



**HAL**  
open science

## CaLiso – Detection and epidemiology of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ transmitted to seeds and associated with vegetative disorders in Apiaceae and Solanaceae.

Marianne Loiseau, J Gombert, Anne-Claire Le Roux, Nicolas Sauvion, Isabelle Renaudin, A Forveille, Benjamin Coussy, E. Morel, L. Berton, F. Villeneuve, et al.

### ► To cite this version:

Marianne Loiseau, J Gombert, Anne-Claire Le Roux, Nicolas Sauvion, Isabelle Renaudin, et al.. CaLiso – Detection and epidemiology of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ transmitted to seeds and associated with vegetative disorders in Apiaceae and Solanaceae.. Innovations Agronomiques, 2021, 84, pp.226-237. 10.15454/3q0s-sx52 . hal-03641806

**HAL Id: hal-03641806**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03641806v1>**

Submitted on 14 Apr 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

**CaLiso – Détection et épidémiologie de ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’, bactérie transmissible à la semence et responsable de désordres végétatifs sur apiacées et solanacées.**

**Loiseau M.<sup>1</sup>, Gombert J.<sup>2</sup>, Le Roux A.-C.<sup>3</sup>, Sauvion N.<sup>4</sup>, Renaudin I.<sup>1</sup>, Forveille A.<sup>1</sup>, Coussy B.<sup>2</sup>, Morel E.<sup>2</sup>, Berton L.<sup>3</sup>, Villeneuve F.<sup>5</sup>, Ouvrard D.<sup>6,8</sup>, Samson-Kermarrec F.<sup>7</sup>, Laurent E.<sup>2</sup>, Poliakov F.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ANSES-LSV-UBVO, 7 rue Jean Dixmèras, F-49044 Angers

<sup>2</sup> FNAMS, Impasse du verger, Brain sur l'Authion, F-49800 Loire-Authion

<sup>3</sup> FN3PT, INRAE - UMR 1349 IGEPP, Domaine de La Motte BP 35327, F-35653 Le Rheu Cedex

<sup>4</sup> INRAE UMR BGPI, Equipe Epidémiologie Végétal, Campus de Baillarguet, F-34398 Montferrier-sur-Lez

<sup>5</sup> CTIFL, Centre opérationnel de Lanxade, 28 route des Nébouts, F-24130 Prignonieux

<sup>6</sup> Natural History Museum, Dept of Life Sciences - Insects Division, Cromwell Road, SW7 5BD London, United Kingdom.

<sup>7</sup> UFS, 17 rue du Louvre, F-75001 Paris

<sup>8</sup> ANSES-LSV, Unité entomologie et plantes invasives, 755 avenue du campus Agropolis, CS 30016, F-34988 Montferrier-sur-Lez Cedex

**Correspondance :** [marianne.loiseau@anses.fr](mailto:marianne.loiseau@anses.fr)

## Résumé

‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ (Lso) est la bactérie du phloème responsable de la maladie du « Zebra Chip » aux USA. En France, elle a été signalée pour la première fois en 2012 sur carotte porte-graine. Le projet CaLiso a permis de valider une méthode de détection de Lso et donc de fiabiliser la qualité sanitaire des semences de carotte et de garantir celle des plants de pomme de terre. En France, les prospections à grande échelle montrent que les haplotypes LsoD et LsoE sont présents dans la majorité des zones de productions d’apiacées et que *Bactericera trigonica* est la principale espèce de psylles présente sur ces cultures. Ce psylle constitue probablement le principal vecteur de Lso en France. De plus, Lso n’a pas été détectée sur pommes de terre, notamment celles produites à proximité de cultures d’apiacées, ce qui souligne le très faible risque de transmission de Lso de la carotte vers la pomme de terre. Les études menées ont permis de mieux connaître ce pathosystème. Lso ne semble pas émergente sur apiacées en France mais pourrait l’être sur solanacées (haplotypes A et B) en cas d’introduction du psylle de la pomme de terre, *B. cockerelli*, en Europe.

**Mots-clés :** ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’, Apiacées, Solanacées, Carotte, Psylles

**Abstract: CaLiso – Detection and epidemiology of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ transmitted to seeds and associated with vegetative disorders in Apiaceae and Solanaceae.**

‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ (Lso) is the phloem bacterium responsible for the "Zebra Chip" disease in the USA. In France, it was reported for the first time in 2012 on seed carrots. The CaLiso project validated a Lso detection method and thus made the health quality of carrot seeds reliable and guaranteed the same reliability for potato plants. In France, our large-scale surveys show that the LsoD and LsoE haplotypes are present in the majority of Apiaceae production areas, and that *Bactericera trigonica* is the main psyllid species present on these crops. This psyllid is probably the main vector of Lso in France. In addition, Lso was not detected on potatoes, especially those produced near Apiaceae crops, which underlines the very low risk of Lso transmission from carrots to potatoes. The studies carried

out improved our knowledge of this pathosystem. Lso does not seem to be emerging on Apiaceae in France. The major threat for Solanaceae would probably be an introduction of the potato psyllid, *B. cockerelli*, in Europe.

**Keywords:** 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*', Apiaceae, Solanaceae, Carrot, Psyllids

## 1. 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' : contexte en 2014

'Candidatus *Liberibacter solanacearum*' (Lso) est une bactérie du phloème, gram négative, restreinte au phloème des plantes hôtes et à l'hémolymphe des insectes vecteurs. Elle est décrite pour la première fois en 2006 aux Etats-Unis et en Nouvelle-Zélande sur cultures de solanacées et en Europe, en 2010, sur carottes (Liefing *et al.*, 2009 ; Munyaneza *et al.*, 2010). Sur pomme de terre, elle provoque la maladie du « Zebra Chip » qui rend non commercialisable les pommes de terre produites. Différents haplotypes de la bactérie ont été décrits sur la base de polymorphisme nucléotidique simple (SNP) sur l'ADN ribosomique 16S, l'intergène 16S/23S et les gènes de protéines ribosomales 50S *rplJ* et *rplL* (Nelson *et al.*, 2011). Aux Etats-Unis et en Amérique centrale, les haplotypes A et B infectent les plantes de la famille des solanacées dont la pomme de terre, la tomate, le poivron et sont transmis par le psylle de la pomme de terre, *Bactericera cockerelli* (Secor *et al.*, 2009). L'haplotype A a été introduit en Nouvelle-Zélande par des psylles infectés (Gill, 2006). En Europe, Lso est signalée sur cultures de carottes et sur céleri (Munyaneza *et al.*, 2010; Teresani *et al.*, 2014). Les haplotypes présents sont différents des haplotypes sur solanacées. L'haplotype C est détecté dans les pays scandinaves et est associé au psylle de la carotte, *Trioza apicalis* (Munyaneza *et al.*, 2010). En Espagne, les haplotypes D et E sont décrits sur carotte et céleri et sont associés au psylle *Bactericera trigonica* (Teresani *et al.*, 2014). En Europe, à partir de 2012, l'OEPP a recommandé à ses membres de réglementer les haplotypes solanacées (A et B) ainsi que *B. cockerelli* et les a placés sur la liste A1 (absent du territoire) (EPPO, 2012).

