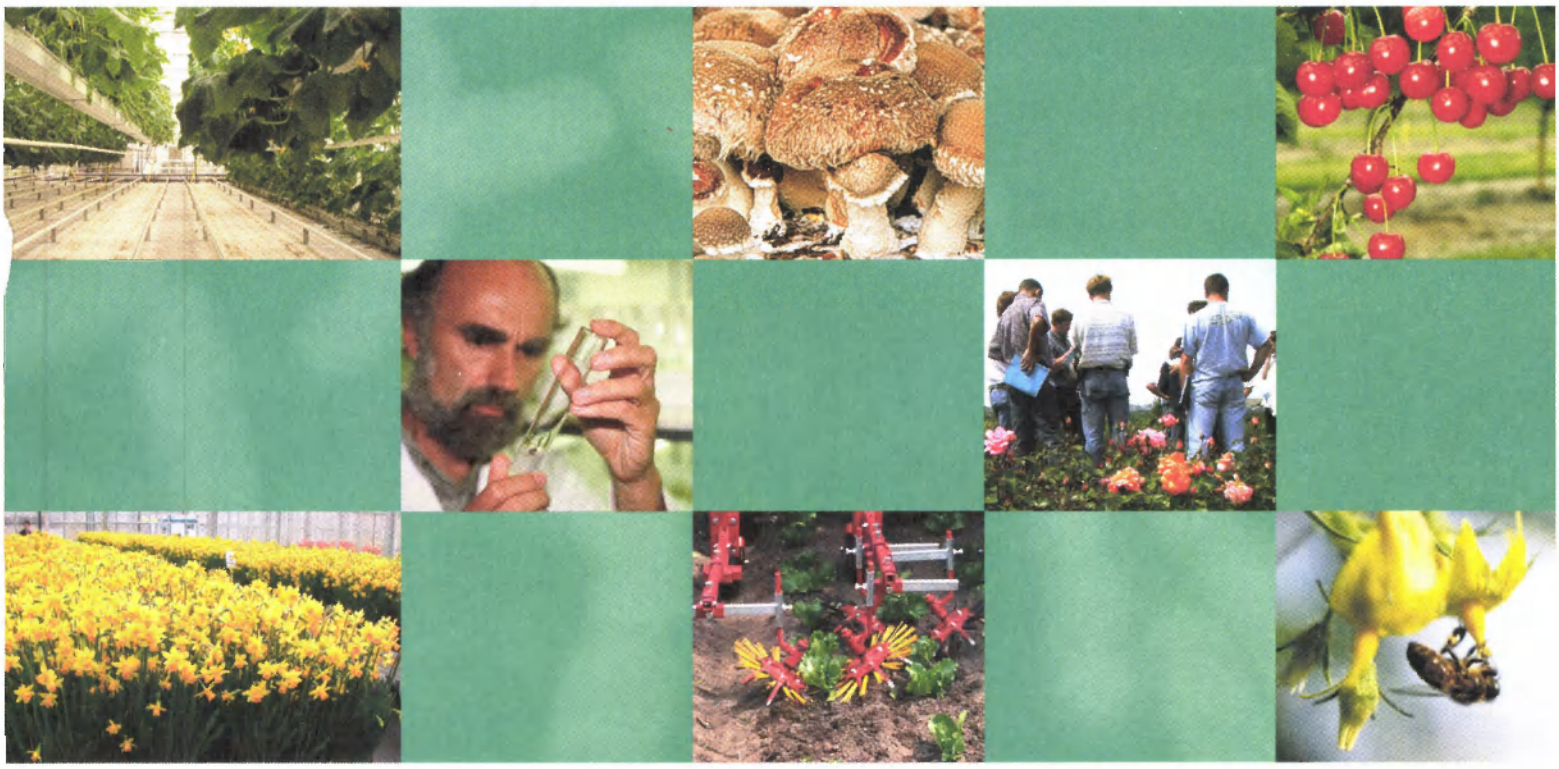
IR
311215
2006

Hosta Virus X in Hosta's

Onderzoek naar toetsmogelijkheden in rustfase en risico's bij mechanische teelthandelingen

Ing. Pieter van Dalfsen, Ir. Toon Derks, Miriam Lemmers en Linda van Dalen-Sanders

Vertrouwelijk!



Productschap Tuinbouw

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
Augustus 2006

Projectnummer 311215

2281637

© 2006 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
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 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit is een vertrouwelijk document, uitsluitend bedoeld voor intern gebruik binnen PPO dan wel met toestemming door derden. Niets uit dit document mag worden gebruikt, vermenigvuldigd of verspreid voor extern gebruik.

Productschap Tuinbouw

Projectnummer: 311215

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
Adres : Prof. van Slogterenweg 2, Lisse
: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 - 46 21 21
Fax : 0252 - 46 21 00
E-mail : infobomen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING 6

1 INLEIDING 8

2 TOETSEN OP HVX TIJDENS RUSTPERIODE 10
2.1 Inleiding 10
2.2 Opzet 10
2.3 Resultaten 10
2.4 Discussie en conclusie 12

3 RISICO'S VAN TEELTHANDELINGEN 14
3.1 Algemene opzet van onderzoek 14
3.2 Bovengronds afmaaien voor rooien 15
3.2.1 Opzet 15
3.2.2 Resultaten 15
3.2.3 Discussie 16
3.3 Machinaal rooien 16
3.3.1 Opzet 16
3.3.2 Resultaten 16
3.3.3 Discussie 17
3.4 Sorteren en inkorten van planten 17
3.4.1 Opzet 17
3.4.2 Resultaten 18
3.4.3 Discussie 18
3.5 Spoelen van planten 18
3.5.1 Opzet 18
3.5.2 Resultaten 19
3.5.3 Discussie 19
3.6 Warmwaterbehandeling 20
3.6.1 Opzet 20
3.6.2 Resultaten 20
3.6.3 Discussie 21
3.7 Mechanische onkruidbestrijding 22
3.7.1 Opzet 22
3.7.2 Resultaten 22
3.7.3 Discussie 23
3.8 Planten uitsteken tijdens selecteren 24
3.8.1 Opzet 24
3.8.2 Resultaten 25
3.8.3 Discussie 25
3.9 Conclusies 25

BIJLAGE 1: STATISTIEK 28

Samenvatting

Hosta Virus X (HVX) is in korte tijd een actuele bedreiging gaan vormen voor de teelt van Hosta. Soms is de ziekte duidelijk te zien, maar in bepaalde gevallen kan het lastig zijn om symptomen te ontdekken en te herkennen. Juist omdat de ziekte zich niet altijd duidelijk laat zien is het gevaar van besmetting groot. PPO heeft in de periode 2004- 2005 onderzoek gedaan naar een toetsmethode voor HVX in de rustfase en naar risicofactoren tijdens de hele teeltfase.

Hosta Virus X is in 1996 voor het eerst beschreven door een Amerikaanse onderzoeker. Het virus geeft wisselende symptomen, afhankelijk van de cultivar. In sommige Hosta-cultivars is HVX gemakkelijk waar te nemen (bijv. 'Sum & Substance', 'Pacific Blue Edger'). Er zijn ook cultivars, waarin de symptomen veel lastiger zijn waar te nemen, zoals *Hosta lancifolia* en *Hosta* 'Undulata Albomarginata'. Tenslotte zijn er ook cultivars, waarin het virus niet of nauwelijks is waar te nemen. Voorbeelden daarvan zijn 'Striptease', 'Revolution' en H. 'Undulata Albomarginata'. Juist deze laatste groep geeft veel risico's, omdat deze cultivars besmet kunnen zijn, zonder dat het zichtbaar is. Ze vormen dan echter wel een besmettingsbron. Omdat een besmetting met het virus niet altijd zichtbaar is, is een goede toetsmethode, waarmee het virus aan te tonen is, belangrijk. In de VS is een toetsmethode ontwikkeld, de zogenaamde ELISA-toets. Dit is een goed uitvoerbare toets, waarmee snel veel monsters te onderzoeken zijn.
Het was al bekend dat bladmateriaal geschikt is om ELISA-toetsen uit te voeren. Dit kan echter alleen vanaf ongeveer begin augustus tot eind september in de middelste bladeren (niet te oud en niet te jong). In die periode is er voldoende virus om de ELISA-toets betrouwbaar uit te voeren. Uit het nu uitgevoerde onderzoek is gebleken dat ook de neuzen en wortels in de rustperiode betrouwbaar te toetsen zijn met deze toets. Hierdoor is het ook mogelijk om gedurende de leverperiode te toetsen, zodat men meer tijd heeft om te beslissen of men een bepaalde partij wel of niet koopt.

Voor zover bekend vindt overdracht van het Hosta Virus X voornamelijk mechanisch plaats. Gebleken is dat het virus nogal besmettelijk is. Om verspreiding van het virus tegen te gaan is het nodig om inzicht te hebben in de risico's van de verschillende teelthandelingen. Juist het feit dat het virus aanwezig kan zijn, zonder symptomen te geven, maakt het extra belangrijk om de mogelijkheden van infectie in kaart te brengen.
De gevolgen van de belangrijkste teelthandelingen op virusverspreiding zijn in de periode 2004 tot 2005 onderzocht. Zo blijkt afklepelen van het (groene) gewas vóór het rooien geen virusoverdracht te geven. Van de teelthandelingen rooien, spoelen, warmwaterbehandeling en mechanische onkruidbestrijding kan het risico nog niet duidelijk uitgesloten worden. Spoelen kan onder extreme condities wel een sterke uitbreiding van HVX geven. Verder lijkt het sorteren en snijden een risico te zijn voor het overdragen van het virus.
Tot nog toe is alleen *Hosta* een duidelijke waardplant van het virus. Overdracht van het virus naar andere vaste planten is vooralsnog nog niet aan de orde.

Dit project was gericht op het in kaart brengen van risico's in de teelt en daarnaast mogelijkheden voor toetsen in andere perioden. Er is dus nog in beperkte mate aandacht geweest voor praktijkklare oplossingen. Gezien het grote financiële belang wat het HVX-probleem met zich meebrengt, zijn de uitkomsten van het onderzoek al wel snel opgepakt door de praktijk. Daarbij richt men zich vooral op het vermijden van de grootste risico's.
In het project is intensief contact geweest met de begeleidingscommissie (export, kwekers, Naktuinbouw en PPO). De begeleidingscommissie heeft besloten 2 informatiebijeenkomsten voor kwekers en exporteurs te beleggen tijdens het project (15 juni en 13 september 2005). Hierin zijn de onderzoeksresultaten teruggekoppeld naar de praktijk.

Vervolgonderzoek, wat inmiddels is opgestart, zal meer inzicht verschaffen in nog onduidelijke risico's. Verder is daarbij meer aandacht voor oplossingsgericht onderzoek, zoals bijv. het ontsmetten van het mes.

1 Inleiding

Vanuit de VS komen sinds voorjaar 2004 signalen dat Hosta's besmet zijn met Hosta Virus X (HVX). Het virus kan symptomen geven in de vorm van vlekken/strepen op het blad. De consumenten die Hosta's verzamelen zijn erg beducht voor aangetaste planten. Zij zetten de grote verkoopketens onder druk om gezonde Hosta's te leveren. Deze eis is vervolgens neergelegd bij Nederlandse exporteurs.
Hosta is een van belangrijkste vaste planten in de export naar de VS.

De eis van afnemers naar Hosta's zonder HVX vraagt om een toetsmethode. Er zijn toetsmethoden als ELISA en PCR beschikbaar. Tot nog toe zijn deze toetsmethoden alleen gebruikt voor bladmonsters in het groeiseizoen. De vraag is of het virus ook aangetoond kan worden in het ondergrondse deel van de plant tijdens de rustperiode. Als dit mogelijk is, kunnen gebruikers partijen op cruciale momenten testen, bijvoorbeeld vóór het planten of vóór inkoop, en zo financiële risico's verkleinen.

Bij onderzoek in de VS zijn Hosta-cultivars ingedeeld in 3 groepen wat betreft vatbaarheid voor HVX, nl:

1. vatbaar voor HVX én symptomen zichtbaar
2. vatbaar voor HVX zonder zichtbare symptomen
3. immuun voor HVX

Het virus wordt, zover bekend, voornamelijk mechanisch overgebracht en is bovendien besmettelijk. Inzicht in het risico van de verschillende teelthandelingen m.b.t verspreiding van virus is nodig om verspreiding van het virus tegen te gaan. Juist het feit dat het virus kan vóórkomen zonder symptomen te geven, maakt het extra belangrijk om de infectieroutes in kaart te hebben. Hierdoor kan een verspreiding van het virus beter worden tegengegaan.

