

# CaLiso

---

Détection et épidémiologie de *Candidatus*  
*Liberibacter solanacearum*, bactérie  
transmissible à la semence et responsable de  
désordres végétatifs sur Apiacées et  
Solanacées.

Porteur: Marianne LOISEAU – ANSES-LSV

Partenaires: ANSES-LSV-UBVO, CTIFL, FNAMS,  
FN3PT/RD3PT et ses 3 OP, INRA UMR BGPI, UFS

# Contexte en 2014

---

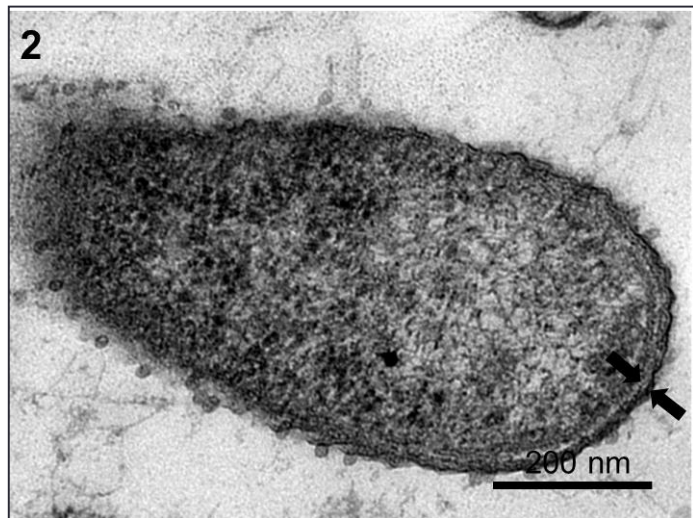
*'Candidatus Liberibacter solanacearum'*

Secteurs impactés

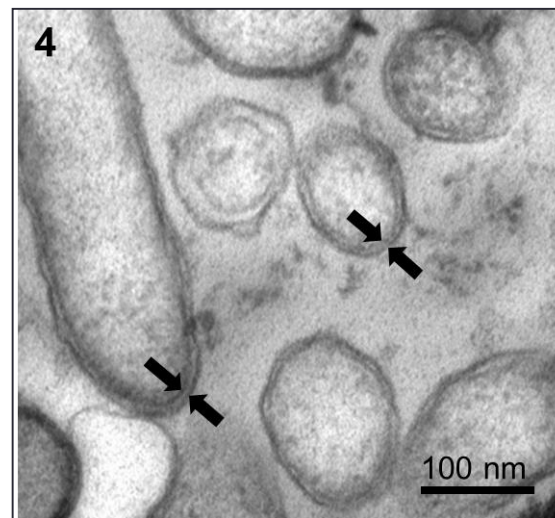
Impact économique

## '*Candidatus Liberibacter solanacearum*'

- Bactérie non-cultivable, Gram -, restreinte au phloème des plantes hôtes et à l'hémolymphe des insectes.



