

Protocol voor het Cultuur- en
Gebruikswaarde Onderzoek
aan zaailingen van True Potato
Seed rassen

2020

Raad voor plantenrassen

februari 2020

Inhoud

1.	Inleiding.....	1
2.	Zaaizaad voor de beproeving	1
3.	Toetsing op resistentie tegen Phytophthora in het loof	2
4.	Bepaling van het glycoalkaloidgehalte (SGA)	5
5.	Toetsing op resistentie tegen Y-virus	7
	Bijlage 1 Contactgegevens	10

1. Inleiding

Het Cultuur- en Gebruikswaarde Onderzoek (CGO) van TPS rassen wordt uitgevoerd op twee manieren:

- CGO-proeven uitgevoerd aan planten geteeld vanuit pootgoed dat door de betreffende kweker wordt aangeleverd en afkomstig is van zaailingen;
- CGO-proeven uitgevoerd aan zaailingen (uit zaad opgetrokken planten).

Het CGO van TPS-rassen dat uitgevoerd wordt op basis van pootgoed is beschreven in het Protocol voor het Cultuur- en Gebruikswaarde Onderzoek van Aardappelen 2020. In dit onderzoek is het CGO aan TPS-rassen volledig geïntegreerd in het CGO van vegetatief vermeerderde rassen.

Omdat niet duidelijk is of CGO van TPS-rassen uitgevoerd aan zaailingen andere resultaten oplevert dan CGO uitgevoerd aan planten uit pootgoed, wordt in 2020 ook CGO aan zaailingen uitgevoerd.

Het CGO aan TPS-zaailingen bestaat uit de volgende proeven:

- Eén veldproef voor de bepaling van de resistentie tegen Phytophthora
- Twee veldproeven voor de bepaling van de resistentie tegen Y- virus
- Twee veldproeven voor de bepaling van het glycoalkaloïdgehalte (SGA)

Alleen de rassen die vóór 15 december zijn aangevraagd bij de Raad voor Plantenrassen (zie www.raadvoorplantenrassen.nl) komen voor de officiële CGO-beproeving in aanmerking.

2. Zaaizaad voor de beproeving

Het benodigde zaaizaad voor de beproeving van zaailingen wordt besteld en ingenomen door de coördinerende/uitvoerende instantie (NAK). Het zaaizaad moet vóór 1 februari bij de NAK worden aangeleverd.

Kwaliteit van het zaaigoed

Het zaaizaad moet een kiemkracht hebben van minimaal 85%.

3. Toetsing op resistentie tegen Phytophthora in het loof

De toets wordt uitgevoerd in het veld onder kunstmatige inoculatie. Het verloop van de epidemie wordt met regelmatige tussenpozen beoordeeld. De toets wordt uitgevoerd in hetzelfde proefveld waarop ook de vegetatief vermeerderde rassen worden getest op resistentie tegen Phytophthora. In alle drie herhalingen worden de TPS-rassen geplant in veldjes die liggen tussen de veldjes van de vegetatief vermeerderde rassen.

Opkweek van de zaailingen

In maart zaait Naktuinbouw de TPS-rassen in de kas. In de tweede helft van mei worden de zaailingen door de NAK in het Phytophthora proefveld geplant.

Standaardrassen

In de Phytophthora proef liggen de volgende standaardrassen: Bintje, Avenra, Eigenheimer, Nicola, Mondial en Markies. Deze standaardrassen dekken de range van vatbaar tot resistent. De standaardrassen worden begin mei gepoot.

Proefopzet

Begin mei wordt de Phytophthoraproef van het CGO aardappelen vegetatief vermeerderde rassen gepoot, waarbij in elke herhaling een gedeelte vrij gelaten wordt voor de zaailingen van de TPS-rassen. Ca. 14 dagen daarna worden in elke herhaling de zaailingen van de vier in onderzoek zijnde TPS-rassen geplant volgens onderstaand overzicht.

