



EUPHRESKO PHYLIB - ILVO

Kris De Jonghe



Institute for Agricultural and Fisheries Research

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO)

Plant Sciences Unit - Eenheid Plant

www.ilvo.vlaanderen.be

Beleidsdomein Landbouw en Visserij



Short presentation of ILVO

Institute for Agricultural and Fisheries Research Scientific Institute of the Flemish Community

Animal Sciences

Social Sciences

Plant Sciences

Technology & Food
Sciences

*-Functional Animal
Nutrition*

*-Animal Husbandry and
Welfare*

-Fisheries

-Crop Protection

*-Growth and Development
Biology*

*-Crop Husbandry and
Environment*

*-Applied Genetics and
Breeding*

*-Agricultural
Engineering*

*-Product Quality and
Innovation*

-Food Safety

Short presentation of ILVO

Scientific director

Martine Maes

Bacteriology

Johan Van Vaerenbergh

*Bart Cottyn
Elena Gavrilă
Annemie Hoedekie
Sofie Rombouts
Inge Van der Linden
Joachim Vandroemme*

Entomology/acarology

Hans Casteels

*Johan Witters
Nick Berkvens
Veerle Van Damme*

Mycology

Kurt Heungens

*Bjorn Gehesquière
Kris Van Poucke*

Nematology

Nicole Viaene

*Nick Berkvens
Nicole Damme
Lieven Waeyenberge
Wim Wesemael
Negin Ebrahimi*

Virology/phytoplasmas

Kris De Jonghe

*Matthias De Backer
Saman B. Kamangar
Noémi Van Bogaert
Rachid Tahzima*

Disease resistance in plants

Jane Debode

25 specialized technicians

Services



National Reference Laboratorium – Plant Health

Communication : *Annemie Hoedekie*



Diagnostic Centre for Plants

Quality coordinator: *Lutgart De Wael*



ISO 17025 – Test 340

Short presentation of ILVO

- **Virology: youngest discipline at ILVO (2007).**

- **Focus (all disciplines)**
 - **Quarantine & regulated organisms**

 - **Quality diseases and pests with important impact in agri/horticulture in Flanders / Belgium / EU**

- **Research & Diagnostic lab (DCP)**

ILVO Plant virology lab priorities



- Diagnostic lab**
 - Identification and optimisation of reliable, sensitive and fast detection and identification tools for viral pathogens.
 - Implementation of these methods in the DCP (Diagnosecentrum voor Planten - Diagnostic Centre for Plants)
 - If necessary, development of new diagnostic tools and procedures for the detection of virus-like pathogens.
 - Quality assurance (ISO17025) (*ELISA and qPCR*)

- Research lab**
 - Basic and applied research on virus problems with an economic impact in Flanders through projects and cooperation with other research institutes and universities.

ILVO Plant virology lab priorities (2)

Networking

- Flanders: policy makers, research centres, cooperatives, auctions, extension workers, private companies and other stakeholders
- Belgium: cooperation with the virus labs in the other Belgian regions (CRA-W).
- International: neighbouring countries (mainly research institutions), EPPO, EC-working groups, institutional cooperation, scientific meetings.

Short presentation of ILVO

□ **Fruit (*Malus*, *Pyrus*, *Cydonia*, *Prunus*, *Vitis*)**

Investigation of distribution and epidemiology of pear decline (*Candidatus Phytoplasma pyri*, PD) and apple proliferation (*Candidatus Phytoplasma mali*, AP) (FOD - project REPEDAP 1/3/2013-28/2/2015)

EUPHRESKO Project AOPHYT: Evaluation of factors determining distribution, impact, detection and characterization of apple proliferation and other fruit tree phytoplasmoses in the European Community

- **Apple proliferation phytoplasma**
- **Pear decline phytoplasma**
- **European stone fruit yellow Phytoplasma**



EUPHRESKO GRAFDEPI: Epidemiological studies on reservoir hosts and potential vectors of Grapevine flavescence dorée (FD) and validation of different diagnostic procedures for GFD (GRAFDEPI)

Short presentation of ILVO

□ Floriculture, horticulture and field crops

FYQUARSTAT, Masters thesis + EUPHRESCO project (PHYLIB):
Phytoplasmas and *Ca. Liberibacter* spp. of significance in
potato production and in other EU crops

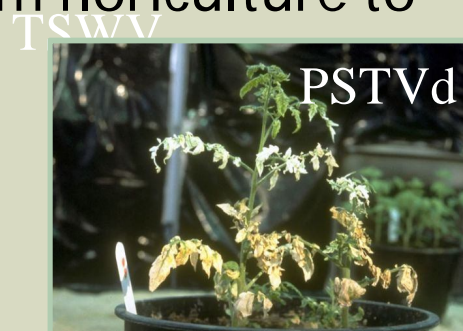
EUPHRESCO DEP2: evaluation of the transmission risk of
Potato spindle tuber viroid (PSTVd) from floriculture to
tomato and potato.