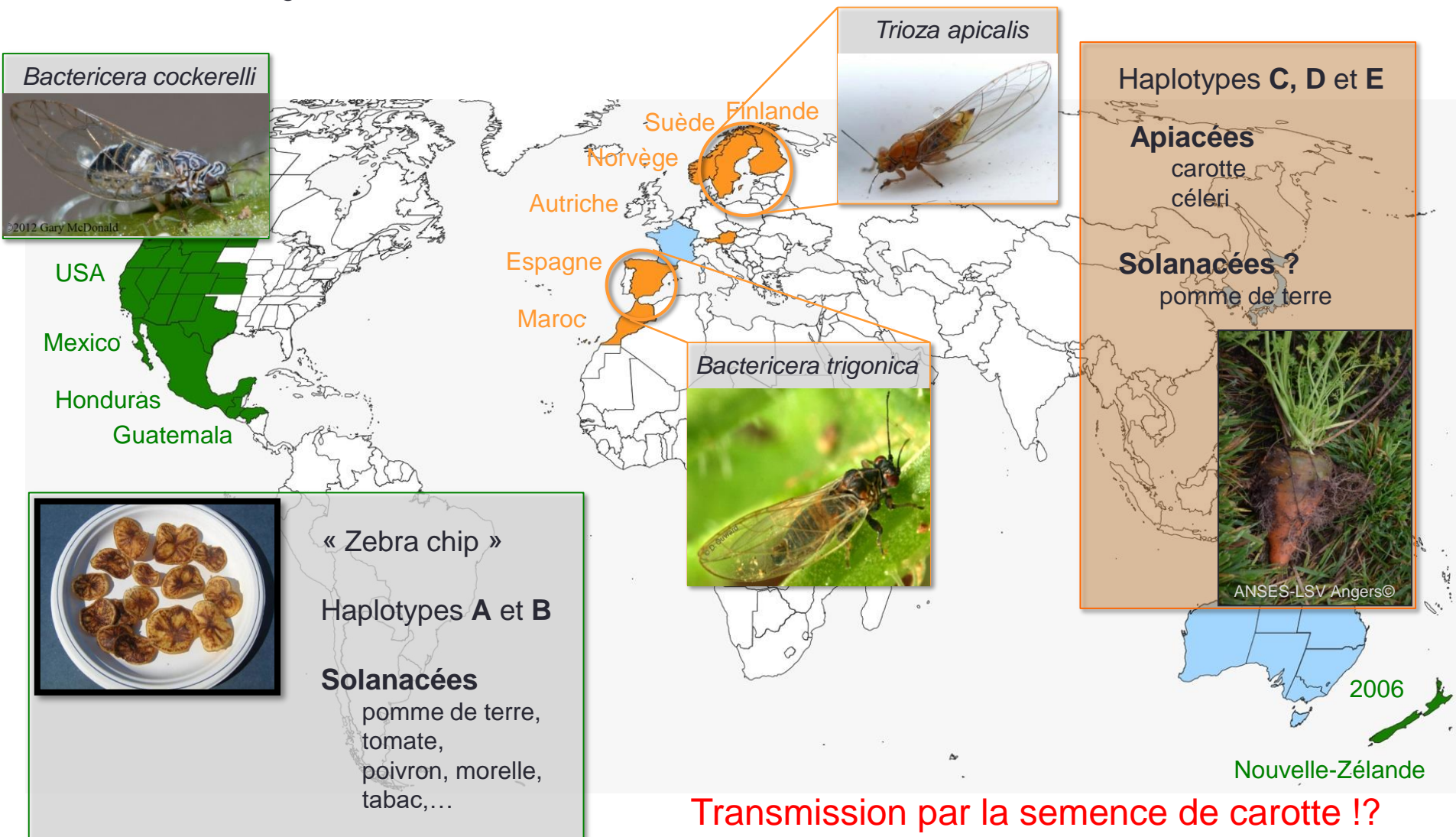
Source: Teresani *et al.*, 2014



- 5 haplotypes: SNPs sur l'ADNr 16S, l'intergène 16s/23s et les gènes de protéines ribosomales 50s rp1J et rp1L. (Nelson *et al.*, 2011; Teresani *et al.*, 2014)

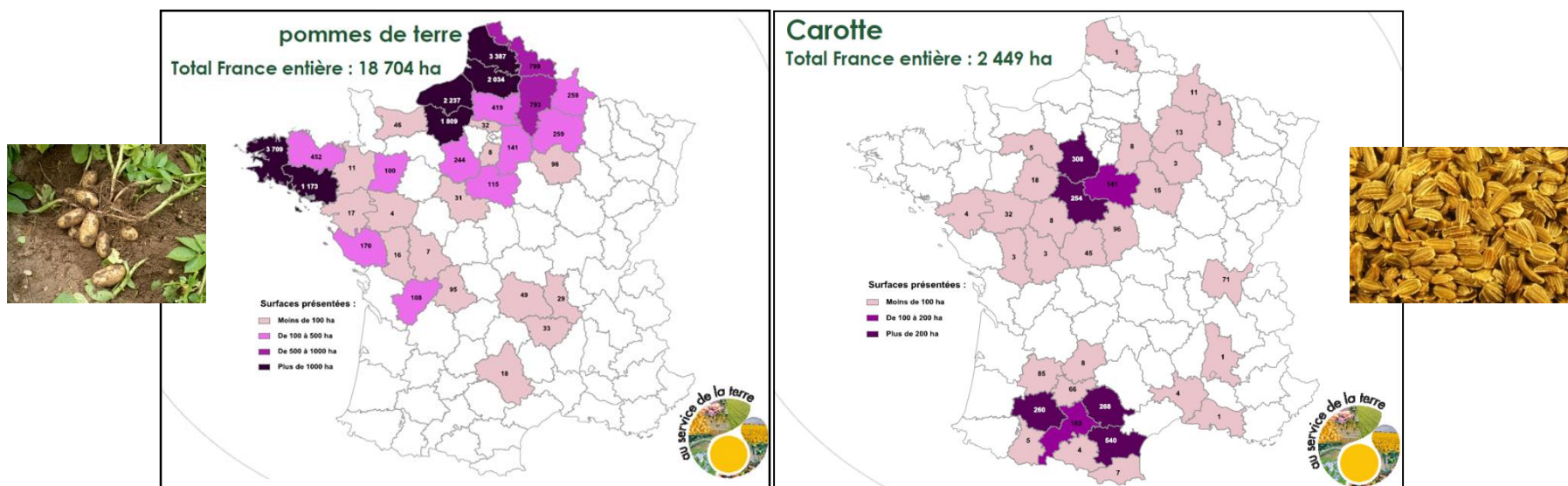
# '*Candidatus Liberibacter solanacearum*':

- liste A1 de l'OEPP pour les haplotypes solanacées – En France, surveillance des pdt importées; arrêté du 15/12/2014 – catégorie 1



# Secteurs des semences et de la production française agricole impactés

- Secteurs stratégiques : culture de semences de carotte et de plants de pomme de terre



Source: GNIS – Récolte 2014

mais aussi les productions destinées à la consommation et à l'industrie: carottes, pommes de terre, tomates, céleris, poivrons et piments...



