

Aanvullend onderzoek naar verspreidingsroutes en mogelijkheden voor beheersing van PIAMV

Maarten de Kock, Hans Kok, Hans van Aanholt, Miriam Lemmers, Suzanne Lommen,
Khanh Pham, Trees Hollinger, Astrid de Boer & Casper Slootweg

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
PPO nr. 32 361429 00/PT nr. 14483
Juli 2013

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

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

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

PPO Projectnummer : 32 361429 00
PT Projectnummer : 14483

De bloembollensector investeert in dit project via het Productschap  Tuinbouw

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

Adres : Postbus 16, 6700 AA Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : +31 252 46 21 48
Fax : +31 317 41 80 94
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
1.1 Aanleiding	7
1.2 Onderzoeksvragen.....	7
1.3 Positionering van dit onderzoek in de tijd en in relatie tot overig PIAMV onderzoek	8
2 PARTIJEN LELIE GEBRUIKT IN DIT ONDERZOEK	9
3 SYMPTOOMVORMING BIJ 1 ^{STE} - EN 2 ^{DE} -JAARS INFECTIE MET PLAMV	11
3.1 Introductie.....	11
3.2 Werkwijze.....	12
3.3 Resultaten en discussie	12
3.4 Conclusies	13
4 BODEMGEBONDEN VERSPREIDING VAN PLAMV	15
4.1 Introductie.....	15
4.2 Werkwijze.....	16
4.3 Resultaten en discussie	16
4.3.1 Nematodenanalyse bodem	16
4.3.2 Analyse infectie met PIAMV	18
4.4 Overig onderzoek naar bodemgebonden virusverspreiding.....	21
4.4.1 Analyse PIAMV in onkruid.....	21
4.4.2 Hergebruik grond broeierij.....	21
4.5 Conclusies	22
5 MATE VAN VERSPREIDING TUSSEN PARTIJEN TIJDENS SPOELEN/SHAVEN/VERWERKEN	25
5.1 Introductie.....	25
5.2 Werkwijze.....	25
5.3 Resultaten en discussie	25
5.4 Conclusies	26
6 INVLOED VAN ROOITIJDS TIP EN TIJDSDUUR WONDHERSTEL OP RISICO'S PLAMV-VERSPREIDING TIJDENS VERWERKEN RESP. ONTSMETTEN	27
6.1 Introductie.....	27
6.2 Werkwijze.....	27
6.3 Resultaten en discussie	28
6.3.1 Invloed rooitijdstip.....	28
6.3.2 Invloed tijdsduur wondherstel op risico's PIAMV-verspreiding tijdens ontsmetten	28
6.4 Conclusies	31
7 AFDODING RECENTE PLAMV-INFECTIE MET WARMWATERBEHANDELING	33
7.1 Introductie.....	33
7.2 Inactivatie van PIAMV door d.m.v. hitte	33
7.3 Effect kortstondige warmwaterbehandeling op recente PIAMV-infectie.....	35
7.3.1 Werkwijze.....	35
7.3.2 Resultaten en discussie	35
7.3.3 Conclusies	37
8 ALGEMENE DISCUSSIE EN CONCLUSIES.....	39

BIJLAGE 1 – MAATREGELEN OM INFECTIE EN VERSPREIDING VAN PLAMV TE VOORKOMEN OF TE BEPERKEN.....	43
BIJLAGE 2 – FACTSHEET 'GEBRUIK PLAMV-TOETSEN'	49

Samenvatting

Sinds 2010 kampt de leliesector met een relatief nieuw virus, *Plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV). Praktijkgericht onderzoek is destijds spoedig opgestart om kennis te verkrijgen over mogelijke infectie- en besmettingsroutes en om mogelijkheden voor beheersing van dit virus te onderzoeken. Vijf onderzoeksvragen stonden centraal in dit onderzoek. Naast antwoord op deze vragen, heeft het onderzoek ook aanvullende informatie over PIAMV en lelie opgeleverd. Dit rapport beschrijft onderzoek dat in de periode zomer 2011 t/m zomer 2012 is uitgevoerd:

1. *Symptoomontwikkeling van 1^{ste} en 2^{de} jaars infectie*

Het percentage PIAMV in een geïnfecteerde partij was vaak hoger dan op basis van de bladtoets uit het voorgaande teeltseizoen bekend was. Ook de ELISA-boltoets geeft (in dit onderzoek) bij een PIAMV-besmette partij dus een onderwaarding van het werkelijke percentage PIAMV. Daarmee is selectie van virusvrije bollen in een virusbesmette partij op basis van een ELISA boltoets niet betrouwbaar. Afhankelijk van het besmettingspercentage van een partij kunnen virusvrij getoetste bollen in een virusbesmette partij tijdens de nateelt alsnog virusbesmet te zijn.

Handmatige infectie heeft een wisselende efficiëntie (20-88%, afhankelijk van de partij). De visuele schade in een partij wordt voornamelijk door het cultivar, teeltlocatie en teeltmoment bepaald. Een 1^{ste}-jaars of primaire infectie lijkt vergelijkbare visuele schade te geven als een 2^{de}-jaars of secundaire PIAMV-besmetting.

2. *Verspreiding van PIAMV tijdens de teelt via grond, onderzoek naar een eventueel betrokken grondgebonden virusvector*

Naast mechanische verspreiding van PIAMV tijdens de verwerking van gerooide bollen is er zeker ook een risico op verspreiding van PIAMV via de bodem. Het is zeer waarschijnlijk dat bij deze vorm van virusverspreiding geen biologische vector betrokken is. Het is echter onbekend of deze vorm van virusverspreiding het gevolg is van wortel-wortel-contact tussen een zieke en een gezonde lelie, of dat er ook vrije virusdeeltjes in de bodem aanwezig zijn die via de wortels een plant besmetten. Bij het optreden van een bodemgebonden verspreiding van PIAMV is dit (bij de partij lelie gebruikt in dit onderzoek) niet of nauwelijks met een ELISA-toets op het blad aan te tonen. Bij het optreden van een bodemgebonden verspreiding van PIAMV laten recent besmette lelies (bij deze partij lelie) nauwelijks tot geen symptomen zien. Dit is voor de leliesector risicovol omdat een eventueel toegenomen viruspercentage (en daarmee de kwaliteit van een partij) volgens het standaard kwaliteitskeuringssysteem (visueel en ELISA bladtoets) niet goed wordt beoordeeld.

Bodemgebonden verspreiding van PIAMV kan in de praktijk in ieder geval tijdens de bloemproductie optreden. Virusvrije lelies kunnen met PIAMV besmet raken na teelt op grond waar voorafgaand een PIAMV-teelt op heeft plaatsgevonden. Het virus blijft vanuit de eerste teelt in de bodem achter (in gewasresten of als vrije virusdeeltjes) en kan in de volgende teelt voor infectie zorgen. Bodemgebonden infectie met PIAMV in een cultivar die al (symptoomloos) besmet is met LSV kan tot zeer heftige symptomen leiden.

Er zijn nieuwe waardplanten voor PIAMV aangetoond. Bekende waardplanten voor PIAMV zijn nu: weegbree (*Plantago spp.*), lelie *Nandina domestica*, primrose (*Primula vulgaris*), *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor*, *Nicotiana benthamiana*, vogelmuur (*Stellaria media*), kleine brandnetel (*Urtica urens*).

3. *Mate van verspreiding tussen partijen tijdens spoelen/shaven/verwerken*

Virusverspreiding tussen partijen tijdens spoelen is een feit. Wanneer virusvrije lelies worden verwerkt over een spoellijn/aquagrader die gebruik maakt van gerecirculeerd PIAMV-besmet spoelwater bestaat er een reëel risico op besmetting van een partij lelies.

4. *Invloed van rootijdstip op risico's van PIAMV verspreiding tijdens spoelen/shaven/verwerken*

Er zijn aanwijzingen voor aanvullende (bodemgebonden) virusverspreiding tijdens de nateelt van de lelies van dit specifieke onderdeel.

Omdat deze aanvullende virusverspreiding niet bij alle behandelingen even sterk heeft plaatsgevonden, is het niet mogelijk concrete conclusies te formuleren over invloed van rootijdstip en rusttijd tussen spoelen en ontsmetten op risico's op PIAMV-infectie. Toch zijn er informatieve resultaten verkregen. Bij één van de vier partijen lelie werd minder PIAMV toename waargenomen wanneer rijpe bollen zijn geroid ten opzichte van vroeg gerooidde bollen.

Dompeling van bollen in een ontsmettingsbad met fungiciden en PIAMV gaf in dit onderzoek geen aanvullend risico op PIAMV-infectie ten opzichte van bollen die niet gedompeld waren. Bolontsmetting 1 dag na spoelen geeft geen hoger risico dan bolontsmetting 7 dagen na spoelen. Voor verwerking van virusvrije partijen zou het juist aan te bevelen zijn om deze vroeg te rooien en te verwerken op een moment dat er nog geen PIAMV-besmette partijen verwerkt zijn. Er moet gerealiseerd worden dat in een virusvrije werkomgeving geen virusverspreiding of infectie kan plaatsvinden, ongeacht de handelingen die met een gewas worden uitgevoerd.

5. Effect van hittebehandeling van spoelwater op verspreiding van PIAMV tijdens spoelen

PIAMV-virusdeeltjes raken bij een temperatuur boven 65°C dermate beschadigd dat PIAMV niet meer besmettelijk is. Dit hittebeschadigd virus is niet met ELISA aan te tonen; een PCR-toets detecteert dit hittebeschadigde virus nog wel.

Wanneer men bij verwerking van plantgoed een risico op infectie met PIAMV vanuit hergebruikt spoelwater of dompelbaden verwacht, dan is een kortstondige warmwaterbehandeling (1-2 minuten, 65-68°) van de recent verwerkte bollen zeker het overwegen waard. Dit resulteert in een (bijna) volledige reductie van de recent opgetreden virusinfecties. Er wordt geadviseerd de details van de warmwaterbehandeling voor kleine bolmaten nog verder te optimaliseren. De warmwaterbehandeling heeft een effect op taklengte, aantal knoppen per tak en de bloeidatum. Daarom wordt toepassing van warmwaterbehandeling met 65°C of hoger afgeraden voor leverbare bollen.

De verspreiding van PIAMV is complex, de beheersing van dit virus nog complexer. Het onderzoek heeft in ieder geval een beter inzicht gegeven in gewashandelingen die beperkte, matige of grote risico's hebben op PIAMV verspreiding binnen en tussen partijen. Om de sector te ondersteunen bij de beheersing van PIAMV, is op basis van de inzichten in juli 2012 een overzicht met maatregelen geschreven waarmee infectie en verspreiding van PIAMV te voorkomen of te beperken zou moeten zijn. Het inzichtelijk maken van de aanwezige besmettingen in partijen door middel van toetsen is van groot belang om de risico's op infectie en verspreiding in te schatten. Immers, bij afwezigheid van virus, is er ook geen risico dat virusinfectie kan optreden. Omdat hiervoor verschillende toetsen beschikbaar zijn, is een factsheet opgesteld waarin de details van de verschillende toetsmethoden toegelicht is. Naast deze geschreven informatie, zijn er ook drie informatiebijeenkomsten georganiseerd om met aanwezigen de details en resultaten van dit onderzoek te bespreken.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

De leliesector is in het voorjaar van 2010 geconfronteerd met de aanwezigheid van een nieuw virus in lelie (*Plantago asiatica mosaic virus*, PIAMV). De omvang van de aanwezigheid van dit virus, en de schade die het virus voornamelijk tijdens de broeierij veroorzaakt, heeft de sector verrast. Een goede onderlinge samenwerking en communicatie tussen teelt, handel en broeierij, keuringsdienst, aangevuld met praktijkgericht onderzoek en toetswerkzaamheden heeft in een korte tijd veel informatie opgeleverd over de herkomst van het virus, de mogelijke verspreidingswijzen van het virus en details omtrent symptoomontwikkeling bij lelies.

In een eerste groot onderzoek naar PIAMV is gebleken dat tijdens spoelen, shaven, verwerken en/of direct aansluitend ontsmetten de belangrijkste verspreiding van PIAMV lijkt op te treden¹. Op basis van uitgebreid onderzoek kan algemeen worden geconcludeerd dat PIAMV aan de buitenkant van blad en bol aanwezig kan zijn en dat dit uitwendige virus vervolgens wordt teruggevonden in spoelwater, eb- en vloedwater en op oppervlaktes van de verwerkingslijn. Hoe meer verwonding er tijdens het spoelen en verwerken van leliebollen optreedt, hoe meer virus er vrijkomt in het spoelwater, of achterblijft op harde oppervlaktes.

Bij machinaal planten, koppen, maaien, en rooien lijkt het risico op virusverspreiding nihil te zijn. Ook 'kijken met de hand' geeft geen aantoonbare risico's. Onderzoek heeft echter ook sterke aanwijzingen gegeven voor grondgebonden virusverspreiding. PIAMV kent naast lelie diverse waardplanten, waaronder weegbree en *Chenopodium* soorten. In 2011 is op basis van kennis van dat moment een uitgebreide lijst van maatregelen en adviezen samengesteld waarmee verspreiding van PIAMV binnen en tussen partijen te beperken of zelfs te voorkomen is.

Na het eerste jaar van onderzoek waren lang niet alle relevante vragen beantwoord. Wel was duidelijk geworden dat verspreiding van PIAMV plaats lijkt te kunnen vinden tijdens alle teelt- en verwerkingshandelingen waarbij mechanische beschadiging/verwonding optreedt. In dit project wordt het onderzoek naar verspreidingsroutes verder voortgezet en zijn mogelijkheden onderzocht om op een duurzame, niet-chemische wijze PIAMV-verspreiding te beperken.

1.2 Onderzoeksvragen

Op basis van kennis in medio 2011 en vragen uit onderzoek & praktijk zijn de volgende problemen/vragen in meer detail bestudeerd:

A. Onderzoek naar symptoomvorming van 1^{ste} en 2^{de}-jaars PIAMV-infecties

Aankoop van partijen kan worden ondersteund door PIAMV-toetsresultaten vanuit het voorafgaande teeltseizoen. De PIAMV-toets die in augustus/september wordt uitgevoerd, geeft uitsluitend informatie over de aanwezigheid van reeds aanwezige PIAMV-infecties (de 2^{de}-jaars infecties). PIAMV-infecties die na de bladbemonstering tijdens het afmaaien/klepelen/rooien/spoelen/verwerken/ontsmetten/inpakken nog kunnen gaan plaatsvinden (de 1^{ste}-jaars infecties), worden niet gedetecteerd. Het is onduidelijk of deze recente 1^{ste}-jaars infecties (die niet gedetecteerd zijn met de PIAMV-bladtoets) in dezelfde mate tot typische symptomen leiden ten opzichte van reeds aanwezige virusinfecties (die wel door de PIAMV-toets zijn gedetecteerd).

¹ De Kock M, Kok H, Van Aanholt H, Lemmers M, Pham K (2012) Onderzoek naar herkomst en verspreidingsroutes van *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) in lelie. PT project 13891 en 13834.18.

B. Onderzoek naar virusverspreiding tijdens de teelt via grond / grondgebonden vector

Vanuit het onderzoek zijn er zeer sterke aanwijzingen dat tijdens de teeltfase van lelie (zowel buitenteelt en kasteelt) verspreiding van PIAMV plaatsvindt zonder dat er door menselijk handelen beschadiging of verwonding van het gewas plaats vindt. Ook zijn er vanuit de praktijk signalen dat er pleksgewijze PIAMV-symptomen worden waargenomen, zgn nestjes met PIAMV-symptomen. Er is nog geen enkele aanwijzing op welke wijze deze verspreiding plaatsvindt. Er is daarom onderzoek gedaan naar niet-mechanische verspreiding van PIAMV tijdens teelt d.m.v. nematoden, mijten en/of specifieke schimmels.

C. Mate van verspreiding tussen partijen tijdens spoelen/shaven/verwerken

Onderzoek uit 2010/2011 heeft laten zien dat er tijdens spoelen/shaven/verwerken PIAMV-verspreiding binnen partijen kan plaatsvinden. Er is nog geen informatie bekend over de mate van PIAMV-verspreiding tussen partijen. Wanneer er verspreiding tussen partijen plaats vindt, dan bestaat het risico dat virusvrije partijen alsnog geïnfecteerd kunnen raken wanneer deze vlak na een virusgeïnfecteerde partij worden gespoeld.

D. Invloed van rooitijdstip op risico's PIAMV-verspreiding tijdens spoelen/shaven/verwerken

Onderzoek uit 2010/2011 heeft laten zien dat er tijdens spoelen/shaven/verwerken PIAMV-verspreiding kan plaatsvinden. Er zijn vanuit de praktijkervaringen aanwijzingen dat de rijpheid van de bollen van invloed kan zijn op deze risico's van virus-verspreiding. De invloed van rijpheid van geoogste leliebollen op de mate van virusverspreiding is in dit project onderzocht. Indien rijpheid van belang is, dan kan daar tijdens productie van leliebollen op geanticipeerd worden.

