



NVWA-protocol: Uitvoeringsprotocol resistentieonderzoek aardappelmoeheid

Auteur: Loes den Nijs

Redactie: Evelyn van Heese, Mario van Sabben

Versie: **AM2024.01**

Dit protocol is een onderdeel van de overeenkomst tussen de NVWA – Divisie Regie en Expertise en de onderzoeksinstantie inzake het accepteren van gegevens van resistentie-onderzoek naar aardappelmoeheid voor officiële doeleinden.

Inhoud

Hoofdstuk 1: Algemeen	3
1.1. Doel	3
1.2. Verklarende begrippen	3
1.3. Quarantaine eisen.....	3
Hoofdstuk 2: Eisen aan onderzoeksinstanties die resistentieonderzoek uitvoeren.....	4
2.1. Algemeen	4
2.2. Organisatie	4
2.3. Kwaliteitsmanagement	4
2.4. Kwalificatie van personeel.....	4
2.5. Eisen aan monstercodering, registratie, administratie en archivering.....	5
Hoofdstuk 3: Technische eisen aan onderzoeksmethode en data-analyse	5
3.1. Algemeen	5
3.2. Zuiverheid en vitaliteit.....	5
3.3. Raschtheid	6
Hoofdstuk 4: Technische uitvoering resistentietoets	6
Hoofdstuk 5: Verwerking van gegevens en op lijst plaatsing	7
5.1. Verwerken van gegevens.....	7
5.2. Informeren van bedrijven	8
5.3. Verwerking door NVWA en opstellen rassenlijsten	8
5.4. Tijdsplanning	9
Hoofdstuk 6: Literatuur.....	9
Bijlage 1: De officiële EU eisen waaraan de resistentietoets moet voldoen zoals omschreven in ANNEX V van de Uitvoeringsverordening (EU) 2022/1192.....	9
Bijlage 2: Verwerking uitslagen	12

Hoofdstuk 1: Algemeen

1.1. Doel

Dit uitvoeringsprotocol omschrijft de eisen en kwalificaties waaraan het toetsen van aardappelcultivars op resistentie tegen de verschillende pathotypen van het aardappelpycysteaaltje, *Globodera rostochiensis* en *G. pallida*, en het verwerken van de uitslagen moeten voldoen. Het is onderdeel van de overeenkomst inzake de beoordeling van de kwaliteit van door de onderzoeksinstantie uitgevoerd resistentieonderzoek aardappelmoetheid en vormt de basis voor procedures en werkinstructies die bij de onderzoeksinstantie gebruikt worden voor het uitvoeren van het resistentieonderzoek en de analyse van de uitslagen. De naleving van dit protocol, zoals uitgewerkt in werkinstructies, wordt beoordeeld door de NVWA, middels audits.

Het uitvoeringsprotocol heeft als basis de ANNEX V van de Uitvoeringsverordening (EU) 2022/1192. De Uitvoeringsverordening vervangt per 2022 de bestrijdingsrichtlijn 2007/33/EG. Voor het resistentieonderzoek kent de verordening geen wijzigingen t.o.v. de richtlijn. In het uitvoeringsprotocol zijn extra eisen gesteld om de continuïteit en hoogwaardige toetsingswijze vanuit het verleden te kunnen garanderen. Nederland toetst op deze wijze vanaf 1998, altijd in nauw overleg met de sector.

1.2. Verklarende begrippen

- Audit: een audit is een systematisch, onafhankelijk en gedocumenteerd proces voor het verkrijgen van bewijsmateriaal en het objectief beoordelen daarvan om vast te stellen in welke mate aan de overeengekomen criteria is voldaan (NEN-EN-ISO 19011, 2018).
- DNA fingerprinting: een methode waarbij middels DNA-onderzoek aan unieke stukjes genetisch materiaal van een (aardappel)ras geïdentificeerd kan worden.
- Initiële audit: een audit uitgevoerd bij een nieuwe aanvraag van een onderzoeksinstantie om beoordeeld te worden.
- Jaarlijkse audit: een periodieke audit uitgevoerd bij de onderzoeksinstantie in het kader van de overeenkomst "resistentie-onderzoek aardappelmoetheid".
- Lichtkiemtoets: een toets aan een aardappelras waarbij, aan de hand van karakteristieken van de lichtkieming, een ras geïdentificeerd wordt.
- NVWA: Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit – Divisie Regie en Expertise.
- OL: Officieel lab zoals bedoeld in artikel 37 van Verordening (EU) 2017/625.
- Pathotype: een pathotype is een eenheid binnen de soorten *Globodera rostochiensis* en *G. pallida*, gekenmerkt door een bepaald vermeerderingspatroon ten aanzien van een reeks Solanum soorten of aardappelrassen (definitie volgens KNPV term). Inmiddels is duidelijk dat er geen strakke grenzen zijn aan te geven, en dat het pathotypeconcept niet sluitend is, wat vooral bij *G. pallida* te zien is. *G. pallida*-populaties komen voor in een glijdende schaal van minder tot meer virulent. Populaties moeten gekarakteriseerd worden op basis van virulentie. Op basis van de huidige EU regelgeving onderscheiden we in EU voorlopig nog de benaming van een populatie aardappelpycysteaaltjes, gebaseerd op toetsing op differentials. In Nederland onderscheiden we de volgende virulentiegroepen: Binnen *Globodera rostochiensis* Ro1, 2/3, 4 en 5, en binnen *G. pallida* Pa2 en 3.
- Q-afval: quarantaine-afval.

1.3. Quarantaine eisen

De in Nederland gevestigde onderzoeksinstantie dient te beschikken over een geldige ontheffing EU 2019/829 om te mogen werken met *Globodera rostochiensis* en *G. pallida*. Indien zich tijdens de uitvoering van werkzaamheden met de nematoden of daarmee besmette materialen situaties voordoen die afbreuk doen aan de beoogde inperking dienen direct afdoende maatregelen genomen te worden. Tevens dienen deze voorvallen in het desbetreffende logboek vermeld te worden (hoofdstuk 4).