En France, Lso est signalée pour la première fois en 2012 sur des cultures de carotte porte-graine dans la région Centre (Loiseau *et al.*, 2014).

Sur solanacées, la bactérie provoque ainsi des pertes de millions de dollars en Amérique du Nord et en Nouvelle-Zélande (Soliman *et al.*, 2013). L'impact économique est lié à plusieurs facteurs : la réduction des rendements et de la qualité des produits, la reprise coûteuse des luttes insecticides, les problèmes à l'exportation. Sur apiacées, l'impact réel reste à établir. Les secteurs français de production d'apiacées et de solanacées pouvant être touchés par cette bactérie sont considérés comme stratégiques, en particulier les cultures de semences de carotte et de plants de pomme de terre.

## 2. Le projet CASDAR CaLiso

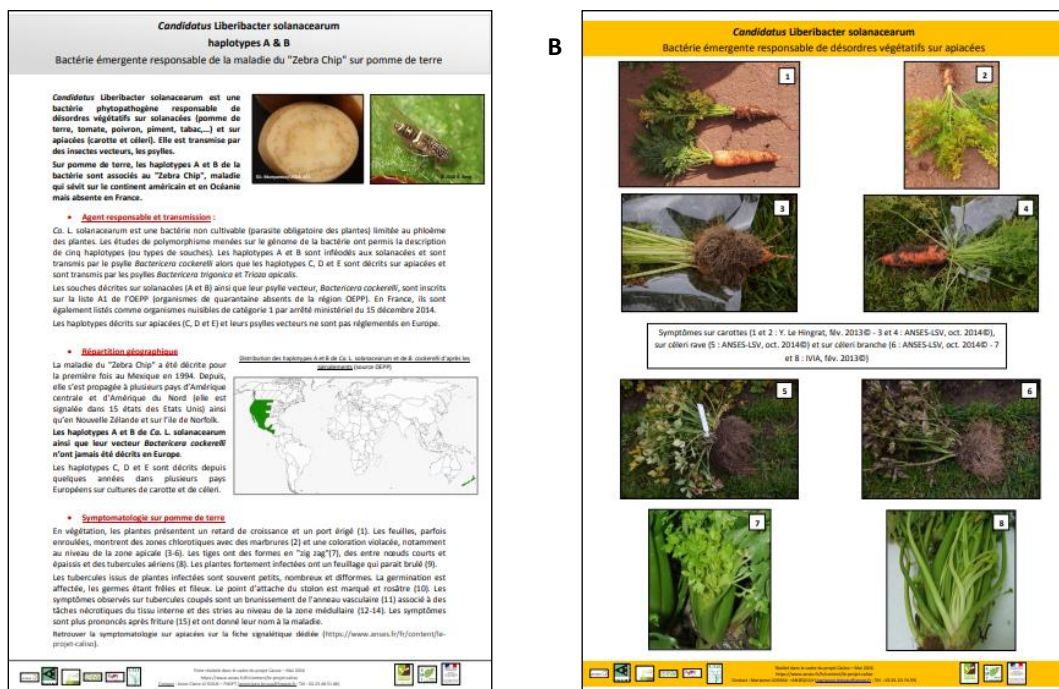
Six partenaires techniques (ANSES, CTIFL, FN3PT/RD3PT et ses 3 OP, FNAMS, INRA UMR BGPI, UFS) provenant à la fois de la recherche et de 3 secteurs différents de la production végétale se sont réunis pour effectuer des travaux visant à mieux connaître la bactérie dans le contexte français. Le projet s'est articulé autour de trois objectifs techniques et scientifiques.

Le premier objectif de ce projet était de mettre à disposition des professionnels et des services de contrôle officiels une méthode de détection de la bactérie permettant de contrôler la qualité sanitaire des semences de carotte et des plants de pomme de terre. Le deuxième objectif visait à estimer la prévalence de la maladie et de ses vecteurs sur apiacées et pomme de terre en France et à la caractériser. Le dernier objectif visait à acquérir des connaissances biologiques sur *Bactericera trigonica*.

### 3. Méthodologie de détection et de prospection (Action 1)

#### 3.1 Méthodes de prospection

L'objectif était de définir une méthode de prospection permettant de couvrir l'ensemble des zones de production concernées par la maladie sur le territoire français. Pour cela, un groupe de travail a été constitué avec à la fois des agents techniques de terrain et des instituts de recherche. L'ensemble des partenaires impliqués dans le projet a participé afin de rendre cohérentes les modalités de prospection choisies. Il est apparu nécessaire de produire des fiches signalétiques afin de communiquer sur les éléments disponibles sur Lso alors méconnue en France. Afin de ne pas créer de confusion entre la problématique sur apiacées et celle sur pommes de terre, deux fiches signalétiques distinctes ont été produites. Ces fiches signalétiques proposent des éléments sur la bactérie, son mode de transmission, sa répartition géographique et la symptomatologie (Figure 1).



**Figure 1** : Extraits des fiches signalétiques Lso. **A**, recto de la fiche signalétique « Pomme de terre » ; **B**, verso de la fiche signalétique « apiacées » (fiches disponibles sur : <https://www.anses.fr/fr/content/le-projet-caliso>).

Un protocole de prélèvements commun aux apiacées et aux solanacées ainsi qu'un protocole d'échantillonnage « psylles » ont été développés et mis en ligne pour une diffusion publique (<https://www.anses.fr/fr/content/le-projet-caliso>). Ces protocoles reprennent une présentation succincte du projet ainsi que l'objectif de la surveillance, le dispositif choisi et les modalités d'échantillonnage. Le protocole prévoyait la prospection de parcelles d'apiacées et de solanacées sur l'ensemble du territoire français. Les parcelles devaient être prospectées à une seule date en fin de culture pour les cultures primeurs et entre mi-juillet et fin octobre pour les autres avec des prélèvements de plantes et de psylles. Sur chaque parcelle, l'échantillonnage devait être réalisé de façon aléatoire et à différents endroits de la parcelle. Une échelle de notation a été proposée pour évaluer l'intensité des symptômes à la fois sur les plantes prélevées et sur l'ensemble de la parcelle.