Doelen van dit project:

- testen of de bestaande ELISA-toetsmethode ook bruikbaar is voor ondergrondse delen, welke in rust zijn.
- in kaart brengen van belangrijkste infectieroutes van HVX tijdens de teelt.

2 Toetsen op HVX tijdens rustperiode

2.1 Inleiding

Het HVX geeft niet altijd symptomen in het blad. Het virus geeft echter nooit symptomen in de ondergrondse delen van de plant. Omdat afnemers van exporteurs Hosta's eisen zonder HVX, is het nodig om planten te kunnen toetsen. Er zijn toetsmethoden als ELISA en PCR beschikbaar. Totnogtoe zijn deze toetsmethoden alleen gebruikt voor bladmonsters. Vraag is of het virus ook aangetoond kan worden in het ondergrondse deel van de plant (als de plant in rust is). Als dit mogelijk is, kunnen gebruikers hun partijen op cruciale momenten testen, bijvoorbeeld vóór het planten of vóór inkoop.

2.2 Opzet

In dit onderdeel zijn twee toetsmomenten interessant, namelijk rond het rooitijdstip (november) en rond het moment van leveren aan export (januari). Daarbij is het belangrijk te weten of de wortels betrouwbaar getoetst kunnen worden. Wanneer deze minst destructieve methode niet betrouwbaar is, is het belangrijk te weten of de neuzen betrouwbaar getoetst kunnen worden. Om hiervan een goede indruk te krijgen zijn in totaal 10 cultivars uit de verschillende groepen in het onderzoek betrokken.
In oktober 2004 zijn partijen geselecteerd op een HVX-aantasting van ca. 70 %, gebaseerd op toetsingen door Naktuinbouw in september 2004. Alle partijen zijn tussen 20 en 22 oktober 2004 bemonsterd; daarbij zijn 50 bladeren geplukt per 250 planten. Deze bladeren zijn getoetst met ELISA bij Naktuinbouw te Roelofarendsveen. Vervolgens zijn de planten half november gerooid en ongespoeld bewaard bij 2°C.

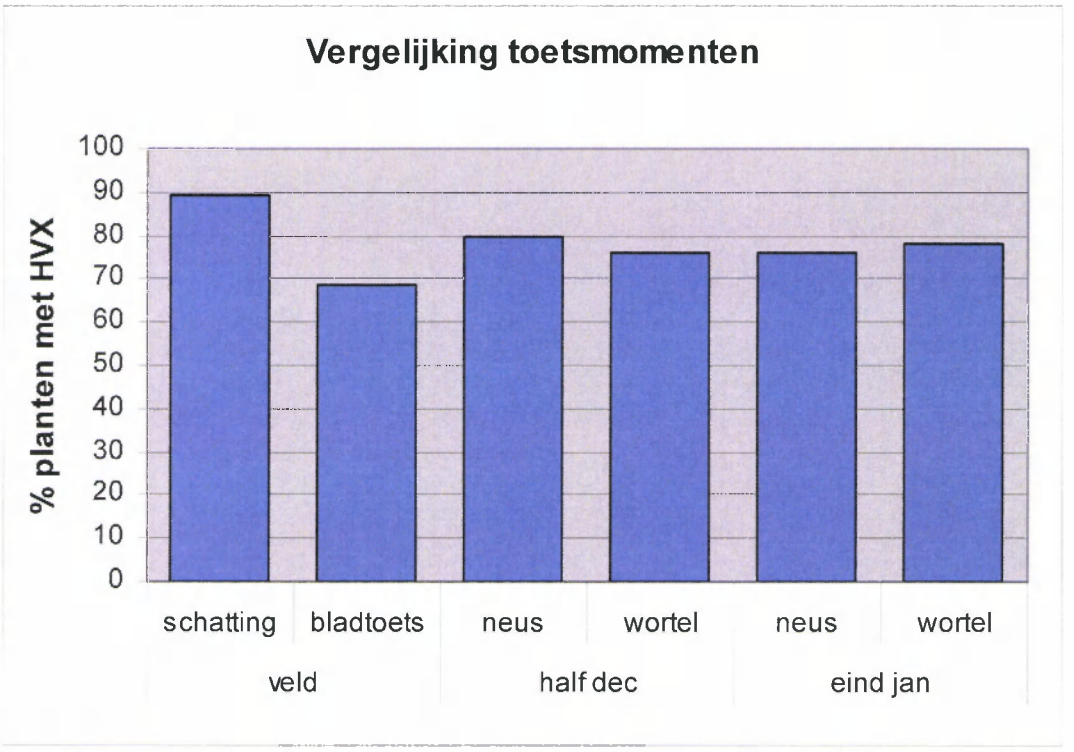
Half december is ter voorbereiding van het uitgebreide toetswerk bepaald of HVX met ELISA aantoonbaar is in wortels. Uiteindelijk zal een ELISA-test aan de wortels de voorkeur hebben boven een test aan de neuzen. Om de monsters zo goed mogelijk te kunnen nemen in het uitgebreide toetswerk is vooraf naar de verdeling in de wortels gekeken. Hiervoor zijn van alle 10 cultivars 2 planten gebruikt, waarbij per plant onderscheid is gemaakt tussen het onderste en bovenste deel (tegen de neus) van de wortels. Vanuit elk deel werden 3 mengmonsters genomen, die allen beoordeeld zijn met ELISA. In totaal zijn dus per cultivar 12 monsters genomen.

Vervolgens is de eerste grootschalige toetsing uitgevoerd op 10 december 2004, waarbij per cultivar 50 monsters van de neuzen en 50 monsters van wortels (onderste delen) zijn getoetst m.b.v. ELISA bij Naktuinbouw. Dit is herhaald met dezelfde cultivars en dezelfde aantallen monsters per cultivar en plantendeel op 28 januari 2005.

2.3 Resultaten

Bij 8 van de 10 cultivars was de verdeling van het virus over de wortels gelijk. Wanneer een plant ziek was, waren ook alle geteste wortels ziek. Alle mengmonsters van zowel het onderste als het bovenste deel van de wortel kon HVX aangetoond worden. Twee cultivars gaven in dit onderdeel geen positieve uitslagen, namelijk de cultivars 'Gold Edger' en 'Revolution'. Het percentage zieke planten in het uitgangsmateriaal van deze cultivars was echter relatief laag t.o.v. andere cultivars (zie ook Tabel 1).

Uit Figuur 1 blijkt dat bij het percentage HVX-zieke planten, aangetoond met ELISA, vrij constant is over de verschillende toetsmomenten en plantendelen. De schatting op het veld lijkt het hoogste percentage HVX-planten op te leveren. Het gemiddelde percentage zieke planten uit de bladtoets (oktober) is het laagst. De cijfers van half december en eind januari én die voor neus en wortels liggen op een vergelijkbaar niveau.



Figuur 1. Percentage planten met HVX, aantoonbaar op diverse momenten in diverse plantendelen. Waarden zijn gemiddelden over 10 Hosta-cultivars.

De resultaten per cultivar zijn te vinden in Tabel 1. In deze tabel is met een sterretje gemerkt, welke resultaten afwijken ten opzichte van de overige resultaten. De cultivar 'Gold Edger' geeft een wisselend beeld te zien. Verder is het percentage zieke planten bij de cultivars 'Hertha' en 'Yellow Cream' in de bladtoets lager dan bij de overige meetmomenten. Bij deze cultivars was het blad al vrij ver afgestorven op het moment van toetsing (oktober).

Tabel 1. Percentage HVX-zieke planten in 10 verschillende cultivars bepaald op verschillende tijdstippen en verschillende plantendelen.

Type		**veld**		**half december**		**Eind januari**	
		schatting	**bladtoets**	**neus**	**wortel**	**neus**	**wortel**
Fortunei	Diamond Tiara	100	100	100	100	100	100
Naikaiana	Gold Edger	80	6*	40*	24*	10*	14*
?	Hertha	100	58*	98	94	96	98
Fortunei	Night before Christmas	60	50	54	48	54	60
?	Revolution	65	56	56	52	58	64
?	Stiletto Houman	100	94	100	100	100	100
?	Striptease	100	94	86	74	88	90
?	Sum & Substance	100	92	88	88	-	-
Fortunei	Yellow Cream	90	38*	78	78	82	84
Naikaiana	Yellow Splash Rim	100	96	100	100	100	100
	Gemiddelde	**90**	**68**	**80**	**76**	**76**	**78**

*: afwijkende waarden t.o.v. overige waarden.
-: niet uitgevoerd

2.4 Discussie en conclusie

Dit onderdeel had tot doel om het aantal toetsmomenten uit te breiden. Het was al bekend dat het virus tijdens de groeiperiode in het blad aangetoond kon worden. Het was echter nog niet bekend of dit ook tijdens de rustperiode betrouwbare resultaten zou opleveren.

Bij de voorbereidende toetsing bleek dat bij 8 van de 10 geteste cultivars HVX uniform verdeeld is over de wortels. Er werd geen verschil gevonden tussen het onderste deel of het bovenste deel van de wortel. Bij de 2 andere cultivars werd helemaal geen HVX aangetoond. Het ging daarbij om de cultivars 'Gold Edger' en 'Revolution'. Het percentage aangetaste planten in deze partijen was echter ca. 50 % of lager. Daarmee is de kans reëel, dat er toevallig 2 gezonde planten zijn gebruikt voor de toetsing. Geconcludeerd kan worden dat HVX uniform verdeeld is over de wortels, zodat het niet uitmaakt welk deel van de wortels voor de toets gebruikt worden.

Bij de grootschalige inventarisatie bij 10 cultivars bleek dat ELISA ook betrouwbaar is uit te voeren tijdens de rustperiode (bewaarseizoen). Daarbij is geen verschil geconstateerd tussen neuzen en wortels. Ook is er geen verschil gevonden tussen toetsing in half december of eind januari. Het resultaat van de bladtoets in oktober kan een te lage inschatting van percentage zieke planten geven. Bij 3 cultivars werd het percentage zieke planten onderschat ten opzichte van de resultaten in de bewaring en de schatting uit een eerdere steekproef. Dit bleek te maken te hebben met de fysiologische toestand van het blad. Deze cultivars waren op moment van bladtoetsing (oktober) al aan het afsterven. Waarschijnlijk is daardoor de hoeveelheid virus in het blad al aan het afnemen, met als gevolg dat er minder zieke planten aangetoond kunnen worden. Slechts 1 van de 10 cultivars, namelijk 'Gold Edger' gaf afwijkende percentages te zien tijdens de bewaarperiode. Hier is geen duidelijke verklaring voor.
Geconcludeerd word dat het dus ook mogelijk is om neuzen en wortels te gebruiken voor de detectie en dat dit gedurende het gehele bewaarseizoen een goede inschatting geeft van het besmettingspercentage van een partij.

Omdat de toetsing op de neuzen en wortels hetzelfde resultaat geeft, ligt het voor de hand om in de praktijk tijdens het bewaarseizoen te kiezen voor wortelmonsters (met name de wortelpunten). Hierdoor blijven de neuzen op de planten behouden en blijven ze geschikt voor de afzet.

3 Risico's van teelthandelingen

3.1 Algemene opzet van onderzoek

De volgende teelthandelingen zouden verwondingen aan de planten kunnen geven, waarbij het Hosta Virus X zou kunnen worden overgedragen:

1. Warmwaterbehandeling
2. Planten (handmatig of machinaal)
3. Mechanische onkruidbestrijding
4. Vretende plaagdieren, als slakken
5. Bovengronds afklepelen vlak voor rooien
6. Machinaal rooien
7. Opslag in kuubskisten
8. Sorteren en inkorten van planten
9. Spoelen van planten
10. Inpakken van planten

De handelingen Bovengronds afmaaien voor rooien, Machinaal rooien, Sorteren en inkorten van planten, Spoelen van planten, Warmwaterbehandeling en Mechanische onkruidbestrijding worden voorlopig als meest risicovol beschouwd. In overleg met de begeleidingscommissie is daarom aan deze teelthandelingen aandacht besteed in het onderzoek.

Het uitgangsmateriaal voor de proeven is bij kwekers verzameld. Voor de proeven aan de teelthandelingen Afklepelen en Machinaal rooien is gezocht naar partijen met een besmetting van 20 tot 30 %. Voor de overige proeven is gezocht naar partijen, die 100 % ziek (virusbronmateriaal) respectievelijk 100 % gezond (te behandelen objecten) waren. Van al deze partijen zijn in de herfst van 2004 bladmonsters genomen, welke getoetst zijn met ELISA.
In Tabel 2 en Tabel 3 staan de gevonden HVX-aantastingen in de gebruikte partijen in het onderzoek.

