

### 1-Présentation du sujet d'étude

#### • La bactérie

'*Candidatus Liberibacter solanacearum*' (CaLiSo) est une bactérie limitée au phloème récemment décrite, qui provoque la maladie du « Zebra Chip » sur pomme de terre. Elle est devenue l'un des plus importants pathogènes affectant la pomme de terre et autres solanacées dans les Amériques et la Nouvelle-Zélande. Sur le continent américain, CaLiSo est présente dans certains états des USA, au Guatemala, au Mexique, au Honduras et au Nicaragua. La présence de CaLiSo en Nouvelle Zélande est déclarée depuis 2008 (Munyaneza, 2012). Les haplotypes<sup>1</sup> « A » et « B » sont associés aux maladies observées sur solanacées et transmises par le psylle *Bactericera cockerelli* (Šulc, 1909). Cette espèce est endémique du continent américain (Haapalainen, 2014). Elle a été introduite récemment en Nouvelle-Zélande (première observation en 2006, Thomas *et al.* 2011). Aucun des haplotypes sur solanacées (« A » et « B ») n'a encore été détecté en Europe. *B. cockerelli* est également inconnu sur le territoire européen.

Les haplotypes « C », « D » et « E » de la bactérie sont associés à des désordres végétatifs sur apiacées (carotte et céleri) en Finlande, Norvège, Suède, Espagne et Iles Canaries (Munyaneza, 2012) et en France (Loiseau *et al.*, 2014). Elle a récemment été décrite au Maroc sur carotte (Tahzima *et al.*, 2014). Des études récentes en Finlande et en Espagne, ont permis de détecter les haplotypes « C » et « E » de CaLiSo sur pomme de terre asymptomatiques en Finlande (communication personnelle A. Nissinen) et symptomatiques en Espagne (Palomo *et al.*, 2014). En France, CaLiSo n'a jamais été signalée sur solanacées.

#### • Les psylles vecteurs potentiels en France

A ce jour, tous les vecteurs connus de CaLiSo appartiennent au groupe des psylles (Hemiptera : Psylloidea). En Europe, plusieurs espèces ont été décrites comme associées à la carotte, c'est-à-dire effectuant leur cycle biologique complet sur cette plante-hôte, et deux ont été formellement caractérisées comme vectrices de CaLiSo ; par contre aucune espèce de psylle vectrice n'a encore été décrite sur la pomme de terre :

*Bactericera trigonica* Hodkinson, 1981 est une espèce largement répandue sur tout le pourtour méditerranéen sur des plantes du genre *Daucus* et en particulier la carotte (Ouvrard, 2015 ; GBIF, 2013). Cette espèce de psylle a été pour la première fois signalée en Europe en 1999, en particulier dans les Canaries, sur carotte de consommation. En 2012, elle a été à nouveau signalée dans plusieurs provinces d'Espagne. Ce psylle a été démontré comme le vecteur des haplotypes D et E de '*Ca. L. solanacearum*' dans ce pays. En France, *B. trigonica* a été observé en Beauce où sa présence a été suivie les années suivantes par la FNAMS sur plusieurs parcelles ; cette espèce a été également capturée en 2013 dans le Sud-Ouest au CTIFL de Lanxade (Coussy *et al.*, 2013) et en parcelles de multiplication de carotte dans le Gers (communication personnelle Coussy). A ce jour, on ne dispose pas de données démontrant le statut de vecteur de cette espèce en France, même si c'est une hypothèse très probable compte tenu des fortes populations observées et de la présence concomitante des psylles et du Liberibacter dans les parcelles de carotte. Sa biologie n'est pas connue. Jusqu'à une autre espèce, *Trioza* (= *Bactericera*) *nigricornis* avait été décrite comme vectrice d'une « maladie à prolifération de *Daucus carota* » dans le Sud-Est de la France (Leclant *et al.*, 1974). Une confusion spécifique avec *B. trigonica* a pu avoir lieu par le passé, mais *B. nigricornis* a été formellement identifiée en 2016 dans une parcelle de carotte située dans les Bouches-du-Rhône par le Ctifl de Lanxade en collaboration avec D. Ouvrard. Cette espèce est très largement répandue dans la zone paléarctique et elle est très polyphage puisqu'on la trouve aussi bien sur des plantes de la famille des Apiacées, des Solanacées, des Chenopodiacées ou des Brassicacées (Ouvrard, 2015 ; Ossiannilsson, 1992 p257). *Bactericera cockerelli* (Šulc, 1909) devra faire l'objet d'une attention particulière : cette espèce est endémique du continent américain et vectrice de '*Ca. L. solanacearum*' sur Solanacées, en particulier la pomme de terre et la tomate (Haapalainen 2014). Elle a été introduite récemment en Nouvelle-Zélande (première observation en 2006, Thomas *et al.*, 2011). En Europe, ce psylle est inconnu mais fait l'objet d'une surveillance (liste A1 EPPO).