E. Effect van hitte-behandeling van spoelwater op verspreiding PIAMV tijdens spoelen

Potexvirussen zijn hittegevoelig. Doorgaans worden dit type virussen bij temperaturen hoger dan 65°C afgedood. Daarnaast zijn er recent door PPO aanwijzingen verkregen dat leliebollen gedurende korte tijd dergelijke temperaturen kunnen verdragen. Er is onderzoek gedaan naar het beperken van PIAMV-overdracht tijdens spoelen/shaven/verwerken door temperatuurbehandeling van het spoelwater en het besproeien van de bollen met verwarmd/verhit water.

1.3 Positionering van dit onderzoek in de tijd en in relatie tot overig PIAMV onderzoek

De liliesector is in het van voorjaar 2010 geconfronteerd met de aanwezigheid van een nieuw virus in lelie (*Plantago asiatica mosaic virus*, PIAMV). Sindsdien wordt er onderzoek gedaan naar PIAMV. Dit is begonnen met de identificatie en inventarisatie PIAMV in lelie². Aansluitend is er onderzoek verricht naar de herkomst en verspreidingsroutes van PIAMV³. De resultaten van dit onderzoek waren aanleiding voor het initiëren van het vervolgonderzoek beschreven in dit rapport. Tevens is specifiek voor de leliebroei onderzoek verricht naar teeltomstandigheden die effect hebben op symptoomvorming en naar middelen waarmee virussymptomen onderdrukt kunnen worden⁴. Op het moment van uitvoering van dit onderzoek was er een gevalideerde PIAMV ELISA-toets voor blad beschikbaar. De boltoets voor PIAMV werd ten tijde van dit onderzoek gevalideerd en was nog niet routinematig beschikbaar voor onderzoeksdoeleinden.

² De Kock M, Vink P, Lemmers M, Pham, K, Kok, H (2010) Voortgezet Diagnostisch Onderzoek - Identificatie en inventarisatie *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) in lelie. PT project 13891 en 13834.18.

³ De Kock M, Kok H, Van Aanholt H, Lemmers M, Pham K (2012) Onderzoek naar herkomst en verspreidingsroutes van *Plantago asiatica* mozaïekvirus (PIAMV). PT project 14135.

⁴ De Kock M, Kok H, Van Aanholt H, Van der Lans A, Lemmers M & Slootweg C (2012) Onderdrukking symptoomvorming PIAMV tijdens broei van lilies. PT project 14518.

2 Partijen lelie gebruikt in dit onderzoek

Diverse virusvrij en PIAMV-besmette partijen zijn in dit onderzoek voor diverse onderdelen gebruikt. In Tabel 1 staat een overzicht van deze partijen. Partijen worden aangeduid met het type en een volgnummer. Cultivarnamen worden in dit rapport bewust niet gebruikt. Virusvrij en virusbesmette partijen zijn aangekocht op basis van een PIAMV-percentage dat tijdens de teelt in 2011 met een ELISA toets op het blad is bepaald. Van een aantal partijen is het viruspercentage met ELISA op schubben bepaald. Van alle partijen is tijdens het teelt/broeiseizoen 2012 opnieuw het percentage PIAMV bepaald. Dit betreft dan doorgaans de controlebehandelingen van diverse experimenten waarbij een infectiebron afwezig was en verder mechanische infectie vanuit teelt- of verwerkingsomgeving zo veel als mogelijk werd vermeden.

Tabel 1. Leliepartijen gebruikt in dit onderzoek (LA=Longiflorum x Aziatische hybride; LO=Longiflorum x Oriental hybride; OR=Oriental; OT=Oriental x Trompet hybride).

Partijcode	Herkomst bollen	%PIAMV ELISA bladtoets 2011 ¹⁾	%PIAMV ELISA boltoets 2011 ²⁾	% PIAMV ELISA bladtoets 2012 ³⁾	Factor toename PIAMV bladtoets 2012 ten opzichte van 2011
LA2	NL oogst 2011	72	64	68	0.9
LA3	NL oogst 2011	48	79	96	2.0
LA4	NL oogst 2011	0	-	>1	-
LO4	NL oogst 2011	0	-	0	-
OR1	Chili oogst 2011	55	62	99	1.8
OR2	NL oogst 2011	63	55	97	1.5
OR3	NL oogst 2011	20	38	96 / 57 ⁴⁾	1.5-2.5
OR5	NL oogst 2011	0	-	0	-
OR7	NL oogst 2011	24	-	38	1.6
OR8	NL oogst 2011	0	-	0	-
OT1	NL oogst 2011	50	33	81	1.6
OT2	NL oogst 2011	75	96	100	1.3
OT3	NL oogst 2011	20	-	63	3.2
OT5	NL oogst 2011	20	-	26	1.3

¹⁾ percentage bepaling op basis van n=240 , mengmonsters van 2 blaadjes

²⁾ percentage bepaling op basis van n=minimaal 100

³⁾ percentage bepaling op basis van n=minimaal 100

⁴⁾ percentage PIAMV was 96% bij onderdeel A (onderzoek naar symptoomvorming van 1^{ste} en 2^{de}-jaars PIAMV-infecties) en 57% bij onderdeel D (invloed van roottijdstip op risico's PIAMV-verspreiding tijdens spoelen/shaven/verwerken)

Viruszieke partijen zijn geselecteerd op basis van de ELISA bladtoets 2011. Het percentage PIAMV op basis van de ELISA boltoets komt bij een aantal partijen redelijk overeen met het percentage op basis van de bladtoets (LA2, OR1, OR2). Daarentegen geeft de boltoets ELISA bij partijen LA3, OR3 en OT2 een significant hogere besmettingsgraad dan op basis van de bladtoets te verwachten was. Vergelijking van viruspercentages op basis van bladtoets 2012 ten opzichte van bladtoets 2011 laat zien dat bij het merendeel van de partijen het percentage infectie tijdens de teelt in 2012 veel hoger is dan dat men op basis van de bladtoetsresultaten van 2011 zou vermoeden. Bij veel partijen wordt een verhoogd viruspercentage met een factor 1.3 of hoger waargenomen. Deze verhoogde viruspercentages ten opzichte van van de bladtoetsuitslagen 2011 zijn mogelijk het gevolg van virusverspreiding tijdens het verwerken en ontsmetten van de lelies.

Partijen lelie die op basis van de bladtoetsresultaten 2011 als virusvrij zijn aangekocht, zijn ook in het volgende teeltseizoen virusvrij.

3 Symptoomvorming bij 1^{ste}- en 2^{de}-jaars infectie met PIAMV

3.1 Introductie

Een infectie met PIAMV laat bij lelie tijdens de broei verschillende soorten visuele schade zien, voornamelijk aan de onderkant van het blad (Figuur 1). Symptomen van infectie kunnen beperkt blijven tot enkele ingezonken cellen ter grote van een speldenknop, of wat langere stroken van ingezonken cellen tussen de nerven. Vaak ontstaan (roest)bruin gekleurde vertekeningen aan de onderkant van het blad tussen de nerven, of juist op de nerven. In de loop van de tijd kunnen dergelijke bruine plekken zich uitbreiden tot grotere plekken. De dichtheid van deze (roest)bruine verkleuring kan sterk verschillen van enkele plekken per blad tot tientallen plekken per blad. In enkele gevallen ontstaan ook grotere necrotische plekken. Na verloop van tijd zullen de symptomen die aan de onderkant van het blad ontstaan ook aan de bovenkant van het blad zichtbaar worden. Daarnaast blijft een PIAMV-infectie ook vaak symptoomloos.



Figuur 1. Variantie aan symptomen veroorzaakt door een infectie met PIAMV bij lelie. Type symptoom wordt met name door type lelie en cultivar bepaald. Bij veel lelies is een PIAMV-besmetting ook symptoomloos.

Aankoop van partijen kan worden ondersteund door PIAMV-toetsresultaten vanuit het voorafgaande teeltseizoen. De PIAMV-toets die in augustus/september wordt uitgevoerd, geeft uitsluitend informatie over de aanwezigheid van reeds aanwezige PIAMV-infecties (de 2^{de}-jaars infecties). PIAMV-infecties die na de bladbemonstering tijdens het afmaaien/klepelen/rooien/spoelen/verwerken/ontsmetten/inpakken nog kunnen gaan plaatsvinden (de 1^{ste}-jaars infecties), worden niet gedetecteerd.

Analyse van lelie-partijen die in dit onderzoek gebruikt worden laat zien dat bij het merendeel van de partijen het percentage infectie tijdens de teelt in 2012 veel hoger is dan dat men op basis van de bladtoetsresultaten van 2011 zou doen vermoeden (Hoofdstuk 2). Het is onduidelijk of recente 1^{ste}-jaars infecties (die niet gedetecteerd zijn met de PIAMV-bladtoets) in dezelfde mate tot typische PIAMV symptomen leiden ten opzichte van reeds aanwezige virusinfecties (die wel door de PIAMV-toets zijn gedetecteerd).

3.2 Werkwijze

Bij dit onderdeel wordt er gebruik gemaakt van twee type leliepartijen: PIAMV-vrije partijen en PIAMV-besmette partijen. Bij PIAMV-vrije partijen worden lelies wel en niet kunstmatig besmet met PIAMV. Ten opzichte van de controle behandeling (niet besmet) worden dus uitsluitend 1^{ste}-jaars infecties aangebracht.

Bij de PIAMV-besmette partijen zijn eerst met behulp van een ELISA-toets op de bol viruszieke en virusvrije bollen van elkaar gescheiden. Naast de controle behandeling (ELISA negatief) zijn bollen handmatig besmet met PIAMV. Ten opzichte van de controle behandeling (niet besmet) worden dus hierdoor 1^{ste}-jaars infecties aangebracht. Bollen met een 2^{de}-jaars infectie zijn bollen met een positieve toetsuitslag op basis van ELISA op de bol. In Tabel 2 staat een overzicht van de virusvrije en viruszieke partijen die bij dit onderdeel zijn gebruikt.

Het was het streven om per behandeling 80 individuele lelies te telen. Vanwege onverwacht hoge besmettingspercentages kon bij een aantal partijen dit aantal voor virusvrij getoetste bollen niet behaald worden.

Per behandeling zijn 80 bollen in 8 kratten geteeld (plantdatum 20 februari 2012). Kratten stonden los van de ondergrond. Voor de teelt is potgrond gebruikt (Substraat Bollengrond A, pH 6,0, EC 0,40, Slingeland-Horticoop). De bloementeelt heeft plaatsgevonden onder standaard bloementeelt omstandigheden (dag- en nachttemperatuur 15°C, temperatuur tijdens luchten 16°C, 4 mm watergifte per 2-3 dagen, geen extra bijbelichting).

1^{ste}-jaars infecties zijn handmatig bij behandelingen B en D aangebracht. Hiertoe werd op de dag van infectie virussap van PIAMV-besmette planten gemaakt door 1 deel PIAMV-besmet blad te malen in 4 delen fosfaatbuffer. Via filtratie over kaasdoek zijn plantresten verwijderd. Planten die ±5-10 cm boven de grond kwamen, zijn handmatig geïnoculeerd m.b.v. carborundumpoeder en via injectie van virussap in het groeipunt. Per plant is ± 1 ml virussap gebruikt voor mechanische inoculatie.

Rond het bloeistadium (half juni 2012) zijn de lelieplanten individueel visueel beoordeeld. Aanwezigheid van PIAMV is bepaald met een ELISA bladtoets.

3.3 Resultaten en discussie

Bij de selectie van virusvrije en viruszieke bollen binnen een partij bleek dat op basis van de boltoets resultaten bij partij LA2, LA3 en OT2 onvoldoende bollen beschikbaar waren om 2x 80 planten voor behandeling C en D op te kunnen planten (Tabel 2). Voor de overige partij/behandeling combinaties konden om en nabij 80 planten per behandeling worden opgeplant.

ELISA-analyse van de controle behandeling van virusvrij aangekochte partijen OR5, LA4, OT4 en LO4 bevestigde dat deze partijen virusvrij waren (0% PIAMV met de bladtoets). Vanzelfsprekend werden ook geen visuele PIAMV-symptomen waargenomen. Het aanbrengen van een 1^{ste}-jaars infectie gebeurde met een efficiëntie tussen 20 en 88% (behandeling B bij OR5, LA4, OT4 en LO4). Bij OR5, LA4 en OT4 laten een vergelijkbaar aantal besmette planten ook daadwerkelijk visuele symptomen zien. Een 1^{ste}-jaars infectie laat bij deze partijen dus meteen zichtbare schade zien. Bij LO4 laat slechts 4% van de planten symptomen zien (80% van de planten is met PIAMV besmet).

Bij controlebehandeling C werd verrassend altijd een hoge besmetting met PIAMV waargenomen (68-100% PIAMV bij OR2, OR3, LA2, LA3, OT1 en OR2). Dit was onverwacht.

Dit betrof immers virusvrij getoetste bollen, weliswaar vanuit een besmette cultivar. Met het gegeven dat de virusvrij getoetste bollen alsnog virusbesmet blijken te zijn, had het achteraf geen toegevoegde waarde om bij behandeling D een 1^{ste}-jaars PIAMV-infectie aan te brengen. Deze virusvrij getoetste bollen hadden al een 2^{de}-jaars infectie.

Visuele beoordeling van PIAMV-besmette partijen lelies (behandeling D en E) liet een wisselende mate van schade zien die afhankelijk was van de partij. Ondanks een 100% besmetting met PIAMV liet LA2 nagenoeg geen visuele schade zien. Visuele schade was beperkt bij OR2, OR3, OT1 en OR2; ongeveer 9% van de virusbesmette planten vertoont symptomen. Partij LA3 vertoonde veel visuele schade; in deze partij was 96% van de planten besmet met PIAMV waarbij 74% van de viruszieke planten visuele virussymptomen laat zien. De mate van visuele schade wordt blijkbaar sterk bepaald door het lelietype type en de cultivar.

De 100% besmette partijen OR2, LA2 en LA3 zijn ook gebruikt bij onderzoek naar de invloed van teeltomstandigheden op de visuele schade⁵. Ook in dit onderzoek bleek dat teeltomstandigheden en cultivar van grote invloed zijn op de visuele schade tijdens de broei. Afhankelijk van de teeltlocaties werd verschillende mate aan visuele schade waargenomen (Tabel 5). In dit onderzoek was het bloeimoment en de visuele beoordeling half mei 2012 (teelt van week 4 t/m week 20). De teelt en visuele beoordeling van de lelies voor onderzoek naar symptomen veroorzaakt door 1^{ste}- en 2^{de}-jaars infectie vond ongeveer een maand later rond half juni 2012 plaats (teelt van week 8 t/m week 24). Tabel 5 laat zien dat niet alleen de teeltlocatie van invloed is (waarschijnlijk samenstelling grond/substraat), maar dat ook het teeltmoment invloed heeft op de mate van visuele schade. Op basis van praktijkervaringen zijn het waarschijnlijk met name de zonuren en daglengte die hierbij een grote rol spelen.

3.4 Conclusies

- Het percentage PIAMV in een geïnfecteerde partij is vaak hoger dan op basis van de bladtoets uit het voorgaande teeltseizoen bekend was.
- De ELISA-boltoets geeft (in dit onderzoek) bij een PIAMV-besmette partij een onderwaardering van het percentage PIAMV.
- Selectie van virusvrije bollen in een virusbesmette partij op basis van een ELISA boltoets is niet betrouwbaar. De meeste virusvrij getoetste bollen blijken tijdens de nateelt alsnog virusbesmet te zijn.
- Handmatige infectie heeft een wisselende efficiëntie (20-88%, afhankelijk van de partij)
- De visuele schade in een partij wordt voornamelijk door cultivar, teeltlocatie en teeltmoment bepaald. Een 1^{ste}-jaars of primaire infectie lijkt vergelijkbare visuele schade te geven als een 2^{de}-jaars of secundaire PIAMV-besmetting.

Tabel 2. Leliepartijen gebruikt bij onderzoek naar symptoomvorming bij 1^{ste} en 2^{de}-jaars infectie met PIAMV.

PIAMV-vrije partijen (0% PIAMV)	PIAMV-besmette partijen	% PIAMV (bladtoets 2011)	% PIAMV (boltoets 2012)	Verhouding getoetste bollen gezond/ziek
OR5	OR2	63	51	132 / 117
LA4	OR3	20	38	145 / 235
OT4	LA2	72	64	157 / 93
L04	LA3	48	79	218 / 57
	OT1	50	33	93 / 187
	OT2	75	96	269 / 11

⁵ De Kock M, Kok H, Van Aanholt H, Van der Lans A, Lemmers M & Sloopweg C (2012) Onderdrukking symptoomvorming PIAMV tijdens broei van lelies. PT project 14518.