Tabel 2. Overzicht van de aanwezige besmetting met HVX in de gebruikte cultivars voor de proeven met de teelthandelingen Afklepelen en Machinaal rooien.

Cultivar	**Aantasting**	**Bemonstering deel afklepelen**	**Bemonstering deel Rooien**
Sum & Substance	Beoordeling kweker: 4 zieke planten per meter	12 % ziek	14 % ziek
Birchwood Parky's Gold	Beoordeling kweker: 9 zieke planten per meter	0 % ziek	14 % ziek
Albomarginata	Naktuinbouw: 10 van 10 planten met symptomen besmet; 2 van 10 planten zonder symptomen besmet	20 % ziek	10 % ziek
Revolution	Naktuinbouw: 6 van 10 planten met symptomen besmet; 7 van 10 planten zonder symptomen besmet	64 % ziek	62 % ziek

Tabel 3. Overzicht van HVX-besmetting in de gebruikte cultivars voor de proeven met de teelthandelingen Sorteren, Spoelen, Warmwaterbehandeling en Mechanische onkruidbestrijding.

	Cultivar	Besmetting veld '04	Bemonstering herfst '04	Besmetting herfst '04	Bemonstering '05	Besmetting '05
Ziek	Striptease	Naktuinbouw: 10 van 10 planten met symptomen zijn besmet; 10 van 10 planten zonder symptomen zijn besmet	100 monsters per ca. 800 planten	93 % ziek	-	-
Gezond	Sum & Substance*	Boordeling kweker: opgezuiverd; geen symptomen te zien	100 monsters per ca. 450 planten	0 % ziek	20 planten getoetst in mei 2005	20 %
Gezond	Gold Standard	Beoordeling kweker: geen symptomen te zien	100 monsters per ca. 450 planten	3 %	3 herhalingen á 24 planten getoetst in zomer 2005	4 %
Gezond	Honeybells*	Beoordeling kweker: geen symptomen te zien	-	-	220 planten getoetst; zieke planten zijn verwijderd (17 stuks)	0 %

*: In de proef met de teelthandeling Warmwaterbehandeling is de cultivar 'Sum & Substance' vervangen door de cultivar 'Honeybells'. Planten van de cultivar 'Honeybells' zijn alleen bij deze teelthandeling ingezet. Daarom zijn van deze partij geen monsters genomen in de herfst van 2004.

Om betrouwbare uitspraken te kunnen doen, zijn de proefresultaten van de proeven met de teelthandelingen Sorteren en inkorten van planten, Spoelen van planten, Warmwaterbehandeling en Mechanische onkruidbestrijding geanalyseerd met Gegeneraliseerde Lineaire Modellen (GLM's) op basis van een binomiale verdeling, waarbij paarsgewijs is getoetst. Dit is uitgevoerd met het programma Genstat. De uitkomsten hiervan zijn te vinden in Bijlage 1.

3.2 Bovengronds afmaaien voor rooien

3.2.1 Opzet

Het doel van deze proef is het vaststellen of afklepelen van een (nog groen) gewas vóór het rooien het Hosta Virus X kan overbrengen.
Op basis van ELISA-toetsingen op bladmonsters zijn 4 praktijkpartijen geselecteerd. In de partijen zijn stukken van 5 meter uitgezet, waarin op 21 oktober 100 bladmonsters genomen zijn. De bladmonsters zijn getoetst bij Naktuinbouw. Op 28 oktober zijn de uitgezette proefstukken geklepeld. Daarbij is per partij eerst de voorliggende 10 meter geklepeld om de machine zo veel mogelijk te besmetten met HVX. Daarna is de uitgezette 5 meter geklepeld. Twee partijen konden op het perceel blijven staan; de andere twee partijen moesten worden gerooid en zijn ongespoeld bewaard in de koelcel. Hiervan zijn in het voorjaar van 2005 per partijtje 100 planten op het proefveld bij PPO opgeplant. Op 11 augustus zijn de proefveldjes bemonsterd, waarbij er per proefveldje 75 bladmonsters zijn genomen, welke m.b.v. ELISA getoetst zijn bij Naktuinbouw.

3.2.2 Resultaten

In Tabel 4 staan het percentage viruszieke planten van 4 verschillende cultivars vóór klepelen (2004) en na klepelen en hergroei in 2005. Hieruit blijkt dat bij de cultivars 'Sum & Substance', 'Albomarginata' en 'Revolution' geen toename te zien is in % HVX na afklepelen. Alleen bij de cultivar 'Birchwood Parky's Gold' is een toename te zien.

Tabel 4. Verspreiding van HVX na afklepelen van 4 verschillende cultivars in de praktijk.

Volgorde klepelen	Cultivar	Locatie 2005	Aantasting zomer 2004:	% groen gewas bij klepelen	% HVX in 2004	% HVX in 2005
1.	Sum & Substance	Praktijk	Beoordeling kweker: 4 zieke planten per meter	80 %	12 %	13 %
2.	Birchwood Parky's Gold	Praktijk	Beoordeling kweker: 9 zieke planten per meter	20 %	0 %	9 %
3.	Albomarginata	PPO	Inventarisatie 2004: 10 van 10 met symptomen zijn ziek; 2 van 10 zonder symptomen zijn ziek	70 %	20 %	19 %
4.	Revolution	PPO	Inventarisatie 2004: 6 van 10 met symptomen zijn ziek; 7 van 10 zonder symptomen zijn ziek	70 %	64 %	61 %

3.2.3 Discussie

In deze proef is onderzocht of tijdens het afklepelen van (nog groen) gewas Hosta Virus X kan worden overgedragen. Bij 3 van de 4 cultivars bleek er geen toename te zijn van het percentage HVX-zieke planten in het geklepelde deel. Bij 1 cultivar, namelijk 'Birchwood Parky's Gold', lijkt er sprake te zijn van een toename door het klepelen. Vóór het klepelen werden in de bladmonsters geen besmette bladeren gevonden. In het jaar na het klepelen was er wel sprake van een virusbesmetting (9%). Er moeten echter vraagtekens gezet worden bij de uitkomst van de bemonstering in dat proefdeel in herfst 2004. In het naastgelegen proefdeel in dezelfde cultivar (onderdeel Machinaal rooien) bleek namelijk 14 % van de planten ziek te zijn in herfst 2004. De HVX-besmetting is dus ongelijk verdeeld geweest over de partij.
Ook uit de klepelvolgorde blijkt geen toename in percentage HVX na het klepelen. Zelfs na de 4^{e} partij (cv 'Revolution' is er geen toename van het percentage HVX gevonden.
De verwachting was dat HVX tijdens klepelen het makkelijkst overgedragen wordt bij een vol, groen gewas. Ondanks dat er bij 3 van de cultivars sprake was van een overwegend groen gewas, nam het percentage HVX niet toe na klepelen. Daarbij was er bij de cultivar 'Albomarginata' ook nog eens sprake van veel bladmassa.

Op basis van deze proeven lijkt de teelthandeling 'Afklepelen vóór rooien' geen overdracht van HVX te veroorzaken.

3.3 Machinaal rooien

3.3.1 Opzet

Doel van deze proef is of de teelthandeling Machinaal rooien het Hosta Virus X kan overbrengen van zieke naar gezonde planten.
Door middel van ELISA met bladmonsters zijn 4 praktijkpartijen geselecteerd (in dezelfde partijen als bovengronds afmaaien). In de partijen zijn stukken van 5 meter uitgezet, waarin op 21 oktober 100 bladmonsters genomen zijn. De bladmonsters zijn getoetst bij Naktuinbouw. In de tweede helft van november zijn de uitgezette proefstukken gerooid. De cultivars 'Sum & Substance' en 'Birchwood Parkys Gold'zijn door de ene kweker gerooid met een schudlichter. De cultivars 'Albomarginata' en 'Revolution' zijn door een andere kweker gerooid met een 'Van Duijvenvoorde'-rooimachine. Alle 4 partijen zijn na rooien ongespoeld bewaard in de koelcel. Hiervan zijn in het voorjaar van 2005 per partijtje 100 planten op het proefveld bij PPO opgeplant. Op 11 augustus zijn de proefveldjes bemonsterd, waarbij er per proefveldje 75 bladmonsters zijn genomen, welke m.b.v. ELISA getoetst zijn bij Naktuinbouw.

3.3.2 Resultaten

Tabel 5 geeft de resultaten van de verspreiding van HVX door machinaal rooien bij 4 verschillende cultivars. Hieruit blijkt dat er bij de cultivars 'Sum & Substance' en 'Birchwoord Parky's Gold' het percentage virus

sterk toeneemt (verdubbeld). Bij de twee andere cultivars is geen toename te zien in percentage virus; daar lijkt het percentage zelfs af te nemen. De verschillen tussen de cultivars zijn gekoppeld aan de rooiwijze.

Tabel 5. Verspreiding van HVX door machinaal rooien van 4 verschillende cultivars in de praktijk

Volgorde rooien	Cultivar	Rooiwijze	Aantasting zomer 2004:	% HVX in 2004	% HVX in 2005
1.	Sum & Substance	Schudlichter	Beoordeling kweker: 4 zieke planten per meter	14 %	29 %
2.	Birchwood Parky's Gold	Schudlichter	Beoordeling kweker: 9 zieke planten per meter	14 %	28 %
1.	Albomarginata	Van Duijvenvoorde	Inventarisatie 2004: 10 van 10 met symptomen zijn ziek; 2 van 10 zonder symptomen zijn ziek	10 %	4 %
2.	Revolution	Van Duijvenvoorde	Inventarisatie 2004: 6 van 10 met symptomen zijn ziek; 7 van 10 zonder symptomen zijn ziek	62 %	47 %

3.3.3 Discussie

In dit onderdeel is onderzocht of de teelthandeling 'Machinaal rooien' een overdracht van HVX kan veroorzaken. Bij de rooiwijze 'Schudlichter' was bij beide cultivars een toename te zien in het percentage HVX. Bij de rooiwijze 'Van Duijvenvoorde' was bij beide cultivars geen toename te zien. Het viruspercentage was daar absoluut gezien juist lager. Het is de vraag of de waargenomen verschillen ook betrouwbare verschillen zijn. Bij deze proef zijn een aantal opmerkingen te maken:

- Het gevonden percentage virus varieert, wat mede veroorzaakt kan worden doordat gewerkt is met steekproeven.
- Er kan hier ook sprake zijn van verschillen tussen gevoeligheid in cultivar, namelijk dat het virus in de ene cultivar makkelijker opgenomen wordt dan in de andere cultivar.
- Het is niet heel waarschijnlijk dat een schudlichter meer wonden veroorzaakt aan een Hosta-plant dan een Van Duijvenvoorde-rooimachine. Een schudlichter ondersnijdt de planten en schudt deze (gedeeltelijk) los. Een Van Duijvenvoorde-rooimachine ondersnijdt de planten en voert de planten omhoog via een transportband, waarbij de planten losgeschud worden. De diepte van ondersnijden zou wel verschillend geweest kunnen zijn tussen beide machines.
- Er is een lijn te trekken naar de proef 'Afklepelen' (zie 3.2). In deze proef zijn de cultivars 'Albomarginata' en 'Revolution' niet alleen geklepeld, maar ook gerooid met de Van Duijvenvoorde-rooimachine. Ook in die proef was er geen toename te zien door het opgetelde effect van klepelen en rooien.

Rooien met de Van Duijvenvoorde-rooimachine lijkt dus geen groot risico voor de overdracht van HVX te geven. Van het rooien met een schudlichter is dit nog onduidelijk. Vervolgonderzoek aan dit onderdeel is nodig om risico's van rooimachines beter in te kunnen schatten. Daarbij moeten dezelfde cultivars met verschillende rooimachines gerooid worden.

3.4 Sorteren en inkorten van planten

3.4.1 Opzet

De proef is opgezet om vast te stellen of tijdens sorteren en inkorten van de wortels van besmette en niet besmette Hosta-planten het HVX overgedragen kan worden.
De proef is in januari 2005 uitgevoerd met 2 gezonde cultivars, namelijk 'Sum & Substance' en 'Gold Standard'. Als ziek materiaal zijn planten van de cultivar 'Striptease' gebruikt. De planten zijn voorafgaand aan de proef handmatig gespoeld bij PPO (eerst gezond, dan ziek materiaal). Daarna zijn de planten aangesneden aan de wortels, waarbij steeds eerst een zieke plant werd aangesneden en vervolgens een gezonde plant. Per herhaling en per cultivar werden 24 planten aangesneden. Per cultivar zijn 3 herhalingen uitgevoerd. Tussen de herhalingen

is het werkblad en mes ontsmet met alcohol. Na aansnijden zijn alleen de oorspronkelijk gezonde planten bewaard in de koelcel en in april opgeplant op het proefveld. In augustus zijn deze planten d.m.v. bladmonsters beoordeeld op aanwezigheid van HVX.