Er dient onmiddellijk melding van deze voorvallen gedaan te worden aan de coördinator van het desbetreffende procesonderdeel, daartoe aangewezen door de onderzoeksinstantie. Hierna wordt er tevens melding gedaan aan de NVWA bij de contactpersoon voor de uitvoering van Verordening (EU) 2019/829.

Hoofdstuk 2: Eisen aan onderzoeksinstanties die resistentieonderzoek uitvoeren

2.1. Algemeen

- a) De onderzoeksinstantie dient te beschikken over een vastgelegd kwaliteitsmanagementsysteem en dit te onderhouden en na te leven.
- b) Het kwaliteitsmanagementsysteem van de organisatie dient geaccrediteerd te zijn volgens ISO 17025 (betreft organisatie in algemeen om aan te tonen dat het bedrijf beschikt over een hoogwaardig kwaliteitssysteem. Het resistentieonderzoek hoeft niet in de scope van de accreditatie opgenomen te zijn).
- c) De uitvoerende onderzoeksinstantie moet aangewezen zijn als Officieel Lab (OL) door de NVWA, volgens EU uitvoeringsverordening 2022/1192
- d) De uitvoerende onderzoeksinstantie noch haar bij het resistentieonderzoek betrokken medewerkers hebben een aardappelkweekprogramma of zijn houdster van enig kwekersrecht op aardappelrassen. De uitvoerende onderzoeksinstantie is ook geen onderdeel van een rechtspersoon die zelf of via een (andere) dochteronderneming een aardappelkweekprogramma uitvoert/does uitvoeren of houdster is van enig kwekersrecht op aardappelrassen.

2.2. Organisatie

De onderzoeksinstantie dient

- a) te beschikken over een organisatiestructuur en de middelen waardoor het in staat is de relevante werkzaamheden naar behoren uit te voeren.
- b) te beschikken over voldoende leidinggevend - en technisch personeel met de nodige opleiding en bevoegdheden om zijn taken naar behoren uit te voeren.
- c) de verantwoordelijkheden, taken, bevoegdheden, onderlinge verhoudingen en vervanging vast te stellen van alle personeelsleden die werkzaamheden beheren, uitvoeren of controleren m.b.t. relevante processen en er voor zorg te dragen dat alle personeelsleden hiernaar handelen.
- d) voor het resistentieonderzoek aardappelmoehheid een verantwoordelijke manager aan te wijzen.
- e) er voor zorg te dragen dat management en personeel wordt gevrijwaard van ongepaste druk die de kwaliteit van hun werk nadelig kan beïnvloeden.
- f) er voor zorg te dragen dat het resultaat en de uitvoering van het onderzoek niet negatief beïnvloed wordt door eventuele persoonlijke belangen die medewerkers hierbij kunnen hebben.
- g) te voorzien in doeltreffende supervisie van personeel.

2.3. Kwaliteitsmanagement

- a) De onderzoeksinstantie moet procedures en werkvoorschriften vastleggen, bijhouden en uitvoeren die er voor dienen dat de kwaliteit van alle relevante processen, ruimtes, uitrusting en materiaal voldoet en blijft voldoen aan het gestelde doel. De geautoriseerde procedures en werkvoorschriften dienen beschikbaar te zijn op alle relevante gebruikslocaties.
- b) Er dient een procedure te zijn voor het behandelen van klachten en intern en extern signaleerde tekortkomingen.
- c) Voor het op peil houden van het kwaliteitsmanagementsysteem moet een kwaliteitsmedewerker zijn aangewezen, die rechtstreeks toegang heeft tot de leiding van afdelingen die betrokken zijn bij relevante processen en tot de directie van de onderzoeksinstantie.
- d) De onderzoeksinstantie dient voor wat betreft het resistentieonderzoek aardappelmoehheid een register van wijzigingen in procedures en werkinstructies bij te houden.

2.4. Kwalificatie van personeel

- a) De voor uitvoering van het resistentieonderzoek benodigde kennis en vaardigheden dient aantoonbaar aanwezig te zijn en op peil gehouden te worden.
- b) De taken en bevoegdheden van het personeel t.a.v. de verschillende uitvoeringsaspecten van het resistentie-onderzoek aardappelmoehheid dienen te worden verleend op basis van relevante opleiding en vakbekwaamheid, training, vaardigheden en/of ervaring van de uitvoerende(n).
- c) Het kennisniveau dient gecontroleerd te worden, door jaarlijkse deelname aan een (ring)onderzoek AM.

2.5. Eisen aan monstercodering, registratie, administratie en archivering

- a) Monsters dienen anoniem te worden verwerkt door de uitvoerende onderzoekers. NVWA en sector hebben afgesproken om het anonimiseren uit te voeren via het Gebruikswaardenonderzoek, zie 3.1.e en 5.2.
- b) De voorschriften en alle relevante registraties dienen te worden gearchiveerd gedurende ten minste 10 jaar te rekenen vanaf ontvangst van het schriftelijke bericht van de coördinerende instantie dat het gehele AM-resistentieonderzoek is afgerond. Alle gegevens zijn beschikbaar voor de NVWA (auditor).
- c) De gegevens dienen onder meer te bevatten: alle proefgegevens van beide jaren, incl. labjournaal en logboek, en het verloop van temperatuur en luchtvochtigheid in de klimaatcel, personeelsregistraties t.a.v. het resistentie-onderzoek en het onderhoud en de kalibratie van bij het onderzoek gebruikte apparatuur.
- d) Waarnemingen moeten worden geregistreerd op het moment dat ze worden verkregen en door middel van identificatie herleidbaar zijn tot de persoon die de registratie heeft uitgevoerd.
- e) Als registraties fouten bevatten moet elke fout worden doorgestreept, maar niet worden gewist, onleesbaar gemaakt of verwijderd, waarna de juiste waarde ernaast wordt aangegeven, voorzien van een paraaf van de persoon die de correctie aanbrengt. In digitale logboeken kan als paraaf de initialen worden toegevoegd al dan niet als opmerking bij de doorgestreepte tekst.
- f) Alle geldende en vervallen kwaliteitsdocumenten en registraties m.b.t. het resistentieonderzoek aardappelmoehheid dienen duidelijk leesbaar te zijn en zo te worden opgeslagen en bewaard dat ze eenvoudig opvraagbaar zijn, in faciliteiten die een geschikte omgeving bieden om schade, achteruitgang en verlies te voorkomen.