Associée à ces protocoles, une formation a été dispensée aux préleveurs sur le terrain. Elle comportait deux temps : une première partie de présentation du projet et des psylles et une seconde partie d'observation de terrain sur une parcelle de multiplication de semences de carotte près de Mer (41). Elle a réuni 30 participants de 18 organismes différents (FREDONs, Instituts techniques, DRAAF, ANSES, INRA, Etablissements semenciers).

### 3.2 Méthodes de détection

De nombreuses méthodes de détection de Lso sont disponibles (Beard *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2009 ; Munyaneza *et al.*, 2009 ; Ravindran *et al.*, 2011, 2012 ; Teresani *et al.*, 2014 ; Wen *et al.*, 2009, 2013) mais aucun essai de comparaison de leurs performances tel que recommandé par l'OEPP n'avait été réalisé (EPPO, 2019). L'objectif était d'évaluer différentes méthodes sélectionnées suite à des essais préliminaires afin de disposer d'une méthode fiable et robuste pour la détection de Lso sur différentes matrices végétales (semences de carotte, tubercules de pomme de terre, feuilles de plantes hôtes) et sur insectes vecteurs.

#### **3.2.1 Evaluation de la taille de l'échantillon**

La taille d'échantillon habituellement utilisée pour tester les semences de carotte est de 1g ce qui correspond à environ 450 semences. La sensibilité de la méthode a été testée dans l'objectif de savoir si elle permettait la détection d'une semence contaminée dans 450 semences. Pour cela, 4,4 µL de broyat de semences contaminées ont été mélangés à 2 mL de broyat de semences saines (soit une dilution au 1/450<sup>ième</sup>). Six répétitions ont été testées. Une extraction de l'ADN avec le kit DNeasy plant mini kit (Qiagen®) et une amplification avec la PCR en temps réel de Li *et al.* (2009) ont été réalisées pour chacune des répétitions. La sensibilité de la détection obtenue est de 100% à une dilution au 1/450<sup>ième</sup>.

#### **3.2.2 Evaluation des méthodes d'extraction des acides nucléiques**

Sur plantes « hors pomme de terre », 5 types de matrices ont été testées : pétioles et semences de carotte, pétioles de céleri, de persil et de tomates. Pour chacune d'entre elles, un échantillon contaminé par Lso a été analysé pur puis en gamme de dilutions à 4 niveaux dans du matériel (matrice identique) sain. Quatre méthodes d'extraction ont été évaluées : la méthode CTAB (adaptée de Doyle et Doyle, 1990), le kit DNeasy plant mini kit (Qiagen®), le kit NucleoSpin food® (Macherey-Nagel) en manuel et le kit NucleoMag Plant® avec tampon MC1 (Macherey-Nagel) en robot 96 puits. Chaque extraction a été répétée 3 fois pour chacun des échantillons. Sur matrice « pomme de terre », 2 variétés de pomme de terre ont été utilisées, Bintje (chair blanche) et Désirée (chair rouge). Les échantillons ont été préparés en mélangeant du broyat de feuilles ou du lyophilisat de tubercules de pomme de terre contaminés provenant des Etats-Unis (J. Munyaneza, USDA) avec du broyat de pétioles ou du broyat de tubercules de pomme de terre sains. Après homogénéisation, des dilutions en cascade de 10 en 10 dans du broyat de plante saine (tiges ou tubercules) ont été effectuées de façon à avoir 5 points de gamme (D à D<sup>-4</sup>). Sept méthodes d'extraction ont été évaluées : les 4 mêmes méthodes que pour les autres matrices plantes et les kits NucleoSpin Plant II®, NucleoSpin Tissue® (Macherey-Nagel) et QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile). Chaque échantillon a été extrait 3 fois avec chacune des méthodes évaluées. Sur psylles vecteurs, 3 espèces de psylles ont été testées : *Trioza apicalis*, *Bactericera trigonica* et *B. cockerelli*. Pour chacune des espèces, 18 individus contaminés par Lso ont été testés. Trois méthodes d'extraction ont été évaluées : la méthode CTAB (adaptée de Doyle et Doyle, 1990), le kit QuickPick™ SML Plant DNA (Bio-Nobile) en robot 96 puits et une méthode non destructive au tampon TNES. Des témoins non contaminés ont été ajoutés pour chacune des modalités testées. Les extraits ADN obtenus ont été amplifiés avec la PCR temps réel de Li *et al.* (2009).

Pour la matrice « semences de carotte », la méthode la plus sensible a été la méthode CTAB. Pour les autres matrices « plantes », la méthode CTAB et les kits NucleoSpin food® (Macherey-Nagel) et NucleoMag Plant® avec tampon MC1 (Macherey-Nagel) ont permis d'obtenir des résultats équivalents. Sur « pétioles de pomme de terre », la bactérie a été détectée pour les 3 premiers points de gamme avec 6 méthodes sur 7. Seul le kit DNeasy plant mini kit (Qiagen®) n'a pas permis de descendre à cette concentration. Les 2 kits les plus performants sur cette matrice permettant une détection de la bactérie à la dilution D<sup>-3</sup> et donnant les valeurs de Ct les plus basses pour chacun des points de gamme ont été les kits NucleoSpin Tissue® et NucleoSpin food® (Macherey-Nagel) pour la variété Désirée. Sur « tubercules de pomme de terre », seules 3 méthodes (méthode CTAB et celles utilisant les kits NucleoSpin food® et NucleoMag II® - Macherey-Nagel) sur les 6 testées ont permis la détection de la bactérie dans les

échantillons non dilués avec des valeurs de Ct relativement élevées (>35 cycles). Aucune différence de sensibilité de détection n'a été mise en évidence entre les 2 variétés de pomme de terre testées bien que les variétés à chair rouge (Désirée) soient souvent décrites comme plus riches en inhibiteurs. Sur psylles vecteurs, la sensibilité de la méthode CTAB a été de 100% alors que la sensibilité des deux kits a été de 94,44%. Ces résultats doivent être interprétés avec prudence car il est difficile de connaître le statut *a priori* d'un individu bien qu'il soit issu d'une population reconnue contaminée.