3.4.2 Resultaten

Uit Tabel 6 blijkt dat er bij zowel de cultivar 'Sum & Substance' als 'Gold Standard' op het veld geen betrouwbare toename gevonden is in het percentage virus, nadat de wortels zijn ingekort tijdens het verwerkingsseizoen.

Tabel 6. Verspreiding van HVX door sorteren en inkorten van wortels van 2 verschillende cultivars.

Cultivar	Uitgangsmateriaal 2004	Niet ingekort Controle	Wel ingekort
Sum & Substance	0 %	20 % a[1]	25 % a[1]
Gold Standard	3 %	5 % b	4 % b

[1]: op basis van 1 herhaling
Getallen met dezelfde letter zijn niet significant verschillend (P=0,05)

3.4.3 Discussie

In deze proef zijn de wortels ingekort tijdens het verwerkingsseizoen, waarbij afwisselend in zieke en gezonde planten is gesneden. Bij de cultivar 'Gold Standard' bleek het percentage virus in de proefveldjes niet toe te nemen in gesneden planten. Ook bij de cultivar 'Sum & Substance' is geen betrouwbare toename gevonden t.o.v. de controlebehandeling. Hier moet echter de kanttekening geplaatst worden dat er zowel in de controle-behandeling als de behandeling 'Wel ingekort' slechts 1 herhaling is uitgevoerd. Gezien het besmettingsniveau in de hierna beschreven proeven, ligt het besmettingsniveau in de controle-behandeling op een toevallig hoog niveau. Hierdoor kunnen effecten minder goed vergeleken worden.

Deze resultaten zijn vooraf niet verwacht, omdat in deze proef gegarandeerd verwondingen in de planten zijn aangebracht en er (besmet) plantensap achterblijft op het mes. In het vervolgonderzoek verdient het de aanbeveling om intensiever in de planten te snijden (bijvoorbeeld in de neus). Een factor die overigens mee kan spelen is dat het virus minder goed wordt opgenomen in planten die in rust zijn. In paragraaf 3.7 wordt een proef beschreven waarin in groeiende planten in de wortels is gesneden.

3.5 Spoelen van planten

3.5.1 Opzet

In dit onderdeel zijn proeven opgezet om vast te stellen of tijdens spoelen van besmette en niet besmette Hosta-planten HVX overgedragen wordt. De volgende proeven zijn uitgevoerd:

- overdracht van HVX tussen zieke en gezonde planten tijdens spoelen in dezelfde machine
- aantonen HVX in spoelwater in spoelmachines
- overdracht van HVX via besmet spoelwater op gezonde planten

De proeven zijn in januari 2005 uitgevoerd met 2 gezonde cultivars, namelijk 'Sum & Substance' en 'Gold Standard'. Als besmettingsbron zijn planten van de cultivar 'Striptease' gebruikt.

Overdracht tijdens spoelen

De proef is in januari 2005 uitgevoerd met gezonde planten van 2 cultivars, namelijk 'Sum & Substance' en 'Gold Standard'. Als ziek materiaal zijn planten van de cultivar 'Striptease' gebruikt. Voorafgaand aan het spoelen zijn de gezonde planten gemerkt om verwarring te voorkomen. Per herhaling werden 24 zieke en 24 gezonde planten door elkaar gespoeld op een spoelmachine (contactoverdracht testen). De proef gebeurde in 3 herhalingen. Na het spoelen zijn de zieke planten verwijderd en hebben de oorspronkelijk gezonde planten uit kunnen lekken. Vervolgens zijn ze tot april bewaard in de koelcel bij 2°C en opgeplant op het proefveld. In augustus zijn de planten bemonsterd op het blad en is het percentage HVX in het proefveld bepaald.

Aantonen HVX in spoelwater
Op vijf bedrijven zijn spoelmachines bemonsterd. Hierbij waren zowel professionele spoelbedrijven vertegenwoordigd als kwekers met een eigen spoelmachine. Per bedrijf zijn 4 watermonsters genomen, verdeeld over het spoelproces. Daarnaast is bij 1 bedrijf een monster genomen van het bezinksel in de bezinkput. In totaal zijn er dus 21 monsters genomen. De monsters zijn getoetst met ELISA.

Overdracht door spoelwater
De proef is in januari 2005 uitgevoerd met gezonde plante van 2 cultivars, namelijk 'Sum & Substance' en 'Gold Standard'. Per herhaling werden 24 gezonde planten gespoeld in de spoelmachine. Na het spoelen zijn deze planten bespoten met een virussuspensie, gemaakt uit sap van zieke Hosta's en aangevuld met water. Er is gekozen voor deze kunstmatige besmetting, omdat in het onderdeel 'Aantonen HVX in spoelwater' geen besmet spoelwater is gevonden. Vervolgens zijn de planten uitgelekt en zijn ze bewaard in de koelcel bij 2°C tot het moment van planten in april. In augustus is de aanwezigheid van HVX in de proefveldjes bepaald door middel van bladmonsters.

3.5.2 Resultaten

Overdracht tijdens spoelen
In Tabel 7 staan de resultaten van de overdracht van HVX door gezamenlijk spoelen van ziek en gezonde planten. Bij beide cultivars blijkt het percentage viruszieke planten niet toe te nemen.

Tabel 7. Verspreiding van HVX door gezamenlijk spoelen van ziek en gezonde planten, uitgevoerd met 2 verschillende cultivars.

Cultivar	Uitgangsmateriaal 2004	Controle ongespoeld	Gespoeld
Sum & Substance	0 %	20 % a[1]	1 % a
Gold Standard	3 %	5 % a	8 % a

[1]: op basis van 1 herhaling
Getallen met dezelfde letter zijn niet significant verschillend (P=0,05)

Aantonen HVX in spoelwater
Zowel in de watermonsters (20 stuks) als het bezinkselmonster (1 monster) is met ELISA géén HVX aangetoond.

Overdracht door besmet spoelwater
Tabel 8 laat zien dat het percentage zieke planten van de cultivar 'Gold Standard' toeneemt, nadat gezonde, gespoelde planten zijn nagespoeld met een virussuspensie. Bij planten van de cultivar 'Sum & Substance' werd dit effect niet bewezen.

Tabel 8. Verspreiding van HVX door naspoelen van gespoelde gezonde planten met virussuspensie, uitgevoerd met 2 verschillende cultivars.

Cultivar	Uitgangsmateriaal 2004	Controle ongespoeld	Gespoeld
Sum & Substance	0 %	20 % ab[1]	6 % a
Gold Standard	3 %	5 % a	26 % b

[1]: op basis van 1 herhaling
Getallen met dezelfde letter zijn niet significant verschillend (P=0,05)

3.5.3 Discussie
In deze proeven is onderzocht of tijdens het spoelen van Hosta het HVX overgedragen kan worden. Als zieke en gezonde planten gezamenlijk gespoeld werden, werden gezonde planten van beide cultivars niet aantoonbaar zieker. Contactoverdracht bij gespoelde planten lijkt dus geen risicofactor.

Het virus is niet aangetoond in genomen watermonsters (21 stuks). Bij alle machines zijn regelmatig Hosta's gespoeld. Er is vooraf niet bewust een besmette partij gespoeld. Bij de meeste spoelmachines is er sprake van grote watervoorraden, waardoor de kans niet heel groot is dat er daadwerkelijk virus aangetoond wordt. Daarnaast heeft de toetsmethode (ELISA) een bepaalde detectiegrens. Als het aantal virusdeeltjes

zich onder deze grens bevindt, zal het niet aangetoond kunnen worden. Als de concentratie virusdeeltjes in het spoelwater inderdaad zo laag is, zal de kans op overdracht via deze route ook klein zijn (verdunningseffect). Het verdient de aanbeveling om nogmaals spoelwatermonsters te nemen. Ook kan daarbij gedacht worden aan het concentreren van deze watermonsters om de kans groter te maken dat eventueel aanwezige virusdeeltjes aangetoond worden met ELISA.

Overdracht via besmet spoelwater lijkt wel mogelijk, hoewel dit effect alleen werd aangetoond bij de cultivar 'Gold Standard' en niet bij de cultivar 'Sum & Substance'. Hierbij moet opgemerkt worden dat de proefomstandigheden extreem waren. Nadat de planten in een professionele spoelmachine gespoeld waren, zijn de planten nagespoeld met een virussuspensie. De concentratie virusdeeltjes in deze suspensie zal vele malen hoger liggen, dan in een spoelmachine (waarin grote hoeveelheden water gebruikt worden), bereikt zal worden. Daarnaast wordt in professionele spoelmachines nagespoeld met schoon leidingwater, waardoor eventuele virusdeeltjes van de plantenwortels afgespoeld zouden kunnen worden.

3.6 Warmwaterbehandeling

3.6.1 Opzet

Doel in deze proef was het vaststellen van het risico op HVX-overdracht tijdens warmwaterbehandeling van besmette en niet besmette Hosta-planten. Hierbij werd onderscheid gemaakt tussen de volgende 3 onderdelen:

- overdracht tussen zieke en gezonde planten tijdens warmwaterbehandeling (contactoverdracht);
- overdracht van HVX via besmet warmwaterbehandelings-water op gezonde planten (wateroverdracht);
- aantonen HVX in warmwaterbehandelings-water;

Overdracht tijdens warmwaterbehandeling

In april 2005 (enkele dagen voor het planten) kregen de gezonde planten van de cultivars 'Gold Standard' en 'Honeybells' samen met zieke planten van de cultivar 'Striptease' een warmwaterbehandeling van 1 uur 43,5 °C. Per herhaling ondergingen 24 zieke en 24 gezonde planten gemengd, gelijktijdig een warmwaterbehandeling. Per cultivar zijn 3 herhalingen uitgevoerd. Na de warmwaterbehandeling werden de planten afgekoeld in koud water, waarna de zieke planten verwijderd zijn. De 'gezonde' planten zijn opgeplant op het proefveld en in augustus beoordeeld met behulp van bladmonsters beoordeeld op aanwezigheid van HVX.

Overdracht via besmet water

Aansluitend aan de proef 'Overdracht tijdens warmwaterbehandeling' kregen zieke 'Striptease'-planten in hetzelfde water een warmwaterbehandeling van 1 uur 43,5°C. Daarbij werden 24 zieke planten per bad gebruikt. Dit is bedoeld om de kans op besmet water te vergroten. De zieke planten zijn na deze warmwaterbehandeling verwijderd, waarna gezonde planten van de cultivars 'Gold Standard' en 'Honeybells' in hetzelfde water een warmwaterbehandeling kregen (1 uur 43,5°C).
De 'gezonde' planten zijn na de warmwaterbehandeling afgekoeld in koud water, uitgelekt en binnen enkele dagen geplant op het proefveld. In augustus 2005 zijn alle planten in elk veldje bemonsterd op het blad, waarbij met ELISA is vastgesteld of HVX aanwezig was.

Aantonen HVX in warmwaterbaden

Uit de proef 'Overdracht via besmet water' zijn na de warmwaterbehandeling van de zieke planten per bad watermonsters genomen (totaal 6 stuks). Verder is een kookketel in de praktijk bemonsterd, waarin voorafgaand aan de bemonstering een zieke partij een warmwaterbehandeling onderging. In totaal zijn uit deze ketel 4 watermonsters genomen, waarvan 2 uit het warmwaterbad zelf en 2 uit het afkoelbad. Alle monsters zijn met ELISA getest op HVX.

3.6.2 Resultaten

Overdracht tijdens warmwaterbehandeling

Tabel 9 laat zien dat er bij de cultivar 'Honeybells' een behoorlijke toename van het percentage virus gevonden is. Bij de cultivar 'Gold Standard' in dezelfde proef blijft het percentage virus echter constant.

Tabel 9. Verspreiding van HVX door gelijktijdige warmwaterbehandeling van zieke en gezonde planten, uitgevoerd met 2 verschillende cultivars.

