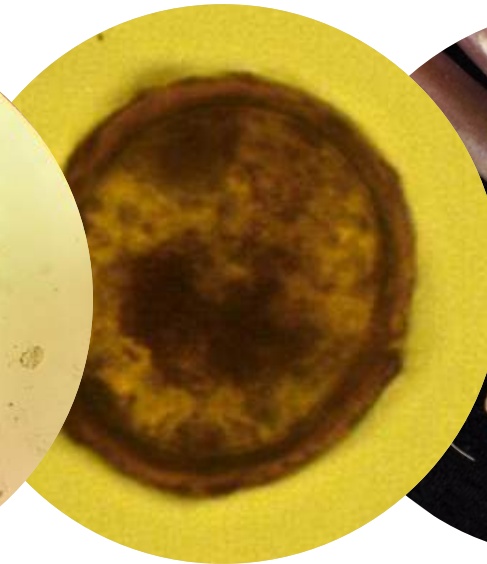
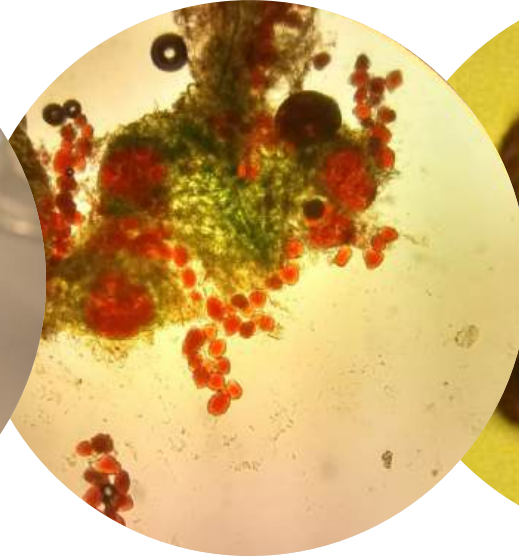


Reducing the vitality of Potato wart disease

Theo van der Lee, Marga van Gent-Pelzer



Synchytrium endobioticum

- Soil-borne, obligate parasitic fungus on potato
- Causal agent of potato wart disease
- Induces wart formation upon infection of susceptible potato cultivars
- Production of robust resting spores
- Regarded as the most important quarantine disease on cultivated potato
- World-wide quarantine status
- Added to the USA bioterrorism list for plant pathogens in 2002



Image: Patricia Rijswick

Reviewed in van de Vossenbergh, B.T.L.H., Prodhomme, C., Vossen, J.H. & van de Lee, T.A.J. (2022) *Synchytrium endobioticum*, the potato wart disease pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 23, 461– 474. <https://doi.org/10.1111/mpp.13183>

ASD, enzyme en ECP

- 4 partijen inoculum
- 4 herhalingen
- Niet behandeld positieve controle
- Geautoclaveerd als negatieve controle
- ASD
 - 3 grondsoorten
 - Met/zonder Herbie
 - Met/zonder deksel
 - PCN als controle op ASD
- Laccase
- ECP



Protocol uitgevoerd bij HLB 07 12 2023

50 ml buis met droge compost vullen > 60gr

60 gr compost in flask



Met 100ml 10% Laccase
1 uur bij 60°C in waterbad
Elke 15 min schudden

2 flasks per keer in waterbad

30 gr compost in flask 2x



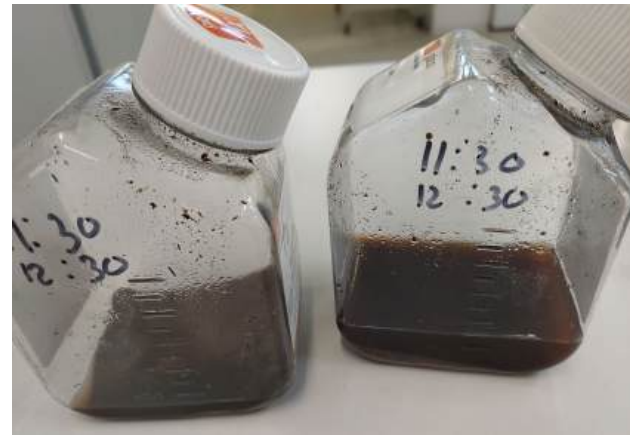
Met 100ml 1% EcoClearProxy
2 uur bij kamer temp $\approx 19^{\circ}\text{C}$ zonder dop

Elke 15 min schudden met dop erop





Na incubatie



Laccase afgieten

Behandeld compost overgieten in kous, wassen met een liter water



Start Spieckerman met composten uit emmerproef 07 12 2023

Innoculatie 25-30 gram op 27 oogstukjes



Behandeling oogstukjes



Oogstukje met water besproeien voor en na strooien

Methoden



23 jan 2024: per compost 17 bakken

Methoden

Biotoets

27 oogstukjes voor iedere combinatie



Resultaten P6 bak 1 emmer 9 dekzand geen deksel



Resultaten score biotoets

							Compost1 = compost compost4										vatbare reacties									
potnr	grondsoort	OS	deksel	Opm	Uithalen	Opm	potnr	bak	P1	P1	P2	P6		rot	0	-	P	F	R	1	2	3	4	5	10	
1	dekzand	Herbie	deksel		19 09 2023		1	1	voor												2	4	1		3	
5	dekzand	geen OS	deksel		19 09 2023		5	1	midden												3	2	2	4	2	
9	dekzand	geen OS	geen deksel		19 09 20	nat	9	1	achter																	
13	compost-Aveb	Herbie	deksel		19 09 2023		13	2	voor																	
17	compost-Aveb	geen OS	deksel		19 09 2023		17	2	midden																	
21	compost-Aveb	geen OS	geen deksel		19 09 20	nat	21	2	achter																	
25	grond-Cosun	Herbie	deksel		19 09 2023		25	3	voor													2		2	1	
29	grond-Cosun	geen OS	deksel		19 09 2023		29	3	midden												4	1	1			
33	grond-Cosun	geen OS	geen deksel		19 09 20	nat	33	3	achter																	
37	onbehandeld	isolaat					37	4	voor												1	2				
41	afgedood						41	4	midden																	
45	beh 1 WUR						45	4	achter																	
49	beh 2 WUR						49	5	voor												2				1	