Aantal herhalingen: 3

Aantal locaties: 1 (zo mogelijk buiten de belangrijke teeltgebieden)

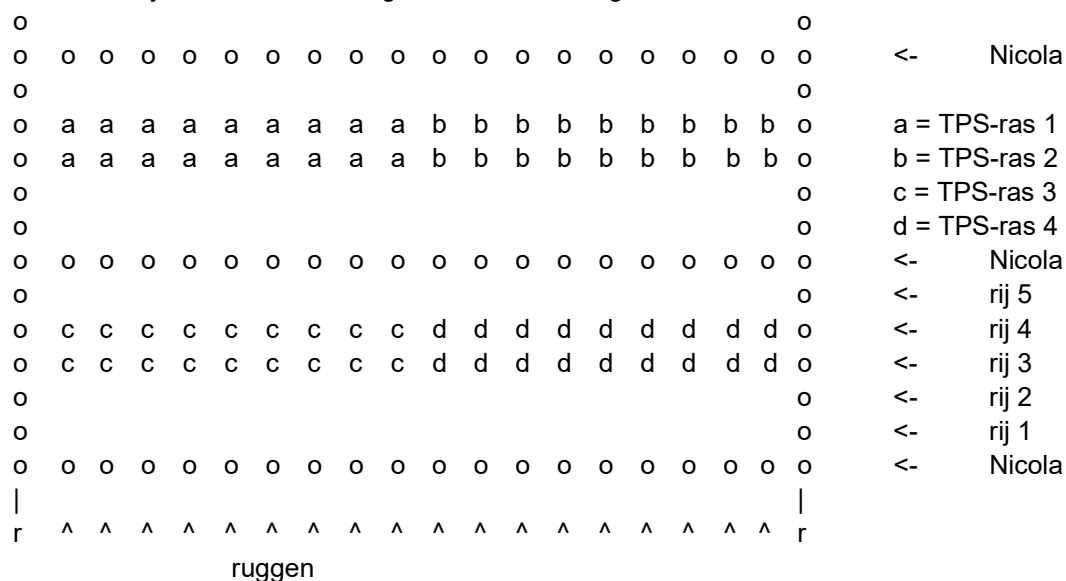
Aantal jaren: minimaal 2 jaar

Aantal planten per veldje met een TPS-ras (per herhaling): 18

Aantal planten per veldje met een standaardras: 6

Het proefveld wordt opgedeeld in banen van 20 ruggen. Op de buitenste twee ruggen van een baan wordt begin mei een laat en matig resistent ras gepoot (r) - bijv. het ras Pimpernel of Irene. Dwars op de ruggen lopen rijen, waarop begin mei iedere zesde rij het matig vatbare ras Nicola gepoot wordt. Nicola is een besmetter waarmee de epidemie geleidelijk wordt opgebouwd. Iedere eerste, tweede en vijfde rij is leeg. Daartussen liggen twee rijen met te toetsen rassen. Een veldje van een TPS-ras bevat 18 planten (9 ruggen breed, 2 planten diep, zie onderstaande figuur).

Overzicht van veldjes met TPS-zaailingen in een herhaling:



Inoculatie

Het hele veld wordt geïnoculeerd met een mengsel van zoösporen en zoösporangien, waarbij de uitgangsdichtheid 15.000 zoösporangien per ml bedraagt. De inoculatie vindt plaats in een gesloten gewas (in juli). Voor inoculatie wordt het gewas (en de bodem) beregend, waarna het inoculum tegen het vallen van de avond wordt verneveld (met constante spuitdruk). Het inoculum is afkomstig van Wageningen University & Research. Er wordt geïnoculeerd met een isolaat van een complex fysio (IPO-complex fysio 1.2.3.4.5.6.7.10.11 isolaat nummer IPO 82001).

Het veld wordt kunstmatig beregend ('s morgens en 's avonds, 3 à 5 keer per uur, afhankelijk van de weersomstandigheden) en zes tot tien keer per seizoen waargenomen met tussenpozen van 3 à 4 dagen.