Cultivar	Uitgangsmateriaal 2004	Controle Geen warmwaterbehandeling	Wel warmwaterbehandeling
Honeybells	0 % *	- *	14 %
Gold Standard	3 %	5 % a	2 % a

*: alle planten van de cultivar 'Honeybells' zijn voorafgaand aan de proef getoetst aan de wortel. Op basis hiervan zijn alle zieke planten verwijderd en is de rest van de planten gebruikt voor de proef.
Getallen met dezelfde letter zijn niet significant verschillend (P=0,05)

Overdracht via besmet water
Bij de cultivar 'Honeybells' is er een sterke toename van het percentage HVX-besmette planten gevonden na een warmwaterbehandeling van gezonde planten in een 'besmet' bad (zie Tabel 10). Bij de cultivar 'Gold Standard' werd geen toename gevonden.

Tabel 10. Verspreiding van HVX via mogelijk besmet water in warmwaterbad op gezonde planten, uitgevoerd met 2 verschillende cultivars.

Cultivar	Uitgangsmateriaal 2004	Controle Geen warmwaterbehandeling	Wel warmwaterbehandeling
Honeybells	0 %	-	13 %
Gold Standard	3 %	5 % a	6 % a

Getallen met dezelfde letter zijn niet significant verschillend (P=0,05)

Aantonen HVX in warmwaterbaden
In geen van de 10 watermonsters bleek het HVX aantoonbaar met ELISA.

3.6.3 Discussie

In dit onderdeel is onderzocht in hoeverre tijdens warmwaterbehandeling het risico bestaat op overdracht van HVX. Zowel binnen partijen (gezond en ziek samen warmwaterbehandeling) als tussen partijen (gezond na ziek in hetzelfde warmwaterbad) werd bij de cultivar 'Gold Standard' geen virusoverdracht plaats heeft gevonden. Bij de cultivar 'Honeybells' werd echter in de proeven wel een toename van virus gevonden. Planten van deze cultivar zijn voorafgaand aan de proef allemaal getoetst, waarna de zieke planten verwijderd zijn. Daarmee wordt er van uit gegaan dat het uitgangsmateriaal voor deze proef geen virus bevatte. In beide proeven werd echter een toename van 0 % naar 13 á 14 % gevonden. Het is opvallend dat deze waarden dicht bij elkaar liggen. De proef dient herhaald te worden om duidelijke conclusies te kunnen trekken.

In de watermonsters van de warmwaterbehandelingsbaden is in geen van de 10 genomen monsters HVX met ELISA aangetoond. Dit kan betekenen dat er geen HVX aanwezig was óf dat de hoeveelheid HVX onder de detectiegrens van de toetsmethode ligt. Het verdient de aanbeveling om nogmaals watermonsters uit de warmwaterbaden te nemen. Ook kan daarbij gedacht worden aan het concentreren van deze watermonsters om de kans groter te maken dat eventueel aanwezige virusdeeltjes aangetoond worden met ELISA.

3.7 Mechanische onkruidbestrijding

3.7.1 Opzet

In deze proef is onderzocht of tijdens mechanische onkruidbestrijding HVX kan worden overgedragen van zieke naar gezonde planten. Daarbij is er zowel een simulatie in een kasproef uitgevoerd als een kleinschalige veldsituatie.

Simulatie kasproef

In dit onderdeel is gekeken naar op welke wijze HVX- infecties plaats kunnen vinden tussen verschillende planten. De besmetting is uitgevoerd (eind april) aan de wortel of aan het blad.
Er zijn 2 potten met gezonde planten en 2 potten met zieke planten gebruikt. De planten zijn voorafgaand aan de proef getest aan het blad.
Per cultivar is gekozen voor een besmetting via de wortel óf een besmetting via het blad.

- De besmetting via wortel is uitgevoerd door per plant een deel van de gezonde wortels aan te snijden met een mes, dat vooraf gedoopt was in sap van wortels van de zieke plant (cv onbekend). Er zijn 23 planten op deze wijze geïnfecteerd. De planten werden daarbij in de pot gelaten.
- De besmetting via het blad is uitgevoerd door met een mes, gedoopt in bladsap van zieke planten, 2 á 3 bladeren per gezonde plant aan te snijden (cv. 'Pacific Blue Edger'). In dit onderdeel zijn 21 planten gebruikt.

De planten hebben gedurende de gehele proef in de kas gestaan. Door het seizoen heen zijn, zodra er symptomen zichtbaar waren op het blad, bladmonsters genomen voor een ELISA test. Aan het einde van het seizoen (half november) zijn van alle planten wortelmonsters getest met ELISA.

Veldsituatie

In april 2005 zijn proefveldjes aangelegd met 20 gezonde planten per proefveldje per cultivar (5 rijen van 4 planten). De proef is uitgevoerd met 2 cultivars, namelijk 'Sum & Substance' en 'Gold Standard'. Voorafgaand aan elk proefveldje werden 4 zieke planten van de cultivar 'Striptease' dwars op de bedrichting geplant. Tussen de proefveldjes was 1 meter vrije ruimte. De proef is uitgevoerd in 3 herhalingen. Bij de cultivar 'Sum & Substance' was er 1 herhaling minder. Vanaf 10 juni tot 28 juli is er 1 á 2 maal per week mechanische onkruidbestrijding toegepast m.b.v. een bewegende wiedeg (productent: ATH), Noordwijkerhout. In totaal is er ca. 10 keer gewiedegd. De rijrichting was gedurende de gehele proef gelijk. In november zijn de oorspronkelijk gezonde planten per plant gerooid en zijn per plant wortelmonsters genomen, die m.b.v. ELISA zijn beoordeeld op aanwezigheid van HVX. Hierdoor is gelijk inzicht verkregen, waar de zieke planten zich in het proefveldje bevonden.

3.7.2 Resultaten

Simulatie kasproef

In de kasproef zijn planten, die aan de wortel besmet zijn, regelmatig visueel beoordeeld op symptomen en daarnaast via ELISA op aanwezigheid van HVX. In

Tabel 11 is te zien dat na 2 maanden bij 4 van de 23 planten virussymptomen werden geconstateerd; echter in slechts 1 van die 4 planten kon daadwerkelijk HVX aangetoond worden met ELISA. Na 3 maanden kon in 3 van deze 4 planten HVX aangetoond worden. Na 4 maanden waren in 6 van de 23 planten symptomen ontwikkeld; in 4 hiervan kon daadwerkelijk HVX aangetoond worden. Na 6,5 maanden (15 november) waren er nog steeds 6 planten met symptomen; er kon in 5 van deze 6 planten HVX in de wortel aangetoond worden. Opvallend daarbij was dat in plantnummer 4 al vanaf 2 maanden symptomen te zien waren; er 2 keer HVX in het blad is aangetoond, maar dat er aan het eind van de proef geen HVX in de wortel werd aangetoond. Verder bleek in 11 van de resterende 17 symptoomloze planten HVX aangetoond te kunnen worden. In totaal werd aan het eind van de proef in 16 van de 23 planten HVX aangetoond in de

wortel (70%).

Tabel 11. Verloop van verschijning van symptomen en het kunnen aantonen van HVX- met ELISA na infecteren van de planten via de wortel op 29 april 2005.

	30 juni		**26 juli**		**16 augustus**		**26 augustus**		**15 november**	
	bladtest		bladtest		bladtest		bladtest		**wortel**test	
Plant nr:	sympt	ELISA pos/neg	sympt:	ELISA pos/neg	sympt:	ELISA pos/neg	sympt:	ELISA pos/neg	sympt:	ELISA pos/neg
1	ja	neg	ja	pos	ja	pos*	ja	pos*	ja	pos
2	ja	neg	ja	neg	ja	neg	ja	neg	ja	pos
3	ja	neg	ja	pos	ja	pos*	ja	pos*	ja	pos
4	ja	pos	ja	pos*	ja	pos	ja	pos*	ja	neg
5	nee	*	nee	*	ja	pos	ja	pos*	ja	pos
6	nee	*	nee	*	nee	*	ja	neg.	ja	pos
7 t/m 23	nee	*	nee	*	nee	*	nee	*	nee	11 van 17 pl. pos

*: geen ELISA uitgevoerd
pos*: geen ELISA uitgevoerd; gezien resultaat eerdere toetsing wordt positieve uitslag verwacht

De 21 planten, die op 29 april via het blad besmet waren, lieten tijdens de hele proef tot half november geen duidelijke virussymptomen zien. Op 30 juni was er in 4 willekeurige planten geen HVX aantoonbaar. Op 16 augustus was in 2 van 3 willekeurige planten wél HVX aantoonbaar, maar dus geen symptomen zichtbaar. Op 26 augustus werd in 2 van 7 willekeurige planten HVX aangetoond. Tijdens dit toetsen zijn sommige planten op meerdere toetsmomenten getoetst. Tussen 30 juni en 26 augustus zijn er in totaal 11 planten getoetst, waarvan in totaal in 3 planten HVX aangetoond kon worden. Op 15 november zijn alle 21 planten aan de wortel getest, waarbij bleek dat 18 planten HVX bevatten (86 %).

Veldsituatie
In deze proef zijn proefveldjes met ziek en gezonde planten ge-wiedegd, gedurende bijna 2 maanden (10 juni tot 28 juli). In november zijn de oorspronkelijk gezonde planten beoordeeld m.b.v. ELISA aan wortelmonsters. Tabel 12 geeft aan dat er bij beide cultivars geen betrouwbare verschillen gevonden tussen de viruspercentages in veldjes die wel of niet ge-wiedegd zijn.

Tabel 12. Verspreiding van HVX via mechanische onkruidbestrijding, uitgevoerd gedurende 2 maanden met 2 verschillende cultivars.

Cultivar	**Uitgangsmateriaal 2004**	**Controle Niet wiedeggen**	**Wel wiedeggen**
Sum & Substance	0 %	20 % a [1]	15 % a [2]
Gold Standard	3 %	5 % a	8 % a

[1]: op basis van 1 herhaling
[2]: op basis van 2 herhalingen
Getallen met dezelfde letter zijn niet significant verschillend (P=0,05)

3.7.3 Discussie

In de kasproef waarbij de planten opzettelijk in contact zijn gebracht met virus is gebleken dat het virus daadwerkelijk overgebracht kan worden via de wortel of via het blad. Bij besmetting via de wortel werd slechts bij een klein deel van de planten symptomen gezien. Het virus kon op het moment van verschijnen van de symptomen in de meeste gevallen nog niet aangetoond worden met ELISA op bladmonsters. Bij 1 plant zelfs nog niet 4 maanden nadat de symptomen gezien werden. Na 6,5 maanden werd het virus wel in een groot aantal planten (70 %) in de wortel gevonden. Het kan niet geheel uitgesloten worden dat het virus op dat moment (15 november) ook in het blad aantoonbaar zou zijn. Op dat toetsmoment zijn alleen

wortelmonsters getest en geen bladmonsters. Op moment van toetsen werd echter niet verwacht dat in zoveel planten het virus in de wortel gevonden zou worden.
In deze proef werd 70 % van de planten daadwerkelijk geïnfecteerd via besmetting op de wortel. In de proef Sorteren en inkorten van wortels (zie 3.4) werd een veel lagere virusoverdracht gevonden of zelfs geen virusoverdracht. Een mogelijke verklaring hiervoor is, dat het in de proef Sorteren ging om planten in ruststadium en in de kasproef om actief groeiende planten. In deze actief groeiende planten zal het virus waarschijnlijk effectiever opgenomen worden. Ook is het waarschijnlijk dat de virusconcentratie op het mes in de kasproef hoger lag dan in de veldproef. Het vervolgonderzoek zal dit moeten uitwijzen.

In de kasproef met inoculatie via het blad werd uiteindelijk 86 % van de planten daadwerkelijk besmet met HVX. Het virus kan dus goed via beschadigingen in bladeren overgedragen worden. In deze proef met inoculatie van het blad bleek geen van de planten duidelijke virussymptomen te ontwikkelen tijdens het resterende groeiseizoen. Bij inoculatie via de wortel gebeurde dit wel bij enkele planten. Blijkbaar wordt via die route het virus makkelijker of sneller verdeeld over de plant.

Er kan geen betrouwbare uitspraak gedaan worden of het virus makkelijker via het blad dan via de wortel overgedragen wordt, ondanks het verschil van 86 % respectievelijk 70 % geslaagde infecties. Daarvoor was de proefopzet ongeschikt.