								Compost1 = compost compost compost4											vatbare reacties							
potnr	grondsoort	OS	deksel	Opm	Uithalen	Opm	potnr	bak	P1	P1	P2	P6		rot	0	-	P	F	R	1	2	3	4	5	10	
1	dekzand	Herbie	deksel		19 09 2023		1	1	voor											1	5				4	
5	dekzand	geen OS	deksel		19 09 2023		5	1	midden												2	1	1		1	
9	dekzand	geen OS	geen deksel		19 09 20	nat	9	1	achter																	
13	compost-Aveb	Herbie	deksel		19 09 2023		13	2	voor																	
17	compost-Aveb	geen OS	deksel		19 09 2023		17	2	midden																	
21	compost-Aveb	geen OS	geen deksel		19 09 20	nat	21	2	achter																	
25	grond-Cosun	Herbie	deksel		19 09 2023		25	3	voor																1	
29	grond-Cosun	geen OS	deksel		19 09 2023		29	3	midden												2	1				
33	grond-Cosun	geen OS	geen deksel		19 09 20	nat	33	3	achter																	
37	onbehandeld isolaat						37	4	voor												2	1				
41	afgedood						41	4	midden																	
45	beh 1 WUR						45	4	achter																	
49	beh 2 WUR						49	5	voor																	

Wrat grootte meegenomen in score

Start 7 december ingezet,
februari 2024
eindbeoordeling

Analyse eindbeoordeling

					vatbare reacties						
rot	0	-	P	F	R	1	2	3	4	5	10

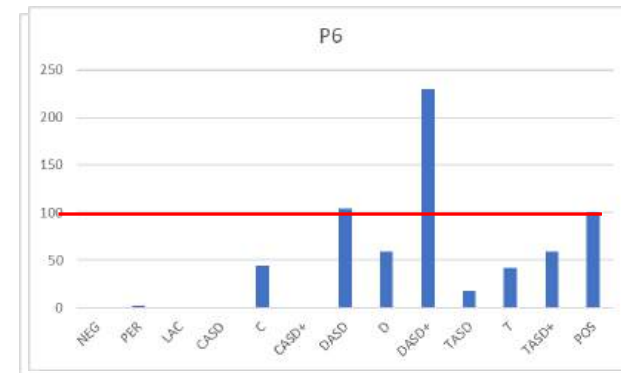
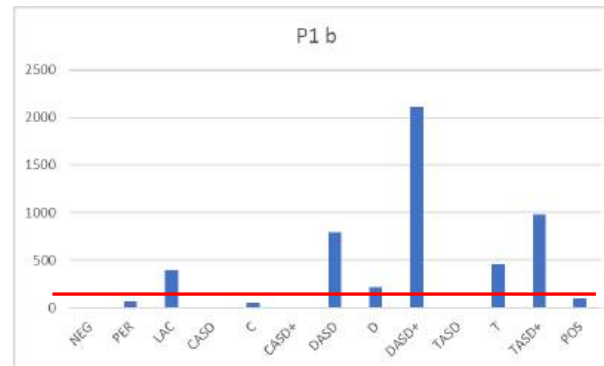
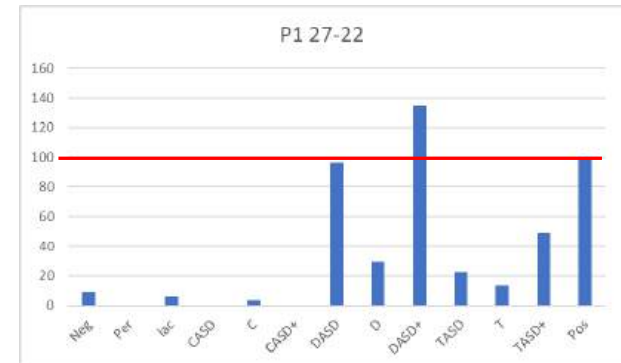
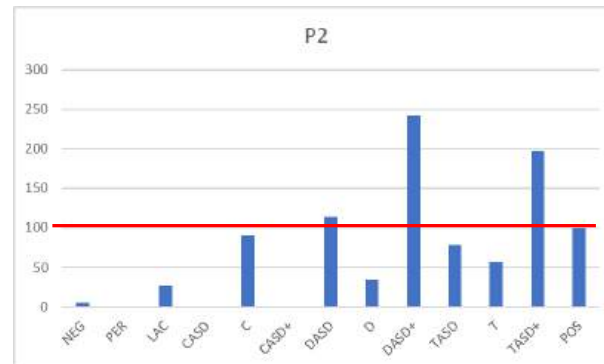
Gemiddeld per blokje
(meestal 27 soms 1 of 2
minder)

Cat 2,3,4,5,10
meegenomen

Per wrat vermenigvuldigd
met de grootte

Dus $2 \times 10 + 3 \times 3 = 29/27 = 1.07$

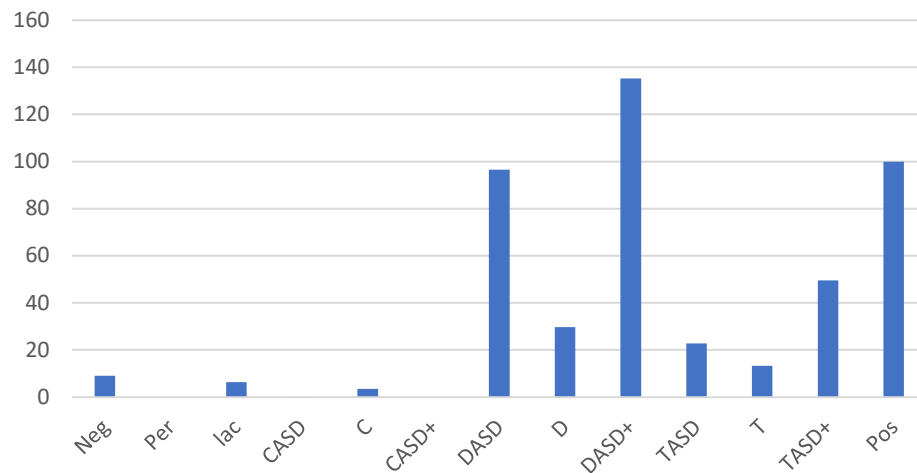
Vervolgens vergeleken
met de vatbare controle
=100%