Tabel 3. Behandelingen bij onderzoek naar symptoomvorming bij 1^{ste}- en 2^{de}-jaars infectie met PIAMV.

behandeling	PIAMV-status bij aankoop	Toetsuitslag	Omschrijving
A	PIAMV-vrije partij	-	controle opplant
B	PIAMV-vrije partij	-	1 ^{ste} -jaars PIAMV-infectie aangebracht
C	PIAMV-besmette partij	Virusvrij getoetste bollen	controle opplant
D	PIAMV-besmette partij	Virusvrij getoetste bollen	1 ^{ste} -jaars PIAMV-infectie aangebracht
E	PIAMV-besmette partij	Virusziek getoetste bollen	2 ^{de} -jaars infectie

Tabel 4. PIAMV symptoomontwikkeling bij verschillende partijen lelie die virus vrij zijn (behandeling A en C), een 1^{ste}-jaars PIAMV-infectie hebben (behandeling B en D) of een 2^{de}-jaars infectie hebben. Zie Tabel 3 voor een uitgebreidere beschrijving van de behandelingen.

Partij lelie	Behandeling	Aantal planten	% PIAMV besmet	% met PIAMV symptomen
OR5	A	80	0	0
	B	80	51	53
LA4	A	80	0	0
	B	80	70	80
OT4	A	80	0	0
	B	76	20	24
L04	A	80	0	0
	B	80	88	4
OR2	C	74	97	15
	D	78	100	8
	E	79	96	8
OR3	C	77	96	10
	D	72	99	7
	E	76	100	12
LA2	C	37	68	3
	D	50	100	0
	E	79	100	5
LA3	C	27	96	78
	D	28	93	68
	E	79	97	85
OT1	C	80	81	16
	D	80	74	10
	E	79	100	10
OT2	C	9	100	0
	D	0	-	-
	E	79	100	8

Tabel 5. Variatie aan visuele schade in drie partijen lelie (100% besmet met PIAMV) die op verschillende locaties en verschillende momenten geteeld zijn.

Partij lelie (100% PIAMV)	Variatie aan visuele schade op verschillende teeltlocaties ⁵	Visuele schade (teeltlocatie PPO, teelt week 4 – 20) ⁵	Visuele schade (teeltlocatie PPO, teelt week 8 – 24)
OR2	29 – 76%	29%	8%
LA2	0 – 3%	3%	3%
LA3	11 – 64%	43%	80%

4 Bodemgebonden verspreiding van PIAMV

4.1 Introductie

Vanuit het onderzoek zijn er zeer sterke aanwijzingen dat tijdens de teeltfase van lelie (zowel buitenteelt als kasteelt) verspreiding van PIAMV plaatsvindt zonder er door menselijk handelen beschadiging of verwonding van het gewas plaats vindt ⁶. Ook zijn er vanuit de praktijk signalen dat er pleksgewijze PIAMV-symptomen worden waargenomen, zgn nestjes met PIAMV-symptomen. Er is nog geen enkele aanwijzing op welke wijze deze verspreiding plaatsvindt. Er wordt daarom onderzoek gedaan naar een mogelijke niet-mechanische verspreiding van PIAMV tijdens teelt waarbij extra aandacht wordt gegeven aan de betrokkenheid van een virusvector zoals nematoden, mijten en/of specifieke schimmels.

PIAMV is een potexvirus waarvan er ruim 50 verschillende bekend zijn. Hosta virus X, Pepino-mozaïekvirus en Tulpenvirus X zijn het meest verwant aan PIAMV. Potexvirussen worden altijd op mechanische wijze (beschadiging/verwonding) verspreid. Ook vindt er verspreiding van potexvirussen plaats via generatieve vermeerdering, oculeren, of enten. Voor slechts een paar potexvirussen is virusverspreiding via bladluizen beschreven; voor de meeste andere potexvirussen is dit uitgesloten. Verspreiding van een potexvirus door bladluizen is dus uitzonderlijk. Typisch voor de verspreiding van enkele specifieke potexvirussen door bladluizen is dat slechts één of enkele bladluisoorten desbetreffend potexvirus kunnen verspreiden. In enkele gevallen is tevens een tweede helpervirus noodzakelijk. Voor HVX, PepMV en TVX is verspreiding via bladluizen in ieder geval niet eerder aangetoond en op basis van ervaring uit de praktijk niet aannemelijk. Voor PIAMV is dit ook niet aannemelijk.

Verspreiding van potexvirussen via mijten is voor enkele virussen aangetoond. Tulpengalmijt is de belangrijkste vector van TVX, maar tulpengalmijt is geen plaagorganisme van lelie. Onderzoek heeft aangetoond dat er geen aanwijzingen zijn dat bollenmijt een vector van PIAMV is ⁶. Er wordt daarom niet verwacht dat mijten een rol spelen bij de verspreiding van PIAMV tijdens de teelt.

In onderzoek is aangetoond dat er TVX-verspreiding kan optreden wanneer gezonde tulpen worden geteeld op grond waardoorheen TVX-geïnfecteerd bladmateriaal is gefreesd ⁷. Of bij deze virusinfectie vanuit de grond een vector betrokken is (zoals een nematode of schimmel), is vooralsnog onduidelijk. Voor PepMV is aangetoond dat naast mechanische verspreiding, virusverspreiding ook kan plaatsvinden via de grondgebonden schimmel *Ospidium virulentus* ⁸. Deze oömycete staat ook bekend als de vector van Tabaksnecrose virus, de veroorzaker van Augustaziek bij tulp. Virusverspreiding via een grondgebonden vector wordt gekarakteriseerd door het ontstaan van een lokale plek met infecties. Verspreiding van een potexvirus via een nematode is niet eerder beschreven. Daarnaast zijn er ook geen publicaties bekend van verspreiding van een potexvirus via wortel-wortelcontact of via gewas/virusrestanten in de bodem.

⁶ De Kock M, Kok H, Van Aanholt H, Lemmers M, Pham K (2012) Onderzoek naar herkomst en verspreidingsroutes van *Plantago asiatica* mozaïekvirus (PIAMV). PT project 14135.

⁷ De Kock M, Lommen S, Lemmers M, Pham P, Martin W (2012) Onderzoek naar verspreiding van TVX via water, mijten en bodemgebonden vectoren. PT project 13630.

⁸ Alfaro-Fernández A, Del Carmen Córdoba-Sellés M, Herrera-Vásquez J, Cebrián, M d C, Jordá C. (2010), Transmission of Pepino mosaic virus by the fungal vector *Ospidium virulentus*. *Journal of Phytopathology*, 158: 217–226.

4.2 Werkwijze

Onderzoek naar bodemgebonden virusverspreiding werd met potgrond (Substraat Bollengrond A, pH 6.0, EC 0,40, Slingeland-Horticoop) en met zandgrond (herkomst Proeftuin PPO Lisse) in een pottenproef uitgevoerd (Figuur 2). Per behandeling is er een beplanting uitgevoerd zonder aanvullende PIAMV-bollen in de pot (aangegeven in Tabel 7 met 'gezond') en met twee PIAMV-besmette bollen (OR1) naast een virusvrije bol (OR5) in een pot (aangegeven in Tabel 7 met '+ virusbron'). Per behandeling zijn 40 individuele potten zonder- en 40 individuele potten met virusbron aangeplant. Als controle zijn 200 virusvrije bollen zonder aanvullende virusbron in potgrond geteelt. Behandelingen met 1 leliebol werden opgeplant in 1,5 liter potten (behandelingen 'gezond' in Tabel 7); behandelingen met 3 leliebollen (2x OR1, 1x OR5) werden opgeplant in 5 liter potten (aangegeven in Tabel 7 met '+ virusbron'). Bollen van OR1 en OR5 zijn voor planten ontsmet met 0.5% Shirlan en 0.3% Sportak. Watergift werd per pot voorzichtig net boven de grond gedaan zodat er niet gespat werd. Tevens stond elke pot op een schoteltje om te voorkomen dat vloeistof van de ene pot naar de andere pot kon overgaan. Hierdoor werd eventuele virusverspreiding via gietwater tussen individuele potten vermeden. Elke virusvrije bol (OR5) werd genummerd opgeplant en analyse op blad, bol en tijdens de nateelt werd op nummer uitgevoerd.

Om te bepalen of er een schimmel betrokken was bij eventuele bodemgebonden verspreiding van PIAMV, zijn bij behandeling 3 de grond en de bollen voor deze behandeling behandeld met het fungicide Captan (2g/kg grond, of domping in 0.5% Captan).

Om te bepalen of er een biologische vector bij betrokken was, is de zandgrond voor het planten gesteriliseerd door middel van stomen.

De lilies zijn tegelijkertijd geplant. Vanwege verschil in bewaring liep OR1 ± 2 weken eerder uit dan OR5. OR1 had daarmee al een groter wortelstelsel op het moment dat OR5 wortelgroei ging vertonen.

Tijdens de groei van de lilies zijn visuele symptomen van PIAMV-besmetting bestudeerd. Drie weken na de bloei is van elke individuele lelie van de aanvankelijke virusvrije partij OR5 de aan- of afwezigheid van PIAMV bepaald (kolom PIAMV (ELISA blad) tijdens 1^{ste} teelt in Tabel 7). Er is voor gekozen de lieteelt na de ELISA-analyse op het blad voort te zetten en de planten enkele maanden langer te laten groeien zodat uiteindelijk een bol gerooid kon worden.

Alle 480 bollen van OR5 zijn na het afsterven van de lilies op nummer gerooid en op nummer bewaard. Van alle bollen die met ELISA op het blad tijdens de 1^{ste} teelt virusvrij getoetst zijn, is een schubmonster genomen voor PCR-detectie van PIAMV. Na een bewaarperiode van 2 maanden zijn de bollen opnieuw per stuk op pot opgeplant om met een ELISA-bladtoets het viruspercentage te bepalen.

Voorafgaand aan het planten van de eerste teelt is van de gebruikte grondsoorten/behandelingen een nematoden analyse uitgevoerd. Tevens zijn tijdens de pottenteelt (1^{ste} teelt) leliewortels uit de potten opgegraven om met behulp van PCR-diagnostiek specifieke schimmels die als virusvectoren bekend staan te detecteren.

4.3 Resultaten en discussie

4.3.1 Nematodenanalyse bodem

Voorafgaand aan het planten van de eerste teelt is voor de gebruikte grondsoorten/behandelingen een nematoden analyse uitgevoerd (Tabel 6). In zowel de potgrond als de zandgrond zijn geen nematoden aanwezig waarvan bekend is dat zij betrokken zijn bij de overdracht van plantenvirussen. Dit zijn specifiek (*Paratrichodorus*) nematoden als vector van Tabaksratelvirus (TRV) en *Xiphinema diversicaudatum* als vector van *Arabidopsis*-mozaïekvirus (ArMV). In behandeling 2 (zandgrond) zijn tien *P. penetrans* nematoden per 100 ml grond aanwezig. In de gestoomde grond wordt deze populatie niet meer teruggevonden hetgeen aangeeft dat de nematodenpopulatie met het stomen succesvol is afgedood.



Figuur 2. Onderzoek naar bodemgebonden verspreiding van PIAMV via pottenproeven.

Tabel 6. Nematoden aanwezig in de verschillende type grond/behandelingen.

Behandeling / type grond	Waargenomen nematoden	Aantal per 100ml)
1. Potgrond	<i>Pratylenchus vulnus</i> Houtwortelzieaaltje	15
2. Zandgrond	<i>Pratylenchus penetrans</i> Gewoon wortelzieaaltje	10
3. Zandgrond (fungicide behandeld)	<i>Pratylenchus penetrans</i> Gewoon wortelzieaaltje	10
4. Zandgrond (gestoomd)	geen	0

4.3.2 Analyse infectie met PIAMV

Tijdens de groei van de lelies zijn visuele symptomen van PIAMV-besmetting bestudeerd. PIAMV-besmette OR1 lelies vertoonden typische visuele symptomen gedurende de teelt. OR5 lelies bleven nagenoeg vrij van symptomen. Slechts vijf lelies van het type OR5 vertoonden tijdens de 1^{ste} teelt typische symptomen van PIAMV-besmetting. Dit waren 2 planten van behandeling 2b (zandgrond met virusbron in de pot) en 3 planten van behandeling 4b (gestoomde zandgrond met virusbron). Dit waren de eerste aanwijzingen dat er een infectie in deze OR1 planten had plaatsgevonden.

Drie weken na de bloei is van elke individuele lelie van de aanvankelijke virusvrije partij OR5 de aan- of afwezigheid van PIAMV met ELISA bepaald (kolom PIAMV (ELISA blad) tijdens 1^{ste} teelt in Tabel 7). Bij behandeling 1a (potgrond) werd in de controle zonder aanplant van extra virusbron bij één van de 200 planten met ELISA PIAMV aangetoond (extinctie waarde 0.86). Bij behandeling 1b (potgrond) werd bij aanplant met virusbron bij één van de 40 planten PIAMV aangetoond. Bij de controle-beplantingen bij behandeling 2a, 3a en 4a (zonder extra virusbron) werd met ELISA aan het blad geen PIAMV aangetoond. Bij behandeling 2b (zandgrond) en 4b (gestoomde zandgrond) met extra virusaanplant werden 2, resp. 3 planten met PIAMV in het blad waargenomen.

Op basis van deze ELISA-analyses leek het erop dat de virusvrije OR5 mogelijk licht besmet was met PIAMV. Eén van de 360 OR5-lemes die op een pot geteeld waren zonder aanvullende virusbron leek besmet met PIAMV te zijn; een viruspercentage van 0.27%. Bij aanplant van een virusbron werden geen, of slechts beperkte infectiepercentages waargenomen (0% - 7.5% bij n=40). Dit zijn geen significante verschillen ten opzichte van 0.27% in de controle met n=360).

Tijdens de teelt is met PCR-diagnostiek onderzocht of de schimmels *Olpidium spp.*, en *Polymyxa spp.* aanwezig waren op de wortels van zeven individuele bollen van OR5 die tijdens de 1^{ste} teelt ELISA-positief voor PIAMV waren bevonden. *Olpidium* is de vector van PepMV en TNV. *Polymyxa spp.* is de grondgebonden vector van twee virussen behorende tot het genus Furovirus (Beet necrotic yellow vein virus en Beet soil-borne virus).

Polymyxa kon op geen van de wortels worden aangetoond. Daarentegen werd *Olpidium virulentus* op één van de wortelmonsters met een directe PCR aangetoond (behandeling 4, gestoomde zandgrond); met een *nested* PCR (veel gevoeliger dan een directe PCR) waren twee aanvullende monsters positief voor *Olpidium* (behandeling 2, zandgrond en behandeling 4 gestoomde zandgrond). In dit geval ging het waarschijnlijk om een zeer lage hoeveelheid *Olpidium*. Ondanks dat de grond van behandeling 4 gestoomd was, en de bollen met het fungicide Captan waren behandeld, werd toch bij drie individuele lelies (beperkte hoeveelheid) *Olpidium* aangetoond. Bij de overige vier OR5 lelies die via de bodem besmet zijn geraakt met PIAMV werd daarentegen geen *Olpidium* aangetroffen.

Er is voor gekozen de lelieteelt na de ELISA-analyse op het blad voort te zetten en de planten enkele maanden langer te laten groeien zodat uiteindelijk een bol gerooid kon worden.

Alle 480 bollen van OR5 zijn na het afsterven van de lelies op nummer gerooid en op nummer bewaard. Van alle bollen die met ELISA op het blad tijdens de 1^{ste} teelt virusvrij getoetst zijn, is een schubmonster genomen voor PCR-detectie van PIAMV. PCR-detectie werd door BQ-Support uitgevoerd (Tabel 7). Naast een positief/negatief resultaat wordt ook de Cq-waarde van een PCR-toets gerapporteerd. De Cq-waarde is een relatieve maat voor de hoeveelheid PIAMV dat in een monster aanwezig was. Cq-waarden lager dan 34 zijn positief.

Van behandeling 1a (zonder extra virusbron) zijn 199 schubben als mengmonster geanalyseerd. Er werd geen PIAMV waargenomen. Deze analyse bevestigt dat deze ELISA-negatieve lelies daadwerkelijk virusvrij zijn. Van de behandelingen 1b, 2b, 3b en 4b (met virusbron) zijn de schubben van bollen die ELISA-negatief waren per behandeling als 4 mengmonsters van 7-10 schubben getoetst. Als deze 12 mengmonsters toetsten positief voor PIAMV. Cq-waarden waren relatief laag, hetgeen aantoont dat er wel degelijk sprake is van PIAMV besmetting in deze mengmonsters.

Planten die tijdens de teelt op basis van een ELISA-toets op het blad virusvrij werden beoordeeld, bevatten daarentegen weldegelijk een PIAMV-besmetting in de bol.