Ref. TOPOVIR (Dec.2009- Nov. 2011)



PhD thesis (Noémi Van Bogaert)

Insect-viroid interaction (focus on transmission risk)



Short presentation of ILVO

FOD project QUARANTSTAT: evaluation of the status of

- Raspberry ringspot virus**
- Strawberry mild yellow edge virus**
- Strawberry crinkle virus**
- Strawberry latent ringspot virus**

IWT project: Ecology and control of zucchini viruses

- Watermelon mosaic virus**
- Zucchini yellow mosaic virus**
- Cucumber mosaic virus**
- Papaya ringspot virus**

Vector-virus interaction (PhD)

- Aphids-PVY (protein receptors in the stylet)**

Current proposals awaiting funding:

TBRV, LChV, ArMV – status/PRA

virus detection in nematode vectors (diagnostic tests/validation/PT)

Potato Phytoplasmas at ILVO

2010-2011: FYQUARSTAT – Potato stolbur mycoplasma survey

Focus on grapevine and strawberry, limited survey in potato
Sensibilisation campaign – inspectors, extension workers and producers

Fytoplasma-ziekten bij druif



Geelverkleuring



Geelverkleuring + opkrullen

De ziekteverwerkers

De verwekkers van dit ziekte-“complex” zijn vaatbundelgebonden celwandloze bacteriën, fytoplasma's geheten, echter vaak beter bekend onder de term “mycoplasma's”. Zo komen in de druiventeelt het flavescence dorée fytoplasma, het bois noir fytoplasma (zwarthoutziekte) en het grapevine yellows fytoplasma voor.

Overdracht

De natuurlijke verspreiders (vectoren) van de fytoplasma's in verschillende gewassen, waaronder ook de druiventeelt, zijn cicaden.

Foto: voorbeeld van twee van deze cicaden:



Scaphoideus titanus

Anaceratagalla fibaulti

Fytoplasma's worden ook via enten overgebracht. Er is geen overdracht via zaden.

Symptomen

Alle fytoplasma-ziekten geven zeer gelijklopende symptomen op de plant:

- Algemene groeiachterstand van de struiken.
- Verkleuring van de bladeren (geel of rood afhankelijk van de variëteit) en het naar binnenkrullen van de bladeren. Bij witte variëteiten vaak gele vlekken, uitgroeiend tot lijnen, bij rode cvs. vaak gelijkaardig patroon, maar roodachtig.
- Aangetaste takken groeien niet volwaardig en blijven vaak dun en rubberachtig en worden in een later stadium broos. De aangetaste takken worden zwart en sterven af in de winter.



Opkrullen van het blad



Verminderde groei



Stengelsymptomen

- Bij vroege aantasting drogen de bloesems op en vallen ze af, waardoor er als gevolg hiervan een verminderde vruchtzetting is. Bij een latere aantasting (vaker het geval) wordt de schil dikker en kleuren de vruchttrossen bruin waarna ze verschrompelen.



Algemeen hangt de ontwikkeling van de ziekte sterk af van de temperatuur en van de variëteit van de wijnstokken.

Contact

Kris De Jonghe en Shana Vandierendonck
ILVO- Eenheid Plant, virologie
Burgemeester Van Gansberghelaan 92/2, 9820 Merelbeke
Tel. : 09 / 272 24 48 - Fax : 09 / 272 24 29
E-mail: kris.dejonghe@ilvo.vlaanderen.be
shana.vandierendonck@ilvo.vlaanderen.be

Le stolbur de la pomme de terre



Hôtes

Le **potato stolbur phytoplasma** attaque typiquement les *Solanaceae*.

Pomme de terre, tomate, poivron et aubergine sont les plantes-hôtes d'importance économique principales. La gamme d'hôtes de ce phytoplasme est en fait plus large (16 espèces au moins parmi 6 autres familles), y compris des adventices comme le trèfle, le liseron, l'ortie ou le séneçon.

Le stolbur se décline également différemment suivant l'hôte : bois noir de la vigne, rougissement du maïs, syndrome de basse richesse de la betterave...



Transmission

Les **cicadelles** sont les vecteurs de dispersion naturelle de ce phytoplasme.

Le stolbur de la pomme de terre peut également être transmis par **greffe**.

Il ne semble cependant pas transmissible par les graines et ne survit pas ou très peu dans les tubercules.