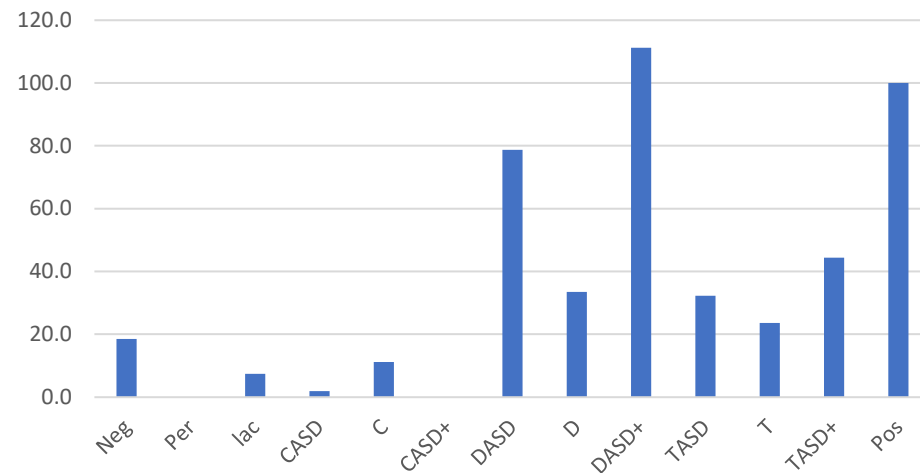
Twee belangrijke grenswaarden
100%
10%

Wrat grootte versus aantal wratten

P1 27-22 weighted



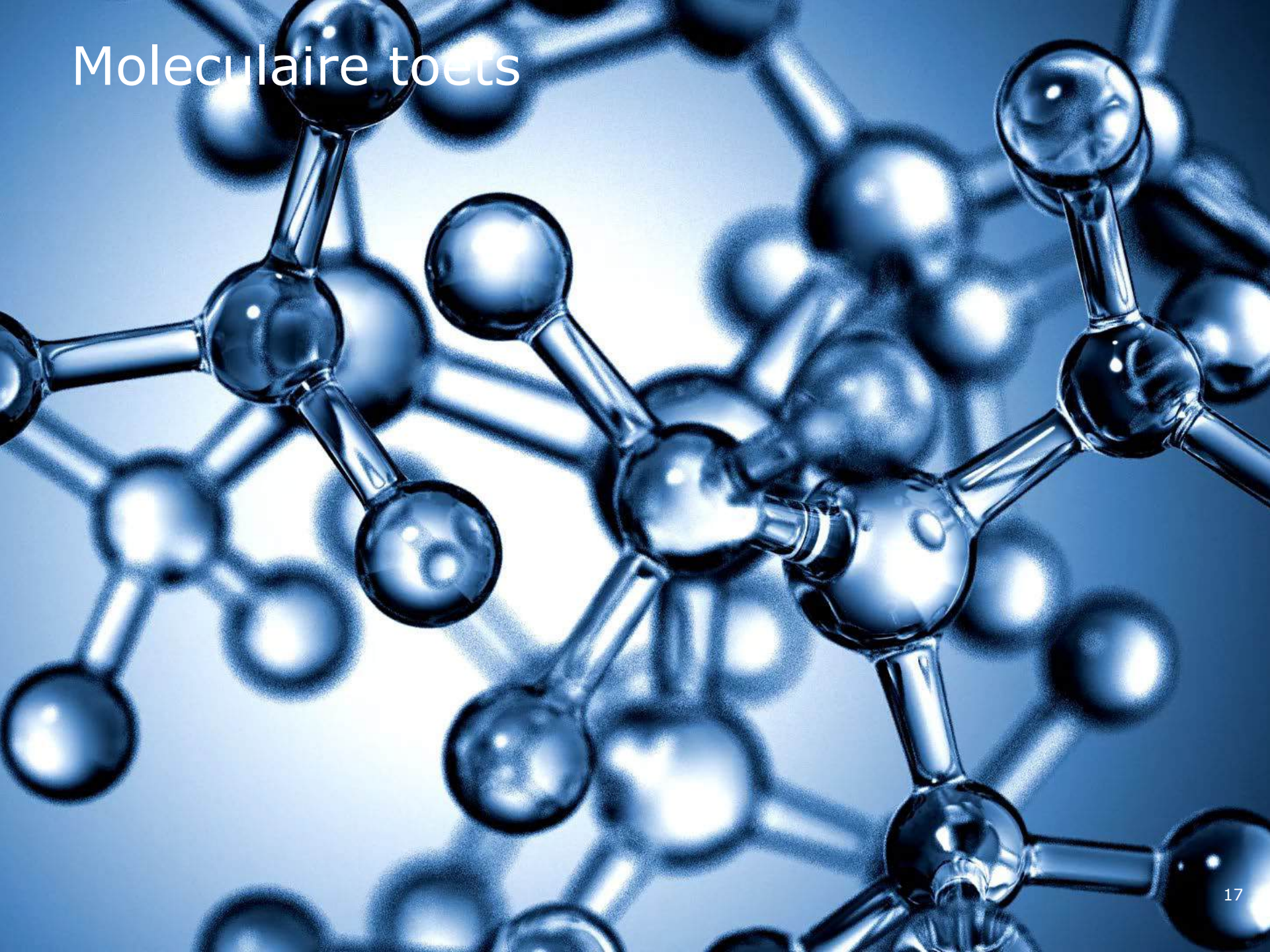
P1 27-22 incidence



Conclusies afdoding met biotoets

- Goede infectie in positieve controle
- Geen infectie in negatieve control
- Reproduceerbare effecten behandelingen
- Geen wratvorming bij Laccase en ECP behandeling <10%
- Geen effect ASD, mogelijk wel effect van compost