### **3.2.3 Evaluation interlaboratoire des méthodes d'amplification**

Un essai interlaboratoire a été organisé pour la validation des cinq méthodes de détection de Lso proposées par le futur protocole OEPP (publication prévue en 2020). Au total, 26 laboratoires partenaires des projets CaLiso (4), H2020 POnTE (8), Euphresco PhyLib II (10) et/ou reconnus internationalement pour leurs compétences dans ce domaine d'analyse ont participé à l'essai. L'organisateur a fourni les protocoles de détection à évaluer : 2 PCR en temps réel (Li *et al.*, 2009; Teresani *et al.*, 2014) et 3 PCR en point final (Li *et al.*, 2009; Munyaneza *et al.*, 2009; Ravindran *et al.*, 2011). Avant envoi aux participants, les échantillons ont été testés pour leur homogénéité et leur stabilité. Le panel était constitué d'extraits ADN de 5 échantillons cibles avec chacun des haplotypes alors connus de la bactérie (LsoA, LsoB, LsoC, LsoD et LsoE), 5 échantillons non cibles représentatifs des plantes hôtes de la bactérie et 5 échantillons correspondant à une gamme de dilutions à 5 niveaux d'un extrait d'ADN contaminé par LsoD dilué dans de l'extrait d'ADN de carotte saine. Tous les échantillons ont été transmis en double et ont été codés pour être testés en aveugle. La spécificité analytique, la sensibilité analytique, la répétabilité et la reproductibilité ont été calculées pour chacune des méthodes évaluées. La meilleure spécificité analytique a été obtenue avec la PCR en temps réel de Teresani *et al.* (2014) et la PCR en point final de Munyaneza *et al.* (2009). Par contre, les meilleures sensibilités analytiques, reproductibilité et répétabilité ont été obtenues avec la PCR en temps réel de Li *et al.* (2009) qui est la méthode la plus largement utilisée en routine dans les laboratoires des partenaires (Tableau 1). Ces résultats doivent être interprétés avec précautions car aucune analyse individuelle des résultats non attendus n'a été effectuée pour en comprendre la cause. De plus, une analyse statistique des données, comme proposé par Chabirand *et al.* (2017), est nécessaire pour interpréter les variations observées entre les méthodes.

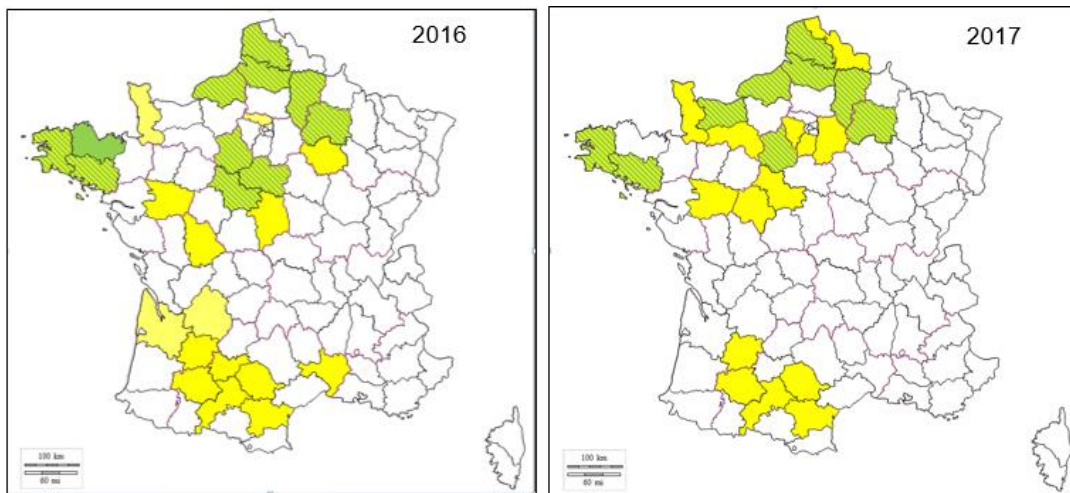
**Tableau 1** : Critères de performance des méthodes évaluées pour la détection de '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'. \*i.e. probabilité de détection de la cible à différents niveaux de dilution. Le niveau est donné comme la concentration en bactéries pour un gramme de matériel biologique.

		PCR en temps réel Teresani <i>et al.</i> , 2014	PCR en temps réel Li <i>et al.</i> , 2009	PCR point final Li <i>et al.</i> , 2009	PCR point final Ravindran <i>et al.</i> , 2011	PCR point final Munyaneza <i>et al.</i> , 2009
<b>Spécificité analytique</b>		<b>97.3%</b>	<b>96.3%</b>	<b>93.7%</b>	<b>96.0%</b>	<b>97.3%</b>
<b>Sensibilité analytique</b>	<b>7.9x10<sup>4</sup></b>	95%	100%	60%	88%	74%
	<b>1.7x10<sup>4</sup></b>	93%	98%	45%	80%	56%
	<b>8.2x10<sup>3</sup></b>	90%	100%	33%	78%	35%
	<b>1.6x10<sup>3</sup></b>	17%	98%	8%	40%	6%
	<b>2.1x10<sup>2</sup></b>	7%	50%	3%	8%	3%
<b>Répétabilité moyenne</b>		<b>96.8%</b>	<b>97.5%</b>	<b>95.2%</b>	<b>97.1%</b>	<b>96.2%</b>
<b>Reproductibilité</b>		<b>88.3%</b>	<b>94.3%</b>	<b>78.7%</b>	<b>84.2%</b>	<b>83.8%</b>

## 4. Epidémiologie (Action 2)

### 4.1 Prévalence de Lso

Les symptômes provoqués par Lso ne sont pas spécifiques. D'autres bactéries du phloème (phytoplasmes et *Spiroplasma citri*) peuvent provoquer des symptômes similaires (Munyaneza, 2012). Depuis 2012, des symptômes étaient régulièrement signalés sur carotte de différentes zones de production en France. Dans 80% des cas, Lso avait été détectée dans les échantillons prélevés. Ces résultats préliminaires laissaient supposer que la bactérie pouvait être présente dans de nombreuses zones de production. Toutefois, jusque-là aucune étude de répartition géographique n'avait été conduite. L'objectif était d'estimer la prévalence de la bactérie sur le territoire français dans les zones de production des secteurs concernés et de vérifier que la bactérie n'était pas présente en culture de pomme de terre. Pour cela, une collecte d'échantillons a été organisée en parcelles selon les recommandations préconisées dans les protocoles d'échantillonnage précédemment décrits. Les échantillons ainsi collectés ont été analysés avec les méthodes évaluées en début de projet. Les prélèvements ont eu lieu du printemps à l'automne en 2016 et 2017. Au total, 32 départements (26 en 2016 et 23 en 2017) représentatifs de la production de semences de carotte et de plants de pomme de terre ont fait l'objet d'une prospection (Figure 2).