Confusion

Certains symptômes du stolbur de la pomme de terre peuvent être confondus soit avec ceux provoqués par le **virus de l'enroulement**, soit avec ceux dus à des troubles physiologiques comme le **boulage** ou les **germes fileux**.

Symptômes

Le développement de la maladie dépend du climat : il est lent durant les périodes fraîches et humides.

- **Décoloration des feuilles**, jaune ou violette selon les variétés, et **enroulement en cuillère**.



- Jeunes feuilles rigides et fanes érigées.

- Les tubercules deviennent mous, caoutchouteux.



- Possibilité d'apparition de tubercules et de stolons aériens à différents endroits de la tige, proche des aisselles.



- Quelques jours après l'apparition des symptômes, les fanes se dessèchent suite à la pourriture sèche des racines.

- Les tiges qui germent sont frêles et fragiles.



A gauche : plante à germes sains
A droite : plantes à germes grêles

Contacts

S. STEYER, T. OLIVIER et K. BELKHEIR
CRA-W - Département Sciences du Vivant
2, rue de Liroux, 5030 Gembloux
Tél. : 081/62 03 35
Fax : 081/62 03 49
E-mail : steyer@cra.wallonie.be
k.belkheir@cra.wallonie.be

Photos

I. EMBER, Fitolab Ltd., Hungary

Le rougissement du maïs

Hôtes

Le **potato stolbur phytoplasma** attaque typiquement les *Solanaceae*.

Le stolbur se décline également différemment suivant l'hôte : bois noir de la vigne, rougissement du maïs, syndrome de basse richesse de la betterave...

Transmission

La **cicadelle *Reptalus panzeri*** semble être le seul vecteur de dispersion naturelle de ce phytoplasme au niveau du maïs.

Le Bois Noir peut également être transmis par **greffe**, rarement par matériel de multiplication contaminé.

Il ne semble cependant pas transmissible par les graines.

Confusion

Les symptômes du rougissement du maïs sont parfois attribués à des *Fusarium* spp. ou des bactéries exigeantes.

Symptômes

Les symptômes apparaissent tardivement en juillet et consistent en un rougissement de la nervure foliaire principale, suivi du rougissement complet de la feuille et des tiges.



On observe également une déformation des épis et faible développement des grains.



Contacts

S. STEYER, T. OLIVIER et K. BELKHEIR
CRA-W - Département Sciences du Vivant
2, rue de Liroux, 5030 Gembloux
Tél. : +32 81 62 03 35,
Fax : ++ 32 (0) 81 62 03 49
E-mail : steyer@cra.wallonie.be
Références:

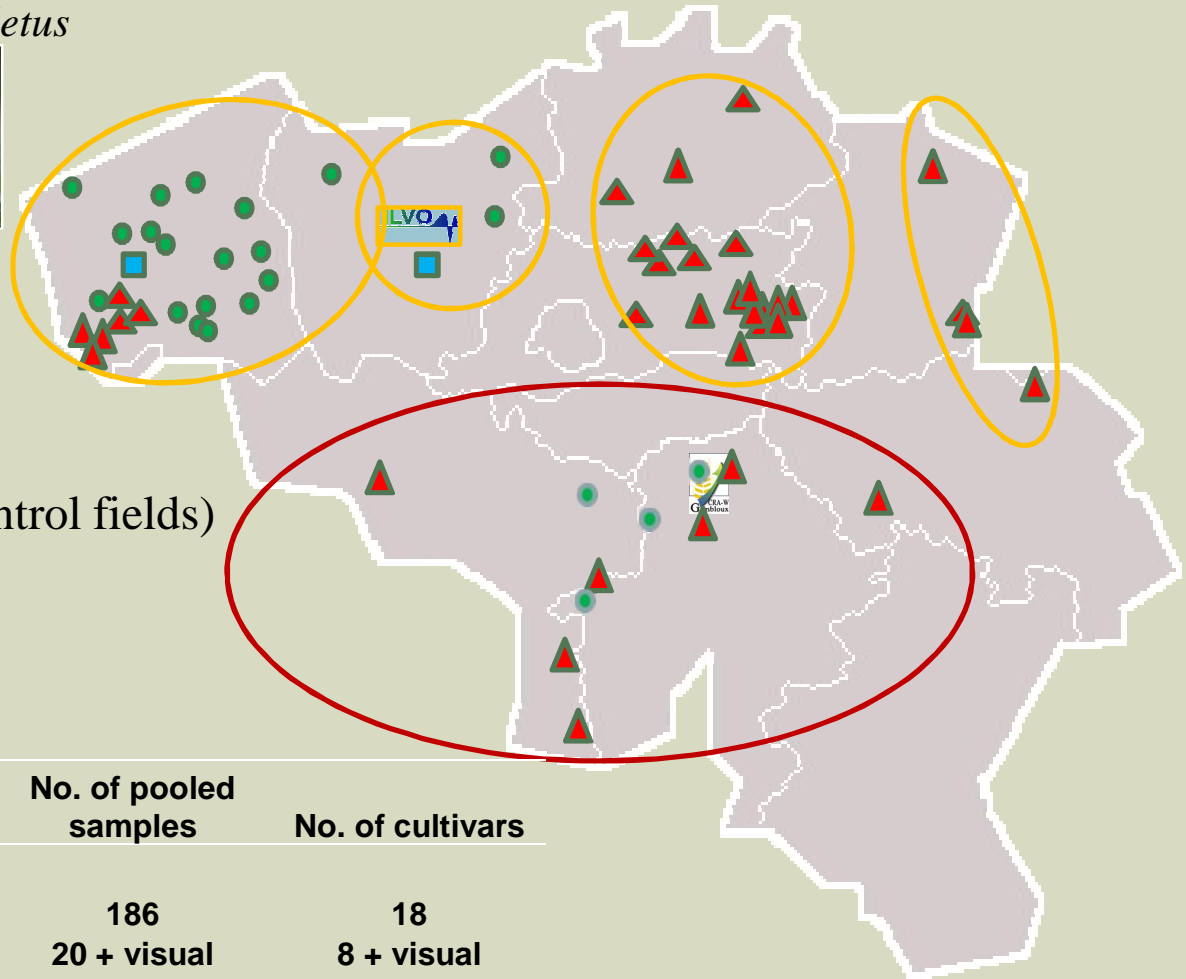
FYQUARSTAT: Potato stolbur phytoplasma survey