De planten uit deze kasproef zijn na de wortelbemonstering bewaard en zullen in 2006 opnieuw opgeplant worden. Het is interessant om te volgen of de zieke planten alsnog virussymptomen ontwikkelen en zo ja, wanneer. Ook zullen alle planten aan het eind van het groeiseizoen 2006 opnieuw getest worden om te achterhalen of het aantal zieke planten stabiel blijft of toeneemt. Mocht het laatste het geval zijn, dan was het virusniveau in november blijkbaar nog op een te laag niveau om aantoonbaar te zijn voor ELISA.

De resultaten van de kasproef kunnen niet zondermeer doorvertaald worden naar de praktijk. In de kasproef is de inoculatie onder vrij extreme omstandigheden tot stand gebracht. Het virussap is direct op de wonden aangebracht. In de praktijk zal deze situatie meestal niet optreden. Bijvoorbeeld bij mechanische onkruidbestrijding zullen niet zoveel beschadigingen optreden. Het snijden van Hosta-blad als snijgroen komt echter wel in de richting, waardoor virusoverdracht in dat geval wel degelijk plaats zal kunnen vinden.

In de veldproef met mechanische onkruidbestrijding (wiedeggen) is geen duidelijke aanwijziging voor virusoverdracht aangetoond. Ondanks dat er ca. 10 keer mechanische onkruidbestrijding is toegepast in een groeiend, actief gewas, werd geen toename in het virusniveau gevonden. Gezien de resultaten in de kasproef worden er blijkbaar weinig beschadigingen aan de plant toegebracht door deze handeling. Ook kan het zijn dat er te weinig virus meegenomen wordt aan de machine. Op basis van de resultaten uit de kasproef mag verwacht worden, dat eventueel overgedragen virus aantoonbaar geweest had moeten zijn in de wortels.
Vanwege de grote verschillen tussen de kasproef en de veldproef is het raadzaam de veldproef op grotere schaal te herhalen voor een definitief oordeel.

3.8 Planten uitsteken tijdens selecteren

3.8.1 Opzet

Doel van dit onderdeel is het vaststellen of tijdens het uitspitten van zieke planten (zogenaamd selecteren) Hosta Virus X overgedragen kan worden naar omstaande gezonde planten. Dit onderdeel is uitgevoerd op een praktijkperceel. Op 27 juni 2005 zijn van de 4 cultivars 'Aureomarginata', 'Love Pat', 'Halcyon' en 'Shade Fanfare' bladmonsters verzameld van in totaal 7 planten met symptomen. Hiervan bleek slechts 1 locatie licht positief te reageren in de ELISA-toets (ELISA-waarde van 0.16 na 3 uur 37°C i.p.v. 1 uur 37°C). Ook de zieke controle reageerde zwak positief. Op 20 juli zijn opnieuw planten bemonsterd, waarbij de licht positieve plant uit de eerste bemonstering opnieuw is meegenomen. Bij deze 2e bemonstering zijn er 10 planten bemonsterd in de cultivars 'Aureomarginata' en 'Shade Fanfare'. Al deze planten vertoonden duidelijk virussymptomen. 3 planten hiervan bleken positief te reageren in de ELISA-toets. Al deze 3 planten waren van cultivar 'Aureomarginata'. Vervolgens

zijn eind juli 6 planten rondom deze zieke planten bemonsterd via het blad, waarna de 3 zieke planten uit de grond zijn gespit met een schopje. In november zijn de gezonde planten rondom de verwijderde zieke planten bemonsterd aan de wortels en getoetst met ELISA.

3.8.2 Resultaten

De eerste bemonstering van 7 verdachte planten op 27 juni leverde geen aantoonbaar zieke planten op. 1 plant reageerde licht positief. Bij de 2e bemonstering op 20 juli zijn opnieuw bladmonsters genomen. Op alle locaties van 1e bemonstering waren niet of nauwelijks symptomen te zien. Genomen nieuwe monsters hebben diverse symptomen: van strepen tot vlekken tot kringerige tospovirus-achtige symptomen. Na ELISA bleken 3 van de 10 planten HVX te bevatten. Daarbij was de plant, die op 27 juni licht positief reageerde, op 20 juli duidelijk positief voor HVX. In de 6 planten rondom elke verwijderde plant werd vóór het uitsteken van de zieke plant geen HVX in het blad gevonden. Begin november zijn de planten rondom de zieke plant aan de wortels getoetst. Resultaten hiervan zijn terug te vinden in Tabel 13. Er zijn echter op dat moment meer planten bemonsterd dan na het verwijderen van de zieke plant. Gemiddeld bleek dat 10 % van de planten rond de verwijderde zieke plant besmet was met HVX.

Tabel 13. Percentage planten waarin HVX is aangetoond in omringende planten na het verwijderen een tussenstaande zieke plant (cv. Aureomarginata).

Locatie	**Aantal bemonsterde planten**	**Aantal planten met HVX (ELISA)**	**% zieke planten**
Zieke plant 1	9	1	11
Zieke plant 2	11	2	18
Zieke plant 3	11	0	0
		Gemiddeld	10

3.8.3 Discussie

In dit onderdeel is onderzocht of HVX overgedragen kan worden op gezonde planten tijdens het uitsteken van zieke planten. Het bleek dat gemiddeld 10 % van de planten rondom de verwijderde zieke plant besmet was met HVX. In de eindbemonstering zijn echter meer planten bemonsterd dan in de beginbemonstering. Het is dus mogelijk dat de planten, die in de eindbemonstering ziek bleken te zijn niet bemonsterd zijn in de beginbemonstering. Er kunnen dus geen goede uitspraken gedaan worden over het risico van het uitsteken van zieke planten op de omringende planten. Wel kan aangenomen worden dat niet alle direct aangrenzende planten besmet zullen raken tijdens het verwijderen van de zieke plant.

Opvallend in deze proef was dat HVX in eerste instantie slecht aantoonbaar was, ondanks aanwezige symptomen. Dit duidt erop dat het virus met een bladtoets tijdens het begin van de teelt niet altijd betrouwbaar kan aangetoond worden. Het verdient dus de aanbeveling om de bladtoets niet vóór 1 augustus uit te voeren.

3.9 Conclusies

Voor zover bekend vindt overdracht van het Hosta Virus X voornamelijk mechanisch plaats. In de praktijk is gebleken dat het virus nogal besmettelijk is. Om verspreiding van het virus tegen te gaan is het nodig om inzicht te hebben in de risico's van de verschillende teelthandelingen. Juist het feit dat het virus aanwezig kan zijn, zonder symptomen te geven, maakt het extra belangrijk om de mogelijkheden van infectie in kaart te brengen.
De risico's van de belangrijkste teelthandelingen voor verspreiding van HVX zijn in de periode 2004 tot 2005 onderzocht. Per teelthandeling worden de belangrijkste conclusies weergegeven:

Afklepelen: In de uitgevoerde proeven bleek afklepelen van het (groene) gewas vóór het rooien geen virusoverdracht te geven.

Rooien: Rooien kan mogelijk virusoverdracht geven. Uit de uitgevoerde proef

	werd bij het ene type rooimachine (schudlichter) een toename van geïnfecteerde planten gevonden, bij het andere type machine (van Duijvenvoorde) werd geen toename gevonden. Door de proefopzet was het echter onmogelijk om het effect van rooimachine en cultivar te scheiden. Het zou dus ook een cultivar effect kunnen zijn.
Sorteren en snijden:	Sorteren en snijden kan waarschijnlijk virusoverdracht geven. Bij beide cultivars kon dit echter niet duidelijk worden aangetoond.
Spoelen:	Spoelen bleek geen overdracht te geven tussen planten tijdens het spoelen. Wel werd overdracht gevonden in planten, die na het spoelen bespoten werden met een HVX-suspensie. In het laatste geval gaat het echter om een extreme situatie. Er werd geen virus gevonden in diverse monsters van spoelwater.
Warmwaterbehandeling:	De proef met warmwaterbehandeling gaf wisselende resultaten. Er werd geen virus in het warmwaterbehandelingsbad aangetroffen.
Mechanische onkruidbestrijding:	In de uitgevoerde proef met wiedeggen werd geen overdracht gevonden van HVX. Wel bleek uit een oriënterende kasproef dat HVX van blad naar blad en van wortel naar wortel overgedragen kan worden via aansnijden met een mesje, in sap van geïnfecteerde planten gedompeld.
Planten uitsteken tijdens selecteren:	Het planten uitsteken tijdens selecteren kan in theorie een overdracht van virus geven. In de proef werd een toename gevonden, maar deze is niet zondermeer toe te wijzen aan de teelthandeling.

In het algemeen geven de proeven geen duidelijke resultaten. Herhaling van de proeven is nodig.