Moleculaire toets

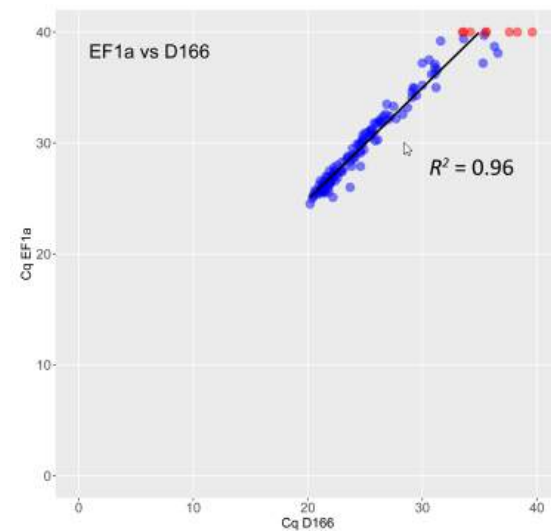
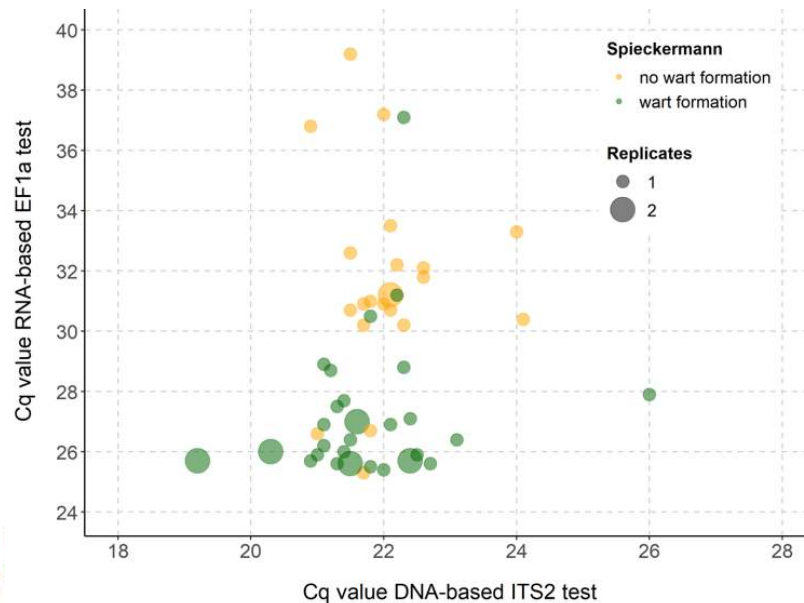
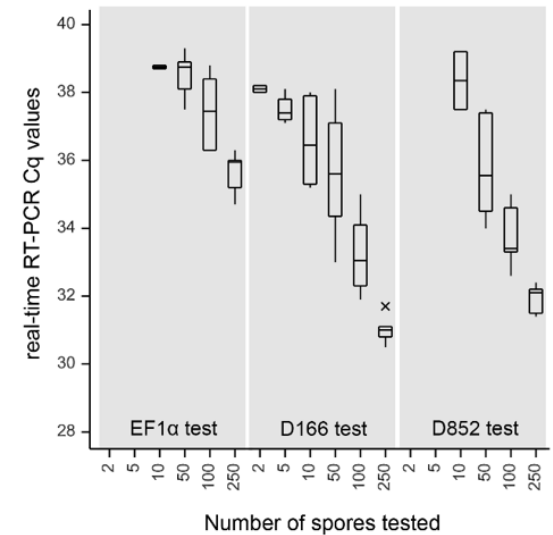
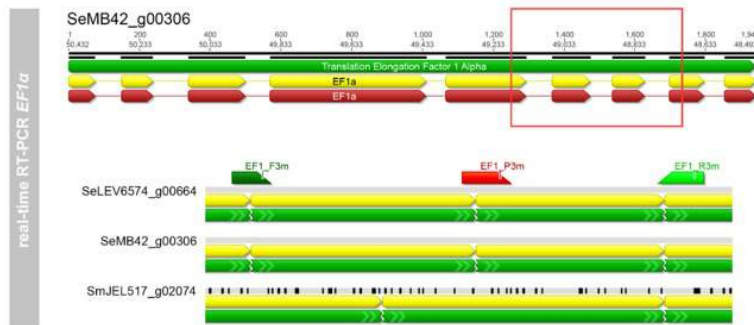


Dead or Alive, that is the question: development and validation of molecular

Synchytrium endobioticum viability tests

Bart T.L.H. van de Vossen^{1*}, Donna Smith², Marga van Gent³, Marlies van den Berg¹, Marcel Govaert¹, Carin

M. Helder¹, Theo van der Lee³

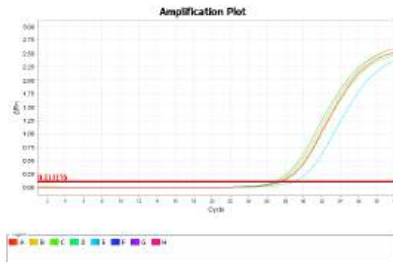


5-Figure 1. Correlation of Cq values from the EF1α and D166 tests. Values were obtained with RNA extracted