H. obsoletus

Sampling :

- ▲ Grapevine
- Strawberry
- Potato (pre/post control fields)



	No. of producers	No. of pooled samples	No. of cultivars
Grapevine	27	186	18
Potato	Pre/post control field + 2	20 + visual inspection	8 + visual inspection (102)
Strawberry/ <i>Rubus</i>	19	153	3

+ sampling of *Convolvulus* and *Urtica*

No positive samples – only *Ca. Phytoplasma ulmi* on *Rubus* found – first report

Potato phytoplasmas and *Liberibacter*

2012-2013: – PHYLIB

2012: MSc thesis – Rachid Tahzima

WP1. Collections: isolates

Ca. Phytoplasma solani

- *Rubus* and *Convolvulus* isolate

- On potato tubers (limited)

WP2. Detection and identification

Extraction

CTAB

DNeasy or Invitex Spin Plant

Phytoplasma

P1/P7 (or Tint) – R16F2/R2 – stol11 – fu5/ru3

real-time PCR (Christensen & Hodgets)

Qbol protocol - TufAY/Tuf cocktail

- 16S (P1-ATT/P625r)

Liberibacter

LsoF/OI2c (Li et al 2009 & Jagoueix et al 1996)

Ring testing ?

Potato phytoplasmas and *Liberibacter*

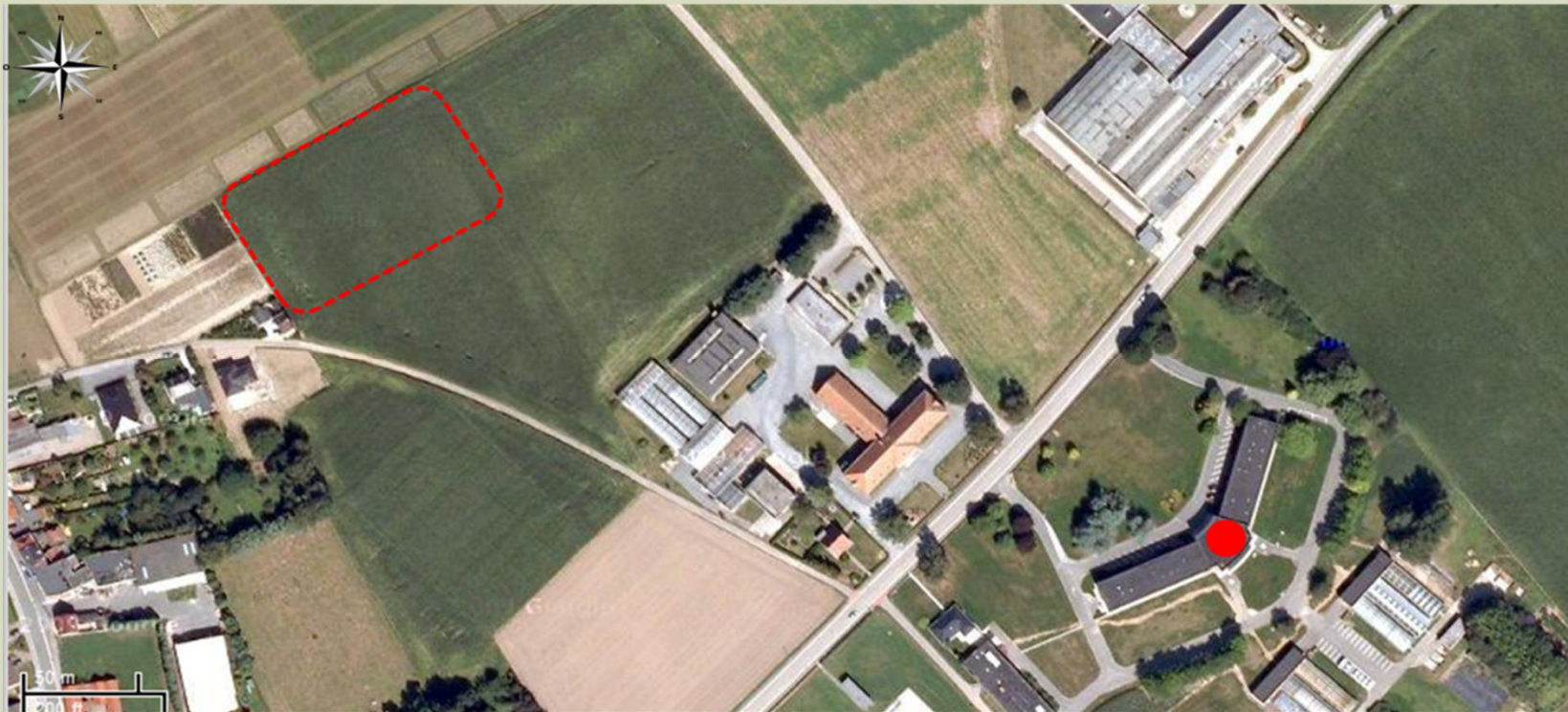
WP3. Epidemiology

Seed potato survey (2012)

Pre and post control field visual inspection

Sampling: 10 leaves/seed potato lot (spec. cv. And class)

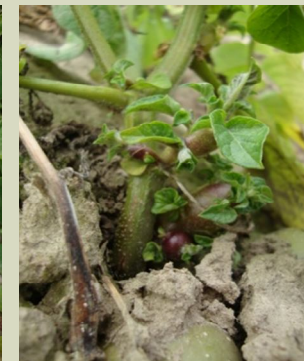
Inspection/sampling: vectors and possible source plants (weeds)



Potato phytoplasmas and *Liberibacter*

WP3. Epidemiology

Post control field 2012



Laboratory Work flow

Field Samples

- Potato Leaves Inspection
- Morphological Identification of Insects
- Weed Species Identification
- Phytoplasma/CLso DNA Extractions (*in planta* & *in insecta*)
- Phytoplasma/CLso Detection

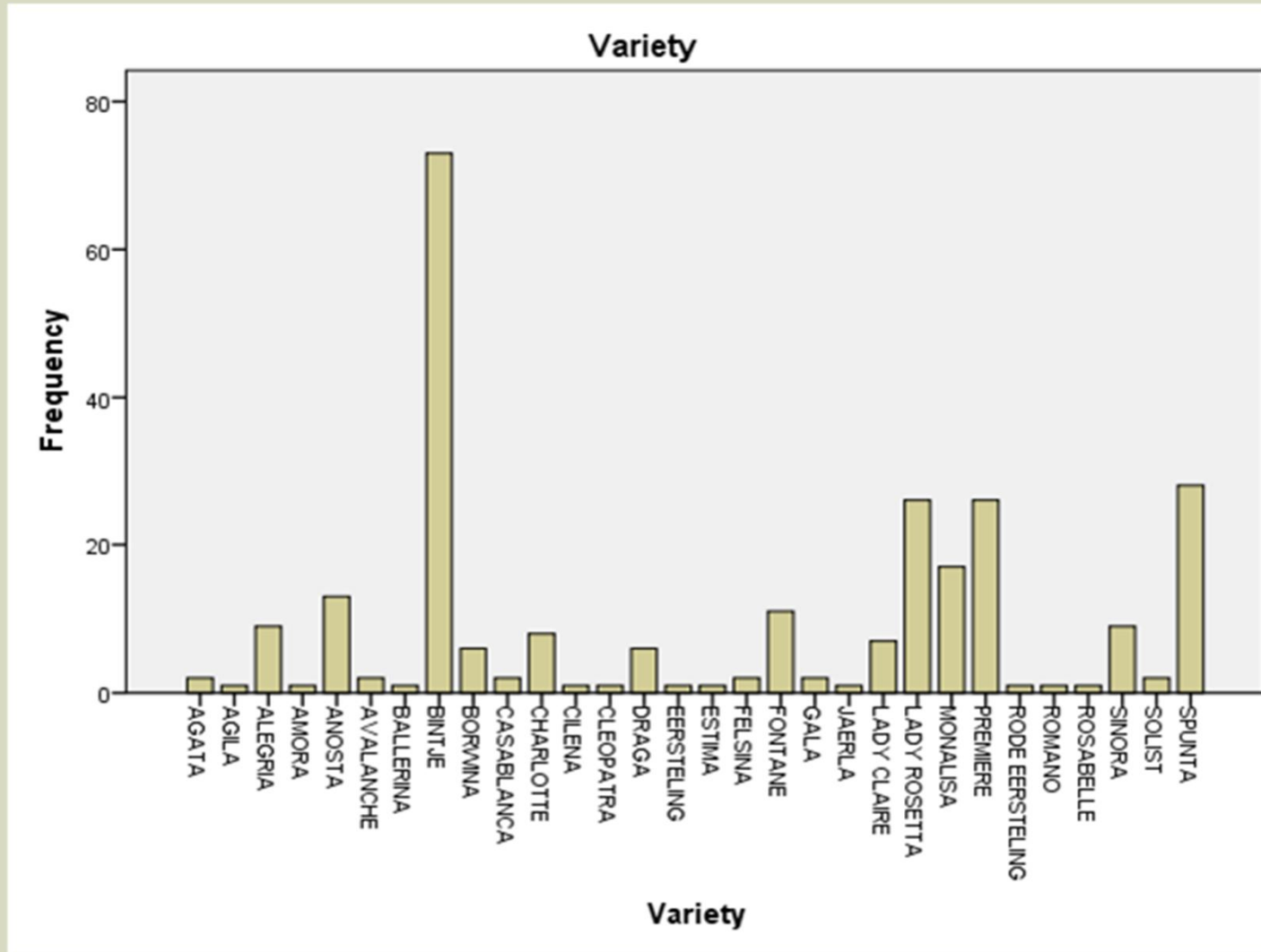
Molecular Identification of Phytoplasma/CLso

- **Plant** : 1Leaf/Species or cv/Test
- **Insect**: Bulk of Specimens/Field
- **DNA Extraction**: DNEasy/CTAB
- **Universal Primers , Nested and Specific PCR:**
- **P1/P7 & R16F2/R16R2 & fU3/rU5 & LsoF/OI2c**
- **RFLP Profiling** of Positive Samples
- **Sequencing** of *tuf* and R16F2/R16R2 (positive Phytoplasma samples – no CLso detected so far)
- Further characterisation in process



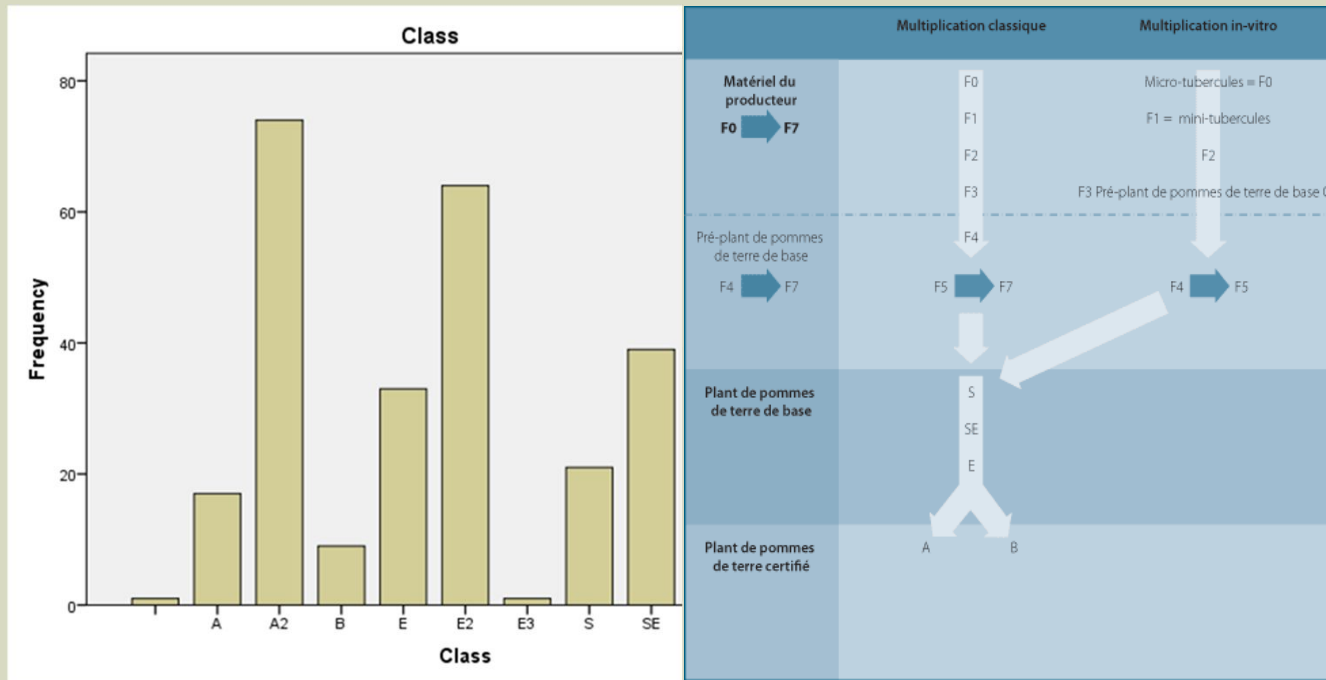
Potato phytoplasmas and *Liberibacter*

Relative importance of the most prevailing cultivars (%)



Potato phytoplasmas and *Liberibacter*

Distribution of the requested class (%)



Potato phytoplasmas and *Liberibacter*

Survey results:

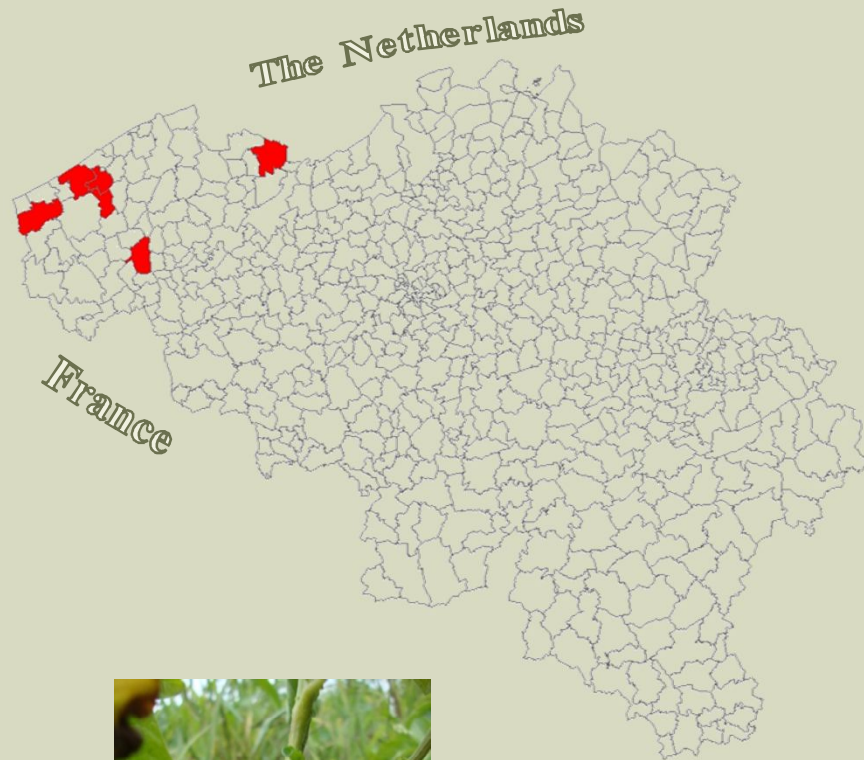
Ca Phytoplasma solani – identified based on tuf sequence results

Plot	Variety	Class	Symptoms	R16F2/R2	tuf band	16S band	lot ID	potato type	Origin	
				(10+2/250)						
1	021	PREMIERE	E2	Leaf	1 (2/26)	1	1	11 027057 003	early	Assenede
2		<i>Buffer plant Fontane</i>		<i>Aerial Tubers</i>	1	1	1	–		2011
3	029	PREMIERE	A2	Leaf	1	1	1	11 027129 009	early	Koekelaere
4	040	AGATA	SE	Leaf	1 (1/2)	1	1	11 084066 011	early	Middelkerke
5	041	AMORA	E2	Leaf	1 (1/1)	1	1	11 028544 012	intermediate	Veurne
6	042	ANOSTA	E2	Leaf	1 (2/13)	1	1	11 027057 011	early	Assenede
7	048	ANOSTA	A2	Aerial Tubers	1	1	1	11 053890 017	early	Roesselaere
8	061	CILENA	SE	Leaf	1 (1/1)	1	1	11 027057 006	early	Assenede
9	083	BALLERINA	B	Aerial Tubers	1 (1/1)	1	1	11 084066 014	early	Middelkerke
10	194	BINTJE	A2	Aerial Tubers	1 (2/73)	1	1	11 010752 011	late	Waterland-Oud.
11	247	BINTJE	A2	Aerial Tubers	1	1	1	11 027057 029	late	Assenede
12		<i>Buffer plant Fontane</i>		<i>Start aerial tuber formation</i>	1	1	1	–		2011

Potato phytoplasmas and *Liberibacter*

Origin of the infected seed potato lots

Leaf and stem symptoms



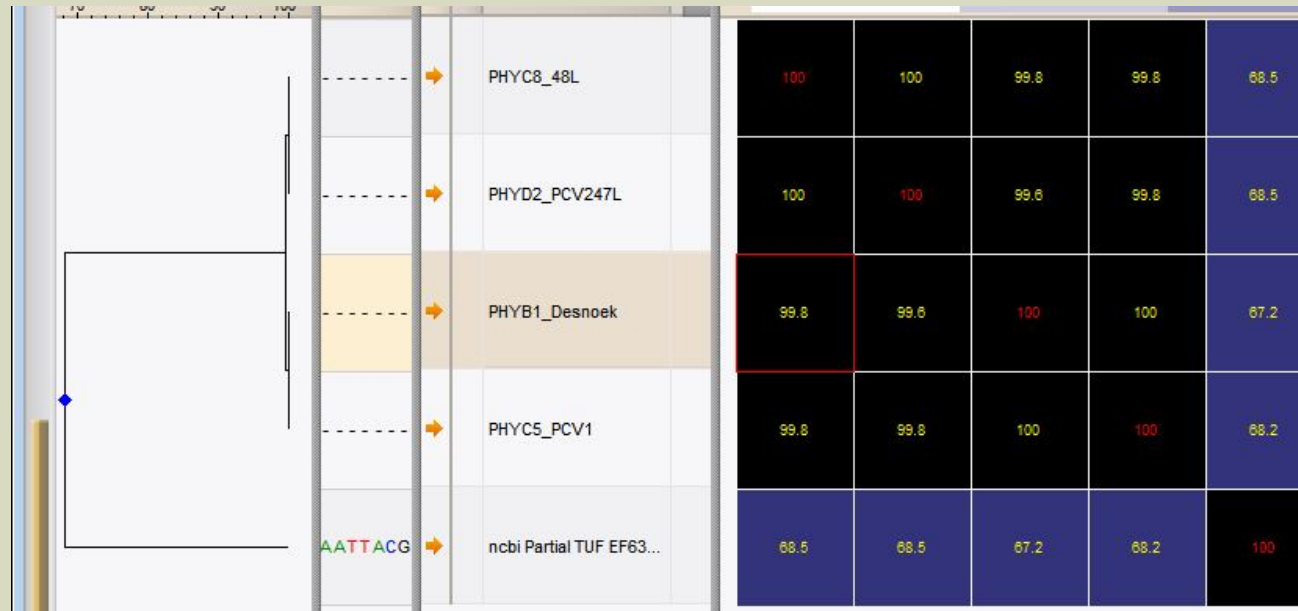
Potato phytoplasmas and *Liberibacter*

Tuber symptoms



Potato phytoplasmas and *Liberibacter*

Partial characterization based on the *tuf* gene sequence



Potato phytoplasmas and *Liberibacter*

Planning *Phytoplasma* research ILVO - 2013

General:

APOPHYT – REPEDAP: AP, PD (and ESFY)

GRAFDEPI: ring testing FD

Start *in vitro Phytoplasma* collection

PHYLIB:

Characterisation/genotyping

in vitro collection

Ring testing – validation of detection/identification methods

Follow up on findings in seed potato lots on location

Additional survey – potato, carrot, (celery ?), weeds, other ?

Vector monitoring (phytoplasma, *Liberibacter*)

Contact

KRIS DE JONGHE

Institute for Agricultural and Fisheries Research (ILVO)
Plant Sciences Unit

Address: Burgemeester Van Gansberghelaan 96/2
B-9820 Merelbeke
Belgium

Tel ++ 32 9 272 24 48

Fax ++ 32 9 272 24 29

E-mail: kris.dejonghe@ilvo.vlaanderen.be

Web: www.ilvo.vlaanderen.be