Hoofdstuk 3: Technische eisen aan onderzoeksmethode en data-analyse

3.1. Algemeen

- a) Het resistentieonderzoek dient te voldoen aan de eisen verwoord in hoofdstuk 4 en bijlage 1.
- b) Inoculum: Er mogen uitsluitend vitale cysten van zuivere standaardpopulaties worden gebruikt; deze dienen te zijn geproduceerd door een instantie die in het kader Verordening (EU) 2019/829 een ontheffing van de bevoegde instantie heeft verkregen. Deze instantie kan dezelfde zijn als de toetsende instantie.
- c) Het plantmateriaal dient blind getoetst te worden en de identiteit van het materiaal dient getoetst te worden. De onderzoeksinstantie dient hiervoor zorg te dragen. De organisatie die de resistentietoetsingen uitvoert dient te beschikken over vastgelegde werkwijzen voor deze werkzaamheden.
- d) De data-analyse moet voldoen aan de eisen zoals vermeld in hoofdstuk 5.
- e) De coördinator van het gebruikswaardenonderzoek (NAK) maakt jaarlijks voor de start van het onderzoek een overzichtstabel over de in dat jaar te onderzoeken rassen met vermelding van jaar van onderzoek (1^e, 2^e of 3^e jaars onderzoek en het nummer waaronder een ras in onderzoek wordt genomen) en verstrekt deze aan de NVWA.

3.2. Zuiverheid en vitaliteit

- a) Het voor het onderzoek gebruikte inoculum (cysten) dient voorafgaande aan het resistentieonderzoek minimaal éénmaal op zuiverheid getoetst te zijn.
- b) Het inoculum dient aan de volgende eisen van zuiverheid te voldoen: Soortbepaling en bepaling van de zuiverheid van de soort (dus geen bijmenging) dienen d.m.v. een adequate moleculair biologische methode (EPPO protocol PM 7/40) te worden uitgevoerd en vervolgens dient de populatie getoetst te worden op pathotype/virulentie-eigenschappen volgens het principe van het Kort schema, waarbij het rassengebruik aangepast kan worden aan het hedendaagse aanbod (Kort et al, 1977). Het zuiverheidsonderzoek mag alleen worden uitgevoerd door de onderzoeksinstantie zelf of een andere instantie, waar de NVWA, in ditzelfde kader, toezicht op houdt.
- c) De vitaliteit dient ten minste 70% te zijn; dit dient maximaal 2 maanden voor inzetten van de proef te zijn bepaald.

- d) De identiteit van het inoculum dient gehandhaafd te blijven en door middel van productiejaar en code van de populatie en het ras waarop de populatie vermeerderd is, geregistreerd te worden.
- e) Er dient een uitslag van het zuiverheidsonderzoek bij het inoculum aanwezig te zijn. De uitslag dient minimaal aan te geven: de uitslagen van het zuiverheidsonderzoek en de vitaliteitstoets en het jaar van toetsing.
- f) Als toetspopulaties worden de populaties gebruikt zoals genoemd in bijlage 1 bij dit protocol; aanvullend kunnen andere populaties gebruikt worden: NL gebruikt als toetspopulaties de Ro1 populatie (Ecosse), Ro2/3 populatie (BC262), Ro5 (Harmerz), Pa2 (Pa2-WUR/IPO=PD248) en Pa3 (Chavornay).

3.3. Rasechtheid

- a. De rasechtheid van toetsrassen en controlerassen dient middels een lichtkiemonderzoek vastgesteld te worden voorafgaande aan het onderzoek. Andere methoden die even betrouwbaar blijken te zijn zoals DNA fingerprinting, mogen ook ingezet worden.
- b. De identificatie dient uitgevoerd te worden door een onderzoeksinstantie die over vastgelegde werkwijzen dient te beschikken voor de uitvoering van dit onderzoek.

Hoofdstuk 4: Technische uitvoering resistentietoets

- a) Uitvoering van het in paragraaf 3.1 genoemde resistentieonderzoek dient plaats te vinden in een daartoe geschikte toetsruimte die voldoet aan de hieronder gespecificeerde eisen. De temperatuur en luchtvochtigheid in de toetsruimte moeten gedurende het gehele onderzoek geregistreerd worden. Er dient een gekalibreerde temperatuur- en hygrometer in de cel/kas/ruimte aanwezig te zijn. Afwijkingen van de optimale klimaatcondities moeten geregistreerd worden.
- b) De uitrusting dient adequaat te worden onderhouden en zo vaak gecontroleerd en gekalibreerd als nodig is om goed functioneren te waarborgen. Zo dienen microscopen en balansen minimaal 1 keer per jaar een onderhoudsbeurt te krijgen, voor andere apparatuur dienen geschikte frequenties van controle te worden vastgesteld. Defecte apparatuur wordt direct uit gebruik genomen. Defecten aan apparatuur die tijdens het onderzoek vastgesteld worden, dienen te worden geregistreerd in een logboek.
- c) Er dienen effectieve maatregelen te worden genomen tegen het gevaar van kruisbesmetting tussen proeven met verschillende soorten en pathotypen/ virulentiegroepen.
- d) Voor het uitzoeken van de cysten en het tellen van de inhoud van deze cysten dienen dissectiemicroscopen ("binoculairen") met een vergroting van minimaal 25x te worden gebruikt.
- e) Alle relevante handelingen die in het kader van het AM-resistentieonderzoek verricht worden en die invloed kunnen hebben op de kwaliteit en uitkomst van het onderzoek, dienen geregistreerd te worden met vermelding van datum, plaats, uitvoerende persoon en verantwoordelijke persoon.
- f) De resistentietoets wordt twee keer uitgevoerd in twee verschillende jaren. In beide jaren dient het onderzoek te worden uitgevoerd onder code zonder vermelding van rasnaam.
- g) Ter controle van de methode en zuiverheid van het inoculum worden vatbare en resistente controlerassen opgenomen in de toetsing volgens de volgende tabel:
 1. Ro1: Saturna
 2. Ro3: Elkana
 3. Ro5: Laura
 4. Pa2: (VTN)2 62.33.3
 5. Pa3: AM 78.3778
 6. vatbare controle: Desiree
- h) De toetsen dienen vroeg in het jaar te worden uitgevoerd; het inzetten moet plaatsvinden in de periode van januari tot en met april. Het pootgoed wordt voorgekiemd, per pot 1 oogstuk met 1 kiem. Het resistentieonderzoek wordt per pathotype in één keer ingezet, omdat de resultaten als één geheel moeten worden beoordeeld. Het later toevoegen van een ras is dus niet mogelijk.
- i) Het onderzoek wordt uitgevoerd met potten van 2 liter in 5 herhalingen. Aanbevolen wordt om voor het standaard vatbare controleras enkele extra herhalingen te gebruiken. Per pathotype volledig geward.
- j) De toetsing vindt plaats onder geconditioneerde omstandigheden. De luchtvochtigheid dient niet beneden de 40% te komen, de temperatuur overdag rond 20°C ± 5°C., 's nachts tussen 12 en