# Impact économique

- Perte de récolte jusqu'à:
  - 80% sur pomme de terre (Honduras, USA);
  - 100% sur carotte de consommation (Finlande, Espagne)
  - 70% sur céleri de consommation (Espagne)
- fruits non commercialisables (en fonction de la variétés, NZ)
- Production de semences et de plants de qualité dégradée (pomme de terre et carotte?)
- Exportation :
  - fermeture des frontières et organisations de la lutte (NZ) – 330 000€ de perte poivrons; 2 M€ pour la pomme de terre
  - pb d'exportation des semences de carotte



Source : Croslin *et al.*, 2010



Source : ANSES-LSV

# CaLiso : Action 1

---

Méthodologie de détection et de prospection

# Nous savions...

Author	Method	Target	Internal control (plant)	Sensitivity	Theoretical LOD	Specificity
Liefting <i>et al.</i> , 2009	PCR	16SrDNA	N.A.	unknown	100	Negative for 'Ca. L. asiaticus', 'Ca. L. africanus', or 'Ca. L. americanus'
Li <i>et al.</i> , 2009	PCR	16SrDNA	N.A.	10X PCR Liefting	10	<b>18 Ca. L. solanacearum (positive Ct 20.6-35.2)</b> <b>3 'Ca. L. asiaticus', 3 'Ca. L. africanus', or 3 'Ca. L. americanus' (negative)</b>
	<b>Real-time PCR (TaqMan)</b>	<b>16SrDNA</b>	<b>COX</b>	<b>10X PCR Li</b>	<b>1</b>	<b>Potato leaf roll virus, Clover proliferation phytoplasma, Ca. phytoplasma americanum, Xylella fastidiosa PD strain and CVC strain (negative)</b>
Ravindran <i>et al.</i> , 2011	PCR	16S-23SrDNA ITR	$\beta$ -TUB	10X PCR Li	1	1 'Ca. L. asiaticus' (negative)
	PCR	Adenylate kinase	$\beta$ -TUB	10X PCR Li	1	
Beard <i>et al.</i> , 2012	Semi-nested real-time PCR (SYBR)	16SrDNA	EF-1 $\alpha$	50X cPCR Liefting	2	3 Ca. L. solanacearum (positive) 1 'Ca. L. asiaticus', 1 'Ca. L. africanus', 1 'Ca. L. americanus' and 1 'Ca. L. europaeus' (negative)
	Semi nested PCR	16SrDNA	28S	1/10X semi-nested qPCR Beard	20	WX phytoplasma, PoiBI phytoplasma, WWB phytoplasma, 'Ca. P. australiense', Pectobacterium atrosepticum, pseudomonas fluorescens (1 each, negative)
Teresani <i>et al.</i> , 2014	Real-time PCR	16SrDNA	N.A.	= qPCR Li	1	110 'Ca. L. solanacearum' (positive) 14 'Ca. L. asiaticus', 2 'Ca. L. africanus', 2 'Ca. L. americanus' (negative) 16 strains of bacterial species (negative)



# Ce que nous ne savions pas...

Quelles sont les méthodes de détection et de prospection les plus fiables pour mettre en évidence la présence de la bactérie?

## Objectifs du projet CaLiso

Mettre à disposition des professionnels et des services de contrôle officiels:

- 1) une méthode de prospection
- 2) une méthode de détection de la bactérie


# Résultats

## • 2 Fiches signalétiques et 2 Protocoles d'échantillonnage:

**Candidatus Liberibacter solanacearum**  
Bactérie émergente responsable de désordres végétatifs sur apiacées

*Candidatus Liberibacter solanacearum* est une bactérie phytopathogène responsable de désordres végétatifs sur solanacées (pomme de terre, tomate, poivron, piment, tabac...) et sur apiacées (carotte et céleri). Elle est transmise par des insectes vecteurs, les psylles.

Sur apiacées, les haplotypes C, D et E de la bactérie sont associés à des désordres végétatifs.



**• Agent responsable et transmission**

*Ca. L. solanacearum* est une bactérie non cultivable (parasite obligatoire des plantes) limitée au phloème des plantes. Les études de polymorphisme menées sur le génome de la bactérie ont permis la description de cinq haplotypes (ou types de souches). Les haplotypes A et B sont inféodés aux solanacées et sont transmis par le psylle *Bactericera cockerelli* alors que les haplotypes C, D et E sont décrits sur apiacées et sont transmis par les psylles *Bactericera trigonica* et *Trioxa apicalis*.


Les souches décrites sur solanacées (A et B) ainsi que leur psylle vecteur, *Bactericera cockerelli*, sont inscrits sur la liste A1 de l'OEPP (organismes de quarantaine absents de la région OEPP). En France, ils sont également listés comme organismes nuisibles de catégorie 1 par arrêté ministériel du 15 décembre 2014.

Les haplotypes décrits sur apiacées (C, D et E) et leurs psylles vecteurs ne sont pas réglementés en Europe.

**• Répartition géographique**

Tandis que la maladie du « Zebra Chip » a été décrite pour la première fois au Mexique en 1994, les désordres végétatifs sur carotte associés à la bactérie (haplotypes C, D et E) sont décrits depuis 2008. Depuis de nombreux signalements ont été faits en Scandinavie, dans le sud de l'Europe et au Maroc sur cultures de carotte et de céleri.

Les haplotypes A et B de *Ca. L. solanacearum* ainsi que leur vecteur *Bactericera cockerelli* n'ont jamais été décrits en Europe.



**• La symptomatologie sur apiacées**

Sur feuilles, les symptômes se manifestent par un développement anarchique au collet, un enroulement et/ou une décoloration (jaune, bronze au violet). Ces symptômes peuvent être confondus avec les symptômes dus au psylle de la carotte, *Trioxa apicalis*, à *Cy. Phytoloplia asteris*, responsable de la jaunisse de l'aster (*Aster yellows*), maladie commune et largement répandue, et à *Spiroplasma citri*.