Waarnemingen:

Het percentage aangetast blad wordt geschat. Bij het waarnemen worden van elk TPS-ras in elke herhaling 3 subveldjes gescoord op Phytophthora-aantasting (6 planten; 3 ruggen breed, 2 planten diep). Indien mocht blijken dat er binnen een veldje duidelijke verschillen bestaan tussen de planten in mate van aantasting door Phytophthora, dan wordt een aanvullende waarneming gedaan door per plant het percentage dood bladoppervlak vast te leggen.

<u>% aangetast bladoppervlak (severity)</u>	<u>Symptomen</u>
0	geen aantasting zichtbaar.
0.01	1 lesie per (sub)veldje.
0.02	2 lesies per veldje.
0.05	5 lesies per veldje.
0.1	6 – 10 lesies per veldje.
0.5	2 – 5 lesies per plant.
1	6 – 10 lesies per plant.
5	tot gemiddeld 20 lesies per plant.
10	10 % bladoppervlak van het veldje is dood. Plant ziet er gezond uit, maar lesies zijn dichterbij gemakkelijk zichtbaar.
25	25 % bladoppervlak van het veldje is dood.
50	50 % bladoppervlak van het veldje is dood.
75	75 % bladoppervlak van het veldje is dood. Veldje lijkt groen met bruine vlekken. Onderste bladlagen zijn dood.
90	90 % bladoppervlak van het veldje is dood. Veldje lijkt bruin-groen. Alleen de topbladeren zijn groen. Stengellesies komen veelvuldig voor.
97.5	97.5 % bladoppervlak van het veldje is dood. Veldje lijkt bruin. Enkele topblaadjes hebben nog groene delen. Stengels hebben veel lesies of zijn al dood.
100	alle bladeren en stengels zijn dood.

Indien mocht blijken dat er binnen een subveldje van een TPS-ras duidelijke verschillen bestaan tussen de planten in mate van aantasting door *Phytophthora*. Dan wordt een aanvullende waarneming gedaan door per plant het percentage dood bladoppervlak vast te leggen.

Het percentage aangetast blad wordt op basis van de score van de standaardrassen d.m.v. lineaire regressie omgerekend naar een score op de schaal van 1 - 9

De *Phytophthora*-gegevens die verkregen worden in veldjes met zaailingen worden vergeleken met de gegevens die verkregen worden in de veldjes met planten die opgegroeid zijn vanuit pootgoed.

Literatuur

Colon, L.T. and D.J. Budding, 1988. Resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in ten wild *Solanum* species. *Euphytica* 37: 77 - 86.

Fry, W.E., 1978. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight. *Phytopathology* 68: 1650 - 1655

4. Bepaling van het glycoalkaloïdgehalte (SGA)

Solanine Glycoalkaloïden (SGA) zijn natuurlijke toxinen die in diverse delen van de aardappelplant voorkomen. Bij aardappelen vormen α -solanine, α -chaconine en β -chaconine samen ongeveer 95 % van het totale glycoalkaloïdgehalte.

Het maximaal toelaatbare gehalte van consumptieaardappelen is met ingang van toelating 2015 gelijk aan het meerjarig gemiddelde gehalte van het ras Innovator.

Opkweek van de zaailingen

In maart zaait Naktuinbouw de TPS-rassen in de kas. In de tweede helft van mei worden door de NAK de zaailingen in de proefvelden geplant.

Standaardrassen

De standaarden voor het SGA-gehalte, Innovator, Diamant en Aventura worden meegenomen in de proeven.

Proefopzet

Er worden twee proefvelden in enkelvoud aangelegd aansluitend aan de SGA-proefvelden waar de vegetatief vermeerderde consumptierassen worden onderzocht, nl. in Tollebeek en in Urk. Op beide locaties bestaat het proefveld bestaat uit twee gedeelten: een gedeelte waarin zaailingen worden geplant en een gedeelte waarin knollen van de standaarden worden gepoot (zie overzichtstekening op volgende pagina).

Begin mei wordt het proefgedeelte met de standaardrassen gepoot. Van elke standaard wordt 1 veldje met 10 planten aangelegd. Ca. half mei wordt het gedeelte met de TPS-rassen geplant.

Elk TPS-ras wordt op 6 veldjes onderzocht. Op elk veldje worden 10 zaailingen geplant.