<sup>1</sup> Haplotype : ensemble de gènes situés côte à côte sur un chromosome

# Candidatus Liberibacter solanacearum

## Protocole d'échantillonnage « Psylles »

*Triosa (=Dyspersa) apicalis* (Foerster, 1848) est, sur carotte de consommation, l'espèce la plus communément rencontrée en Europe du Nord. Elle est décrite dans presque toute la zone paléarctique sauf dans les régions les plus au Sud. On la trouve par exemple en Suisse, en Italie et en France (Burckhardt 1986 ; Ossiannilsson 1992). Ce psylle a été caractérisé très récemment comme vecteur de l'haplotype C de '*Ca. L. solanacearum*' en Finlande et en Norvège (Haapalainen, 2014 ; Nissinen *et al.*, 2014). L'espèce *T. apicalis* appartient en fait à un complexe de 8 espèces très apparentées d'un point de vue phylogénétique et morphologiquement très difficiles à dissocier (Burckhardt 1985). Hormis *T. apicalis sensu stricto*, trois autres espèces ont déjà été décrites en France : *T. laserpitii*, *T. carpathica* et *T. lauteriella*. Il n'est pas exclu que *T. apicalis* (ou une des espèces apparentées) soit vecteur de '*Ca. L. solanacearum*' en France, en particulier dans les régions les plus au nord.

### 2-Objectifs

L'échantillonnage des psylles décrit dans ce document répond à la Tâche 2.3 du projet CaLiso (mais aussi la tâche xx du projet Ponte) dont l'objectif général est de faire un **inventaire des psylles** présents dans les parcelles de carotte de consommation et multiplication, et de pomme de terre qui seront suivies lors de l'étude de la répartition géographique de la bactérie (voir Tâche 2.1).

Cet inventaire faunistique sera réalisé par un échantillonnage aussi large que possible sur le territoire français, sans cibler une espèce spécifique de psylles. En fonction des premières captures et des résultats obtenus sur la biologie des psylles (Action 3), une nouvelle stratégie d'échantillonnage pourrait être mise en place pour cibler plus précisément les vecteurs potentiels ou avérés de *Ca. L. solanacearum* en France dans les parcelles et dans les plantes du milieu sauvage où ces insectes pourraient aussi trouver refuge (tâche 2.3.1).

Cet inventaire bénéficiera de l'appui logistique de différents partenaires : réseau de surveillance du territoire (BSV), groupe d'expérimentateurs Carotte, Inra, FNAMS,...

### 3-Captures des psylles

Les captures pourront être réalisées dans les parcelles de carotte et de pomme de terre suivies par les différents partenaires, ou sur les adventices au bord des parcelles.

Trois techniques de captures seront mises en œuvre dans un premier temps :

- **pièges jaunes** (type colza : bol de couleur jaune bouton d'or ; photo Annexe 1A) à eau + mouillant, avec hauteur du bol à adapter en fonction de la hauteur de végétation. Ce type de pièges est utilisé dans le cadre du projet pour suivre la dynamique des populations des psylles dans les parcelles de carotte. Dès lors que les pièges sont relevés régulièrement (2 fois par semaine), il est envisageable de récupérer les psylles piégés pour les conserver ensuite dans de l'alcool 96° non dénaturé. Cette technique aurait l'avantage de permettre la capture d'un grand nombre d'individus et de ne pas être trop chronophage.
- **filet fauchoir** (photo Annexe 1B). Cette technique consiste à attraper vivants les psylles dans un filet et ensuite les récupérer dans un tube avec un aspirateur à bouche (Annexe 1D). Cette technique demande une certaine pratique pour le fauchage. Récupérer les insectes dans le filet est parfois difficile (peu d'individus difficiles à discerner et qui s'envolent, etc.). Cette technique est chronophage mais elle est bien adaptée pour les plantes rases, type carotte de production, pomme de terre.
- **parapluie japonais** (photo Annexe 1C). Cette technique consiste à frapper les plantes hôtes avec un bâton pour faire tomber les psylles sur une toile. Ces derniers sont ensuite récupérés dans un tube avec un aspirateur à bouche. Cette technique est bien adaptée pour les plantes hôtes assez hautes.