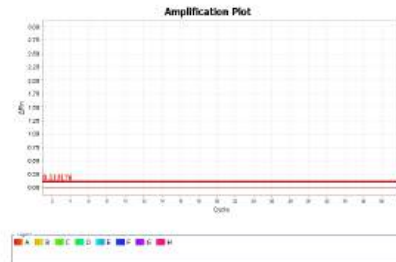


Molecular vitaliteits test; verschil vitaliteit en infectieus

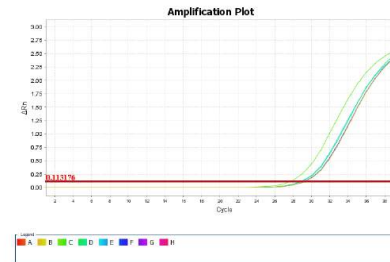
P1 27-22



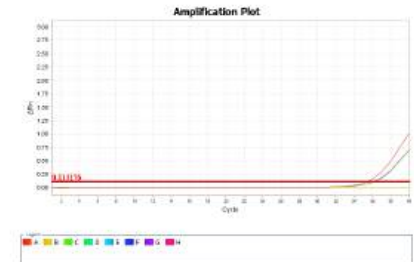
Autoclaved



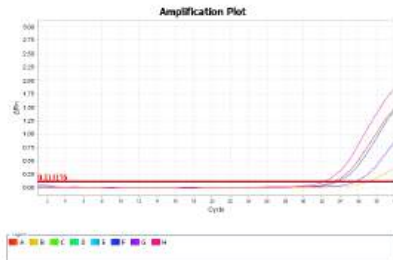
ECP



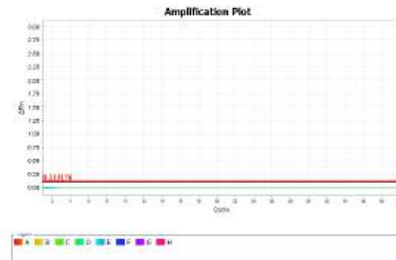
Laccase



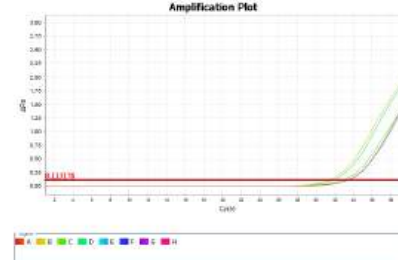
P1 25-19b



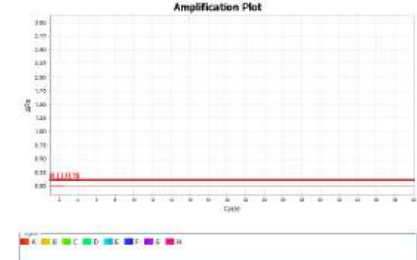
Autoclaved



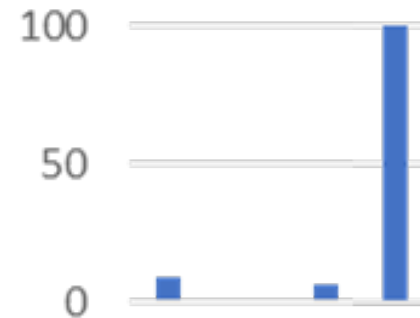
ECP



Laccase



TNA EF3m taqman 21-03-2024 PK



P1 27-22 met controles en behandelingen

4 biologische herhalingen

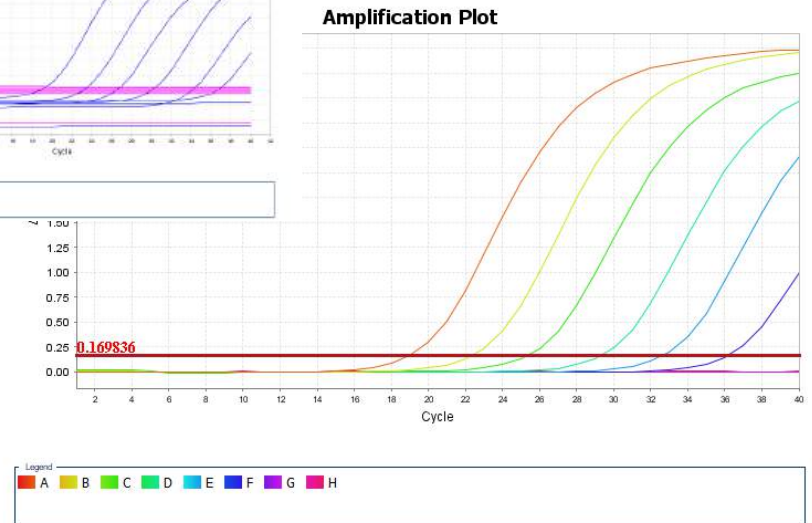
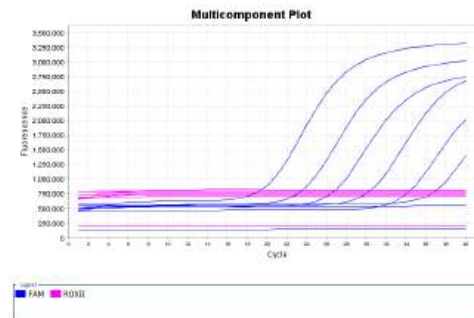
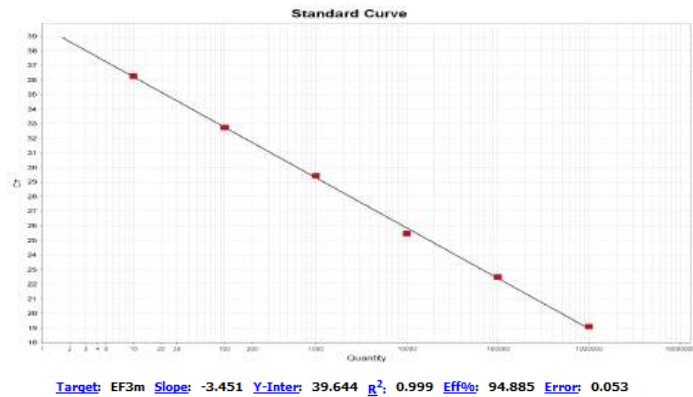
5 sampling en methode herhalingen