Factoren die invloed hebben op het SGA-gehalte – zoals droogtestress, structuurproblemen, ziekten en plagen - moeten zoveel mogelijk worden voorkomen. Ruggen moeten goed worden aangeaard; afspoelen van de ruggen – door zware regenval – leidt mogelijk tot groene knollen, waardoor de ruggen terplaatse moeten worden hersteld. Tijdens het seizoen moeten de proeven regelmatig worden gecontroleerd op storende factoren.

Monstername

Van elk veldje wordt een monster van 8 kg (versgewicht) afgerijpte aardappelen (geen groene knollen) genomen, met een maatsortering van 35 mm opwaarts. Aangezien het gehalte toeneemt bij knollen die aan het licht zijn blootgesteld moeten de knollen in het donker worden bewaard door ze direct na het rooien in niet-doorschijnende papieren zakken te verpakken. De monsters moeten (vanwege de kans op rotting bij bewaring) ongewassen worden aangeleverd.

De monsters moeten correct worden gelabeld, op en in de zak. Locatie en rooidatum moeten bij aflevering worden vermeld. Monsters moeten worden bewaard bij 10 à 15 °C (niet lager).

Op beide locaties worden bij de oogst van het veldje Innovator van elke plant 2 knollen apart gehouden. Aan deze twee knollen wordt het SGA-gehalte per plant bepaald.

Bepalingsmethode

De monsters worden afzonderlijk geanalyseerd met een HPLC-methode, zoals beschreven door Houben en Brunt (1994). Het SGA-gehalte wordt vastgesteld in mg per 100 gram versgewicht.

Statistische analyse van de resultaten

Aangezien de variantie van de gemeten SGA-gehalten doorgaans evenredig is met het gemiddelde, moeten de resultaten van de metingen voor de variantie-analyse worden getransformeerd.

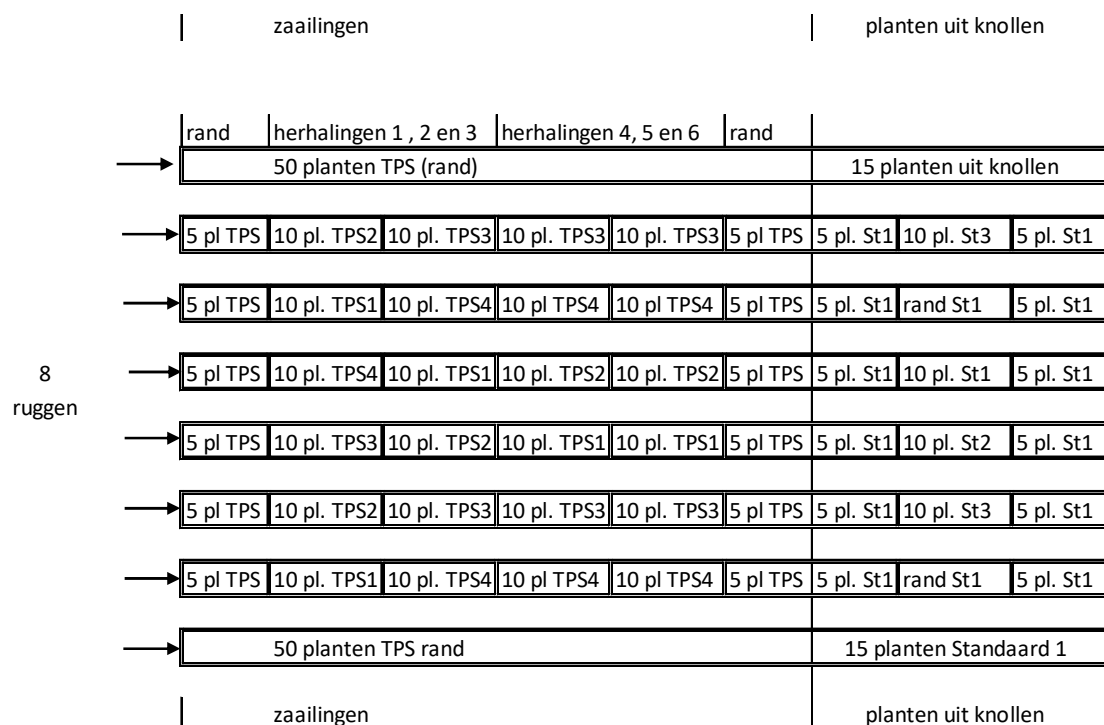
De gegevens worden geanalyseerd op een logaritmische schaal.