Omdat de PCR-analyse van schubben geen informatie gaf over een besmettingspercentage van de 40 bollen per behandeling, zijn de bollen na een bewaarperiode van 2 maanden opnieuw per stuk op pot geplant om alsnog met een ELSIA-bladtoets het werkelijke viruspercentage te bepalen (Tabel 7). Er is alle moeite voor gedaan om enige vorm van mechanische virusverspreiding tussen het rooien van de bollen aan het einde van de 1^{ste} teelt, en het planten van de 2^{de} teelt (de nateelt) te voorkomen.

Tabel 7. Onderzoek naar bodemgebonden virusverspreiding van PIAMV bij lelie. Virusvrije lelies planten (OR5) zijn met en zonder virusbesmette lelies (OR1) in een pot geteeld met verschillende soorten grond en grondbehandelingen. Lelieplanten (OR5) zijn genummerd met ELISA aan het blad getoetst op aanwezigheid van PIAMV. Na het rooien is met een PCR-toets de aanwezigheid van PIAMV in aanvankelijk virusvrij getoetste planten bepaald. Percentage PIAMV in individuele OR5 planten is opnieuw met een ELISA aan het blad in een 2^{de} teelt (nateelt) bepaald.

Behandeling		1 ^{ste} teelt				Bol na rooien		2 ^{de} teelt (nateelt)		werkelijk % PIAMV tijdens 1ste teelt
Type grond	Bepanting	plant nr	PIAMV (ELISA blad)	aantal planten	PCR-10 toets	Cq-waardes	aantal	PIAMV (ELISA blad)		
1. Potgrond	a. gezond	1 - 200	0.5%	virusvrij	199	NEG	35.31	188	0%	0%
				PIAMV	1	-	-	1	0%	
Potgrond	b. + virusbron	201 - 240	2.5%	virusvrij	39	4x POS	23/32/24/25	39	97%	98%
				PIAMV	1	-	-	1	100%	
2. Zandgrond	a. gezond	241 - 280	0.0%	virusvrij	40	-	-	-	-	0%
				PIAMV	0	-	-	-	-	
Zandgrond	b. + virusbron	281 - 320	5.0%	virusvrij	38	4x POS	22/23/22/16	36	36%	36%
				PIAMV	2	-	-	2	100%	
3. Zandgrond + fungicide	a. gezond	321 - 360	0.0%	virusvrij	40	-	-	-	-	0%
				PIAMV	0	-	-	-	-	
Zandgrond + fungicide	b. + virusbron	361 - 400	0.0%	virusvrij	40	4x POS	24/26/31/27	34	32%	32%
				PIAMV	0	-	-	-	-	
4. Zandgrond gestoomd	a. gezond	401 - 440	0.0%	virusvrij	40	-	-	-	-	0%
				PIAMV	0	-	-	-	-	
Zandgrond gestoomd	b. + virusbron	441 - 480	7.5%	virusvrij	37	4x POS	21/20/20/19	22	50%	56%
				PIAMV	3	-	-	3	100%	

Alle 189 opgekomen planten van behandeling 1a (potgrond zonder extra virusbron) waren ELISA-negatief in de nateelt. De plant die in de 1^{ste} teelt positief voor PIAMV bleek te zijn, was in deze analyse ELISA-negatief. Mogelijk dat het waargenomen positieve ELISA-resultaat tijdens de 1^{ste} teelt een vals-positief ELISA-resultaat betrof, mede omdat deze lelie tijdens de 1^{ste} teelt symptomloos bleef.

Het is zeer opvallend dat bij alle behandelingen waarbij tijdens de 1^{ste} teelt ook viruszieke lelies in de pot groeiden, aanzienlijke PIAMV besmettingen bij OR5 zijn opgetreden (behandelingen 1b, 2b, 3b, en 4b). Er worden duidelijke en significante verschillen in PIAMV besmetting gevonden. Het laagste risico op PIAMV-besmetting via een bodemgevonden virusverspreiding vond in deze proefopzet plaats bij teelt in zandgrond en in zandgrond behandeld met een fungicide (behandeling 2b en 3b). Ongeveer 1/3 van de 40 lelieplanten raakte vanuit de twee viruszieke lelies (OR1) via de bodem besmet met PIAMV. Vanwege deze vergelijkbare resultaten wordt geconcludeerd dat schimmels niet betrokken zijn bij deze vorm van virusverspreiding. Wanneer het bodemleven via stomen wordt afgedood, dan neemt het viruspercentage toe van 36% naar 56% (behandeling 2b, resp. 4b). Mogelijk dat micro-organismen in de bodem een rol spelen bij de onderdrukking van bodemgebonden verspreiding van PIAMV; micro-organismen zijn (nagenoeg) afgedood in gestoomde grond.

De nematoden aanwezig in de zandgrond (behandeling 2) waren niet meer aanwezig in de gestoomde zandgrond (behandeling 4). Daarom suggereren deze resultaten dat nematoden niet betrokken zijn bij een bodemgebonden verspreiding van PIAMV.

Teelt in potgrond laat extreme infectie bij OR5 zien; 39 van de 40 planten blijkt met PIAMV besmet te zijn (behandeling 1b). Blijkbaar heeft de samenstelling van de grond invloed op de mate waarop PIAMV via de bodem kan verspreiden.

Onderzoek aan het voorkomen van een bodemgebonden verspreiding van PIAMV heeft dit fenomeen duidelijk aangetoond. Er is een relatief hoge virusdruk in de pottenproef aangelegd (2 ziek (OR1) ten opzichte van 1 gezond (OR5)). Mede daarom zijn er duidelijke resultaten verkregen met zelf verschillen tussen behandelingen en grondsoorten. Het is zeer waarschijnlijk dat er geen biologische vector bij deze vorm van virusverspreiding betrokken is. Het is echter onbekend of deze vorm van virusverspreiding het gevolg is van wortel-wortel-contact tussen een zieke en een gezonde lelie, of dat er ook vrije virusdeeltjes in de bodem aanwezig zijn die via de wortels een plant besmetten. Het is ook onbekend of er een groot verschil in wortelgroei is tussen teelt in zandgrond en potgrond en of dit hierbij eventueel een rol kan spelen.

Het is voor de leliesector een gevaarlijke constatering dat tijdens het optreden van een bodemgebonden verspreiding van PIAMV dit niet of nauwelijks met een ELISA-toets op het blad aan te tonen is (Tabel 8). Wanneer de nateelt bijvoorbeeld bloemproductie in de broei is, dan is de schade aanzienlijk terwijl deze partij op basis van de ELISA-bladtoets een virusarme status had meegekregen. Tijdens de 1^{ste} teelt werd de bodemgebonden besmetting nauwelijks aangetoond terwijl in de nateelt aanzienlijke infecties zichtbaar waren. De lelies waren tijdens de 1^{ste} teelt niet alleen ELISA-negatief aan het blad, ook werden nauwelijks symptomen waargenomen. Dit zou weer een 'gelukje bij een ongeluk' voor de broei zijn. Blijkbaar blijft PIAMV in deze cultivar tijdens het seizoen dat de bodemgebonden virusverspreiding optreedt, ondergronds in het wortelstelsel en bol aanwezig en verspreidt PIAMV zich vanuit de wortels tijdens dit 1^{ste} teeltseizoen zich niet systemisch door de hele plant.

Tabel 8. PIAMV percentage bepaald met ELISA aan het blad tijdens het 1^{ste} teeltseizoen, het moment waarop de bodemgebonden virusverspreiding optrad, en tijdens het 2^{de} teeltseizoen (de nateelt van dezelfde bollen). Tussen het rooien van de 1^{ste} teelt en het planten van de 2^{de} teelt heeft er minimaal risico op mechanische PIAMV-infectie opgetreden.

Type grond	Behandeling	% PIAMV 1 ^{ste} teelt	% PIAMV 2 ^{de} teelt (nateelt)
1. Potgrond	a. gezond	0.5% (n=200)	0.0% (n=189)
	b. + virusbron	2.5% (n=40)	98% (n=40)
2. Zandgrond	b. + virusbron	5.0% (n=40)	36% (n=38)
3. Zandgrond + fungicide	b. + virusbron	0.0% (n=40)	32% (n=34)
4. Zandgrond gestoomd	b. + virusbron	7.5% (n=40)	56% (n=25)

4.4 Overig onderzoek naar bodemgebonden virusverspreiding

4.4.1 Analyse PIAMV in onkruid

Bekende waardplanten voor PIAMV zijn weegbree, lelie, *Nandina domestica* en Primrose (*Primula vulgaris*). Daarnaast kan PIAMV infecties veroorzaken bij zgn toetsplanten (*Arabidopsis thaliana*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* en *Nicotiana benthamiana*).

Tijdens de pottenteelt vond er spontane groei van vogelmuur en kleine brandnetel plaats. M.b.v. PCR-diagnostiek kon PIAMV worden aangetoond in vogelmuur (*Stellaria media*) en kleine brandnetel (*Urtica urens*). Deze resultaten tonen aan dat PIAMV niet alleen via de bodem van lelie naar lelie kan verspreiden, maar ook van lelie naar onkruiden zoals vogelmuur en kleine brandnetel.

Het optreden van bodemgebonden verspreiding van PIAMV van lelie naar frequent voorkomende onkruiden kan er toe leiden dat virusreservoirs ontstaan. Dergelijke virusreservoirs kunnen op hun beurt mogelijk weer als infectiebron optreden bij aanplant van een volgend vatbaar gewas voor PIAMV, bijvoorbeeld een nieuwe teelt lelies. Onderzoek naar deze risico's worden in vervolgonderzoek nader bestudeerd⁹.

4.4.2 Hergebruik grond broeierij

Vanuit de praktijk is er gedurende het onderzoek de volgende ervaring gedeeld:

“Tijdens de zomermaanden is er een LA-cultivar gebroeid (bijv. cv. 1). Het was bekend dat deze cultivar een PIAMV besmetting had, maar het was ook bekend dat deze PIAMV-besmetting in deze cultivar gedurende de zomermaanden symptomeloos was. Er is een goede productie van deze PIAMV-cultivar geoogst. In het najaar is er bewust geschakeld naar een LA cultivar die getoetst vrij was van PIAMV (ELISA bladtoets 2011). Deze cultivar (bijv. cv. 2) had echter wel een LSV besmetting (~30%). Het was bij deze specifieke cultivar bekend dat LSV verder geen schade vertoont. Tijdens de bloementeelt in deze vollegrondskas werd de broeier verrast door een onbekend, maar heftig schadebeeld (Figuur 3). Enkele weken voor de geplande bloemenoogst stortte ~30% van de planten binnen enkele dagen ineen. Het leek alsof de planten met kokend water overgoten waren”

ELISA-analyse toonde aan dat in deze planten sprake was van een dubbelinfectie LSV + PIAMV. Er werd verondersteld dat tijdens de teelt van cv. 1 een PIAMV besmetting in de bodem is achterbleven die tijdens de teelt van cv. 2 heeft geleid tot een infectie met PIAMV. Deze dubbelinfectie LSV + PIAMV resulteert zichtbaar tijdens de teelt meteen (bij dit cultivar) in zeer heftige schadebeelden en een onverkoopbaar product.

Grond afkomstig van deze LSV/PIAMV-besmette lelies is hergebruikt in een kleinschalige pottenproef waarbij getoetst virusvrije lelies in deze grond zijn geplant. (OR5). Gedurende de teelt vertoonden 4 van 12 lelies typische PIAMV symptomen. Deze besmetting met PIAMV kon met ELISA worden bevestigd. Deze resultaten tonen aan dat een teelt van virusvrije lelies met PIAMV besmet kan raken na teelt op grond waar voorafgaand een PIAMV-teelt op heeft plaatsgevonden.

Nadat deze specifieke ervaringen met de leliebroeierij zijn besproken, blijkt dat er broeiers zijn die vergelijkbare (maar minder heftige) ervaringen met bodemgebonden verspreiding van PIAMV hebben. Er is ook een groep broeiers die deze schadebeelden als gevolg van bodemgebonden virusverspreiding niet ervaren hebben. Mogelijk dat bodemsamenstelling van vollegrondsbroeier en/of kistenbroeier een rol speelt bij het al dan niet optreden van deze vorm van bodemgebonden verspreiding van PIAMV. Het is ook goed mogelijk dat deze vorm van virusverspreiding weldegelijk optreedt, maar dat de gebruikte cultivars voornamelijk symptomeloos reageren (zoals ook bij §4.3.2 het geval was).

Deze resultaten tonen aan dat een PIAMV-besmette teelt er toe kan leiden dat er virus in de bodem achterblijft welke bij een volgende teelt weer voor infecties bij een vatbaar gewas kan veroorzaken.

⁹ De Kock M. en anderen (2013) Bestrijden bodemgebonden verspreiding PIAMV. PT-project 14774.

De schade die dan ontstaat is afhankelijk van de cultivar (gevoeligheid voor PIAMV) en eventuele aanwezigheid van andere virussen (dubbelinfectie laten heftige symptomen zien). Het is nog onduidelijk of het hier gaat om virusbesmette gewasresten die de infectiebron zijn, of dat het om vrije virusdeeltjes in de grond gaat.

Met deze ervaringen is het niet alleen de teelt of export die een verantwoordelijkheid heeft in het leveren van PIAMV-vrije bollen, maar is het ook de verantwoordelijkheid van de broeier om voor een PIAMV-vrije teeltomgeving te zorgen.

De details van bodemgebonden verspreiding van PIAMV, de risico's van hergebruik van PIAMV-grond (teelt en broei) en maatregelen om (broei)grond effectief PIAMV-vrij te maken zijn onderwerpen van vervolgonderzoek¹⁰.



Figuur 3. Schadebeelden van een dubbelinfectie LSV/PIAMV als gevolg van een infectie met PIAMV vanuit de bodem in een LA-lilie die reeds voor planten besmet was met LSV.

4.5 Conclusies

- Naast mechanische verspreiding van PIAMV tijdens de verwerking van gerooide bollen is er zeker ook een risico op verspreiding van PIAMV via de bodem.
- Het is zeer waarschijnlijk dat bij deze vorm van virusverspreiding geen biologische vector betrokken is.
- Het is echter onbekend of deze vorm van virusverspreiding het gevolg is van wortel-wortel-contact tussen een zieke en een gezonde lelie, of dat er ook vrije virusdeeltjes in de bodem aanwezig zijn die via de wortels een plant besmetten.
- Bij het optreden van een bodemgebonden verspreiding van PIAMV is dit (bij deze partij lelie) niet of nauwelijks met een ELISA-toets op het blad aan te tonen.
- Bij het optreden van een bodemgebonden verspreiding van PIAMV laten recent besmette lelies (bij deze partij lelie) nauwelijks tot geen symptomen zien. Dit is voor de leliesector risicovol omdat een eventueel toegenomen viruspercentage (en daarmee de kwaliteit van een partij) volgens het standaard kwaliteitskeuringssysteem (visueel en ELISA bladtoets) niet goed wordt beoordeeld.

¹⁰ De Kock M. en anderen (2013) Bestrijden bodemgebonden verspreiding PIAMV. PT-project 14774.

- Bodemgebonden verspreiding van PIAMV kan in de praktijk in ieder geval tijdens de bloemproductie optreden. Virusvrije lelies kunnen met PIAMV besmet raken na teelt op grond waar voorafgaand een PIAMV-teelt op heeft plaatsgevonden. Het virus blijft vanuit de eerste teelt in de bodem achter (in gewasresten of als vrije virusdeeltjes) en kan in de volgende teelt voor infectie zorgen.
- Bodemgebonden infectie met PIAMV in een cultivar die al (symptoomloos) besmet is met LSV kan tot zeer heftige symptomen leiden.
- Er zijn nieuwe waardplanten voor PIAMV aangetoond. Bekende waardplanten voor PIAMV zijn nu:
 - weegbree (*Plantago* spp.)
 - lelie
 - *Nandina domestica*
 - primrose (*Primula vulgaris*)
 - *Chenopodium quinoa*
 - *C. amaranticolor*
 - *Nicotiana benthamiana*
 - vogelmuur (*Stellaria media*)
 - kleine brandnetel (*Urtica urens*)

5 Mate van verspreiding tussen partijen tijdens spoelen/shaven/verwerken

5.1 Introductie

In onderzoek was aangetoond dat er verspreiding van PIAMV binnen een partij tijdens het spoelen, shaven en verwerken kan plaatsvinden¹¹. Het is belangrijk ook kennis te krijgen over de mate van PIAMV-verspreiding tussen partijen. Spoelwater wordt doorgaans gerecirculeerd en dagen/weken lang hergebruikt. Wanneer PIAMV-besmette partijen worden verwerkt, blijft er PIAMV virusdeeltjes in het spoelwater achter wat mogelijk een infectie risico oplevert voor (virusvrije) partijen die aansluitend met dit virusbesmette water worden gespoeld. Wanneer er verspreiding tussen partijen plaats vindt, dan bestaat het risico dat virusvrije partijen alsnog geïnfecteerd kunnen raken wanneer deze vlak na een virusgeïnfecteerde partij worden gespoeld. Het is er echter alles aan gelegen om virusvrije partijen ook echt virusvrij te houden.