Totaal 20 herhalingen

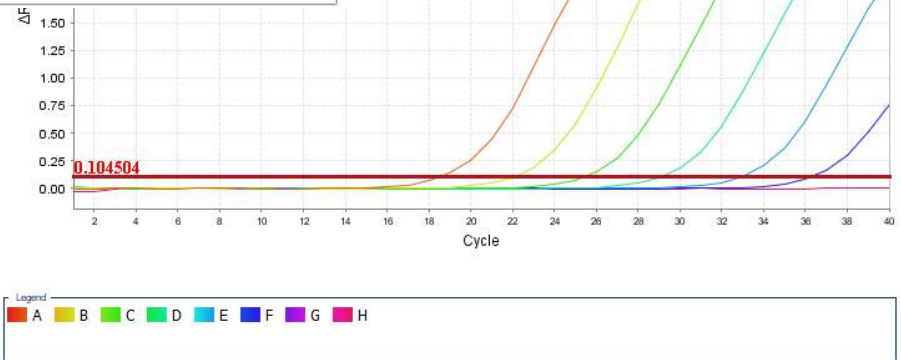
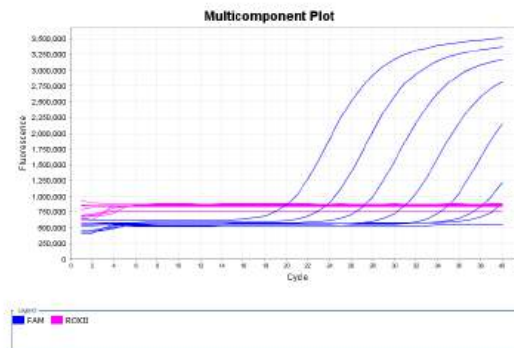
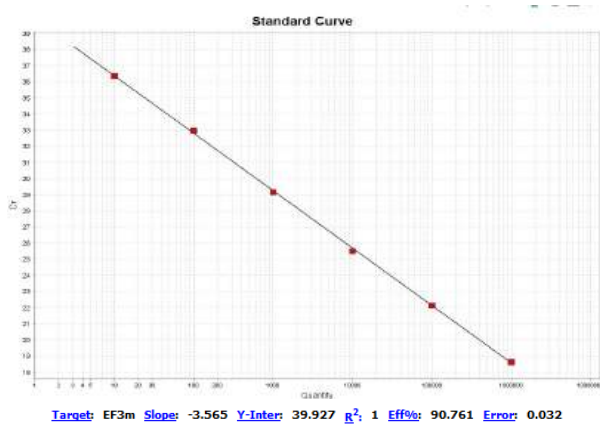
potnr	grondsoort	OS	deksel
1	dekzand	Herbie	deksel
2	dekzand	Herbie	deksel
3	dekzand	Herbie	deksel
4	dekzand	Herbie	deksel
5	dekzand	geen OS	deksel
6	dekzand	geen OS	deksel
7	dekzand	geen OS	deksel
8	dekzand	geen OS	deksel
9	dekzand	geen OS	geen deksel
10	dekzand	geen OS	geen deksel
11	dekzand	geen OS	geen deksel
12	dekzand	geen OS	geen deksel
13	compost-Avebe	Herbie	deksel
14	compost-Avebe	Herbie	deksel
15	compost-Avebe	Herbie	deksel
16	compost-Avebe	Herbie	deksel
17	compost-Avebe	geen OS	deksel
18	compost-Avebe	geen OS	deksel
19	compost-Avebe	geen OS	deksel
20	compost-Avebe	geen OS	deksel
21	compost-Avebe	geen OS	geen deksel
22	compost-Avebe	geen OS	geen deksel
23	compost-Avebe	geen OS	geen deksel
24	compost-Avebe	geen OS	geen deksel
25	grond-Cosun	Herbie	deksel
26	grond-Cosun	Herbie	deksel
27	grond-Cosun	Herbie	deksel
28	grond-Cosun	Herbie	deksel
29	grond-Cosun	geen OS	deksel
30	grond-Cosun	geen OS	deksel
31	grond-Cosun	geen OS	deksel
32	grond-Cosun	geen OS	deksel
33	grond-Cosun	geen OS	geen deksel
34	grond-Cosun	geen OS	geen deksel
35	grond-Cosun	geen OS	geen deksel
36	grond-Cosun	geen OS	geen deksel

37	onbehandeld isolaat
38	onbehandeld isolaat
39	onbehandeld isolaat
40	onbehandeld isolaat
41	afgedood
42	afgedood
43	afgedood
44	afgedood
45	beh 1 WUR ECP
46	beh 1 WUR
47	beh 1 WUR
48	beh 1 WUR
49	beh 2 WUR Laccase
50	beh 2 WUR
51	beh 2 WUR
52	beh 2 WUR

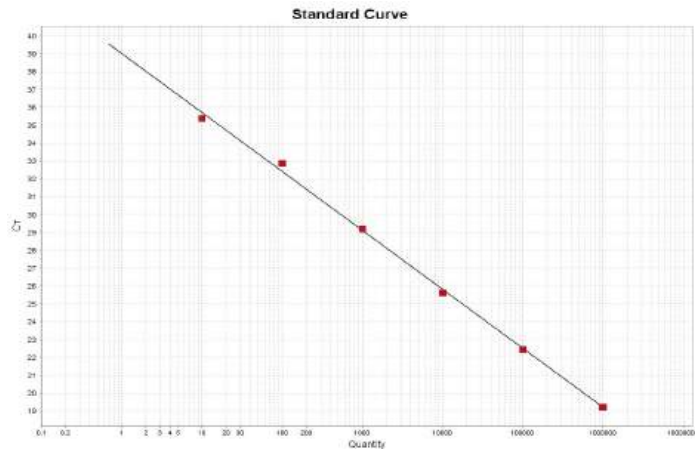
Standaard curve EF3m plate 1



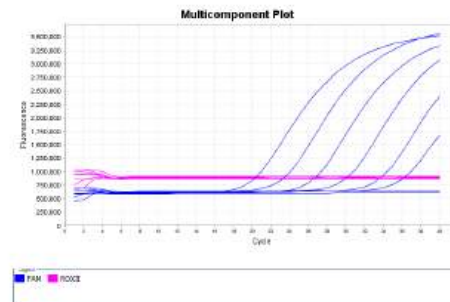
Standaard curve EF3m plate 2



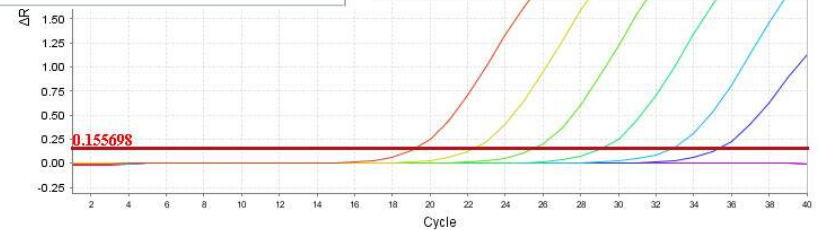
Standaard curve EF3m plate 3



Target: EF3m Slope: -3.303 Y-Inter: 39.006 R^2 : 0.998 Eff%: 100.804 Error: 0.072



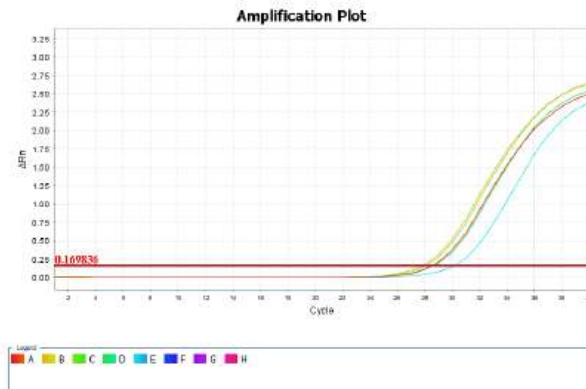
ification Plot



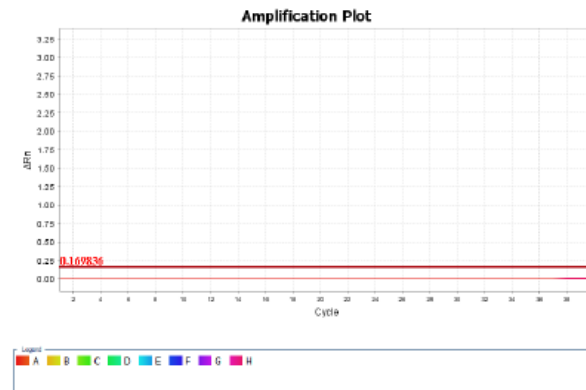
Legend
A B C D E F G H

Controls

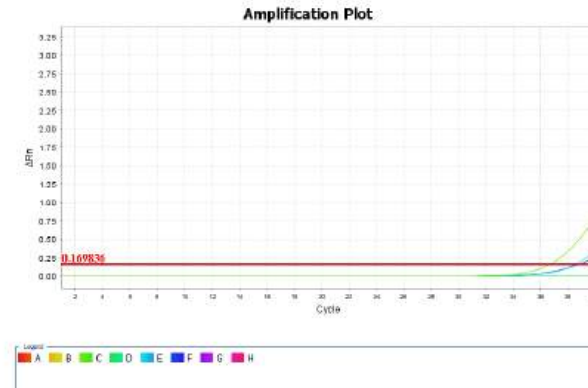
Ref P1 27-22



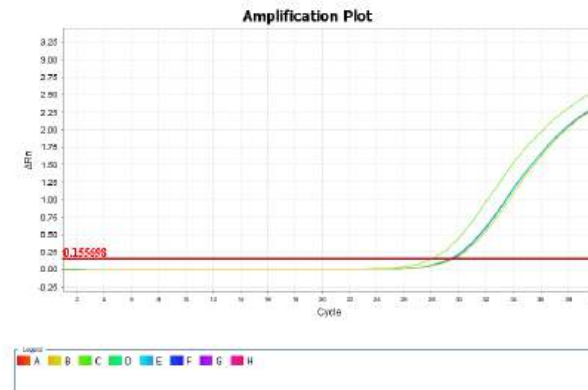
Autoclaved



Laccase

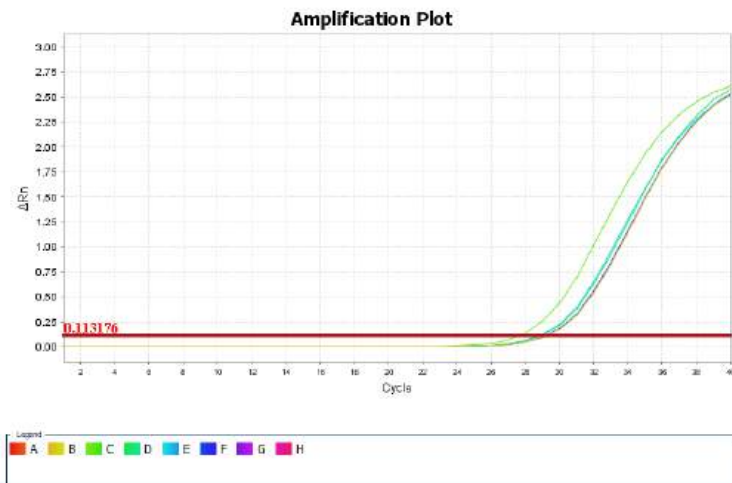


ECP (oudere extractie)

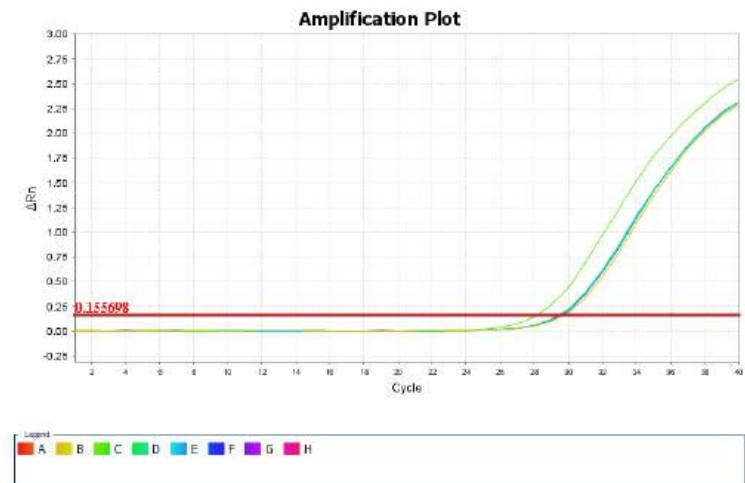


Herhaalbaarheid

ECP, taqman: **21-03-2024**
Extractie: 06-03-2024



ECP, taqman: **06-06-2024**
Extractie: 06-03-2024



Conclusie moleculaire toets

- Positieve controle lage Ct waarde <30
- Negatieve controle hoge Ct waarde >40
- Goed reproduceerbaar
- Duidelijke effecten; autoclaaf, enzyme, compost
- Geen effect ASD, ECP, behandelingen hebben wel effect op de spreiding