15°C ± 5°C. De pottentemperatuur mag niet boven de 25°C uitkomen omdat dit de vermeerdering sterk negatief beïnvloedt. Vanaf 50% opkomst dient minimaal 6.000-7.000 lux (minimaal 14 uur licht) per dag aanwezig te zijn.

- k) Het vochtgehalte in de potten dient ongeveer tussen de 15 en 20% te blijven, bij inoculeren ongeveer 12%.
- l) Er dient met een suspensie van nematoden geïnoculeerd te worden zodanig dat een dichtheid van $5 \pm 0,5$ levende eieren + juvenielen per gram droge grond bereikt wordt. Dit dient aantoonbaar gecontroleerd te zijn door een aantal extra doses inoculum (10 keer) apart op te vangen gedurende het inoculatieproces en deze vervolgens te tellen met als doel het gemiddelde en de standaardafwijking van de Pi te schatten. Het gemiddelde van deze Pi's wordt beschouwd als de Pi voor alle potten. De vitaliteit van het inoculum is voordien vastgesteld. Bij het inoculeren wordt daarom geen visueel onderscheid gemaakt tussen levende en dode juvenielen.
- m) De suspensie dient voor gebruik gecontroleerd te worden op zuiverheid van de soort mbv een moleculaire methode (zie EPPO PM7/40).
- n) De planten dienen optimaal water, mest en verzorging te krijgen.
- o) De planten beginnen na circa 3 maanden (100 dagen) af te sterven, de levenscyclus van de meeste aardappelcysten is dan voltooid. Stop met de watergift.
- p) De cysten dienen volgens een erkende extractietechniek (EPPO PM7/119) uit de grond te worden geïsoleerd. Validatie dient te geschieden middels deelname aan een ringonderzoek of een daarmee vergelijkbaar onderzoek met hetzelfde doel.
- q) Bij het bepalen van de einddichtheid (Pf), gebaseerd op eieren en juvenielen, dient dezelfde telmethode gebruikt te worden als bij de begindichtheid (Pi). De cysten worden na 1 nacht voorweken gecrushed, in suspensie gebracht en een representatief deel geteld waarbij geen onderscheid gemaakt wordt tussen dode en levende nematoden en waarbij minimaal 300 eieren + juvenielen geteld dienen te worden.
- r) Aanvullende informatie over het uitvoeren en de verzorging van deze toets is te lezen in het oude CGO-protocol (2009).

Hoofdstuk 5: Verwerking van gegevens en op lijst plaatsing

5.1. Verwerken van gegevens

- a) Het resistentieniveau wordt uitgedrukt in relatieve vatbaarheid; dit is de vermeerdering op de toetsplant gedeeld door de vermeerdering op de vatbare plant maal 100%.
- b) Alle data dienen inzichtelijk opgeslagen te worden in een datafile (spreadsheet EXCEL) die, in combinatie met de verwerkte data en de voorlopige uitslagen, naar de NVWA opgestuurd dienen te worden.
- c. Voor elke pot worden in een spreadsheet (EXCEL) de volgende factoren en kenmerken weergegeven:
 - Rascode (Ras!);
 - Herhalingsnummer (Herhnr!);
 - Aantal getelde cysten (Cysten);
 - Het volume van de aangemaakte suspensie in ml (Ml);
 - Aantal juvenielen per telling (T[1], T[2], T[3], T[4]), minimaal 1 telling (bij aantallen > 300).
- d. De datafile wordt in EXCEL verwerkt, in de daarvoor door de NAK ontwikkelde spreadsheet. De organisatie dient te beschikken over een werkwijze waarmee de gebruikte programmatuur wordt beschermd tegen en wordt getest op mogelijke fouten en onvolkomenheden.
- e. Per jaar dienen de uitslagen te voldoen aan de volgende betrouwbaarheidseisen (als hier niet aan wordt voldaan, wordt de proef als niet uitgevoerd beschouwd):
 - Bij een geslaagde proef is de variantie van de vatbare referentierassen, de zgn. s2 ref, niet groter dan 0,05.
 - De vermeerdering van *Globodera rostochiensis* en *G. pallida* op de vatbare combinaties, uitgedrukt in Pf/Pi, dient minimaal 20 keer te zijn.
 - De variatiecoëfficiënt van de ongetransformeerde Pf van de vatbare referentierassen mag niet groter zijn dan 35%.
 - De variantie binnen de potten van één ras mag niet groter zijn dan 0,45. Dit geldt alleen bij rassen met score <9. Bij score 9 liggen de waarden zo dicht rond de nul dat kleine afwijkingen zeer grote effecten hebben. Dit leidt tot een niet reële grote variantie.

- De uitslagen op de resistente referentierassen moeten overeenkomen met de historische gegevens van deze rassen.
- f. Uitbijters mogen alleen verwijderd worden als er een aanwijsbare aanleiding voor is. Eventueel na overleg met de NVWA.
- g. De geanalyseerde uitslagen dienen jaarlijks, tezamen met de ruwe data en de uitleg van de verwijderde uitbijters of om andere redenen afwijkende uitslagen, vóór 1 september van het jaar van uitvoering van de proef, bij de NVWA ingeleverd te worden, digitaal in een voorgeschreven format (zie 5.1c).