De resultaten worden vergeleken met de SGA-gehalten gemeten in de SGA-proef met vegetatief vermeerderde rassen en TPS-rassen geteeld vanuit pootgoed.

Literatuur:

Houben, R.J. and Brunt, K., 1994. Determination of glycoalkaloids in potato tubers by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. of Chromatography A, 661: 169-174.

Overzicht SGA-proef:



4. Toetsing op resistentie tegen aardappel Y^{NTN}

Het Y-virus van aardappelen is een niet-persistent virus dat door bladluizen wordt verspreid. Er zijn verschillende stammen (Y^{NTN}, Y^N, Y^C en Y^O) die niet serologisch van elkaar zijn te onderscheiden, maar wel met een eigen karakteristiek symptoom reageren, dat per ras kan verschillen (bont, krinkel, stippelstreep, etc.).

De resistentie tegen Y^{NTN}-virus wordt getoetst in het veld in een zgn. "buurplanten-infectieproef", een toets waarbij virusvrije planten op natuurlijke wijze (door luizen) worden geïnfecteerd vanuit buurplanten die zijn besmet met een virusstam van bekende herkomst. Door ruimtelijke isolatie van de proef worden introducties van andere stammen voorkomen. Het percentage aangetaste planten wordt serologisch getoetst.

De proeven waarin de zaailingen van TPS-rassen worden onderzocht liggen naast de Y-virusproeven in Tollebeek en Wageningen waarop de vegetatief vermeerderde rassen worden onderzocht. De standaardrassen, de besmetterij en de "pootgoed"-randrijen worden begin mei gepoot. De zaailingen van de TPS-rassen worden ca. half mei geplant.

Opkweek van de zaailingen

In maart zaait Naktuinbouw de TPS-rassen in de kas. In de tweede helft van mei worden de zaailingen in het veld geplant.

Proefopzet:

Complete blokkenproef

Aantal jaren: minimaal 2

Aantal locaties: 1

Aantal herhalingen: 4

Aantal planten per TPS- veldje (per herhaling): 16

Aantal planten per veldje vegetatief vermeerderde standaardrassen: 4

Standaardrassen:

Er worden minimaal 4 standaardrassen opgenomen in de proef: Astarte, Mondial, Martiema en Agria. De standaardrassen dekken zoveel mogelijk de reeks van vatbaar (1) t/m resistent (9).

Pootgoed van de standaardrassen: virusvrij, pootgoedmaat 45 - 55 mm

Besmettingsbron: een tolerant ras (waarop het Y^{NTN}-virus zich voldoende vermeerdert en dat resistent is tegen de overige virussen) besmet met een Y^{NTN}-stam. Het besmettingsmateriaal moet tenminste elke 2 jaar worden vernieuwd, waarbij met een ELISA-toets gecontroleerd wordt op aanwezigheid van de juiste virusstam en afwezigheid van overige virussen.

Per herhaling wordt van elk ras een rijtje van 4 planten uitgepoot, dwars op de ruggen, met aan beide zijden een besmette plant. Plantafstand 40 cm; rugafstand 75 cm.

Het virus wordt op natuurlijke wijze door bladluizen overgebracht.