Sur racines, les symptômes observés sont un rabougrissement de la racine principale et une prolifération des racines secondaires. Ces symptômes correspondent également à ceux observés avec la jaunisse de l'aster.

Retrouver la symptomatologie sur pomme de terre sur la fiche signalétique dédiée (<https://www.anses.fr/fr/content/le-projet-caliso>).

**Candidatus Liberibacter solanacearum**  
haplotypes A & B

Bactérie émergente responsable de la maladie du "Zebra Chip" sur pomme de terre

*Candidatus Liberibacter solanacearum* est une bactérie phytopathogène responsable de désordres végétatifs sur solanacées (pomme de terre, tomate, poivron, piment, tabac...) et sur apiacées (carotte et céleri). Elle est transmise par des insectes vecteurs, les psylles.

Sur pomme de terre, les haplotypes A et B de la bactérie sont associés au "Zebra Chip", maladie qui sévit sur le continent américain et en Océanie mais absente en France.



**• Agent responsable et transmission**

*Ca. L. solanacearum* est une bactérie non cultivable (parasite obligatoire des plantes) limitée au phloème des plantes. Les études de polymorphisme menées sur le génome de la bactérie ont permis la description de cinq haplotypes (ou types de souches). Les haplotypes A et B sont inféodés aux solanacées et sont transmis par le psylle *Bactericera cockerelli* alors que les haplotypes C, D et E sont décrits sur apiacées et sont transmis par les psylles *Bactericera trigonica* et *Trioxa apicalis*.

Les souches décrites sur solanacées (A et B) ainsi que leur psylle vecteur, *Bactericera cockerelli*, sont inscrits sur la liste A1 de l'OEPP (organismes de quarantaine absents de la région OEPP). En France, ils sont également listés comme organismes nuisibles de catégorie 1 par arrêté ministériel du 15 décembre 2014.

Les haplotypes décrits sur apiacées (C, D et E) et leurs psylles vecteurs ne sont pas réglementés en Europe.

**• Répartition géographique**

La maladie du "Zebra Chip" a été décrite pour la première fois au Mexique en 1994. Depuis, elle s'est propagée à plusieurs pays d'Amérique centrale et d'Amérique du Nord (elle est signalée dans 15 états des États Unis) ainsi qu'en Nouvelle Zélande et sur l'île de Norfolk.

Les haplotypes A et B de *Ca. L. solanacearum* ainsi que leur vecteur *Bactericera cockerelli* n'ont jamais été décrits en Europe.

Les haplotypes C, D et E sont décrits depuis quelques années dans plusieurs pays Européens sur cultures de carotte et de céleri.



**• Symptomatologie sur pomme de terre**


En végétation, les plantes présentent un retard de croissance et un port érigé (1). Les feuilles, parfois enroulées, montrent des zones chlorotiques avec des marbrures (2) et une coloration violacée, notamment au niveau de la zone apicale (3-6). Les tiges ont des formes en "zig zag" (7), des entre noeuds courts et épaissis et des tubercules aériens (8). Les plantes fortement infectées ont un feuillage qui paraît brûlé (9). Les tubercules issus de plantes infectées sont souvent petits, nombreux et difformes. La germination est affectée, les germes étant frêles et fléaux. Le point d'attache du stolon est marqué et rosâtre (10). Les symptômes observés sur tubercules coupés sont un brunissement de l'anneau vasculaire (11) associé à des tâches nécrotiques du tissu interne et des stries au niveau de la zone médullaire (12-14). Les symptômes sont plus prononcés après friture (15) et ont donné leur nom à la maladie.

Retrouver la symptomatologie sur apiacées sur la fiche signalétique dédiée (<https://www.anses.fr/fr/content/le-projet-caliso>).


**Candidatus Liberibacter solanacearum**  
Protocole d'échantillonnage « Psylles »

**Annexe 1**


**A- Exemple de piège jaune**



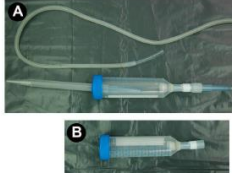
**B- Exemple de filet fauchoir**



**C- Exemple de parapluie japonais**



**D- Exemple d'aspirateur à bouche**



# Résultats

- Protocoles de détection validés:

1) plusieurs protocoles d'extraction ADN validés sur plantes hôtes et sur insectes vecteurs;

2) 5 protocoles de détection par PCR validés lors d'un EILV (26 participants à l'international)

PM 7	European and Mediterranean Plant Protection Organization Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes
<b>Diagnostics</b>	
<b>Disease</b>	19-24458 (18-24508, 18-24255, 17-22820, 17-22747, 15-21104, 14-49985)
<b>'Candidatus Liberibacter solanacearum'</b>	
<b>Specific scope</b>	This Standard describes a diagnostic protocol for 'Candidatus Liberibacter solanacearum', and for its detection in the psyllid vectors <i>Bactericera cockleyi</i> , <i>Trioxys apricorum</i> and <i>Bactericera brassicae</i> .
<b>Specific approval and amendment</b>	201X-09-XX
<b>This Diagnostic Protocol was prepared in parallel to the EPIC Diagnostic Protocol adopted in 2017 on 'Candidatus Liberibacter solanacearum' (Annex C) by ISPM 27, EPIC, 2017. The EPPO Diagnostic Protocol differs in terms of format but is consistent with the content of the EPIC Standard. With regard to molecular methods, one real-time PCR test used in the EPPO region is included, more information on the different haplotypes is included as well as additional information on reference accessions.</b>	
<b>1. Introduction</b>	
'Candidatus Liberibacter solanacearum' is a Gram negative bacterium. It is restricted to the host plant's phloem and psyllid vector's hemolymph, alternating its life cycle between host plants and insect vectors. 'Ca. L. solanacearum' has not been cultured in axenic medium yet. In North and Central America and Oceania, it primarily infects solanaceous crops and weeds including <i>Solanum tuberosum</i> (potato), <i>Solanum lycopersicum</i> (tomato), <i>Capiscum annuum</i> (pepper), <i>Solanum elaeagnifolium</i> (manzanilla), <i>Moronega tuberosa</i> (bitter melon), <i>Solanum melongena</i> (eggplant), <i>Lycopersicon peruvianum</i> (tomato), <i>Solanum elaeagnifolium</i> (silver cholla), <i>Solanum elaeagnifolium</i> (black nightshade), <i>Lycopersicon esculentum</i> (cucumber) and other crops or weeds in the family Solanaceae (EPPO 2011; Haganahm, 2014). In the EPPO region, 'Ca. L. solanacearum' has been associated with symptoms in species of the Solanaceae family, including <i>Datura stramonium</i> (jimson weed), <i>Passiflora suberosa</i> (passiflora), <i>Pereskia akrotricha</i> (passiflora), <i>Antirrhinum aureum</i> (snapdragon) and <i>Floricolum vulgare</i> (sunflower) (EPPO 2013; Terzano et al., 2014; Alfaro-Semadeni et al., 2014 and 2016; Hagi et al., 2017). In addition, 'Ca. L. solanacearum' was found on <i>Urtica dioica</i> (stinging nettle) in Finland (Haganahm et al., 2018a).	
'Ca. Liberibacter solanacearum' is transmitted by different psyllid species in a propagative, circulative and persistent manner. The tomato psyllid <i>Bactericera cockleyi</i> has been described as the vector of haplotypes A and B in solanaceous crops (Manjrez et al., 2007; Buchanan et al., 2011; Sengul et al., 2014). Evidence of effective transovular transmission of 'Ca. L. solanacearum' has been provided in <i>B. cockleyi</i> (Hansen et al., 2008). 'Ca. L. solanacearum' is transmitted to agnathous species by <i>Trioxys apricorum</i> (Nisenson et al., 2014) and <i>Bactericera brassicae</i> (Amelkin et al., 2010 & 2017; Terzano et al., 2017). <i>T. apricorum</i> has been reported as vector of haplotypes C (Nisenson et al., 2014), and <i>B. brassicae</i> as vector of haplotypes D and E in Spain (Delgado et al., 2012; Terzano et al., 2015; Amelkin et al., 2016 and 2017; Terzano et al., 2017). There are also reports of 'Ca. L. solanacearum' detection, but not transmission, in <i>Bactericera brassicae</i> collected from carrots (Terzano et al., 2015; Amelkin et al., 2017). 'Ca. L. solanacearum' was also detected in <i>B. brassicae</i> , <i>Trioxys apricorum</i> and <i>Passiflora suberosa</i> in Spain, Finland, Germany and United Kingdom (Terzano et al., 2015; Haganahm et al., 2018a; Spjohndt et al., 2017 and 2018) however, no study was conducted to determine their potential as a vector of the bacterium. In addition, 'Ca. L. solanacearum' can be transmitted by propagative plant material and as shown in experimental setup, it can also be transmitted by <i>Cucurbita composita</i> (dudley) to <i>Cucurbitaria renouii</i> (peppercorn) and other horticola plants (Berthoin et al., 2010). Although the presence of the bacterium has been detected in seeds of chili pepper (Carrascho-Tapia et al., 2011), parsley (Drooghe & Jellison, 2016) and parsnip (Drooghe et al., unpublished data), bacterial seed transmission has only been suggested for carrot seeds and only in one study (Berthoin et al., 2010). Those results have never been reproduced (Lorenzen et al., 2017a; Lorenzen et al., 2017b).	
Seven haplotypes of 'Ca. L. solanacearum' have been described (Orellana et al., 2011, 2012; Terzano et al., 2014; Haganahm et al., 2018a; Snyder-Greggs & Gierczak, 2018). Three haplotypes (A, B and F) are known to be associated with diseases caused by this bacterium in potatoes and other solanaceous crops, whereas the C, D and E haplotypes are known to be associated with agnathous species. In 2018, a new	

haplotype U has been described on *Urtica dioica* (stinging nettle). Haplotype A has been detected primarily from Honduras and Guatemala through Western Mexico to USA (Arizona, California, Oregon, Washington and Idaho) and in New Zealand. Haplotype B has been detected in Mexico and USA. Haplotype F has been detected in the USA as a single plant (Florida, Georgia & California, 2018). Haplotype C was detected in Finland, Sweden, Norway, Germany and Austria (Haganahm, 2014; Manjrez et al., 2011; EPPO Global Database, 2019). Haplotypes D and E have been detected in the Canary Islands and in mainland Belgium, Spain, France, Greece, Tunisia, Morocco and Portugal (EPPO Global Database, 2019; Terzano et al., 2014; Haganahm, 2014; Tahama et al., 2014; Hagi et al., 2017; Haganahm et al., 2017; Ben Othman et al., 2018). Haplotype D has been detected in Israel (EPPO, 2017). An outbreak was detected in Italy (Sicily) and haplotype D was detected in one sample (Cairo, pers. com., 2019). Finally, an outbreak has been reported in Estonia (EPPO, 2018; haplotype not known). Information can also be extracted from the EPPO Global Database (EPPO, 2019).

'Ca. Liberibacter solanacearum' (usually Haplotype D) was detected in old commercial seed (the earliest dating from 1973) from countries not previously reporting the presence of this bacterium in Agnathous species: the Czech Republic, Denmark, Egypt, Japan, Netherlands, the Soviet Union, Syria, the United Kingdom and the United States of America (Drooghe & Jellison, 2017). Haplotypes D and E of 'Ca. Liberibacter solanacearum' are also detected in commercial carrot seeds lots (Hagi et al., 2016).

The discovery in Finland of asymptomatic potato volunteers infected with haplotype C (Haganahm et al., 2018b) and of symptomatic ware potato volunteers infected with haplotype E in Spain (Palomo et al., 2016) would suggest that all haplotypes can infect potato, but transmission is limited between the different plant families because of the lack of a vector that is able to feed efficiently on plants in both families. In addition, with regards to the detection in ware tubers, Palomo et al. (2016) state that 'these data would indicate that these haplotypes could have previously infected the potato and would not have any specific epidemiological or economic' similarity. The solanaceous infecting haplotype B can infect carrot (Manjrez et al., 2016).

Consequently, although EPPO recommends regulation of Solanaceous haplotypes of 'Ca. L. solanacearum' only (EPPO, 2012), testing for other hosts than Solanaceae is included in this Diagnostic Protocol.

Detailed information on the distribution of 'Ca. Liberibacter solanacearum' can be found in Global Database (EPPO, 2019)

A flow diagram describing the diagnostic procedure for 'Ca. Liberibacter solanacearum' is presented in Fig. 1.

# CaLiso : Action 2

---

Epidémiologie

## Nous savions...

### • *Ca. L. solanacearum*

- Carotte
- région Centre et autres
- Pomme de terre
- haplotypes C & E
- Finlande et Espagne



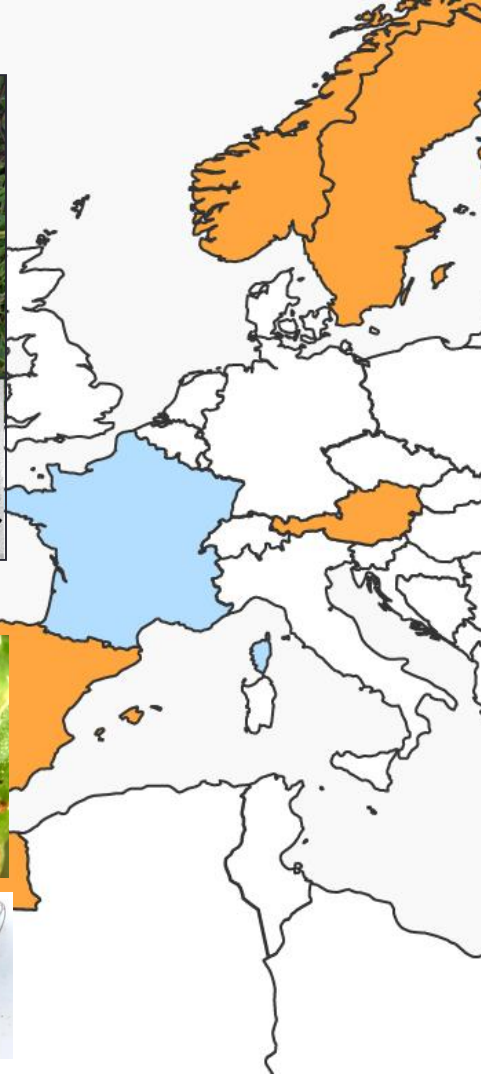
### • Psylles

- *Bactericera trigonica*
- *Trioza apicalis*



## Ce que nous ne savions pas...

- répartition géographique
- variabilité génétique ?
- risque transmission  
Apiacées ⇔ Solanacées ?
- vecteur(s) ?
- Ho : *B. trigonica*



# Objectifs Action 2

- 1) Estimer la prévalence et caractériser la maladie et ses vecteurs présents sur Apiacées et pommes de terre en France
- 2) Comprendre l'historique de la présence de la bactérie sur le territoire
- 3) Estimer le risque de la colonisation des autres hôtes de la bactérie en particulier des pommes de terre



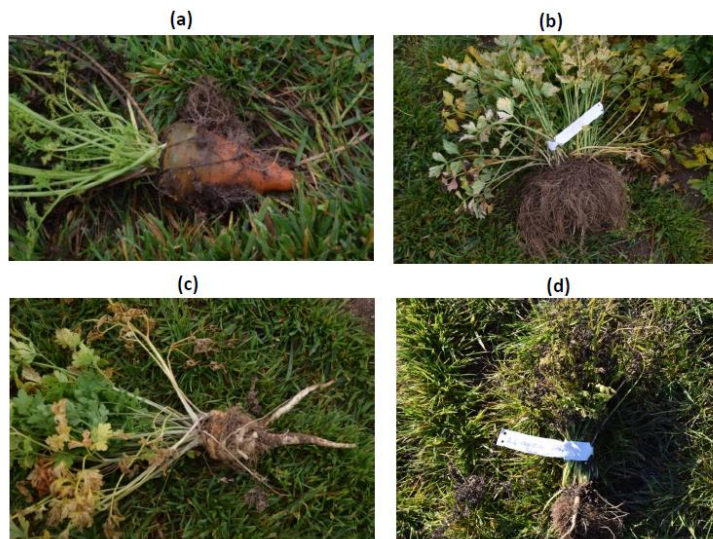
# Résultats

- **Sur Apiacées,**

1) la bactérie a été détectée en moyenne dans 55% des échantillons prélevés principalement en carotte porte-graine (2016, 2017) alors que peu de symptômes ont été observés.

2) Nouvelles plantes hôtes:

céleri, persil,  
fenouil,  
panais et  
cerfeuil



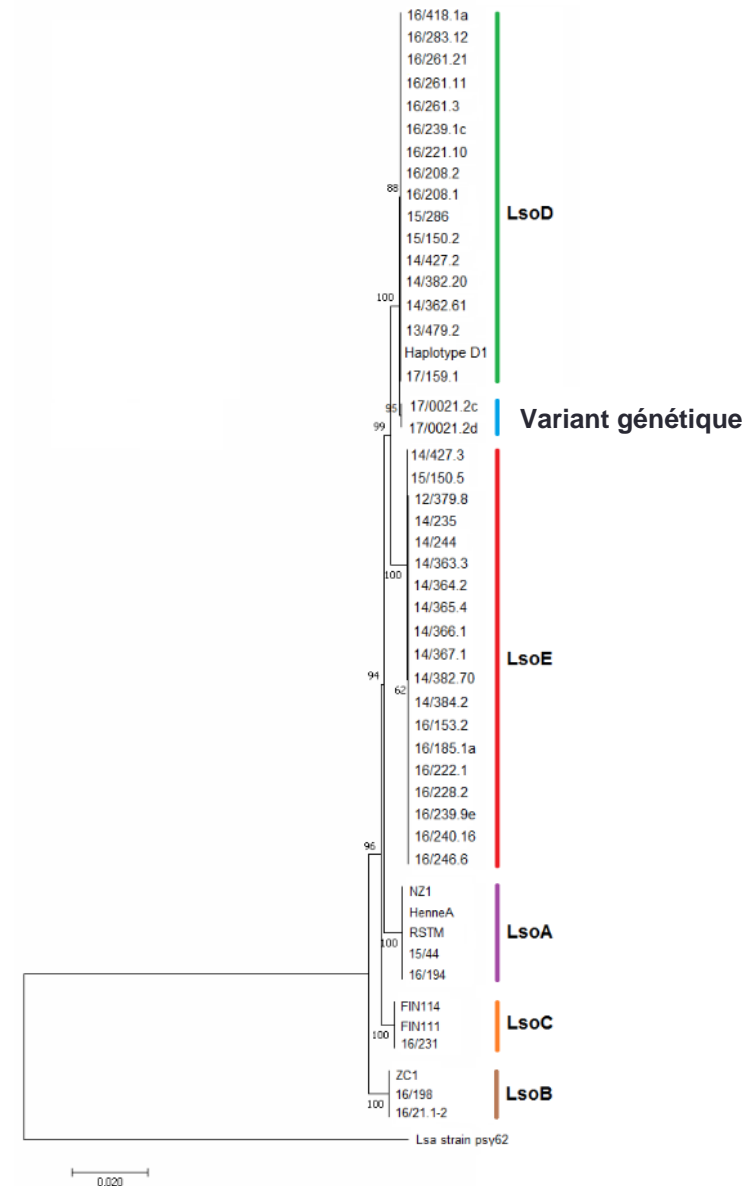
Symptômes associés à 'Ca. L. solanacearum': (a) carotte, (b), céleri, (c) persil, (d) cerfeuil (Hajri *et al.*, 2017)

# Résultats

- Sur Apiacées,
  - 3) haplotypes D et E ainsi qu'un variant génétique

4) psylles piégés majoritairement sur carottes porte-graine *Bactericera trigonica* Hodkinson

5) 65% des psylles porteurs de Lso



Arbre phylogénétique MLSA basé sur les gènes concaténés (*acnA*, *atpD*, *ftsZ*, *glnA*, *glyA*, *gnd* et *groEL*) (maximum de vraisemblance; 1 000 réplicats)

# Résultats

- **Sur pomme de terre,**

- 1) la bactérie n'a jamais été détectée.

- 2) peu de psylles piégés.

- 3) Pas de transmission observée entre carotte et pomme de terre

# CaLiso : Action 3

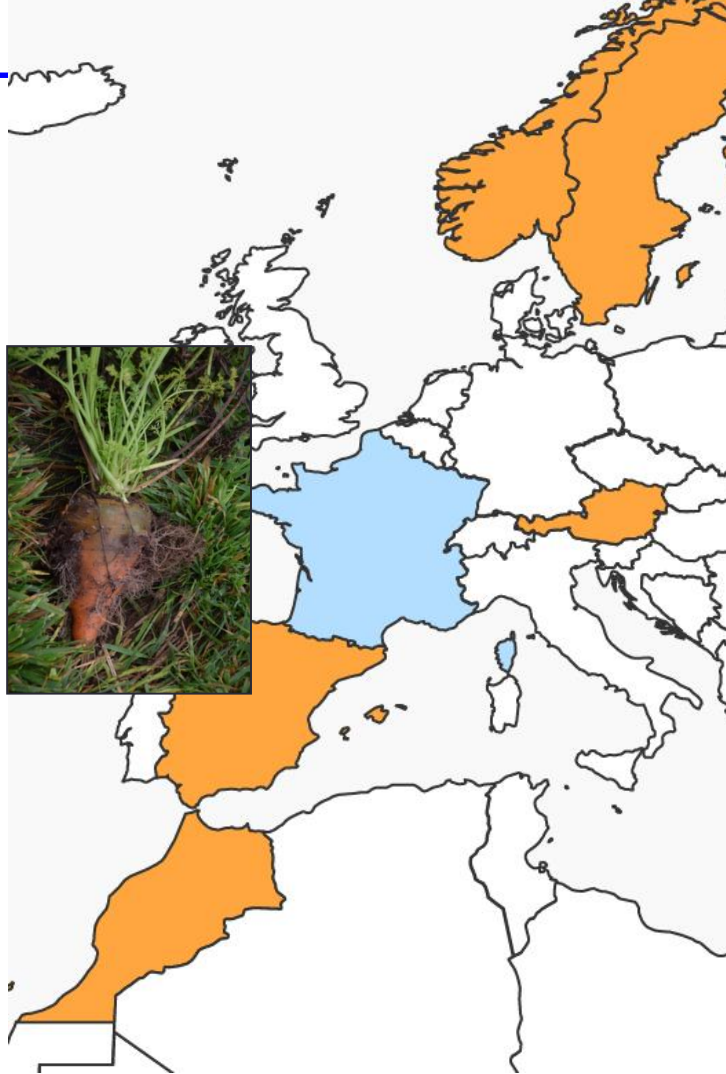
---

Biologie du vecteur et nuisibilité

## Nous savions...

- *Bactericera trigonica*

- ravageur présent sur carotte
- dans parcelles infectées en région Centre
- porteur
- connu comme vecteur efficace



## Ce que nous ne savions pas...

- biologie ?
- nuisibilité complexe  
psylle  $\leftrightarrow$  bactérie ?

# Objectifs Action 3

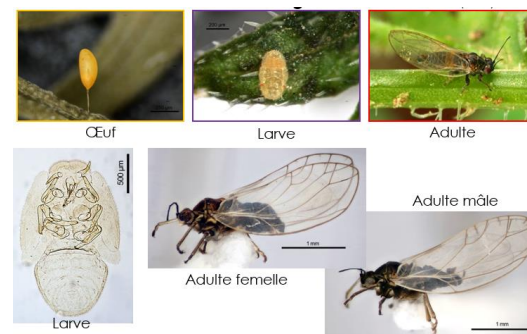
- 1) Recueillir des données sur la biologie de *Bactericera trigonica*
- 2) Evaluer l'impact du complexe psylle-bactérie sur la carotte porte-graine

...afin d'envisager des méthodes de lutte efficaces et des itinéraires techniques adaptés.



# Résultats

## Biologie de *Bactericera trigonica*

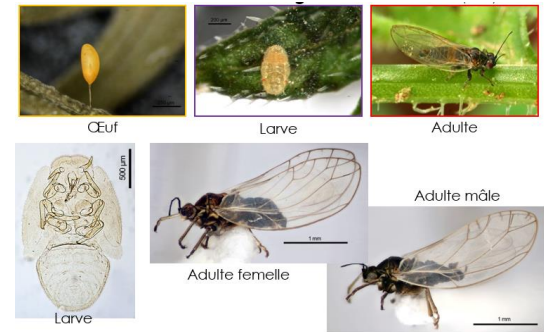


©D. Ouvrard

- **3 générations annuelles** en Beauce ?
- **Larves** passent l'hiver sur la culture
- Présence sur **toutes les parcelles suivies**, mais à des **niveaux de populations variables**
- Pics de captures parfois **très importants**
  - 2940 et 4297 individus en 1 semaine à Suèvres et Mer respectivement (capture avec cuvettes jaunes à eau)
- **Sex-ratio déséquilibré** dans les pièges jaunes

# Résultats

## Impact de *Bactericera trigonica* (essais sous tunnel)



©D. Ouvrard

Impact sur la culture (perte de rendement) constaté sous tunnel

→ quand les populations de psylles sont extrêmement élevées;

→ ces niveaux de populations n'ont jamais été observées en parcelles de multiplication!

# CaLiso : Action 4

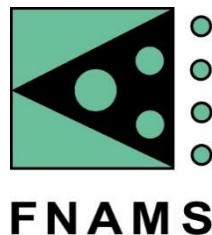
---

Management du projet

<https://www.anses.fr/fr/content/le-projet-caliso>

# Mise en œuvre

- 6 partenaires techniques:



- 3 partenaires associés:

- D. Ouvrard - Natural History Museum, UK
- M. Rolland puis T. Baldwin – SNES
- E. Geoffriau - Agrocampus ouest
- S. Eveillard – INRA Bordeaux

# Mise en œuvre

- 3 secteurs différents de la production végétale.
- Soutenu par Vegepolys et le RMT VegDiag



- Des équipes travaillant déjà sur le sujet, en collaboration.
- Recrutement d'un post-doc
- Budget:

Montant de la subvention demandée	200 378€	49,3%
Autofinancement	206 029€	50,7%
Coût total du projet	406 407€	

# Merci de votre attention....

---

<https://www.anses.fr/fr/content/le-projet-caliso>