**Figure 2** : Répartition géographique des départements français ayant fait l'objet d'une prospection en 2016 à gauche et en 2017 à droite pour la détection de Lso (Légende : jaune=prospection « apiacées » ; vert=prospection « pomme de terre » ; vert+jaune= prospection « apiacées » et « pomme de terre »)

#### 4.1.1 Situation en culture d'apiacées

Pour les apiacées porte-graine, peu de symptômes ont été observés. En effet, 50% des parcelles prospectées ne présentaient aucun symptôme et 97% des parcelles restantes présentaient moins de 10% de symptômes suspects. Cependant, 49% des échantillons testés étaient porteurs de la bactérie. Pour les apiacées de consommation et d'industrie, peu de parcelles ont finalement été surveillées et la prospection a principalement concerné les carottes. Aucun symptôme n'a été observé dans ces productions mais la bactérie a été détectée dans 3,9% des échantillons (20 sur 516). De nouveaux hôtes de Lso ont été mis en évidence : le persil, le panais, le cerfeuil, le fenouil, le céleri (Hajri *et al.*, 2017). Les échantillons qui ont pu être typés appartiennent aux haplotypes LsoD et LsoE. Six cent quatre-vingt-trois échantillons de 74 espèces botaniques différentes correspondant à des adventices ou à des plantes pérennes ont été prélevés dans les parcelles analysées. Aucun symptôme n'a été observé sur ces échantillons. Cependant, la présence de LsoD a été détectée dans 2% de ces échantillons, principalement des apiacées sauvages. Ces échantillons proviennent pour la plupart de parcelles de carotte porte-graine fortement infectées et dans lesquelles des psylles infectés ont été capturés.

#### **4.1.2 Situation en culture de plants de pomme de terre**

La quasi-totalité des zones de production de plants de pomme de terre a été prospectée dans le cadre du projet CaLiso. 43 et 40 parcelles ont respectivement été prospectées en 2016 et 2017 avec un total de 414 échantillons analysés. Les parcelles pomme de terre ciblées étaient situées à moins de 3 km de cultures d'apiacées. Aucun symptôme n'a été observé et Lso n'a été détectée dans aucun des échantillons de pomme de terre testés.

#### *4.2 Psylles présents en France*

Lors de la collecte de plantes pour estimer la prévalence de Lso en culture, des captures de psylles ont été réalisées selon le protocole préalablement établi. La caractérisation des psylles a été faite au travers de deux approches : (i) observation morphologique sous loupe binoculaire (Burckhardt et Freuler, 2000) et; (ii) caractérisation moléculaire par séquençage d'une portion du gène ITS2 et d'un gène mitochondrial, le Cox1 ou COI (Peccoud *et al.*, 2013).

Les psylles ont été capturés principalement en parcelles de carotte porte-graine. A quelques exceptions près, tous les psylles capturés ressemblent morphologiquement à l'espèce *Bactericera trigonica*. Ces identifications ont été confirmées par des analyses moléculaires effectuées sur 789 spécimens collectés en 2016 et quelques spécimens collectés en 2017. A noter que *B. nigricornis* a été observé en parcelles de carotte en Provence. Les analyses de détection de Lso sur environ 1200 spécimens ont montré que 67% des individus étaient porteurs de la bactérie.

#### *4.3 Evaluation du risque de transmission à la pomme de terre*

Le premier objectif était d'étudier, en conditions naturelles et dans un environnement où la bactérie et ses vecteurs sont présents, la transmission ou non de Lso à des cultures de pomme de terre, de tomates et de différentes apiacées (carotte, persil à grosses racines et panais). Le deuxième objectif était d'évaluer l'existence ou pas d'une sensibilité variétale chez la pomme de terre lorsque les cultures sont conduites dans un environnement favorable à la bactérie (présence de psylles et de carottes à proximité de l'essai). En 2016, un essai a été mis en place dans une zone où des psylles vecteurs de Lso et la bactérie sont présents (CTIFL Lanxade). Deux variétés de pommes de terre ( Bintje et Kennebec) ont été plantées dans des micro-parcelles jouxtant des blocs de carotte, de panais et de persil à grosses racines. Deux blocs de 10 parcelles chacun ont été installés. Vingt-deux pièges jaunes ont été disposés dans l'essai (14 dans les carottes, 4 dans les pommes de terre, 2 dans le panais et 2 dans le persil à grosses racines). Les plantes ont été échantillonnées 3 fois pendant la culture à raison de 9 plantes par parcelle de pomme de terre et 4 plantes par parcelle d'apiacées. Les psylles ont été collectés 2 fois par semaine de juin à octobre. En 2017, 2 essais ont été conduits. Comme en 2016, un essai a été mis en place dans une zone connue pour avoir des psylles vecteurs de Lso et la bactérie (CTIFL Lanxade). Deux variétés de pommes de terre (Bintje et Monalisa) ainsi qu'une variété de tomate (Pietra Rossa) ont été plantées dans des micro-parcelles jouxtant des blocs de carotte, de panais et de persil à grosses racines. Deux blocs de 10 parcelles chacun ont été installés. Douze pièges jaunes ont été installés dans l'essai (4 dans les carottes, 2 dans les pommes de terre, 2 dans les tomates, 2 dans le panais et 2 dans le persil à grosses racines). Les plantes ont été échantillonnées une fois pendant la culture à raison de 50 feuilles ou tiges prises au hasard et 20 feuilles ou tiges prélevées sur des plantes symptomatiques pouvant faire penser à la présence de Lso. Les psylles ont été collectés 2 fois par semaine de juin à fin septembre. Seules 20 pommes de terre, 20 tomates, 20 persils et 20 panais sur les 50 prélevées ont été analysés. Par contre, tous les échantillons de plantes présentant des symptômes ressemblants à ceux observés en présence de Lso ont été testés soit 20 échantillons par espèce végétale. Le deuxième essai de 2017 a été mené en région Centre et a été mis en place le 11 mai 2017 (J0), entre une parcelle de carotte porte-graine et une parcelle de plants de pomme de terre. Dix variétés de pomme de terre ont été choisies. Le dispositif