Overzicht van één herhaling van de Y-virus proef:

* z z z z *	<- rand TPS zaailingen (z)
* a a a a *	<- TPS-ras a
* a a a a *	<- TPS-ras a-
* a a a a *	<- TPS-ras a
* a a a a *	<- TPS-ras a
* b b b b *	<- TPS-ras b
* b b b b *	<- TPS-ras b
* b b b b *	<- TPS-ras b
* b b b b *	<- TPS-ras b
* c c c c *	<- TPS-ras c
* c c c c *	<- TPS-ras c
* c c c c *	<- TPS-ras c
* c c c c *	<- TPS-ras c
* d d d d *	<- TPS-ras d
* d d d d *	<- TPS-ras d
* d d d d *	<- TPS-ras d
* d d d d *	<- TPS-ras d
* z z z z *	<- rand TPS zaailingen (z)
* r r r r *	<- rand planten uit knollen (r)
* e e e e *	<- Standaard-e (uit knollen)
* f f f f *	<- Standaard-f (uit knollen)
* e e e e *	<- Standaard-g (uit knollen)
* f f f f *	<- Standaard-h (uit knollen)
* r r r r *	<- rand planten uit knollen (r)

^ ^ ^ ^ ^ ^ = rugrichting

* = besmetterrij (uit knollen)

Herkomst van proefmateriaal van de standaardrassen

In beide jaren wordt het pootgoed geleverd door de aanvrager. De aanvrager levert virusvrij pootgoed, (S- of SE-waardig). Na opkomst wordt het proefveld gecontroleerd op secundair besmet materiaal. Bij aanwezigheid van secundair besmette planten komen de resultaten van dit ras in hun geheel te vervallen. Bovendien worden deze planten uit de proef verwijderd.

Tijdstip van poten en planten:

Poottijd: de standaardrassen en de besmetterrijen worden begin mei gepoot. Ca. half mei worden de zaailingen geplant.

De proeven krijgen een normale bemesting, onkruidbestrijding, etc. Om de verspreiding van de luizen te bevorderen en voor het screenen van secundair besmette planten wordt vóór het sluiten van het gewas één à twee keer in het seizoen door het proefveld gelopen.

De luizendruk ter plaatse wordt vastgesteld aan de hand van vangbaktellingen.

Oogst:

In september wordt de proef gerooid, op basis van gegevens over luizenvluchten of luisaantasting in het veld. Zware aantastingen moeten worden vermeden. Bij het rooien wordt elke plant afzonderlijk

bemonsterd. Monstergrootte: 3 knollen per plant, van verschillende bovengrondse stengels. Elk veldje wordt apart bemonsterd, d.i. 12 knollen per veldje. In 4 herhalingen; dat betekent 48 knollen per standaardras. Een veldje van een TPS-ras bestaat uit 4 subveldjes van 4 planten. Dit betekent dat van een TPS-ras 192 knollen onderzocht worden op Y-virus. De geogoste knollen worden bij 10 - 15 °C bewaard.

Analyse

Begin januari wordt, na kiemrustbreking (door dompeling gedurende 20 minuten in Gibberelline - 2 ppm), van elke knol een oogstek (bij voorkeur de topspruit) uitgepoot in de kas. Ongeveer 6 weken na potten wordt elke plant afzonderlijk onderzocht op het voorkomen van Y^{NTN}-virus d.m.v. ELISA op basis van een polykloonaal antiserum (Clark and Adams, 1977), uitgevoerd volgens de handleiding van de NAK (ELISA versie 1993 - 1). De rassen worden per herhaling geanalyseerd.

Resultaat

Het aantal positieve reacties t.o.v. het totale aantal getoetste knollen per veldje (d.i. het % aangetaste knollen per veldje). Het percentage aangetaste knollen wordt op basis van de score van de standaardrassen d.m.v. lineaire regressie omgerekend naar een score op de schaal van 1 - 9

Literatuur

Clark, M.F. and Adams, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475 - 483.

NAK, 1993. Elisa handleiding versie 1993 - 1.

Bijlage 2 Contactgegevens

Raad voor plantenrassen / Naktuinbouw

Postbus 40
2370 AA Roelofarendsveen

Bezoekadres:
Sotaweg 22
2371 GD Roelofarendsveen

L.vd.brink@naktuinbouw.nl
www.naktuinbouw.nl
www.raadvoorplantenrassen.nl

NAK.

Postbus 1115
8300 BC Emmeloord

Bezoekadres kantoor:
Randweg 14
Emmeloord

Proefbedrijf:
Johannes Postweg 1
Tollebeek

www.nak.nl
k.boons@nak.nl