5.2. Informeren van bedrijven

De bedrijven die rassen aanmelden voor het officiële resistentieonderzoek zijn eigenaar van de uitslagen van het resistentieonderzoek, zijnde de ruwe toetsdata en de statistische analyse daarvan.

De coördinator van het gebruikswaardenonderzoek informeert de afzonderlijke bedrijven over de uitslagen van het resistentieonderzoek van de door hun aangemelde rassen.

5.3. Verwerking door NVWA en opstellen rassenlijsten

- a. De NVWA verwerkt de uitslagen van het resistentieonderzoek op basis van de verstrekte gegevens van de laboratoria en de gegevens over de identiteit van de onderzochte rassen die door de coördinator van het gebruikswaardenonderzoek (in Excel) zijn verstrekt.
- b. De NVWA verstrekt aan de aanvrager van het onderzoek na tenminste 2 jaren van toetsen een resistentieverklaring. Hiertoe wordt het rekenkundig gemiddelde bepaald van de Relatieve vatbaarheid als percentage over alle uitgevoerde jaren van toetsen, waarbij afronding tot 1 cijfer achter de komma wordt gehanteerd. Deze verklaring geeft aan welk resistentieniveau, conform Uitvoeringsverordening (EU) 2022/1192 en EPPO PM3/68, aan het ras is toegekend. Resistentieverklaringen worden per pathotype verstrekt.
- c. De NVWA behoudt zich het recht om op basis van deskundigheid nog geen resistentieverklaring af te geven als het verschil tussen de Relatieve Vatbaarheidsscore van de 2 jaren van toetsen >1, in verband met de invloed op het rekenkundig gemiddelde van het eindcijfer. In zo'n geval zal het ras voor een 3e jaar getoetst moeten worden.
- d. De NVWA verzorgt 2 lijsten:

1. De lijst AM-resistentieniveaus aardappelrassen (officiële naam: Lijst aardappelrassen met het bijbehorende resistentieniveau voor AM).

Dit is de officiële lijst van aardappelrassen met de relatieve vatbaarheden en hun bijpassende scores. De genoemde rassen worden in Nederland verhandeld of zijn anderszins verkrijgbaar en kunnen worden gebruikt op besmet verklaarde terreinen. Deze lijst bevat zowel resistentiegegevens uit Nederlands onderzoek als uit onderzoek dat in andere EU landen is uitgevoerd. In de lijst wordt vermeld in welk land het resistentieonderzoek is uitgevoerd.

De NVWA past een procedure toe waarmee rechthebbenden een aanvraag kunnen indienen om een ras genoteerd te krijgen op de lijst AM resistentieniveaus op grond van onderzoek, dat in een andere EU land is uitgevoerd. De NVWA zal de lijst beperken tot rassen die daadwerkelijk in Nederland beschikbaar zijn. De NVWA hanteert een procedure om te beoordelen of een ras van de lijst AM resistentieniveaus verwijderd kan worden.

In de officiële versie, die in de Staatscourant wordt gepubliceerd, worden alleen rassen opgenomen die opgenomen zijn in het Nederlands rassenregister (status 'toegelaten'). De NVWA controleert voorafgaande aan de publicatie of er rassen zijn die na de vorige publicatie in de Staatscourant toegelaten zijn tot het Nederlands rassenregister. Deze rassen worden toegevoegd aan de te publiceren lijsten. Met beide Nederlandse lijsten bereikt de NVWA, dat telers eenvoudig na kunnen gaan welke resistentiecijfers gelden voor beschikbare rassen.

Daarnaast zullen andere EU-lidstaten de officiële lijsten van geregistreerde rassen voor hun grondgebied jaarlijks voor 31 januari notificeren aan de Europese Commissie en aan andere lidstaten. Lidstaten kunnen gebruik maken van elkaars gegevens maar zijn hiertoe niet verplicht. De lijsten van de EU-lidstaten kunnen onderling grote verschillen vertonen, vanwege de variatie in beschikbare en getoetste rassen en mogelijke verschillen in de aanvullende AM-populaties in verschillende lidstaten.

2. De verzamellijst Nederlands resistentieonderzoek AM

Dit is de verzamellijst van rassen met relatieve vatbaarheden en hun bijpassende scores, die aan de EU zijn genotificeerd op basis van onderzoek, dat in Nederland is uitgevoerd. Jaarlijks notificeert Nederland de uitkomsten van resistentieonderzoek, dat in Nederland is uitgevoerd. Deze notificering dient plaats te vinden voor 31 januari van het opvolgende jaar. Er worden alleen uitslagen van resistentieonderzoek genotificeerd van rassen, waarvoor Nationaal kwekersrecht is verleend en de status 'toegelaten' hebben in het Nederlands rassenregister.

- e. De NVWA verstrekt geen ruwe toetsdata met vermelding van bijbehorend ras aan derden. De NVWA en haar zusterorganisaties hebben de mogelijkheid om de ruwe data te gebruiken voor analyse- en onderzoeksdoeleinden.

5.4. Tijdsplanning

Onderstaande tabel geeft de tijdlijn van de gegevensverwerking weer.

Onderdeel	Wie	Deadline
Rassen aanmelden voor resistentieonderzoek	Kwekers	<15 december
Coderen rassen	CGO coördinator	<15 januari
Resistentieonderzoek + gegevensverwerking	Onderzoekslaboratorium	<1 september
Controleren gegevens + uitslag	NVWA	<1 oktober
Uitslag naar kweker	CGO coördinator	<15 oktober
Verstrekking resistentieverklaring aan telers	NVWA	< 1 november*
Verzamellijst Nederlands resistentieonderzoek AM + notificering naar EU	NVWA	<31 januari

* Verklaring wordt verstrekt voor ieder ras dat een resistentieniveau eindcijfer heeft gekregen met ARD nummer en mits bekend ook met rasnaam, anders wordt de kwekersaanduiding vermeld.

Hoofdstuk 6: Literatuur

Kort J., Rumpfenhorst H.J. & Stone A.R., 1977. An international scheme for identifying and classifying pathotypes of potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica* 23: 333-339.