Bijlage 1: Statistiek

Statistische analyse van proeven Sorteren, Spoelen 1 en Spoelen 2 en mechanische onkruidbestrijding t.o.v. de controle voor de cultivars 'Gold Standard' en 'Sum and Substance'

```
 36  job'360146, van Dalfsen, lezen data Sum & Substance + Gold Standard, Jan Sieverink, 1 februari 2006'
 37  output[width=100]1
 38  unit[nval=30]
 39
 40  factor[lab=!t(controle,mec,sor,spo1,spo2)]Methode
 41  factor[lab=!t(A,B,C)]HH
 42  factor[lab=!t(SaS,GS)]Cultivar
 43  vari nplanten,nplziek
 44
 45  open name='Sum & Substance + Gold Standard c.txt';channel=2
 46  read[channel=2]Methode,HH,Cultivar,nplanten,nplziek;frep=lab,lab,lab,*,*

   Identifier   Minimum      Mean   Maximum    Values   Missing
     nplanten     20.00     22.56     24.00        30         5
      nplziek    0.0000     2.280     10.00        30         5    Skew

   Identifier    Values   Missing    Levels
      Methode        30         0         5
           HH        30         0         3
     Cultivar        30         0         2

 47  close 2
 48
 49  model[distribution=binomial;dispersion=*]nplziek;nbinomial=nplanten
 50  terms Cultivar*Methode
 51  fit[fprob=y;tprob=y]Cultivar*Methode
51.......................................................................................

Regression analysis
===================

 Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

Summary of analysis
-------------------
                                        mean  deviance approx
Source        d.f.     deviance     deviance     ratio  F pr.
Regression       9        39.47        4.386      2.51  0.056
Residual        15        26.24        1.749
Total           24        65.71        2.738

Dispersion parameter is estimated to be 1.75 from the residual deviance.

* MESSAGE: the following units have high leverage.
         Unit     Response    Leverage
            7         6.00        1.00
           28         4.00        1.00

Estimates of parameters
-----------------------
                                                                  antilog of
Parameter                    estimate        s.e.     t(15)  t pr.   estimate
Constant                       -1.386       0.739     -1.88  0.080     0.2500
Cultivar GS                     -1.56        1.08     -1.45  0.169     0.2105
Methode mec                    -0.348       0.943     -0.37  0.717     0.7059
Methode sor                     0.288       0.967      0.30  0.770      1.333
Methode spo1                    -2.88        1.52     -1.89  0.078    0.05634
Methode spo2                    -1.45        1.00     -1.44  0.170     0.2353
Cultivar GS .Methode mec         0.89        1.37      0.65  0.524      2.447
Cultivar GS .Methode sor        -0.48        1.47     -0.33  0.749     0.6196
Cultivar GS .Methode spo1        3.42        1.80      1.90  0.077      30.66
Cultivar GS .Methode spo2        3.37        1.32      2.55  0.022      28.95

* MESSAGE: s.e.s are based on the residual deviance.

Parameters for factors are differences compared with the reference level:
              Factor  Reference level
            Cultivar  SaS
             Methode  controle
```

```
  52
  53  predict Methode

53.......................................................................................

Predictions from regression model
---------------------------------
These predictions are estimated mean proportions, formed on the scale of the response variable,
corresponding to one binomial trial, adjusted with respect to some factors as specified below.

The predictions have been formed only for those combinations of factor levels for which means can be
estimated without involving aliased parameters.

The predictions have been standardized by averaging over the levels of some factors:
         Factor  Weighting policy  Status of weights
       Cultivar  Marginal weights  Constant over levels of other factors

The standard errors are appropriate for interpretation of the predictions as summaries of the data
rather than as forecasts of new observations.

Response variate: nplziek

                Prediction        s.e.
      Methode
     controle       0.1106      0.0527
          mec       0.1103      0.0412
          sor       0.1259      0.0508
         spo1       0.0553      0.0267
         spo2       0.1797      0.0434

* MESSAGE: s.e's, variances and lsd's are approximate, since the model is not linear.

* MESSAGE: s.e's are based on the residual deviance.

  54  rpair[print=tprob] !p(Methode)

Pairwise differences
====================
54.......................................................................................

Regression analysis
===================

 Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
     controle           *
          mec       0.797           *
          sor       0.992       0.794           *
         spo1       0.336       0.204       0.325           *
         spo2       0.407       0.514       0.393       0.073           *
                 controle         mec         sor        spo1        spo2

  55  rpair[sort=yes;print=tprob] !p(Methode);tprob=tMeth;diff=dMeth

Pairwise differences
====================

55.......................................................................................

Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

* MESSAGE: rows of the following symmetric matrices have been sorted according to the means.

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
         spo1           *
     controle       0.336           *
          sor       0.325       0.992           *
          mec       0.204       0.797       0.794           *
         spo2       0.073       0.407       0.393       0.514           *
                     spo1    controle         sor         mec        spo2
```

```
  56  ppair[print=items]tMeth;diff=dMeth

Pairwise testing: non-significant items in tMeth, P=0.05
========================================================
       spo1   -3.152   A  ABCDE
   controle   -2.315   B  ABCDE
        sor   -2.312   C  ABCDE
        mec   -2.130   D  ABCDE
       spo2   -1.756   E  ABCDE

  57
  58  predict Cultivar
58.......................................................................................

Predictions from regression model
---------------------------------

These predictions are estimated mean proportions, formed on the scale of the response variable,
corresponding to one binomial trial, adjusted with respect to some factors as specified below.

The predictions have been formed only for those combinations of factor levels for which means can be
estimated without involving aliased parameters.

The predictions have been standardized by averaging over the levels of some factors:
         Factor  Weighting policy  Status of weights
        Methode  Marginal weights  Constant over levels of other factors

The standard errors are appropriate for interpretation of the predictions as summaries of the data
rather than as forecasts of new observations.

Response variate: nplziek

               Prediction        s.e.
     Cultivar
          SaS      0.1152      0.0309
           GS      0.1176      0.0235

* MESSAGE: s.e's, variances and lsd's are approximate, since the model is not linear.
* MESSAGE: s.e's are based on the residual deviance.

  59  rpair[print=tprob] !p(Cultivar)

Pairwise differences
====================
59.......................................................................................

Regression analysis
===================

 Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
          SaS           *
           GS       0.621           *
                      SaS          GS

  60  rpair[sort=yes;print=tprob] !p(Cultivar);tprob=tMeth;diff=dMeth

Pairwise differences
====================

60.......................................................................................
Regression analysis
===================

 Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

* MESSAGE: rows of the following symmetric matrices have been sorted according to the means.

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------

          SaS           *
           GS       0.621           *
                      SaS          GS
```

```
  61  ppair[print=items]tMeth;diff=dMeth

Pairwise testing: non-significant items in tMeth, P=0.05
========================================================
   SaS   -2.503   A  AB
    GS   -2.251   B  AB

  62
  63  predict Cultivar,Methode
63.......................................................................................

Predictions from regression model
---------------------------------
These predictions are estimated mean proportions, formed on the scale of the response variable,
corresponding to one binomial trial.

The predictions have been formed only for those combinations of factor levels for which means can be
estimated without involving aliased parameters.

The standard errors are appropriate for interpretation of the predictions as summaries of the data
rather than as forecasts of new observations.

Response variate: nplziek

      Methode    controle                    mec                    sor
               Prediction        s.e.  Prediction        s.e.  Prediction        s.e.
     Cultivar
          SaS       0.2000      0.1183      0.1500      0.0747      0.2500      0.1169
           GS       0.0500      0.0372      0.0833      0.0472      0.0417      0.0311

      Methode        spo1                    spo2
               Prediction        s.e.  Prediction        s.e.
     Cultivar
          SaS       0.0139      0.0182      0.0556      0.0357
           GS       0.0833      0.0431      0.2639      0.0687

* MESSAGE: s.e's, variances and lsd's are approximate, since the model is not linear.

* MESSAGE: s.e's are based on the residual deviance.

  64  rpair[print=tprob] !p(Cultivar,Methode);

Pairwise differences
====================

64.......................................................................................
Regression analysis
===================

 Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
        C1-M1          *
        C1-M2      0.717          *
        C1-M3      0.770      0.469          *
        C1-M4      0.078      0.102      0.048          *
        C1-M5      0.170      0.240      0.080      0.354          *
        C2-M1      0.169      0.235      0.085      0.407      0.916          *
        C2-M2      0.310      0.448      0.159      0.223      0.642      0.592          *
        C2-M3      0.124      0.171      0.059      0.476      0.774      0.865      0.470
        C2-M4      0.294      0.427      0.143      0.216      0.629      0.580      0.992
        C2-M5      0.666      0.317      0.920      0.033      0.032      0.041      0.073
                   C1-M1      C1-M2      C1-M3      C1-M4      C1-M5      C2-M1      C2-M2


        C2-M3          *
        C2-M4      0.455          *
        C2-M5      0.026      0.057          *
                   C2-M3      C2-M4      C2-M5

  65  rpair[sort=yes;print=tprob] !p(Cultivar,Methode);tprob=tMeth;diff=dMeth

Pairwise differences
====================

65.......................................................................................

Regression analysis
```

```
==================

 Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode


* MESSAGE: rows of the following symmetric matrices have been sorted according to the means.

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
        C1-M4           *
        C2-M3       0.476           *
        C2-M1       0.407       0.865           *
        C1-M5       0.354       0.774       0.916           *
        C2-M4       0.216       0.455       0.580       0.629           *
        C2-M2       0.223       0.470       0.592       0.642       0.992           *
        C1-M2       0.102       0.171       0.235       0.240       0.427       0.448           *
        C1-M1       0.078       0.124       0.169       0.170       0.294       0.310       0.717
        C1-M3       0.048       0.059       0.085       0.080       0.143       0.159       0.469
        C2-M5       0.033       0.026       0.041       0.032       0.057       0.073       0.317
                    C1-M4       C2-M3       C2-M1       C1-M5       C2-M4       C2-M2       C1-M2


        C1-M1           *
        C1-M3       0.770           *
        C2-M5       0.666       0.920           *
                    C1-M1       C1-M3       C2-M5

  66  ppair[print=items]tMeth;diff=dMeth

Pairwise testing: non-significant items in tMeth, P=0.05
========================================================

   C1-M4   -4.263   A  ABCDEFGH..
   C2-M3   -3.135   B  ABCDEFGHI.
   C2-M1   -2.944   C  ABCDEFGHI.
   C1-M5   -2.833   D  ABCDEFGHI.
   C2-M4   -2.398   E  ABCDEFGHIJ
   C2-M2   -2.398   F  ABCDEFGHIJ
   C1-M2   -1.735   G  ABCDEFGHIJ
   C1-M1   -1.386   H  ABCDEFGHIJ
   C1-M3   -1.099   I  .BCDEFGHIJ
   C2-M5   -1.026   J  ....EFGHIJ

  67
  68
  69  stop

********* End of 360146, van Dalfsen, lezen data Sum & Substance + Gold Standard, Jan Sieverink, 1
februari 2006. Current data space: 1 block, peak usage 9% at line 64.
```

Statistische analyse van proeven Sorteren, Spoelen 1, Spoelen 2, Warmwaterbehandeling 1, Warmwaterbehandeling 2 en mechanische onkruidbestrijding t.o.v. de controle voor alleen de cultivar 'Gold Standard'.

```
102  job'360146, van Dalfsen, lezen data Gold Standard, Jan Sieverink, 25 januari 2006'
 103  output[width=100]1
 104  unit[nval=21]
 105
 106  factor[lab=!t(controle,mec,sor,spo1,spo2,wwb1,wwb2)]Methode
 107  factor[lab=!t(A,B,C)]HH
 108  text cv
 109  vari nplanten,nplziek
 110
 111  open name='Gold Standard.txt';channel=2
 112  read[channel=2]Methode,HH,cv,nplanten,nplziek;frep=lab,lab,*,*,*

    Identifier   Minimum      Mean   Maximum    Values   Missing
            cv                                     21         0
      nplanten     20.00     22.80     24.00        21         1
       nplziek    0.0000     2.050     10.00        21         1    Skew

    Identifier    Values   Missing    Levels
       Methode        21         0         7
            HH        21         0         3
113  close 2
 114
 115  model[distribution=binomial;dispersion=*]nplziek;nbinomial=nplanten
```

```
 116  terms Methode
 117  fit[fprob=y;tprob=y]Methode
117.......................................................................

Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant, Methode

Summary of analysis
-------------------
                                        mean  deviance approx
Source        d.f.     deviance     deviance     ratio  F pr.
Regression       6        27.52        4.587      2.89  0.051
Residual        13        20.63        1.587
Total           19        48.15        2.534

Dispersion parameter is estimated to be 1.59 from the residual deviance.

Estimates of parameters
-----------------------
                                                          antilog of
Parameter          estimate         s.e.     t(13)  t pr.   estimate
Constant             -2.944        0.746     -3.95  0.002    0.05263
Methode mec           0.547        0.950      0.58  0.575      1.727
Methode sor           -0.19         1.05     -0.18  0.859     0.8261
Methode spo1          0.547        0.919      0.59  0.562      1.727
Methode spo2          1.919        0.819      2.34  0.036      6.811
Methode wwb1          -0.91         1.48     -0.61  0.550     0.4043
Methode wwb2          0.111        0.988      0.11  0.912      1.118

* MESSAGE: s.e.s are based on the residual deviance.

Parameters for factors are differences compared with the reference level:
              Factor  Reference level
             Methode  controle

 118  predict Methode
118.......................................................................

Predictions from regression model
---------------------------------
These predictions are estimated mean proportions, formed on the scale of the response variable,
corresponding to one binomial trial.

The predictions have been formed only for those combinations of factor levels for which means can be
estimated without involving aliased parameters.

The standard errors are appropriate for interpretation of the predictions as summaries of the data
rather than as forecasts of new observations.

Response variate: nplziek

               Prediction        s.e.
      Methode
     controle      0.0500      0.0354
          mec      0.0833      0.0449
          sor      0.0417      0.0297
         spo1      0.0833      0.0410
         spo2      0.2639      0.0654
         wwb1      0.0208      0.0260
         wwb2      0.0556      0.0340

* MESSAGE: s.e's, variances and lsd's are approximate, since the model is not linear.
* MESSAGE: s.e's are based on the residual deviance.

 119  rpair[print=tprob] !p(Methode);

Pairwise differences
====================
119.......................................................................

Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant, Methode

t probabilities of pairwise differences
```

```
----------------------------------------
     controle          *
         mec      0.575          *
         sor      0.859      0.450          *
        spo1      0.562      0.992      0.435          *
        spo2      0.036      0.064      0.023      0.050          *
        wwb1      0.550      0.319      0.636      0.312      0.051          *
        wwb2      0.912      0.627      0.764      0.614      0.028      0.489          *
                 controle      mec        sor       spo1       spo2       wwb1       wwb2

 120  rpair[sort=yes;print=tprob] !p(Methode);tprob=tMeth;diff=dMeth

Pairwise differences
====================
120.......................................................................................

Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant, Methode


* MESSAGE: rows of the following symmetric matrices have been sorted according to the means.

t probabilities of pairwise differences
----------------------------------------
        wwb1          *
         sor      0.636          *
     controle     0.550      0.859          *
        wwb2      0.489      0.764      0.912          *
        spo1      0.312      0.435      0.562      0.614          *
         mec      0.319      0.450      0.575      0.627      0.992          *
        spo2      0.051      0.023      0.036      0.028      0.050      0.064          *
                   wwb1        sor    controle      wwb2       spo1        mec       spo2

 121  ppair[print=items]tMeth;diff=dMeth

Pairwise testing: non-significant items in tMeth, P=0.05
========================================================

       wwb1   -3.850   A  ABCDEFG
        sor   -3.135   B  ABCDEF.
   controle   -2.944   C  ABCDEF.
       wwb2   -2.833   D  ABCDEF.
       spo1   -2.398   E  ABCDEF.
        mec   -2.398   F  ABCDEFG
       spo2   -1.026   G  A....FG

 122
 123
 124  stop

********* End of 360146, van Dalfsen, lezen data Gold Standard, Jan Sieverink, 25 januari 2006.
Current data space: 1 block, peak usage 8% at line 120.
```

Statistische analyse van proeven Sorteren, Spoelen 1, Spoelen 2 en mechanische onkruidbestrijding t.o.v. de controle voor alleen de cultivar 'Sum and Substance'.

```
  25  job'360146, van Dalfsen, lezen data Sum & Substance, Jan Sieverink, 1 februari 2006'
  26  output[width=100]1
  27  unit[nval=15]
  28
  29  factor[lab=!t(controle,mec,sor,spo1,spo2)]Methode
  30  factor[lab=!t(A,B,C)]HH
  31  text cv
  32  vari nplanten,nplziek
  33
  34  open name='Sum & Substance c.txt';channel=2
  35  read[channel=2]Methode,HH,cv,nplanten,nplziek;frep=lab,lab,*,*,*

    Identifier   Minimum      Mean   Maximum    Values   Missing
            cv                                     15         0
      nplanten     20.00     22.80     24.00        15         5
       nplziek    0.0000     2.100     6.000        15         5

    Identifier    Values   Missing    Levels
       Methode        15         0         5
            HH        15         0         3
```

```
  36  close 2
  37
  38  model[distribution=binomial;dispersion=*]nplziek;nbinomial=nplanten
  39  terms Methode
  40  fit[fprob=y;tprob=y]Methode
40.....................................................................................

Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant, Methode

Summary of analysis
-------------------
                                          mean  deviance approx
Source        d.f.     deviance     deviance     ratio  F pr.
Regression       4       17.905        4.476      2.98  0.131
Residual         5        7.521        1.504
Total            9       25.426        2.825

Dispersion parameter is estimated to be 1.50 from the residual deviance.

Estimates of parameters
-----------------------
                                                          antilog of
Parameter          estimate         s.e.      t(5)  t pr.   estimate
Constant             -1.386        0.686     -2.02  0.099     0.2500
Methode mec          -0.348        0.875     -0.40  0.707     0.7059
Methode sor           0.288        0.897      0.32  0.761      1.333
Methode spo1          -2.88         1.41     -2.04  0.097    0.05634
Methode spo2         -1.447        0.932     -1.55  0.181     0.2353

* MESSAGE: s.e.s are based on the residual deviance.

Parameters for factors are differences compared with the reference level:
             Factor  Reference level
            Methode  controle

  41  predict Methode
41.....................................................................................

Predictions from regression model
---------------------------------

These predictions are estimated mean proportions, formed on the scale of the response variable,
corresponding to one binomial trial.

The predictions have been formed only for those combinations of factor levels for which means can be
estimated without involving aliased parameters.

The standard errors are appropriate for interpretation of the predictions as summaries of the data
rather than as forecasts of new observations.

Response variate: nplziek

               Prediction        s.e.
      Methode
     controle      0.2000      0.1097
          mec      0.1500      0.0692
          sor      0.2500      0.1084
         spo1      0.0139      0.0169
         spo2      0.0556      0.0331
* MESSAGE: s.e's, variances and lsd's are approximate, since the model is not linear.
* MESSAGE: s.e's are based on the residual deviance.

  42  rpair[print=tprob] !p(Methode);

Pairwise differences
====================
42.....................................................................................

Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant, Methode

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
```

```
     controle          *
         mec      0.707          *
         sor      0.761      0.459          *
        spo1      0.097      0.120      0.068          *
        spo2      0.181      0.244      0.098      0.349          *
                 controle       mec        sor       spo1       spo2

  43  rpair[sort=yes;print=tprob] !p(Methode);tprob=tMeth;diff=dMeth

Pairwise differences
====================

43.......................................................................................
Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant, Methode

* MESSAGE: rows of the following symmetric matrices have been sorted according to the means.

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
        spo1          *
        spo2      0.349          *
         mec      0.120      0.244          *
     controle     0.097      0.181      0.707          *
         sor      0.068      0.098      0.459      0.761          *
                   spo1       spo2        mec    controle        sor

  44  ppair[print=items]tMeth;diff=dMeth

Pairwise testing: non-significant items in tMeth, P=0.05
========================================================

       spo1   -4.263   A  ABCDE
       spo2   -2.833   B  ABCDE
        mec   -1.735   C  ABCDE
   controle   -1.386   D  ABCDE
        sor   -1.099   E  ABCDE

  45
  46
  47  stop

********* End of 360146, van Dalfsen, lezen data Sum & Substance, Jan Sieverink, 1 februari 2006.
Current data space: 1 block, peak usage 7% at line 43.
```

Statistische analyse van proeven warmwaterbehandeling 1 en Warmwaterbehandeling 2 voor de cultivars 'Gold Standard' en 'Honeybells'.

```
223  job'360146, van Dalfsen, lezen data Gold Standard + Honeybells, Jan Sieverink, 25 januari 2006'
 224  output[width=100]1
 225  unit[nval=12]
 226
 227  factor[lab=!t(wwb1,wwb2)]Methode
 228  factor[lab=!t(A,B,C)]HH
 229  factor[lab=!t(GS,Ho)]Cultivar
 230  vari nplanten,nplziek
 231
 232  open name='Gold Standard + Honeybells.txt';channel=2
 233  read[channel=2]Methode,HH,Cultivar,nplanten,nplziek;frep=lab,lab,lab,*,*

    Identifier   Minimum      Mean   Maximum    Values   Missing
      nplanten     24.00     24.00     24.00        12         1
       nplziek    0.0000     2.182     5.000        12         1

    Identifier    Values   Missing    Levels
       Methode        12         0         2
            HH        12         0         3
      Cultivar        12         0         2

 234  close 2
 235
 236  model[distribution=binomial;dispersion=1]nplziek;nbinomial=nplanten
 237  terms Cultivar*Methode
 238  fit[fprob=y;tprob=y]Cultivar*Methode

238.......................................................................................
Regression analysis
```

```
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

Summary of analysis
-------------------
                                        mean  deviance approx
Source        d.f.     deviance     deviance     ratio chi pr
Regression       3        7.951       2.6505      2.65  0.047
Residual         7        4.290       0.6129
Total           10       12.242       1.2242

Dispersion parameter is fixed at 1.00.
* MESSAGE: deviance ratios are based on dispersion parameter with value 1.

Estimates of parameters
-----------------------
                                                                  antilog of
Parameter                     estimate        s.e.      t(*)  t pr.   estimate
Constant                         -3.85        1.01     -3.81  <.001    0.02128
Cultivar Ho                       2.03        1.07      1.90  0.057      7.581
Methode wwb2                      1.02        1.13      0.90  0.370      2.765
Cultivar Ho .Methode wwb2        -1.14        1.24     -0.92  0.357     0.3204

* MESSAGE: s.e.s are based on dispersion parameter with value 1.

Parameters for factors are differences compared with the reference level:
              Factor  Reference level
            Cultivar  GS
             Methode  wwb1

 239
 240  predict Methode
240.......................................................................................

Predictions from regression model
---------------------------------
These predictions are estimated mean proportions, formed on the scale of the response variable,
corresponding to one binomial trial, adjusted with respect to some factors as specified below.

The predictions have been formed only for those combinations of factor levels for which means can be
estimated without involving aliased parameters.

The predictions have been standardized by averaging over the levels of some factors:
         Factor  Weighting policy  Status of weights
       Cultivar  Marginal weights  Constant over levels of other factors

The standard errors are appropriate for interpretation of the predictions as summaries of the data
rather than as forecasts of new observations.

Response variate: nplziek

               Prediction        s.e.
      Methode
         wwb1      0.0852      0.0241
         wwb2      0.0934      0.0245


* MESSAGE: s.e's, variances and lsd's are approximate, since the model is not linear.
* MESSAGE: s.e's are based on dispersion parameter with value 1

 241  rpair[print=tprob] !p(Methode)

Pairwise differences
====================
241.......................................................................................

Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

* MESSAGE: sed's are based on dispersion parameter with value 1

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
         wwb1           *
         wwb2       0.496           *
```

```
                    wwb1        wwb2

 242  rpair[sort=yes;print=tprob] !p(Methode);tprob=tMeth;diff=dMeth

Pairwise differences
====================
242.......................................................................................

Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

* MESSAGE: sed's are based on dispersion parameter with value 1
* MESSAGE: rows of the following symmetric matrices have been sorted according to the means.

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
         wwb1           *
         wwb2       0.496           *
                     wwb1        wwb2

 243  ppair[print=items]tMeth;diff=dMeth

Pairwise testing: non-significant items in tMeth, P=0.05
========================================================

   wwb1   -2.745   A  AB
   wwb2   -2.349   B  AB

 244
 245  predict Cultivar

245.......................................................................................
Predictions from regression model
---------------------------------
These predictions are estimated mean proportions, formed on the scale of the response variable,
corresponding to one binomial trial, adjusted with respect to some factors as specified below.

The predictions have been formed only for those combinations of factor levels for which means can be
estimated without involving aliased parameters.

The predictions have been standardized by averaging over the levels of some factors:
         Factor  Weighting policy  Status of weights
        Methode  Marginal weights  Constant over levels of other factors

The standard errors are appropriate for interpretation of the predictions as summaries of the data
rather than as forecasts of new observations.

Response variate: nplziek

               Prediction        s.e.
     Cultivar
          GS      0.0398      0.0175
          Ho      0.1313      0.0282

* MESSAGE: s.e's, variances and lsd's are approximate, since the model is not linear.
* MESSAGE: s.e's are based on dispersion parameter with value 1

 246  rpair[print=tprob] !p(Cultivar)

Pairwise differences
====================

246.......................................................................................
Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

* MESSAGE: sed's are based on dispersion parameter with value 1

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
          GS           *
          Ho       0.018           *
                      GS          Ho
```

```
247  rpair[sort=yes;print=tprob] !p(Cultivar);tprob=tMeth;diff=dMeth

Pairwise differences
====================
247.......................................................................................
Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

* MESSAGE: sed's are based on dispersion parameter with value 1
* MESSAGE: rows of the following symmetric matrices have been sorted according to the means.

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
          GS          *
          Ho      0.018          *
                     GS         Ho

 248  ppair[print=items]tMeth;diff=dMeth

Pairwise testing: non-significant items in tMeth, P=0.05
========================================================
   GS   -3.295   A  A.
   Ho   -1.891   B  .B

 249
 250  predict Cultivar,Methode

250.......................................................................................
Predictions from regression model
---------------------------------
These predictions are estimated mean proportions, formed on the scale of the response variable,
corresponding to one binomial trial.

The predictions have been formed only for those combinations of factor levels for which means can be
estimated without involving aliased parameters.

The standard errors are appropriate for interpretation of the predictions as summaries of the data
rather than as forecasts of new observations.

Response variate: nplziek

      Methode        wwb1                    wwb2
               Prediction        s.e.  Prediction        s.e.
     Cultivar
           GS      0.0208      0.0206      0.0556      0.0270
           Ho      0.1389      0.0408      0.1250      0.0390

* MESSAGE: s.e's, variances and lsd's are approximate, since the model is not linear.
* MESSAGE: s.e's are based on dispersion parameter with value 1

 251  rpair[print=tprob] !p(Cultivar,Methode);

Pairwise differences
====================

251.......................................................................................
Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

* MESSAGE: sed's are based on dispersion parameter with value 1

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
        C1-M1          *
        C1-M2      0.370          *
        C2-M1      0.057      0.102          *
        C2-M2      0.076      0.156      0.805          *
                   C1-M1      C1-M2      C2-M1      C2-M2

 252  rpair[sort=yes;print=tprob] !p(Cultivar,Methode);tprob=tMeth;diff=dMeth

Pairwise differences
====================
252.......................................................................................
```

```
Regression analysis
===================
Response variate: nplziek
  Binomial totals: nplanten
     Distribution: Binomial
    Link function: Logit
     Fitted terms: Constant + Cultivar + Methode + Cultivar.Methode

* MESSAGE: sed's are based on dispersion parameter with value 1
* MESSAGE: rows of the following symmetric matrices have been sorted according to the means.

t probabilities of pairwise differences
---------------------------------------
        C1-M1          *
        C1-M2      0.370          *
        C2-M2      0.076      0.156          *
        C2-M1      0.057      0.102      0.805          *
                   C1-M1      C1-M2      C2-M2      C2-M1

 253  ppair[print=items]tMeth;diff=dMeth

Pairwise testing: non-significant items in tMeth, P=0.05
========================================================

   C1-M1   -3.850   A  ABCD
   C1-M2   -2.833   B  ABCD
   C2-M2   -1.946   C  ABCD
   C2-M1   -1.825   D  ABCD

 254
 255
 256  stop

********* End of 360146, van Dalfsen, lezen data Gold Standard + Honeybells, Jan Sieverink, 25
januari 2006. Current data space: 1 block, peak usage 6% at line 251.

GenStat Release 8.1  (PC/Windows XP)              25 January 2006 08:17:05
Copyright 2005, Lawes Agricultural Trust (Rothamsted Experimental Station)
Registered to: Plant Research International
```