La **collecte terminée**, identifier bien les tubes contenant les insectes vivants :

=> noter date capture/localité/collecteur/plante-hôte

=> noter ces infos sur un cahier où on ajoutera d'autres infos type nom de la variété, nom du propriétaire de la parcelle, coordonnées GPS de la parcelle,...

Dans un premier temps, l'objectif sera de capturer « un maximum » de psylles, sans a priori sur l'espèce à capturer. Des psylles abondants pourraient être des ravageurs non vecteurs, alors que des psylles plus rares pourraient être au contraire les vecteurs de CaLiSo.

### 4-Conservation des psylles

#### **A retenir ! Un tube = un échantillon**

1 échantillon = une localité, un même jour, sur la même plante hôte

ex : psylles capturés le même jour sur carotte et céleri = 2 échantillons différents

ex : psylles capturés sur la même parcelle, 2 jours différents = 2 échantillons différents

1 localité = une parcelle, ou un ensemble de parcelles proches de la même plante-hôte

Les psylles capturés au piège jaune seront transférés dans un tube contenant de l'alcool 96°.

Les psylles capturés vivants dans des tubes (au filet fauchoir ou avec un parapluie japonais) seront mis dans un congélateur à -20°C (au minimum 48h, mais sans limite de temps). Ils pourront ensuite être transférés dans de l'alcool 96° sans risque que certains s'échappent.

**Dans tous les cas, identifier chaque tube par :**

- une info sur le bouchon du tube (N° tube, etc.)
- une étiquette où sera notée au crayon papier : le N° du tube / localité / collecteur / plante-hôte / espèce de psylle (si possible) / nbre psylles capturés
- remplir la fiche permettant d'identifier chaque échantillon (voir Annexe 2)
- stocker les tubes, de préférence à 4°C (pour éviter évaporation de l'alcool)
- expédier les tubes à :

Nicolas Sauvion  
CIRAD TA A-54 K  
Campus International de Baillarguet  
34398 Montpellier cedex 5  
tel : 04 99 62 48 41 / 06 31 50 63 89

### 5-Détermination des espèces de psylles capturées

Les insectes capturés seront envoyés à l'INRA de Montpellier pour identification morphologique, extraction de leur ADN et typage moléculaire.

On s'appuiera en particulier sur les clés de détermination morphologique déjà publiées pour caractériser les différentes espèces de psylles susceptibles d'être trouvées sur la carotte (tâche 2.3.2). Les échantillons qui poseraient problèmes pourraient être envoyés à D. Ouvrard au Museum de Londres. Enfin, des individus des espèces identifiées seront caractérisés par voie moléculaire (tâche 2.3.3). Leurs ADNs seront extraits par une technique non destructive (ce qui permettra de vérifier à nouveau la morphologie des spécimens si nécessaire) et chaque échantillon sera séquencé pour 2 gènes : le COI et le gène ITS2, deux gènes classiquement utilisés pour différencier des espèces d'insectes apparentées (Peccoud *et al.*, 2013). Les séquences obtenues pourront être comparées aux séquences de référence dont nous disposons déjà (plus de 200 espèces de psylles séquencés pour ces 2 gènes dont des *Bactericera sp.* et autres *Triozidae* dans le cadre d'un projet, Bibliothèque du Vivant : <http://bdv.ups-tlse.fr/index.php>).

Des aliquots des ADNs extraits seront aussi envoyés à l'ANSES d'Angers pour typage moléculaire pour la présence de CaLiSo

# *Candidatus Liberibacter solanacearum*

## Protocole d'échantillonnage « Psylles »

### Annexe 1

A- Exemple de piège jaune



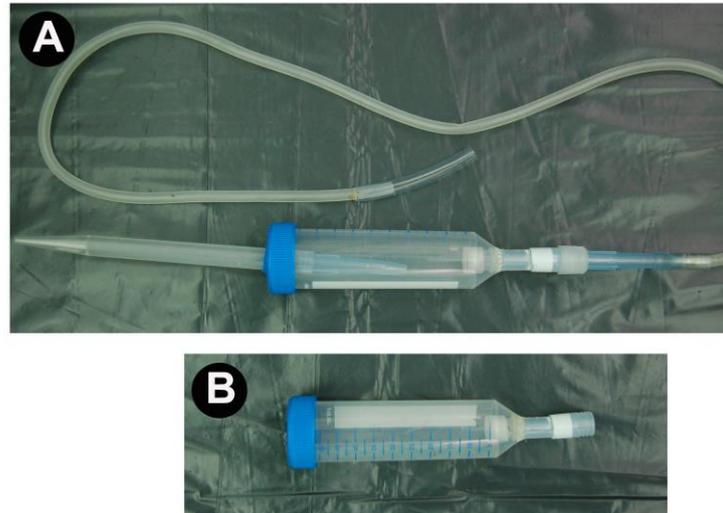
B- Exemple de filet fauchoir



C- Exemple de parapluie japonais



D- Exemple d'aspirateur à bouche



### Annexe 2 :

#### Fiche de prélèvements

Prévenir la personne adéquate en fonction de la culture prélevée (voir annexe 3) de l'expédition de l'échantillon et envoyer les photos par e-mail.