était constitué de 2 blocs dans lesquels se trouvaient des micro-parcelles de 3 rangs de 11 à 15 plantes des différentes variétés. Quatre cuvettes jaunes ont été placées dans ce dispositif ou dans l'environnement proche : une dans chacun des blocs, une dans la parcelle « carotte » et une dans la parcelle « plants ». Des prélèvements de plantes ont été effectués à 3 dates, J+40, J+56 et J+69 après la mise en place du dispositif. A chaque date, 5 carottes, 5 pommes de terre de la parcelle « plants » située à côté et 3 plantes par variété et par bloc ont été collectées. En fin de culture (J+152), les tubercules ont été récoltés pied par pied et conservés jusqu'en mars 2018. Une notation visuelle a alors été faite sur les tubercules d'un pied de pomme de terre par rang, par variété et par bloc afin d'évaluer la présence ou non des symptômes typiques décrits sur pomme de terre (marbrures, stries, décoloration de la chair du tubercule). Concernant les insectes, les relevés des cuvettes jaunes ont été faits 2 fois par semaine. Les insectes collectés ont été conservés dans de l'alcool à 90° jusqu'à leur tri, leur identification et leur analyse pour savoir s'ils sont porteurs ou non de la bactérie. Pour ces différents essais, l'ADN des plantes prélevées a été extrait avec le kit NucleoSpin food® (Macherey-Nagel) et la détection de Lso a été réalisée avec la PCR temps réel de Li *et al.*, 2009. L'identification des psylles a été effectuée comme décrit précédemment.

En 2016, Lso n'a été détectée dans aucun des 27 échantillons de pomme de terre collectés au cours de l'essai. Par contre, plusieurs échantillons de carotte ont été testés positifs à Lso. Les psylles capturés en 2016 ont été identifiés et appartiennent en grande majorité à l'espèce *B. trigonica*. Les résultats montrent qu'il existerait une différence d'attractivité entre les cultures et que le persil à grosses racines apparaîtrait plus attractif en fin de cycle. En 2017, pour le premier essai (site de Lanxade), Lso n'a pas été détectée dans les échantillons de pomme de terre, de tomate, de panais et de persil à grosses racines. Elle a été détectée dans 13 échantillons de carotte sur les 69 testés, soit dans 19% des cas. Les suivis de piégeage ont confirmé les résultats de 2016 et ont montré une plus forte attractivité du persil à grosses racines à partir de septembre au détriment des carottes et du panais. Pour le deuxième essai (site de la région Centre), la bactérie n'a pas été détectée dans les 175 plantes de pomme de terre analysées et ce, quelle que soit la variété testée. Par contre, 13 des 15 plantes de carotte analysées (soit 87%) ont donné un résultat positif quant à la présence de la bactérie. Les plantes prélevées étaient majoritairement des plantes symptomatiques. Peu de psylles ont été retrouvés dans les parcelles de pommes de terre. Dans la parcelle de carotte, le nombre de psylles capturés était plus élevé que dans les pommes de terre et était très variable en fonction de la date de la collecte.

## 5. Biologie de *Bactericera trigonica* et nuisibilité (Action 3)

### 5.1 Biologie de *Bactericera trigonica* en cultures de carotte porte-graine

Afin d'appréhender au mieux l'écologie et la biologie de *B. trigonica* en France, 3 zones d'étude ont été définies en 2016 et 2017 pour suivre des parcelles de carotte porte-graine. Ainsi, dans le Loir-et-Cher (41), 3 et 2 parcelles de multiplication ont été suivies respectivement en 2016 et 2017. Dans l'Aude (11), 2 et 1 parcelles de multiplication ont été suivies en 2016 et 2017. Et dans le Gers (32), une parcelle a été suivie les 2 années. Un suivi, plus léger a également été conduit pendant l'été 2016 à Brain-sur-l'Authion (49). Trois types de suivis ont été faits en fonction de la zone d'étude : vols des adultes par cuvette jaune avec mouillant, dynamique des pontes et larves par observations visuelles sur feuilles, et présence du psylle par échantillonnage dans les bords de champs. Pour les cuvettes jaunes avec mouillant, une cuvette est installée par parcelle sur les 4 zones de suivi (11, 32, 41 et 49) et est relevée toutes les 1 à 3 semaines en fonction de la période de l'année (cadence moins élevée à la fin de l'automne et en hiver). Pour les suivis sur plantes, les comptages des œufs et larves ont été réalisés sur 50 feuilles prélevées au hasard par parcelle et date de notation. Seules les parcelles du Loir-et-Cher et une parcelle de l'Aude (pendant l'été 2016) ont été échantillonnées pour ce suivi, juste avant l'entrée en repos végétatif, montaison, début-pleine floraison et fin floraison. Pour le suivi des bords de champs, un échantillonnage au filet fauchoir a été effectué sur les parcelles de l'Aude (2017) et du Loir-et-Cher (2016 et 2017) aux

alentours des parcelles de suivi, pour déterminer la présence du psylle sur les différentes espèces végétales observées. Les notations ont été effectuées en 2016 et 2017.

En zone nord de la Loire, la première génération du psylle était présente de la fin de l'été jusqu'au printemps. Les psylles de cette génération ont initié de nouvelles pontes et larves observées au printemps. Les adultes de deuxième génération ont été observés à la fin du printemps et au début de l'été. Les nouvelles pontes et larves observées au début de l'été laissent supposer qu'une nouvelle génération, la troisième et dernière, existerait. Les adultes issus de cette dernière génération seraient à l'origine des pontes notées à la fin de l'été sur les nouvelles cultures de carotte. Ces pontes correspondraient ainsi à la première génération annuelle suivante. Ce schéma a été observé les 2 années de suivi, et même lors des années précédant le projet CaLiso, ce qui permet de conforter cette hypothèse. Dans le secteur de Castelnaudary (11), ce schéma a également été observé mais avec des pics de population du psylle moins importants (dix fois moins importants en moyenne). Une potentielle quatrième génération a été observée dans ce secteur du fait d'un hiver 2016-2017 très doux, mais cette hypothèse ne peut être validée en raison du manque de données sur les populations d'œufs et larves sur la parcelle suivie. Enfin, dans le secteur de Condom (32), le troisième et dernier pic observé durant l'été n'a pas été détecté, mais il est possible que le cycle soit en réalité décalé et plus précoce par rapport aux deux zones précédentes ce qui pourrait expliquer ce résultat et corroborer l'hypothèse tri-générationnelle. En outre, même si des captures de psylles adultes dans l'environnement ont été réalisées, il a globalement été difficile d'observer ce ravageur durant l'année hors de la parcelle. Ce psylle semble ainsi profiter de la longue durée du cycle de la carotte porte-graine pour y effectuer de manière quasi-exclusive son cycle.