CGO-protocol (2009): AM-deel aangepaste versie (januari 2009). Protocol voor het cultuur- en gebruikswaarde onderzoek van aardappelen. Als aparte bijlage op te vragen bij Plantum.

EPPO PM7/40 (5) 2022. Diagnostic protocol *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. EPPO Bulletin Volume 52 : 286-313

EPPO PM3/68 (2) 2021. Testing of potato varieties to assess resistance to *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. EPPO Bulletin Volume 51: 404-405

EPPO PM7/119 (1) 2013. Nematode extraction. EPPO Bulletin 43 (3): 471-495.

Bijlage 1: De officiële EU eisen waaraan de resistentietoets moet voldoen zoals omschreven in ANNEX V van de Uitvoeringsverordening (EU) 2022/1192.

(aangepaste vertaling NVWA)

DEEL I

RESISTENTIE NIVEAU

Het niveau van vatbaarheid van de aardappelen voor aardappelcystealtjes wordt gekwantificeerd volgens de volgende standaard score notatie, zoals bedoeld in artikel 8, lid 3 van de

Uitvoeringsverordening Aardappelmoetheid (AM).

Score 9 geeft het hoogste resistentieniveau aan.

Relatieve Vatbaarheid (%)	Score
≤ 1	9
$1 < RV \leq 3$	8
$3 < RV \leq 5$	7
$5 < RV \leq 10$	6
$10 < RV \leq 15$	5
$15 < RV \leq 25$	4
$25 < RV \leq 50$	3
$50 < RV \leq 100$	2
> 100	1

DEEL II

PROTOCOL VOOR RESISTENTIETESTS

1. De tests worden verricht in een quarantaine-inrichting, hetzij buiten, hetzij in kassen, hetzij in koelruimten.
2. De tests worden verricht in potten die elk ten minste een liter grond (of een ander geschikt substraat) bevatten.
3. Tijdens de test mag de grondtemperatuur niet meer dan 25 °C bedragen en moet er voldoende water worden gegeven.
4. Voor het planten van het test- of controleras wordt van elk test- of controleras één stuk aardappel met oog gebruikt. Aanbevolen wordt om op één na alle stengels te verwijderen.
5. Bij elke test wordt het aardappelras "Désirée" als standaard vatbaar controleras gebruikt. Als interne controle mogen daarnaast volledig vatbare controlerassen van plaatselijk belang worden gebruikt. Indien uit onderzoek blijkt dat andere rassen geschikter zijn of gemakkelijker te verkrijgen zijn, mag een ander standaardvatbaar controleras worden gebruikt.
6. Voor de pathotypen Ro 1, Ro 5, Pa 1 en Pa 3 worden de volgende standaardpopulaties aardappelcysteaaltjes gebruikt:
Ro 1: populatie Ecosse,
Ro 5: populatie Harmerz,
Pa 1: populatie Scottish,
Pa 3: populatie Chavornay.
Er mogen andere populaties aardappelcysteaaltjes van plaatselijk belang worden toegevoegd.
7. De identiteit van de standaardpopulatie wordt met geschikte methoden gecontroleerd. Aanbevolen wordt om voor de tests ten minste twee resistente rassen of twee differentiële standaardklonen met bekend resistentievermogen te gebruiken. 16.6.2007 NL Publicatieblad van de Europese Unie L 156/21.
8. Het aardappelcysteaaltjesinoculum (Pi) bestaat uit in totaal vijf eitjes en jonge aaltjes per ml grond. Aanbevolen wordt om het aantal te inoculeren aardappelcysteaaltjes per ml grond te bepalen met een loktoets. De aardappelcysteaaltjes mogen als cysten worden geïnoculeerd of als eitjes en jonge aaltjes in een suspensie.
9. De levensvatbaarheid van de aardappelcysteaaltjesinhoud die als inoculatiebron wordt gebruikt, moet ten minste 70 % bedragen. Aanbevolen wordt dat de cysten 6 à 24 maanden oud zijn en onmiddellijk vóór gebruik gedurende ten minste vier maanden bij 4 oC zijn bewaard.
10. Per geteste combinatie van aardappelcysteaaltjespopulatie en aardappelras worden ten minste vier replicaten (potten) gebruikt. Aanbevolen wordt om voor het standaard vatbare controleras ten minste tien herhalingen te gebruiken.
11. De test duurt ten minste drie maanden. Alvorens de test wordt beëindigd, wordt gecontroleerd of de zich ontwikkelende wijfjes volgroeid zijn.
12. De aardappelcysteaaltjes in de potten worden voor elke pot afzonderlijk verwijderd en geteld.
13. De eindpopulatie (Pf) bij het standaard vatbare controleras aan het einde van de resistentietest wordt bepaald door alle cysten in alle herhalingen en de eitjes en jonge aaltjes in ten minste vier herhalingen te tellen.
14. Bij het standaard vatbare controleras moet een vermenigvuldigingsfactor (Pf/Pi) van ten minste 20 worden bereikt.
15. De variatiecoëfficiënt (CV) bij het standaard vatbare controleras mag niet meer dan 35% bedragen.
16. De relatieve vatbaarheid van het geteste aardappelras in verhouding tot het standaardvatbare controleras wordt bepaald en uitgedrukt als een percentage aan de hand van de volgende formule: $Pf \text{ testras} / Pf \text{ standaard vatbaar controleras} \times 100 \%$.
17. Indien een getest aardappelras een relatieve vatbaarheid van meer dan 3 % heeft, volstaat het om de cysten te tellen. Indien de relatieve vatbaarheid minder dan 3 % bedraagt, worden naast de cysten ook de eitjes en jonge aaltjes geteld.
18. Indien uit de testuitslagen van het eerste jaar blijkt dat een ras volledig vatbaar is voor een pathotype, hoeven deze tests niet in een tweede jaar te worden herhaald.
19. De testuitslagen moeten worden bevestigd door ten minste nog een proef in een tweede jaar. Het rekenkundige gemiddelde van de relatieve vatbaarheid in de twee jaren wordt gebruikt om de score volgens de standaard scorenotatie te berekenen.

Bijlage 2: Verwerking uitslagen

De Uitvoeringsverordening van de EU ((EU) 2022/1192) bevat een geharmoniseerde schaal voor het weergeven van de resistentieniveaus van aardappelen op basis van relatieve vatbaarheden. Volgens de AM verordening wordt de Relatieve Vatbaarheid vervolgens omgezet in een standaard score die in de lokale beheersmaatregelen kan worden vermeld. Deze score wordt als volgt vastgesteld:

Relatieve Vatbaarheid (%)	Score
$RV \leq 1$	9
$1 < RV \leq 3$	8
$3 < RV \leq 5$	7
$5 < RV \leq 10$	6
$10 < RV \leq 15$	5
$15 < RV \leq 25$	4
$25 < RV \leq 50$	3
$50 < RV \leq 100$	2
$RV > 100$	1

De analyse van de uitslagen en de procedure om te komen tot plaatsing op officiële lijsten wordt hieronder uitgelegd.

De Relatieve Vatbaarheid (RV) is de maximale vermeerdering van de nematodenpopulatie op het toetsras in verhouding (in %) tot de maximale vermeerdering van dezelfde nematodenpopulatie in dezelfde toets op een volledig vatbaar ras.

In formulevorm:

$$RV = \frac{\text{Maximalevermeerdering van het te toetsen ras}}{\text{Maximalevermeerdering van het vatbare ras}} \times 100 \%, \text{ waarbij de vermeerdering}$$

wordt bepaald door het aantal gevormde juvenielen en eieren per ml grond of per pot. Hierbij wordt de Pf (final population=einddichtheid) vergeleken met de Pi (initial population=begin dichtheid).

Het rekenkundig gemiddelde van de resultaten van twee jaar onderzoek, in verschillende jaren uitgevoerd, waarbij afronding (na 2 toetsjaren) op 1 cijfer achter de komma wordt gehanteerd, bepalen de einduitslag van een ras.

Pi en Pf

Het doel van het doen van potproeven is het vergelijken van de vatbaarheid voor nematoden van een bepaalde virulentiegroep van een aantal toetsrassen t.o.v. een standaard vatbaar ras (= vatbare referentieras). Het standaard ras is altijd het voor alle virulentiegroepen vatbare ras Desirée. De vatbaarheid wordt vastgesteld door aardappelplanten vanuit een knol een bepaalde periode in potten van 2 liter te telen en de hoeveelheid juvenielen en eieren per gram droge grond te bepalen aan het begin (Pi) en aan het eind (Pf) van de periode. De potgrond wordt geïnoculeerd met als streefwaarde voor de Pi 5 juvenielen + eieren per gram droge grond. Een aantal extra doses inoculum wordt apart opgevangen gedurende het inoculatieproces en vervolgens geteld met als doel het gemiddelde en de standaardafwijking van de Pi te schatten. Het gemiddelde van deze Pi's wordt beschouwd als de Pi voor alle potten. De Pi- waarde mag niet lager dan 4,5 en niet hoger dan 5,5 eieren+juvenielen per gram grond zijn.

Na de proef worden de cysten per pot opgespoeld en gecrushed. De juvenielen en eieren worden in suspensie gebracht. De tellingen van de juvenielen en eieren in 1 ml suspensie wordt enkelvoudig (in geval >300 juvenielen +eieren) of in duplo bepaald en mogelijk in 3- of 4-voud afhankelijk van de verschillen tussen duplo waarnemingen. De Pf wordt berekend door het gemiddelde van de juvenielen + eieren tellingen/ml te vermenigvuldigen met het volume van de aangemaakte suspensie in ml, en te delen door het aantal grammen grond per pot. Van de Pf wordt de mediaan per ras berekend (Oude Voshaar 1994, blz 10 en blz 13). Hierbij wordt eerst de natuurlijke logaritme van de gemeten Pf's berekend. Van deze loggetransformeerde Pf's wordt het gemiddelde per ras berekend. Deze gemiddelden worden teruggetransformeerd en het resultaat is de mediaan

van de Pf's per ras. De mediaan is de waarde waarbij 50 % van de waarnemingen kleiner is dan de mediaan en 50 % van de waarnemingen groter dan de mediaan. Bij symmetrische verdelingen, zoals de normale verdeling, vallen gemiddelde en mediaan samen. Bij de lognormale verdeling is het gemiddelde groter dan de mediaan.

In het vervolg van deze beschrijving is de eenheid voor Pi en Pf steeds het aantal juvenielen + eieren per gram droge grond.

Data en overige gegevens

De potproeven worden aangelegd als volledig gewarde proeven (§ 3.3 uit Oude Voshaar, 1994) in 5 herhalingen, waarin slechts één factor onderzocht wordt, namelijk ras. Het aantal potten in de proef is in principe gelijk aan het aantal rassen keer het aantal herhalingen. =

Bij de verslaglegging wordt vermeld:

- de gebruikte toetspopulatie aaltjes;
- de leeftijd van de populatie;
- de afzonderlijke bepalingen van de Pi, het gemiddelde en standaardafwijking Pi.

Voor elke pot worden in een spreadsheet (EXCEL) de volgende factoren en kenmerken weergegeven:

- Rascode (Ras!);
- Herhalingsnummer (Herhnr!);
- Aantal getelde cysten (Cysten);
- Het volume van de aangemaakte suspensie in ml (MI);
- Aantal juvenielen en eieren per telling (T[1], T[2], T[3], T[4]).

De datafile wordt direct verwerkt in een beveiligde excelfile. Lege cellen of cellen met een* worden gezien als ontbrekende waarneming.

Statistische verwerking van de gemeten Pf waarden of Pf/Pi-waarden

EXCEL:

De NAK heeft een beveiligde excelfile ontwikkeld, waarin de gegevens per uniek potnummer worden ingevoerd en waarin de statistische verwerking direct plaatsvindt. Hierin zijn ook de betrouwbaarheidseisen zoals beschreven in 5.1e opgenomen en wordt berekend of de resultaten hieraan voldoen. Sinds 2022 heeft HLB ook toestemming om deze spreadsheet te gebruiken. Elk pathotype staat als separaat werkblad vermeld.

In NL heeft elk ras standaard 5 potten (waarnemingen) in de excelfile. Voor de vatbare controlerassen kunnen dat er zelfs 10 zijn. Het minimaal aantal benodigde waarnemingen is 3. Rassen waarvan minder dan 3 waarnemingen aanwezig zijn worden uitgesloten.

Systematiek in de beoordeling van de uitslagen

Bij de beoordeling van de uitslagen wordt allereerst gekeken naar de kwaliteit van de afzonderlijke proeven. Een proef is een groep potten in één kas, geïnoculeerd met één suspensie (van een bepaalde aaltjespopulatie) bij dezelfde begindichtheid.

Na een variantie-analyse van het totaal aantal potten worden de eventuele uitbijters (afwijkende potten) bepaald die in de daaropvolgende analyse worden uitgesloten van de verwerking. De uitslagen van de individuele rassen van de goedgekeurde proeven worden uiteindelijk beoordeeld op basis van de variantie-analyse zonder uitbijters.

Betrouwbaarheid van de proef

De afzonderlijke proeven worden beoordeeld op:

1. de totale variantie van de proef (s_2) en de variantie van de vatbare referentie-rassen (s_2 susref). Aangezien de referentie-rassen (controle-rassen) een vast onderdeel zijn van elke proef en op alle locaties voorkomen, wordt de kwaliteit van een proef in de eerste plaats beoordeeld aan de hand van de variantie van de vatbare referentie-rassen. Bij een geslaagde proef is de variantie van de vatbare referentierassen (s_2 susref) niet groter dan 0,05.
2. Volgens het protocol is voor een geslaagde proef een minimale vermeerdering van 20 keer vereist ($Pf/Pi = 20$).
3. De variatie coëfficiënt van de ongetransformeerde Pf van de vatbare referentierassen mag niet groter zijn dan 35%.

Uitbijter – analyse

In de eerste analyse (uiteraard met uitsluiting van de potten die op voorhand zijn mislukt), wordt aan de hand van de residuenplots bepaald welke potten een relatief grote bijdrage leveren aan de totale variantie. Een voorwaarde voor de variantie-analyse is dat de variantie van alle waarnemingen gelijk verdeeld is. In een residuenplot worden de uitbijters zichtbaar doordat zij zich buiten een zekere bandbreedte rondom de gemiddelde variantie bevinden. Aan de voorwaarde voor de variantie-analyse wordt voldaan door de eventuele uitbijters (met een aantoonbare reden, bijvoorbeeld onvoldoende groei van de plant) te elimineren. Als er teveel potten van een ras worden geëlimineerd kunnen de uitslagen van het desbetreffende ras komen te vervallen:

4. Bij minder dan 3 potten wordt de uitslag onbeslist.
De uitbijters komen ook tot uiting in de variantie binnen de potten van één ras (s_2 - binnen ras).
5. De s_2 - binnen ras mag niet groter zijn dan 0,45. Dit criterium geldt alleen bij rassen die een score hebben < 9 . Bij score 9 liggen de waarden zo dicht rond de nul dat kleine afwijkingen zeer grote effecten hebben. Dit leidt tot een niet reële grote variantie.

Controle- of referentierassen

Per proef zijn 2 controle-rassen opgenomen (een vatbare en een resistente controle) voor eventuele verwisselingen van rassen en ter controle van het eindresultaat. De gerealiseerde uitslagen van de controle-rassen moeten overeenkomen met de historische gegevens van deze rassen. Afwijkende uitslagen zijn een indicatie voor eventuele fouten in de uitvoering en kunnen leiden tot een afkeuring van de proef.

Beoordeling van de individuele rassen

Als de proefuitslagen voldoen aan bovengenoemde criteria kunnen de uitslagen van de individuele rassen worden vastgesteld op basis van de variantie-analyse. De berekening van de Relatieve Vatbaarheden zullen met de bijbehorende scores van 1 – 9 uitgangspunt zijn voor de einduitslag zie 5.3. Als eindverantwoordelijke behoudt de NVWA zich het recht na 2 jaren van toetsen nog geen resistentieverklaring af te geven als de gemiddelde Relatieve Vatbaarheid (%) van beide jaren van toetsen sterk van elkaar afwijken (verschil RV score > 1), waardoor geen betrouwbare eindscore gegeven kan worden. Het ras zal nogmaals getoetst moeten worden om het definitieve resistentie niveau te kunnen vaststellen. Voor de definitieve bepaling van de eindscore van de relatieve vatbaarheid zal in deze gevallen het rekenkundig gemiddelde van alle 3 de jaren van toetsen meegenomen worden in de analyse. Alleen bij aanwijsbare redenen, zoals menging van knollen of geen zuivere batch, en/of een uitbijtertoets, zal het resultaat van een jaar van toetsen niet meegenomen worden.

Samenvatting

De beoordeling van de uitslagen vindt plaats in 5 stappen:

1. Uitbijter-controle:

Variantie-analyse van totaal. Uitbijters worden geïdentificeerd in de oorspronkelijke dataset, in residuenplots en aan de hand van s^2 -binnen ras en overdispersie. Individuele rassen met veel variabele uitslagen worden zo mogelijk volledig geëlimineerd. Variantie-analyse wordt opnieuw uitgevoerd zonder (aantoonbare) uitbijters.

2. Statistische analyse:

De kwaliteit van de proef wordt beoordeeld op basis van s^2 (totaal) en s^2 van de vatbare referentie-rassen (< 0.05), vermeerdering op de vatbare controles (min. 20 x) en op basis van de variatie coëfficiënt ($< 35\%$ voor de vatbare referentierassen).

3. Controle/referentierassen:

Eventuele fouten in de uitvoering worden opgespoord op basis van vergelijking met de historische gegevens van de controlerassen.

4. Goed-/afkeuring:

Bovengenoemde criteria leiden tot goedkeuring of afkeuring van de uitslagen van individuele rassen of van de gehele proef.

5. Uitslagen per ras:

Per ras wordt de Relatieve Vatbaarheid berekend met de bijbehorende score.

De beoordeling van bovenstaande punten gebeurt door de uitvoerende instantie, waarbij de ruwe data, de uitslagen en de analyses naar de NVWA worden gestuurd ter controle. De einduitslag wordt door de NVWA bekrachtigd.