Ne pas envoyer en fin de semaine pour éviter un stockage à la poste pendant le week-end.

*NB : les informations (en gras, rouge) sont indispensables aux traitements des données recueillies dans le cadre de cette étude.*

<b>Expéditeur/ Préleveur</b>			
Nom :			
Adresse :			
Tél. :			
<b>Identifiant parcelle :</b>		Réservé au laboratoire	
<b>Commune:</b> (code postal/n°INSEE)			
<b>Coordonnées GPS :</b> ##,##### : Degrés décimaux, projection : UTM / WGS 84			
<b>latitude</b>		<b>longitude</b>	
<b>Date de prélèvement :</b>			
<b>Symptômes :</b>		<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	
<b>Intensité à la parcelle</b>		<b>Type de symptômes sur plante cultivée</b>	
<input type="checkbox"/> Absence de symptômes		<input type="checkbox"/> 0 : asymptomatique	
<input type="checkbox"/> Quelques plantes (1 à 10%)		<input type="checkbox"/> 1 : jaunissement ou rougissement du feuillage	
<input type="checkbox"/> 10 à 30 % des plantes (par tâches)		<input type="checkbox"/> 2 : (1) + prolifération aérienne	
<input type="checkbox"/> 30 à 50 % des plantes (une partie de la parcelle)		<input type="checkbox"/> 3 : symptômes racinaires	
<input type="checkbox"/> + 50 % des plantes		<input type="checkbox"/> 4 : (2 + 3)	
Surface atteinte			
Impact sur la production			
<b>Présence d'insectes</b> (dont le psylle de la carotte, de la tomate ou de la pomme de terre)		<input type="checkbox"/> OUI <input type="checkbox"/> NON	

# Candidatus Liberibacter solanacearum

## Protocole d'échantillonnage « Psylles »

### Liste des échantillons prélevés sur une parcelle

Identifiant parcelle (réservé au laboratoire) :

Codification préleveur début (partenaire/date/code postal) :

Type d'échantillons	Nombre de prélèvements	Codification préleveur fin = espèce végétale/n°prél.
Plantes cultivées avec symptômes		
Plantes cultivées sans symptôme		
Plantes adventices (préciser espèces)		
Plantes de bordure (préciser espèces)		
Plantes pérennes		
Psylles		
Cicadelles		

Commentaires :

**Annexe 3 :****Liste des personnes à contacter**

Culture en production	Personne à contacter	Coordonnées
Apiacées porte-graines	Marianne Loiseau (ANSES-LSV)	LSV 7 rue Jean Dixméras 49044 Angers cedex 01  Tél : 02.41.20.74.59 Fax : 02.41.20.74.30 Mail : <a href="mailto:marianne.loiseau@anses.fr">marianne.loiseau@anses.fr</a>
	Ou Personnes en charge de laboratoire laboratoire de pathologie (semenciers pouvant réaliser les analyses Vilmorin, Bejo et Rijk Zwaan)	
Pomme de terre (Plants, consommation & transformation)	Anne-Claire Le Roux (FN3PT)	INRA - UMR 1349 IGEPP Domaine de La Motte BP 35327 35653 Le Rheu Cedex  Tél : 02.23.48.51.86 Fax : 02.23.48.51.50 Mail : <a href="mailto:anneclaire.leroux@fnpppt.fr">anneclaire.leroux@fnpppt.fr</a>
Autres solanacées, Apiacées consommation et industrie	Marianne Loiseau (ANSES-LSV)	LSV 7 rue Jean Dixméras 49044 Angers cedex 01  Tél : 02.41.20.74.59 Fax : 02.41.20.74.30 Mail : <a href="mailto:marianne.loiseau@anses.fr">marianne.loiseau@anses.fr</a>
Psylles	Nicolas Sauvion (INRA Montpellier)	INRA UMR BGPI Dr. Nicolas Sauvion Campus de Baillarguet 34398 Montferrier-sur-Lez  Tél : 04 99 62 48 41 Fax : 04 99 62 48 22 Mail : <a href="mailto:sauvion@supagro.inra.fr">sauvion@supagro.inra.fr</a>