5.2 Werkwijze

Onderzoek naar eventuele virusverspreiding tussen partijen via gerecirculeerd spoelwater vindt plaats met vier verschillende cultivars: LA4, LA5, OR6 en OR8. Deze partijen zijn op basis van de bladtoets ELISA 2011 vrij van PIAMV. Het was niet mogelijk om ongespoelde bollen te krijgen, de bollen waren dus al zandvrij gespoeld. Er is aandacht aan gegeven dat dit spoelen in een teelt- en verwerkingsomgeving plaats had gevonden met minimale risico's op PIAMV-besmetting.

Omdat de lelies al zandvrij waren gespoeld en de wortels al waren ingekort zou er tijdens het spoelen beperkte verwonding optreden. Van elke partij zijn 300 bollen afgeteld en hebben aansluitend een bepaalde mate van mechanische beschadiging gekregen (enkele keren naar links, rechts, voor, achter schudden op een gaasbak). Zonder deze mechanische beschadiging was het risico op infectie mogelijk te klein. De helft van de 300 bollen is vervolgens via een spoellijn opnieuw gespoeld. De gebruikte spoellijn met aquagrader was voorafgaand aan dit onderzoek al enkele weken in gebruik voor het verwerken van PIAMV-vrije en PIAMV-besmette partijen lelie. Tijdens het spoelen zijn diverse watermonsters genomen om aanwezigheid van PIAMV aan te tonen. Na het spoelen zijn de bollen opgevangen.

Gespoelde- en niet gespoelde bollen van de vier partijen zijn in kratten nageteeld. Kratten stonden los van de ondergrond. Voor de teelt is potgrond gebruikt (Substraat Bollengrond A, pH 6.0, EC 0,40, Slingeland-Horticoop). De bloementeelt heeft plaatsgevonden onder standaard bloementeelt omstandigheden (dag- en nachttemperatuur 15°C, temperatuur tijdens luchten 16°C, 4 mm watergifte per 2-3 dagen, geen extra bijbelichting). Drie weken na de bloei is met behulp van een ELISA op het blad het percentage PIAMV bepaald.

5.3 Resultaten en discussie

Tijdens het spoelen zijn diverse watermonsters genomen om met PCR-diagnostiek de aanwezigheid van PIAMV aan te tonen. Watermonsters zijn genomen op verschillende locaties (1^{ste} spoelbasin, 2^{de} spoelbasin, Aquagrader en opslagbasin). In alle vier watermonsters kon PIAMV met PCR worden aangetoond.

Drie weken na de bloei zijn de planten met ELISA geanalyseerd op aanwezigheid van PIAMV. De resultaten van deze analyse staan vermeld in Tabel 9.

¹¹ De Kock M, Kok H, Van Aanholt H, Lemmers M, Pham K (2012) Onderzoek naar herkomst en verspreidingsroutes van *Plantago asiatica* mozaiekvirus (PIAMV). PT project 14135.

Tabel 9. Verspreiding van PIAMV tussen partijen. Virusvrij aangekochte partijen lelie zijn wel en niet verwerkt over een spoellijn/aquagrader waar met gerecirculeerd spoelwater werd gewerkt. Voorafgaand aan deze spoelactiviteiten werd deze spoellijn gebruikt voor het verwerken van PIAMV-vrije en PIAMV besmette partijen.

Partij	% PIAMV (niet gespoeld)	% PIAMV (gespoeld)	Analyse met χ^2 (p=0.05)
LA4	1.5% (n=137)	5.0% (n=140)	Geen significant verschil
LA5	0.0% (n=144)	7.3% (n=137)	Significant toename
OR6	0.0% (n=71)	12.5% (n=80)	Significant toename
OR8	0.0% (n=100)	8.0% (n=88)	Significant toename

De virusvrij aangekochte partijen waren (nagenoeg) virusvrij. Alleen bij LA4 werd in de niet gespoelde lelies een lichte besmetting met PIAMV aangetroffen. Bij deze partij werd bij gespoelde bollen een PIAMV-besmetting van 5% waargenomen ten opzichte van 1,5% in de ongespoelde bollen. Volgens de χ^2 -test is dit met dit aantal getoetste planten geen significant verschil (p=0.05). Bij de overige drie cultivars ontstond op de spoellijn/aquagrader wel degelijk een besmetting met PIAMV als gevolg van hergebruik van het spoelwater waarin PIAMV aanwezig was. Partijen die als virusvrij de spoellijn/aquagrader in gingen, kwamen er met een besmetting tussen de 7.3% en 12.5% uit.

Naast verspreiding van PIAMV binnen een partij bestaat er dus ook een reëel risico op besmetting met PIAMV wanneer partijen verwerkt worden met hergebruikt spoelwater dat PIAMV bevat.

De virusstatus en kwaliteit van een partij lelies wordt tijdens de teelt bepaald met een ELISA bladtoets. Dit onderzoek laat zien dat deze kwaliteitskeuring slechts een momentopname is en dat de kwaliteit van een geleverde partij ook wordt bepaald door de bedrijfshygiëne van de locatie waar de lelies worden verwerkt. Met name hergebruik van virusbesmet spoelwater kan risico's op besmetting opleveren. Kopers van viruspartijen lelie wordt geadviseerd zich niet alleen te richten op het resultaat van de bladtoets, maar zich ook te laten informeren over de toegepaste bedrijfshygiëne en de virusstatus van voorgaande partijen die over de spoellijn/aquagrader zijn verwerkt.

5.4 Conclusies

- Virusverspreiding tussen partijen tijdens spoelen is een feit. Wanneer virusvrije lelies worden verwerkt over een spoellijn/aquagrader die gebruik maakt van gerecirculeerd PIAMV-besmet spoelwater bestaat er een reëel risico op besmetting van een partij lelies.
- Virusvrije partijen lelies zijn het kapitaal van de leliesector. Door verkeerde werkvolgorde en hergebruik van PIAMV-besmet spoelwater kunnen kostbare virusvrije partijen lelie besmet raken met PIAMV en in korte tijd grote waarde verliezen.

6 Invloed van rooitijdstip en tijdsduur wondherstel op risico's PIAMV-verspreiding tijdens verwerken resp. ontsmetten

6.1 Introductie

Er zijn vanuit de praktijkervaringen aanwijzingen dat de rijpheid van de bollen van invloed kan zijn op deze risico's van virusverspreiding tijdens het spoelen en verwerken van leliebollen. Vroeg gerooide bollen zijn fysiologisch actiever dan laat gerooide bollen die dan inmiddels in een rustfase zitten. Vroeg gerooide bollen zijn door exudaten die via poriën worden uitgescheiden, plakkeriger dan laat gerooide bollen. Ook lijkt het de ervaring te zijn dat wondherstel bij vroeg gerooide bollen minder snel verloopt dan bij laat gerooide bollen. Vanwege deze ervaringen leefde het vermoeden dat bij vroeggerooide bollen het risico op virusverspreiding hoger is dan bij laat gerooide bollen.

Na het verwerken van de lelies op een spoelmaschine met aquagrader worden bollen doorgaans ontsmet in een dompelbad. Wanneer daarvoor al PIAMV-besmette partijen in dit dompelbad zijn ontsmet, dan kan PIAMV relatief eenvoudig in dit ontsmettingsvloeistof worden aangetoond. Tevens kan de aanwezige PIAMV-besmetting in deze vloeistof leiden tot nieuwe besmettingen bij partijen die aansluitend worden ontsmet. Kort na het spoelen en inkorten van de wortels is wondheling nog niet voldoende waardoor er een hoger risico op virusinfectie kan zijn dan wanneer beschadigde bollen langere tijd krijgen voor wondherstel voorafgaand aan dompelen.

In dit onderdeel wordt enerzijds het de invloed van vroeg rooien versus laat rooien op PIAMV-besmetting bestudeerd. Anderzijds wordt de invloed van 1 dag versus 7 dagen rust tussen spoelen/verwerken en ontsmetten in relatie tot risico's op PIAMV-besmetting bestudeerd.

6.2 Werkwijze

Onderzoek naar invloed van rooitijdstip en tijdsduur van wondherstel op de risico's op PIAMV-infectie tijdens verwerken en ontsmetten is uitgevoerd met vier partijen lelie die op basis van de ELISA bladtoets in 2011 een matige besmetting met PIAMV hadden:

OR3	20% PIAMV tijdens ELISA bladtoets 2011
OR7	24% PIAMV tijdens ELISA bladtoets 2011
OT3	20% PIAMV tijdens ELISA bladtoets 2011
OT7	20% PIAMV tijdens ELISA bladtoets 2011

Vanwege de reeds aanwezige virusbesmetting, betreft een eventuele toename aan virus in een behandeling met name de virusverspreiding binnen een partij.

Bollen van deze partijen zijn op twee tijdstippen gerooid:

Vroeg rooien:	14 november 2011
Rijp rooien:	7 december 2011

Aansluitend op het spoelen en inkorten van de wortels op de aquagrader zijn de bollen één en zeven dagen later ontsmet in een bad met 0.5% Captan en 0.4% Mirage Elan. Tussentijds werden de bollen bewaard bij 2°C. Als controle is ook een serie bollen niet ontsmet. Omdat op de spoellocatie geen ontsmettingsmogelijkheden waren, is het ontsmetten bij PPO uitgevoerd. Voor elke partij is een apart ontsmettingsbad gemaakt waaraan een vaste hoeveelheid PIAMV toegevoegd. Voorafgaand aan het ontsmetten zijn de gespoelde bollen in de schuur bewaard (open gaasbakken). Na het spoelen zijn de bollen gedurende één dag open in de schuur teruggedroogd waarna ze ingepakt zijn voor bewaring.

Na de bewaarperiode zijn de bollen in kratten nageteeld (120 bollen per behandeling). Kratten stonden los van de ondergrond. Voor de teelt is potgrond gebruikt (Substraat Bollengrond A, pH 6.0, EC 0,40, Slingeland-Horticoop). De bloemeteelt heeft plaatsgevonden onder standaard bloemeteelt omstandigheden (dag- en nachttemperatuur 15°C, temperatuur tijdens luchten 16°C, 4 mm watergifte per 2-3 dagen, geen extra bijbelichting). Drie weken na de bloei is met behulp van een ELISA op het blad het percentage PIAMV bepaald.

6.3 Resultaten en discussie

6.3.1 Invloed rooitijdstip

Drie weken na de bloei zijn de lelies met ELISA geanalyseerd op aanwezigheid van PIAMV. De resultaten van deze analyse staan vermeld in Tabel 10. Het besmettingspercentage PIAMV is per cultivar voor beide rooimomenten met elkaar vergeleken.

Bij alle partijen vindt een toename in besmetting plaats. Deze varieert van een factor 1.3 bij OR7 en OT3 tot een factor 2.9 en 3.2 bij OR3, resp. OT5. Bij drie van de vier partijen (OR7, OT3 en OT5) wordt geen verschil in besmettingspercentage waargenomen wanneer de leliebollen vroeg (11 november) of rijp (7 december) werden gerooid. Bij partij OR3 werd echter wel een effect voor rijp rooien gevonden. Rijp gerooide bollen hadden in de nateelt significant minder PIAMV: 52% tegenover 63% PIAMV bij vroeg gerooide bollen.

Dit onderzoek toont aan dat er m.b.t. PIAMV-besmette partijen een voorkeur is voor het rooien van rijpe bollen ten opzichte van vroeg rooien. Hiermee kan het risico op verspreiding van PIAMV binnen een partij (enigszins) beperkt worden. Aan de andere kant kan de virusconcentratie in spoelwater en/of ontsmettingsbaden bij recirculatie in de loop van het rooiseizoen oplopen wanneer er ook PIAMV-besmette partijen worden verwerkt. Voor verwerking van virusvrije partijen zou het juist aan te bevelen zijn om deze vroeg te rooien en te verwerken op een moment dat er nog geen PIAMV-besmette partijen verwerkt zijn. Er moet gerealiseerd worden dat in een virusvrije werkomgeving geen virusverspreiding of infectie kan plaatsvinden, ongeacht van de hoeveelheid verwonding van een gewas.

Tabel 10. Resultaten onderzoek naar effect rooidatum bij vier partijen lelie (PIAMV percentage op basis van bladtoets 2011). Besmettingspercentage PIAMV tijdens de nateelt is per cultivar voor beide rooimomenten met elkaar vergeleken (χ^2 , $p=0.05$); a=significant gelijk, b=significant verschillend.

Rooidatum	Percentage PIAMV tijdens nateelt			
	OR3 (20%)	OR7 (24%)	OT3 (20%)	OT5 (20%)
17 nov 2011	63	30	27	66
7 dec 2011	52 b	32 a	25 a	61 a
Toename PIAMV nateelt ten opzichte van teelt 2011	2.9x	1.3x	1.3x	3.2x

6.3.2 Invloed tijdsduur wondherstel op risico's PIAMV-verspreiding tijdens ontsmetten

De resultaten van deze analyse zijn weergegeven in Tabel 11 en Figuur 4. Het besmettingspercentage PIAMV is per cultivar voor beide rooimomenten met elkaar vergeleken.

Bij OR3 wordt bij vroeg gerooide bollen geen verschil in PIAMV-besmetting waargenomen ten opzichte van niet ontsmette bollen wanneer de bollen na 1 of 7 dagen worden gedompeld in een ontsmettingsbad dat is verrijkt met PIAMV. Bij laat gerooide bollen wordt er juist een lager percentage PIAMV waargenomen bij dompelen 1 dag na spoelen (39% PIAMV) ten opzichte van niet ontsmetten en ontsmetten 7 dagen na spoelen. Bij OR 7 zijn voor beide rooidata vergelijkbare resultaten verkregen als bij OR3 gerooid op 7 december: dompelen 1 dag na spoelen in een ontsmettingsbad verrijkt met PIAMV geeft lagere infectiepercentages dan bij niet dompelen en lager dan bij dompelen 7 dagen na spoelen.

Bij partij OT3 worden onafhankelijk van wel of niet ontsmetten in een ontsmettings bad verrijkt met PIAMV vergelijkbare PIAMV-besmettingen voor beide roodata waargenomen. Daarentegen wordt bij partij OT5 ten opzichte van de niet ontsmette bollen een lagere PIAMV-besmetting waargenomen bij bollen die 1 dag na spoelen ontsmet zijn in een dompelbad verrijkt met PIAMV en bij de op 7 december gerooide bollen ook bij 7 dagen dompelen na rooien.

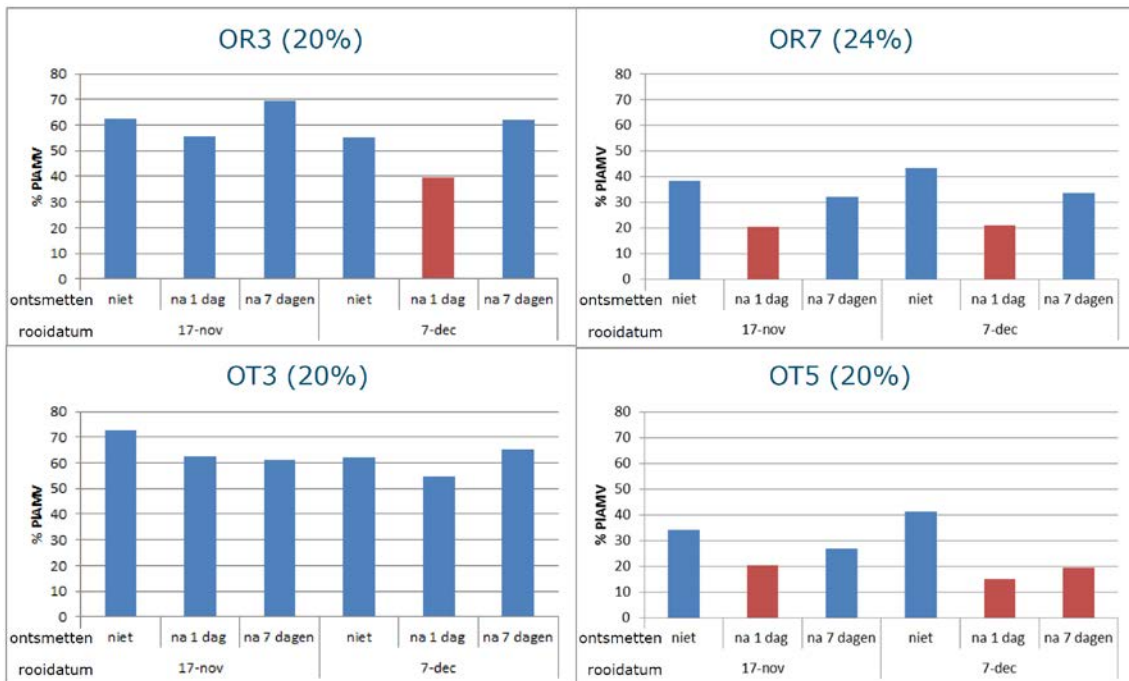
Tabel 11. Onderzoek naar risico's van dompelen in een ontsmettingsbad met PIAMV bij vier partijen lelie (PIAMV percentage op basis van bladtoets 2011) die vroeg (17 nov) of rijp (7 dec) gerooid zijn. Besmettingspercentage PIAMV tijdens de nateelt is per cultivar voor beide roomomenten met elkaar vergeleken (χ^2 , $p=0.05$); a=significant gelijk, b=significant verschillend.