Eindconclusies afdodings-experimenten

- De controles zijn goed (positief/negatieve controles)
- De resultaten zijn reproduceerbaar met voldoende herhalingen
- Resultaten zijn consistent over de verschillende vitaliteits bepalingen
- ASD is niet effectief (met de gekozen proefopzet/termijn)
- Verschil in vitaliteit en infectieus
- Sporen lijken wel in vitaliteit te kunnen veranderen
- Afdoding sporen mogelijk door autoclaveren, Laccase, niet door peroxide of ASD
- Peroxide behandeling beïnvloed de wratvorming

Verdere vragen afdodings-experimenten

- Er lijkt wel meer dynamiek in de vitaliteit te zitten
- Waar komt het effect van de compost vandaan?
- Is dit mogelijk een buffer voor de infectie druk?
- Waarom heeft de peroxide behandeling een negatief effect op de wratvorming?
- Waarom heeft de ASD behandeling een positief effect op de wratvorming?
- Kunnen we door toevoegingen de vitaliteit veranderen?
- Wat zijn de langere termijn effecten (5 jaar)



Acknowledgements

Collaborations

Biointeractions

Priscilla Kok
Marc Hendriks
Olaf Hartsema
Andre Ramaker
Marga van Gent-Pelzer
Bart Fraaije
Theo van der Lee

Plant Breeding

Herman v Eck
Charlotte Prodhomme
Jack Vossen
Dong Zhang
Richard Visser

NPPO

Bart van de Vossenbergh
Gerard van Leeuwen
Frans Jansen
Hanne Glas
Saskia Bosman
Sietse van der Linde

LVN

Tjeerd Snoeren
Cédric Heijdens

IHAR

Jarek Przetakiewicz

Canada

CFIA
AAFC
Hay Nguyen



partners

HZPC
Averis Seeds
C. Meijer BV
Saka Pflanzenzucht
GmbH & Co
BNA GmbH & Co
Danespo
Teagasc
HLB BV

LVN
TKI T&U

- van de Vossen, B.T.L.H., Prodhomme, C., Vossen, J.H. & van de Lee, T.A.J. (2022) *Synchytrium endobioticum*, the potato wart disease pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 23, 461– 474. <https://doi.org/10.1111/mpp.13183>
- van de Vossen, B. T. L. H., van de Lee, T. A. J., Nguyen, H. D. T. (2019), The 2019 Potato Wart Disease workshop: shared needs and future research directions. *EPPO Bulletin*, 50: 170– 176. <https://doi.org/10.1111/epp.12638>
- [The *Synchytrium endobioticum* AvrSen1 Triggers a Hypersensitive Response in *Sen1* Potatoes While Natural Variants Evade Detection](#) Bart T. L. H. van de Vossen, Charlotte Prodhomme, Gert van Arkel, Marga P. E. van Gent-Pelzer, Marjan Bergervoet, Balázs Brankovics, Jarosław Przetakiewicz, Richard G. F. Visser, Theo A. J. van der Lee, and Jack H. Vossen *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 2019 32:11, 1536-1546 <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-19-0138-R>
- [An Alternative Bioassay for *Synchytrium endobioticum* Demonstrates the Expression of Potato Wart Resistance in Aboveground Plant Parts](#) B. T. L. H. van de Vossen, M. P. E. van Gent-Pelzer, M. Boerma, L. P. van der Gouw, T. A. J. van der Lee, and J. H. Vossen *Phytopathology*® 2019 109:6, 1043-1052 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-19-0024-R>
- van de Vossen, B.T.L.H., Warris, S., Nguyen, H.D.T. *et al.* Comparative genomics of chytrid fungi reveal insights into the obligate biotrophic and pathogenic lifestyle of *Synchytrium endobioticum*. *Sci Rep* **9**, 8672 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45128-9>
- van de Vossen, B.T.L.H., Brankovics, B., Nguyen, H.D.T. *et al.* The linear mitochondrial genome of the quarantine chytrid *Synchytrium endobioticum*; insights into the evolution and recent history of an obligate biotrophic plant pathogen. *BMC Evol Biol* **18**, 136 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1246-6>
- Nguyen, H., van de Vossen, B., van der Lee, T., Joly, D., Smith, D., van Gent-Pelzer, M., ... & Levesque, C. (2016, December). Genome sequencing of *Synchytrium endobioticum* offers insight into its carbohydrate degrading enzymes and effectors. In *PHYTOPATHOLOGY* (Vol. 106, No. 12, pp. 34-34). 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121 USA: AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC.
- [Development of Polymorphic Microsatellite Loci for Potato Wart from Next-Generation Sequence Data](#) Marie-Claude Gagnon, Theo A. J. van der Lee, Peter J. M. Bonants, Donna S. Smith, Xiang Li, C. André Lévesque, and Guillaume J. Bilodeau *Phytopathology*® 2016 106:6, 636-644
- Bonants, P.J.M., van Gent-Pelzer, M.P.E., van Leeuwen, G.C.M. *et al.* A real-time TaqMan PCR assay to discriminate between pathotype 1 (D1) and non-pathotype 1 (D1) isolates of *Synchytrium endobioticum* . *Eur J Plant Pathol* **143**, 495–506 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0702-z>