## 5.2 Nuisibilité du complexe *Bactericera trigonica* – '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' en culture de carotte porte-graine

Les objectifs des essais conduits pendant 3 années étaient d'évaluer l'impact du complexe psylle – bactérie sur la carotte porte-graine (rendement, contamination des semences), ainsi que les périodes du cycle de développement les plus sensibles aux attaques. Afin de bénéficier de conditions culturales avec et sans psylles sur carotte porte-graine, les essais ont été mis en place en serre avec utilisation de cages insect-proof. Deux modalités ont été comparées. Pour la première modalité, les plantes étaient cultivées en l'absence de psylle (vérification de leur absence pendant l'essai) alors que dans la seconde modalité, des psylles ont volontairement été introduits avec des carottes prélevées en parcelle et porteuses de pontes dès les premiers stades de développement de la carotte. Pour l'essai de 2018, la sensibilité des jeunes stades de la culture en condition de forte pression de psylles a également été évaluée. Pour cela, 2 sous-modalités ont été testées avec pour la première un semis classique à l'automne et pour la seconde un semis en juillet. Ainsi, en juillet 2018, de très jeunes plantes de carotte étaient présentes dans le tunnel où les psylles s'étaient développés depuis l'automne précédent et avaient atteint un niveau de population extrêmement important. Plusieurs types de notations ont été effectués à différents stades de la culture : crispations du feuillage aux premiers stades (pourcentage de plantes symptomatiques et intensité d'attaque), jaunissements et rougissements aux stades plus avancés (pourcentage de plantes symptomatiques et intensité d'attaque), densité en termes de nombre de pieds par m<sup>2</sup>, hauteur de végétation et diamètre racinaire, matière sèche. En fonction des années d'essai, les différents stades notés ont été : 4-5 feuilles, avant repos végétatif, sortie de repos, montaison, floraison. Le nombre de plantes échantillonnées a varié, en fonction de la notation et du stade de la culture, de 2 à 6 plantes par parcelle élémentaire. A la fin des essais, une récolte manuelle d'ombelle a été effectuée. Des plantes prélevées pour les notations ont été testées pour la détection de Lso.

La comparaison des résultats des variables mesurées dans les 2 modalités ne laisse pas de doute quant au retard de développement végétatif induit par la présence du psylle. En 2016, deux attaques spectaculaires de pucerons ont eu lieu dans la modalité où les psylles ont été apportés. Ainsi, bien qu'il ne soit pas possible d'appréhender l'impact du psylle seul sur la culture de carotte porte-graine dans cet

essai 2016, son association avec d'importantes populations de pucerons s'est avérée extrêmement préjudiciable sur cette culture. En 2017, il n'y a pas eu de grosses attaques de pucerons. L'ensemble des résultats obtenus montre que le psylle *Bactericera trigonica* peut impacter de manière très importante la culture de carotte porte-graine, mais dans des conditions de pression très forte du ravageur, par ailleurs jamais observées à un tel niveau dans des parcelles de multiplication. En 2018, des populations de pucerons ont de nouveau été observées et ont commencé à faire des dégâts mais ont fini par être bien contrôlées par l'utilisation d'un insecticide et de populations de parasitoïdes. Les populations de psylles observées étaient, comme en 2017, très fortes. Les très jeunes carottes issues du semis tardif en juillet ont été quasiment toutes détruites par ces fortes populations de psylles, ce qui confirme la nuisibilité de ce ravageur, dans ces conditions, sur la culture. Les résultats de détection de Lso montrent que, dans la modalité « avec psylles », la contamination par la bactérie a eu lieu assez tardivement, probablement à la montaison en mai. Ces résultats sont à mettre en lien avec les populations de psylles installées dans l'essai qui n'ont réellement explosé qu'à la montaison. Dans la modalité « sans psylle », aucune détection de Lso n'a été mise en évidence, même sur les semences. Cela confirme également une nouvelle fois que ce psylle est vecteur de la bactérie. Un signal tardif de PCR a été obtenu à partir de semences récoltées dans la modalité « sans psylle » et ayant été battues/triées après un lot de semences de la modalité « avec psylles ». Il semble ainsi important de considérer que des contaminations fortuites de lots indemnes peuvent avoir lieu lors de l'usinage.

## Conclusions

Le projet CaLiso a permis d'évaluer et de valider des méthodes de prospection et de détection de Lso. En effet, des fiches signalétiques et des protocoles de surveillance ont permis d'établir un premier état des lieux de la situation française par rapport à 'Candidatus *Liberibacter solanacearum*'. L'évaluation des méthodes de détection a permis de fiabiliser le processus analytique. Ainsi, il a été déterminé que la taille d'échantillon habituellement utilisée pour la détection de Lso sur semences de carotte est appropriée. Les différentes méthodes d'extraction d'ADN testées ont montré des performances adéquates pour la détection de Lso et certaines méthodes, comme celle au CTAB, permettent un usage polyvalent (sur plusieurs matrices). Enfin, l'essai interlaboratoire de validation conduit en partenariat avec 26 laboratoires a permis d'évaluer les 5 protocoles de détection de Lso qui sont intégrés au protocole OEPP à paraître. Les filières de production de semences d'apiacées et de plants de pomme de terre ainsi que les services officiels disposent ainsi de méthodes fiables permettant de sécuriser ces secteurs stratégiques de la production française.

Les surveillances à grande échelle ont permis de mettre en évidence que les haplotypes LsoD et LsoE sont présents en France principalement sur carotte porte-graine. Cependant, peu de symptômes sont observables et sont sans impact visible sur la qualité des semences produites. La surveillance sur les apiacées pour l'industrie et la consommation a été beaucoup moins importante que pour le secteur semencier. Ceci est peut-être lié au fait que l'impact de la bactérie sur ces productions semble inexistant. Des prospections plus intenses dans ces secteurs de production ainsi que dans l'est et le sud de la France permettraient de conclure quant à cette hypothèse. Pour le secteur de la pomme de terre, ces surveillances ont concerné la totalité des zones de production de plants et ont confirmé que Lso n'est pas présente sur culture de pomme de terre en France. Les analyses conduites sur les plantes adventices et les plantes de pourtour de parcelle montrent que ces plantes peuvent très occasionnellement être porteuses de la bactérie. Cependant, leur implication dans le cycle épidémiologique de la bactérie est peu probable car les plantes porteuses ont été prélevées dans des parcelles fortement contaminées par Lso avec des populations en psylles importantes.