Rooidatum	Ontsmetten in dompelbad	Percentage PIAMV tijdens nateelt			
		OR3 (20%)	OR7 (24%)	OT3 (20%)	OT5 (20%)
17 nov 2011	Niet	63 a	27 a	73 a	34 a
	1 dag na rooien	56 a	20 a	63 a	21 b
	7 dagen na rooien	69 a	32 b	61 a	27 a
7 dec 2011	Niet	44 a	43 a	62 a	41 a
	1 dag na rooien	39 b	21 b	55 a	15 a
	7 dagen na rooien	62 a	34 a	65 a	19 a

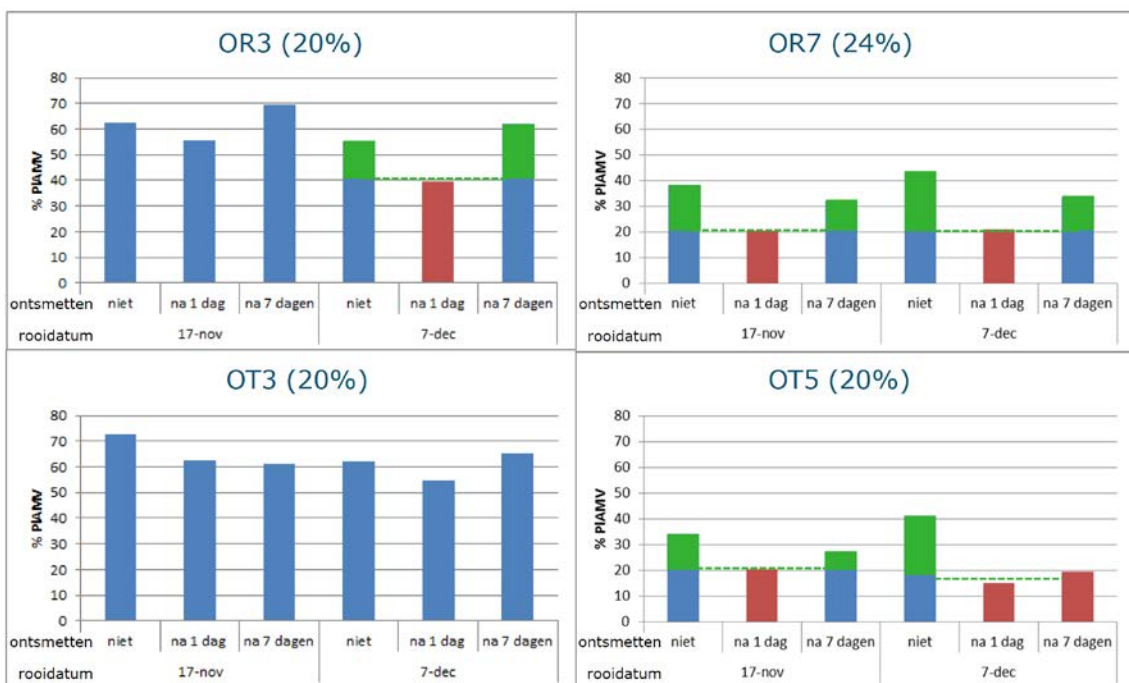
Het is opvallend dat bij bollen die op 17 november 2011 gerooid zijn, bij twee partijen bollen die gedompeld zijn in een ontsmettingsbad met PIAMV (OR7 en OT5) een lagere PIAMV-besmetting wordt gevonden ten opzichte van niet ontsmette bollen die niet zijn blootgesteld aan PIAMV in een dompelbad. Bij bollen gerooid op 7 december 2011 wordt dit fenomeen bij drie van de vier partijen waargenomen (OR3, OR7 en OT5). Het is niet eenvoudig hier een verklaring voor te kunnen geven.

Het is aannemelijk dat het laagst gevonden viruspercentage binnen een partij, het minimaal aanwezige percentage PIAMV is dat in de gerooide bollen aanwezig was. Dit percentage (groene stippellijn in Figuur 5) kwam bij OR7 en OT5 ook overeen met het PIAMV-percentage dat tijdens de teelt in 2011 met de ELISA-bladtoets is waargenomen. Dat de controlebehandeling, de niet ontsmette bollen, een hoger PIAMV-percentage hadden dan de ontsmette bollen, kan mogelijk verklaard worden door de aanname dat er tijdens de nateelt nog aanvullende bodemgebonden verspreiding heeft plaatsgevonden die (deels) met ELISA aan het blad tijdens de nateelt al te detecteren was. In Figuur 5 is deze (aangenomen) bodemgebonden virusverspreiding met groene balkjes aan gegeven. Bij bollen die 1 dag na het spoelen ontsmet zijn in een dompelbad, had deze (aangenomen) bodemgebonden virusverspreiding vaak minder frequent plaats gevonden. Het is onduidelijk waarom dit niet of minder gebeurde bij de bollen die 1 dag na rooien zijn gedompeld in een ontsmettingsbad ten opzichte van bollen die 7 dagen na spoelen zijn ontsmet, of überhaupt niet zijn ontsmet. Een andere verklaring zou kunnen zijn dat de mate van bodemgebonden verspreiding bij de verschillende behandelingen vergelijkbaar was, maar dat bij specifieke behandelingen het virus eenvoudiger systemisch door de plant verspreidde dan bij andere behandelingen waar het virus niet systemisch door de plant verspreidde.

In Hoofdstuk 4 zijn resultaten beschreven die bewijzen dat er bodemgebonden verspreiding van PIAMV kan optreden. De verkregen resultaten doen sterk vermoeden dat er *geen* biologische vector bij betrokken is. In dit deel van het onderzoek lijkt er echter een invloed te zijn van bolontsmetting met fungiciden (mits 1 dag na spoelen uitgevoerd) waardoor er minder virusverspreiding lijkt op te treden dan bij de niet ontsmette bollen of bollen die 7 dagen na spoelen zijn ontsmet. Het lijkt niet mogelijk te zijn deze resultaten te rijmen met hetgeen in Hoofdstuk 4 beschreven is. Voor de volledigheid is de aanwezigheid van *Olpidium* en *Polymyxa* op wortels van OR7 (niet gespoeld, gespoeld 1 dag na rooien, gespoeld 7 dagen na rooien) onderzocht. *Olpidium* kon in geen van de monsters worden aangetoond. *Polymyxa* kon in lage concentraties worden aangetoond op wortels van bollen van alle drie de behandelingen. Er lijkt dus geen relatie te zijn tussen wel of geen extra PIAMV-toename en de aanwezigheid van lage concentraties *Polymyxa*.



Figuur 4. Onderzoek naar risico's van dompelen in een ontsmettingsbad met PIAMV bij vier partijen lelie (PIAMV percentage op basis van bladtoets 2011) die vroeg (17 nov) of rijp (7 dec) geroid zijn. Besmettingspercentage PIAMV tijdens de nateelt is per cultivar voor beide rooimomenten met elkaar vergeleken (χ^2 , $p=0.05$); blauw=significant gelijk, rood=significant verschillend.



Figuur 5. Onderzoek naar risico's van dompelen in een ontsmettingsbad met PIAMV bij vier partijen lelie (PIAMV percentage op basis van bladtoets 2011) die vroeg (17 nov) of rijp (7 dec) geroid zijn. Grafiek bevat dezelfde resultaten als Figuur 4; met groene balkjes wordt verschil tussen laagste PIAMV-percentage per rooimoment en waargenomen PIAMV-besmettingen in andere behandelingen van dit cultivar en rooimoment aangegeven. Besmettingspercentage PIAMV tijdens de nateelt is per cultivar voor beide rooimomenten met elkaar vergeleken (χ^2 , $p=0.05$); blauw=significant gelijk, rood=significant verschillend.

Omdat het onderzoek aan bodemgebonden verspreiding van PIAMV in Hoofdstuk 4 veel analytischer is uitgevoerd dan het onderzoek beschreven in dit hoofdstuk, blijven de conclusies uit Hoofdstuk 4 leidend. Het is daardoor niet mogelijk een verklaring te geven voor de verrassende resultaten die in Tabel 11 en Figuur 5 beschreven staan.

Een conclusie die wel getrokken kan worden, is dat (in dit onderzoek) dompeling van bollen met fungiciden in een ontsmettingsbad met PIAMV geen aanvullend risico op PIAMV-infectie geeft ten opzichte van niet ontsmette bollen. Bolontsmetting 1 dag na spoelen geeft geen hoger risico dan bolontsmetting 7 dagen na spoelen.

6.4 Conclusies

- Er zijn aanwijzingen voor aanvullende (bodembonden) virusverspreiding tijdens de nateelt die niet bij alle behandelingen even sterk heeft plaatsgevonden. Hierdoor is het niet mogelijk concrete conclusies te formuleren over invloed van rootijdstip en rusttijd tussen spoelen en ontsmetten op risico's op PIAMV-infectie. Toch zijn er informatieve resultaten verkregen.
- Bij één van de vier partijen lelie werd minder PIAMV toename waargenomen wanneer rijpe bollen zijn gerooid ten opzichte van vroeg gerooide bollen.
- Dompeling van bollen in een ontsmettingsbad met fungiciden en PIAMV gaf in dit onderzoek geen aanvullend risico op PIAMV-infectie geeft ten opzichte van niet ontsmette bollen. Bolontsmetting 1 dag na spoelen geeft geen hoger risico dan bolontsmetting 7 dagen na spoelen.
- Voor verwerking van virusvrije partijen zou het juist aan te bevelen zijn om deze vroeg te rooien en te verwerken op een moment dat er nog geen PIAMV-besmette partijen verwerkt zijn. Er moet gerealiseerd worden dat in een virusvrije werkomgeving geen virusverspreiding of infectie kan plaatsvinden, ongeacht de hoeveelheid verwonding van een gewas.

7 Afdoding recente PIAMV-infectie met warmwaterbehandeling

7.1 Introductie

PIAMV in spoelwater, grond en/of dompelbad levert risico's op virusverspreiding binnen en tussen partijen. Er zijn geen middelen geregistreerd die ingezet kunnen worden om virussen in het algemeen, of PIAMV specifiek af te doden of niet-besmettelijk te maken. Daarentegen is bekend dat virussen geïnactiveerd kunnen worden door middel van hitte. Voor de meeste potexvirussen waarvoor deze hitte-inactivatie is onderzocht, ligt deze inactiveringstemperatuur rond de 65°C. In dit onderzoek wordt bepaald bij welke temperatuur PIAMV onschadelijk gemaakt kan worden. Vervolgens wordt onderzocht of PIAMV-infecties die recent tijdens spoelen of dompelen zijn ontstaan met een korte warmwaterbehandeling afgedood kunnen worden.

7.2 Inactivatie van PIAMV door d.m.v. hitte

Als eerste is met een lab-experiment onderzocht bij welke temperatuur PIAMV geïnactiveerd kan worden. PIAMV-besmet plantensap in ELISA-extractiebuffer is gebruikt voor een matrix-analyse met verschillende temperatuur- en tijdcombinaties (Tabel 12). Hiervoor zijn 6x5=30 porties van 1 ml plantensap gebruikt. Voorafgaand en aansluitend op de temperatuurbehandeling werd het plantensap op ijs bewaard. Na de hittebehandeling is met een PIAMV-ELISA de aanwezigheid van PIAMV bepaald. Wanneer PIAMV niet door hitte is geïnactiveerd, wordt PIAMV goed door het antiserum gedetecteerd. Er wordt dan een hoge ELISA-waarde verkregen. Bij hitte-inactivatie van een virus raakt het manteleiwit van het virus beschadigd. Het is de hypothese dat beschadigd manteleiwit niet meer efficiënt door het antiserum van de PIAMV-ELISA wordt herkend waardoor de ELISA-waarden lager worden. Hoe lager de ELISA-waarde, hoe meer het PIAMV virus door hitte is beschadigd.

PIAMV-besmet plantensap dat geen hitte-behandeling heeft ondergaan, had een ELISA-waarde van 0.47 (gemiddelde van 3 herhalingen). Het is opvallend dat bij een kortstondige temperatuurbehandeling de ELISA-waarde (veel) hoger is dan wanneer het plantensap deze temperatuurbehandeling niet heeft gehad. Dertig seconden verwarmen resulteerde bijvoorbeeld in een ELISA-waarde van 1.20, een toename van bijna een factor 2,5 (Tabel 12). Mogelijk dat een korte verwarming van een monster de samengeklonterde virusdeeltjes van elkaar los maakt waardoor de gevoeligheid van een ELISA verhoogd kan worden.

Bij een hittebehandeling voor een langere tijd neemt de ELISA-waarde snel af. Bij 60°C duurt dit meer dan 5 minuten, bij de hoogste temperatuur (80°C) is PIAMV al na 1 minuut niet meer detecteerbaar. Hitte-inactivatie van PIAMV bij 65°C is na 2 minuten volledig, mits de ELISA-waarde een goed voorspellende informatie geeft.

De besmettelijkheid van PIAMV is tevens met toetsplanten onderzocht. Hiertoe is *Nicotiana benthamiana* geïnoculeerd met plantensap dat gedurende 2, 5, 10 of 30 minuten bij 60°C is verwarmd (drie herhalingen met temperatuur/tijd combinatie). De aanwezigheid van besmettelijk virus werd binnen drie weken door middel van mozaïeksymptomen zichtbaar als gevolg van systemische aanwezigheid van PIAMV (Tabel 13). Het gebruik van toetsplanten heeft aangetoond dat bij afname van de ELISA-waarde de besmettelijkheid van PIAMV ook afneemt. Bij een ELISA-waarde die de nul benadert, is er geen besmettelijk PIAMV meer aanwezig.

Bij hitte-inactivatie raakt het manteleiwit van het virus beschadigd waardoor detectie met ELISA niet meer mogelijk is. Theoretisch raakt het erfelijk materiaal van PIAMV, het RNA molecuul, niet beschadigd bij deze temperatuurbehandeling. Aanwezigheid van virus-RNA wordt met een PCR-toets gedetecteerd. Met PCR-diagnostiek zou hitte-geïnactiveerd PIAMV daarom nog steeds goed detecteerbaar moeten zijn. Resultaten uit Tabel 14 bevestigen dit. Ondanks dat ELISA hitte-behandeld en niet besmettelijk PIAMV niet

meer detecteert, worden bij analyse met TaqMan PCR voor PIAMV onafhankelijk van de temperatuur- en tijdbehandeling vergelijkbare PCR-resultaten verkregen (Cq-waardes).

Algemeen kan gesteld worden dat efficiënte hitte-inactivatie van PIAMV optreedt bij 65°C. Hoe hoger de temperatuur, hoe sneller deze hitte-inactivatie plaatsvindt.

Tabel 12. Effect van hitte-behandeling op de detecteerbaarheid van PIAMV met ELISA. Per behandeling is de gemiddelde ELISA-waarde van drie herhalingen weergegeven. Rood = goed detecteerbaar, minimaal even hoog als de controle ELISA op onbehandeld plantensap (ELISA-waarde 0.47); Oranje = detecteerbaar, maar een ELISA-waarde lager dan de controle ELISA op onbehandeld plantensap; Groen = PIAMV is niet meer detecteerbaar, ELISA-waarde is lager dan de drempelwaarde van 0.15.

Tijd	Temperatuur				
	60°C	65°C	68°C	70°C	80°C
30 sec	1.20	0.86	0.92	0.71	0.56
1 min	1.36	0.66	0.52	0.18	0.01
2 min	0.72	0.08	0.02	0.01	0.02
5 min	0.16	0.01	0.02	0.01	0.01
10 min	0.07	0.01	0.02	0.00	0.00
30 min	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00

Tabel 13. Aanwezigheid van besmettelijk PIAMV in hitte-behandeld plantensap aangetoond met inoculatie op toetsplanten (*N. benthamiana*, n=3). Aanwezigheid van besmettelijk virus werd binnen drie weken na inoculatie zichtbaar in de vorm van systemische mozaïeksymptomen.

Temperatuur	Tijd	ELISA waarde (Tabel 12)	Symptomen
60°C	2 minuten	0.72	Bij 3 toetsplanten mozaïeksymptomen
60°C	5 minuten	0.16	Bij 1 van de 3 toetsplanten mozaïeksymptomen
60°C	10 minuten	0.07	Bij 1 van de 3 toetsplanten mozaïeksymptomen
60°C	30 minuten	0.02	Bij geen van de drie toetsplanten mozaïeksymptomen zichtbaar

Tabel 14. Analyse van hitte-behandeld PIAMV-besmet plantensap met een TaqMan PCR voor PIAMV.

Temperatuur	Tijd	ELISA waarde (Tabel 12)	PIAMV TaqMan PCR resultaat (Cq-waarde)
Negatieve controle (water)		0.00	No Cq
Positieve controle (PIAMV besmette plant)		0.47	13.10
60°C	30 seconden	1.20	12.76
	1 minuut	1.36	13.30
	2 minuten	0.72	14.38
	5 minuten	0.16	14.08
	10 minuten	0.07	13.86
	30 minuten	0.02	15.11
65°C	30 seconden	0.86	13.33
	1 minuut	0.66	16.55
	2 minuten	0.08	17.72
	5 minuten	0.01	16.75
	10 minuten	0.01	14.04
	30 minuten	0.01	13.99

7.3 Effect kortstondige warmwaterbehandeling op recente PIAMV-infectie

7.3.1 Werkwijze

Voor dit onderdeel zijn virusvrij getoetste bollen van partij LA4 en OR5 gebruikt. Om het optreden van infectie vanuit een dompelbad te stimuleren, is 20 minuten voor het dompelen bij de bollen van deze cultivars een mechanische beschadiging aangebracht door de bollen een aantal keer over de bodem van een gaasbak te rollen/wrijven.

Een dompelbad met PIAMV-virus is gemaakt door 10 bollen van OR2 en 10 bollen van LA2 (beide partijen nagenoeg 100% besmet met PIAMV) in een gaasnet fijn te stampen. De fijngestampde lelies zijn aansluitend in een dompelbad met 10 liter water gedaan.

Infectie van de bollen van partij LA4 en OR5 vond plaats door netten met elk 100 bollen gedurende 3 minuten in het dompelbad met virus-verrijkt water te dompelen. Na het dompelen werden de netten met bollen 20-30 minuten weggelegd zodat deze konden uitlekken. Per behandeling werd een nieuw gemaakt dompelbad gebruikt, dompelbaden werden dus niet hergebruikt.

Aansluitend aan het dompelen in een bad met PIAMV-verrijkt water werden de bollen gedurende een korte periode gedompeld in water met hoge temperatuur (Tabel 15). Na de warmwaterbehandeling konden de bollen 30 minuten uitdruipen waarna de bollen bij 0.5° werden bewaard. Een week na uitvoering van de dompelproeven, werden de bollen in kisten geteeld. Per behandeling zijn 120 bollen in 12 kratten geteeld (plantdatum 22 februari 2012). Kratten stonden los van de ondergrond. Voor de teelt is potgrond gebruikt (Substraat Bollengrond A, pH 6.0, EC 0,40, Slingeland-Horticoop). De bloementeelt heeft plaatsgevonden onder standaard bloementeelt omstandigheden (dag- en nachttemperatuur 15°C, temperatuur tijdens luchten 16°C, 4 mm watergifte per 2-3 dagen, geen extra bijbelichting). Drie weken na de bloei is met behulp van een bladmonster en ELISA het percentage PIAMV-besmetting per behandeling bepaald. Tevens zijn kwaliteitseigenschappen van de lelies beoordeeld.

Tabel 15. Combinaties van temperatuur en dompeltijd voor onderzoek naar effect van kortstondige warmwaterbehandeling op recent PIAMV-infectie. Dit onderzoek is uitgevoerd voor twee partijen lelie (LA3 en OR5). Temperatuur in dompelbad is bij aanvang van het dompelen en aan het einde van de dompelperiode gemeten.

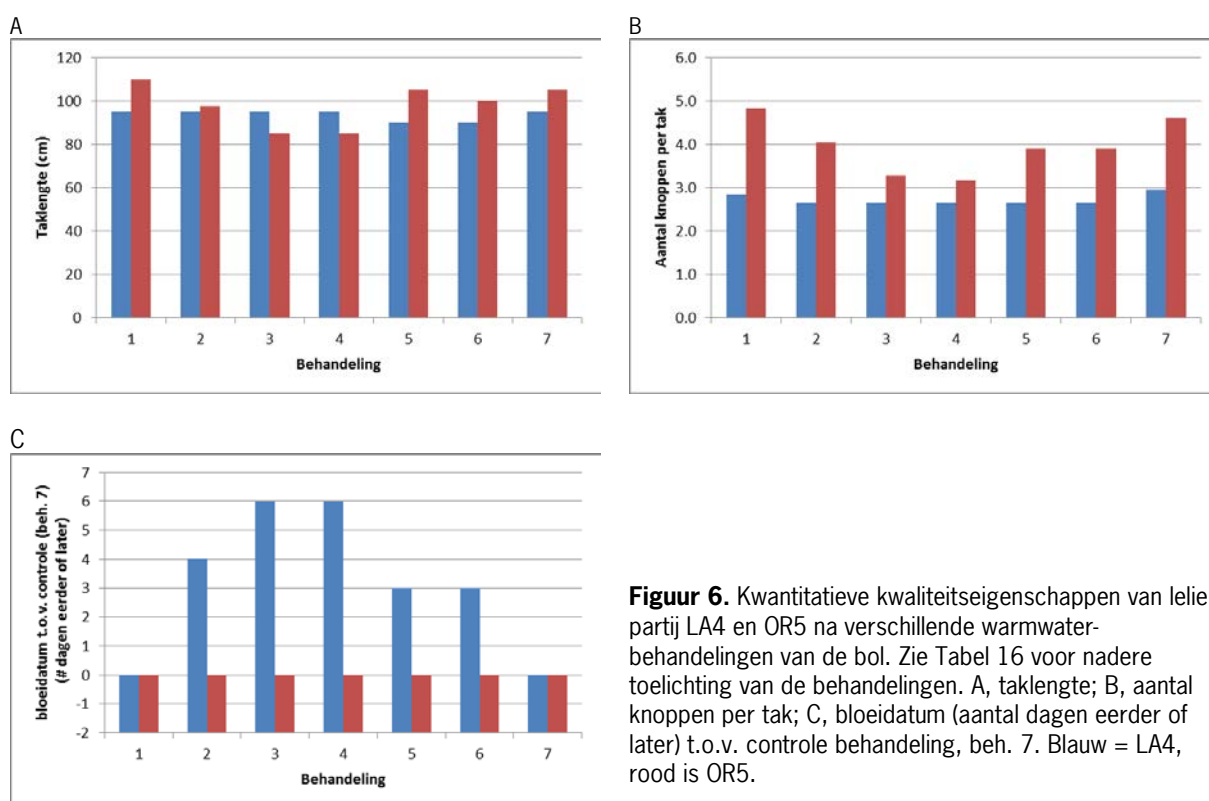
Behandeling	Temperatuur dompelbad	Dompeltijd	Temperatuur bij aanvang dompelen	Temperatuur bij einde dompelen
LA4 – 1	Koud water	1 minuut	15.4°C	15.1°C
LA4 – 2	65°C	2 minuten	65.2°C	60.9°C
LA4 – 3	65°C	3 minuten	65.2°C	61.1°C
LA4 – 4	68°C	1 minuut	67.8°C	63.0°C
LA4 – 5	68°C	2 minuten	65.3°C	64.2°C
LA4 – 6	70°C	1 minuut	69.7°C	65.2°C
LA4 – 7	Niet dompelen	-	-	-
OR5 – 1	Koud water	1 minuut	15.0°C	14.6°C
OR5 – 2	65°C	2 minuten	65.0°C	61.7°C
OR5 – 3	65°C	3 minuten	64.9°C	61.3°C
OR5 – 4	68°C	1 minuut	68.1°C	64.4°C
OR5 – 5	68°C	2 minuten	68.3°C	64.3°C
OR5 – 6	70°C	1 minuut	69.9°C	66.8°C
OR5 – 7	Niet dompelen	-	-	-

7.3.2 Resultaten en discussie

Ondanks dat de bollen zijn blootgesteld aan relatief hoge temperaturen, werd er bij geen van de behandelingen uitval waargenomen. Welk waren er verschillen in taklengte, aantal knoppen, standcijfer en, bij LA4) verschillen in bloeidatum waargenomen (Tabel 16 en Figuur 6).

Tabel 16. Kwantitatieve kwaliteitseigenschappen van lelie partij LA4 en OR5 na verschillende warmwaterbehandelingen van de bol (N=120 per behandeling).

Beh.	Temperatuur dompelbad	Dompeltijd	LA4				OR5			
			lengte tak (cm)	aantal knoppen per tak	bloei datum	Stand cijfer	lengte tak (cm)	aantal knoppen per tak	bloei datum	stand cijfer
1	Koud	1 min	95	2.9	14 mei	9	110	4.8	13 juni	9
2	65°C	2 min	95	2.6	18 mei	7	98	4.1	13 juni	7
3	65°C	3 min	95	2.6	20 mei	7	85	3.3	13 juni	4
4	68°C	1 min	95	2.6	20 mei	7	85	3.2	13 juni	4
5	68°C	2 min	90	2.6	17 mei	8	105	3.9	13 juni	9
6	70°C	1 min	90	2.6	17 mei	7	100	3.9	13 juni	8
7	Niet	-	95	2.9	14 mei	9	105	4.6	13 juni	8



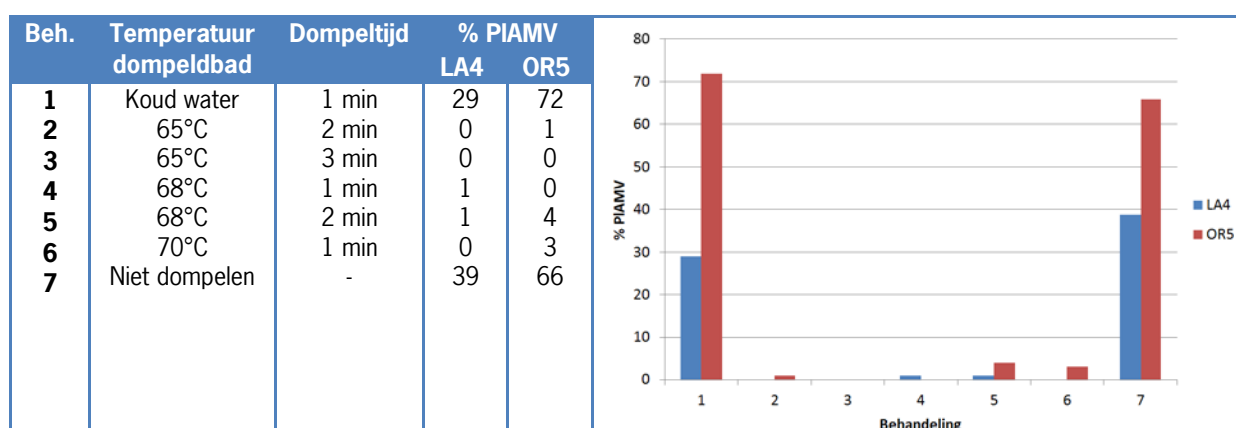
Figuur 6. Kwantitatieve kwaliteitseigenschappen van lelie partij LA4 en OR5 na verschillende warmwaterbehandelingen van de bol. Zie Tabel 16 voor nadere toelichting van de behandelingen. A, taklengte; B, aantal knoppen per tak; C, bloeidatum (aantal dagen eerder of later) t.o.v. controle behandeling, beh. 7. Blauw = LA4, rood is OR5.

In dit onderzoek werden de mogelijkheden voor een kortstondige warmwaterbehandeling ter voorkoming van een recente PIAMV-infectie onderzocht. Wanneer de bollen na het dompelen niet opnieuw werden gedompeld in een schoon, virusvrij bad met water (behandeling 7, controle), dan ontstond op basis van de bladtoets een forse PIAMV-besmetting van 39% resp. 66% bij LA4 en OR5 (Tabel 17). Dit zijn aanzienlijk hoge infectiepercentages voor beschadigde bollen die slechts drie minuten aan PIAMV in een dompelbad zijn blootgesteld. Een extra dompeling in een virusvrij bad (1 minuut, normale schuurtemperatuur, behandeling 1), had geen significante effect op de PIAMV-besmetting (29%, resp 72%). Blijkbaar heeft de infectie tijdens het dompelen in het eerste bad, en/of tijdens de 20-30 minuten rusttijd aansluitend reeds plaats gevonden en heeft verdunnen van virus in het tweede, virusvrije dompelbad geen effect meer op de het al dan niet optreden van virusinfectie.

Dompelen van de recent met PIAMV-besmette bollen in een warmwaterbad had bij beide cultivars en bij alle combinaties van temperatuur en dompeltijd een groot reducerend effect op de besmetting met PIAMV. Bij LA4 werd bij alle warmwaterbehandelingen (nagenoeg) geen PIAMV-infectie waargenomen (0-1% PIAMV), bij OR5 werd alleen bij de behandelingen 5 en 6 nog een lage besmetting (3-4% PIAMV) waargenomen, de overige warmwaterbehandelingen waren (nagenoeg) virusvrij (0-1% PIAMV).

Vanwege de biomassa van de leliebollen die gedompeld werden, daalde de temperatuur enkele graden tijdens de 1-3 minuten dompelen van de bollen (Tabel 15). Ondanks dat gedurende de warmwaterbehandeling de temperatuur onder de 65°C daalde, werd de recente infectie met PIAMV voldoende goed afgedood zodat nagenoeg gezonde partijen werden verkregen.

Tabel 17. Effect van warmwaterbehandeling op recente PIAMV-infectie in de bol. Percentage PIAMV is met ELISA-bladtoets bepaald aansluitend op de bloei. N=100 per behandeling.



7.3.3 Conclusies

PIAMV-virusdeeltjes raken bij een temperatuur boven 65°C dermate beschadigd dat PIAMV niet meer besmettelijk is. Dit hittebeschadigd virus is niet met met ELISA aan te tonen; een PCR-toets detecteert dit hittebeschadigde virus nog wel.

Wanneer men bij verwerking van plantgoed een risico op infectie met PIAMV vanuit hergebruikt spoelwater of dompelbaden verwacht, dan is een kortstondige warmwaterbehandeling (1-2 minuten, 65-68°) van de recent verwerkte bollen zeker het overwegen waard. Dit resulteert in een (bijna) volledige reductie van de recent opgetreden virusinfecties. Er wordt geadviseerd de details van de warmwaterbehandeling voor kleine bolmaten nog verder te optimaliseren. De warmwaterbehandeling heeft echter wel een effect op taklengte, aantal knoppen per takken en de bloeidatum. Daarom wordt toepassing van warmwaterbehandeling met 65°C of hoger afgeraden voor leverbare bollen.

8 Algemene discussie en conclusies

Het onderzoek dat in dit rapport is beschreven, is gebaseerd op vijf onderzoeksvragen die medio 2011 actueel waren. Onderzoeksresultaten zijn in de periode najaar 2011 – zomer 2012 verkregen. Vaak werd tijdens het bestuderen van deze onderzoeksvragen aanvullende kennis en ervaring over PIAMV en lelie verkregen. Een samenvatting van de conclusies is in Tabel 18 weergegeven.

Tabel 18. Samenvatting van belangrijkste onderzoeksvragen en conclusies die in dit rapport beschreven zijn.

Vraagstellingen	Conclusies
A. Symptoomontwikkeling van 1^{ste} en 2^{de} jaars infectie	<ul style="list-style-type: none"> • Het percentage PIAMV in een geïnfecteerde partij is vaak hoger dan op basis van de bladtoets uit het voorgaande teeltseizoen bekend was. • De ELISA-boltoets geeft (in dit onderzoek) bij een PIAMV-besmette partij een onderwaardering van het werkelijke percentage PIAMV. • Selectie van virusvrije bollen in een virusbesmette partij op basis van een ELISA boltoets is niet betrouwbaar. De meeste virusvrij getoetste bollen blijken tijdens de nateelt alsnog virusbesmet te zijn. • Handmatige infectie heeft een wisselende efficiëntie (20-88%, afhankelijk van de partij) • De visuele schade in een partij wordt voornamelijk door cultivar, teeltlocatie en teeltmoment bepaald. Een 1^{ste}-jaars of primaire infectie lijkt vergelijkbare visuele schade te geven als een 2^{de}-jaars of secundaire PIAMV-besmetting.
B. Verspreiding van PIAMV tijdens de teelt via grond, onderzoek naar een eventueel betrokken grondgebonden virusvector	<ul style="list-style-type: none"> • Naast mechanische verspreiding van PIAMV tijdens de verwerking van gerooide bollen is er zeker ook een risico op verspreiding van PIAMV via de bodem • Het is zeer waarschijnlijk dat bij deze vorm van virusverspreiding geen biologische vector betrokken is. Het is echter onbekend of deze vorm van virusverspreiding het gevolg is van wortel-wortel-contact tussen een zieke en een gezonde lelie, of dat er ook vrije virusdeeltjes in de bodem aanwezig zijn die via de wortels een plant besmetten. • Bij het optreden van een bodemgebonden verspreiding van PIAMV is dit (bij deze partij lelie) niet of nauwelijks met een ELISA-toets op het blad aan te tonen. • Bij het optreden van een bodemgebonden verspreiding van PIAMV laten recent besmette lelies (bij deze partij lelie) nauwelijks tot geen symptomen zien. Dit is voor de leliesector risicovol omdat een eventueel toegenomen viruspercentage (en daarmee de kwaliteit van een partij) volgens het standaard kwaliteitskeuringssysteem (visueel en ELISA bladtoets) niet goed wordt beoordeeld. • Bodemgebonden verspreiding van PIAMV kan in de praktijk in ieder geval tijdens de bloemproductie optreden. Virusvrije lelies kunnen met PIAMV besmet raken na teelt op grond waar voorafgaand een PIAMV-teelt op heeft plaatsgevonden. Het virus blijft vanuit de eerste teelt in de bodem achter (in gewasresten of als vrije virusdeeltjes) en kan in de volgende teelt voor infectie zorgen. • Bodemgebonden infectie met PIAMV in een cultivar die al (symptoomloos) besmet is met LSV kan tot zeer heftige symptomen leiden. • Er zijn nieuwe waardplanten voor PIAMV aangetoond. Bekende waardplanten voor PIAMV zijn nu: weegbree (<i>Plantago</i> spp.), lelie <i>Nandina domestica</i>, primrose (<i>Primula vulgaris</i>), <i>Chenopodium quinoa</i>, <i>C. amaranticolor</i>, <i>Nicotiana benthamiana</i>, vogelmuur (<i>Stellaria media</i>), kleine brandnetel (<i>Urtica urens</i>).
C. Mate van verspreiding tussen	<ul style="list-style-type: none"> • Virusverspreiding tussen partijen tijdens spoelen is een feit. Wanneer

<i>partijen tijdens spoelen/shaven/verwerken</i>	virusvrije lelies worden verwerkt over een spoellijn/aquagrader die gebruik maakt van gerecirculeerd PIAMV-besmet spoelwater bestaat er een reëel risico op besmetting van een partij lelies.
<i>D. Invloed van rootijdstip op risico's van PIAMV verspreiding tijdens spoelen/shaven/verwerken</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Er zijn aanwijzingen voor aanvullende (bodemgebonden) virusverspreiding tijdens de nateelt die niet bij alle behandelingen even sterk heeft plaatsgevonden. Hierdoor is het niet mogelijk concrete conclusies te formuleren over invloed van rootijdstip en rusttijd tussen spoelen en ontsmetten op risico's op PIAMV-infectie. Toch zijn er informatieve resultaten verkregen. • Bij één van de vier partijen lelie werd minder PIAMV toename waargenomen wanneer rijpe bollen zijn gerooid ten opzichte van vroeg gerooide bollen. • Dompeling van bollen in een ontsmettingsbad met fungiciden en PIAMV gaf in dit onderzoek geen aanvullend risico op PIAMV-infectie geeft ten opzichte van niet ontsmette bollen. Bolontsmetting 1 dag na spoelen gaf geen hoger risico dan bolontsmetting 7 dagen na spoelen. • Voor verwerking van virusvrije partijen zou het juist aan te bevelen zijn om deze vroeg te rooien en te verwerken op een moment dat er nog geen PIAMV-besmette partijen verwerkt zijn. Er moet gerealiseerd worden dat in een virusvrije werkomgeving geen virusverspreiding of infectie kan plaatsvinden, ongeacht van de hoeveelheid verwonding van een gewas.
<i>E. Effect van hittebehandeling van spoelwater op verspreiding van PIAMV tijdens spoelen</i>	<ul style="list-style-type: none"> • PIAMV-virusdeeltjes raken bij een temperatuur boven 65°C dermate beschadigd dat PIAMV niet meer besmettelijk is. • Dit hittebeschadigd virus is niet met ELISA aan te tonen; een PCR-toets detecteert dit hittebeschadigde virus nog wel. • Wanneer men bij verwerking van plantgoed een risico op infectie met PIAMV vanuit hergebruikt spoelwater of dompelbaden verwacht, dan is een kortstondige warmwaterbehandeling (1-2 minuten, 65-68°) van de recent verwerkte bollen zeker het overwegen waard. Dit resulteert in een (bijna) volledige reductie van de recent opgetreden virusinfecties. • Er wordt geadviseerd de details van de warmwaterbehandeling voor kleine bolmaten nog verder te optimaliseren. • De warmwaterbehandeling heeft een effect op taklengte, aantal knoppen per takken en de bloeidatum. Daarom wordt toepassing van warmwaterbehandeling met 65°C of hoger afgeraden voor leverbare bollen.

De verspreiding van PIAMV is complex, de beheersing van dit virus nog complexer. Het onderzoek heeft in ieder geval een beter inzicht gegeven in gewashandelingen die beperkte, matige of grote risico's hebben op PIAMV verspreiding binnen en tussen partijen (Figuur 7).

Om de sector te ondersteunen bij het beheersen van PIAMV, is op basis van de inzichten in juli 2012 een overzicht met maatregelen geschreven waarmee infectie en verspreiding van PIAMV te voorkomen of te beperken zou moeten zijn (Bijlage 1). Het inzichtelijk maken van de aanwezige besmettingen in partijen door middel van toetsen is van groot belang om de risico's op infectie en verspreiding in te schatten. Immers, bij afwezigheid van virus, is er ook geen risico dat virusinfectie kan optreden. Omdat hiervoor verschillende toetsen beschikbaar zijn, is een factsheet opgesteld waarin de details van de verschillende toetsmethoden toegelicht is (Bijlage 2). Naast deze geschreven informatie, zijn er ook drie informatiebijeenkomst georganiseerd om met aanwezigen de details en resultaten van dit onderzoek te bespreken.

3 juli 2012 – Lisse: met name voor broeierij

5 juli 2012 – Emmeloord: met name voor teelt

16 juli 2012 – Lisse: met name voor export

Bepaalde risico's	Matige risico's	Grote risico's
<ul style="list-style-type: none"> • Koppen • Afmaaien • Bollenmijt • Ontsmetten/koken van <u>on</u>beschadigde bollen • Sorteren <u>on</u>beschadigd 	<ul style="list-style-type: none"> • Spoelen/shaven • Sorteren beschadigd 	<ul style="list-style-type: none"> • Uitschudden/ontsmetten schubbenteelt
<ul style="list-style-type: none"> • Ontsmetten/koken van <u>beschadigde</u> bollen 		
Hergebruik PIAMV-grond Bodemgebonden virusverspreiding		

Figuur 7. Overzicht van gewashandelingen of teeltomstandigheden met het bijbehorende globale risico op infectie en/of verspreiding van PIAMV. Groen - beperkte risico's: maximaal enkele procenten virustoename; Oranje – matige risico's: enkele tot ca. 10% virustoename; rood – grote risico's: tientallen procenten toename. Het feitelijke risico op infectie en/of verspreiding van PIAMV is van vele factoren afhankelijk, waaronder ook fysiologische status van het gewas, de virusdruk in de partij en/of concentratie in het dompel/spoelwater. Dit overzicht is gebaseerd op basis van kennis aanwezig in het najaar van 2012.

Met de aanvullende kennis over PIAMV bij lelie beschreven in dit rapport zijn nog niet alle vragen opgelost om de virusproblematiek met grote stappen te laten verminderen. Daarom is in overleg met de brancheorganisaties en het Productschap Tuinbouw in de zomer van 2012 een derde project van start gegaan (PT project 14774). In de project wordt de volgende onderwerpen bestudeerd:

- Bepalen van wijze van bodemgebonden verspreiding van PIAMV.
- Risico's van virusopname door wortels bij afwezigheid van verwonding.
- Ontwikkelen van effectieve ontsmettingsmethoden voor grond uit kistenteelt, vollegronds kasteelt en vollegronds buitenteelt. De focus ligt met name bij stomen en afhankelijk van de geïdentificeerde vector mogelijk ook bij toepassing van fungiciden of nematiciden.
- Bepalen van de stabiliteit/overlevingsmogelijkheden van PIAMV in de bodem.
- Bepalen of symptoomloze infecties met PIAMV veroorzaakt worden door een specifiek virusisolaat dat anders is dan symptomatisch PIAMV (genetische analyse symptoomloze PIAMV isolaten).
- Kennisverspreiding van onderzoeksresultaten en daaruit voortkomende adviezen naar alle schakels in de keten zodat de leliesector gezamenlijk de virusverspreiding een halt toe kan roepen.

Publicatie van de resultaten uit dit onderzoek wordt in het najaar van 2013 verwacht.

Bijlage 1 – Maatregelen om infectie en verspreiding van PIAMV te voorkomen of te beperken

v2.1, juli 2012 – dit is een momentopname op basis van de kennis die in juli 2012 beschikbaar was

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

Top 10 PIAMV-adviezen

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

10. Deel uw ervaring met uw collega's en onderzoekers; alleen door samenwerking en goede communicatie kunnen we als sector deze complexe puzzel oplossen.

Onderstaande adviezen zijn tot stand gekomen op basis van onderzoek en uitgebreide interactie met veredelaars, lelietelers, broeiers, handelaren, exporteurs, voorlichters, toetslaboratoria en keuringsdienst. Aanvullende informatie te vinden via www.tuinbouw.nl onder projectnummer 13732, 14483 en 14518.

Ervaringen m.b.t. virustoetsen en bemonstering

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

Adviezen m.b.t. zaadoverdracht PIAMV

- PIAMV is in pollen van virusgeïnfecteerde lelies aanwezig. De risico's op PIAMV-overdracht tijdens kruisingsactiviteiten en via zaad is onbekend. Er wordt geadviseerd om de veredelingspopulatie volledig vrij te houden van virus, inclusief PIAMV.

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

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

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

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

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

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

Adviezen m.b.t. aanwezigheid PIAMV op oppervlakten

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

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

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

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

Adviezen m.b.t. waardplantenreeks PIAMV

- In de literatuur worden gewassen als weegbree, lelie, *Nandina domestica* en Primrose (*Primula vulgaris*) als waardplant genoemd.
- Er zijn nog geen aanwijzingen dat PIAMV infecties kan veroorzaken bij tulp, *Zantedeschia*, *Agapanthus*, *Anemone*, *Aster*, *Astilbe*, *Convallaria*, *Dicentra*, *Echinacea*, *Geranium*, *Hosta*, *Hemerocallis* en *Iris*.
- Strikte onkruidbeheersing gericht op in ieder geval weegbree, melganzevoet, kleine brandnetel en (vogel)muur is belangrijk en moet eventuele virusreservoirs voor PIAMV in onkruid voorkomen.

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

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

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

Advies m.b.t koppen en afmaaien

- Kop en maai verdachte of PIAMV-besmette partijen wanneer het gewas droog is en indien mogelijk bij warm weer, blauwe hemel en enige wind. Onder deze omstandigheden is het risico op verspreiding het minst.

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

- Verwerk eerst virusvrije partijen, daarna verdachte partijen en als laatste virusgeïnfecteerde partijen. Realiseer de omvang van de kapitaalvernietiging wanneer virusvrije partijen virusgeïnfecteerd raken wanneer deze na viruszieke partijen gespoeld worden. Vraag u echt af of u überhaupt nog met viruszieke partijen wilt blijven werken en virusrisico's op uw bedrijf wilt behouden.

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

Adviezen m.b.t. schubbenteelt bij lelies

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

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

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

- Zorg ervoor dat bollen voldoende zijn hersteld van recente verwondingen of beschadigingen voordat bollen gekookt of ontsmet worden. Alleen dan kan het risico op infectie met PIAMV worden beperkt.
- Het is onduidelijk of er tijdens het koken en ontsmetten van bollen virusopname door wortels plaats vindt. Houd daarom rekening met werkvolgorde: allereerst partijen vrij van virus koken en/of ontsmetten, aansluitend risicovolle partijen en als laatste virusgeïnfecteerde partijen.

Vraag u echter af of u überhaupt nog met viruszieke partijen wilt blijven werken en virusrisico's op uw bedrijf wilt behouden.

- Houd er rekening mee dat gedurende het koken en/of ontsmetten van geïnfecteerde bollen de virusconcentratie in het kook- en ontsmettingsbad toe zal nemen. Ververs daarom op tijd dit bad.
- PIAMV in water is af te doden bij verhitting tot 65°C gedurende 10 minuten of 60°C gedurende 30 minuten. Bij een 55°C wordt PIAMV bijna niet afgedood, ook al wordt het virus vele uren verhit. Raadpleeg de leverancier/fabrikant van de middelen in het kook- of dompelbad of de middelen bestand zijn tegen deze temperatuursverhoging. Controleer of bij verhitting of daadwerkelijk de 65°C wordt bereikt.

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

Er zijn omstandigheden waarbij verspreiding en infectie van PIAMV via de bodem optreedt. Deze bodemgebonden virusverspreiding kan tijdens de teelt en broei binnen een partij plaatsvinden, maar (in het geval van broei) ook tussen treks en dus tussen opeenvolgende partijen. Onderzoek richt zich nu op eventuele betrokkenheid van een biologische vector. Zolang de wijze van bodemgebonden verspreiding onbekend is, worden de volgende preventieve maatregelen voorgesteld om bodemgebonden virusverspreiding te beperken of te voorkomen:

- Werk zo veel als mogelijk met schone grond waarop niet eerder PIAMV-geïnfecteerde lelies hebben gegroeid.
- Vraag af of hergebruik van grond waarop PIAMV-geïnfecteerde partijen hebben gestaan vermeden kan worden. Registreer duidelijk de teelt- of broeilocatie van PIAMV-geïnfecteerde partijen.
- Houdt tijdens buitenteelt en broei rekening met goede afwatering en voorkom te vochtige grond.
- Zorg voor een goede onkruidbestrijding in verband met mogelijke alternatieve waardplanten voor PIAMV.
- Eventuele betrokkenheid van *Pratylenchus penetrans* is onduidelijk. Bestrijdt dit aaltje zorgvuldig bij teelt van PIAMV-geïnfecteerde partijen.
- Voorkom doorwortelen in de ondergrond van onderuit de kist. Plaats kistenteelt eventueel los van de ondergrond.
- De mogelijkheden om de infectieuze grond te ontsmetten zijn nog onduidelijk en heeft aandacht in onderzoek. Bij hergebruik van grond wordt voornamelijk geadviseerd om zowel de grond en de kisten zorgvuldig te stomen waarbij de temperatuur gedurende 10 minuten minimaal 70°C bereikt.
- Let op de virusstatus (LMoV en LSV) van de nieuwe partij lelies bij hergebruik van grond waarop eerder een PIAMV-geïnfecteerde partij is gebroeid. Wanneer grondgebonden infectie optreedt in een partij die reeds met LMoV en/of LSV is geïnfecteerd (maar desondanks weinig visuele schade geeft), ontstaat alsnog grote gewasschade als gevolg van dubbelinfecties met PIAMV.

Bovenstaande adviezen zijn bij gebrek aan voldoende inzicht over feitelijke risico's ook van toepassing ter voorkoming van infectie van lelies met TVX.

- Hergebruik tulpengrond waarin het verleden TVX-tulpen zijn geteeld nooit aansluitend voor lelieteelt
- Hergebruik kookbaden en ontsmettingsbaden die potentieel besmet kunnen zijn met TVX nooit voor de ontsmetting van leliemateriaal.

Adviezen voor broeierij

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

- Vraag naar toetsuitslagen, ook voor PIAMV (bladtoets, boltoets, worteltoets?) – koop virusvrij.
- Wees alert bij 'probleem' cultivars.

- Laat je informeren over de PIAMV-status op teelt- en verwerkingslocatie (zowel op productielocatie als op verwerkingslocatie).
 - Laat je informeren over het moment van rooien (rooidatum), laat gerooide partijen lijken in sommige gevallen minder gevoelig te zijn voor infectie.
 - Laat je informeren over de manier van verwerken – een rusttijd tussen verschillende stappen lijkt PIAMV-infectie te beperken.
-
- Het vroegtijdig opplanten van monsters uit partijen is zeer informatief om een indruk te krijgen over de kwaliteit van de partij. PIAMV is in deze opplantmonsters al na enkele weken met ELISA aan het blad betrouwbaar te detecteren.

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

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

Bijlage 2 – Factsheet ‘Gebruik PIAMV-toetsen’

Factsheet gebruik PIAMV-toetsen

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

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



PRAKTIJKONDERZOEK
PLANT & OMGEVING
WAGENINGEN UR



BKD
UN-SCHAPEL IN KWALITEIT



BQ Support



Productschap
Tuinbouw

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

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

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