*Bactericera trigonica*, principal vecteur de Lso dans le sud de l'Europe et le pourtour méditerranéen, est le psylle qui a majoritairement été capturé dans le cadre de ces surveillances. Bien qu'un suivi plus régulier dans les parcelles contaminées ainsi qu'une prospection dans l'est et le sud de la France aurait

pu permettre de capturer d'autres espèces, il est probable que *B. trigonica* soit le principal vecteur de Lso en France. Vues les observations effectuées dans 3 zones géographiques différentes, il semblerait que ce psylle effectue 3 générations par an. Dans les zones de production de carotte porte-graine, *B. trigonica* semble effectuer l'ensemble de son cycle exclusivement sur cette culture. Les résultats obtenus dans le cadre des essais conduits en serre permettent de confirmer que *B. trigonica* transmet Lso aux jeunes plants. L'impact de populations de psylle extrêmement élevées a été très conséquent. Cependant, il est important de noter que les conditions de pression de psylles de l'essai ne correspondent pas à ce qui peut être observé en parcelle. En condition de production normale de semences de carotte, la nuisibilité du complexe Lso – *B. trigonica* apparaît anecdotique.

Le principal danger pour le secteur de la pomme de terre en Europe est probablement l'introduction de *Bactericera cockerelli* sur le territoire, via les échanges commerciaux notamment.

## Remerciements

Ce travail a reçu le soutien financier du ministère français en charge de l'agriculture dans le cadre des programmes CASDAR sous la convention de subvention C-2015-09 n°2101755701: CaLiso.

## Références bibliographiques

- Beard S.S., Pitman A.R., Krabberger S., Scott I.A.W., 2013. SYBR Green real-time quantitative PCR for the specific detection and quantification of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in field samples from New Zealand. *European Journal of Plant Pathology* 136, 203-215.
- Burckhardt D., Freuler J., 2000. Jumping plant-lice (Hemiptera, Psylloidea) from sticky traps in carrot fields in Valais, Switzerland. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 73, 191-209.
- Chabirand A., Loiseau M., Renaudin I., Poliakoff F., 2017. Data processing of qualitative results from an interlaboratory comparison for the detection of "Flavescence dorée" phytoplasma: How the use of statistics can improve the reliability of the method validation process in plant pathology. *PLoS One* 12, e0175247.
- Doyle J.J., Doyle J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 39-40.
- EPPO, 2012. New additions to the EPPO A1 and A2 lists. *EPPO Reporting Service* 9, 2012-182.
- EPPO, 2019. PM 7/98 (4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin* 49, 530-563.
- Gill G., 2006. Tomato psyllid detected in New Zealand. *Biosecurity*, 10-11.
- Hajri A., Loiseau M., Cousseau-Suhard P., Renaudin I., Gentit P., 2017. Genetic Characterization of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' Haplotypes Associated with Apiaceous Crops in France. *Plant Disease* 101, 1383-1390.
- Li W., Abad J.A., French-Monar R.D., Rascoe J., Wen A., Gudmestad N.C., Secor G.A., Lee I.M., Duan Y., Levy L., 2009. Multiplex real-time PCR for detection, identification and quantification of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in potato plants with zebra chip. *J Microbiol Methods* 78, 59-65.
- Liefting L.W., Sutherland P.W., Ward L.I., Paice K.L., Weir B.S., Clover G.R.G., 2009. A New 'Candidatus Liberibacter' Species Associated with Diseases of Solanaceous Crops. *Plant Disease* 93, 208-214.
- Loiseau M., Garnier S., Boirin V., Merieau M., Leguay A., Renaudin I., Renvoisé J.P., Gentit P., 2014. First Report of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in Carrot in France. *Plant Disease* 98, 839-839.
- Munyaneza J.E., 2012. Zebra Chip Disease of Potato: Biology, Epidemiology, and Management. *American Journal of Potato Research* 89, 329-350.

Munyaneza J., Sengoda V., Crosslin J., De la Rosa-Lozano G., Sanchez A., 2009. First report of 'Candidatus Liberibacter psyllae' in potato tubers with Zebra Chip disease in Mexico. *Plant Disease* 93, 552-552.

Munyaneza J.E., Fisher T.W., Sengoda V.G., Garczynski S.F., Nissinen A., Lemmetty A., 2010. First Report of "Candidatus Liberibacter solanacearum" Associated with Psyllid-Affected Carrots in Europe. *Plant Disease* 94, 639-639.

Nelson W., Fisher T., Munyaneza J., 2011. Haplotypes of "Candidatus Liberibacter solanacearum" suggest long-standing separation. *European Journal of Plant Pathology* 130, 5-12.

Peccoud J., Labonne G., Sauvion N., 2013. Molecular test to assign individuals within the *Cacopsylla pruni* complex. *PLoS ONE* 8.

Ravindran A., Levy J., Pierson E., Gross D.C., 2011. Development of Primers for Improved PCR Detection of the Potato Zebra Chip Pathogen, 'Candidatus Liberibacter solanacearum'. *Plant Disease* 95, 1542-1546.

Ravindran A., Levy J., Pierson E., Gross D.C., 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification procedure as a sensitive and rapid method for detection of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in potatoes and Psyllids. *Phytopathology* 102, 899-907.

Secor G.A., Rivera V.V., Abad J.A., Lee I.M., Clover G.R.G., Liefing L.W., Li X., De Boer S.H., 2009. Association of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' with Zebra Chip Disease of Potato Established by Graft and Psyllid Transmission, Electron Microscopy, and PCR. *Plant Disease* 93, 574-583.

Soliman T., Mourits M.C.M., Oude Lansink A.G.J.M., van der Werf W., 2013. Economic justification for quarantine status – the case study of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in the European Union. *Plant Pathology* 62, 1106-1113.

Teresani G.R., Bertolini E., Alfaro-Fernández A., Martínez C., Tanaka F.A.O., Kitajima E.W., Roselló M., Sanjuán S., Ferrándiz J.C., López M.M., 2014. Association of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' with a Vegetative Disorder of Celery in Spain and Development of a Real-Time PCR Method for Its Detection. *Phytopathology* 104, 804-811.

Wen A., Johnson C., Gudmestad N.C., 2013. Development of a PCR assay for the rapid detection and differentiation of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' haplotypes and their spatiotemporal distribution in the United States. *American Journal of Potato Research* 90, 229-236.

Wen A., Mallik I., Alvarado V., Pasche J., Wang X., Li W., Levy L., Lin H., Scholthof H., Mirkov T., 2009. Detection, distribution, and genetic variability of 'Candidatus Liberibacter' species associated with zebra complex disease of potato in North America. *Plant Disease* 93, 1102-1115.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL).