Université des Antilles

Ecole doctorale de l'Université des Antilles

Mémoire présenté en vue d'obtenir

L'Habilitation à Diriger des Recherches

Gestion alternative des bioagresseurs telluriques en conditions d'intensification écologique

(Juin 2016)

M Alain SOLER

Jury

Mme Juliette SMITH-RAVIN (UA, Pôle Martinique)

M Daniel IMBERT (UA, Pôle Guadeloupe)

M Didier M'BEGUIE (CIRAD Guadeloupe)

M Thierry WOIGNIER (CNRS/IRD Martinique)

M Harry OZIER-LAFONTAINE (INRA Antilles)

M Christophe ROOS (UA, Pôle Martinique)

Rapporteurs

M Amadou BA (UA, Pôle Guadeloupe)

M Didier M'BEGUIE (CIRAD Guadeloupe)

M Jean ROGER-ESTRADE (AgroParisTech)

Remerciements

Je tiens à remercier collectivement les collègues du CIRAD au Département PERSYST qui ont su faire preuve d'ouverture d'esprit en me soutenant depuis que j'ai commencé à développer ce travail passionnant sur les thématiques scientifiques concernant les résistances systémiques.

Un remerciement particulier pour Paul-Alex MARIE-ALPHONSINE à mes côtés depuis plus de 15 ans avec un engagement et une conscience professionnelle sans faille, il m'a permis malgré les difficultés de continuer à avancer. Merci à lui pour ses qualités humaines qui en font un compagnon de travail formidable.

Merci à Patrick QUENEHERVE qui au-delà des analyses de nématodes indispensables a toujours été là pour nous soutenir et apporter sa vision et son expérience à ce travail pionnier, en tout cas au sein du CIRAD. Merci à lui pour ses qualités humaines.

Ma gratitude va aussi à Mme Juliette SMITH-RAVIN pour m'avoir soutenu dans ma démarche scientifique, pour les collaborations diverses que nous avons eu ces dernières années et pour m'avoir parrainé pour mon inscription à l'UA pour cette HDR. Merci pour sa gentillesse et les contacts humains chaleureux que nous avons partagés. Merci aux collègues de son laboratoire à l'Université des Antilles ainsi qu'à Mme Soazig LEMOINE pour son accueil très sympathique à l'UA en terre guadeloupéenne.

Merci au Professeur ZUILY FODIL de l'université de Paris Créteil pour avoir partagé avec nous sa vision claire sur les caractères d'adaptabilité des plantes aux stress.

Mes remerciements vont aussi aux collègues étrangers de Cuba et d'ailleurs pour leur engagement aussi dans ces recherches, leur apport scientifique d'une qualité rare et les échanges enrichissants aussi bien scientifiques que sur le plan personnel.

Sommaire

Première Partie : Curriculum Vitae, Publications, Encadrements 4

1- Curriculum Vitae 4
2- Publications, Congrès 8
3- Encadrements et formations dispensées 11

Seconde Partie : Historique de carrière synthétique 12

Troisième Partie : Actions de Développement en Afrique de l'Ouest et du Centre 13

1- Contexte et Enjeux des projets de Développement 14
2- Appui filière ananas au Ghana (projet Banque Mondiale, 1994-1997) 14
3- Projet Régional Appui aux filières Afrique de l'Ouest et du Centre (Union Européenne) (1997-2000) 15

Quatrième Partie : Projets sur la qualité des variétés d'ananas et la sensibilité aux stress (températures et bioagresseurs) 18

1- Physiologie de la maturation et de la sénescence des fruits tropicaux *(1981-1992,Thèse)* 19
2- Intégration de nouvelles variétés d'ananas du CIRAD dans un système de culture *(2000 – 2007)* 21

Cinquième Partie : Le nouveau projet de recherche, *(2010 – 2015)* 26
'La gestion alternative des bioagresseurs telluriques en conditions d'intensification écologique'

1. Contexte et Problématiques 27
2. Démarche scientifique 28
   - *2.1. Concevoir des systèmes de cultures à base de rotation ou association avec des plantes de services*
   - *2.2. Intégrer les résistances systémiques dans les systèmes de culture pour contribuer à la gestion des bioagresseurs*
3. Résultats 33
   - *3.1. Intégrer des plantes de services dans les systèmes de culture*
   - *3.2. Intégrer les résistances systémiques dans les systèmes de cultures améliorés*
4. Conclusion 42

Sixième Partie : Perspectives 43

1. Intégration de plantes de services dans les systèmes de culture ananas 43
2. Les résistances systémiques contre les bioagresseurs 43
3. Les mécanismes de défense des plantes au cœur de l'intégration des processus aériens et souterrains 44

Annexe 1 Publications citées dans le texte
Annexe 2 Exemple de prototype de systèmes de culture ananas
Annexe 3 Carte phylogénétique des bactéries diazotrophes endophytes
Annexe 4 Choix de 5 publications
Annexe 5 Tableaux encadrement étudiants

Première Partie

Curriculum Vitae, Publications, Encadrements

1. Curriculum Vitae

Date de naissance 30 mars 1955

Adresse professionnelle

UPR GECO (Systèmes de culture bananes, plantains et ananas)
Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
Département PERSYST
Campus Agroenvironnemental Caraïbe (ex PRAM), BP214, 97285, Le Lamentin, Cedex 2 Martinique.

Téléphone : +596 5 96 42 30 92 Fax : +596 5 96 42 30 01
Adresse électronique : alain.soler@cirad.fr

Profession **Ingénieur Agronome - Agro-physiologiste**

Fonction **Recherche**

Régions d'expérience **Afrique de l'Ouest et du centre, Amérique centrale, Caraïbes, Asie**

Formations principales

Docteur de l'Université de Montpellier II (1991)
(Spécialité : Physiologie, Biologie des Populations)
Diplôme d'Ingénieur Agronome (1978)
(spécialité physique et chimie appliqués aux plantes et produits alimentaires)
Licence de Biologie et préparation du concours externe à l'Institut National d'Agronomie de Paris - Université Paul Sabatier / Toulouse / France (1975)
Baccalauréat scientifique D / Toulouse (1972)

Autres Formations

Formations sur les parasites racinaires tropicaux (nématodes) (1979)
- Centre INRA Sofia Antipolis (V Scotto de la Massèse)
- Centre INRA de Petit Bourg / Guadeloupe (A Kermarec)

2005 et 2008 Formations à la Communication scientifique en anglais
2006 Formation Gestion de Projet
2007 Formation « Personne compétente en Radio Protection »
attestation 07.073 dans le cadre de la mise aux normes QSE du PRAM
2008 Formation Encadrant Thèse
2008 M.O. Matières organiques en milieu tropical
2009 CPG / MS
2010 XLSTAT, ANR, Endnote
2011 Ecriture articles scientifiques en anglais, Techniques GC/MS-MS et MS3, Ionisation chimique. Maîtrise du logiciel d'exploitation des résultats
2013 Racin'Situ : formation à l'étude du système racinaire (grille à impact/ rhizotron)
2014 Techniques LC-MS Ion Trap (CIRAD Montpellier) analyses toxines fongiques
2014 Techniques RTqPCR (SybrGreen) (CIRAD Guadeloupe)

Compétences linguistiques Langue maternelle : Français
Langues de travail : Anglais,
Espagnol
(parlé et écrit, niveau 4 pour les 2 langues étrangères)

Expérience professionnelle

2006 - 2016 **CIRAD Département PERSYST, UPR26 Systèmes de culture bananes, plantains et ananas. Campus AgroEnvironnemental Caraïbes** (ex Pôle de recherche agro-environnementale de la Martinique)

- Evaluation des nouvelles variétés hybrides d'ananas du CIRAD
- Appui filière
- Contrôle bioagresseurs ananas et banane en conditions d'intensification écologique
- Responsable de la plateforme analytique Biochimie / Physiologie du PRAM.

2000 - 2005 : CIRAD-FLHOR - UPR26 Systèmes de culture bananes, plantains et ananas. Pôle de recherche agro-environnementale de la Martinique

- Responsable de l'évaluation du potentiel des nouvelles variétés hybrides d'ananas, et Chargé du développement des nouvelles variétés d'ananas, appui filière ananas
- Responsable de la plateforme analytique Biochimie / Physiologie du PRAM (analyses biochimie et physiologie des fruits, qualités organoleptiques et analyses de pesticides)

1997 - 2000 : CIRAD-FLHOR
Chef du projet régional d'assistance aux Organisations professionnelles de producteurs d'ananas d'Afrique de l'Ouest et du centre, basé à Cotonou (Bénin) champ d'activité = Guinée, Côte d'Ivoire, Ghana, Togo, Bénin et Cameroun (financement Union Européenne)

1994 - 1997 : CIRAD-FLHOR en poste à ACCRA (Ghana)
Expert-Consultant : gestion d'un projet national Banque Mondiale d'appui à la filière ananas.
Activités principales : Appui filière ananas et encadrement recherche mais interventions aussi sur les autres fruits, les légumes et les fleurs, à la tête d'une équipe d'agents du ministère de l'agriculture : Identification des principaux facteurs limitant la production de l'ananas au Ghana et actions pour le développement de la filière. Réalisation d'un projet de restructuration de la filière ghanéenne. Réalisation en collaboration avec le BEPAC ((Bureau d'étude et de Productions agro-pédagogiques) d'un outil de formation sur les techniques culturales de l'ananas.

1992 - 1994 : CIRAD-FLHOR Montpellier (France)
Expertises qualité et études de projets liés aux problèmes de qualité des fruits. Préparation de documents techniques pour un symposium Ananas à Abidjan. Réalisation de la plaquette Ananas critères de qualité co-éditée avec le COLEACP et l'OCAB. Réalisation d'outils de formation sur la qualité de l'ananas en collaboration avec BEPAC pour les professionnels de la filière directement intéressés par les aspects qualité du fruit.

1985 - 1991 : CIRAD-FLHOR (Côte d'Ivoire)
Responsable du service de physiologie Qualité du fruit
Programme de recherche axé sur la conservation et la maturation des fruits. Supervision d'un projet PNUD sur la réduction des pertes post-récolte dans la filière plantain en Côte-d'Ivoire. Encadrant principal d'une thèse sur la nutrition minérale de l'ananas réalisée dans le service et de DEA ou équivalents. Responsable de l'organisation des sessions de

formation sur le contrôle de qualité des agents du Ministère de l'Agriculture. Participation à l'élaboration de textes de normes de qualité de l'ananas export avec le Ministère de l'Industrie.

1982 - 1985 : CIRAD-FLHOR (Côte d'Ivoire)
Ingénieur agro-physiologiste
Recherche appliquée : Mise au point d'un traitement d'induction florale de l'ananas sous forme solide et utilisable en période diurne. Mise au point de l'utilisation de régulateurs de croissance modifiant la maturation et la coloration des fruits. Travaux sur la multiplication végétative accélérée de l'ananas.

1981 - 1982 : CIRAD-FLHOR (Côte d'Ivoire)
Ingénieur agro-physiologiste
Intérim de gestion de la plantation CIRAD d'ananas de 100 ha.

1980 (1978 -1980) Service militaire en tant que VSN / République Dominicaine
Formation d'étudiants ingénieurs agronomes, création d'un laboratoire d'analyses de routine des nématodes et formation du personnel local, puis mise en route d'un programme d'activité sur les cultures légumières, à l'Université Autonome de Santo Domingo (UASD).

Missions expertises

2000 : expertise filière ananas Trinidad et Tobago /IICA
2001 : expertise filière ananas Dominique / IICA
2001 : expertise (Côte d'Ivoire)
Appui technique Agrisol plantations Côte d'Ivoire
2004 : expertise filière ananas Ste Lucie
2004 : expertise filière ananas Antigua
2006 : expertise technique projet plantation Bio ananas sous cocoteraie au Zimbabwe et Mozambique
2006 : mission de coordination activités ananas à la Réunion
2004-2009 : 2 missions par an d'appui interne Cirad Guadeloupe
2007 : Expertise ananas Bio / MD2 au Ghana (Akosombo Volta river estate)
2008 : Expertise ananas Bio / West Africa Fair Fruit Company (Ghana)
2009 : Chine Expertise terrain et formation chercheurs + bases d'un partenariat
2011 : Mission de contact à Cuba pour mise au point d'un projet de collaboration sur les résistances systémique (Université de Ciego de Avila et Centro Bioplantas).
2015 : Mission de contact en République Dominicaine et à Cuba pour la mise au point de projets Interreg V pour l'ananas.

2. Publications, Congrès, Documents de synthèse

Articles de périodiques et revues à facteur d'impact (2004 – 2016)

- **Compost addition reduces porosity and chlordecone transfer in soil microstructure**. **2016**. Woignier T., Clostre F., Fernandes P., Rangon L., **Soler A**., Lesueur Jannoyer M. Environmental Science and Pollution Research, 23 (1) : p. 98-108.

- **Estimating root length density of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) from root counts on soil profiles in Martinique (French West Indies)**. Chopart J.L., Debaut-Henoque L., Marie-Alphonsine PA, Asensio R. and **Soler A.**, Fruits, **2015**, vol. 70(3), p. 143-151.

- **Field validation of chlordecone soil sequestration by organic matter addition. 2014.** *Clostre F, Woignier T, Rangon L, Fernandes P, Soler A, Lesueur Jannoyer M.Journal of Soils and Sediments,* **14** (1) : p. 23-33.

- **Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for quantitative determination of chlordecone in environmental micro-samples. 2014.** *Soler, A., M. Lebrun and T. Woignier. Fruits, 69(4),p 325-339.*

- **Soil microstructure and organic matter: Keys for chlordecone sequestration. 2013.** *Woignier T, Fernandes P, Soler A, Clostre F, Carles C, et al. Journal of Hazardous Materials 262:357-64.*

- **Differential response of two pineapple cultivars (*Ananas comosus* (L.) Merr.) to SAR and ISR inducers against the nematode *Rotylenchulus reniformis*. 2013.** *Soler A, Marie-Alphonsine P-A, Corbion C, Quénéhervé P. Crop protection 54:48-54.*

- **The expression patterns of bromelain and AcCYS1 correlate with blackheart resistance in pineapple fruits submitted to postharvest chilling stress. 2013.** *Raimbault A-K, Zuily-Fodil Y, Soler A, Mora P, Cruz de Carvalho MH Journal of Plant Physiology. 170 (2013) 1442-1446.*

- **A novel aspartic acid protease gene from pineapple fruit (*Ananas comosus* (L.) Merr.): Cloning, characterization, and relation to postharvest chilling stress resistance. 2013**. *Raimbault, A.K., Y. Zuily-Fodil, A. Repellin, A. Soler and M.H. Cruz de Carvalho. Journal of Plant Physiology, 170 (17) : p. 1536-1540.*

- **Sequestration of chlordecone in andosol : An alternative to decontamination. 2012.** *Woignier, T., P. Fernandes, M.A. Jannoyer-Lesueur and A. Soler European Journal of Soil Science 63:717-23.*

- **Low water transport in fractal microstructure of tropical soils: Application to chlordecone pesticide trapping. 2011.** *Woignier, T., M. Morell, O. Morell, L. Duffours and A. Soler. International Journal of Ecohydrology & Hydrobiology, 11(1-2): 121-128.*

- **Development and evaluation of a standard method for sampling and monitoring Hanseniella sp (symphylid) in pineapple. 2011.** *A. Soler; J.M. Gaude ; P.A. Marie-Alphonsine; B. Dole; P.Fournier ; F. Vinatier; J.C. Govindin ; P. Quénéhervé. Pest Management Science, 67(9): 1169-1177.*

- **Polyphenoloxidases and Peroxidases expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* (L.) Merr.) after a chilling injury.** *Raimbault, A., PA Marie-Alphonsine, JP Horry, M François-Haugrin, K Romuald, A Soler.* **2010***, Journal of agricultural and food chemistry, 59 (1) : 342-348.*

- **Growth Indicators for Different Pineapple Varieties Compared with the Reference Smooth Cayenne in West Africa and Reunion Island: A First Step towards Modelling Growth.** *Fournier P., Duval C., Soler A.* **2010,** *Agronomy journal, 102 (6) : 1572-1577.*

- **Management de la qualité dans la filière ananas en Martinique :** *F. Saudubray, JP Horry, PA Marie-Alphonsine, D Cros, A Soler.* **2006***, Fruits, vol.61, p.39-53.*

- **Caractérisation du profil aromatique de différentes variétés d'ananas par SPME en espace de**

tête /GC-FID. *A Soler, M Lebrun, MP Beauté,* **2006***, Fruits, 2006, vol.61 (3), 185-195.*

- **Physicochemical characterization of a new pineapple hybrid (FLHORAN41 Cv.).** *Brat P., Nguyen Thi Hoang L., Soler A., Reynes M., Brillouet J.M.,* **2004.** *Journal of agricultural and food chemistry, vol.52, n. 20, p. 6170-6177.*

Articles de périodiques et revues sans facteur d'impact (2004-2016)

- Une innovation agroécologique : la sequestration des pesticides. *Woignier T, Rangon L, Fernandes P, Clostre F, Lesueur-Jannoyer M,* ***Soler A***. Sciences Eaux et Territoires, 2015, n°16, 24-27.
- Les défenses naturelles des plantes contre les bioagresseurs : Un nouvel atout dans la mise au point de systèmes de cultures plus écologiques. ***A.Soler,*** *P. Marie-Alphonsine, C. Corbion, S. Marie-Luce and P. Quénéhervé.* 2012. Les Cahiers du PRAM,
- The pineapple systemic resistances, an ecological control of nematodes ? *A. Soler; P.A. Marie-Alphonsine; P.Quénéhervé.* 2011. Revue ISHS Pineapple news n°18.
- Growth indicators for Queen Victoria pineapple vs sum of temperature : basis for a heat –unit model of vegetative growth. *Dubois C, Fournier P, Soler A*. 2010. Revue ISHS Pineapple news n°17.
- Bait and trap method for sampling symphylid population in pineapple. *PA Marie Alphonsine, P Fournier, B Dole, JC Govindin,* ***Soler A***. 2010. Revue ISHS Pineapple news n°17.
- How to evaluate the resistance or tolerance of pineapple varieties to nematodes? ***Soler A****, Marie-Alphonsine P.-A., Topart P., Quénéhervé P*. 2009. Acta Horticulturae (ISHS) 822:191-198.
- Cirad pineapple breeding programme. *Horry JP, Quenehervé P,* ***Soler A***. 2007. Revue ISHS Pineapple news n°14.
- Ethephon on pineapple news about uses and regulations*. Soler A, Marie Alphonsine PA, Govindin JC and Fournier* P. 2007. Revue ISHS Pineapple news n°14.
- Growth characteristics of pineapple cultivars MD2 and Flhoran 41 compared with Smooth Cayenne. *P Fournier,* ***Soler A*** *and Marie Alphonsine PA*. 2007. Revue ISHS Pineapple news n°14.
- Synthèse sur les nouveautés techniques d'induction florales de l'ananas; Forcing in pineapples : What is new ?, ***A Soler****, CTeisson, B Dole, PA Marie-Alphonsine*, May 2006. Revue ISHS Pineapple news, n°13, 27-30.
- Synthèse sur les techniques d'amplifications horticoles rapides de l'ananas, Pineapple Multiplication, Practical techniques for small farms : *A Soler, B Dole* : May 2006. Revue ISHS Pineapple news, n°13, 23-27.

Ouvrages et Chapitres d'ouvrage

- **La séquestration des pesticides, une alternative à la dépollution. Résultats expérimentaux et modélisation.**Thierry Woignier, Florence Clostre, Paula Fernandes, Luc Rangon, **Alain Soler**, Magalie Lesueur-Jannoyer. Book GFP Groupe français des pesticides (sous presse **2016**).

- **Quantification de la chlordécone dans l'eau, les sols et les plantes par micro-extraction en phase solide et chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (SPME / GC-MS & MS/MS). Alain Soler**, Marc Lebrun, Yoan Labrousse, Thierry Woignier. Book GFP Groupe français des pesticides (sous presse **2016**)

- **Sequestering Pesticide with Organic Fertilizer or Organic Amendment.** Woignier T, Clostre F, Rangon L, Fernandes P, **Soler A**, Lesueur Jannoyer M. **2013.** "FERTILIZER TECHNOLOGY" edited by Sinha, Shishir; Pant, K.K.; Bajpai, S.: Fertilizer Technology I: Synthesis. Texas: Studium Press, LLC, , USA , pp. 319-344, ISBN: 9781626990449

- **Nutritional Composition of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.).** Sun, G.-M., Zhang, X.-M., **Soler, A**., Marie-Alphonsine, P., **2016**. In: Simmonds, M.S.J., Preedy, V.R. (Eds.), Nutritional Composition of Fruit Cultivars. Academic Press, 609–637.
- **Fruits et légumes, la santé du monde.** Hébert A. (ed.), De Bon H. (ed.), Ganry J. (ed.), **A Soler**, et al. **2009.**
- Etude collégiale : **Agriculture Biologique en Martinique**, **2005**
- **AnanAS technique de production**, Ouvrage de formation professionnelle pour adultes (Edition BEPAC). A. Soler. **1994**, 180p.

- **Ananas. Critères de qualité**. **Soler A**., **1992**. Paris, France, CIRAD-COLEACP, 48 p.
- **Thèse d'Université: Maturation et sénescence de l'ananas (*Ananas comosus* (L.) MERR)**. **Soler A.**, **1991**. Montpellier, France, USTL, 262 p.

Communications à Congrès récentes

- Bioprotection of Pineapple in Ecological Cropping Systems. 2014. *A. Soler, P.A. Marie-Alphonsine, C. Corbion, P. Fernandes, N. Portal Gonzalez, R. Gonzalez, A. Repellin, S. Declerck, P. Quénéhervé*. Acta 26. XXIX International Horticultural Congress (IHC2014): International Symposia on Pineapple, Mango and Papaya. (in press, conférence invité).

- Sequestering a persistent organochloride with organic fertilizer and organic amendment to increase food safety in Martinique. Conférence paper 20th Congress of soil science*. P. Fernandes, T. Woignier, F. Clostre , A. Soler , L. Rangon, M. Lesueur-Jannoyer.*
- Bioprotección de los cultivos tropicales en Martinica: experiencias y perspectivas con RIS en la piña y el banano. *Soler A, Marie-Alphonsine PA, Corbion C, Fernandes P, Portal* Gonzalez *N, et al.In BIOVEG2013, 7-10 mai, ed. Unica. Cuba; 2013.*
- A strategy towards bioprotection of tropical crops : Experiences and perspectives with ISR on pineapple and banana in Martinique*. Soler A, Marie-Alphonsine PA, Corbion C, Fernandes P, Portal Gonzalez N, et al.In Congrès: 6th meeting of IOBC-WPRS Working Group "Induced resistance in plants against insects and diseases": Induced resistance in plants against insects and diseases: leaping from success in the lab to success in the field, ed. IOBC. Avignon, France* 2013
- Can systemic resistances contribute to ecologically based IPM control of nematodes in pineapple ? *A. Soler; P.A. Marie-Alphonsine; P. Quénéhervé. Presentacion oral y cartel para el congreso International de Biotecnologia Vegetal, BIOVEG 2011 (4-6 mai), Cuba. (Présentation orale)*
- La chlordécone est-elle biodégradable et biodisponible? Quelques considérations issues de la littérature et résultats expérimentaux préliminaires. *H Macarie, D Devault, I Sastre Conde, L Rangon, A Soler, Y Labrousse, C Charpy-Roubaud, S Roussos, D Guiral, J Dolfing, I Novak, A Archelas, T Woignier. Communication au congrès du Groupe Français des Pesticides (GFP). Orléans, Mai 2011.*
- Postharvest chilling-induced variations in cysteine protease and inhibitor gene expression in pineapple fruits (Ananas comosus (L) Merr.) under blackheart physiopathy. *AK Raimbault , MH Cruz de Carvalho, A Soler, P Mora Y Zuily-Fodil. Poster congrès Suede 2011(10-14 avril), Umea plant proteases 2011.*
- Kepone sequestration in volcanic soils : clay microstructure and organic matter content. *Woignier T, Soler A, Fernandes P., Jannoyer-Lesueur M. Congrès ISMOM 2011 à Montpellier, 26 juin-1juillet. (Présentation orale)*
- La chlordécone est-elle biodégradable et biodisponible? Quelques considérations issues de la littérature et résultats expérimentaux préliminaires. *In XXXXIème congrès du Groupe Français des Pesticides 25-27 mai). Orléans Macarie H, Devault D, Sastre Conde I, Rangon L, Soler A, et al. 2011.*
- Effects of clay microstructure and compost quality on chlordecone retention in volcanic tropical soils: consequences on pesticide lability and plant contamination. *Woignier T, Fernandes P., Jannoyer-Lesueur M, Soler A, Achard R.2010 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. 1* – 6 August 2010, Brisbane, Australia.
- Evaluation of the potential of different rotation crops to control *Rotylenchulus reniformis* and *Hanseniella sp* in pineapple. *A.Soler; J.M. Gaude ; P.A. Marie-Alphonsine. Abstract for oral presentation for 7th ISHS Pineapple Symposium 2010. (Présentation orale)*
- Growth indicators of two new pineapple varieties compared with the reference Smooth Cayenne in West Africa and Reunion Island: A first step towards modelling growth. *Fournier P., Dubois C., Soler A. Oral presentation at 7th ISHS Pineapple Symposium 2010.*
- Development and evaluation of a standard method for sampling and monitoring Hanseniella sp (symphylid) in pineapple. *A. Soler; J.M. Gaude ; P.A. Marie-Alphonsine; B. Dole, et al. Oral presentation for 7th ISHS Pineapple Symposium 2010.*
- Enzymatic browning of Pineapple Flesh. *Raimbault AK, Cruz de Carvalho M, Soler A, Beauté MP, Zuily-Fodil Y. Journées internationales de l'UMR BIOEMCO. Paris. 2010 .*
- Relation entre la structure fractale des sols volcaniques et leur pouvoir de fixation de la chlordécone. *Thierry Woignier, A.Soler, Paula Fernandes, Laurent Duffours, Marc Lebrun. Congrès ADEME Paris, oct 2009.*
- Agroecological management of soil borne diseases in tropical horticultural crop by biocidal plants : Hypothesis and chosen methodologies. *Fernandes P., Deberdt P., Soler A. et al. 2008.*
- Manejo agroecologico de parasitos teluricos en hortalizas : Estrategia y metodologias *[Poster] Fernandes P., Deberdt P., Soler A. et al. 2008.*

- Determinism of Anthocyanins Biosynthesis in Pineapple Hybrid Flhoran 41 of CIRAD. *A.Soler*; *P.Fournier; 2005, Vth ISHS International Pineapple Symposium, Port Alfred , South Africa. (Présentation orale)*
- MARTAnanas A software for the management of pineapple plots; *A.Soler, P. Fournier, D. Cros. 2005 V th ISHS International Pineapple Symposium, Port Alfred , South Africa.*

3. Encadrements et formations dispensées

Volontaires du service Civil (VSC) 1 ou 2 ans **nombre 4**
Thèses **nombre 3**
et appui scientifique à une thèse du Sud

1- Thèse de M Assani Soulaimana. Université d'Abidjan **(1992)**
La thématique principale était la relation entre composition minérale du fruit et la maladie du 'jaune' de l'ananas, maladie physiologique due à un stress de tempétature élevée avant récolte. J'ai été l'encadrant principal de cette thèse dont les expérimentations se sont déroulées dans mon laboratoire de la station de recherche d'Adopodioumé (CI).

2- Thèse de Melle Raimbault Astrid-Kim, Université Paris EST **(2011)**
La thématique de cette thèse était la réponse de l'ananas à un stress de froid provoquant un brunissement physiologique (chilling injury). J'ai co-encadré cette thèse avec le Professeur Y. Zuily-Fodil (Directeur de thèse), la première partie s'est déroulée en Martinique dans mon laboratoire, la seconde dans le laboratoire d'écophysiologie moléculaire de l'Université de Paris-Est.

3- Thèse R Daumur (**2015 – 2018**):
Directeur de thèse: Mme J Smith-Ravin, Co-encadrement A Soler
Titre : Impact de l'interaction entre différents stress biotiques et abiotiques sur l'efficacité des défenses naturelles de l'ananas et du bananier.

4- Appui Thèse N Portal Gonzalez **(2013 – 2016):**
Titre : Expresión diferencial de metabolitos y compuestos de naturaleza proteica excretados por *Fusarium oxysporum f.sp. cubense (Foc)* al medio de cultivo en condiciones in vitro: Identificación de metabolitos y expresión diferencial de genes involucrados en la interacción Foc - banano.
Plusieurs accueils d'un chercheur Cubain dans le cadre de sa thèse entre 2013 et 2016. L'appui à cette thèse a consisté à faire différentes formations techniques (HPLC, LC-MS, GC-MS et RTqPCR). Des expérimentations ont également été réalisées dans mon laboratoire et à l'UA pour évaluer la mise en place de défenses de la plante et identifier des toxines fongiques produites par différentes races de *Fusarium oxysporum f.sp.cubense.*

Masters et Ingénieurs *(2000-2015)* **nombre 26**
Encadrement Etudiants en stage diplômant, M1, M2, DESS ou Ingénieur, (dans le cadre de projets FEDER, FEADER-RITA, MOM).
BTS Biochimie ou BTSA **nombre 10**

Formations dispensées
J'ai dispensé un enseignement niveau Ingénieur Agronome à l'Université Autonome de St Domingues et plusieurs enseignements dans le cadre de formations professionnelles dont une partie au cours de séminaires ou ateliers régionaux que j'ai organisés en Afrique de l'Ouest, dans la Caraïbe et en Chine. Plus récemment je participe à l'enseignement de la LP « les métiers des Biotechnologies végétales » à l'Université des Antilles en Martinique. (*Voir tableaux en annexe*)

Seconde Partie

Historique synthétique de carrière

Après l'obtention d'une licence en Physiologie végétale (Université Paul Sabatier de Toulouse) et en 1978 d'un diplôme d**'Ingénieur Agronome (INA-Paris Grignon),** spécialité 'Physique et Chimie appliqués aux plantes et produits alimentaires' dans le laboratoire INRA du Professeur C Costes, j'effectue deux formations complémentaires. L'une en nématologie à l'INRA d'Antibes Sophia Antipolis sous la tutelle du Professeur Scotto de La Massèse, l'autre à l'INRA de Guadeloupe dans le laboratoire de nématologie de M A Kermarec.

Affecté à St Domingues (VCAT, 1978-1980) à l'Université Autonome de Santo Domingo (UASD) sous la tutelle de l'INRA d'Antibes, j'ai assuré un enseignement en nématologie tropicale et assuré le montage d'un laboratoire d'analyses nématologiques et la formation d'un technicien.

Engagé par le CIRAD en Côte d'Ivoire entre 1981 et 1991, j'ai exercé une activité de recherche sur le contrôle de la maturation et la conservation des fruits tropicaux dont sont issus mes travaux de thèse soutenue en novembre 91 **à l'Université de Montpellier II** (**Physiologie Végétale) sous la direction du Professeur Jean D'Auzac.**

De retour en Afrique entre 1994 et 2000, **j'ai eu la responsabilité de la gestion technique et financière de 2 projets de Développement en appui aux filières ananas.** Le premier projet s'est déroulé au Ghana (1994-1997) sur financement de la Banque Mondiale. Le second, financé par l'Union Européenne, concernait 5 pays d'Afrique de l'Ouest et le Cameroun (1997-2000).

En Martinique depuis 2000 au sein du Campus Agroenvironnemental Caraïbe, mes activités au sein de l'UR26 sont centrées sur la conception de systèmes de culture ananas en conditions d'intensification écologique. De mes travaux consacrés à l'évaluation de nouveaux hybrides du CIRAD (2000 - 2006), est issu un nouveau projet de recherche : **La gestion alternative des bioagresseurs telluriques de l'ananas et des bananiers par les plantes de services et la stimulation des défenses systémiques.**

Je participe aussi à l'appui aux producteurs d'ananas d'une filière déclinante avec différents projets FEADER et de transferts d'innovation technologie en matière de gestion des bioagresseurs (RITA 2012-2016) : Normalisation Agriconfiance, reconversion variétale, expertises techniques, formation des producteurs, de techniciens et d'étudiants, montage de projets pour les producteurs.

J'ai créé au cours de cette période au sein du CAEC une plate-forme analytique (Laboratoire d'Agrophysiologie). A côté de mes propres thématiques de recherche, j'ai participé directement à plusieurs projets sur une thématique majeure aux Antilles, **la pollution par la chlordécone et sa remédiation** (Plans Nationaux d'Action Chlordécone, MOM). Cette plateforme a également permis d'initier des collaborations sous conventions spécifiques avec l'UA en Martinique. Elles ont contribué à un rapprochement UA - CAEC récemment concrétisé par l'intégration de l'UA au GIS qu'est le CAEC.

L'expérience acquise au cours de ma carrière, a ceci d'original qu'elle me permet d'avoir une vue d'ensemble des problèmes d'une filière de production exportation et des liens indissociables nécessaires entre la Recherche Scientifique et le Développement.

Troisième Partie

Actions de Développement en Afrique de l'Ouest et du Centre

(1994 – 2000)

1. Contexte et Enjeux des projets de Développement

De 1994 à 2000, j'ai pris successivement la direction de 2 projets de Développement en appui aux filières ananas en Afrique. Le premier était un projet national pour le Ghana financé par la Banque Mondiale et le second était un projet régional européen (Guinée, Côte d'Ivoire, Ghana, Togo, Bénin et Cameroun).

L'enjeu de Développement de ces 2 projets était la **compétitivité des filières africaines** face aux exportations vers l'Europe de filières d'Amérique latine, alors émergentes.

2. Appui filière ananas au Ghana (projet Banque Mondiale, 1994-1997)

Objectif : **Diagnostiquer les freins au développement de la filière ananas** au Ghana, proposer des actions correctives, **notamment en matière de contrôle des bioagresseurs de l'ananas** et les mettre en œuvre.

2.1. Contexte et moyens du projet au Ghana

Ce projet financé par la Banque Mondiale s'est déroulé au Ghana au sein du Ministry of Food and Agriculture (MOFA). A la tête d'une équipe d'agronomes et phytopathologistes du 'Crops services' et de l'Extension services' du MOFA, de 1994 à 1997, j'ai élaboré et mis en œuvre différentes actions d'appui en partenariat avec les organisations professionnelles ghanéennes.

2.2. Méthodologie : Diagnostic et transfert de technologie sous forme d'actions participatives des producteurs

Avec mon équipe nous avons réalisé un **diagnostic** de la filière sur la base d'une **typologie de la qualité des sols et de la technicité des exploitations**. Une expertise globale sur l'**état sanitaire des exploitations** a complété ce diagnostic.

Une **stratégie** simple d'amélioration de la production a été mise en œuvre. Elle consistait à améliorer les méthodes prophylactiques et les pratiques pour contrôler les nématodes, les symphyles et le wilt, sous forme d'**actions participatives avec les organisations de producteurs** bénéficiaires (parcelles de démonstration). L'information technique a été diffusée en organisant des **formations professionnelles** pour les producteurs et les techniciens du Ministère.

Nous nous sommes appuyés sur des **collaborations** avec différents services des Ministère de l'Agriculture, sur l'**Université d'Accra** (analyses de sols avec la chair de Pédologie) mais aussi avec des consultants locaux œuvrant pour d'autres projets (USAID). Un **colloque national de restitution**, organisé par nos soins et rassemblant environ 150 participants (producteurs et organisations professionnelles, universitaires et agents au service des Ministères), nous a permis d'exposer le bilan du projet après 3 ans d'activités.

Pendant cette période, j'ai été invité par le Directeur du 'Council for Scientific and Industrial Research' (CSIR), le Dr Owusu Benhoa (Professeur à l'Université d'Accra) à **siéger à la commission de sélection des projets de recherche de l'Université d'Accra concernant l'ananas**. **Le CSIR est un Comité qui supervise l'ensemble des institutions de recherche ghanéennes.**

2.3. Conclusion

La réussite globale du projet a généré des effets positifs en accompagnant une forte augmentation des exportations d'ananas (de 13000 t à 40000 t sur la durée du projet). J'ai ensuite été recruté à titre personnel comme 'chef de projet' pour gérer un 'Projet Régional Européen d'Appui aux filières Ananas d'Afrique de l'Ouest et du Centre' (PRAAOC).

J'ai donc acquis une expérience de la gestion technique et financière d'un projet d'envergure et le management d'une équipe de cadres et d'experts locaux dans un environnement anglophone. J'ai également pu développer des collaborations entre Institutions, organiser un colloque national et mettre en œuvre des formations professionnelles. Enfin, j'ai pu garder un contact direct avec la fonction d'encadrement et d'évaluation de projets de recherche.

Un rapport de synthèse de fin de projet est disponible [1].

3. Projet Régional Appui aux filières Afrique de l'Ouest et du Centre (Union Européenne) (1997-2000) (Côte d'ivoire, Ghana, Cameroun, Bénin, Togo et Guinée)

Objectif : Elaborer une politique commune d'exportation par transport maritime pour améliorer la compétitivité des filières de l'Afrique de l'Ouest et du Centre. Une harmonisation des filières était recherchée en termes de standard de qualité et de gestion de la production à travers des actions d'envergure régionale.

Les organisations professionnelles leader dans chaque pays étaient réunies dans un comité régional de suivi de l'ananas (CRSA) à la fois bénéficiaires du projet mais aussi agissant en tant que comité de pilotage. Participaient aussi à ce comité de pilotage le COLEACP, concepteur du projet, et bien sûr un représentant de l'Union Européenne.

3.1. Contexte et moyen du projet régional

C'est sur un fond de forte concurrence entre filières et organisations professionnelles que le projet a débuté. Les petites filières (Togo, Bénin, Guinée) recherchaient un accès au fret bateau alors que le Ghana, souhaitait conforter sa position sur les marchés européens face au plus gros producteur, la Côte d'Ivoire.

Pour mettre en œuvre le projet, j'ai monté une **cellule autonome** sur fonds propres comprenant 3 cadres et un secrétariat, appuyée par un réseau de consultants nationaux recrutés par mes soins. J'ai été recruté par l'Union Européenne sur ce projet à titre personnel et j'en avais la responsabilité technique mais aussi financière. Une part importante de mon activité consistait en de la gestion technique et financière, notamment pour réaliser les devis programmes permettant de débloquer les fonds européens. J'ai lancé et géré tous les appels d'offres internationaux nécessaires au projet et proposé leurs Termes de Références. J'étais responsable de la réalisation des rapports techniques et financiers d'exécution. J'ai personnellement mis en œuvre la plupart des formations régionales sous forme d'ateliers régionaux et la communication inter-filières qui n'avaient pas été sous-traitées par appels d'offre.

3.2. Quelques actions significatives organisées par le projet

3.2.1. Actions mises en œuvre après appels d'offres internationaux lancés par notre bureau.

- Etude assurance Qualité puis Etablissement de contrôles de qualité indépendants au niveau des ports via la contractualisation de sociétés spécialisées (Veritas et SGS).
- Recherche d'informations stratégiques *(notamment les prévisions hebdomadaires d'exportation vers l'Europe depuis l'Amérique latine)* et actions commerciales pilote.
- Séminaire à Abidjan à l'intention des agents portuaires des 6 pays pour une meilleure gestion des flux à l'export intégrant le système de contrôle de qualité indépendant de la production.
- Financement d'une étude et d'un séminaire 'Logistique' organisé par le COLEACP à Cotonou (Bénin).

3.2.2. Actions directement mises en œuvre par notre cellule et notre réseau de consultants.

- Conception du cahier des charges d'une charte Qualité régionale.
- Diffusion des informations techniques par notre réseau de consultants nationaux et par les 4 séminaires régionaux de formation que j'ai animés (Abidjan, Douala, Accra et Lomé). Diffusion également par un site internet du projet, dont une part en intranet, pour diffuser des dossiers sur les techniques de production et sur les marchés (revues de presse). Réalisation de parcelles de démonstration de paquets technologiques.
- Enquête régionale sur les résidus d'éthéphon contaminant les fruits avec des analyses au CIRAD.
- Vingt et une missions d'appui de la cellule aux OP ont été réalisées dans les 6 pays et un appui a été apporté aux OP localement dans la mise en place de leurs propres actions envers les producteurs.

3.3. Quelques impacts du projet

Les contrôles de qualité indépendants ont vite contribué à une harmonisation de la qualité des fruits des différents pays permettant des actions commerciales pilote sur les marchés européens. Nous avons renforcé les services d'appui des organisations professionnelles aux producteurs, grâce aux formations régionales et à notre réseau de consultants.

L'enquête « résidus éthéphon » a été suivie par la mise à disposition d'un agent CIRAD en CI pour déterminer les pratiques susceptibles de réduire la contamination, se conformer à la nouvelle réglementation européenne (LMR) et évaluer les risques éventuels pour les consommateurs. Par la suite le concept a été repris par le COLEACP, pour mettre en œuvre le PIP (Projet Européens sur les Pesticides).

3.4. Conclusion

L'évaluation du projet par un expert indépendant contracté par l'UE a conclu que, malgré les nombreux impacts positifs sur les filières ananas africaines, les concepteurs (COLEACP) ont mal évalué l'ampleur des différences entre ces filières. La difficulté était de vouloir fédérer autour d'une même politique d'exportation des acteurs aux mentalités et aux objectifs commerciaux trop différents. Pour la suite du projet, il a été recommandé que chaque filière bénéficie d'un projet

national approprié comme celui que j'avais développé au Ghana et dont l'impact avait été très satisfaisant.

Durant cette période, j'ai pu renforcer mon **expérience dans la gestion technique et financière** de projets d'envergure ainsi que le **management d'une équipe de cadres en réseau**. J'ai organisé des ateliers régionaux de formation professionnelle à l'intention de 'formateurs et encadreurs' des organisations professionnelles.

Les rapports techniques et le rapport de synthèse que j'ai rédigés sont confidentiels et ne sont pas disponibles. Les comptes rendus d'évaluation du Projet par chaque organisation OP du CRSA sont disponibles.

A noter que pendant cette période (1994-2000) axée sur des actions de développement, je n'ai évidemment pas eu la possibilité de faire des publications scientifiques en raison de la nature de mes activités.

Quatrième Partie

Deux projets de recherche sur ananas et autres fruits tropicaux

D'abord en Afrique puis à mon arrivée en Martinique, j'ai développé deux projets de recherche sur les fruits tropicaux. Le premier, en Côte d'Ivoire, était centré sur la physiologie de la maturation et de la sénescence de l'ananas et d'autres fruits tropicaux. Le second, en Martinique, traitait de l'évaluation de nouvelles variétés d'ananas à intégrer dans des systèmes de culture innovants utilisant peu de pesticides.

1. Projet de recherche sur la Physiologie de la maturation et de la sénescence des fruits tropicaux *(1981-1991)*

1.1. Contexte

J'ai monté un laboratoire de physiologie sur la station de recherche CIRAD d'Adiopodoumé en Côte d'ivoire spécialisé sur la qualité des fruits (1985-1986). J'y ai mené des recherches sur la qualité des fruits et sur d'autres aspects de la production d'ananas (induction forale, régulateurs de croissance). Une partie des résultats a été publiée dans la revue Fruits du CIRAD [2-7].

A partir de 1987, mes travaux sont orientés **sur l'impact de stress climatiques sur la sénescence prématurée de l'ananas.** Ils ont été valorisés par une **thèse en physiologie végétale soutenue à l'Université de Montpellier II** en 1991 avec le Professeur Jean D'Auzac comme Directeur de Thèse.

1.2. Stress de température au champ : maladie physiologique du 'jaune' de l'ananas

Liée à un stress de température avant récolte, la maladie du 'jaune' de l'ananas est une importante cause de refus de fruits à l'exportation. Ce phénomène s'apparente à une surmaturité de la chair alors que le fruit est encore immature extérieurement.

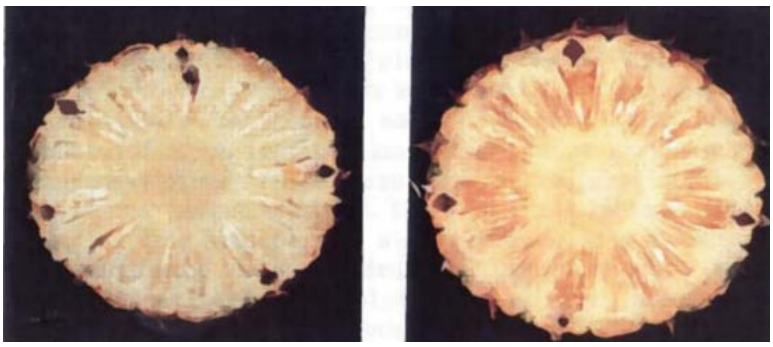


Fig 1 : Symptomatologie du 'jaune' de l'ananas : a) fruit normal b) fruit 'jaune'. *Apparition de zones translucides à partir du cœur des 'yeux'*

Cette maladie physiologique se traduit par une désorganisation des membranes cellulaires par attaque des lipides membranaires (α et β galactosidases mais aussi phospholipases souvent activées en cas de stress) avant que le phénomène ne soit visible à l'œil nu. Il en résulte un envahissement progressif des espaces intercellulaires par une solution qui peut être d'origine cellulaire ou vasculaire provoquant une certaine translucidité de la chair du fruit. Elle se traduit aussi par une augmentation de la densité des fruits et nous avons établi une relation entre l'intensité des symptômes et la densité. Cette technique d'immersion des fruits dans l'eau est utilisée dans les stations de conditionnement en période de risque d'apparition de la maladie.

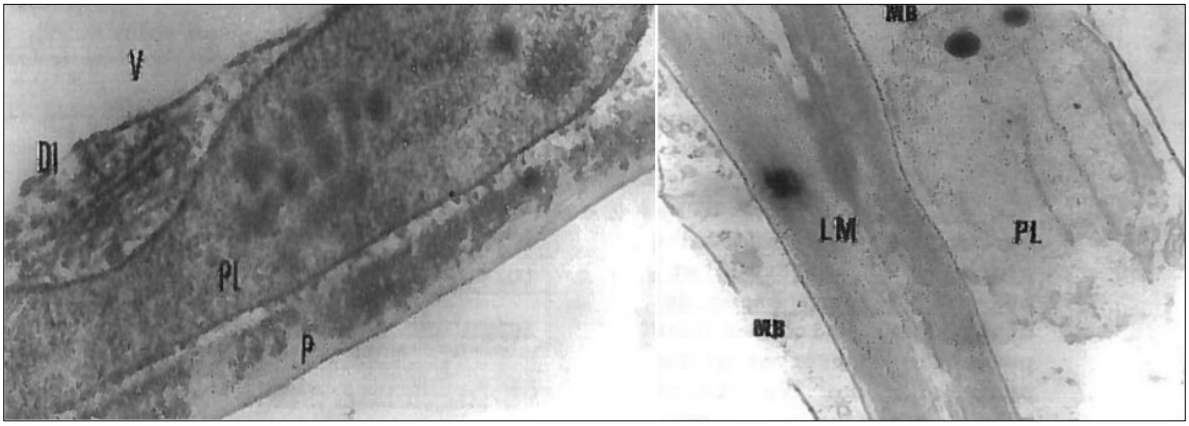


Fig 2 : Fruit normal avec structures cellulaires fonctionnelles (gauche) et fruit 'jaune' avec structures cellulaires dégradées (droite).

Il faut remarquer qu'une désorganisation des membranes cellulaires similaire a été observée dans le cas du brunissement interne de l'ananas provoqué cette fois par un stress de froid. Dans les 2 cas, il s'ensuit une dégradation des parois cellulaires et une disparition progressive des structures cellulaires (Fig 2). Les réactions cataboliques oxydatives conduisant à la mort cellulaire sont partiellement contrebalancées par le fonctionnement d'un système de protection antioxydant visant à rétablir l'homéostasie cellulaire et ralentir la sénescence (Fig 3).

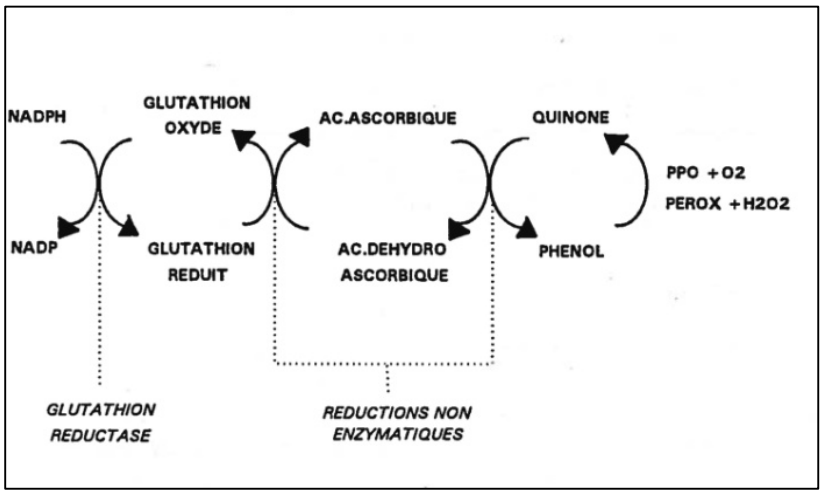


Fig 3 : Système de protection cellulaire redox utilisant les antioxydants naturels glutathion et acide ascorbique.

Ce système de protection est basé sur des réactions d'oxydo-réduction enzymatique du glutathion et de l'acide ascorbique (chimique), antioxydants naturels. La décompartimentation cellulaire met en contact des enzymes oxydantes (POD et PPO) et leurs substrats (composés phénoliques stockés dans la vacuole). La production d'éléments toxiques comme les quinones est compensée par leur régénération en composés phénoliques via les antioxydants naturels. D'autres composés toxiques sont issus de ce catabolisme oxydatif comme les espèces toxiques de l'oxygène (ions superoxyde et H_2O_2 en particulier). Malgré une réduction globale de la teneur en protéines, nous avons montré dans l'ananas une forte augmentation des

activités spécifiques d'enzymes liées à la protection des cellules contre ces molécules toxiques (SOD, CAT, APX) [8-10].

Des systèmes similaires de protection cellulaire se mettent place chez une plante soumise à un stress biotique ou abiotique [11, 12], nous les retrouverons également ci-après dans les études sur les défenses naturelles des plantes contre les bioagresseurs [13].

2. Projet de recherche pour l'intégration des nouvelles variétés d'ananas du CIRAD dans un système de culture *(2000 – 2007)*

2.1. Contexte

En Martinique, dans un contexte de restructuration profonde d'une filière ananas déclinante, l'objectif était d**'évaluer les qualités agronomiques, organoleptiques et de transformation de nouvelles variétés d'ananas hybrides du CIRAD afin de les intégrer dans des systèmes de culture innovants à proposer aux producteurs**.

Ce projet a été mené en partenariat avec le PARM (évaluations sensorielles), l'IRSTEA et différents acteurs de la filière dont la SOCOMOR pour la transformation usine. Le CIRAD a pris en charge plus particulièrement la conservation des fruits frais au froid et le volet agronomique dont la sensibilité aux bioagresseurs.

2.2. Typologie des exploitations en Martinique

Une typologie des exploitations martiniquaises produisant de l'ananas basée sur leur état sanitaire, leur technicité et sur l'usage des pesticides [14] a montré une tendance à l'utilisation trop intensive d'engrais chimiques et de pesticides (Fig 4).

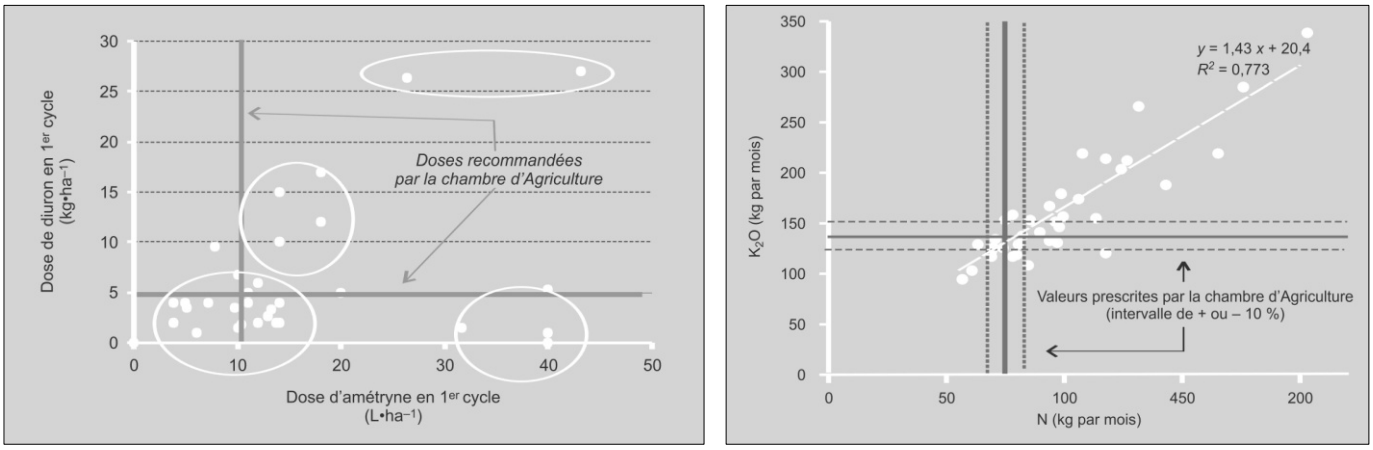


Fig 4 : Comparaisons entre les recommandations techniques et doses réelles appliquées (Engrais (droite) et herbicides (gauche).
Chaque point représente une exploitation (reproduction de Saudubray et al, 2006)

Cette analyse a permis de définir et d'initier les actions de renforcement de la qualité globale de la filière (normes Agriconfiance) pour entreprendre une reconversion variétale :

- Elaborer les pratiques culturales spécifiques aux nouvelles variétés ainsi que des techniques comme l'utilisation de vitro-plants et la multiplication horticole accélérée pour mettre en œuvre un plan de reconversion variétale [15, 16].

- Former des techniciens de l'OP aux bonnes pratiques agricoles.

- Développer un logiciel de gestion des plantations. Ce logiciel, MARTAnanas [17], permettait une programmation très précise de chacune des interventions au champ et leur enregistrement. La gestion des flux de fruits entrant à l'usine était un des éléments importants de ce logiciel.

2.3. Evaluation du potentiel agronomique et qualitatif des nouvelles variétés

Si les nouveaux hybrides CIRAD présentent des qualités organoleptiques exceptionnelles, ils ont aussi un potentiel pour la transformation supérieur aux variétés standards Cayenne lisse et MD-2. A l'opposé de ces qualités, j'ai mis en évidence des défauts difficiles à surmonter, une sensibilité aux bioagresseurs telluriques et une sensibilité au froid.

2.3.1. Des qualités organoleptiques et de transformation de haut niveau pour les nouvelles variétés d'ananas hybrides du CIRAD (PARM – CIRAD)

Des analyses biochimiques classiques et aromatiques [18] comparant nouvelles variétés d'ananas (Florhan 41 et 53) et variétés classiques du marché (MD-2 et Cayenne lisse) [19] combinées avec des analyses sensorielles par des panels de dégustateurs ont permis d'établir des cartes d'identité variétale. Les caractéristiques de transformation en usine et de conservation par différentes techniques industrielles agroalimentaires ont montré l'excellente tenue des nouveaux hybrides CIRAD par rapport aux variétés classiques et permis d'aborder la diffusion auprès des producteurs en Martinique et en Guadeloupe.

2.3.2. Sensibilité aux bioagresseurs telluriques

Le niveau de tolérance aux nématodes d'un certain de nombre de variétés a été évalué en expérimentations en milieu contrôlé (Tableau 1, [20]). Des variétés comme le MD-2 ou le RL53 (hybride Cirad) tolèrent mieux la présence des nématodes en multipliant l'émission de petites racines. Cependant, ce chevelu racinaire favorise l'augmentation de la population de *R. reniformis*, jusqu'à 100 fois plus de nématodes que pour des variétés dites sensibles. D'autres variétés sont particulièrement sensibles comme le Cayenne lisse ou le FlhoranL41 (hybride Cirad) et voient leur système racinaire rapidement détruit. Enfin certaines variétés dites 'sauvages' comme des Ananassoïdes peuvent se montrer pratiquement résistantes.

Les déterminants de cette variabilité, qu'ils soient biochimiques (composés issus du métabolisme secondaire) ou structuraux n'ont pas été recherchés à ce stade.

Tableau 1. Evolution de la croissance végétative et racinaire et des populations de nématodes à 6mois.

Varieties	Plant Weight (%)	Root Weight (%)	Nematodes / g Soil (infested/ control)	Resistance (R, T, S, VS)
MD2	-24,9	-21,8	133.6/2.6	T
Smooth Cayenne	-42.3	-53.8	32.2/0	S
Flhoran 41	-27.5	-49.2	28.2/2	VS
Flhoran 53	-17.9	+26.9	52,7/9	T
Queen	-36.7	-59.2	30.9/0	VS
Red A. ananassoides	-6.8	-33.8	2/1	R
Green A. ananassoides	-10.4	-61.2	353/1	T

R= resistant, T= tolerant, S= susceptible, VS= very susceptible

La disparition récente des molécules utilisées pour le contrôle des nématodes et des symphyles de l'ananas, sans alternative efficace, a fortement réduit l'intérêt des producteurs pour ces variétés. La recherche d'une gestion alternative des bioagresseurs telluriques est donc devenue un enjeu majeur pour la survie de la filière en Martinique et en Guadeloupe.

2.3.3. Sensibilité au froid

Le 'Brunissement Interne' (BI) du cœur de l'ananas est induit par le froid, le plus souvent lors de la phase de stockage à 7-8°C, les symptômes ne s'exprimant qu'après retour à température ambiante. On l'observe aussi avant récolte dans les zones de production où les températures descendent naturellement sous les 10°C. Quelques éléments concernant l'étiologie de la maladie et son mécanisme physiologique ont pu être expliqués [21-24], notamment la présence ou l'absence de gènes spécifiques de Polyphénol oxydases. Aucune technique satisfaisante pour son contrôle n'a été mise au point à ce jour.

Les hybrides CIRAD se sont montrés particulièrement sensibles au BI. L'expression des symptômes (intensité et apparence) est une caractéristique variétale (Fig 5). Seule la variété MD-2 ne développe jamais de symptômes de brunissement, ce qui résulterait du blocage de gènes codant pour les polyphénol oxydases mentionnés ci-avant [25].

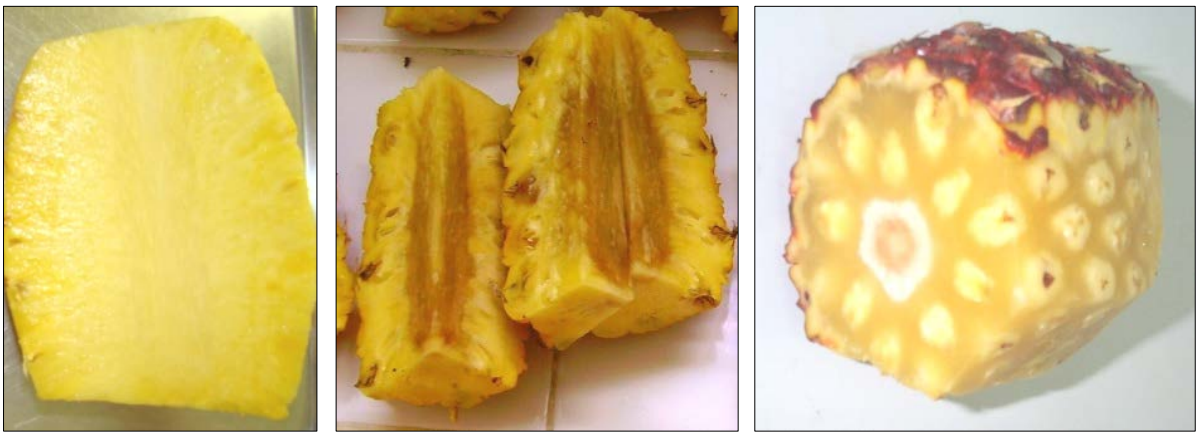


Fig 5: Expression différentiée des symptômes de BI dans 3 variétés d'ananas,
- MD-2 (gauche) = pas de BI
- Queen (centre) = forte coloration brune près du cœur
- FIhoran 41 (droite) = coloration brune moins intense mais translucidité de la chair très étendue.

Une procédure depuis la détermination du stade de récolte (modèle basé sur les ΣT° entre la floraison et la récolte) jusqu'aux modalités de mise au froid pour limiter les symptômes (utilisation de precooling et T° de stockage de12°C au lieu de 7°C) a cependant été proposée.

2.3.4. Conclusion

Les résultats de ces évaluations variétales laissent penser que toutes les variétés d'ananas n'ont pas les mêmes capacités à s'adapter à des modifications importantes de leur environnement. Cela m'a conduit à m'intéresser au déterminisme de la capacité d'adaptation aux stress biotiques ou abiotiques que montrent certaines variétés de différentes espèces végétales et voir ce qu'il en est de l'ananas et du bananier.

J'ai développé à partir de 2008 une collaboration avec le laboratoire d'Ecophysiologie moléculaire de Paris-EST spécialisé dans ce domaine. Des gènes particuliers voient leur expression modifiée sous l'action d'un stress. On peut observer une expression différentiée de ces gènes entre les variétés tolérantes et celles sensibles à un stress au sein de la même espèce [26]. Ces gènes auraient été conservés par la sélection naturelle au cours du temps, ils seraient de bons marqueurs de la capacité d'adaptation aux stress d'une variété donnée.

Cette collaboration s'est traduite par un projet de thèse sur la capacité de l'ananas à s'adapter à un stress abiotique (froid) en prenant le Brunissement interne comme modèle. J'ai co-encadré cette thèse entre 2008 et 2011 avec le Professeur Zuily Fodil de l'Université de Paris EST. Cette thèse est présentée ci-après dans cette 4ème partie parce qu'initialement l'objectif était une compréhension des mécanismes induisant un problème de qualité.

2.4. Thèse en écophysiologie sur le Brunissement Interne de l'ananas (A.Raimbault, 2011)

2.4.1. Réaction primaire au stress abiotique

Comme dans le cas de la maladie du 'Jaune' de l'ananas, un des effets primaires du stress de température est une fragilisation des membranes cellulaires mesurable par le relargage des électrolytes cellulaires en milieu isotonique. La peroxydation des lipides membranaires (Lipoxygénase) est souvent impliquée dans les mécanismes primaires de décompartimentation cellulaire mais des endoprotéases pourraient aussi être partiellement à l'origine de cette fragilisation.

2.4.2. Expression des symptômes : Polyphénol oxydases et Peroxydases

Les symptômes du BI sont principalement liés à l'expression de polyphénol oxydases. Nous avons montré qu'il y a un lien entre la variété, l'intensité des symptômes et le nombre d'isoformes de polyphénol oxydases (de 2 à 6 détectables par électrophorèse). Celles-ci n'apparaissent qu'après retour à T° ambiante suggérant une synthèse de novo après le stress. Ce n'est pas le cas des peroxydases qui sont actives dès la phase de froid et présentent moins différences en termes d'isoformes (Fig 6, [27]).

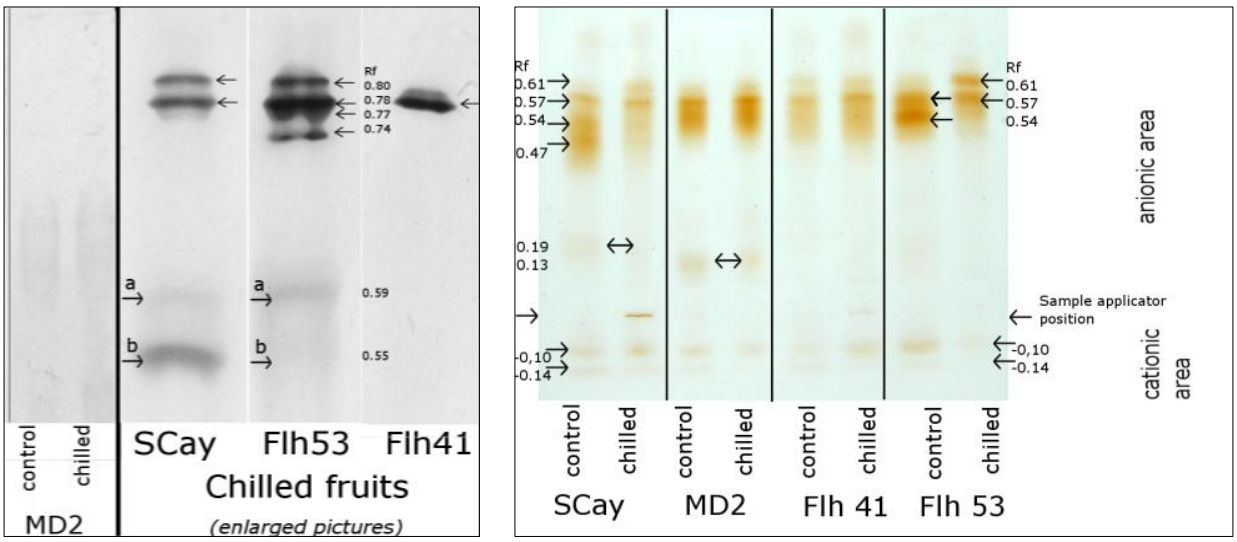


Fig 6 : Isoformes des Polyphenol oxydases (gauche) et des Peroxydases (droite) avant et après stress de froid pour différentes variétés d'ananas.

2.4.3. Gènes marqueurs des capacités adaptatives de la variété MD-2

Un autre résultat remarquable est l'expression du gène d'une cystéine-protéase (Broméline) et de son inhibiteur naturel, une cystatine (AcCYS1) [28]. Le stress de froid entraîne chez la variété tolérante MD-2 une forte diminution de l'activité de la protéase à la fois par diminution de la synthèse de l'enzyme et augmentation de la synthèse de la cystatine (Fig 7). Cette endoprotéase serait plus particulièrement impliquée dans le turn-over normal des protéines. La régulation de ces 2 gènes serait caractéristique de la capacité d'adaptation d'une variété à son environnement. Une telle régulation a déjà été observée pour ces mêmes gènes chez d'autres espèces végétales face à des stress de température, hydriques ou dus à une pollution par les métaux lourds [26, 29].

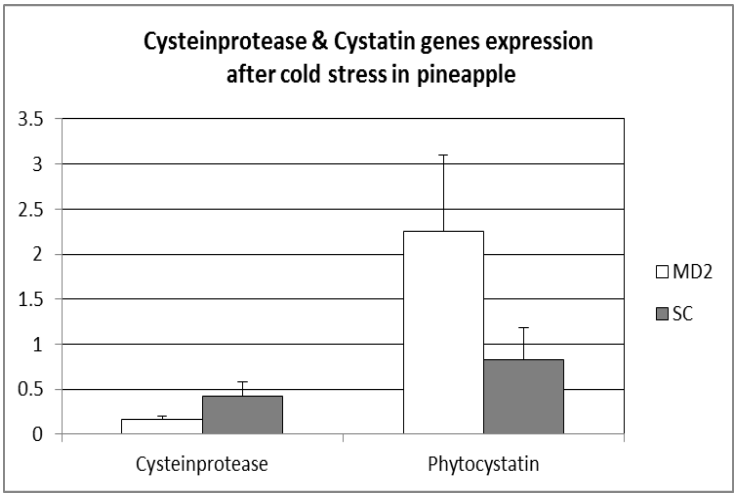


Fig 7 : Expression des gènes (RTqPCR) de la cystéine protéase (Broméline) et de la cystatine (AcCYS1) après chilling stress chez Cayenne lisse (SC) et MD-2.

Enfin chez le MD-2, une autre protéase (AcAP1), à acide aspartique, impliquée dans la maturation d'autres enzymes voit son activité très stimulée [30]. Ce serait un comportement de réponse adaptative de la plante face au stress, la plante ayant besoin de nouvelles activités enzymatiques pour adapter son métabolisme. Le séquençage complet du gène a été réalisé au cours de la thèse.

2.4.4. Conclusion

La variété d'ananas MD-2 présenterait donc des capacités d'adaptation aux changements de son environnement et en particulier aux stress. Les gènes étudiés dans cette thèse peuvent servir d'outils de sélection variétale.

Des capacités similaires mais vis-à-vis de stress biotiques comme les nématodes ont été mis en évidence dans d'autres espèces comme le riz, elles mettent en jeu les mêmes gènes [13]. Dans ce cas c'est la capacité de la plante à mettre en œuvre des défenses naturelles contre les bioagresseurs. La question se pose de savoir s'il y a un lien direct entre ces capacités adaptatives face à un stress abiotique (froid) observées chez le MD-2 et les résistances systémiques contre les nématodes**.** Cette thématique est développée dans la cinquième partie de ce mémoire « Nouveau projet de recherche ».

Rq : *Durant cette période j'ai développé une méthode d'extraction et d'analyse simplifiée de la chlordécone qui a été utilisée dans les diverses recherches au CAEC sur la pollution par ce pesticide et différentes publications résultent de ce travail [31-41]**.** La méthode a été également transférée au LDA 972.*

Cinquième Partie

Un nouveau Projet de recherche

La gestion alternative des bioagresseurs telluriques en conditions d'intensification écologique *(2010– 2016)*

1. Contexte et Problématiques

1.1. Contexte filière

L'objectif du projet scientifique de l'UR GECO du CIRAD à laquelle j'appartiens est de «concevoir des systèmes de culture bananier, ananas et plantain en conditions d'intensification écologique».

Les cultures intensives monospécifiques très consommatrices en intrants, comme l'ananas et les bananiers, ont conduit à un appauvrissement de la biodiversité dans les agrosystèmes et une prédominance des organismes phytopathogènes. Par ailleurs, le contexte sociétal et réglementaire actuel se traduit par un retrait quasi-total des pesticides ne permettant plus le contrôle efficace des bioagresseurs. La seule alternative utilisée par les producteurs est une jachère spontanée plus ou moins longue après destruction de l'ancienne culture.

Il y a urgence à trouver une alternative à ces systèmes de culture obsolètes. L'intensification écologique (Griffon, 2009) est devenue un des axes majeurs au CIRAD. Elle signifie concevoir des systèmes de culture sans pesticide et valider des pratiques culturales permettant de rétablir des fonctions écosystémiques dans l'agrosystème qui assureront entre autre une meilleure régulation naturelle des équilibres entre populations de micro-organismes bénéfiques et pathogènes. De tels agrosystèmes en étant plus respectueux de l'environnement répondront mieux aux attentes sociétales actuelles.

1.2. Systèmes multi-espèces

La combinaison de plusieurs espèces cultivées au sein de l'agrosystème permettrait d'obtenir une plus forte productivité globale, une meilleure régulation des bioagresseurs, d'autres services écosystémiques importants et une plus forte rentabilité économique [42].

Il était donc intéressant d'explorer les possibilités d'adapter ce concept de systèmes multi-espèces au cas de l'ananas. Plante au caractère épiphyte marqué avec un système racinaire peu développé, elle est sensible aux bioagresseurs du sol que sont les nématodes et les symphyles. Elle tolère mal la compétition pour les éléments nutritifs, la lumière ou l'eau avec d'autres plantes. Compte tenu des fortes densités de plantation de l'ananas, l'utilisation de plantes de services doit *a priori* se faire dans le cadre d'une rotation assainissante.

1.3. Les résistances systémiques induites

Les résistances systémiques peuvent être induites par des éliciteurs chimiques, par des bactéries de la rhizosphère [43-47], par des endophytes (mycorhizes [48, 49] et rhizobactéries [50-54]). Leur efficacité est démontrée depuis plusieurs années chez beaucoup de plantes cultivées [55] et ce champ d'investigation est redevenu important depuis quelques années. Les résultats de la thèse en écophysiologie sur le Brunissement interne de l'ananas nous confortent dans l'idée que des caractéristiques adaptatives existent aussi chez l'ananas. Nos expérimentations préliminaires confirment que la capacité à développer des résistances systémiques contre leurs bioagresseurs existe pour les 2 espèces végétales ananas et bananier mais serait variété-dépendante.

Associées à l'utilisation de plantes de services assainissantes, ces défenses naturelles non spécifiques pourraient contribuer à une gestion alternative des bioagresseurs dans des systèmes de production plus écologiques pour l'ananas et le bananier [48, 50].

1.4. Stratégie de recherche pour la bioprotection de l'ananas et du bananier

Nous avons proposé, en collaboration avec des collègues de diverses institutions de recherche, une stratégie de recherche pour la bioprotection de l'ananas et des bananiers en conditions d'intensification écologique basée sur les hypothèses suivantes :

1) Les populations de bioagresseurs du sol peuvent être fortement réduites par l'introduction dans l'agrosystème de plantes de services non-hôtes en rotation et/ou en association avec les cultures principales. La sélection de ces plantes de services doit aussi s'appuyer sur des traits fonctionnels tels que la production de biomasse, la fixation d'azote, leur possible contribution aux équilibres au sein de la microflore de la rhizosphère ou encore leur effet positif sur le potentiel de mycorhization des sols.

2) L'utilisation des résistances systémiques nécessite des variétés d'ananas ou de bananiers aptes à adapter leur métabolisme aux changements du milieu et aux stress biotiques (bioagresseurs) et abiotiques (sècheresse, température, salinité…) qui en résultent. Les résistances systémiques contre les bioagresseurs pourraient n'être qu'un aspect de la capacité de la plante à une adaptation globale de son métabolisme aux stress.

3) Les systèmes racinaires de l'ananas et des bananiers abritent des bactéries endophytes non pathogènes, en particulier des diazotrophes. Elles induisent souvent des résistances systémiques et pourraient être utilisées au champ de manière plus efficace et plus écologique que des éliciteurs chimiques.

Dans cette stratégie de bioprotection *[56]*, le système de rotation/association avec des plantes de services constitue une base agroécologique indispensable à l'expression du potentiel de défense de la plante contre les bioagresseurs par les résistances systémiques. La culture principale pourrait ainsi contribuer directement à la gestion des bioagresseurs.

2. Démarche scientifique

La démarche scientifique repose deux thématiques importantes, la conception des systèmes de cultures multi-espèces pour l'ananas et l'intégration dans ces systèmes de culture des résistances systémiques comme pratique contribuant à la gestion des bioagresseurs.

2.1. Concevoir des systèmes de cultures à base de rotation ou association avec des plantes de services.

2.1.1. Objectif et moyens

L'objectif est de concevoir des systèmes de culture intégrant une ou des plantes de services assainissantes dans une rotation culturale avec l'ananas pour une gestion plus écologique des bioagresseurs telluriques tout en améliorant les qualités biophysiques du sol.

Cela nécessite de déterminer le statut d'hôte de plantes dites de services vis-à-vis des bioagresseurs puis de les évaluer dans des rotations expérimentales. L'arrangement spatio-temporel des différentes cultures de la rotation peut aussi contribuer à donner une certaine durabilité à l'assainissement en ralentissant la ré-infestation entre parcelles. Il fait partie

intégrante du système de culture à concevoir. A partir de ces caractéristiques et des spécificités de la culture d'ananas, on peut proposer des prototypes de systèmes de culture dans une démarche participative avec les producteurs et des techniciens des structures d'encadrement.

2.1.2. Les plantes de services, leurs traits fonctionnels et les services écosystémiques rendus

La sélection de plantes de services est basée sur les relations entre les services écosystémiques attendus du système de culture et les traits fonctionnels de ces plantes répondant à ces besoins (Tableau 2). Idéalement ces plantes devraient également avoir un impact positif direct ou indirect sur les défenses naturelles de l'ananas. C'est notamment le cas de plantes qui par leur action sur la microflore améliorent les régulations entre populations de micro-organismes du sol [57].

Tableau 2 : Relations entre les services écosystémiques recherchés et les traits fonctionnels des Plantes de services.

Services écosystémiques recherchés	Traits fonctionnels des plantes de services
Assainissement du sol cultivé (nématodes et symphyles) avant implantation de l'ananas	Statut d'hôte défavorable aux bioagresseurs Allélopathie Biofumigation après incorporation
Assainissement du sol en profondeur (Symphyles)	Structure du système racinaire = Un système racinaire capable d'explorer le profil 'cultural' au-delà des 30-40 cm de profondeur habituellement explorés par le système racinaire de l'ananas.
Contrôle des adventices	Couverture du sol Allélopathie
Amélioration de l'état biophysique du sol (structure et statut organique)	Structure du système racinaire Biomasse
Amélioration de la biodisponibilité en éléments nutritifs (Quantitatif et dynamique)	Biomasse Qualité de la matière organique Plante fixatrice d'azote Structure du système racinaire
Effets suppressifs du sol vis-à-vis des bioagresseurs (Equilibres entre groupes fonctionnels de la microflore et de la microfaune, potentiel de mycorhisation)	Plante mycorhizante Biomasse Qualité de la matière organique

2.1.3. Priorité à l'assainissement vis-à-vis des bioagresseurs telluriques.

Le service écosystémique auquel nous avons donné la priorité pour la culture d'ananas est la régulation des bioagresseurs telluriques (nématodes et symphyles). Ce choix est déterminé par le fait que des mesures prophylactiques appropriées et un bon choix variétal limitent l'impact des deux autres principaux bioagresseurs que sont le Phytophthora et le Wilt de l'ananas (complexe virus / cochenilles / fourmis).

Des plantes de services assainissant le sol avant implantation de l'ananas doivent avoir un statut d'hôte défavorable aux bioagresseurs, des effets allélopathiques (exsudats racinaires toxiques) et une composition chimique permettant une biofumigation après incorporation (Tableau 2).

Contraintes : Les deux populations de bioagresseurs telluriques, *R reniformis* et Symphyles, ne sont pas strictement inféodées à l'ananas car les deux sont très polyphages et entrent en compétition pour la même ressource alimentaire (racines). Pour évaluer les populations de symphyles et mesurer leur impact sur le système racinaire, nous avons dû développer deux outils qui n'existaient pas pour l'ananas. Le premier est une méthode d'échantillonnage pour les symphyles avec un outil statistique adapté à des populations hétérogènes qui se développent en foyers comme c'est aussi le cas pour les nématodes (Bait & Trap) [58]. Le second est une méthode d'évaluation du développement du système racinaire *in situ* [59].

2.2. Intégrer les résistances systémiques dans les systèmes de cultures pour contribuer à la gestion des bioagresseurs.

2.2.1. Objectif

L'objectif ici est d'orienter les processus écosystémiques pour favoriser le contrôle des bioagresseurs de l'ananas et des bananiers en intégrant la stimulation de leurs résistances systémiques comme une 'pratique culturale'. Si elles sont efficaces, elles contribueraient à ralentir la ré-infestation des plants par les bioagresseurs (nématodes, symphyles, champignons pathogènes et cochenilles). Les conditions de production en milieu tropical et la littérature récente nous ont conduits à privilégier la stimulation des défenses naturelles par l'utilisation de bactéries endophytes plutôt que par des éliciteurs chimiques [60]. Aujourd'hui, ces mécanismes de défenses des plantes sont mis au cœur de l'intégration des processus aériens et souterrains [61]. Le microbiome fonctionnel de la rhizosphère a un impact sur la stimulation de la croissance des plantes et sur les résistances systémiques. En retour les plantes 'sélectionnent' et favorisent des communautés bactériennes et fongiques dont les symbioses leurs sont bénéfiques [62, 63].

2.2.2. Les résistances systémiques

Les résistances systémiques s'établissent d'abord localement après la reconnaissance par des récepteurs membranaires ou cytosoliques de molécules élicitrices (MAMPs, PAMPs, et DAMPs, respectivement composés chimiques provenant de micro-organismes, de pathogènes ou résultant des dommages occasionnés à la plante elle-même, [64]). Cette reconnaissance déclenche les mécanismes de défense par la cellule végétale et elle est perçue par la plante comme un stress transitoire et de faible intensité. La réponse à ce stress met en jeu des activités enzymatiques oxydatives (peroxydases POD, polyphénoloxydases PPOX), des enzymes de protection de la cellule (superoxyde dismutases SOD, ascorbate peroxydases APX, catalases CAT et des protéines PR) ainsi que les lipoxygénases (LOX) et les phénylalanine ammonia liases (PAL) impliquées dans la synthèse de deux molécules signal caractéristiques des résistances systémiques. Ces 2 molécules correspondent à 2 voies de signalisation chez les plantes. La première est la voie de l'acide jasmonique (JA) pour les résistances systémiques induites (ISR) dans le cas d'interactions avec des bioagresseurs nécrotrophes ou avec des micro-organismes non pathogènes. La seconde est la voie de l'acide salicylique (SA) pour les résistances systémiques acquises (SAR) dans le cas d'interactions avec des bioagresseurs biotrophes, souvent des micro-organismes pathogènes.

Ces 2 voies de signalisation assurent la propagation de la résistance à l'ensemble de la plante. Ensuite, divers gènes de défenses dépendant de JA ou de SA sont régulés de façon à amplifier le système de défense de base de la plante contre les bioagresseurs (protéines PR,

composés du métabolisme secondaire pour renforcer les parois ou des substances toxiques pour le pathogène). Mais rien ne se produit avant qu'une attaque par un bioagresseur n'intervienne (ou une nouvelle attaque dans le cas des SAR). La réaction de la plante est alors bien plus forte qu'en l'absence d'élicitation, c'est l'effet 'priming'.

Le JA est une des oxylipines qui sont synthétisées à partir de l'acide linoléique libéré des phospholipides membranaires en cas de stress. Cet acide est transformé en oxylipines par actions successives de la LOX, et les allène-oxyde synthase et cyclase (AOS et AOC). Le JA est lui-même transformé en dérivés plus mobiles dans la plante (méthyl-jasmonate, Ile-Jasmonate, etc). Le SA est issu de l'acide cinnamique (voie de biosynthèse des composés phénoliques) qui est produit par la PAL dans les plantes. Les gènes correspondants sont utilisés comme marqueurs moléculaires des voies de signalisation.

SA, JA et l'éthylène (ET) sont les hormones clé dans le réseau de signalisation des résistances systémiques. L'acide abscissique (ABA) avec l'ET sont considérés comme les hormones des stress abiotiques mais seraient aussi liés aux mécanismes de défense des plantes. Les voies de signalisation peuvent être antagonistes (SA/JA ou SA/ABA) ou coopératives (JA/ET), mais peu d'études ont permis d'évaluer l'impact de ces interactions sur le contrôle des bioagresseurs (Fig 8). Les interactions entre ces réseaux de signalisation (cross-talk) modulent de façon complexe les réponses des plantes aux stress et peuvent expliquer les résultats inconstants en conditions de production réelle par le passé. Le JA a un rôle clé dans la réponse des plantes à divers stress biotiques (pathogènes) ou abiotiques (stress salin, osmotique, blessure) [65].

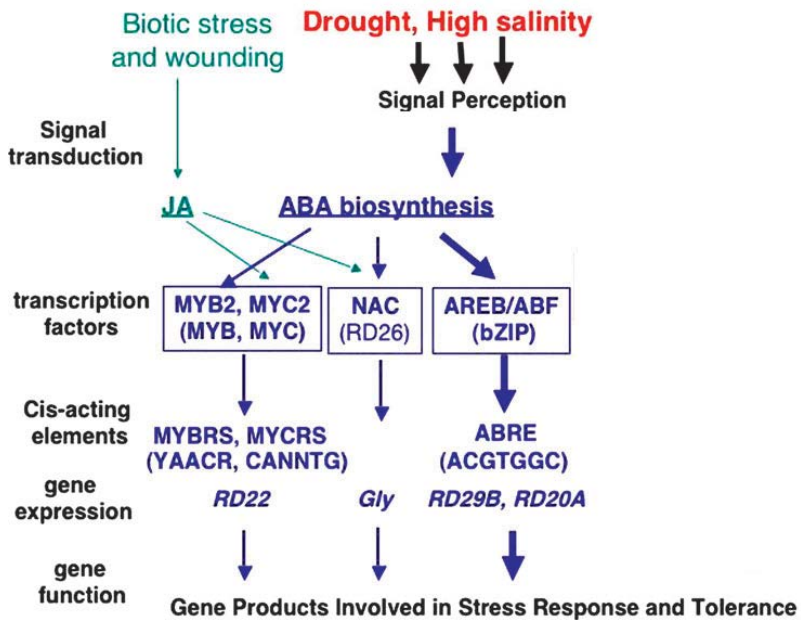


Figure 8 : Régulation transcriptionnelle après perception de signaux de stress hydrique et salin au niveau de la voie dépendante à l'ABA. Le facteur de transcription MYC2, gène clé dans la régulation des gènes de défense inductibles par JA, est aussi activé par les stress salin et hydrique. Modifié de Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki (2006).

Pour déterminer la mise en place effective de ces résistances systémiques, il est d'usage de caractériser leurs mécanismes à l'aide de 3 types d'indicateurs :

- des indicateurs biologiques (contrôle du pathogène ou diminution des symptômes),

- des indicateurs biochimiques (activités enzymatiques oxydatives liées aux stress, protéines PR, enzymes liées à la synthèse des molécules signal ou directement impliquées dans la défense, enfin les molécules signal elles-mêmes),

- des indicateurs moléculaires (gènes spécifiques de défense, facteurs de transcription régulant les voies de signalisation et la synthèse d'enzymes de défenses),

Ensuite l'effet 'priming' est aussi une des caractéristiques principales à rechercher.

Enfin, après la caractérisation des résistances systémiques, il faut déterminer leur potentiel de contrôle sur les différents bioagresseurs cibles et les conditions de leur mise en œuvre optimisant les effets biologiques : sélection variétale, modalités de mise en œuvre, pré-priming avant plantation au champ, impact de stress abiotiques ou biotiques additionnels sur l'efficacité des résistances systémiques induites.

2.2.3. La stimulation des résistances systémiques par des bactéries diazotrophes endophytes chez l'ananas et le bananier

Différentes bactéries de la rhizosphère ont la capacité d'induire des résistances systémiques. Ce peut être le cas de bactéries endophytes 'locales' issues des systèmes racinaires de l'ananas des bananiers et plantains pour lesquelles il faut caractériser les effets biologiques (ISR et PGPR) en milieu contrôlé et au champ. Il faut également élaborer les modalités pratiques d'utilisation de ces endophytes favorisant leur maintien dans le système racinaire.

Ces différentes actions nécessitent de maîtriser les indicateurs biologiques, biochimiques et moléculaires pour caractériser ces résistances systémiques ainsi que les réponses des plantes aux bioagresseurs. Elles nécessitent également la maîtrise de la production d'inoculum des pathogènes de l'ananas (nématodes, symphyles, phytophthora et cochenilles) et du bananier (nématodes, *Mycosphaerella fijiensis et Fusarium oxysporum*). Ces activités mobilisent donc des compétences multiples avec des collaborations de collègues du CIRAD (UMR LSTM), de l'IRD, de l'Université des Antilles ainsi qu'une collaboration internationale avec des chercheurs notamment de l'Université de Ciego de Avila et du Centro Bioplantas à Cuba.

3. Résultats

3.1. Intégrer des plantes de services dans les systèmes de culture

3.1.1. Statut d'hôte des plantes de services.

Une première évaluation de plantes de services issues d'une collection mise en place au CAEC a été faite après piégeages des symphyles (Photo 1). Peu de plantes parmi celles disponibles sont clairement non-hôtes pour les symphyles. On trouve cependant dans plusieurs familles différentes espèces qui sont malgré tout de mauvais hôtes et donc potentiellement utilisables pour un assainissement des parcelles : convolvulacées, légumineuses ou poacées.

Photo 1 : Germplasm de plantes de services en Martinique

Le statut d'hôte de ces plantes a été validé en conditions contrôlées après avoir éliminé celles qui selon la littérature présentent un statut d'hôte positif pour le nématode *R reniformis*. Quelques plantes légumineuses ou poacées se sont révélées efficaces à la fois contre le *Rotylenchulus reniformis (Fig.9a)* et contre les symphyles en empêchant leur reproduction (*Fig 9b*). Les marqueurs les plus pertinents de ce statut d'hôte sont l'absence de larves pour les symphyles, et de larves et d'œufs pour les nématodes. Les crotalaires sont déjà connues pour leur effet assainissant (exsudats racinaires toxiques et composition chimique de la plante), mais elles ont d'autres traits fonctionnels d'intérêt. Ce sont des légumineuses (fixation d'azote), elles produisent une forte biomasse en un temps réduit, ce sont de bonnes plantes de couverture et sont de bonnes plantes 'mycorhizantes'. Nous les avons sélectionnées pour une validation au champ et pour être testées dans des rotations expérimentales avec l'ananas.

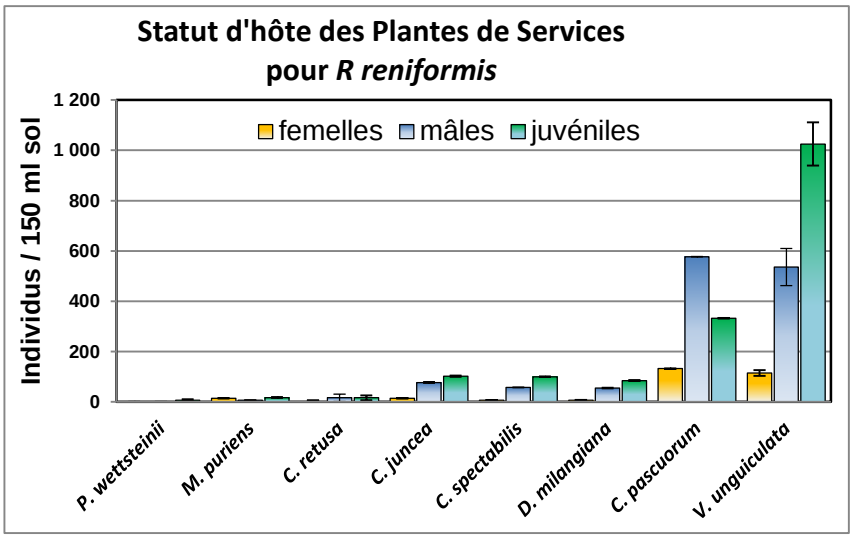


Fig 9a : Statut d'hôte de plantes de services vis-à-vis des nématodes

Chambre de culture, 150 ml pots, Inoculation de 4000 nématodes d'une population monospécifique élevée sur Vigna unguiculata (hôte ref). Elutriation 45 jours après inoculation. Populations sur Vigna divisées par 10.

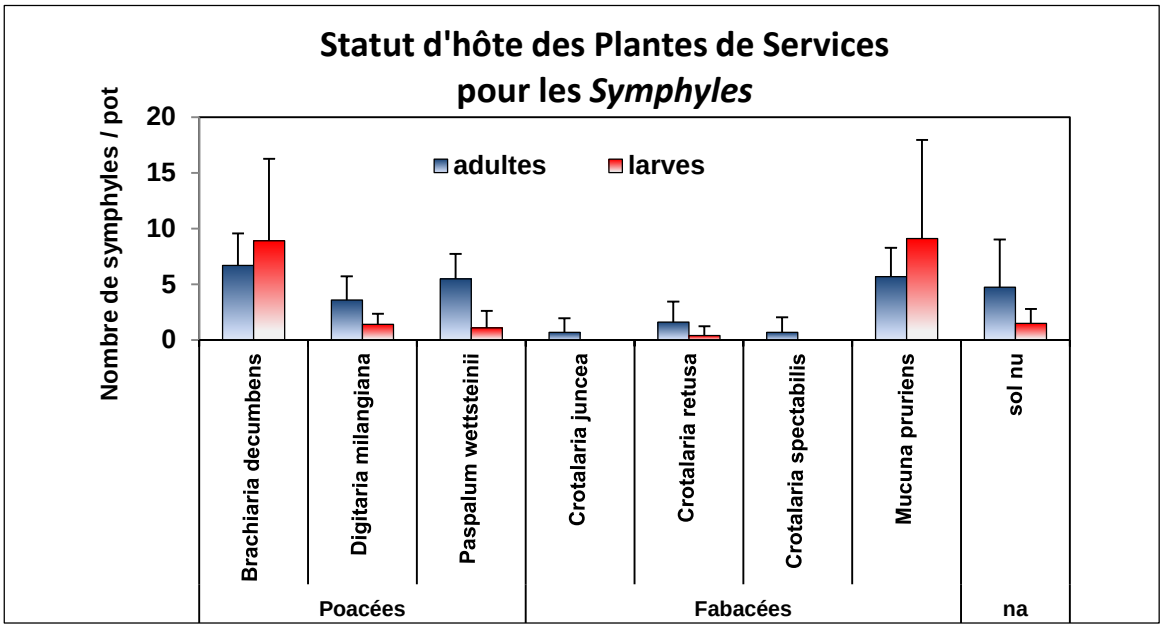


Fig 9b : Statut d'hôte de plantes de services vis-à-vis des symphyles

Chambre de culture, pots 150 ml, Inoculation de 10 symphyles d'une population monospécifique.

3.1.2. Les crotalaires et la gestion au champ des nématodes et des symphyles

Des parcelles de crotalaires ont été installées en plein champ en même temps que des parcelles d'ananas. En partant d'une situation sanitaire identique (précédent ananas), la crotalaire assainit fortement le sol vis-à-vis des populations de nématodes et de symphyles tandis qu'elles se développent sous ananas (Fig.10). Les comptages de nématodes montrent que la compétition entre les deux populations de bioagresseurs tourne à l'avantage des symphyles. Enfin en l'absence d'un contrôle efficace, les deux populations coexistent dans les parcelles laissant ainsi peu de chances à l'ananas d'installer son système racinaire.

Evolution des densités des populations de symphyles et de nématodes sous crotalaire et ananas

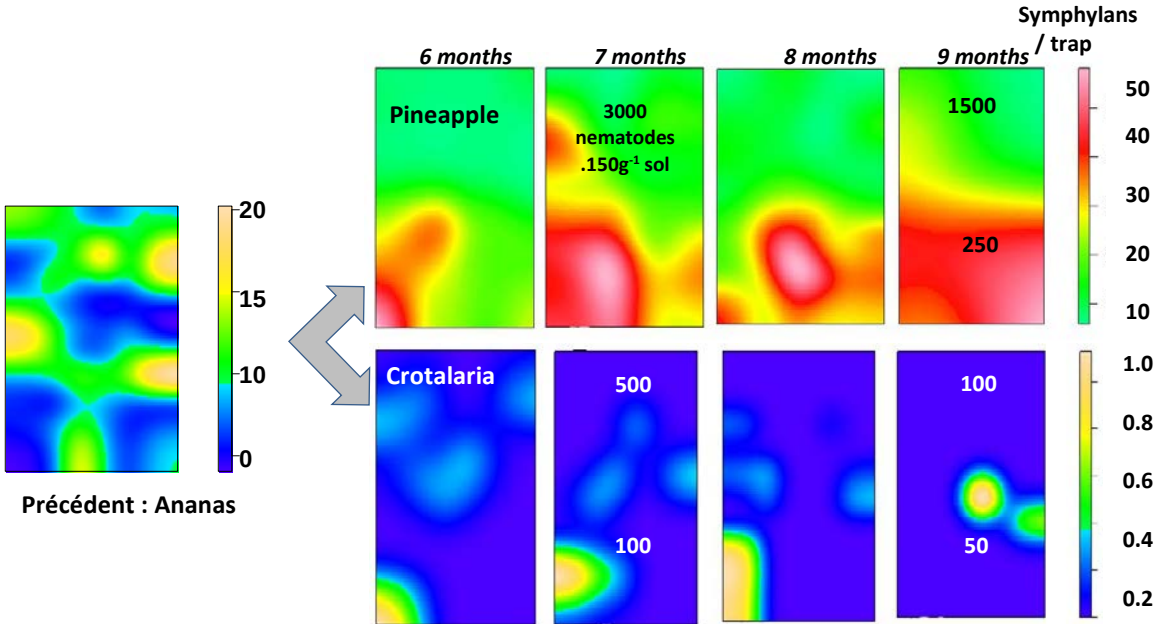


Fig.10 Cartes de densité des bioagresseurs: Populations de symphyles et de nématodes sous ananas et crotalaire dans une même parcelle avec précédent ananas.

(Monitoring avec méthode 'bait & traps' durant 6 mois après plantation dans les 2 parcelles. Moyennes des populations de nématodes données pour les moitiés supérieures et inférieures de chaque parcelle.)

La validation de l'effet assainissant des crotalaires a également été faite en conditions de rotation (ananas – jachère spontanée – aubergine – crotalaire). L'aubergine est ici une culture de rente additionnelle destinée à mieux valoriser la période sans ananas. Ces parcelles ont servi de démonstration pour les professionnels dans le cadre des RITA. Dans ce dispositif expérimental installé dans une exploitation en basse altitude les conditions de températures ne sont pas favorables aux symphyles.

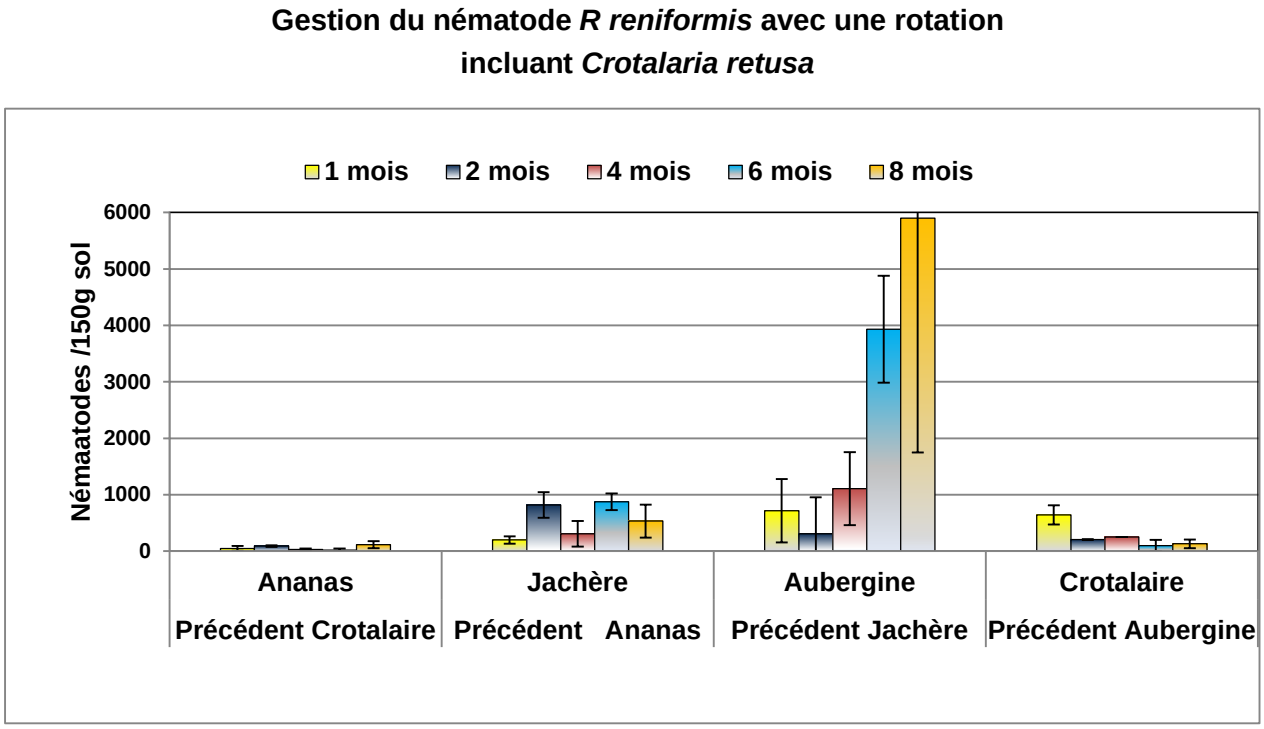


Fig.11 Monitoring des populations de R.reniformis dans une rotation incluant ananas – jachère – aubergine - Crotalaria retusa en parcelles de démonstration

Le suivi a été réralisé sur 8 mois, ensuite les parcelles sont détruites et replantées 4 mois après en poursuivant la rotation. Les 4 parcelles étaient répétées en 2 blocs et suivies pendant 3 rotations complètes.

La crotalaire (*C retusa*) s'est montrée particulièrement efficace pour réduire les populations de nématodes (Fig.11) alors qu'au contraire l'aubergine excellent hôte de *R reniformis* leur a permis une très forte multiplication. Dans les parcelles ananas qui bénéficient du précédent crotalaire, l'effet assainissant de la crotalaire s'est prolongé au moins 8 mois dans les conditions de l'expérimentation. La jachère spontanée permet de maintenir un niveau d'inoculum assez bas mais la présence de nombreuses espèces potentiellement hôtes du nématode serait un des facteurs ne permettant pas un assainissement aussi efficace qu'une jachère contrôlée « crotalaire ».

3.1.3. Statut d'hôte des plantes constituant la flore en jachère spontanée

Un inventaire floristique a été réalisé sur les parcelles avec la rotation ananas – jachère – aubergine - crotalaire. Il existe un bon fonds documentaire sur le statut d'hôte de nombreuses plantes vis-à-vis de *Rotylenchulus reniformis.* C'est le cas d'une majorité des plantes issues de la flore de jachères spontanées ou des adventices trouvées sous ananas en Martinique

(Tableau 3), (revues scientifiques [66] Soares da silva 1989, Araujo Filho 2010, ou d'études locales, Quénéhervé *et al* 1995, Nematropica, Quénéhervé *et al* 2006 Crop protection.

Tableau 3 : Statut d'hôte vis-à-vis de *R. reniformis* de la flore adventices ou en jachère spontanée

Nombre d'espèces	*Jsp courte	Jsp longue	Ananas
Hôte	10	5	22
H/NH **	7	5	4
Non Hôte	2	2	3
ND	5	10	76
Total espèces	24	22	105

Observations faites sur la base d'une étude floristique de parcelles individuelles.
Jsp = Jachère spontanée. Statut incertain hôte ou non hôte suivant les auteurs.*

L'analyse floristique des jachères spontanées montrent qu'une bonne partie de la flore contribue à maintenir un inoculum qui, sans moyen de contrôle, va conduire à une ré-infestation rapide de la jeune culture d'ananas par les nématodes.

Ces résultats montrent aussi que la flore adventice sous culture d'ananas est plus diversifiée qu'en jachère spontanée. Le contrôle des adventices pendant la culture se révèle donc absolument nécessaire non seulement pour les raisons classiques de compétition pour l'eau ou pour les éléments minéraux mais aussi pour des raisons sanitaires.

3.1.4. Conclusion

A ce stade des expérimentations, trois crotalaires (*C. juncea, C. spectabilis* et *C. retusa*) sont retenues pour poursuivre la mise au point de prototypes de systèmes de culture sans pesticides.

Les crotalaires assainissent le sol dans la rotation mais excellentes plantes de couverture, elles permettent aussi la réduction de l'enherbement. Elles seraient donc une bonne option pour une gestion alternative des bioagresseurs en conditions de production. D'autres possibilités d'utilisation de ces plantes de services mériteraient d'être explorées :

- L'association entre plusieurs plantes de services : Dans un mélange d'espèces, si elles sont compatibles, chaque plante peut contribuer de façon différente au fonctionnement du système de culture (augmentation de la biodiversité fonctionnelle).

- L'agencement spatial des parcelles : Associé à des pratiques prophylactiques, c'est un élément qui peut aussi contribuer à réduire l'infestation entre parcelles et la dissémination des bioagresseurs à l'échelle de l'exploitation agricole.

Les résultats précédents ont été utilisés pour concevoir des prototypes servant de base à une co-construction avec les acteurs de la filière de systèmes de culture acceptables par les producteurs d'ananas. Ces systèmes de culture sont testés dans le cadre des réseaux de transfert d'innovations agricole (RITA). *Voir exemple en annexe 2*.

3.2. Intégrer les résistances systémiques dans les systèmes de cultures améliorés

3.2.1. Caractériser les résistances systémiques chez l'ananas et le bananier

Pour caractériser les résistances systémiques on fait appel à des marqueurs biologiques (ici croissance de populations de nématodes), à des marqueurs biochimiques enzymatiques (stress oxydatifs et protéines de défenses PR), enfin à des marqueurs moléculaires (gènes contrôlant les voies de synthèse et d'utilisation des molécules signal, gènes correspondant à certains des marqueurs enzymatiques, gènes impliqués dans les voies de synthèse de métabolites secondaires comme le renforcement des parois cellulaires, facteurs de transcription impliqués dans la régulations des gènes précédemment mentionnés, composés toxiques pour les bioagresseurs).

Lors d'expérimentations préliminaires nous avions appliqué divers éliciteurs chimiques (ac salicylique ou methyl-jasmonate) et biologiques (*Trichoderma harzianum, Pontoscolex corethrurus,* Tableau 4) déjà utilisés par divers auteurs sur d'autres espèces végétales. Toutes ces stimulations et d'autres non mentionnées ici ont donné à des degrés divers des réponses encourageantes pour le contrôle des populations de nématodes sur ananas et bananier.

Tableau 4 : Impacts d'éliciteurs sur le développement des nématodes chez le bananier et l'ananas. Pourcentage de réduction de la population en nématodes après application de stimulateurs de défenses naturelles en conditions semi-contrôlées (serre).

		MeJA	SA	*T. harzianum*	*P. corethrurus*
Pratylenchus coffeae (Banane cv 902)	*Juvéniles*	**-44%**	-13%	-12%	11%
	Mâles	**-28%**	-15%	-4%	-6%
	Femelles	**-47%**	-17%	-5%	7%
R. reniformis (Ananas cv MD2)	*Adultes*	**-42%**	**-43%**	**-32%**	**-47%**
	Œufs	**-58%**	**-73%**	**-18%**	**-52%**

Pour caractériser la mise en place des résistances systémiques contre les nématodes, le methyl-jasmonate (ISR) a été utilisé comme éliciteur sur deux variétés d'ananas, MD-2 et Cayenne lisse, et sur trois variétés de bananiers, deux hybrides du CIRAD (cv924, cv925) et la variété classique Cavendish cv902.

Dans le cas de l'ananas, le MD-2 supporte plus facilement de fortes populations de nématodes que le Cayenne lisse et il aurait aussi une capacité d'adaptation aux stress supérieure [28]. Les variétés de bananiers utilisées se distinguent aussi par des sensibilités aux nématodes variables. Si la Cavendish est prise comme référence sensible (100%), l'hybride cv925 a une sensibilité réduite à 45% et l'hybride cv924 à 12% (Fig.12).

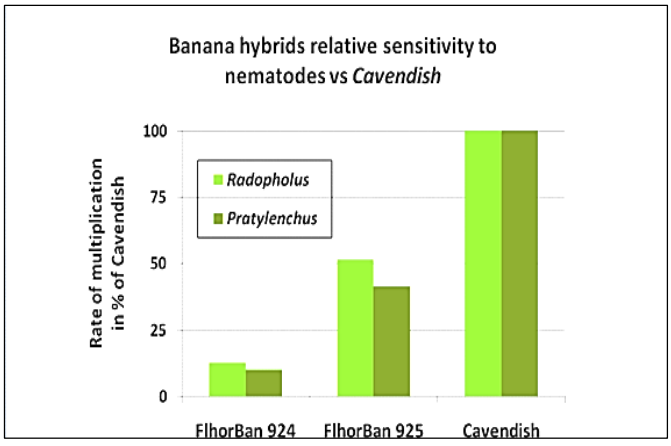


Fig.12 Sensibilité naturelle aux nématodes comparée entre Cavendish (référence) et hybrides CIRAD cv925 et cv924.

3.2.1.1. Effets biologiques: réduction du développement des populations

En serre, la stimulation des ISR par le méthyl-jasmonate (10^{-4} M) a réduit fortement la fécondité des populations (réduction de 73% du nombre d'œufs dans le cas du *R reniformis* sur ananas mais aussi jusqu'à 45% pour les juvéniles dans le cas des *P coffeae* sur bananier), (Fig.12). Sans stimulation, le MD-2 tolère mieux les fortes populations de nématodes que le Cayenne lisse mais il permet un fort accroissement des populations (voir contrôles dans la Fig.13).

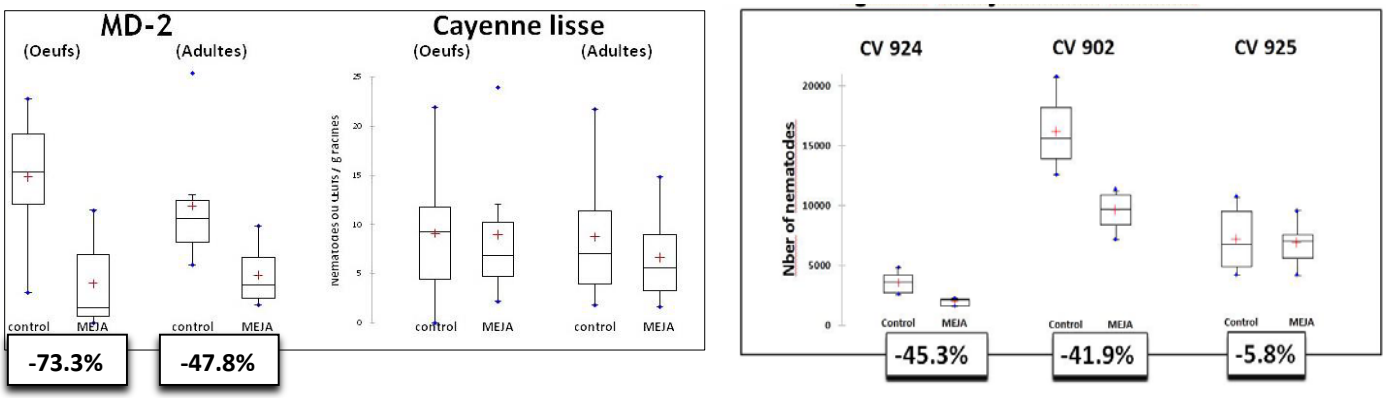


Fig.13 : Densité de nématodes (R reniformis, adultes et œufs sur ananas et P coffeae, juvéniles, sur bananier) 60 jours après inoculation sur des plants pré-traités ou non avec du méthyl-jasmonate (10^{-4} M).

Les inocula monospécifiques de Rotylenchulus reniformis (4000 nématodes) et de Pratylenchus coffeae (400 nématodes), respectivement pour ananas et bananier, ont été appliqués après élicitation au méthyl-jasmonate 10^{-4}M ; l'augmentation des populations a été évaluée 2 mois après.

Enfin, pour les 2 espèces végétales, certaines des variétés utilisées sont capables de mettre en œuvre des ISR efficaces et d'autres non. Dans le cas du bananier, avec une réduction de la population de 41.9%, la variété sensible Cavendish devient aussi tolérante que l'hybride cv925 naturellement moyennement tolérant. Ce dernier s'est montré insensible à la stimulation. Quant au cv924 naturellement très tolérant, il voit sa tolérance s'accroître encore de 45.3%.

Ces résultats doivent être confirmés sur un panel de variétés plus important aussi bien sur ananas que sur bananier. Ils valident l'hypothèse qu'une stratégie de bioprotection avec les résistances systémiques s'appuiera sur la capacité des variétés à adapter leur métabolisme aux stress et en particulier à mettre en place ou non des ISR.

3.2.1.2. Effets biochimiques: activités enzymatiques du stress oxydatif et Protéines PR

Un dispositif en split-root (Photo 2) a permis de mettre en évidence à la fois l'effet systémique, le stress transitoire après stimulation et le priming, en s'appuyant sur des indicateurs enzymatiques (LOX, PAL, les protéines PR, chitinases et β1-3 glucanases, ainsi que différentes activités enzymatiques impliquées dans le contrôle du stress oxydatif).

Photo 2 : Split-Root

Juste après élicitation par le méthyl-jasmonate, la teneur en acide jasmonique (JA) dans la partie non traitée du système racinaire montre une synthèse transitoire et brève juste avant la mobilisation des enzymes de défenses. On observe également pour ces enzymes une augmentation d'activité transitoire mais plus longue. Elles augmentent dans l'heure qui suit l'application du traitement avant de revenir à un niveau équivalent aux témoins après une quinzaine d'heures (Fig.14). Ce stress transitoire est une des caractéristiques de la réponse de la plante à une induction d'ISR.

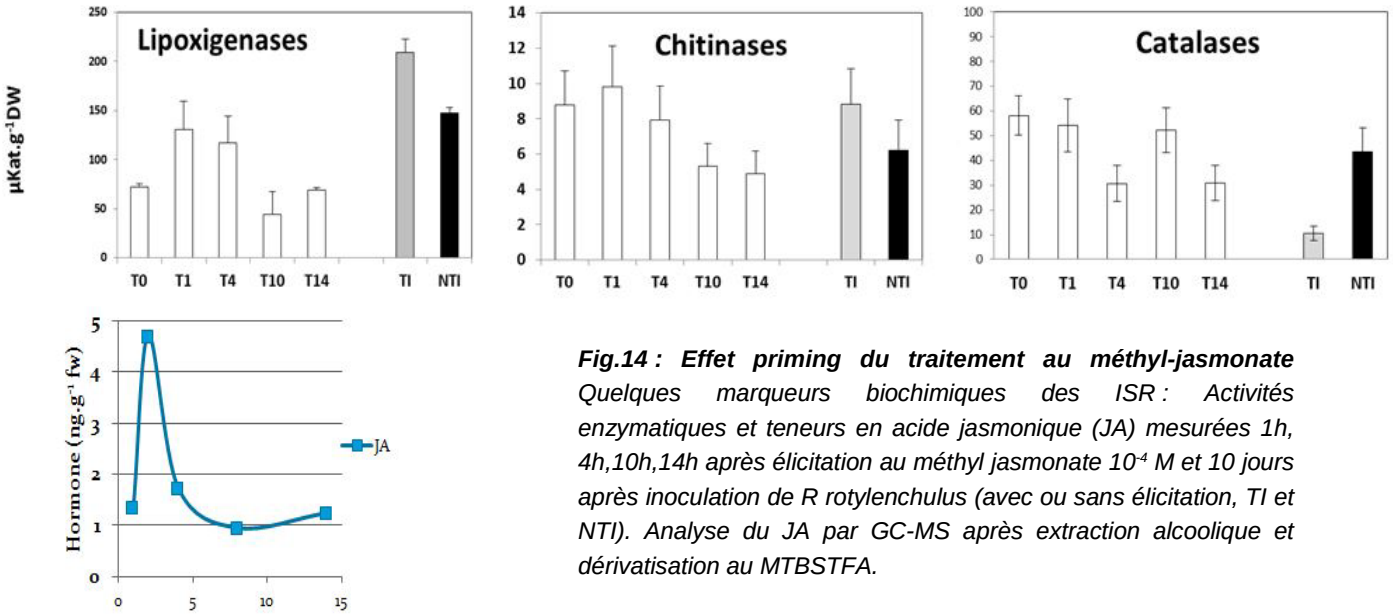


Fig.14 : Effet priming du traitement au méthyl-jasmonate *Quelques marqueurs biochimiques des ISR : Activités enzymatiques et teneurs en acide jasmonique (JA) mesurées 1h, 4h,10h,14h après élicitation au méthyl jasmonate 10^{-4} M et 10 jours après inoculation de R rotylenchulus (avec ou sans élicitation, TI et NTI). Analyse du JA par GC-MS après extraction alcoolique et dérivatisation au MTBSTFA.*

L'activité LOX pourrait favoriser la diffusion du signal de défense (méthyl-jasmonate). Contrairement aux autres activités mesurées, celle de la CAT diminue ce qui favorise une légère augmentation des teneurs en H_2O_2. C'est à la fois une réaction typique de défense contre des bioagresseurs mais à ce stade l'H_2O_2 participe aussi à la diffusion du signal dans la plante. L'augmentation d'activités SOD et POD est aussi une réponse de défense classique à une agression. De fait, la SOD est considérée comme faisant partie de la première ligne de défenses de la plante contre les effets toxiques des ions toxiques superoxyde sur ses propres cellules.

Une dizaine de jours après la stimulation, les plants traités au méthyl-jasmonate ont une réaction de défense à l'inoculation de nématodes plus forte que celle des plants inoculés mais non traités avec l'éliciteur. Cela est la principale caractéristique de l'effet priming. Les activités et les différences observées peuvent paraître relativement faibles mais les analyses enzymatiques ont été faites 10 jours après l'inoculation des nématodes. A ce stade les populations commencent à peine à augmenter engendrant un stress encore minime. Ensuite, il s'agit d'une expérimentation en split-root qui représente déjà un stress en soi pour la plante ce qui a pu niveler un peu les réponses enzymatiques. Enfin on a observé un effet systémique, les analyses ont été faites sur la partie du système racinaire non traitée avec l'éliciteur mais 'qui a reçu' l'information par la voie interne de signalisation du JA (ISR).

Au total on a bien un ensemble de caractéristiques de la mise en place d'une résistance systémique induite (ISR) décrite dans la littérature.

3.2.1.3. Effets moléculaires: régulation de gènes de défenses

La caractérisation de résistances systémiques doit se faire également avec des marqueurs moléculaires : gènes impliqués dans la synthèse du JA (gènes codant pour les LOX, AOC allène oxyde cyclase et AOS allène oxyde synthase, ainsi que des facteurs de transcription, MYC2, ORA47 et ORA59 mais aussi les gènes Cystéine protéase et Cystatine, marqueurs de l'adaptation aux stress du métabolisme de la plante.

Des expérimentations préliminaires sont en cours pour pouvoir valider ces marqueurs et les utiliser sur la collection CIRAD d'ananas avec comme objectif de détecter des variétés ayant la capacité d'adapter leur métabolisme aux stress et de mettre en place des ISR.

3.2.2. Bactéries diazotrophes endophytiques et résistances systémiques chez l'ananas et les bananiers.

3.2.2.1. Isolement des bactéries diazotrophes endophytes de l'ananas et des bananiers.

Des bactéries de la rhizosphère sont utilisées pour la stimulation de résistances systémiques en particulier des *Pseudomonas fluorescens* ou des *Bacillus subtilis*. D'autres bactéries sont utilisées comme substituts partiels à des applications d'engrais chimiques, ce sont des bactéries diazotrophes fixatrices d'azote vivant en symbiose avec la plante qui les héberge. Un exemple classique est la famille des Rhizobium en symbiose avec des légumineuses comme les crotalaires. Si le critère de choix de telles bactéries est surtout l'effet PGPR (promotion de croissance), elles ont fréquemment une capacité à induire des résistances systémiques. L'ananas et le bananier, comme beaucoup d'autres plantes, abritent des bactéries diazotrophes endophytes [67]. La recherche de ce type de bactéries s'appuie sur les hypothèses suivantes :

1- Il y a une plus forte probabilité de trouver parmi des diazotrophes endophytes des bactéries capables d'induire des ISR tout en profitant d'un effet PGPR même si ce dernier n'est pas la caractéristique principale recherchée. Le nombre de souches à isoler, à manipuler et à identifier sera également plus réduit.
2- Ces bactéries isolées à partir des systèmes racinaires de l'ananas, du bananier et des plantains en Martinique seraient déjà adaptées aux conditions locales (cultures et conditions agroclimatiques). Elles ne poseraient pas non plus le problème de l'introduction de micro-organismes étrangers.
3- Pour augmenter la diversité des bactéries isolées, les sites de prélèvement de racines couvrent un panel assez large de systèmes de production, du Bio au système de production intensif. En plus à l'intérieur des parcelles des îlots de plants particulièrement sains en apparence ont été sélectionnés.

Nous avons isolés ainsi 178 souches au total qui présentaient des caractéristiques de bactéries diazotrophes (isolement après stérilisation externe des racines et sélection sur milieu azote-free). De cette collection de souches martiniquaises, 48 ont déjà été identifiées sur bananiers, 39 sur ananas et 12 sur plantains. Les identifications ont été faites par

ADN16S (UMR LSTM CIRAD Montpellier), *voir arbre phylogénétique en annexe 3*. *(Publication en cours sur la diversité bactérienne en fonction des conditions agropédologiques, incluant les analyses de sol, la mesure du potentiel de mycorhization du sol, la diversité de groupes fonctionnels de la microflore dans la rhizosphère et bien sûr le niveau d'intensification du système de production).*

3.2.2.2. Tests d'induction des ISR par les bactéries diazotrophes endophytes.

Ces tests n'en sont qu'à une étape préliminaire. Un premier choix a été fait sur des bactéries n'appartenant pas à des familles à risque pathogène pour l'homme :

- *Bacillus toyonensis* pour l'ananas, très représentée dans nos prélèvements, et ce sont par ailleurs des bactéries considérées comme des probiotiques utilisées dans l'alimentation animale.
- *Herbaspirillum huttiense* pour le bananier, faiblement représentée dans nos prélèvements mais la famille des Herbaspirillum comprend beaucoup de diazotrophes et certaines ont la capacité à stimuler les défenses systémiques.

3.2.2.3. Vérification de l'induction des effets biologiques sur les pathogènes par B toyonensis et H huttiense.

Un test a été réalisé en appliquant les 2 bactéries *B toyonensis et H huttiense* sur ananas et sur bananier contre 2 pathogènes respectivement *R reniformis* et Juglone (toxine de *M fijiensis*), en utilisant comme références chimiques le méthyl-jasmonate et le Bion (stimulateur de type SAR homologué sur bananier pour contrôler *M fijiensis*) (Fig 15a et 15b).

Les bactéries paraissent effectivement réduire les effets biologiques des bioagresseurs mais chacune sur sa plante d'origine uniquement. Le *B toyonensis* a permis une réduction du développement des nématodes par rapport aux contrôles, mais dans cette expérimentation le méthyl-jasmonate n'a pas eu l'efficacité escomptée. *H huttiense* a ralenti l'extension des nécroses induites par les infiltrations de juglone dans les feuilles de bananier et sans effets phytotoxiques comme cela a été le cas pour le Bion. Les stimulateurs chimiques ou bactériens n'ont pas eu d'effet croisé dans ces tests.

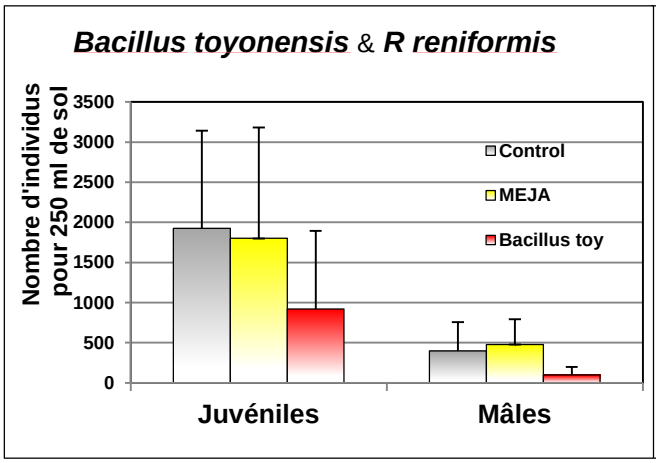


Fig.15a : Effet biologique de B toyonensis sur ananas *Stimulations avec éliciteur chimique (Methyl-Jasmonate) et application de bactéries – suspension à 10^8 CFU/ml- respectivement 3 jours et 8 jours avant inoculation de 4000 R reniformis, populations nématodes comptées 45j après.*

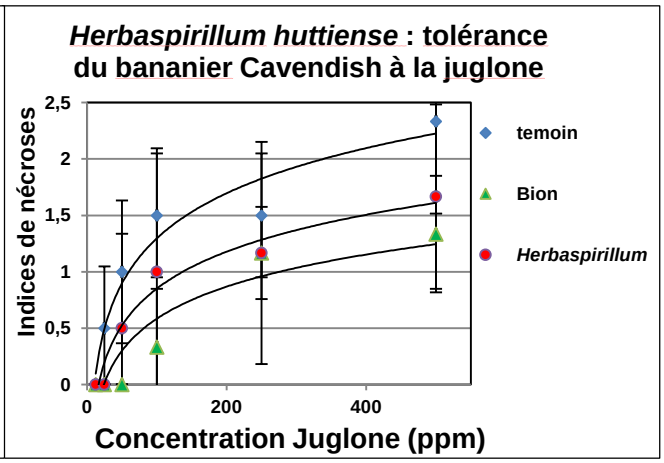


Fig.15b : Effet biologique de H huttiense sur bananier *Stimulations avec éliciteur chimique (Bion) et application de bactéries -suspension à 10^8CFU/ml- respectivement 3 jours et 8 jours avant les infiltrations de 10µl de juglone concentrations croissantes.*

La banque de souches bactériennes endophytes diazotrophes isolées des systèmes racinaires de l'ananas et des bananiers est conséquente. On peut espérer trouver plusieurs candidates avec un bon potentiel d'induction d'ISR. Il reste à vérifier si les effets obtenus en conditions réelles peuvent faire de ces bactéries un outil complémentaire pour la gestion des bioagresseurs. Les modalités d'utilisation au champ doivent être optimisées. Des expérimentations destinées à répondre à ces interrogations sont en cours.

Enfin les bactéries peuvent aussi avoir des effets antagonistes directs notamment sur les micro-organismes pathogènes (bactéries, champignons) ou sur des insectes comme les cochenilles. Ces effets antagonistes peuvent être aussi importants que l'induction de résistances systémiques et ils doivent être identifiés et valorisés.

4. Conclusion générale

Dans un contexte d'accès limité aux pesticides pour contrôler les bioagresseurs ainsi que les attentes croissantes du public pour prévenir les risques environnementaux, il est devenu urgent de développer une stratégie de lutte intégrée avec des systèmes de culture sans pesticides mais néanmoins durables. Ces systèmes de culture intègrent des pratiques plus écologiques en exploitant la biodiversité locale et en restaurant des fonctions écosystémiques qui régissent les régulations biologiques (Biomasse, contrôle de l'enherbement, biodiversité microbienne). Les plantes de services en rotation peuvent réduire considérablement l'inoculum en pathogènes des sols avant l'installation de la culture d'ananas. Ces pratiques culturales constituent un prérequis agro-écologique pour que l'ananas ou le bananier développent des résistances systémiques efficaces indépendamment des tolérances variétales naturelles. Les plantes de services peuvent aussi contribuer à stimuler les résistances systémiques en influant sur les communautés de micro-organismes de la rhizosphère. Quelques-unes des variétés d'ananas capables de mettre en œuvre ces résistances systémiques pourront à leur tour contribuer à maintenir les populations de bioagresseurs à des niveaux tolérables pour la plante et compatibles avec une activité de production rentable.

Les résultats présentés vont dans ce sens mais restent néanmoins préliminaires et des recherches complémentaires doivent confirmer les hypothèses émises avant de proposer de tels systèmes de production durables aux producteurs. La complexité des interactions au sein de l'agrosystème conduit à aborder simultanément de nombreuses thématiques faisant appel à des domaines de compétences variés et très spécialisés. La conception de systèmes de culture innovants est donc plus que jamais une affaire de collaborations scientifiques. Des concepts plus récents comme la prise en compte des interactions entre la plante et son microbiome de la rhizosphère, peuvent aussi nous aider à orienter les recherches pour fixer des priorités parmi les nombreuses thématiques scientifiques abordées.

Sixième Partie

Perspectives

1. Intégration de plantes de services dans les systèmes de culture ananas.

Les producteurs en l'absence de pesticides sont désarmés devant la rapidité de l'extension des bioagresseurs dans toutes les zones de production. Face à l'urgence de la situation, nous avons fait un choix forcément réducteur de commencer à expérimenter des systèmes de culture avec des plantes de services (crotalaires) mais nos données sont encore incomplètes. Les crotalaires sont connues depuis longtemps pour leur potentiel assainissant vis-à-vis de bioagresseurs du sol. Certaines variétés dont le *C retusa* sont déjà connues aux Antilles (graine chacha ou Tchak-tchak), limitant ainsi le risque d'introduction d'espèces envahissantes. Dans nos expérimentations elles ont été très efficaces contre *R reniformis* et les symphyles mais dans des conditions pédoclimatiques trop restreintes. D'autres aspects importants n'ont pu être abordés que succinctement comme le mélange de plantes de services avec des traits fonctionnels complémentaires. Un succès relatif a été obtenu pour le bananier (par ex Brachiaria / Crotalaires) mais cela demande un important travail d'ingénierie plus que de recherche. L'arrangement spatio-temporel des différentes cultures de la rotation peut aussi contribuer à donner une certaine durabilité à l'assainissement en ralentissant la ré-infestation entre parcelles. Les plantes de services servant de barrière limitent l'extension des foyers de populations de bioagresseurs à l'échelle de l'exploitation. Cette biodiversité introduite nous est apparue bénéfique également à la culture maraîchère intermédiaire (aubergine) pour laquelle les auxiliaires ont assuré le contrôle des mouches blanches avec efficacité et sans nécessité aucune de pesticides. Une autre difficulté en climat tropical est la pression parasitaire constante au cours de l'année sans repos hivernal. Trouver une autre plante de service pouvant être associée à l'ananas est aussi un véritable challenge. L'objectif serait de ralentir la réinfestation par les parasites telluriques et de contrôler l'enherbement source de compétition mais aussi contribuant au maintien des parasites.

Il reste beaucoup à faire du point de vue des techniques à mettre au point. Les simulations nous ont permis de montrer les effets positifs de ce type de systèmes de culture ananas intégrant des crotalaires, d'un point de vue agronomique, environnemental et économique. Il n'en demeure pas moins que le producteur reste le décisionnaire pour adopter ou non l'innovation technique proposée. De ce fait, il est important que le schéma de conception des systèmes de culture associe le plus tôt possible producteurs et autres acteurs de la filière pour leur savoir-faire, leur capacité et leur envie d'adopter ou non l'innovation technique.

2. Les résistances systémiques contre les bioagresseurs

Les résistances systémiques sont des défenses naturelles des plantes. Moins efficaces que des résistances spécifiques qui sont souvent monogéniques, elles ont l'avantage d'être actives sur différents pathogènes. Elles sont inductibles par des éliciteurs chimiques qui stimulent l'une ou

l'autre des 2 voies de signalisation ISR ou SAR. L'utilisation de tels éliciteurs nécessite de réaliser des screening de molécules selon des protocoles faisant appels aux mêmes indicateurs biologiques, biochimiques et moléculaires indiqués précédemment. Leurs modalités d'utilisation se rapprochent de celles des pesticides et sont souvent un mixe d'applications d'éliciteurs et de pesticides.

Nous n'avons pas retenu la stimulation chimique pour les systèmes de culture ananas. Cependant, nous l'utilisons en raison de sa facilité de mise en œuvre pour rechercher dans la collection CIRAD des variétés d'ananas ou de bananiers ayant un caractère certain d'adaptabilité aux stress. L'aspect variétal est une composante importante de l'utilisation des résistances systémiques pour contribuer à la gestion des bioagresseurs.

Les résistances systémiques dépendent de différentes voies de signalisation. Celles-ci peuvent être antagonistes (SA/JA ou SA/ABA) ou coopératives (JA/ET), mais peu d'études ont été consacrées à évaluer l'impact de ces interactions sur le contrôle des bioagresseurs. Cet aspect est le thème de la thèse en cours UA/CIRAD. Les résultats pourraient éclairer le fonctionnement de ces résistances lorsqu'elles sont impactées par d'autres stress que celui pour lequel elles ont été stimulées, et ils pourraient orienter les modalités d'utilisation.

Une autre voie de stimulation de ces défenses est l'utilisation de micro-organismes endophytes, bactéries et mycorhizes. Nous avons privilégié la recherche de bactéries diazotrophes endophytes mais sans oublier l'aspect de mycorhization indirecte des plantes via l'augmentation du potentiel de mycorhization du sol induite par la plante de service.

La banque de souches bactériennes endophytes diazotrophes isolées des systèmes racinaires de l'ananas et des bananiers est conséquente. Les perspectives immédiates sont de valoriser ce travail en caractérisant l'induction de résistances systémiques par ces bactéries. Enfin les bactéries peuvent aussi avoir des effets antagonistes directs notamment sur les micro-organismes pathogènes (bactéries, champignons ou insectes comme les cochenilles). Ces effets antagonistes peuvent être aussi importants que l'induction de résistances systémiques et ils doivent être étudiés et valorisés.

3. Les mécanismes de défense des plantes au cœur de l'intégration des processus aériens et souterrains

L'état normal de la plante dans son milieu est d'être stressée de façons multiples et simultanées. Ces stress induisent des réactions de défenses qui mettent en jeux des systèmes de signalisation hormonaux sur lesquels s'appuie la stimulation des résistances systémiques. Il y a une communication entre organes souterrains et aériens qui permet la mise en place du priming. Celui-ci permet à la plante de réagir plus vite et plus efficacement à un bioagresseur.

L'enjeu des recherches sur les résistances systémiques présentées précédemment est d'en faire des pratiques culturales fiables. L'acide jasmonique est au cœur de l'équilibre entre processus de croissance des plantes et processus de défenses. C'est aussi l'hormone de la voie de signalisation mise en jeu lors d'interactions avec des micro-organismes souterrains qui induisent des ISR mais qui sont aussi des promoteurs de croissance (PGPR). Mieux comprendre les mécanismes de la régulation hormonale entre processus est une des clés pour répondre à cet

enjeu. Une autre clé pour répondre au même enjeu est la prise en compte du microbiome rhizosphérique. La plante peut orienter les équilibres entre populations de micro-organismes en favorisant les communautés qui lui sont bénéfiques. Elle peut mobiliser ainsi un second génome (celui des micro-organismes) quand elle le nécessite. Au final l'expression du potentiel de production de la plante est à attribuer au couple plante-microbiome.

Les 3 hypothèses formulées pour une utilisation des résistances systémiques dans des systèmes de culture plus écologiques sont validées dans le concept explicité ci-avant.

Comment utiliser les interactions entre processus aériens et souterrains dans la conception de systèmes de production écologiques mais efficaces ?

- Faciliter l'installation des organismes mutualistes bénéfiques (Champignons mycorhiziens (AM), Rhizobactéries PGPR endophytes), mais aussi Vers de terre… et d'autres, avec en particulier des rotations avec plantes assainissantes et améliorantes.
- Réduire les pertes dues aux interactions négatives (bioagresseurs – stress abiotiques) notamment avec le Priming des défenses de variétés sélectionnées.
- Production de VOC (composés organiques volatiles liés à l'attraction de mutualistes souterrains promoteurs de défenses mais aussi liés à l'attraction de prédateurs/auxilliaires ou à la réduction de l'attraction de bioagresseurs); ils participent ainsi à la gestion du timing de l'installation des premiers bioagresseurs.
- Augmenter les limites de production de la plante (Microbiome modifié - intercropping et modification phénotypique, sélection d'endophytes diazotrophes stimulateurs et rotation avec des plantes de services influant sur les équilibres entre communautés de micro-organismes du sol).

Annexe 1

Publications citées dans le texte

[1] *A. Soler. Agricultural diversification project pineapple : on farm adaptative research. Final report, may 94-may 97, 1997 (unpublished).*

[2] *A. Soler and A. N'Da Adopo. La banane plantain en Côte d'Ivoire.presented at Séminaire du Programme Pluridiscipline - Amélioration des Systèmes Post-Récoltes, Abidjan, 1990 (unpublished).*

[3] *A. Soler, Fruits **45**, 357 (1990).*

[4] *A. Soler. Conservation de la banane plantain : travaux préliminaires et perspectives.presented at La coopération internationale pour une recherche efficace sur le plantain et les bananes : compte-rendu de la 3e réunion, Montpellier, 1987 (unpublished).*

[5] *A. Soler. Synthèse floraison et maturation de l'ananas.presented at Réunion annuelle IRFA, France, 1986 (unpublished).*

[6] *A. Soler, Fruits **40**, 31 (1985).*

[7] *A. Soler, Fruits **40**, 321 (1985).*

[8] *A. Soler. Enzymatic characterization of stress induced translucence of pineapple flesh in the Ivory Coast.presented at Proceedings of the first International pineapple symposium, Wageningen, 1993 (unpublished).*

[9] *A. Soler, Fruits **49**, 5 (1994).*

[10] *A. Soler, Fruits **49**, 83 (1994).*

[11] *R.G. Alscher, N. Erturk, and L.S. Heath, Journal of experimental Botany **53**, 1331 (2002).*

[12] *C. Parent, N. Capelli, and J. Dat, Comptes Rendus Biologies **331**, 255 (2008).*

[13] *M. Blouin, Y. Zuily-Fodil, A.-T. Pham-Thi, D. Laffray, G. Reversat, A. Pando, K. Tondoh, and P. Lavelle, Ecology Letters **8**, 202 (2005).*

[14] *F. Saudubray, J.-P. Horry, P.-A. Marie Alphonsine, D. Cros, and A. Soler, Fruits **61**, 39 (2006).*

[15] *A. Soler, C. Teisson, B. Dole, and P.-A. Marie Alphonsine, Pineapple news., 27 (2006).*

[16] *A. Soler and B. Dole, Pineapple news., 23 (2006).*

[17] ***A. Soler**, **P. Fournier**, and **D. Cros**. MARTAnanas: A software for the management of pineapple plots.presented at Vth ISHS International Pineapple Symposium, Port Alfred , South Africa, 2005 (unpublished).*

[18] *A. Soler, M. Lebrun, and M.-P. Beauté, Fruits **61**, 185 (2006).*

[19] *X.-M.Z. Guan-Ming Sun, Alain Soler, Paul-Alex Marie-Alphonsine, Nutritional Composition of Pineapple (Ananas comosus (L.) Merr.), in Nutritional Composition of Fruit Cultivars, edited by Simmonds. (2016).*

[20] *A. Soler, P.-A. Marie Alphonsine, P. Topart, and P. Quénéhervé. How to evaluate the resistance or tolerance of pineapple varieties to nematodes ?presented at Proceedings of the Sixth international pineapple symposium, João Pessoa, Brazil, November 18-23, 2007, Louvain, 2009 (unpublished).*

[21] *Y. Zhou, J. Dahler, S. Underhill, and R. Wills, Food Chemistry **80**, 565 (2003).*

[22] *R. Stewart, B. Sawyer, C. Bucheli, and S. Robinson, Australian journal of plant physiology **28**, 181 (2001).*

[23] *L. Smith, Trop Agric (Trinidad) **60**, 31 (1983).*

[24] *R. Stewart, B. Sawyer, and S. Robinson, Australian Journal of Experimental Agriculture **42**, 195 (2002).*

[25] *Y. Zhou, T. O'Hare, M. Jobin Decor, S. Underhill, R. Wills, and M. Graham, Plant biotechnology journal **1**, 463 (2003).*

[26] *N.N. Diop, M. Kidrič, A. Repellin, M. Gareil, A. d'Arcy-Lameta, A.T. Pham Thi, and Y. Zuily-Fodil, FEBS Letters **577**, 545 (2004).*

[27] *A.-K. Raimbault, P.-A. Marie-Alphonsine, J.-P. Horry, M. Francois-Haugrin, K. Romuald, and A. Soler, Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**, 342 (2011).*

[28] *A.-K. Raimbault, Y. Zuily-Fodil, A. Soler, P. Mora, and M.H. Cruz de Carvalho, Journal of Plant Physiology **170**, 1442 (2013).*

[29] *A. Repellin, A.T.P. Thi, A. Tashakorie, Y. Sahsah, C. Daniel, and Y. Zuily-Fodil, European Journal of Agronomy **6**, 25 (1997).*

[30] *A.-K. Raimbault, Y. Zuily-Fodil, A. Soler, and M.H.C. de Carvalho, Journal of plant physiology **170**, 1536 (2013).*

[31] *T. Woignier, **A. Soler**, **P. Fernandes**, **L. Duffours**, and **M. Lebrun**. Relation entre la structure fractale des sols volcaniques et leur pouvoir de fixation de la chlordécone : [Poster].presented at 2èmes Rencontres nationales de la Recherche sur les sites et sols pollués, 20-21 octobre 2009, Paris, France, s.l., 2009 (unpublished).*

[32] *P. Fernandes, M.A. Jannoyer-Lesueur, **A. Soler**, **R. Achard**, and **T. Woignier**. Effects of clay microstructure and compost quality on chlordecone retention in volcanic tropical soils: consequences on pesticide lability and plant contamination.presented at 19 th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World., Brisbane, Australia., 2010 (unpublished).*

[33] *H. Macarie, D. Devault, I. Sastre Conde, L. Rangon, A. Soler, C. Charpy-Roubaud, y. Labrousse, S. Roussos, D. Guiral, J. Dolfing, I. Novak, A. Archelas, and T. Woignier. La chlordécone est elle biodégradable et biodisponible? Quelques considérations issues de la littérature et résultats expérimentaux préliminaires.presented at XXXXI^{ème} congrès du Groupe Français des Pesticides 25-27 mai), Orléans, 2011 (unpublished).*

[34] *T. Woignier, M. Morell, O. Morell, L. Duffours, and A. Soler, Ecohydrology & Hydrobiology **11**, 121 (2011).*

[35] *T. Woignier, A. Soler, P. Fernandes, and M. Jannoyer-Lesueur. Chlordecone sequestration in volcanic soils results from clay microstructure and organic matter content presented at International congress ISMOM 2011, Montpellier, 2011 (unpublished).*

[36] *T. Woignier, P. Fernandes, M.A. Jannoyer-Lesueur, and **A. Soler**, European Journal of Soil Science, (in press) (2012).*

[37] *T. Woignier, P. Fernandes, A. Soler, F. Clostre, C. Carles, L. Rangon, and M. Lesueur-Jannoyer, Journal of hazardous materials **262**, 357 (2013).*

[38] *F. Clostre, T. Woignier, L. Rangon, P. Fernandes, A. Soler, and M. Lesueur-Jannoyer, Journal of soils and sediments **14**, 23 (2014).*

[39] *A. Soler, M. Lebrun, Y. Labrousse, and T. Woignier, Fruits **69**, 325 (2014).*

[40] *A. Soler, M. Lebrun, Y. Labrousse, and T. Woignier, Quantification de la chlordécone dans l'eau, les sols et les plantes par micro-extraction en phase solide et chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (SPME / GC-MS & MS/MS). , edited by G.G.f.d. pesticides). (2016).*

[41] *T. Woignier, F. Clostre, P. Fernandes, L. Rangon, A. Soler, and M. Lesueur-Jannoyer, Environmental Science and Pollution Research **23**, 98 (2016).*

[42] *E. Malézieux, Y. Crozat, C. Dupraz, M. Laurans, D. Makowski, H. Ozier-Lafontaine, B. Rapidel, S. de Tourdonnet, and M. Valantin-Morison, Agronomy for Sustainable Development **29**, 43 (2009).*

[43] *R.L. Berendsen, C.M.J. Pieterse, and P.A.H.M. Bakker, Trends in Plant Science. 10.1016/j.tplants.2012.04.001.*

[44] *M. Kyselková and Y. Moënne-Loccoz, Pseudomonas and other Microbes in Disease-Suppressive Soils in Organic Fertilisation, Soil Quality and Human Health, edited by E. Lichtfouse. (Springer Netherlands, 2012). pp. 93-140.*

[45] *U. Jankiewicz and M. Kołtonowicz, Applied Biochemistry and Microbiology **48**, 244 (2012).*

[46] *N. Ilyas and A. Bano, Potential Use of Soil Microbial Community in Agriculture in Bacteria in Agrobiology: Plant Probiotics., edited by D.K. Maheshwari. (Springer Berlin Heidelberg, 2012). pp. 45-64.*

[47] *R.a. Yumlembam, S.J. Singh, and e. al, Recent Advances In Induced Resistance for Plant Disease Management: An Overview, in Innovations in plant Science and Biotechnology, edited by M.C.P. Wani S. H., Hora A. and Kaur R. (Agrobios (India), 2013). pp. pp.107-143.*

[48] *M.J. Pozo and C. Azcón-Aguilar, Current Opinion in Plant Biology **10**, 393 (2007).*

[49] *C. Vos, D. Van Den Broucke, F.M. Lombi, D. De Waele, and A. Elsen, Soil Biology and Biochemistry **47**, 60 (2012).*

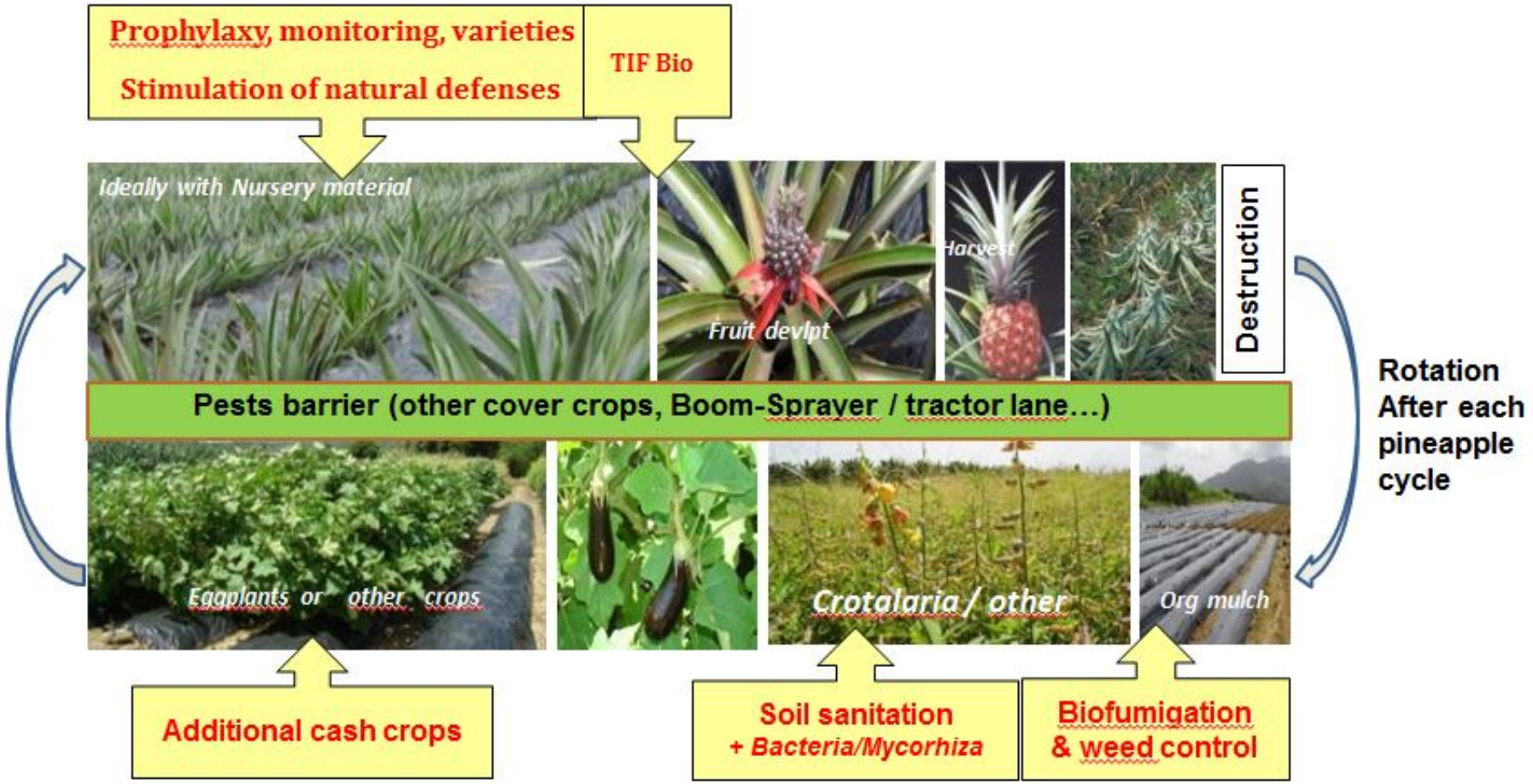
[50] *G.E. Vallad and R.M. Goodman, Crop Science **44**, 1920 (2004).*

[51] *A. Ahmed, C. Sánchez, and M. Candela, European Journal of Plant Pathology **106**, 817 (2000).*
[52] *T.J. Avis, V. Gravel, H. Antoun, and R.J. Tweddell, Soil Biology & Biochemistry **40**, 1733 (2008).*
[53] *P.A. Backman and R.A. Sikora, Biological Control **46**, 1 (2008).*
[54] *N.P. Chaves, L.E. Pocasangre, F. Elango, F.E. Rosales, and R. Sikora, Scientia Horticulturae **122**, 472 (2009).*
[55] *S. Molinari, Plant Cell Reports **30**, 311 (2011).*
[56] *A. Soler, C. Corbion, P.A. Marie-Alphonsine, and P. Quénéhervé, Nematropica **42**, 372 (2013).*
[57] *P. Orrell and A.E. Bennett, Front. Plant Sci **4**, 10.3389 (2013).*
[58] *A. Soler, J.-M. Gaude, P.-A. Marie-Alphonsine, F. Vinatier, B. Dole, J.-C. Govindin, P. Fournier, and P. Queneherve, Pest Management Science **67**, 1169 (2011).*
[59] *J.-L. Chopart, L. Debaut-Henoque, P.-A. Marie-Alphonsine, R. Asensio, and A. Soler, Fruits **70**, 143 (2015).*
[60] *D. Choudhary, Applied Microbiology and Biotechnology **On line**, 1 (2012).*
[61] *M.E. Rout and D. Southworth, American journal of botany **100**, 1689 (2013).*
[62] *V. Lakshmanan, G. Selvaraj, and H.P. Bais, Plant Physiology **166**, 689 (2014).*
[63] *N. Pangesti, A. Pineda, C.M.J. Pieterse, M. Dicke, and J.J.A. Van Loon, Frontiers in plant science **4**(2013).*
[64] *P. Thonart, M. Ongena, and G. Henry, Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement= Biotechnology, Agronomy, Society and Environment [= BASE] **16**, 252 (2012).*
[65] *T.A. Dar, M. Uddin, M.M.A. Khan, K. Hakeem, and H. Jaleel, Environmental and Experimental Botany **115**, 49 (2015).*
[66] *A. Robinson, R. Inserra, E. Caswell-Chen, N. Vovlas, and A. Troccoli, Nematropica (USA), http://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/r_reniformis.htm(1997).*
[67] *O.B. Weber, R.N. Lima, L.A. Crisóstomo, J.A.D. Freitas, A.C.P. Carvalho, and A.H. Maia, Plant and soil **327**, 355 (2010).*

Annexe 2

Exemple de prototype de système de culture ananas

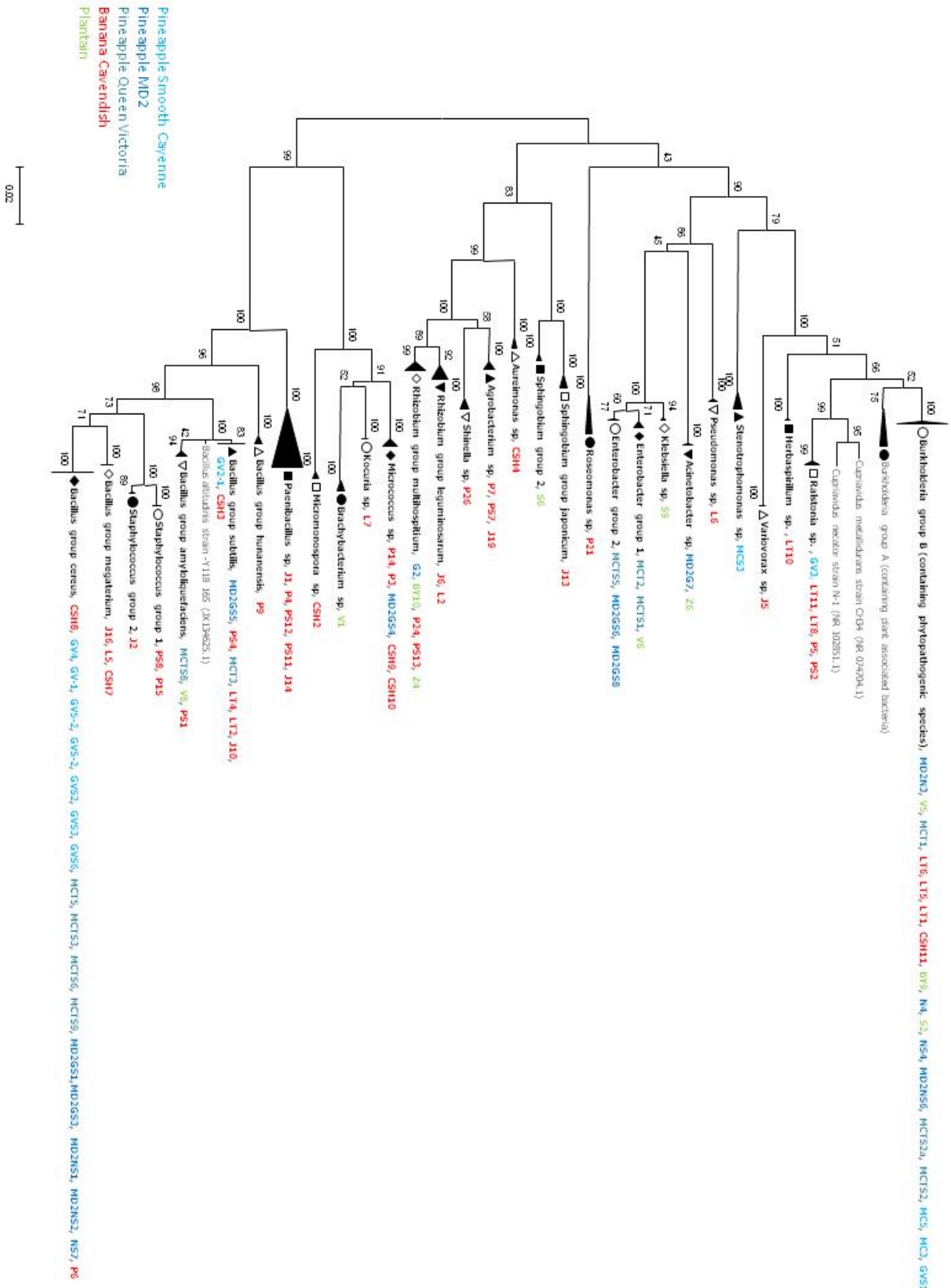
Suggestions pour un SdC ananas sans pesticides



Unité de production en parcelles synchronisées 'ananas' + 'jachères contrôlées'

Annexe 3

Carte phylogénétique des bactéries diazotrophes endophytes isolées de l'ananas, des bananiers et du plantain.



Annexe 4

Exemple de publications avec Facteur d'Impact.

1- Soler A, Marie-Alphonsine P-A, Corbion C, Quénéhervé P. 2013. Differential response of two pineapple cultivars (Ananas comosus (L.) Merr.) to SAR and ISR inducers against the nematode *Rotylenchulus reniformis*. *Crop protection* 54:48-54.

2- Raimbault, A.-K., Y. Zuily-Fodil, et al. (2013). "The expression patterns of bromelain and AcCYS1 correlate with blackheart resistance in pineapple fruits submitted to postharvest chilling stress." Journal of Plant Physiology 170(16): 1442-1446.

3- Soler, A., M. Lebrun, et al. (2014). "Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for quantitative determination of chlordecone in water, plant and soil samples." Fruits 69(04): 325-339.

4- Woignier, T., Morell, M., Morell, O., Duffours, L. Soler, A**.** 2011. Low water transport in fractal microstructure of tropical soils: application to chlordecone pesticide trapping. *Ecohydrology & Hydrobiology*, **11,** 121-128.

5- Soler, A. Gaude, J.-M. Marie-Alphonsine, P.-A. Vinatier, F. Dole, B.*, et al.* 2011. Development and evaluation of a new method for sampling and monitoring the symphylid population in pineapple. *Pest Management Science*, **67,** 1169-1177.

Crop Protection 54 (2013) 48–54

Contents lists available at ScienceDirect

Crop Protection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cropro

Differential response of two pineapple cultivars (*Ananas comosus* (L.) Merr.) to SAR and ISR inducers against the nematode *Rotylenchulus reniformis*

Alain Soler [a,*], Paul-Alex Marie-Alphonsine [a], Claudine Corbion [a], Patrick Quénéhervé [b]

[a] CIRAD, UPR Banana, Plantain and Pineapple Cropping Systems, Pôle de Recherche Agroenvironnementale de la Martinique, F97285 Le Lamentin, Martinique
[b] IRD, UMR Résistance des Plantes aux Bioagresseurs (IRD/CIRAD/UM2), Pôle de Recherche Agroenvironnementale de la Martinique, F97285 Le Lamentin, Martinique

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 November 2012
Received in revised form
16 July 2013
Accepted 22 July 2013

Keywords:
Systemic resistance
Methyljasmonate
Salicylic acid
Rotylenchulus reniformis
Pineapple

ABSTRACT

We hypothesized that inducing systemic resistances can contribute to the control of the nematode *Rotylenchulus reniformis* in pineapple. In greenhouse experiments conducted in Martinique, the pineapple cultivars Smooth Cayenne and MD-2 were treated with methyljasmonate (JAME) and salicylic acid (SA), elicitors of induced systemic resistance (ISR) and systemic acquired resistance (SAR). The efficacy of the elicitors was tested by inoculating plantlets grown in individual pots with a monospecific population of *R. reniformis* reared on *Vigna unguiculata*. The final nematode populations, 45 days after inoculation on MD-2 treated with JAME were reduced by 67.0% ($p = 0.006$). Nematode populations on MD-2 plants treated with SA were reduced by 55.8% ($p = 0.016$). Nematode populations on SC were not reduced by the elicitors. In a second experiment, using split-root systems, JAME was applied to MD-2 plantlets and enzymatic activities involved in plant defense and stress responses were monitored for 14 h after treatment. Additional pots were inoculated with nematodes 24 h after JAME treatment and examined ten days later. Transient stress was observed along with an increase in enzymatic response after inoculation with nematodes. These results showed that the MD-2 was primed through an ISR by JAME. The question now arises whether ISR can be specifically induced only in certain pineapple cultivars. Results are discussed from the perspective of introducing new strategies to manage pineapple nematodes.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Monoculture and intensive use of pesticides not only reduce the biodiversity of agrosystems but also increase the imbalance between pathogenic and beneficial organisms (Malézieux et al., 2009). The natural defenses of plants, known as systemic resistances, could contribute to ecologically based integrated pest management (IPM) as an alternative to the use of pesticides. Chemical elicitors, like methyljasmonate (JAME), can trigger either induced systemic resistance (ISR), or like salicylic acid (SA), systemic acquired resistance (SAR) (Conrath, 2011; Vallad and Goodman, 2004). Natural elicitors include molecules from plant cells undergoing an attack by a chewing insect, or molecules from pathogenic or non-pathogenic micro-organisms that are recognized by specific receptors on the surface of the plant cells (Henry et al., 2012).

An elicitor triggers a complex signaling system that then transfers information about a possible attack by a pathogen to different parts of the plant (Robert-Seilaniantz et al., 2011). Elicitation stimulates a transient moderate stress response by the plant (Bordiec et al., 2011), which results in the classical “oxidative burst” associated with changes in the activity of super oxide dismutase (Alscher et al., 2002) and other enzymes that scavenge reactive oxygen species (Mittler, 2002). In addition, increases in the activities of lipoxygenase and phenylalanine ammonia lyase are observed, not only as part of plant defenses but also as key enzymes for the signaling system in plants (Apel and Hirt, 2004). As a result of the elicitor treatment, the plant is in a “primed state”. This mechanism by which plants can increase their level of resistance by intensifying the responsiveness of their immune system upon recognition of selected signals from their environment is called ‘priming’ or ‘priming of defense’. The priming can provide long-lasting resistance, which is based on a faster and/or stronger defense reaction upon pathogen or pest attack (Pastor et al., 2012). Under a subsequent biotic or abiotic stress, the primed plant

* Corresponding author. Tel.: +596 596 42 30 92; fax: +596 596 42 30 01.
E-mail address: alain.soler@cirad.fr (A. Soler).

0261-2194/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.07.012

activates its defenses more rapidly and more robustly than non-primed plants. In plants, induced systemic resistance depends on the jasmonic acid signaling pathway and other oxylipins, especially if the inducers are non-pathogenic micro-organisms (Jankiewicz and Kołtonowicz, 2012; Jung et al., 2012; Van der Ent et al., 2009). On the other hand, systemic acquired resistance (SAR) is triggered by a 'primary' pathogen attack (Molinari and Baser, 2010), and resistance depends on the salicylic acid pathway. The two pathways are not independent and signaling crosstalk between the SA and JA pathways usually indicates reciprocal antagonism (Thaler et al., 2012), but other plant hormones are also involved in the regulation of the plant defense system (Robert-Seilaniantz et al., 2011; Soler et al., 2012). Methyljasmonate (JAME) and salicylic acid (SA) have been successfully used as elicitors in systemic resistance experiments. However, in a greenhouse experiment, Chinnasri et al. (2006) reported that SAR inducers were not effective in controlling the reniform nematode *Rotylenchulus reniformis* in 'Smooth Cayenne'.

In this paper, we evaluated the capability of pineapple to produce systemic resistances against *R. reniformis* nematodes. We focused on JAME and SA, two key elicitors of systemic resistances in plants and hypothesized that ISR and SAR, can contribute to the control of the nematode *R. reniformis*.

In a previous study (Soler et al., 2009), we showed that in the absence of ISR a higher rate of nematode multiplication was observed on 'MD-2' than on 'Smooth Cayenne' despite a lower pathogenic impact of the nematodes on growth of MD-2 shoot and roots. It was thus concluded that MD-2 is more tolerant to *R. reniformis* than is SC. So, a second hypothesis tested in this new study was the possible differential response to the elicitors for these two pineapple cultivars. Finally, a third hypothesis was that in pineapple a systemic resistance induced by JAME could be characterized by a transient stress after induction and a plant 'priming' resulting in enhanced defense response after *R. reniformis* inoculation.

2. Material and methods

To test the first two hypotheses, we compared the increase in nematode populations after inoculation of *R. reniformis* on plants of 'MD-2' (MD-2) and 'Smooth Cayenne' (SC) with or without ISR or SAR elicitor treatments in a single pot experiment.

To test the third hypothesis, in a split root experiment only using the MD-2, we searched for physiological characteristics of the ISR: a systemic effect, a transient stress just after induction as well as a priming effect. To this end, different enzymatic activities linked to plant response to stress (oxidative enzymes, PR proteins and key enzymes of signaling pathways) were monitored in roots (Alscher et al., 2002; Apel and Hirt, 2004; Hamamouch et al., 2011).

2.1. Plant materials

To test the efficacy of the elicitors methyljasmonate (JAME) and salicylic acid (SA) as elicitors of ISR and SAR on MD-2 and SC, pineapple young shoots weighing 150 g were planted in 1 L pots filled with a mixture of Andosol and compost (50/50, V/V) and grown for two months. The average fresh weight of the pineapple plants when elicitors were applied was 201.6 g ± 43 g. Seven replicates (plants) were used for each treatment in the single pot experiment where nematode populations were evaluated. The two cultivars were selected after a previous experiment showed that in the absence of elicitor, MD-2 was more tolerant to nematodes than other cvs. (Soler et al., 2009). In the split-root experiment, MD-2 plantlets similar to those used in the first experiment were grown for two months in twin 250 mL pots that allowed the growth of two half root systems into two separate compartments. Two 250 mL plastic pots were stapled together and the upper part of the wall in between the 2 pots was cut to receive the plant without roots. The bottom part of the wall acted as a sunken divider that allowed the shoot to root simultaneously in each half of the twin pot. Four replicates were used for each measurement time series in the spilt-root experiment where only enzymatic activities were measured.

2.2. Elicitor treatment and inoculation with nematodes

For the ISR-SAR study in the single pot experiment, 50 mL each of methyljasmonate (JAME) and salicylic acid (SA) solutions, (10^{-4} M JAME, Serva GmbH; and 10^{-3} M SA, Sigma–Aldrich Chemie) were applied directly on the soil surface of each pot. Applications were repeated three times at 5-day intervals and a population of 5000 *R. reniformis* (juveniles, females and males) was inoculated directly into the soil above the root system, five days after the third elicitor treatment. In the split-root experiment, 20 mL of the JAME solution was applied only once and only to one of the twin pots, while 25,000 *R. reniformis* nematodes were inoculated on the untreated half of the root system. Water was used for the controls. The nematode inoculum was obtained from a monospecific population of *R. reniformis* reared on Cowpea (*Vigna unguiculata*).

2.3. Evaluation of nematode populations

The development of the nematode populations was evaluated in the single pot experiment forty-five days after inoculation. Nematodes adhering to pineapple root systems were washed down using tap water, then the entire soil from each single pot and washing water from roots were mixed and processed by the elutriation-sieving technique (Seinhorst, 1962) to extract reniform nematodes. Nematodes were enumerated under a stereomicroscope and abundance was expressed as number of vermiform stages and eggs per g of fresh pineapple roots.

2.4. Plant growth and leaf chlorophyll content

The increase in the weight of the pineapple plant and root system was measured 45 days after inoculation in the single pot experiment. The leaf chlorophyll level content was also estimated with a SPAD 502 (Minolta) chlorophyll meter as an indicator of whole-plant health. Root weight was also measured since inhibition of root growth has been the most widely used assay for screening affected mutants with respect to JA signaling (Wasternack, 2007).

2.5. Enzymatic activities

In the twin pot experiment, activities of the enzymes catalase (CAT), super oxide dismutase (SOD), phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POD), lipoxygenase (LOX), chitinase (CHI) and β 1,3 glucanase (GLU) were measured on crude root extracts with the following set up:

In the split-root system, half the root system of the plants was treated with the JAME solution (or water in the case of the controls), while on the untreated half of their root system, stress enzymes activities were measured 0, 1, 4, 10, and 14 h after application of the elicitor. In other plants, the elicitor treatment with JAME (or water for the controls) was applied as explained just before but nematodes were inoculated four days after. Then enzymatic activities were measured on the untreated but inoculated side 10 days later.

The enzymatic measurements were made using the following procedures: The roots were carefully washed, dried on absorbent

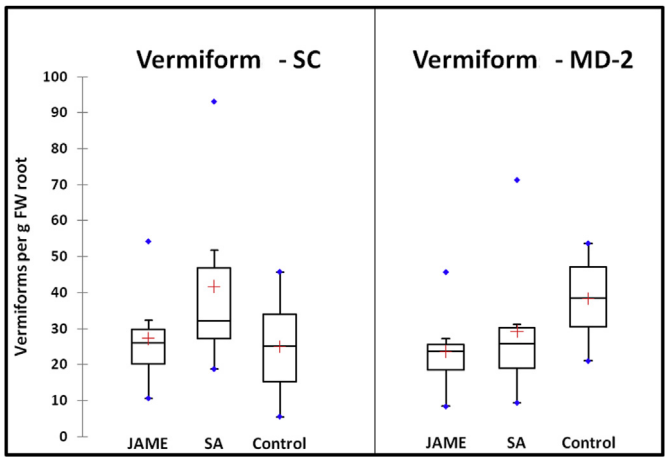


Fig. 1. Number of *Rotylenchulus reniformis* after application of elicitors on roots of pineapple cultivars Smooth Cayenne (SC) and MD-2. Dots represent extreme values, + represent mean values. JAME stands for methyljasmonate and SA for salicylic acid. Treatments were as follows: Three applications (50 mL per pot) of solutions of JAME (10^{-4} M), SA (10^{-3} M), or water (controls) at 5-day intervals. Nematodes adhering to pineapple roots and nematodes from soil were extracted and counted 45 days after inoculation with 5000 *R. reniformis* five days after the final elicitor treatment).

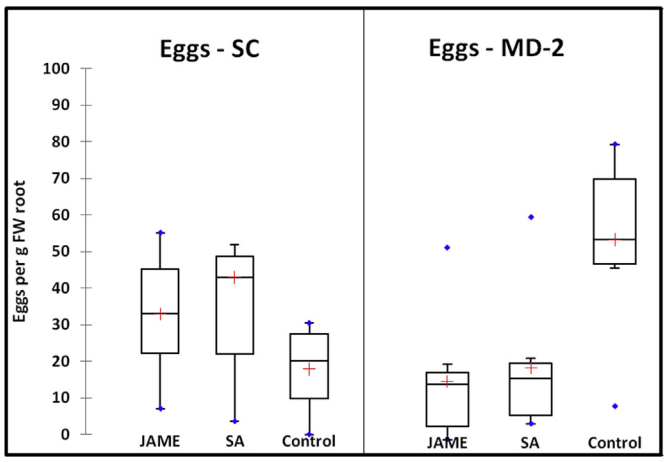


Fig. 2. Number of eggs (fecundity) of *Rotylenchulus reniformis* after application of elicitors to the root system of Smooth Cayenne (SC) and MD-2. Dots represent extreme values, + represents mean values. JAME stands for methyljasmonate and SA for salicylic acid. Treatments were as follows: Three applications of 50 mL of 10–4 M JAME, 10^{-3} M SA) or water (controls) at 5-day intervals. Eggs were counted 45 days after inoculation with 5000 *R. reniformis* five days after the final application of the elicitors).

paper, weighed, and then ground in liquid nitrogen with a stainless steel mortar before freeze drying. The crude extracts were obtained from 10 mg ml^{-1} of freeze dried powder in cold 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8), containing 40 mM PMSF (protease inhibitor from Sigma) and 62.5 mg ml^{-1} polyvinyl-pyrrolidone under gentle stirring on ice for one hour. The crude extracts were then filtered first on Pall A/E glass-fiber filters then on Whatman filters (0.45 μm PS).

CAT activity (EC 1.11.1.6): H_20_2 consumption was monitored for 4 min at 240 nm according to Zhou et al. (2003). Catalase units are expressed in Kat g^{-1} DW (Kat = Mole s^{-1}, $e = 40$ mM^{-1} cm^{-1}).

POD activity (EC 1.11.1.7): production of tetraguaiacol from the substrate guaiacol (2-methoxyphenol) was monitored at 470 nm according to Harinasut (2003). POD units are expressed in Kat g^{-1} DW (Kat = Mole s^{-1}, $e = 26.6$ mM^{-1} cm^{-1}). SOD activity (EC 1.15.1.1): Super oxide ions were produced through xanthine/xanthine oxidase reaction. Eighty μL of crude extract were added to the medium and the production of blue pigment from the reaction of super oxide ions with NBT was monitored at DO_{560} for 4 min. SOD units are expressed in g^{-1} DW according to Giannopolistis and Ries (1977). LOX activity (EC 1.13.11.12): Lipid peroxide production (diene-hydroperoxide) from linoleic acid was monitored for 10 min at 234 nm. LOX units are expressed in μKat g^{-1} DW, (μKat = μMole min^{-1}, $e = 25{,}000$ M^{-1} cm^{-1} (Yadav and Bhatla, 2011)). PAL activity (EC 4.3.1.5): Cinnamic acid produced from L-phenylalanine according to the procedure of Zhou et al., (2003) with 250 μL of crude extract was measured at 290 nm. The crude extracts were pretreated with 1% protamine sulfate. PAL units are expressed in μKat g^{-1} DW (μKat = μMole s^{-1}, $e = 9000$ M^{-1} cm^{-1}). CHI activity (EC 3.2.1.14): chitinase activity was measured from hydrolysis of p-nitrophenyl N-acetylglucosamine according to Chernin's (1995) procedure. CHI units are expressed in nKat g^{-1} DW (nKat = nMole p-nitrophenol s^{-1}). GLU activity (EC 3.2.1.39): hydrolysis of laminarin was monitored according to the procedure of Marco and Felix (2007). GLU units are expressed in mKat g^{-1} DW (mKat = mMole glucose min^{-1}).

2.6. Statistics

As nematode populations follow a negative binomial distribution (aggregated populations), they are not correctly described by classical parametric statistics (Quénéhervé and Ferris, 1989). Nematode data are presented as box plots, as these summarize the statistics of the samples more clearly, and statistical data is frequently presented in this way in nematology studies. The p values were calculated using Kruskal–Wallis non-parametric bilateral tests. For the enzymatic activities, bilateral tests ($a = 0.05$) were used to compare each control plant with the plant that received the corresponding elicitor treatment.

3. Results

3.1. Single pot experiment

3.1.1. Nematode control

Total *R. reniformis* populations (vermiform stages + eggs) were significantly smaller on MD-2 roots treated with JAME ($p = 0.006$) and SA ($p = 0.016$) than on controls. Vermiform populations were significantly smaller on treated MD-2 plants than on controls only after application of JAME (Fig. 1), (p values were 0.028 and 0.121 for JAME and SA, respectively). Significantly fewer eggs were also observed on treated MD-2 plants than on control plants (Fig. 2; $p = 0.011$ for JAME and 0.035 for SA). Percentage decreases in both eggs and vermiform stages ranged from −47.8% to −73.1% (Table 1).

In contrast with MD-2, for SC there were no significant differences in vermiform populations or numbers of eggs on control plants or plants treated with JAME or SA (Figs. 1 and 2). Indeed on SC plants, the number of eggs tended to increase after application of the elicitor. Remarkably, in the absence of application of either elicitor, the nematode populations (especially the number of eggs) increased more on the MD-2 control than on the SC control. But when the MD-2 plants were treated with the elicitors, the populations measured were not only smaller than those on MD-2 controls, but also smaller than the populations observed on SC controls (Figs. 1 and 2).

3.1.2. Growth indicators

Root growth of MD-2 was significantly inhibited by JAME and SA but only JAME had the same effect on the SC roots (Table 2). There was no significant difference in plant or D leaf weight, measured according to Py et al. (1984), between controls and treated plants. Leaf chlorophyll content in the two cultivars also was not different.

Table 1
Percentage reduction in *Rotylenchulus reniformis* populations after elicitor treatments JAME (10^{-4} M) & SA (10^{-3} M) on 2 pineapple cultivars, Smooth Cayenne (SC) and MD-2 compared to controls.

	SC		MD-2	
	JAME	SA	JAME	SA
Adults	−24.0%	−11.2%	−59.3%	−47.8%
Eggs	−1.4%	−4.0%	−73.1%	−61.9%
Total	−14.3%	−8.2%	−67.0%	−55.8%

JAME stands for methyljasmonate, SA for salicylic acid.
Reduction of populations (expressed in percentage) are differences between means of population extracted from treated plants and control.
Treatments were as follows: Three applications (50 mL per pot) of solutions of JAME (10^{-4} M), SA (10^{-3} M), or water (controls) at 5-day intervals. Nematodes adhering to pineapple roots and nematodes from soil were extracted and counted 45 days after inoculation with 5000 *R. reniformis* five days after the final application of the elicitor, seven plants per treatment.

Table 2
Effect of elicitor treatments on growth characteristics of pineapple measured before inoculation with *Rotylenchulus reniformis*.

Growth indicators	Cultivars	JAME	SA	Control
Leaf D (cm)	MD-2	41.0[a]	37.9[a]	41.8[a]
	SC	43.1[a]	45.1[a]	42.7[a]
Root weight (g)	MD-2	11.9[b]	9.7[b]	16.8[a]
	SC	13.0[b]	18.2[a]	18.6[a]
Crown weight (g)	MD-2	192.8[a]	152.9[a]	181.1[a]
	SC	236.6[b]	206.1[a]	196.3[a]
Chlorophyll	MD-2	42[a]	44[a]	38[a]
	SC	49[a]	44[a]	43[a]

Bilateral tests comparing treated and control plants using the same cultivar. Seven plants analyzed per treatment. Different letters indicate significant differences at $\alpha = 0.05$.

3.2. Split roots in the twin pot experiment

3.2.1. Enzymatic activities after JAME application

Most of the enzymatic activities increased sharply within the first hour (t1) following application of JAME (Fig. 3). CAT activity was the exception, as activity decreased sharply between 1 h and 4 h (Fig. 4). LOX, POD, CHI activities decreased to a minimum between 4 h (t4) and 10 h (t10) before increasing again at 14 h (t14). Most of the enzymatic activities reached their initial level after 14 h. GLU activity reached a maximum later than the other enzymes, i.e. 4 h after application of JAME, and activity remained higher than its initial level up to 14 h. Except for a transient increase at 10 h, CAT activity remained low until the end of monitoring.

3.2.2. Enzymatic activities after JAME application and nematode inoculation: priming

The enzymatic activities of the plants stressed by nematodes (TI = treated with JAME then inoculated, and NTI = not treated then inoculated) were measured 10 days after inoculation (Figs. 3 and 4). At this time, plants treated with JAME and untreated plants had higher levels for most of the defense enzymes than at t0 (Fig. 3). However, the activities of CAT and GLU decreased (Fig. 4). LOX and SOD activities were much higher in inoculated plants than in plants treated with JAME. POD, PAL and CHI activities also increased but to a lesser extent. Enzymatic activities in plants treated with JAME and inoculated with nematodes were considerably greater than in untreated but inoculated plants: POD activity increased by almost 58.1%, while LOX increased by 41.5%, SOD increased by 36.9%, PAL increased by 15.0%, and CHI activity increased by 42.4%. Conversely, GLU activity was reduced by 20.7% and CAT activity by 66.6%.

4. Discussion

4.1. Control of nematodes through the natural defenses of pineapple induced by elicitors

Both elicitors, JAME and SA, triggered a defense response in MD-2 leading to a significant reduction in the development of *R. reniformis* populations (Fig. 1). Egg laying was particularly reduced, indicating that nematode fecundity was altered (Fig. 2).

It is important to note that the naturally tolerant MD-2 allowed greater development of the nematode population when no elicitor was applied (control), being consistent with results of a previous experiment (Soler et al., 2009). A hypothesis was that the MD-2 produced more small roots with fine root hairs during the 6-month experiment, which mitigated the damage caused by nematodes feeding on roots. Increased root production likely would support a marked increase in the nematode population. However, the present experiment lasted only 45 days so the plants probably did not have enough time to produce sufficient new fine roots to explain the rapid increase in the *R. reniformis* population. Consequently, we hypothesized that, without elicitor treatment, the MD-2 is a better host for the nematodes than SC.

Conversely, after application of either JAME or SA, the development of the nematode populations was reduced in the roots of MD-2. Meanwhile, in the same conditions in the susceptible SC the defense against the nematodes was not set up. To our knowledge, this is the first time systemic resistance has been induced in a pineapple cultivar using JAME or SA elicitors against *R. reniformis*. These results confirm those of a previous experiment on SC showing that the application of SA on leaves did not trigger a SAR against *R. reniformis*. However, application of another SAR inducer, acibenzolar-S-methyl (2.38 mM), did trigger a SAR on SC against *Meloidogyne javanica* (Chinnasri et al., 2006), whose biology is different from that of *R. reniformis*.

4.2. Growth indicators

Given the short duration of the experiment, the lack of any growth response is not surprising. Nevertheless, in the single pot experiment, the root growth inhibition observed in MD-2 and SC was expected because the elicitors were directly applied on the roots and this effect has been well documented for jasmonic acid (Wasternack, 2007) and SA (Kefeli and Kadyrov, 1971). More specifically on pineapple, a reduction in root growth following application of SA was reported by Chinnasri et al. (2006) but under different experimental conditions.

4.3. Systemic effect and priming by JAME on MD-2

The rapid systemic response of MD-2 to the application of JAME was a typical transient stress response, as evidenced by the changes in the enzymatic activities associated with the oxidative burst (Apel and Hirt, 2004). This is an early event characterizing the priming (Bordiec et al., 2011). These enzymes are also supposed to be components of the defense system of the plants and different physiological functions have already been proposed in case of biotic stresses including nematodes. The reduction in CAT may lead to an increase in H_2O_2, which is toxic for pathogens (Lee and Lee, 2000), but H_2O_2 is also a signaling molecule in ISR (Apel and Hirt, 2004) as well as a substrate for other enzymes. The decrease in CAT in roots just after a JAME treatment has also been reported on various plants (Loyola-Vargas et al., 2012; Nojavan-Ashgari and Norastehnia, 2006). Peroxidases also help reinforce cell walls through callose deposits, thus reducing penetration by the nematodes (Wuyts et al., 2007). The SOD is considered to be a first line defense

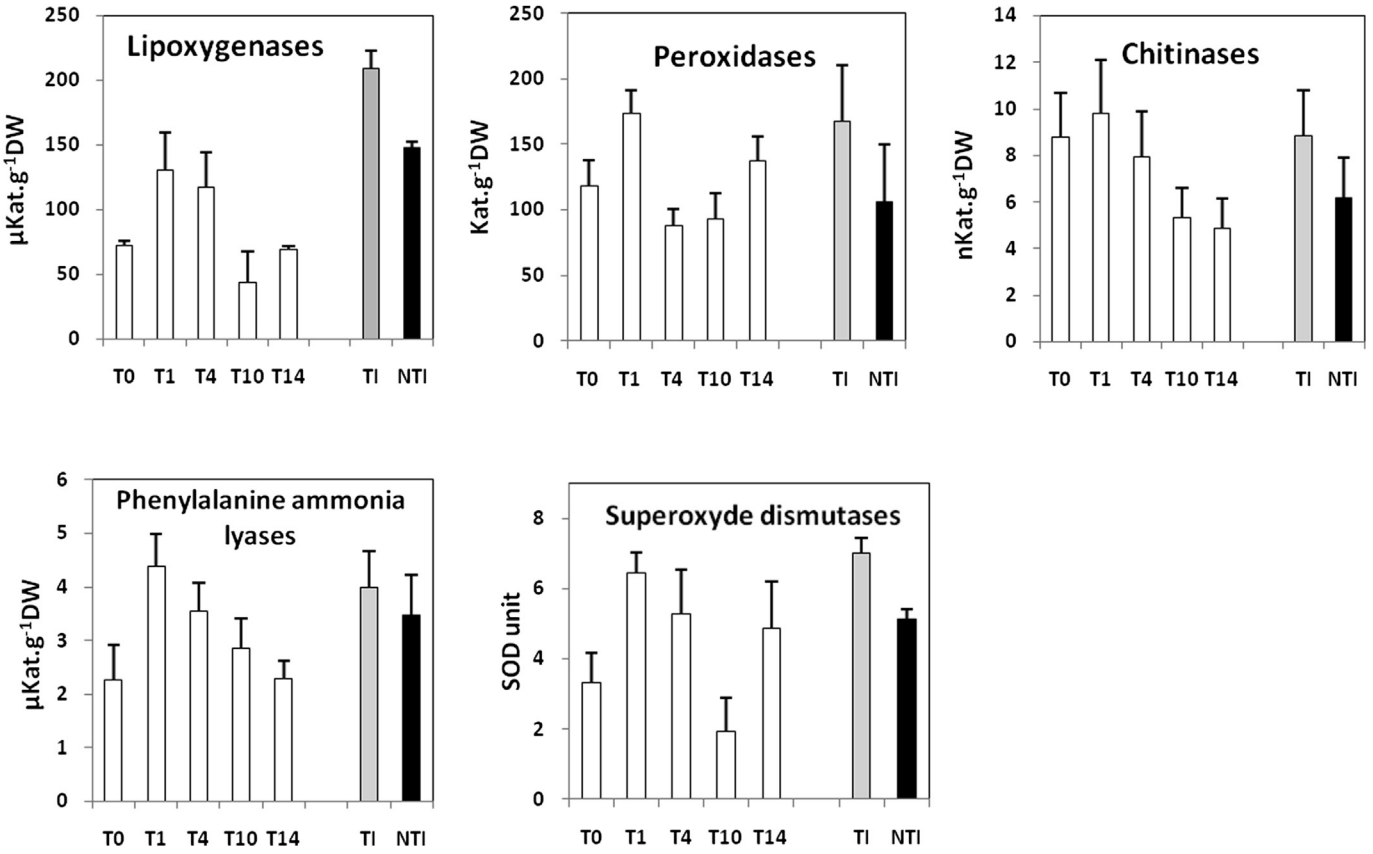


Fig. 3. Increase in enzyme activities: Lipoxygenase (LOX), peroxidase (POD), chitinase (CHI), phenylalanine ammonia lyase (PAL) and super oxide dismutase (SOD) in primed pineapple plants following a transient stress response after treatment with JAME. TI stands for plants treated with JAME then inoculated (TI), and NTI for plants treated with water then inoculated (NTI). T0, T1, T4, T10, T14 stand for time after application of JAME: 0 h (before treatment), then 1 h, 4 h, 10 h and 14 h after treatment. LOX units are expressed in µKat.g^{-1}DW; POD units in Kat.g^{-1}DW; CHI units in nKat, defined as 1 nmole of p-nitrophenol g^{-1} DW s^{-1}; PAL units in µKat.g^{-1}DW defined as 1 µmole of acid cinnamic g^{-1} DW s^{-1}; SOD unit: 1 SOD unit = 50% of inhibition of xanthine/xanthine oxidase reaction.

against the toxic oxygen species produced during the oxidative burst (Lee and Lee, 2000). The increase in LOX activity may reflect an increase in the biosynthesis of the signal molecule JAME, characterizing the ISR set up, while the increase in PAL activity may lead to an increase in the production of phenylpropanoids. PR proteins (CHI and GLU) are also a common response to different stresses.

After the transient stress response, in primed plants, several JA-dependent defense genes can be activated more rapidly and more strongly than in non-primed plants (Conrath, 2009). Our data confirmed that, very early after inoculation, all the MD-2 plants showed a stress reaction similar to that observed immediately after the application of JAME. The stronger response of the plants treated with JAME points to ISR priming. However, the difference between primed and non-primed plants was not very large, probably because among the 25,000 nematodes inoculated, very few were able to start colonizing the root system in a period as short as 10 days. The stress response observed was thus still relatively small.

Our data demonstrate that the MD-2 cultivar was able to establish an ISR against *R. reniformis* after application of JAME. In the same cultivar, application of a SAR inducer, SA, was also able to induce the control of *R. reniformis*, indicating that SAR and ISR may be both induced in MD-2. On the contrary, the SC cultivar was not

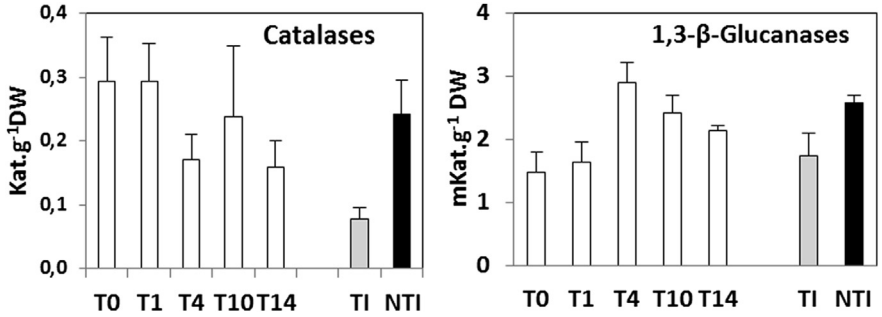


Fig. 4. Decrease in enzyme activities catalase (CAT) and β-glucanase (GLU) in primed pineapple plants following a transient stress response after treatment with JAME. TI stands for plants treated with JAME then inoculated and NTI for plants treated with water then inoculated. T0, T1, T4, T10, T14 stand for hours after application of JAME : 0 h (before treatment), 1 h, 4 h, 10 h and 14 h after treatment. CAT units are expressed in Kat.g^{-1}DW and GLU units in mKat.g^{-1}DW (1 Unit of mKat was defined as production of 1 mmol of glucose g^{-1} DW min^{-1}).

able to establish a systemic resistance against *R. reniformis* with either JAME or SA. However, this cultivar has been shown to be capable of systemic resistance against another nematode, *M. javanica*, after application of a different SAR inducer (Chinnasri et al., 2006). These data suggest that the ability to establish efficient induced systemic resistances (ISR) may be specific to some pineapple cultivars or that the conditions required to trigger such resistances differ from one cultivar to another.

Raimbault et al. (2013) observed that the MD-2 which is not sensitive to chilling, showed similar adaptive characteristics observed in other plant species. This applies for varieties that are not sensitive to abiotic stresses (drought, salinity, temperature). In the MD-2, among other cultivars, a cystatin gene (protease inhibitor) was shown to be highly up-regulated after chilling, suggesting it could be a good marker of resistance to chilling. It would be interesting to investigate if this cystatin could also be used as a marker of the establishment of an ISR in primed plants, as this is the case in tomato (Fujimoto et al., 2011). Moreover, there is evidence that a rice cystatin may be directly involved in resistance to the nematode *Radopholus similis* thanks to its anti-digestive protein properties in transgenic banana (Atkinson et al., 2004). Rabovich et al. (2009) reported that the concentration of protease inhibitors in the SC could be related to a defense reaction to nematode infestation, but their data did not confirm a cause and effect relationship.

We focused our split-root experiment on ISR induced by JAME on the cultivar MD-2, which gave good results in reduction of *R. reniformis* population. ISR induced by interactions between plants and non pathogenic micro-organisms, particularly rhizospheric endophytes, are mediated through the jasmonate signaling pathway (Hao et al., 2012; Jonathan and Umamaheswari, 2006; Molinari, 2011; Vetrivelkalai et al., 2010; Yan et al., 2011). Recent reviews are discussing the potential of non pathogenic micro-organisms for ecological management of biotic or abiotic stresses through ISR (Aravind et al., 2012; Choudhary, 2012; Jankiewicz and Kołtonowicz, 2012; Khan et al., 2012). We now are hypothesizing that it may be also true in pineapple (Soler et al., 2013).

4.4. Concluding remarks

Our data support the hypothesis of early activation of systemic resistance (ISR and SAR) against the nematode *R. reniformis* in pineapple and that this activation could be variety dependant. They also suggest that ISR, and may be SAR, could be a part of an ecologically based IPM of the reniform nematode *R. reniformis*. Further investigation is needed to determine if using the appropriate cultivars and technologies to produce primed plants, *i.e.* application of elicitors or preplant bacterization and/or mycorrhization, could be part of new strategies for sustainable ecologically based pineapple cropping systems.

References

Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002. Role of super oxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 53, 1331–1341.

Apel, K., Hirt, H., 2004. ROS, metabolism and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55, 373–399.

Aravind, R., Kumar, A., Eapen, S.J., 2012. Pre-plant bacterisation: a strategy for delivery of beneficial endophytic bacteria and production of disease-free plantlets of black pepper (*Piper nigrum* L.). Archives of Phytopathology and Plant Protection 45, 1115–1126.

Atkinson, H., Grimwood, S., Johnston, K., Green, J., 2004. Prototype demonstration of transgenic resistance to the nematode *Radopholus similis* conferred on banana by a cystatin. Transgenic Research 13, 135–142.

Bordiec, S., Paquis, S., Lacroix, H., Dhondt, S., Ait Barka, E., Kauffmann, S., Jeandet, P., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., 2011. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. Journal of Experimental Botany 62, 595–603.

Chernin, C., 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. Applied and Environmental Microbiology 61, 1720–1726.

Chinnasri, B., Sipes, B.S., Schmitt, D.P., 2006. Effects of inducers of systemic acquired resistance on reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Rotylenchulus reniformis* in pineapple. Journal of Nematology 38, 319–325.

Choudhary, D., 2012. Microbial rescue to plant under habitat-imposed abiotic and biotic stresses. Applied Microbiology and Biotechnology On line, 1–19.

Conrath, U., 2009. Chapter 9 priming of induced plant defense responses. In: Loon, L.C.V. (Ed.), Advances in Botanical Research. Academic Press, pp. 361–395.

Conrath, U., 2011. Molecular aspects of defense priming. Trends in Plant Science 16, 524–531.

Fujimoto, T., Tomitaka, Y., Abe, H., Tsuda, S., Futai, K., Mizukubo, T., 2011. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. Journal of Plant Physiology 168, 1084–1097.

Giannopolistis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxyde dismutases I. Occurence in higher plants. Plant Physiology 59, 309–314.

Hamamouch, N., Li, C.Y., PilJoon, S., ChungMo, P., Davis, E.L., 2011. Expression of Arabidopsis pathogenesis-related genes during nematode infection. Molecular Plant Pathology 12, 355–364.

Hao, Z., Fayolle, L., van Tuinen, D., Chatagnier, O., Li, X., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., 2012. Local and systemic mycorrhiza-induced protection against the ectoparasitic nematode *Xiphinema index* involves priming of defence gene responses in grapevine. Journal of Experimental Botany 63, 3657–3672.

Harinasut, P., 2003. Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. Science Asia 29, 109–113.

Henry, G., Thonart, P., Ongena, M., 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 16 (2), 257–268.

Jankiewicz, U., Kołtonowicz, M., 2012. The involvement of pseudomonas bacteria in induced systemic resistance in plants (Review). Applied Biochemistry and Microbiology 48, 244–249.

Jonathan, E.I., Umamaheswari, R., 2006. Biomanagement of nematodes infesting banana by bacterial endophytes (*Bacillus subtilis*). Indian Journal of Nematology 36, 213–216.

Jung, S., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J., Pozo, M., 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. Journal of Chemical Ecology, 1–14.

Khan, M.I.R., Syeed, S., Nazar, R., Anjum, N.A., 2012. An insight into the role of salicylic acid and jasmonic acid in salt stress tolerance. In: Khan, N.A., Nazar, R., Iqbal, N., Anjum, N.A. (Eds.), Phytohormones and Abiotic Stress Tolerance in Plants. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 277–300.

Kefeli, V.I., Kadyrov, C.S., 1971. Natural growth inhibitors, their chemical and physiological properties. Annual Review of Plant Physiology 22, 185–196.

Lee, D., Lee, C., 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. Plant Science 159, 75–85.

Loyola-Vargas, V., Ruíz-May, E., Galaz-Ávalos, R., De-la-Peña, C., 2012. The role of jasmonic acid in root mitochondria disruption. Plant Signaling & Behavior 7, 611–614.

Malézieux, E., Crozat, Y., Dupraz, C., Laurans, M., Makowski, D., Ozier-Lafontaine, H., Rapidel, B., de Tourdonnet, S., Valantin-Morison, M., 2009. Mixing plant species in cropping systems: concepts, tools and models. A review. Agronomy for Sustainable Development 29, 43–62.

Marco, J.L., Felix, C.R., 2007. Purification and characterization of a b-Glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential. Brazilian Archives of Biology and Technology 50, 21–29.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7, 405–410.

Molinari, S., 2011. Natural genetic and induced plant resistance, as a control strategy to plant-parasitic nematodes alternative to pesticides. Plant Cell Reports 30, 311–323.

Molinari, S., Baser, N., 2010. Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. Crop Protection 29, 1354–1362.

Nojavan-Ashgari, M., Norastehnia, A., 2006. A possible role for methyl jasmonate in effecting superoxide dismutase and catalase activities under PQ-induced oxidative stress in maize seedlings. Journal of Biological Sciences 6, 55–60.

Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., Flors, V., 2012. Primed plants do not forget. Environmental and Experimental Botany, On line.

Py, C., Lacoeuilhe, J.J., Teisson, C., 1984. The Pineapple: Cultivation and Uses. Editions G.-P. Maisonneuve, Paris.

Quénéhervé, P., Ferris, H., 1989. Use of geometric vs arithmetic mean in the prominence value index and diagram frequency vs abundance. Journal of Nematology 21, 580.

Raimbault, A.K., Zuily-Fodil, Y., Soler, A., Mora, P., Cruz de Carvalho, M.H., 2013. The expression patterns of bromelain and AcCYS1 correlate with blackheart resistance in pineapple *Ananas comosus* L. M.) fruits submitted to postharvest chilling stress. Journal of Plant Physiology (on line).

Rabovich, C., Paull, R., Sipes, B., 2009. Protease inhibitors and reproduction of reniform nematode in pineapple. Annals of Applied Biology 154, 127–132.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., Jones, J.D.G., 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. Annual Review of Phytopathology 49, 317–343.

Seinhorst, J.W., 1962. Modifications of the elutriation method for extracting nematodes from soil. Nematologica 8, 117–128.
Soler, A., Marie Alphonsine, P.-A., Topart, P., Quénéhervé, P., 2009. How to evaluate the resistance or tolerance of pineapple varieties to nematodes? In: Reinhardt, D.H.R.C. (Ed.), Proceedings of the Sixth International Pineapple Symposium, João Pessoa, Brazil, November 18–23, 2007. ISHS, [Belgique], Louvain, pp. 191–198.
Soler, A., Marie Alphonsine, P.-A., Corbion, C., Fernandes, P., Portal Gonzalez, N., Gonzalez, R., Repellin, A., Declerck, S., Quénéhervé, P., 2013. A strategy towards bioprotection of tropical crops: experiences and perspectives with ISR on pineapple and banana in Martinique (Poster & short note 4p, in: Bulletin IOBC, on line). In: Sixth Meeting of IOBC-WPRS Working Group "Induced Resistance in Plants against Insects and Diseases": Induced Resistance in Plants against Insects and Diseases: Leaping from Success in the Lab to Success in the Field, June 10–13, 2013. Avignon, France.
Soler, R., Erb, M., Kaplan, I., 2012. Long distance root–shoot signalling in plant–insect community interactions. Trends in Plant Science 18, 149–156.
Thaler, J.S., Humphrey, P.T., Whiteman, N.K., 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. Trends in Plant Science 17, 260–270.
Vallad, G.E., Goodman, R.M., 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. Crop Science 44, 1920–1934.
Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. Phytochemistry 70, 1581–1588.
Vetrivelkalai, P., Sivakumar, M., Jonathan, E.I., 2010. Biocontrol potential of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* and its effect on plant growth in bhendi. Journal of Biopesticides 3, 452–457.
Wasternack, C., 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. Annals of Botany 100, 681–697.
Wuyts, N., Lognay, G., Verscheure, M., Marlier, M., De Waele, D., Swennen, R., 2007. Potential physical and chemical barriers to infection by the burrowing nematode *Radopholus similis* in roots of susceptible and resistant banana (Musa spp.). Plant Pathology 56, 878–890.
Yadav, M.K., Bhatla, S.C., 2011. Localization of lipoxygenase activity on the oil bodies and in protoplasts using a novel fluorescence imaging method. Plant Physiology and Biochemistry 49, 230–234.
Yan, X.N., Sikora, R.A., Zheng, J.W., 2011. Potential use of cucumber (*Cucumis sativus* L.) endophytic fungi as seed treatment agents against root-knot nematode Meloidogyne incognita. Journal of Zhejiang University, Science. B 12, 219–225.
Zhou, Y., Dahler, J., Underhill, S., Wills, R., 2003. Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. Food Chemistry 80, 565–572.

Journal of Plant Physiology 170 (2013) 1442–1446

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Plant Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jplph

Short communication

The expression patterns of bromelain and AcCYS1 correlate with blackheart resistance in pineapple fruits submitted to postharvest chilling stress☆

Astrid-Kim Raimbault[a,b], Yasmine Zuily-Fodil[a], Alain Soler[b], Phillipe Mora[a], Maria H. Cruz de Carvalho[a,c,*]

[a] IBIOS-UMR CNRS 7618 BIOEMCO, Université Paris Est Créteil (UPEC), 61 Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil cedex 2, France
[b] CIRAD-PRAM, Quartier Petite Morne, BP214, 97 285 Le Lamentin, Martinique
[c] Biodiv-UMR CNRS 7618 BIOEMCO, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 January 2013
Received in revised form 9 May 2013
Accepted 10 May 2013
Available online 15 June 2013

Keywords:
AcCYS1
Blackheart
Bromelain
Pineapple
Postharvest chilling treatment

ABSTRACT

Blackheart is a physiological disorder induced by postharvest chilling storage during pineapple fruit export shipping. The aim of this study was to check the involvement of bromelain, the cysteine protease protein family abundantly present in pineapple fruits, and AcCYS1, an endogenous inhibitor of bromelain, in the development of blackheart. For this we checked the response to postharvest chilling treatment of two pineapple varieties (MD2 and Smooth Cayenne) differing in their resistance to blackheart. Quantitative RT-PCR analyses showed that postharvest chilling treatment induced a down-regulation of bromelain transcript accumulation in both varieties with the most dramatic drop in the resistant variety. Regarding AcCYS1 transcript accumulation, the varieties showed opposite trends with an up-regulation in the case of the resistant variety and a down-regulation in the susceptible one. Taken together our results suggest that the control of bromelain and AcCYS1 expression levels directly correlates to the resistance to blackheart development in pineapple fruits.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Cold storage is widely used to slow down postharvest ripening and to extend the postharvest life of pineapple fruits during export shipping (Laville, 1994). However, pineapple fruits are susceptible to chilling temperatures which induce a set of physiological alterations causing visual damage inside the fruits (Teisson, 1972; Paul and Rohrbach, 1985; Stewart et al., 2002; Zhou et al., 2003). Such physiopathy is known as internal browning or blackheart and is one of the major limitations for the pineapple industry (Rohrbach et al., 2003). Natural variation to blackheart development can be found and some pineapple varieties have been characterized to resist better to postharvest chilling stress than others (Stewart et al., 2002; Weerahewa and Adikaram, 2005; Raimbault et al., 2011). Nevertheless, one of the most valued pineapple varieties worldwide, Smooth Cayenne, is also very susceptible to postharvest chilling treatment, developing acute blackheart symptoms during export shipping (Raimbault et al., 2011).

Abiotic stress has been shown to impair the content of membrane phospholipids and proteins by enhanced lipolytic and proteolytic action (Zuily-Fodil et al., 1990; Roy-Macauley et al., 1992; El Maarouf et al., 1999; Cruz de Carvalho et al., 2001; Hieng et al., 2004; Demirevska et al., 2008). Loss of cell integrity due to membrane damage by chilling stress is thought to be one of the major factors underlying blackheart development (Raimbault et al., 2011). Pineapple is extremely rich in bromelain enzyme family which is essentially composed of stem bromelain (EC 3.4.22.32) and fruit bromelain (EC 3.4.22.33) that are highly homologous cysteine proteases (Rowan et al., 1990). Although they have been given different names in regards to their initial identification, both fruit and stem bromelain isoforms can be found in pineapple fruits. Cysteine proteases in plants have been shown to be involved in development, protein turnover, degradation of damaged proteins (Schaller, 2004) and in response to various abiotic and biotic stresses (Schaller, 2004; Martínez et al., 2012). As far as we know, the biological role of bromelain in pineapple remains unknown.

Plant cystatins, commonly known as phytocystatins are the natural inhibitors of cysteine proteases (CP) (Oliveira et al., 2003). Due to their inhibitory action against CP, phytocystatins have

Abbreviations: Act, actin; AcCYS1, *Ananas comusus* cystatin 1; Aprt, adenine phophoribosyl transferase; CP, cysteine protease; Cyc, cyclophilin; ef-α, elongation factor 1-α; PCT, postharvest chilling treatment; RII, relative injury index; SC, Smooth Cayenne; β-tb, β-tubulin.

☆ The nucleotide sequence data is registered in Genbank under the accession numbers HM153704 and HM153703.

* Corresponding author. Present address: Laboratory of Plant Molecular Biology, Rockefeller University, New York, NY 10065, USA. Tel.: +1 212 327 80 93; fax: +1 212 327 83 27.
E-mail address: mcruzdecar@rockefeller.edu (M.H. Cruz de Carvalho).

0176-1617/$ – see front matter © 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.05.008

been shown to contribute to the prevention of essential protein breakdown during seed maturation and germination (Neuteboom et al., 2009). Moreover, phytocystatins have also been shown to be involved in plant responses to abiotic stresses like cold, salt and drought (Pernas et al., 2000; Diop et al., 2004; Zhang et al., 2008; Esteban-García et al., 2010). In pineapple, AcCYS1 is a phytocystatin present in the apoplasm which is able to inhibit over 95% of bromelain activity (Neuteboom et al., 2009).

Until now, only a few studies have related protein catabolism to chilling stress (Schaffer and Fischer, 1988; Montero et al., 1995; Prasad, 1996). To our knowledge, no studies have yet been carried out to investigate the involvement of bromelain and AcCYS1 in blackheart development in pineapple fruits. Thereby, the aim of the present study was to follow the response of two pineapple varieties differing in their resistance to blackheart development after a postharvest chilling treatment (PCT). We initially measured changes in membrane permeability occurring in response to PCT in these two varieties. We also investigated bromelain transcript accumulation as well as the expression of AcCYS1 by quantitative real-time RT-PCR analysis.

Materials and methods

Plant culture

Pineapple (*Ananas comosus* L.) plants were grown in the field at Morne Rouge (Martinique), in a station of the French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD). Two pineapple varieties were chosen due to their resistance (MD2) and susceptibility (Smooth Cayenne, SC) to blackheart development. Plants were grown under field conditions and fruits were harvested as previously described (Raimbault et al., 2011).

Postharvest chilling treatment

Twenty-four fruits were randomly divided into 2 groups of 12 fruits per variety. Six fruits were subjected to postharvest chilling treatment (PCT) designed to simulate the exportation shipping and sale conditions inducing blackheart symptoms: 10 days at 10 °C in a cold room followed by 10 days at room temperature (25 °C). Six other fruits were selected as a control and were flash frozen in liquid nitrogen immediately after harvest and sampling. For sampling, 3 flesh cubes were cut near the core at the base of each fruit and were immediately flash frozen in liquid nitrogen and kept at −80 °C until needed.

Fruit membrane injury test

Fruit membrane injury analysis was carried out using a modified Weerahewa and Adikaram (2005) protocol. Briefly, core flesh cubes (5 g) were treated with 25 mL of saccharose solutions (sol) adjusted to equivalent osmotic pressure, determined by refractometry (Digital, refractometer, Atago, WM 7) and shaked at 25 °C (120 rpm, Digital orbital shaker HS501). Conductivity (L_t) was measured at 15 min intervals during 2 h (conductivity meter, Hanna, HI 99300). The samples were then frozen (−25 °C) overnight. After 1h30 at 25 °C, the conductivity (L_0) was measured. Relative injury index (RII) was defined according to the following Eq. (1).

$$\mathrm{RII} = \frac{L_t - \mathrm{sol}}{L_0} \quad (1)$$

RNA extraction

Frozen flesh cubes were grind to a fine powder in liquid nitrogen with a mortar and pestle. Total RNA was extracted from 200 mg flesh powder using the RNeasy plant mini kit (QIAGEN, France) with a DNase treatment according to the manufacturer's instructions. RNA content was measured at λ 260 nm (Nanodrop, ND1000, USA).

Primer design and cDNA synthesis and cloning

Degenerate primers for two candidate reference genes: elongation factor 1-α (ef-α) and adenine phosphoribosyl transferase (Aprt), were designed from monocotyledon plants' consensus regions (http://www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/clustalw_in.pl). For bromelain, and given the high sequence identity existing between the different stem and fruit bromelain isoforms (ranging between 92 and 98%) it was difficult to design primer pairs that could discriminate the different isoforms. We therefore opted to design a primer pair from 100% consensus regions so as to amplify any bromelain isoform present in the extracts (Supplemental Table 1).

Synthesis of cDNAs was made from 1 μg of total RNA using the Omniscript® Reverse transcription kit (Qiagen, France) following the manufacturer's instructions. The PCR amplification products were cloned using the pGEM-T Easy Vector Plasmid System I (Promega, France) for sequencing (Lille, France).

Expression analysis by quantitative real-time PCR (qPCR)

Quantitative real-time PCR of reference and target genes was conducted in a LightCycler™ (Roche, France) using gene specific primers designed with PrimerPy software (http://code.google.com/p/oligobench/wiki/PrimerPy) (Supplemental Table 1). Reactions were carried out with 10 μL of final PCR reaction volume containing 1 μL of template cDNA, 1 μL of primer mix at 0.5 μM final concentration (forward and reverse primers), 5 μL of water, and 2 μL of SYBR® green master mix (Applied Biosystems). Three independent qPCR runs were performed as technical inter-run repetitions, with 3 intra-run replicates as biological repetitions. Data was normalized using actin as a reference gene, selected amongst five candidate reference genes.

Results

Fruit membrane injury index in MD2 and SC varieties submitted to PCT

Membrane status before and after PCT was assessed by electrolyte leakage and calculation of a relative injury index. After PCT the susceptible variety (SC) showed a significantly higher relative injury index (RII) than the resistant MD2, with respectively 90% and 42% after 135 min ($P < 0.05$) (Fig. 1). No significant differences were found between the RII before and after PCT in the resistant MD2 variety (Fig. 1).

Choice of the reference genes to study gene expression by qPCR in pineapple fruits

In the present study primers were designed for five different candidate reference genes (Supplemental Table 1). Adenine phosphoribosyl transferase (Aprt) and elongation factor 1-α (ef-α) sequences were obtained after cloning and sequencing (GenBank accession numbers HM153703 and HM153704, respectively). Reference genes were selected according to 2 parameters: (M) average expression stability, and (V) a pairwise variation (Vandesompele et al., 2002). According to GeNorm analysis, actin and ef-α showed the lowest M value among the five references genes: 0.592 and 0.643 M value respectively, making them the most stable reference genes tested (Fig. 2). The V value for Pairwise variation was

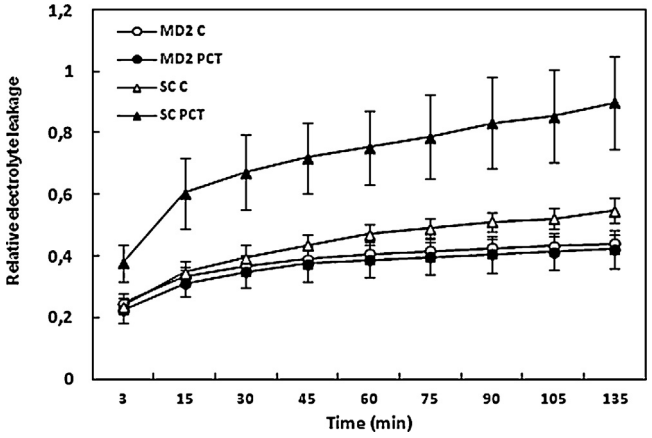


Fig. 1. Kinetics of fruit membrane injury in two pineapple fruit varieties differing in their susceptibility to blackheart assessed by electrolyte leakage. MD2, resistant variety; SC, susceptible variety; C, control untreated fruits; PCT, postharvest chilling treated fruits. Values are means ± SD of three independent experiments each with 3 replicates.

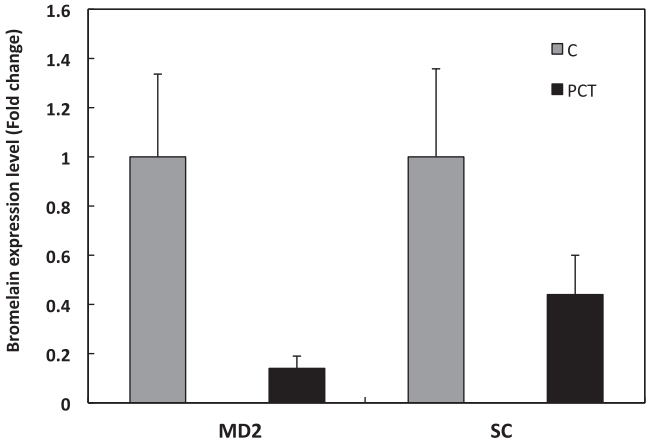


Fig. 3. Real-time qRT-PCR quantification of bromelain transcript accumulation after a postharvest chilling treatment in two pineapple varieties differing in their resistance to blackheart development: MD2 (resistant) and SC (susceptible). C, control untreated fruits; PCT, postharvest chilling treated fruits. Data was normalized with actin and ±SD are the means from 3 independent experiments. Relative quantification data was expressed with reference to controls (untreated fruits).

0.087 and 0.115 for actin and ef-α respectively with the addition of another reference gene (Supplemental Fig. 1).

Bromelain transcript accumulation in MD2 and SC varieties submitted to PCT

The transcript level of bromelain present in the fruits was measured by qPCR analyses on the two pineapple varieties, MD2 and SC, before and after PCT. In both varieties PCT induced a drop in the relative expression level of bromelain (Fig. 3). However, the drop in bromelain expression was more dramatic in the resistant variety (MD2) with only 14% of the control levels detected, whereas in the susceptible variety (SC) after PCT, bromelain expression detected was still 44% of the control levels (Fig. 3).

AcCYS1 transcript accumulation in MD2 and SC varieties submitted to PCT

Specific primers for AcCYS1 (EU937516), a phytocystatin presenting a large inhibitory effect on bromelain were designed for RT-qPCR procedures (Supplemental Table 1). PCT induced a strong up-regulation of AcCYS1 gene expression in the tolerant MD2 variety whereas the susceptible SC variety showed a down-regulation of AcCYS1 transcript accumulation (Fig. 4).

Discussion

Few reports have assessed the cellular and molecular events underlying pineapple fruit blackheart development. Our results show that fruit membrane injury estimated by electrolyte leakage measurements correlated well with the first symptoms of blackheart. These refer to flesh translucency which results from cellular integrity disruption and the disappearance of intracellular spaces (Soler, 1994). Our results are also in line with the results obtained by Weerahewa and Adikaram (2005) on Mauritus (Queen) and Kew (Smooth Cayenne) pineapple varieties, where brown flesh tissue displayed higher electrolyte leakage than flesh tissue with no visible symptoms. In the present work the resistant MD2 variety showed no significant difference between treatment and control

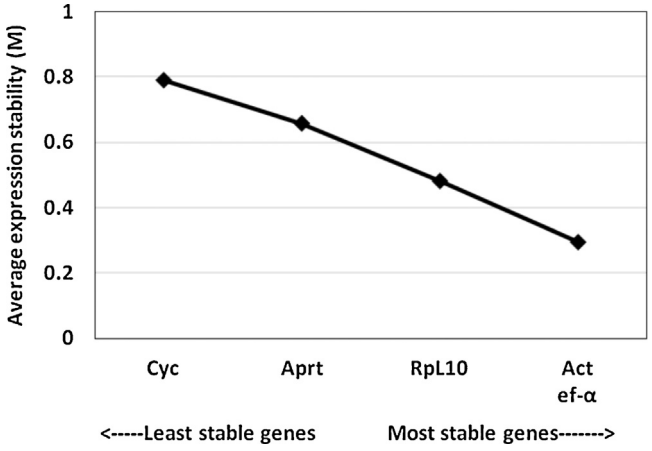


Fig. 2. Gene expression stability and ranking of the candidate reference genes for pineapple by Genorm analysis (http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/). Results show the average expression stability values (M) of the reference genes during the stepwise exclusion of the least stable control genes, the lower M corresponds to the more stable expression. Cyc, cyclophilin; ef-α, elongation factor 1-α; Act, actin; RpL10, ribosomal protein L10; Aprt, adenine phosphoribosyl transferase.

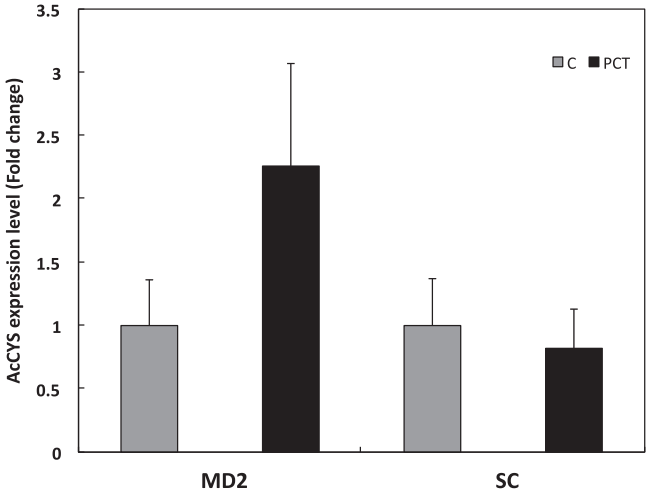


Fig. 4. Real-time qRT-PCR quantification of AcCYS1 transcript accumulation after a postharvest chilling treatment in two pineapple varieties differing in their resistance to blackheart development: MD2 (resistant) and SC (susceptible). C, control untreated fruits; PCT, postharvest chilling treated fruits. Data was normalized with actin and ±SD are the means from 3 independent experiments. Relative quantification data was expressed with reference to controls (untreated fruits).

conditions (Fig. 1) which is in agreement with the absence of blackheart symptoms after PCT (Raimbault et al., 2011). Taken together our results confirm that PCT affects cellular membrane integrity and that this directly correlates with the development of blackheart and to PCT susceptibility.

Studies on potato and tomato plants submitted to abiotic stresses (cold, salt and drought) showed that elongation factor1-α, ubiquitin and actin genes were reliable reference genes for qPCR studies in leaf tissues (Nicot et al., 2005; Jia-Liang et al., 2009; Lovdal and Lillo, 2009). Up to now, very few studies have focused on qPCR analysis of fruit gene expression. Under our experimental conditions in pineapple fruits, we show that actin and ef-α are both appropriate references genes to be used in qPCR studies (Fig. 2 and Supplemental Fig. 1). Furthermore, it was not necessary to use two reference genes to normalize gene expression. Our results are in agreement with those from Moyle et al. (2005) where actin was used as the unique reference gene for the detection of metallothionein expression in pineapple fruit flesh.

Under cold or chilling stress conditions diverse responses in cysteine protease (CP) expression have been reported. In the case of *Brassica napus*, BCP 15 presented a high level of expression under chilling conditions at an early stage of treatment (4 days) (Stroeher et al., 1997). Tomato fruits submitted to cold treatment also showed an accumulation of CP transcripts that dropped when returned to warmer temperatures (Schaffer and Fischer, 1990). Pineapple is extremely rich in bromelain from the cysteine protease family. Our results show that PCT resulted in a decrease in global bromelain expression in both pineapple fruit varieties (Fig. 3). Nevertheless, the variety resistant to blackheart (MD2) was the one that presented a higher down-regulation of bromelain expression (approximately 86% and 56% drop in MD2 and SC, respectively). Hence, bromelain regulation at the gene level could be related to resistance to the development of blackheart symptoms. Indeed it can be suggested that the resistant variety by drastically down-regulating bromelain expression after PCT avoids enhanced proteolytic action which would lead to membrane degradation and development of blackheart symptoms. In the case of the susceptible variety, the control in bromelain expression is less pronounced and therefore could explain the occurrence of membrane damage and the appearance of the blackheart symptoms. In the present study we collected data before and after PCT. These particular time points were chosen in order to analyze the changes occurring after PCT, which is the precise moment when the blackheart symptoms develop in pineapple fruits. However, it should be noted that these time points do not translate the complete time-course of bromelain response during PCT and further studies are needed to check this.

Cystatins modulate the activity of endogenous and exogenous cysteine proteases involved in biotic or abiotic stress responses (Pernas et al., 2000). In the present work, AcCYS1 regulation after PCT was directly related to the pineapple variety. In MD2, the resistant variety, AcCYS1 was up-regulated after PCT whereas it was down-regulated in SC, the susceptible variety. This suggests the existence of a direct correlation between AcCYS1 expression regulation and resistance to blackheart development. Interestingly, a similar trend was found in cowpea cultivars differing in their susceptibility to drought stress (Diop et al., 2004). Furthermore, transgenic Arabidopsis over-expressing two cystatins, AtCYSa and AtCYSb presented increased resistance to high salt, drought, oxidative, and cold stresses (Zhang et al., 2008). Taken together, this reinforces the suggested protective effect of phytocystatins under abiotic stress by modulating the activity of cysteine proteases and inhibiting excessive proteolytic action/degradation.

In conclusion, the present study shows that both bromelain and AcCYS1 expression was modulated by PCT. Furthermore, we detected a direct correlation between resistance to blackheart development and control of bromelain action, both at the level of bromelain gene expression as well at the level of AcCYS1 expression, its endogenous inhibitor.

Acknowledgements

The authors which to thank the technical assistance of S. Giusti-Miller and S. Chantepie for the enzymatic assays.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.05.008.

References

Cruz de Carvalho MH, D'Arcy-Lameta A, Roy-Macauley H, Gareil M, El Maarouf H, Pham-Thi AT, et al. Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. FEBS Lett 2001;492:242–6.

Demirevska K, Simova-Stoilova L, Vassileva V, Vaseval B, Grigorova B, Feller U. Drought-induced leaf protein alterations in sensitive and tolerant wheat varieties. Gen Appl Plant Physiol Spec Issue 2008;34:79–102.

Diop NN, Kidrič M, Repellin A, Gareil M, D'Arcy-Lameta A, Pham Thi AT, et al. A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. FEBS Lett 2004;577:545–50.

El Maarouf H, Zuily-Fodil Y, Gareil M, D'Arcy-Lameta A, Pham Thi AT. Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp differing in their drought tolerance. Plant Mol Biol 1999;39:1257–65.

Esteban-García B, Garrido-Cárdenas JA, Alonso DL, García-Maroto F. A distinct subfamily of papain-like cystein proteinases regulated by senescence and stresses in *Glycine max*. J Plant Physiol 2010;167:1101–8.

Hieng B, Ugrinovicĭ K, Sustar-Vozlic J, Kidric M. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. J Plant Physiol 2004;161:519–30.

Jia-Liang Z, Dong-Hua L, Zhi-Hua W, Can Y, Jin-Hua C, Chun-Tai W, et al. Expression pattern of GS3 during panicle development in rice under drought stress: quantification normalized against selected housekeeping genes in real-time PCR. Asian J Plant Sci 2009;8:285–92.

Laville E. La protection des fruits tropicaux après récolte. CIRAD-COLEACP.Tec & Doc-Lavoisier; 1994. p. 11–3.

Lovdal T, Lillo C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. Anal Biochem 2009;387:238–42.

Martínez M, Cambra I, González-Melendi P, Santamaría ME, Díaz I. C1A cysteine-proteases and their inhibitors in plants. Physiol Plant 2012;145(1):85–94.

Montero LM, Escribano MI, De La Plaza JL, Merodio C. Chilling temperature storage induces changes in protein patterns and protease activity in cherimoya fruit. Postharvest Biol Technol 1995;6(3/4):367.

Moyle RL, Crowe ML, Ripi-Koia J, Fairbairn DJ, Pineapple DB, Botella JR. An online pineapple bioinformatics resource. BMC Plant Biol 2005;5:21.

Neuteboom LW, Matsumoto KO, Christopher DA. An extended AE-Rich N-terminal trunk in secreted pineapple cystatin enhances inhibition of fruit bromelain and is posttranslationally removed during ripening. Plant Physiol 2009;151:515–27.

Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. J Exp Bot 2005;56:2907–14.

Oliveira AS, Xavier-Filho J, Sales MP. Cysteine proteinases and cystatins. Braz Arch Biol Technol 2003;46:91–104.

Paul RE, Rohrbach KG. Symptom development of chilling injury in pineapple fruit (*Ananas comosus*). JASHS 1985;110:100–5.

Pernas M, Sanchez-Monge R, Salcedo G. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. FEBS Lett 2000;467:206–10.

Prasad TK. Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. Plant J 1996;10:1017–26.

Raimbault AK, Marie-Alphonsine PA, Horry JP, Francois-Haugrin M, Romuald K, Soler A. Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* l.) after a chilling injury. J Agric Food Chem 2011;59:342–8.

Rohrbach KG, Leal F, Coppens D'Eeckenbrugge G. History, distribution and world production. In: Bartholomew PE, Paull RE, Rohrbach KG, editors. The pineapple: botany, production and uses. Wallingford: CABI Publishing; 2003. p. 1–12.

Rowan AD, Buttle DJ, Barrett AJ. The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochem J 1990;266:869–75.

Roy-Macauley H, Zuily-Fodil Y, Kidric M, Pham Thi AT, Vieira da Silva J. Effect of drought stress on proteolytic activities in *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. Physiol Planta 1992;85:90–6.

Schaffer MA, Fischer RL. Analysis of mRNAs that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. Plant Physiol 1988;87:431–6.

Schaffer MA, Fischer RL. Transcriptional activation by heat and cold of a thiol protease gene in tomato. Plant Physiol 1990;93:1486–91.
Schaller A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. Planta 2004;220:183–97.
Soler A. Abnormal ripening in pineapple: translucence of the flesh. I. Physical and chemical characteristics of waterlogged fruit. Fruits 1994;49:5–15.
Stewart RJ, Sawyer BJB, Robinson SP. Black heart development following chilling in fruit of susceptible and resistant pineapple cultivars. Aust J Exp Agric 2002;42:195–9.
Stroeher VL, Maclagan JL, Good AG. Molecular cloning of a *Brassica napus* cysteine protease gene inducible by drought and low temperature stress. Physiol Planta 1997;101:389–97.
Teisson C. Studies on internal browning of pineapple. Fruits 1972;27:603–12.
Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 2002;3:0034, 1-11.
Weerahewa D, Adikaram NKB. Some biochemical factors underlying the differential susceptibility two cultivars to internal browning disorder. Ceylon J Sci 2005;34:7–20.
Zhang X, Liu S, Takano T. Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. Plant Mol Biol 2008;68:131–43.
Zhou YC, Dahler JM, Underhill SJR, Wills RBH. Enzymes associated with blackheart development in pineapple fruit. Food Chem 2003;80:565–72.
Zuily-Fodil Y, Vasquez Tello A, Vieira da Silva J. Effect of water deficit on cell permeability and on chloroplast integrity. Bull Soc Bot France 1990;137:115–23.

Original article

Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for quantitative determination of chlordecone in water, plant and soil samples

Alain Soler[1]*, Marc Lebrun[2], Yoan Labrousse[3], Thierry Woignier[4]

[1] Cent. Coop. Int. Rech. Agron. Dév. (CIRAD), Persyst, UR Banan. Plantain and Pineapple Crop. Syst., CAEC, BP 214, 97285 Le Lamentin cedex 2, Martin., Fr., alain.soler@cirad.fr
[2] Cirad, Persyst, UMR Qualisud, 34398 Montp., Fr., m.lebrun@cirad.fr
[3] IRD, Ins. Méditerr. Biodivers. Ecol. Mar. Cont. (IMBE), Aix-Marseille Univ., UMR CNRS IRD Avignon Univ., CAEC, BP 214, 97285 Le Lamentin cedex 2, Martin., Fr., yoan.labrousse@ird.fr
[4] IMBE, Aix-Marseille Univ., UMR CNRS 7263 IRD 237 Avignon Univ., F-13397 Marseille, Fr., thierry.woignier@imbe.fr

* *Correspondence and reprints*

Received 23 September 2013
Accepted 14 January 2014

Fruits, 2014, vol. 69, p. 325–339
© 2014 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved
DOI: 10.1051/fruits/2014021
www.fruits-journal.org

Resumen Español, *p. 339*

Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for quantitative determination of chlordecone in water, plant and soil samples.

Abstract – Introduction. Chlordecone (CLD), an organochlorine formerly used to control the banana black weevil, is strongly adsorbed on soils, particularly on andosols. A simplified analytical procedure for the quantitative determination of chlordecone residues in water and micro-samples of soil and plants was compared with a standard method. **Materials and methods**. The procedure combines a simplified sampling protocol and a 10-min solid phase microextraction (SPME), followed by gas chromatographic separation (GC) and mass spectrometric (MS and MS/MS) identification. Quantitation of CLD used a standard addition method with zero extrapolation. First, seventy samples were analysed using the proposed method and the standard method based on hot solvent extraction. Second, fifteen soil samples were analysed with two SPME methods followed by GC-MS but using CLD labelled with C_{13} as an internal standard or the proposed method. **Results and discussion**. The detection (LOD) and quantitation (LOQ) limits of our SPME extraction procedure were determined for GC-MS and GC-MS/MS with water, plant (pineapple roots) and soil samples: in water for MS/MS, $LOD_{MS/MS\text{-}water}$ = 0.5 ng·L^{-1}, $LOQ_{MS/MS\text{-}water}$ = 2.0 ng·L^{-1}; in andosol for MS/MS, $LOD_{MS/MS\text{-}soil}$ = 15.0 ng·kg^{-1} dw, $LOQ_{MS/MS\text{-}soil}$ = 80.0 ng·kg^{-1} dw. Data from the seventy contaminated soils obtained with the proposed method and the standard method showed a correlation coefficient of r = 0.86. Data obtained by the two SPME/GC-MS quantitation procedures showed a correlation of r = 0.8073. **Conclusion**. The method proposes a simplified sample preparation and extraction of CLD in water, plant and soil samples, with no solvent manipulation and which is not time-consuming. The LOD and LOQ were similar to those obtained with other currently used methods. The method is reliable and accurate and may be considered as a good tool for research purposes.

France (Martinique) / chlordecone / extraction / analytical methods / quantitative analysis / water analysis / soil analysis / tissue analysis

Micro-extraction en phase solide et chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse pour la détermination quantitative de la chlordécone dans les échantillons d'eau, de plantes et de sols.

Résumé – Introduction. La chlordécone (CLD), organochloré autrefois utilisé contre le charançon noir du bananier, est fortement adsorbée sur les sols, comme les andosols. Une procédure simplifiée pour la détermination quantitative des résidus de CLD dans l'eau et des micro-échantillons de sol et de plantes a été comparée à une méthode standard. **Matériels et méthodes**. La procédure associe un échantillonnage simplifié, une micro-extraction en phase solide (SPME) de 10 min, une séparation par chromatographie en phase gazeuse (GC) et une identification par spectrométrie de masse (MS et MS/MS). La quantification est basée sur une méthode d'ajouts dosés. Soixante-dix échantillons ont été analysés en utilisant la méthode proposée et la méthode standard (extraction par solvant à chaud). Quinze échantillons de sol ont été analysés par deux méthodes SPME GC-MS, mais avec comme étalon interne la CLD C_{13} ou la méthode proposée. **Résultats et discussion**. Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ont été déterminées pour la GC-MS et la GC-MS/MS dans l'eau, dans des plantes (racines d'ananas) et dans les sols : dans l'eau pour la MS/MS, $LOD_{MS/MS\text{-}eau}$ = 0,5 ng·L^{-1}, $LOQ_{MS/MS\text{-}eau}$ = 2,0 ng·L^{-1}; dans des andosols pour la MS/MS, $LOD_{MS/MS\text{-}sol}$ = 15,0 ng·kg^{-1} ms, $LOQ_{MS/MS\text{-}sol}$ = 80,0 ng·kg^{-1} ms. Les données provenant des 70 sols contaminés obtenus avec la méthode proposée et la méthode standard ont montré une corrélation de r = 0,86. Les données obtenues par les deux procédures de quantification SPME / GC-MS ont montré une corrélation r = 0,8073. **Conclusion**. La méthode propose un échantillonnage et une extraction de CLD simplifiés dans des échantillons d'eau, de plantes et de sol, sans manipulation de solvants. Les LOD et LOQ sont similaires à celles des méthodes usuelles. La méthode, fiable et précise, est un bon outil pour la recherche.

France (Martinique) / chlordécone / extraction / technique analytique / analyse quantitative / analyse de l'eau / analyse de sol / analyse de tissus

Article published by EDP Sciences

1. Introduction

In the past, chlordecone (IUPAC name decachloropentacyclo [5.3.0.$0^{2,6}$.$0^{3,9}$.$0^{4,8}$] decan-5-one), an organochlorine insecticide, was widely used to control the banana black weevil in the French West Indies (FWI), and became a major soil and water contaminant [1], including sea biota [2]. Due to chronic exposure, this environmental pollutant is potentially dangerous for human health [3–5]. In the near future, other chlordecone environmental 'problems' may come to light in other countries because most of the pesticide produced in the 1970s was exported to Europe for the control of the Colorado potato beetle, mainly in east European countries [6], and to Cameroon and Jamaica for control of the black weevil in banana [7].

Chlordecone has a low water solubility [(0.35 to 3.0) mg·L^{-1} [8]) and a strong persistence in the environment. It is also strongly adsorbed on soils, particularly on andosols rich in allophane clay and organic matter. The persistence of chlordecone in soils is due to its high affinity for organic matter (2.5 < Koc < 2 0 m^3·kg^{-1}) [1] and its chemical structure (bis-homocubane), which make it poorly susceptible to biodegradation (*figure 1*). In addition, allophane clay aggregates in andosols have a tortuous fractal microstructure [9–11] which may also play a role in chlordecone sequestration [11–13].

Attempts have already been made, first, to understand the mechanisms of soil, plant and animal contamination [14], and then to look for remediation solutions. These studies pointed to the need for accurate methods of extraction and analysis in different matrices (water, soil, plants). Little literature is specifically dedicated to chlordecone analysis in environmental samples. The chlordecone extraction methods require solvent manipulations in order to be as exhaustive as possible and may be time-consuming. Usually, liquid-liquid extraction and solvent extraction (cold [15–17], hot [18] or hot and under high pressure [19, 20]) are, respectively, done for aqueous samples, and solid plant and soil samples. Detection can be done with different very sensitive techniques and quantitation methods are based on calibration curves of chlordecone in solvent and spiked samples: GC-MS, GC-MS/MS, GC-ECD or LC-MS and LC-MS/MS analysis. A relatively poor recovery (80%) of chlordecone compared with other pesticides was reported for soil samples [20, 21]. The French standard method for measuring inorganic and organic micropollutants NF XP P 41-250-1, 2, 3 [22] is also based on chlordecone solvent extraction. Few attempts have been made to simplify the chlordecone extraction and analysis protocol. XAD-2 resin was tested on river water but required 20-L samples, filtration and finally, extraction by solvent [23]. Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) has been tentatively used for solid soil samples [24], allowing fast and cheap determination of chlordecone contamination in soil. Nevertheless, consistent results were only obtained on andosols, so further investigations are required to determine if the NIRS method is valid or not.

Pesticides can be rapidly extracted by SPME (solid phase microextraction) in aqueous solution and in different matrices [25, 26]. It has been proposed that quantitative measurements of dissolved compounds can be made even before the equilibrium between the solution and the SPME fibre is reached [27]. The SPME technique has been described as a good way to minimise solvent consumption [28]. It could be used as a quantitative method in the case of many pesticides in water [29–31] and in the case of pyrethrinoids in fruits, where the recovery of the molecules was shown to be close to 100% [32]. For micropollutants in drinking water, SPME was described to be a useful tool for screening [33]. Pesticides with high Koc such as chlordecone are not easily released from the solid matrix into the water and only a small part is actually solubilised, hence rendering quantitation difficult. A SPME/GC-ECD method was described for chlordecone quantitation in fish using PDMS fibre, but which also required a pre-extraction step using a Soxhlet technique [34]. Analyses of spiked samples using this method showed a recovery rate of about 70%.

Our paper presents a sensitive and accurate automated SPME extraction procedure

followed by GC-MS (or GC-MS/MS) analysis in small water, plant and soil samples (test portion = 500 mg for soil and plants) for quantitative analyses of chlordecone. Direct SPME extraction is carried out for water samples and calculations using a calibration curve of chlordecone standard in ultrapure water. Meanwhile, quantitation for plant and soil samples required a modified standard addition method with the zero-intercept calculation [35, 36]. The method enabled the problem of difficult exhaustive extraction of chlordecone from samples and solvent manipulation to be overcome. For water samples, a national inter-laboratory trial allowed the comparison of the data obtained with the SPME extraction/GC-MS method with liquid/liquid extraction methods in other laboratories. Then, duplicated plant and soil samples were analysed in the CIRAD laboratory in the FWI using the proposed method and were also analysed with the normalised method 'NF XP P 41-250-1, 2, 3' by the *Laboratoire Départemental d'Analyse* (LDA26 in Drôme, France, a laboratory accredited for pesticide analysis). This method was used as a reference method for chlordecone estimations in our samples. Then, another set of duplicated soil samples were analysed using the proposed method in the CIRAD laboratory in the FWI and a second SPME/GC-MS method in which quantitation was done with chlordecone labelled with C_{13} as an internal standard in the CIRAD laboratory in Montpellier (France). The advantages, drawbacks and limits of the methods are discussed.

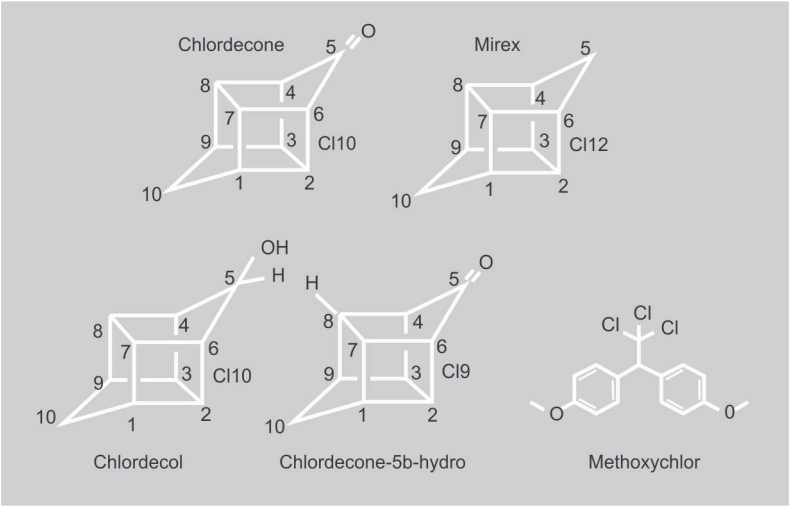


Figure 1.
Molecular structures of chlordecone (decachloropentacyclo[5.3.0.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{4,8}]decan-5-one), Mirex (dodecachloropentacyclo[5.3.0.02,6.03, 9.04,8]decane), chlordecol (decachloropentacyclo [5.3.0.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{4,8}]decan-5-ol), chlordecone-5b-hydro (1,2,3,4,6,7,9,10,10-nonachloropentacyclo [5.3.0.0^{2,6}.0^{3,9}. 0^{4,8}] decan-5-one) (carbon number in IUPAC System) and methoxychlor (1,1,1-trichloro-2,2-bisethane).

2. Experimental

2.1. Water samples

An inter-laboratory trial for chlordecone analysis in water was organised by BRGM in Orléans (France) [37], which provided two types of water samples (two duplicates each) from a continental surface water (0.3 µg·L^{-1}) and from an underground river (0.1 µg·L^{-1}). In our laboratory, the samples were used as received with no further preparation. They were directly analysed by SPME/GC-MS after addition of the internal standard (*e.g.*, 250 µL of a metoxychlor solution 37.5 µg·L^{-1} in ultrapure water) with a calibration curve of chlordecone in water (see §3.3.1). All other ten laboratories used solvent extraction and MS or MS/MS detection after GC or LC separation. The results validated the use of SPME as a good and simple extraction method for chlordecone analyses in water samples (*table I*). A reference solution of chlordecone (2000 µg·L^{-1}) in cyclohexane was then diluted in acetone then in water for SPME extraction in order to give a solution within the range of the chlordecone concentration of the calibration curve (~2 µg·L^{-1}).

2.2. Plant and soil samples

Chlordecone measurements were made using both soil samples (andosols and ferralsols) and plant samples (pineapple roots). Andosols are known in the FWI for their high chlordecone retention capability compared with other types of soils [24, 38]. Pineapple in the FWI is often grown on previously contaminated banana plots, meaning pineapple is potentially one of the most contaminated crops.

For preparation of samples and sub-samples, soil samples (200 g) and plant samples (20 g) were partly air-dried overnight at

Table I.
French national inter laboratories trial for chlordecone analyses in water samples [37].

Samples	[Chlordecone]		Average bias SPME	Global bias		
	Actual value	SPME		max	min	average
	($\mu g.L^{-1}$)			(%)		
Underground water	0.102	0.104 0.109	4	71	3	36
Superficial water	0.304	0.320 0.317	5	85	2	25
Standard solution	2002.0	2189.0 1880.0	2	104	2	24

Global bias (min, max and average): bias calculated for the 11 participant laboratories.
Bias (SPME) and [chlordecone] by SPME: data for the proposed SPME/GC-MS method with quantitation using a calibration curve of chlordecone standard in ultrapure water (data for duplicated samples).

70 °C with no further control of the exact residual humidity. Soil samples were then homogenised in a Retsch® soil grinder (max 100 µm). Plant samples were ground in an 'IKA A11'® grinder. SPME extraction requires the samples to be prepared as water suspensions. To this end, an aliquot of 500 mg of the partially dried and homogenised soil or plant samples (or 1–5 g of fresh weight) were ground for 10 min in 20 mL of distilled water with an automatic stainless steel mortar ('Pulverisette 2'®, *Fritsch*) in order to obtain an extremely thin suspension. The suspension was then diluted to 100 mL with ultrapure water.

For quantitation, a standardised sub-sampling procedure was used: four 1-mL subsamples of the suspension were removed with an automatic pipette under magnetic stirring at controlled speed at a depth of 2/3 of the height of the stirred suspension in a 150-mL glass beaker specifically dedicated to this procedure, and then transferred into pre-weighed 20-mL SPME vials. The internal standard was added to the sub-samples in the SPME vials and ultrapure water was added to bring the final volume to 18.5 mL.

The repeatability of the sub-sampling procedure was validated on two different soils and pineapple roots with ten 1-mL sub-samples. They were dried at 80 °C for 5 h, and kept overnight under a dry atmosphere with silica gel. Then the dry residues were determined on an electronic scale (± 0.01 mg), and means and standard deviations (α = 0.05 mg) were calculated.

2.3. Optimisation of SPME conditions (fibre, temperature and time)

PDMS/DVB fibres (polydimethylsiloxane/divinylbenzene, 65 µm) from Supelco (Bellefonte, PA, USA) were used with an automated extracting and injecting device (CombiPal®, CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). Different sets of temperatures and extraction times were tested to optimise the extraction procedure. The sub-samples were preheated at 40 °C, 60 °C or 80 °C for 5 min. Then, SPME extraction [(5, 10 or 30) min at 40 °C, 60 °C or 80 °C] was performed under stirring at 250 rpm. The fibre was desorbed directly into the GC injector at 270 °C for 5 min. Finally, the fibre was cleaned under a nitrogen stream for 30 min at 250 °C during the GC analysis. It was verified that this cleaning procedure avoided any carryover between two analyses. The optimisation was done on a contaminated andosol sample, 3.87 $mg{\cdot}kg^{-1}$ dry weight (dw) and one chlordecone standard solution in water 2.16 $\mu g{\cdot}L^{-1}$, then a second one at low concentration, 0.36 $\mu g{\cdot}L^{-1}$. The objective of the optimisation was to find a compromise between the total time required for analysis, and sensitivity and accuracy.

2.4. Selection of internal standards

The internal standard selection was an important preliminary step because SPME

extraction is performed in a complex medium. In this medium, the soil or the organic matter is suspended in water, so the molecules are partly adsorbed onto the solid part of the matrix, partly dissolved in the water and partly adsorbed on the SPME fibre. Consequently, the main criterion for internal standard selection was the similarity of their behaviour under the SPME extraction procedure with organic matter or soil suspension in water in the range of chlordecone concentrations and the amounts of soil or organic matter we were working with.

For internal standard selection, increasing quantities of soil or organic matter (andosols and pineapple root samples) were added to pure solutions containing increasing concentrations of different organochlorines [methoxychlor, hexachlorobenzene (HCLB) and dieldrin] and chlordecone. The extractions and analyses were done by SPME/GC-MS and the data obtained for the organochlorines compared with those from chlordecone. The methoxychlor (Metox, IUPAC name: 1,1,1-trichloro-2,2-bisethane) showed very similar uptakes by the SPME fibre to the chlordecone ones at the different concentrations tested (normalised ratio peak areas [organochlorines/chlordecone] of about 1.0 for the different amounts of soil and roots, mean obtained from four different chlordecone concentrations, *figure 2*).

Molecules showing more structural similarities with chlordecone, *e.g.*, chlordecol, or chlordecone-5b-hydro, or Mirex were discarded (*figure 1*) because they have been detected in chlordecone commercial standards at, respectively, 4.0%, 0.5% and 0.4% (pers. commun., C. Mouvet, BRGM). In addition, Mirex has been commonly used as an insecticide in the FWI unlike methoxychlor.

Finally, chlordecone labelled with C_{13} (chlordecone-C_{13}) would probably have been the best choice in terms of structural similarities and behaviour under SPME extraction. However, it is expensive for routine analyses, and so was only used for validation of the method using a protocol and a calculation method based on different m/z ratios and analyses being done in two different CIRAD laboratories.

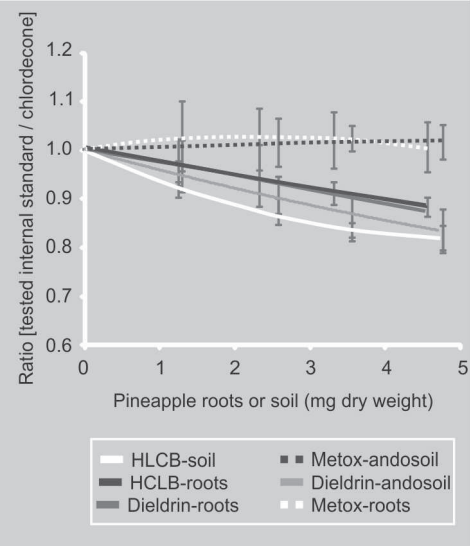


Figure 2.
Ratio peak area of 'tested internal standard' *vs.* chlordecone in the presence of increasing organic matter or soil ratios [tested internal standard peak areas / chlordecone peak areas] *versus* the amount of dry pineapple roots.
Data were obtained from pure solutions of organochlorines tested as internal standards and chlordecone, then internal standard data were normalised against chlordecone data. Means were obtained with four concentrations of pesticides: (0.72, 2.17, 4.34 and 7.23) $\mu g \cdot L^{-1}$ of chlordecone.
HCLB: hexachlorobenzene.

2.5. Instrumentation and GC-MS and GC-MS/MS operating conditions

Chlordecone analyses were performed on a GC450/MS240 (Varian, USA), separation on a non-polar column: RTX-1ms (Restek, USA), 15 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm d_f, with He (purity N60) as the carrier gas with a constant flow rate of 1 $mL \cdot min^{-1}$. The injector temperature was constant at 270 °C, and 5 min splitless during fibre desorption followed by a split ratio of 1:50 during analysis. The oven programme was 100 °C (held 5 min), then 30 $°C \cdot min^{-1}$ up to 160 °C, then 8 $°C \cdot min^{-1}$ up to 250 °C, then 30 $°C \cdot min^{-1}$ up to 300 °C (held 5 min). The mass detector was a MS240 (Varian, USA) ion trap operating in electron impact ionisation (EI) mode (70 eV).

In the MS method the detection of chlordecone was done using the ions m/z (272 + 274) and m/z 237 (37%) as qualifiers. The ion m/z 355 was discarded because it is also a product of siloxanes from the PDMS/DVB fibre. For Metox, the ion m/z 227 was used for detection and quantification. The main ion m/z 272 (C_5Cl_6) results from the symmetric splitting of the cage-like structure of chlordecone (bis-homocuban family).

In the MS/MS method, only one parent ion was selected, in resonance mode, for the chloredecone (m/z 272) and for Metox (m/z 227). The trapping energy selected was

Qz = 0.4 and the excitation energy was 1.8 V. This resulted in the daughter ions m/z 237 and m/z (212 + 196), respectively, for chlordecone and Metox. The ion trap system allowed reducing the number of daughter ions and these ions (and a few m/z around these masses, as m/z 235 and 239 also issued from 272) represent almost 100% of the ions produced by the electronic impacts. The m/z 235 and m/z 239 were used as qualifiers (59% and 49%).

The MS/MS method was developed to confirm the presence of chlordecone in environmental samples where there may be possible interferences due to the matrix, particularly at very low chlordecone concentrations (< 0.5 $\mu g \cdot L^{-1}$ in the water suspension or about 1 $\mu g \cdot kg^{-1}$ in soil), which reduce the noise signal.

2.6. Quantitation

The chlordecone quantitation in water samples (two replicates) was based on simple comparison with a calibration curve with a chlordecone standard solution in water (0.29–10.0 $\mu g \cdot L^{-1}$). The chlordecone quantitation for plant and soil samples was done using a standard addition method to calculate the zero intercept. This method compensates for incomplete SPME extraction and decreases the systematic error. We took into account the model developed by Ai, who showed that quantitative measurement after extraction by SPME is possible in non-equilibrium situations [27]. This dynamic model, which is based on a diffusion-controlled mass transfer process applied to SPME, states that a linear relationship exists between the adsorbed analyte and its initial concentration in the sample matrix before equilibrium is actually reached. We used this characteristic to reduce soaking of the SPME fibre to the minimum time required for chlordecone quantitation.

The standard addition was done as follows: four 1-mL sub-samples of the same water suspensions, using the standardised sub-sampling procedure described above, were spiked with chlordecone, giving four concentrations of added chlordecone of, respectively, (0.00, 0.72, 1.44 and 2.16) $\mu g \cdot L^{-1}$, in a final volume of 18.5 mL. The final internal standard concentration was 0.5 $\mu g \cdot L^{-1}$. The chlordecone standard was prepared from 10 mg pre-weighed vials of chlordecone (AccuStandards®, 99.7% GC-MS), diluted in 100 mL of methanol followed by two subsequent dilutions in water up to 53 $\mu g \cdot L^{-1}$. Then, by linear regression, the actual concentrations of the solid samples were estimated assuming that, in our conditions, the ratio 'chlordecone adsorbed on the particles in the suspension *versus* chlordecone dissolved in water' (and hence accessible to fibre uptake) is the same for both the added chlordecone and the initial contamination to be evaluated. This important hypothesis is discussed in the 'results and discussion' section below. Data were accepted only when the linear regression for both the chlordecone peak area and ratios [chlordecone peak area / internal standard peak area] against the added chlordecone concentrations from the four replicates gave $R^2 > 0.995$.

2.7. Test of the method

First, the repeatability of the analyses with this SPME/GC-MS method was validated. Ten replicates of nine different soil samples were analysed. The samples were as follows: a mixture of different soils used as a reference with a chlordecone contamination of 3.6 $mg \cdot kg^{-1}$, and four andosols and four ferralsols with different chlordecone contaminations ranging from (0.26 to 5.66) $mg \cdot kg^{-1}$ [Laboratoire Départemental d'Analyse (LDA26) data], representative of the range of contamination observed in Martinique soils. Chlordecone concentrations were measured and compared with LDA26 data.

Second, the method was validated on 70 andosol samples with different levels of allophane clay and organic matter contents, analysed with two methods: first, with the proposed method in our laboratory, then with the LDA26 method (hot solvent extraction followed by GC-MS). The correlation between the two sets of data was calculated.

Third, we compared the proposed quantitation method in the CIRAD Martinique

Table II.
Variability of the 1 mL sub-sample dry weights from a water suspension (100 mL) of 500 mg of soil or organic matter samples under magnetic stirring.

Type of sample	Dry weight of the sub-sample effectively taken (mg)	Standard deviation (equivalent in %)
Andosol	4.99 ± 0.33	6.71
Ferralsol	5.36 ± 0.35	6.48
Pineapple roots	4.81 ± 0.28	5.76

Standard deviations are calculated on ten replicates.

laboratory using the same SPME procedure but followed by GC-MS analyses with chlordecone-C_{13} as an internal standard in the CIRAD Montpellier laboratory. In that case, the quantitation was based on the m/z ratios. Resulting from hexachlorocyclopentadien condensation, eight C_{13} isotopes were introduced into the molecule structure (Innovation & Chimie Fine, Manosque, France). The MS quantifying method with chlordecone-C_{13} as an internal standard is carried out in SIM mode. Focused on the main fragment C_5Cl_6, four quantifying ions and one qualifying ion m/z 270, 272, 279, 280 and 276, respectively, were selected. Because of the isotopic configuration of chlorine and many doublet interferences, the simple use of the major ions in the co-eluted molecules was prohibited. A mean spectra, subtracted by the mean noise, was taken at the apex of the chlordecone chromatographic peak. Calibrations, based on 270/279, 270/280, 272/279 and 272/280 ratios, were calculated from increasing amounts of chlordecone [(0, 50, 100 and 600) ng] compared with 100 ng of chlordecone$_{13}$. Coefficients of determination ranged from 0.9996 to 0.9999.

The correlation between the two sets of data was calculated. The test focused on the comparison between the standard addition calculation with Metox as an internal standard and the direct calculation from a calibration curve with chlordecone-C_{13} as an internal standard. Direct calculation was possible with chlordecone-C_{13} because it was expected to exhibit exactly the same behaviour under the SPME technique as the chlordecone.

3. Results and discussion

3.1. The sub-sampling procedure from water suspensions

An important element to be taken into account is the representativeness of such small sub-samples with respect to the original samples. That is why it was very important to perform grinding in two steps, particularly of soils, to ensure a homogeneous water suspension under stirring. Finally, standardising the sub-sampling procedure by using an automatic pipette was also an important step for accuracy of the analyses as it reduced the variability of the dry weight of the sub-samples.

The sub-samples, 1 mL of the suspension (500 mg dry sample in 100 mL of water), corresponded to a dry weight of about 5 mg (*table II*). For the three types of samples, two different soil samples and one root sample, the standard deviations ranged from 5% to 7%, indicating satisfactory repeatability of the sub-sampling method for these very small samples.

It is important to note that, at this stage of the sampling procedure, the samples were not necessarily completely dry. The dry weights of the sub-samples were actually determined after SPME extraction and GC-MS analysis. They were dried directly in

the pre-weighed vials and the data used for the subsequent calculation of contaminations was expressed in chlordecone mg·kg^{-1} dry weight.

Nevertheless, we also checked that calculating a dry weight mean on 10 replicated sub-samples taken in the same 100 mL of water suspension from which the four spiked sub-samples were taken did not affect the accuracy of the quantitation. The dry weight evaluation saved a lot of time because it could be measured the very same day as the analyses instead of 48 h later when the spiked sub-samples were dried in their pre-weighed vials. Drying 1 mL of solution was much faster than drying 18.5 mL.

3.2. Optimisation of SPME conditions (fibre, temperature and time)

3.2.1. Selection of SPME fibres

Three different SPME fibres were tested: a non-polar PDMS fibre - polydimethylsiloxane (100 µm), a medium polarity PDMS/DVB fibre - polydimethylsiloxane/divinylbenzene (65 µm) and a CAR/PDMS fibre - carboxen (porous carbon coating)/polydimethylsiloxane (85 µm); the CAR/PDMS fibre and PDMS fibre (100 µm) exhibited a lower extraction rate for chlordecone than the PDMS/DVB fibre. For example, the limit of detection in water with a GC-MS detector was, respectively, 72.0 ng·L^{-1} and 35.0 ng·L^{-1} using the PDMS fibre and the PDMS/DVB fibre, but the PDMS fibre can be cleaned faster than the PDMS/DVB fibre (15 min *vs.* 30 min). The CAR/PDMS fibre produced many additional peaks and interferences during GC analyses. These observations were consistent with those made in a polychlorobiphenyl study using the SPME technique [25], and finally led to our choice of the PDMS/DVB fibre for analyses.

3.2.2. Extraction temperature and extraction time of the fibre in the water suspension

Increasing the extraction temperature (40 °C, 60 °C or 80 °C) increased the MS signals by 1.1 (60 °C compared with 40 °C) and 1.8 (80 °C compared with 40 °C) for chlordecone. The temperature 80 °C was retained for the extraction procedure.

The chlordecone SPME uptakes from a soil sample (chlordecone: 3.87 mg·kg^{-1} dw) suspended in water increased linearly from 5 min to 30 min (× 5.4) and increased only 1.8 times for the chlordecone standard solution at 2.16 µg·L^{-1}.

In the experiments at a low concentration of chlordecone (a standard solution of chlordecone in water at 0.36 µg·L^{-1}, which could be representative of what is currently available in water suspensions of our environmental samples) an increased uptake was observed from 5 min to 10 min then to 20 min (at 80 °C) by, respectively, 106.3% and 165.0%. The limit of quantitation is often determined by a S:N ratio of 10 (chlordecone peak signal *versus* baseline noise signal). These ratios were 14, 28 and 45 for, respectively, (5, 10 and 20) min. Consequently, because the objective was to reduce the time required for the total procedure 'extraction plus analysis' to the minimum, we determined that a 10-min extraction was still acceptable for chlordecone analyses in these conditions.

The linear increase in uptake between (5 and 30) min also showed that the equilibrium between the chlordecone adsorbed on the fibre and the dissolved chlordecone was in any case not reached, as previously observed with other pesticides, not even after 2 h of extraction [27, 33].

3.3. Calibrations

3.3.1. SPME/GC-MS calibration and limits of detection and quantitation

The chlordecone uptake with the SPME/GC-MS procedure, measured by the ratio [chlordecone peak area/ internal standard peak area] from a standard chlordecone solution in water, increased linearly *versus* the chlordecone concentration in the range of 0.29–10.0 µg·L^{-1} with R^2 = 0.9974 (*figure 3a*). Meanwhile, the Metox uptake (internal standard at 0.5 µg·L^{-1}) was constant when

chlordecone concentration increased [27, 29, 33].

With this SPME/GC-MS method (10 min extraction), the detection and quantitation limits were in water samples: $LOD_{MS\text{-}water}$ = 35.0 ng·L^{-1} ([signal:noise] = 3), and $LOQ_{MS\text{-}water}$ = 80.0 ng·L^{-1} ([signal:noise] = 10), the LOD and LOQ measured by successive dilution until [signal:noise] = 3 or 10 were reached; and in soil samples: $LOD_{MS\text{-}soil}$ = 0.05 mg·kg^{-1}, and $LOQ_{MS\text{-}soil}$ = 0.2 mg·kg^{-1} (measured on andosols with high retention properties due to their allophane and organic matter contents, as explained above). Therefore, the LOD and LOQ determined on andosol and root samples were not significantly different, probably because andosols are rich in organic matter and allophane clay and have a strong retention capability for chlordecone.

3.3.2. SPME/GC-MS/MS calibration at low chlordecone concentrations and limits of detection and quantitation

In the MS/MS method, calibration was made between 4.3 ng·L^{-1} and 138.6 ng·L^{-1} of chlordecone in water using the same SPME procedure for 10 min at 80 °C. The ratio [chlordecone peak area/ internal standard peak area] was linearly correlated with the chlordecone concentration (*figure 3b*). The [signal:noise] ratios were good for quantitation, ranging from 68 to 1163.

In our conditions, with this method, the limit of detection was $LOD_{MS/MS\text{-}water}$ = 0.5 ng·L^{-1} in water, while the limit of detection on andosol determined in the water suspension was $LOD_{MS/MS\text{-}soil}$ = 15 ng·kg^{-1} dw. The limits of quantitation were $LOQ_{MS/MS\text{-}water}$ = 2.0 ng·L^{-1} in water and $LOQ_{MS/MS\text{-}soil}$ = 80 ng·kg^{-1} dw in soil (with [signal:noise] = 10).

These data show that it is reasonable to measure chlordecone contamination in water under the LMR level (European Norm LMR ≤ 0.05 µg·L^{-1} in water; Reg. (EC) No 839/2008) and this is also the case for plant and soil samples in water suspensions, at least when the chlordecone released into the water suspension is within this range of concentrations.

It should be noted that these limits are related to the short chlordecone extraction time by SPME (10 min) required for our method. One would expect lower limits with a longer extraction time, but this would have been in contradiction with our objective of defining a rapid analytical procedure.

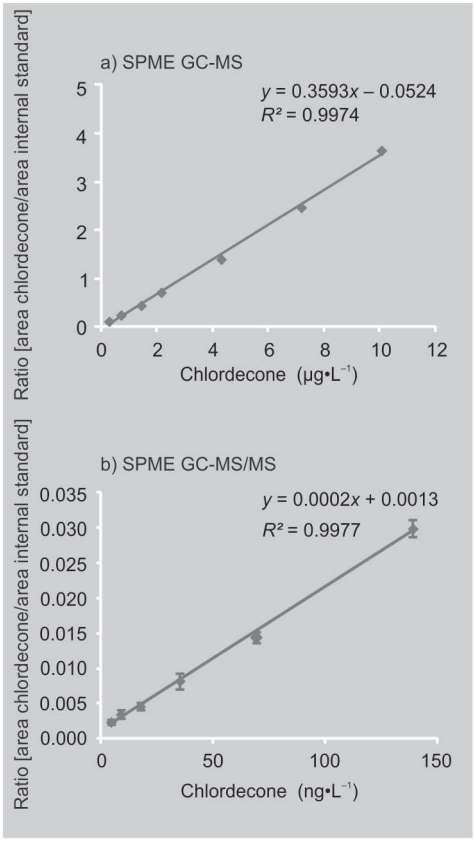


Figure 3.
a) Calibration curve of chlordecone in water (SPME GC-MS).
b) Calibration curve of chlordecone in water (SPME GC-MS/MS).
SPME/GC-MS and MS/MS calibration for chlordecone in water with Metox as an internal standard. Means of three replicates. For the low concentration (MS/MS) the ratio [signal:noise] ranged from 68 for 4.3 ng·L^{-1} chlordecone to 1163 for 138.4 ng·L^{-1} chlordecone.

3.4. Methods of quantitation for plant (pineapple roots) and soil samples

3.4.1. Hypotheses for the quantitation methods

The quantitation of sample contamination was based on the addition of known amounts of a chlordecone standard solution under the following hypothesis. The assertion made by Ai [27] is also valid for the measurement of chlordecone in a water suspension of a solid sample where the source of the contamination is the solid phase (organic matter or soil) instead of just water when the samples are prepared following our procedure.

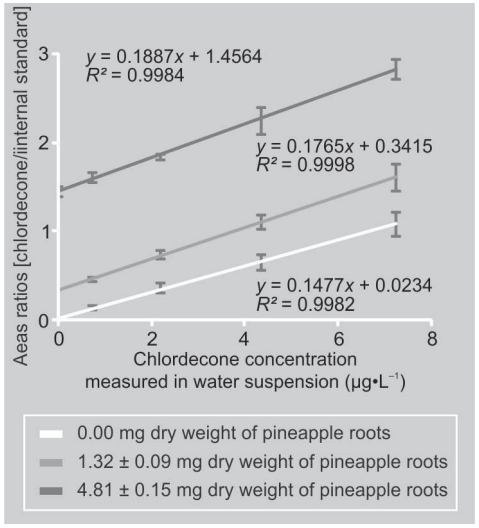


Figure 4.
Chlordecone analyses by SPME GC-MS in water suspension of contaminated pineapple roots (30 mg·kg^{-1} dw).
SPME/GC-MS: ratios [chlordecone peak areas / internal standard peak areas] *versus* chlordecone concentration in the presence of contaminated pineapple roots.
The pineapples were grown on contaminated soil. The amounts (mg dw) indicated are those weighed in the vial after chlordecone analyses. The '0.00 mg' was the normal calibration curve in water. Internal standard concentration 1.5 µg·L^{-1}. Standard deviations for chlordecone analyses and organic matter dry weights from four replicates.

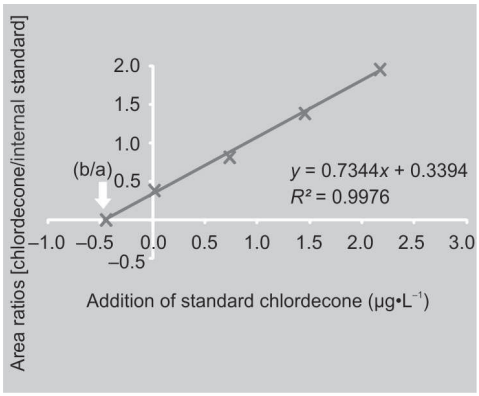


Figure 5.
Quantitation of chlordecone in soil by linear regression on four spiked samples SPME/GC-MS determination of chlordecone contamination in andosol.
The chlordecone available to the SPME fibre in the four spiked samples was given by the peak area and the ratio [chlordecone peak area/internal standard peak area]. The actual total amount of chlordecone in the 'sample' and 'the added chlordecone' was given by the ratio |b/a|, *b* and *a* being the coefficients of the linear regression between the chlordecone peak area or ratio [chlordecone/internal standard] *vs.* added chlordecone concentration, in the form $y = ax + b$. Then the result was expressed in mg·kg^{-1} dw, taking into account the average dry weight of ten 1 mL-subsamples of soil in water suspension was 4.6 mg dw. The andosol contamination was also determined by the LDA26 method at 1.57 mg·kg^{-1} dw.
Calculation method
1) a = 0.7344; b = 0.3394; soil sample 4.6 mg dw on ten replicates of 1 mL sub-samples.
2) X intercept: |b/a| = 0.46215 µg·L^{-1} (vol. 18.5 mL).
3) Soil sample dw = 4.6 mg in 18.5 mL (final vol. for SPME).
4) Chlordecone contamination = 1.859 mg·kg^{-1} dw.

The consequence of this hypothesis is that, in the suspension, the ratio of the chlordecone adsorbed on the solid sample to the chlordecone released in the water suspension is the same for the added chlordecone (increased amounts of standard solution) and the chlordecone from the contaminated sample. If this hypothesis is true, quantitative measurement of chlordecone contamination of solid samples in water suspension should be possible in our conditions of sample preparation. This was confirmed by the experimental data presented hereafter.

3.4.2. Test of the hypotheses

The chlordecone uptake by the fibre increased linearly with increasing amounts of chlordecone [range (0.72 to 7.23) µg·L^{-1}] added to the suspension of contaminated roots in water. This was observed for different amounts of roots in the water suspension (*figure 4*). The contamination of roots was estimated at 30 mg·kg^{-1} dw by the LDA26 method with hot solvent extraction. This linear increase was also observed on two soil samples, an andosol with chlordecone contamination of 1.5 mg·kg^{-1} dw, and a ferrasol with chlordecone contamination of 0.36 mg·kg^{-1} dw (data not shown).

These data confirmed our initial hypothesis and also showed that the chlordecone contamination of plant and soil samples can be estimated using a simple linear regression and the standard addition method calculating the zero intercept.

3.4.3. Quantitation of chlordecone contamination of soils and plant root samples by SPME/GC-MS

In an andosol, the chlordecone contamination was estimated with the linear regression equation in the form $y = ax + b$, where y = ratio [chlordecone/internal standard] and x = "added" chlordecone concentrations, a = slope and b = intercept on the Y axis (*figure 5*). The "calculated" concentrations given by the intercept of the linear regression curve with the X axis (calculated as [b/a]) actually represents what the concentration of the total chlordecone (dissolved plus adsorbed on the soil) would have been in the 18.5-mL water suspension. Then, the

Table III.
Variability of chlordecone analyses on soil samples with two GC/MS techniques (F.W.I.).

Soil samples	LDA26 method	Proposed SPME method		
	$mg \cdot kg^{-1}$ dw (± 30%)	$mg \cdot kg^{-1}$ dw	σ	σ (%)
Reference 'Soil mixture'	3.60	3.84	± 0.68	17.7
Andosol 1	1.50	1.51	± 0.38	25.2
Andosol 2	1.12	1.25	± 0.09	6.8
Andosol 3	1.77	1.53	± 0.21	13.7
Andosol 4	5.35	5.37	± 0.81	15.2
Ferralsol 1	0.26	0.32	± 0.09	28.0
Ferralsol 2	0.86	0.65	± 0.14	21.8
Ferralsol 3	1.76	1.97	± 0.24	12.0
Ferralsol 4	5.66	5.77	± 0.70	12.1

dw: dry weight.
LDA26 (*Laboratoire Départemental d'Analyse)* method: ± 30% global variability indicated by the laboratory.
SPME method: each mean obtained from 10 replicates.

sample dry weight enabled the final calculation to express the chlordecone contamination in $mg \cdot kg^{-1}$ dry weight. The result was 1.859 $mg \cdot kg^{-1}$ dw. The contamination of the soil sample in this experiment was also measured with the GC-MS normalised method with hot solvent extraction in the LDA26: 1.57 $mg \cdot kg^{-1}$ (± 30%). Note that the concentrations of the added chlordecone were in the range of the initial sample contamination.

This calculation applied to the pineapple root data for two different amounts of the same contaminated sample gave a contamination of 27.2 ± 2.4 $mg \cdot kg^{-1}$ and 29.6 ± 2.7 $mg \cdot kg^{-1}$, respectively, with (1.32 and 4.81) mg (dw) of pineapple roots (*figure 4*). Both values were in the range of the LDA26 estimation with hot solvent extraction that gave an estimation of 30.0 $mg \cdot kg^{-1}$ (± 30%).

3.5. Validation of the method

3.5.1. Repeatability of the analyses on soil samples by the SPME/GC-MS method

The consistency of the chlordecone analyses was evaluated with ten replicates on different soils (*table III*): one reference mixture of soils used to control the performances of the equipment in our laboratory periodically, four andosols and four ferralsols with different levels of contamination. First, the data were very close whatever the method of quantitation used. Second, the variability of data obtained with the SPME/GC-MS method increased when the level of contamination decreased clearly for the ferralsols (12.0% to 28.0%), and ranged from 6.8% to 25.2% for andosols. The difference may be a result of the organic carbon and allophane content being highly variable in andosols. Nevertheless, the data are similar to the variability claimed by the LDA26 (± 30%). They included the whole process of sampling, sub-sampling, the SPME extraction and the analysis by GC-MS.

3.5.2. Comparison of soil analyses using the proposed method and the normalised method

The analysis data were compared on 70 duplicated andosol samples analysed and quantified by the CIRAD and LDA26 laboratories. The correlation coefficient between the two sets of data (*figure 6*) was $r = 0.86$, which is very good if we take into account that these data represent trace analyses and that the accuracy of the chlordecone analyses is about 30%. Another point is the fact that the analyses were done in two different laboratories, and it is well known that in these conditions, results sometimes vary considerably.

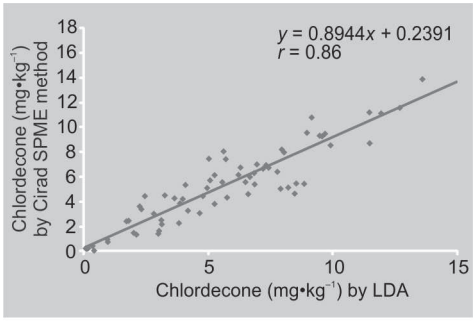


Figure 6.
Comparison of soil chlordecone contamination estimates by SPME (CIRAD) or hot solvent extraction [*Laboratoire Départemental d'Analyses* (LDA26)] and GC-MS techniques. Seventy samples were analysed in duplicate both in the CIRAD laboratory by the SPME/GC-MS method and the LDA26 by the normalised method. For the SPME/GC-MS method: quantitation by three standard additions and zero-intercept calculation.

3.5.3. Comparison of soil analyses using the proposed method and a SPME method with chlordecone C_{13} as an internal standard

Two sets of data were obtained from the duplicated soil samples [contamination ranging from (0.2 to 9.7) mg·kg^{-1}] using the two SPME/GC-MS techniques and the associated modes of calculation described above: the first one with Metox as an internal standard and calculation based on standard additions with the zero intercept in the CIRAD Martinique laboratory, and the second one with chlordecone-C_{13} as an internal standard in the CIRAD Montpellier (France) laboratory.

The good correlation (r = 0.8073) shows that the results obtained with the two methods were close and that both can be used for chlordecone trace analyses in environmental samples. This also confirms that the use of Metox as an internal standard was appropriate in our case. Nevertheless, except for its cost, chlordecone$_{13}$ is probably a more interesting internal standard. A direct measurement of the [chlordecone/chlordecone$_{13}$] ratios can be compared with a calibration curve in water whatever the matrix.

It is interesting to note that neither method required exhaustive chlordecone extraction of the matrix for quantitation. Consequently, knowing the percentage of recovery was not important with these methods.

3.6. Quantitation of soil contamination by SPME/GC-MS/MS

The SPME/GC-MS/MS method was applied to an andosol at three different levels of chlordecone contamination: (1.0, 3.0 and 6.0) µg·kg^{-1} dw, obtained by dilution with a non-contaminated andosol. The results showed a good linear relationship between the chlordecone uptake and the contamination with R^2 = 0.9933. The [signal:noise] ratios were 262, 706 and 1511 for, respectively, (1, 3 and 6) µg·kg^{-1} dw, still far above the limit of quantitation (LOQ) given above (80 ng·kg^{-1} dw). The last dilution (6 µg·kg^{-1} dw) was used for LOQ determination in MS/MS.

The MS/MS method can be used in routine analyses of chlordecone contamination because it is not restricted to low levels of contamination, but also when interferences with other molecules in a complex matrix may be in competition for the binding sites on the fibre. Nevertheless, it has been demonstrated that mixing several pesticides even at relatively high concentrations in water does not affect the linearity of the uptake of one specific pesticide [39]. This is probably true until all the binding sites are occupied by molecules, which may occur if the fibre is soaked in the water for a very long time or if the matrix has a very complex structure. The short soaking time we used (10 min) reduced the risk of interferences. Finally, when this option is available on the MS detector, the MS/MS method is also a good alternative for trace analyses of chlordecone.

4. Conclusion

The data presented here confirm that a quantitative analysis with a short time release of chlordecone from the matrix sample into the water is possible with a SPME technique if an appropriate calculation method is used (standard addition with the zero intercept). The data were very close to those obtained by the LDA26 with hot solvent extraction, and with another SPME method using chlordecone-C_{13} as an internal standard, for water plant and soil samples. Limits of detection and quantitation were similar to those of the literature using the same type of technology (GC-MS or GC-MS/MS).

The proposed method greatly simplifies the protocol for the analysis of chlordecone in water, plant and soil samples. First, the sampling and sub-sampling procedures do not require complete drying of large samples. Only a few milligrams of sample need to be dried for calculations of dry weight. Second, the 10-min SPME procedure just before injection into the GC is short and does not require solvent extraction or additional cleaning of the extracts as used, for example, on Florisil® columns to eliminate some of the contamination due to the many compounds extracted by the hot solvent. Third, the standard addition procedure with calculation of the zero intercept requires four analyses per sample, which represent both the replicates and 'the standard curve' of the analysis with no need for further analyses to determine the percentage of recovery of each sample.

Further improvement may be needed for the SPME extraction of chlordecone from animal samples because of the lipophilic character of this pesticide.

The contamination of soils by chlordecone in the French West Indies is expected to last for centuries due to the slow release of chlordecone in running and underground water, which, in turn, causes continuous contamination of plants and crops, livestock and sea biota. One can assume that the environmental problems caused by chlordecone will not be limited to the FWI but will affect many African and European countries, even if they have not yet come to light. This method, which is reasonably easy to better implement, will be a great help in studies to understand and control pollution of the environment by chlordecone.

References

[1] Cabidoche Y.M., Achard R., Cattan P., Clermont-Dauphin C., Massat F., Sansoulet J., Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: A simple leaching model accounts for current residue, Environ. Pollut. 157 (2009) 1697–1705.

[2] Ramdine G., Lemoine S., Anthropogenic contaminations in the mangrove of Guadeloupe (Lesser Antilles): use of a biomarker of genotoxicity for monitoring, in: Proc. 61st Gulf Carrib. Fish. Inst., Nov. 10–14, Gosier, Guadeloupe, F.W.I., 2008.

[3] Multigner L., Ndong, Giusti A., Romana M., Delacroix-Maillard H., Cordier S., Jégou B., Thome J.P., Blanchet P., Chlordecone exposure and risk of prostate cancer, J. Clin. Oncol. 28 (2010) 3457–3462.

[4] Multigner L., Kadhel P., Huk-Terki F., Thomé J.P., Janky E., Auger J., Exposure to chlordecone and male fertility in Guadeloupe (French West Indies), Epidemiology 17 (2006).

[5] Multigner L., Cordier S., Kadhel P., Huc-Terki F., Blanchet P., Bataille H., Pollution par le chlordécone aux Antilles, quel impact sur la santé de la population ?, Environ. Risques Santé 6 (2007) 1–3.

[6] Epstein S.S., Kepone – Hazard evaluation, Sci. Total Environ. 9 (1978) 1–62.

[7] Okolle J.N., Fansi G.H., Lombi F.M., Lang P.S., Loubana P.M., Banana entomological research in Cameroon: how far and what next?, Afr. J. Plant Sci. Biotechnol. 3 (2009) 1–19.

[8] Kilzer L., Scheunert I., Geyer H., Klein W., Korte F., Laboratory screening of the volatization rates of organic chemicals from water and soil, Chemosphere 10 (1979) 751–761.

[9] Wada K., The distinctive properties of andosol, in: Stewart B.A. (Ed.), Advances in soil sciences, Springer Verlag, N.Y., U.S.A., 1985.

[10] Chevallier T., Woignier T., Toucet J., Blanchart E., Dieudonné P., Fractal structure in natural gels: effect on carbon sequestration in volcanic soils, J. Sol-Gel Sci. Technol. 48 (2008) 231–238.

[11] Woignier T., Morell M., Morell O., Duffours L., Soler A., Low water transport in fractal microstructure of tropical soils: application to chlordecone pesticide trapping, Ecohydrol. Hydrobiol. 11 (2011) 121–128.

[12] Woignier T., Fernandes P., Jannoyer-Lesueur M., Soler A., Sequestration of chlordecone in the porous structure of an andosol and effects of added organic matter: an alternative to decontamination, Eur. J. Soil Sci. 63 (2012) 717–723.

[13] Woignier T., Fernandes P., Soler A., Clostre F., Carles C., Rangon L., Lesueur-Jannoyer M., Soil microstructure and organic matter: keys

for chlordecone sequestration, J. Hazard Mater. 262 (2013) 357–364.

[14] Cabidoche Y.M., Lesueur-Jannoyer M., Contamination of harvested organs in root crops grown on chlordecone-polluted soils, Pedosphere 22 (2012) 562–571.

[15] Saleh F.Y., Lee G.F., Analytical methodology for Kepone in water and sediment, Environ. Sci. Technol. 12 (1978) 297–301.

[16] Bordet F., Thieffinne A., Mallet J., Heraud F., Blateau A., Inthavong D., In-house validation for analytical methods and quality control for risk evaluation of chlordecone in food, Int. J. Environ. Anal. Chem. 87 (2007) 985–998.

[17] Cairns T., Siegmund E.G., Doose G.M., Liquid chromatography/mass spectrometry of Kepone hydrate, Kelevan, and Mirex, Anal. Chem. 54 (1982) 953–957.

[18] Moseman R.F., Crist H.L., Edgerton T.R., Ward M.K., Electron capture gas chromatographic determination of Kepone residues in environmental samples, Arch. Environ. Contamin. Toxicol. 6 (1977) 221–231.

[19] Bristeau S., Amalric L., Mouvet C., Validation of chlordecone analysis for native and remediated French West Indies soils with high organic matter content, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 1073–1080.

[20] Martin-Laurent F., Sahnoun M.M., Merlin C., Vollmer G., Lubke M., Detection and quantification of chlordecone in contaminated soils from the French West Indies by GC-MS using the (13)C 10-chlordecone stable isotope as a tracer, Environ. Sci. Pollut. Res. Int. (2013) 1–6.

[21] Amalric L., Henry B., Berrehouc A., Determination of chlordecone in soils by GC/MS, Int. J. Environ. Anal. Chem. 86 (2006) 15–24.

[22] Anon., Effet des matériaux sur la qualité des eaux destinées à la consommation humaine - Matériaux organiques, Part. 2 : méthode de mesure des micropolluants minéraux et organiques, Norme AFNOR XP P41-250-2, AFNOR, Paris, France, 2001.

[23] Harris R.L., Huggett R.J., Slone H.D., Determination of dissolved Kepone by direct addition of XAD-2 resin to water, Anal. Chem. 52 (1980) 779–780.

[24] Brunet D., Woignier T., Lesueur-Jannoyer M., Achard R., Rangon L., Barthès B.G., Determination of soil content in chlordecone (organochlorine pesticide) using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS), Environ. Pollut. 157 (2009) 3120–3125.

[25] Hawthorne S.B., Grabanski C.B., Miller D.J., Solid-phase-microextraction measurement of 62 polychlorinated biphenyl congeners in milliliter sediment pore water samples and determination of KDOC values, Anal. Chem. 81 (2009) 6936–6943.

[26] Beltran J., López F.J., Hernández F., Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis, J. Chromatogr. A 885 (2000) 389–404.

[27] Ai J., Solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations, Anal. Chem. 69 (1997) 1230–1236.

[28] Wan H.B., Wong M.K., Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis, J. Chromatogr. A 754 (1996) 43–47.

[29] Beltran J., Lopez F.J., Cepria O., Hernandez F., Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples, J. Chromatogr. A 808 (1998) 257–263.

[30] Eisert R., Levsen K., Determination of pesticides in aqueous samples by solid-phase microextraction in-line coupled to gas chromatography--mass spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 6 (1995) 1119–1130.

[31] Gonçalves C., Alpendurada M.F., Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residue analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities, J. Chromatogr. A 1026 (2004) 239–250.

[32] Vázquez P.P., Mughari A.R., Galera M.M., Solid-phase microextraction (SPME) for the determination of pyrethroids in cucumber and watermelon using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection, Anal. Chim. Acta 607 (2008) 74–82.

[33] Guillot S., Kelly M.T., Fenet H., Larroque M., Evaluation of solid-phase microextraction as an alternative to the official method for the analysis of organic micro-pollutants in drinking water, J. Chromatogr. A 1101 (2006) 46–52.

[34] Fidalgo-Used N., Centineo G., Blanco-González E., Sanz-Medel A., Solid-phase microextraction as a clean-up and preconcentration procedure for organochlorine pesticides determination in fish tissue by gas chromatography with electron capture detection, J. Chromatogr. A 1017 (2003) 35–44.

[35] Ostroukhova O., Zenkevich I., A comparison of the external standard and standard addition methods for the quantitative chromatographic determination of pesticide concentrations in plant samples, J. Anal. Chem. 61 (2006) 442–451.

[36] Zenkevich I., Klimova I., Use of the standard addition method in quantitative chromatographic analysis, J. Anal. Chem. 61 (2006) 967–972.

[37] Bristeau S., Ghestem J.P., Résultats de l'essai interlaboratoires chlordécone et chlordécone-5b-hydro dans les eaux de surface continentales et eaux souterraines, BGRM, Rapp. Final, Rapp. AQUAREF- RP-61916-FR, BRGM, France, 2012.

[38] Woignier T., Clostre F., Macarie H., Jannoyer M., Chlordecone retention in the fractal structure of volcanic clay, J. Hazard Mater. 241–242 (2012) 224–230.

[39] Dugay J., Miège C., Hennion M.C., Effect of the various parameters governing solid-phase microextraction for the trace-determination of pesticides in water, J. Chromatogr. A 795 (1998) 27–42.

Microextracción en fase sólida y cromatografía de gases-espectrometría de masas para la determinación cuantitativa de la clordecona en muestras de agua, plantas y suelo.

Resumen – Introducción. La clordecona (CLD), organoclorado anteriormente utilizado para controlar el picudo negro del banano, se adsorbe fuertemente en suelos, como andosol. Un procedimiento simplificado para cuantificar residuos de CLD en agua, micro-muestras de suelo y de plantas fue comparado a un método estándar. **Materiales y métodos**. El procedimiento combina un muestreo simplificado y una micro-extracción en fase sólida (SPME) durante 10 min, separación por cromatografía en fase gaseosa (GC) e identificación por espectrometría de masas (MS y MS/MS). La cuantificación se realizó mediante un método de adición estándar. Se analizaron setenta muestras con el método propuesto y un método estándar (extracción con solvente caliente). Quince muestras de suelo fueron analizadas por dos métodos SPME / GC-MS, una con la CLD C_{13} como estándar interno y la otra el método propuesto. **Resultados y discusión**. Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) con la extracción de SPME de 10 min se han determinado en GC-MS y GC-MS/MS en muestras de agua, de plantas (raíces de piña) y de suelo : en agua, con la MS/MS, $LOD_{MS\ /\ MS\text{-}agua}$ = 0,5 ng·L^{-1} y $LOQ_{MS/MS\text{-}agua}$ = 2,0 ng·L^{-1}; en andosol con la MS/MS, $LOD_{MS/MS\text{-}suelo}$ = 15,0 ng·kg^{-1} ms y $LOQ_{MS/MS\text{-}suelo}$ = 80,0 ng·kg^{-1} ms. Los datos de contaminación sobre los 70 suelos obtenidos con el método propuesto y con el método estándar mostraron un coeficiente de correlación r = 0,86. Los datos obtenidos con los dos procedimientos de cuantificación con SPME / GC-MS mostraron una correlación r = 0,8073. **Conclusión**. El método proporciona una preparación rápida de muestras y una extracción de CLD simplificada en agua, plantas y suelo, sin manipulación de solventes. Los límites de detección y de cuantificación fueron similares a los métodos usuales. El método fiable y preciso, sería útil a fines de investigación.

Francia (Martinica) / clordecona / extracción / técnicas analíticas / análisis cuantitativo/ análisis de agua / análisis del suelo / análisis de tejidos

ECOHYDROLOGY & HYDROBIOLOGY

DOI: 10.2478/v10104-011-0035-2

Vol. 11
No. 1-2, 121-128
2011

Water observation
and information systems
for decision support

Low water transport in fractal microstructure of tropical soils: application to chlordecone pesticide trapping

Thierry Woignier [1], Marc Morell[2], Olivija Morell[3], Laurent Duffours[4], Alain Soler[5]

[1] IMEP (Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie) UMR CNRS 6116 UMR IRD 193, IRD-PRAM, Le Lamentin, Martinique, France,
e-mail: thierry.woignier@univ-montp2.fr
[2] IRD Caraïbes, Fort de France, Martinique, France
[3] Meteo-Mak, Skopje, Republic of Macedonia
[4] Prime Verre, avenue A. Einstein, Montpellier, France
[5] Cirad–PRAM le Lamentin, Martinique, France

Abstract

Chlordecone, a toxic organochlorine insecticide, is a major long term source of pollution of soils and water resources in West Indies. Allophanic soils have been strongly polluted and we show that the clay microstructure should be an important physico-chemical characteristic limiting the transfer of the pesticide in water. We demonstrate the fractal structure of the allophane clay, at the nanoscale and show that it exist a correlation between the allophane fractal structure and the poor pesticides transfer from allophanic clay to water. We propose that the fractal features and associated poor low transport properties could explain why allophane clay is able to retain pesticides. Comparatively, these allophanic clays could be highly polluted but less contaminant for water resources and diffusion in environment.

Key words: water pollution, chlordecone, pesticide, allophane, fractal structure, diffusion coefficient

1. Introduction

The retention of pesticides in soils is an important physico-chemical characteristic governing the fate of pesticides in the environment. Researches deal with the behaviour of the pesticides, its transfer from the soil to cultivated plants and water resources (Topp *et al.* 1986; Hulster *et al.* 1994). The scientific and economic context of this study is related to the pollution of the soils by a persistent (Hulster *et al.* 1994) chlorinated hydrocarbon pesticide (chlordecone) in a tropical context (French West Indies). Chlordecone is a very though pesticide (Dawson *et al.* 1979) which was used in the 1970s mainly for the protection of banana plantation (control of the banana root borer) and today chlordecone is at the origin of the diffuse pollution in agricultural soils (Snegaroff 1977) becoming new sources of contamination for fresh water and fauna. Recently, two reports revealed the presence of chlordecone in

rivers, spring water but also drinking water (DIREN 2001, DSDS 2001). Chlordecone induces cumulative and delayed toxicity (Sterrett, Boss 1977; Epstein 1978) and accumulates in the food chain. It is thus necessary to know the environmental mobility and fate of the pesticides; what content of chlordecone is present in the soils (Brunet *et al.* 2009) and is ability to migrate through environment.

Previous studies have shown that pesticides' diffusion in water differs with the soil type, for example allophanic soils (also called Andosols) are generally highly polluted but less contaminant than other tropical soils (Cabidoche *et al.* 2009; Jeannoyer Lesueur *et al.* 2009). Data from lysimeters show that the concentration of drainage water were 3-4 fold lower for Andosol than for Nitisols (tropical soils containing halloysite clay). Moreover, laboratory experiments (Woignier *et al.* 2009) have shown that Andosols are less sensible to lixiviation experiments and retain larger chlordecone content than samples containing the halloysite clay. Consequently soils containing allophane are generally highly polluted but less contaminant for water resources.

Allophane is amorphous clay presenting completely different structures and physical properties compared to usual clays (Wada 1985; Dorel *et al.* 2000; Woignier *et al.* 2005). Allophanes have peculiar physical features: large porosity (40-70%) and pore size distribution, a high specific surface area (100-200 $m^2 g^{-1}$) and very large water content (200--300 weight percent). We propose that the peculiar structure of the allophane could be responsible for pesticides affinity and slow transfer to river and water resources. In this way, we will study the microstructure of the allophane aggregates, at the nanometre scale (3-500 nm) and characterize the fractal structure of different allophanic soils. We will show that the most important part of the water and pesticides content in Andosols is due to the fractal structure of the porosity. We will show the influence of the allophane content on the porous and structural properties and correlate these features to the retention of chlordecone and trapping properties, in the tortuous microstructure. This approach will help us to understand why the water resources are less contaminated by chlordecone in the case of a transport by allophanic clay.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Soils were sampled from several soil profiles located in the contaminated area (in the vicinity of "Montagne Pelée" volcano), in La Martinique (French West Indies,). The soil samples were sampled from surface (horizon A, from 0 to around 5-20 cm depth) and stored in closed container at 4°C before analyzing. The time before analysis is less than one week. The maximum water content was measured at saturation after rehumidification (24 h at room temperature) and after a complete drying at 105°C.

2.2. Chlordecone analysis

Chlordecone content was measured by the laboratory analysis of the Drôme county (LDA26 at Valence, France), which works under the norm NF17025. After sample homogenization, chlordecone was extracted using dichloromethane and acetone (volume ratio 50/50). It was then assayed by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) using a Triple Quadripole Varian MS1200 analyser (Palo Alto, CA, USA). Calibration method used was the standard addition and two internal standards, hexabromobenzene and triphenylphosphate. The resulting data are given with a 30% confidence interval (Brunet *et al.* 2009).

2.3. Allophanic content analysis

The allophanic content was measured by extraction method, using Al and Si content extracted by oxalate and pyrophosphate. Ammonium oxalate extractable Al and Si (Al_o and Si_o) and sodium pyrophosphate extractable Al (Al_p) were determined. Allophane contents were calculated using the formula proposed by Mizota and van Reewijk (1989): Allophane % = 100 Si_o / [23.4 - 5.1(Al_o - Al_p) / Si_o].

2.4. Pore structure analysis

Nitrogen adsorption desorption measurements and Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) data were determined after supercritical drying (Woignier *et al.* 2005; Woignier *et al.* 1991).

The specific surface area (*S*) was measured by N_2 adsorption techniques (BET analysis) with a micromeritics ASAP 2010. The BET equation was applied to the data in the p/p_0 range of 0.05-0.3. Prior to N_2 adsorption, the out gassing conditions were 24 h at 50°C, with a vacuum of 2-4 μm Hg. A cross sectional area of 16.2 $Å^2$ for the nitrogen molecule was assumed.

From the weight and the geometrical dimensions of the soil samples, the bulk density ρ*b* was determined. The specific volume *Vp* of the solid is calculated from ρ*b* and ρ*s*, the bulk and solid density of the porous body: $V_p = 1/\rho b - 1/\rho s$. ρ*s* measured by He pycnometry is closed to 2.5 $g.cm^{-3}$ (Dorel *et al.* 2000);

2.5. Clay microstructure analysis

The transmission electron microscopy is done with a TEM JEOL Type 1200 EX (100KV).

The nanoscale structure was studied by Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) experiments. They were carried out on solid powders in 1 mm diameter glass capillaries (Chevallier *et al.* 2008). The fit procedure and the analysis of the curve I(q) versus q allowed to calculate the fractal dimension *Df*, and the cluster size (Teixeira 1988; Marlière *et al.* 2001). The extent of the fractal clusters ξ gives the size of the allophane aggregate structure and *Df* characterize the tortuosity inside the aggregate.

3. Results

The obtained results demonstrate the influence of the allophane content on the porous and structural features of the clay matter as useful tool toward understanding the chlordecone transfer from clay to water.

The large increase of chlordecone concentration in soils with increasing allophane content is depicted in figure 1. Data shows that chlordecone content is correlated to the allophane content ($P < 0.0001$ and $r^2 = 0.65$). This finding confirms previous data in the literature (Cabidoche *et al.* 2009; Jeannoyer Lesueur *et al.* 2009) explaining that Andosols are generally more contaminated than others kinds of tropical soils containing usual crystalline clays like halloysite and kaolinite. However, in our study the chlordecone contamination in Andosols seems to be directly related to the soils allophane content (Fig. 1) and we can suppose that the pesticides retention properties could be dependent on allophane features.

Moreover, the large increase of the water content versus the allophane content express that the allophane clay is like a sponge with water content as high as 180 weigh percent (Fig. 2).The statistical analysis shows that the water content is well correlated to the allophane content ($P < 0.0001$ and $r^2 = 0.83$). Figure 3 presents the porous properties versus the allophane content. The two textural features clearly

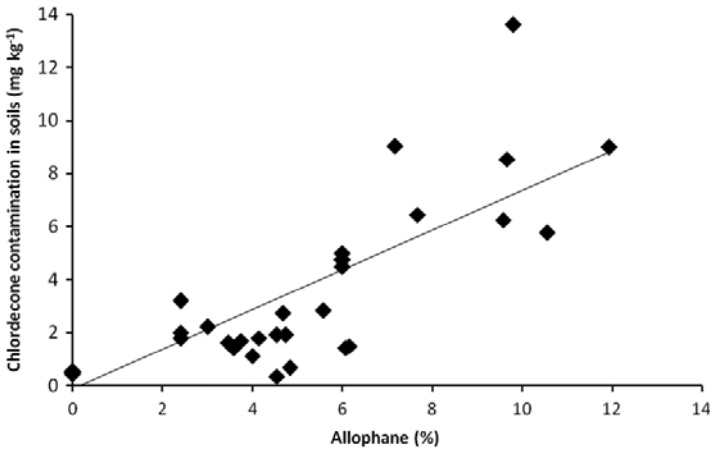


Fig. 1. Evolution of the chlordecone contamination versus allophane content.

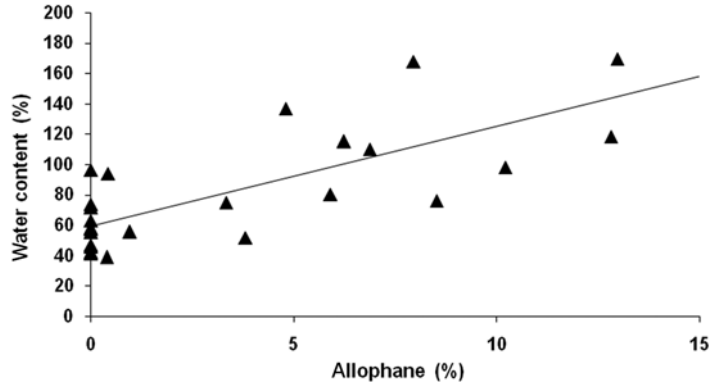


Fig. 2. Evolution of the water content versus allophane content.

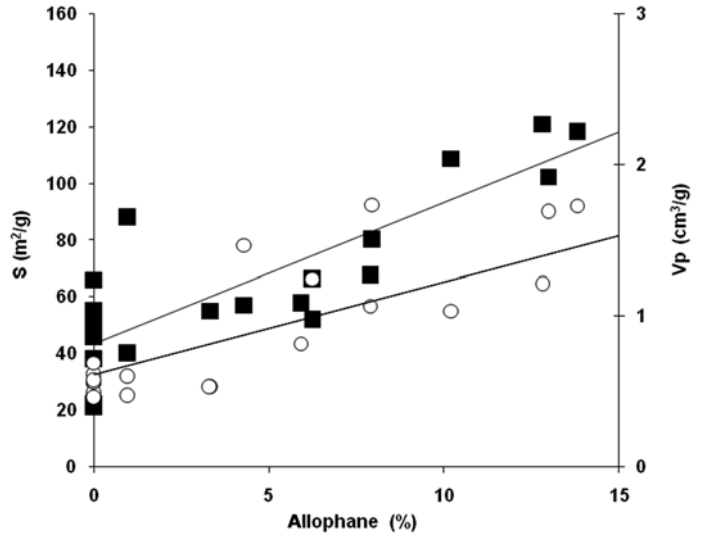


Fig. 3. Specific surface area (*S*, ■) and pore volume (*Vp*, O) *versus* allophane content.

increase with the allophane content showing that the allophane clay favours larger porous features, which explains large water and chlordecone content. The pore volume Vp and the specific surface area S determined after supercritical drying were well correlated to the allophane contents (for S, $P < 0.0001$ and $r^2 = 0.8$ and for Vp $P < 0.0001$ and $r^2 = 0.87$). In this study the specific surface area could be as high as 120 $m^2\ g^{-1}$ and pore volume close to 2 $cm^3\ g^{-1}$. These data suggest that the porous structure is made of micro and mesopores (Brinker, Scherer 1990). We will see later that the peculiar tortuous (fractal) structure of the allophane clay is responsible for the large water content and pesticides retention.

To understand why the allophanic soils retain more water and more pesticides than the other clays, it is necessary to characterize the peculiar structure of the allophane aggregates. Figures 4 and 5 show electronic micrographs (SEM and TEM) of the structure of this amorphous clay. These micrographs confirm the spongy structure of allophane clay. However, the morphology of the allophane aggregates is peculiar. The allophane structure is a very open structure made of aggregated small particles (~ 5 nm) building clusters with size close to 10-20 nm. These clusters can stick and form larger and larger aggregates up to ~ 100 nm (Fig. 5). This description is in agreement with the results of the literature (Wada 1985; Denaix *et al.* 1999). Wada (1985) describes allophane particles as nearly spherical with diameters in the range of 3-5 nm (by way of comparison, the plate-like particles of kaolinite clay are 300-3000 nm). This description is also in agreement with a qualitative fractal description. In the literature several authors have assumed that the allophane structure could be fractal (Wada 1985; Adashi *et al.* 1999).

Electron micrographs are not able to gives quantitative information on the fractal dimension which characterizes the solid compactness. In a previous work (Chevallier *et al.* 2008) we have shown that the nanoscale allophane structure can be studied by scattering experiments like Small Angle X-Rays Scattering (SAXS). To specify the fine structure of the soil samples we have performed SAXS experiments on sample with different allophane content. SAXS experiments allows to calculate the fractal dimension Df (which express the clusters compactness and tortuosity) and figure 6 shows the evolution of ξ, (the extent of the fractal aggregates) versus allophane content ($P = 0.001$ and $r^2 = 0.71$). The fractal extent can be considered as the size of a tortuous nano "labyrinth". Our results show that the size of the fractal labyrinth (the size of the sponge) increases with the allophane content which suggests that the accessibility inside the clay microstructure will be difficult.

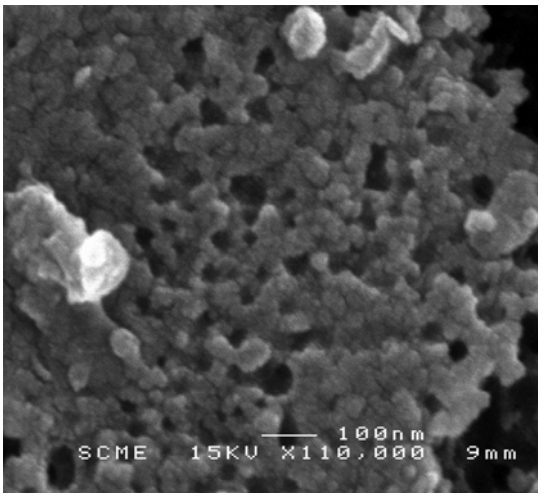


Fig. 4. Scanning electron microscopy of allophanic soil; the micrograph size is 2000 nm.

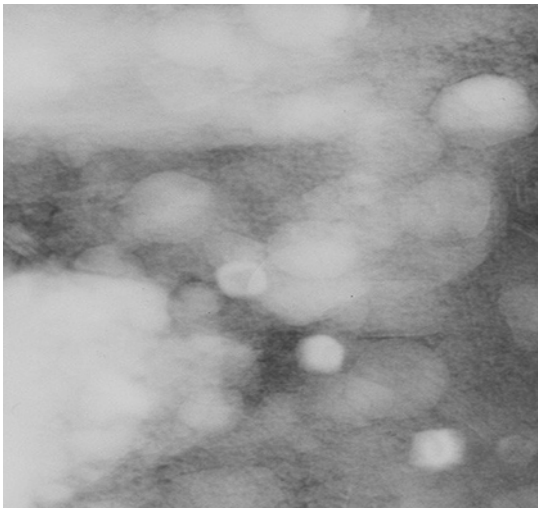


Fig. 5. Transmission electron microscopy of allophanic soil, the micrograph size is 200 nm.

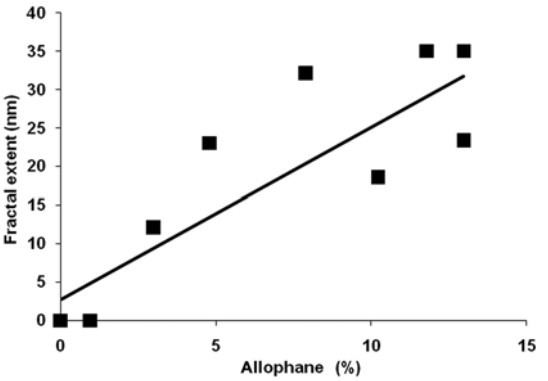


Fig. 6. Evolution of the extent of fractal structure (labyrinth size) *versus* the allophane content.

4. Discussion

In such a way, to understand the lower water contamination from allophane clay the effect of clay structure on pesticide retention or release will be discussed. The influence of the allophane clay on soils porous properties, water and chlordecone content is the signature of a completely different structure of the allophane aggregate, compared to the usual clay. The allophane clay has a structure similar to those of silica gels (spongy structure) made of aggregated small particles and forming a fractal network. For all Andosol samples studied, the allophane particle size is quite constant (3-5 nm), the fractal dimensions *Df* does not vary (*Df* = 2.5-2.7) but the aggregates size increases with the allophane content. A simple structural description is the following: the allophane clusters are made by aggregation of small allophane particles with the same aggregation process (same fractal dimension) but the size of the fractal aggregates increases with the content of available aggregating particles. It is obvious that this peculiar tortuous structure will have some incidences on the transport properties inside the allophane aggregates.

The investigation of the pore structure details allows one to propose a possible mechanism for the high water content and pesticides retention in allophanic soils and also for the poor chlordecone release in water resources. The large specific surface area is the signature of small pore sizes. Associated to the fractal (and consequently tortuous) structure, the flow and diffusive transport at the scale of the allophane clay should be low. For chemical species located inside the allophane aggregates, the exchanges and/or chemical reactions with other chemical species and solvents are difficult. From the fractal structure we can derive physical features responsible for the transport properties. In a previous work (Chevalier *et al.* 2008) we have shown that for such porous structure the water transport by flow is very low because the permeability decrease by a factor 10^4 inside the allophane aggregate. So in the case of allophane matter in suspension in a river, the water inside the allophanic aggregates is quite trapped in the allophane porous structure. Consequently, pesticides cannot move by flow from the interior of allophane particles to river water.

If the inside water is trapped, the pesticides mobility from allophanic matter to water resources and environment could be dependent on a diffusive process. It is not possible to measure the diffusivity at the scale of the allophane aggregates. However, the knowledge of the fractal structure allows deriving *Di* at the aggregates scale. It exists in the literature a relationship which relates the diffusion coefficient with the porosity (Willye *et al.* 1952):

$$Di \propto V_P / t$$

where *Di* is the diffusivity in the porous structure, V_P is the pore volume and *t* the tortuosity.

Tortuosity is defined as the ratio between the minimum length to go from one point to the other (by remaining within the matter of the fractal) and the Euclidean distance between these two points.

In a fractal aggregate we can express the pore volume evolution with the length scale as:

$$V_P(l) = 1 - \rho_r(l) = 1 - [l/a]^{Df-3}$$

where *l* is the length scale and *a* is the size of the primary particle which built the fractal structure.

It exist also a relation relating *t* to the pore volume ratio V_p (Pisnen 1974):

$$1/t = 1 - 2/3\,(1 + V_P)\,(1 - V_P)^{3/2}$$

and we find (Chevalier *et al.* 2008):

$$Di \propto (1 - (l/a)^{Df-3})\,[1 - 2/3\,(2 - (l/a)^{Df-3})\,(l/a)^{Df-3})^{3/2}]$$

From this simple relation we can calculate the evolution of the diffusion coefficient inside the allophane aggregates, i.e. when the length scale decreased between the cluster size (ξ) and the size of allophane particles (*a*) which built the clusters (3-5 nm) (Wada 1985; Denaix *et al.* 1999). Cluster size could be as high as 100 nm and one can calculate that *Di* decreases by 20 when *l* decreases between 100 and 4 nm (Fig. 7).

These results mean that water and chemicals species will have difficulty to diffuse trough the porous and tortuous porosity of allophane clay. Like silica gels, the paradox of allophane clay is a high pore volume but a poor permeability and diffusion coefficient. For such fractal structure the possible exchange and chemical reactions with chemical species able to extract the pesticides are thus difficult. The pesticides stored inside allophane clay (because of the strong affinity of chlordecone with

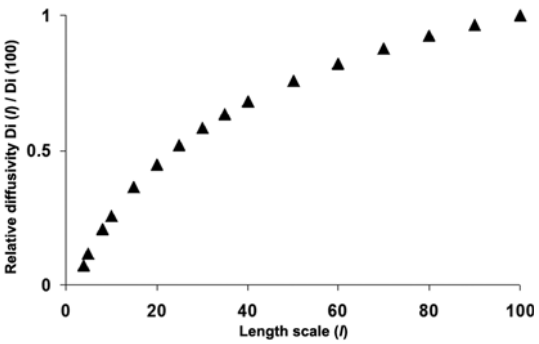


Fig. 7. Evolution of the relative diffusivity (*Di*) inside the allophane aggregate (between 100 and 4 nm) *versus* the length scale (*l*).

large allophane organic matter content) is trapped and protected against extraction. This conclusion is in a qualitative agreement with recent result in the literature (Cabidoche *et al.* 2009; Jeannoyer Lesueur *et al.* 2009; Woignier *et al.* 2009) which shows that soils containing allophane are highly contaminated but poorly contaminant for water resources. Comparatively, halloysite clay present a higher water pollution risk because of its open structure. However, as a consequence of the soil type, the soil natural decontamination will be more than 500 years for allophanic soils compared to some decades for halloysite soils (Cabbidoche 2009). Facilitating organic matter mineralization and/or the destruction of the allophane fractal structure by wetting and drying cycles would be a way to accelerate the decontamination. An alternative to manage the fate of this pesticide could be to improve the capacity of allophanic soils to retain chlordecone. For that, the addition of organic matter in soils will improve the chlordecone sequestration properties.

Conclusions

In French West Indies the water resources, i.e. rivers, spring water and drinking water, are contaminated by a tough pesticides (chloredecone). This contamination is the result of a diffuse pollution coming from agricultural soils. WISORCH, a leaching model accounting for chlordecone soils content and drainage of water concentrations (Cabidoche *et al.* 2009), predict that the lixiviation and chlordecone transport in environment differs between soil types.

Pesticides such as chlordecone tend to adsorb onto soil colloids, and several authors have underlined the role of soil organic matter content in the retention of pesticides (Spark, Swift 2002; Li *et al.* 2003). However, the porosity in allophanic soils can span a wide range of length scales including the micro-, meso- and macroporous regimes. Water and pesticides inside allophane aggregates occupy the pores and a number of factors (size, shape, distribution and connectivity of the pore geometries) dictate how fluids migrate into and through the porosity and ultimately adsorb and react with the solid surfaces. Consequently, the physical features of the clay structure could control the pesticide release to water resources and environment. The understanding of the pesticides trapping in clay necessitates characterizing the porous structure at the nanoscale range.

For that, we have shown that allophanic clay is fractal and it exists a clear correlation between the allophane content, the fractal features, the large water content and the comparatively low pesticide release in water. We propose that the low permeability and diffusivity of fractal allophane aggregates could explain the high pesticides content and low pesticide release in water. The peculiar structure of the allophane aggregates plays the role of a labyrinth which traps the pesticides molecules. As a result, besides the chemical protection by organic matter, physical properties of the allophane aggregates certainly participate in the retention mechanism, thus limiting the pesticides contamination in water resources and environment. However, the allophane fractal structure is fragile and future evolution of the clay structure could lead to a larger release of pesticides into water.

Acknowledgments

The study was supported by the French Research Agency ANR CES “Chlordexco program”.

References

Adashi, Y., Karube, K. 1999. Application of a scaling law to analysis of allophane aggregates. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **43**, 151-155.

Brinker, C.J., Scherer, G. 1990. *Sol-Gel Science*. Academic Press, New York.

Brunet, D., Woignier, T., Lesueur Jeannoyer, M., Rangon, L.R., Barthes, B. 2009. Determination of soil content in chlordecone (organochlorine pesticide) using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Environ. Pollut.* **157**, 3120-3125.

Cabidoche, Y.M., Achard, R., Cattan, P., Clermont-Dauphin, C., Massat, F., Sansoulet, J. 2009. Long-term pollution by chlordecone of tropical volcanic soils in the French West Indies: a simple leaching model accounts for current residue. *Environmental Pollution* **157**, 1697-1705.

Chevallier, T., Woignier, T., Toucet, J., Blanchard, E., Dieudonné, P. 2008. Fractal structure in natural gels: effect on carbon sequestration in volcanic soils. *J. Sol-Gel Sci. Techn*. **48**, 231-238.

Dawson, G.W., Weimer, W.C., Shupe, S.J. 1979. Kepone – A case study of a persistent material. *The American Institute of Chemical Engineers (AIChE) Symposium Series N°75*, **190**, 366-374.

Denaix, L., Lamy, I., Bottero, J.Y. 1999. Structure and affinity of synthetic colloidal amorphous alimino silicates and their precursors. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **158**, 315-325.

DIREN 2001. *Le suivi de la contamination des rivières de la Martinique par les produits phyto sanitaires*. Direction Regionale de l’Environment, Fort-de-France, Martinique, France.

Dorel, M., Roger-Estrade, J., Manichon, H., Delvaux, B. 2000. Porosity and soil water propreties of caribean volcanic ash soils. *Soils use and Management* **16**, 130-140.

DSDS 2001. *Pesticides et alimentation en eau potable en Martinique*. Direction de la santé et du Developpement Social de la Martinique, Fort-de-France, Martinique, France.

Epstein, S. 1978. Kepone Hazard evaluation. *The Science of the Total Environment* **9**(1), Elsevier Sci. Pub., Amsterdam.

Hulster, A., Muller, J.F., Marschner, H. 1994. Soil plant transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to vegetables of the cucumber family (Curcubitaceae). *Environmental Science & Technology* **28**, 1110-1115.

Jeannoyer Lesueur, M., Woignier, T., Achard, R., Calba, H. 2009. *Pesticide transfer from soils to plants in tropical soils: influence of clay microstructure*. SETAC, New Orleans, 19-23 Nov 2009.

Li, H., Sheng, G., Teppen, B.J., Johnston, C.T., Boyd, S.A., 2003. Sorption and desorption of pesticides by clay minerals and humic acid-clay complexes. *Soil Science Society of America Journal* **67**, 122-131.

Marliere, C., Woignier, T., Dieudonne, P., Primera, J., Lamy, M., Phalippou, J. 2001. Two fractal structures in aerogel. *J. Non-Cryst. Sol.* **285**, 175-180.

Mizota, C., van Reewijk, L.P. 1989. *Soil Monograph n°2*. International Soil Reference and Information Center, Wageningen, p. 185.

Pisnen, L.M. 1974. Diffusion in porous media of a random structure. *Chemical Engineering Science* **29**(5), 1227-1236.

Snegaroff, J. 1977. Les résidus d'insecticides organochlorés dans les sols et les rivières de la région bananière de Guadeloupe. *Phytiatrie-Phytopharmacie* **26**, 251-268.

Spark, K.M., Swift, R.S. 2002. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *Science of the Total Environment* **298**, 147-161.

Sterrett, F.S, Boss, C.A. 1977. Careless Kepone. *Environment* **19**, 30-37.

Teixeira, J. 1988. Small-angle scattering by fractal systems. *Journal of Applied Crystallography* **21**, 781-785.

Topp, E., Scheunert, I., Attar, A., Korte, F. 1986. Factors affecting the uptake of ^{14}C-labelled organic chemicals by plants from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **11**, 219-228.

Wada, K.J. 1985. The distinctive properties of Andosols. In: Stewart, B.A. [Eds] *Advances in soil science*. Springer Verlag, pp. 173-229.

Willye, M.R.J., Spangler, M.B. 1952. Application of electrical resistivity measurements to problem of fluid flow in porous media. *Amer. Assoc. Pet. Geol. bull.* **36**(2), 359-369.

Woignier, T., Braudeau, E., Doumenc, H., Rangon, L. 2005. Supercritical drying applied to natural gels. *J. Sol-Gel Sci. Techn.* **36**, 61-68.

Woignier, T., Soler, A., Fernandez, F., Duffours, L., Lebrun, M. 2009. Relation entre la structure fractale des sols volcaniques et leur pouvoir de fixation de la chlordécone. In: *2^{e} rencontres nationales de la Recherche sur les sites et sols pollués.* 20-21 Oct 2009, Ademe, Paris.

Woignier, T., Phalippou, J., Hdach, H., Larnac, G., Pernot, F., Scherer, G.W. 1991. Evolution of mechanical properties during the alcogel aerogel glass process. *J. Non-Cryst. Sol.* **147**, 672-680.

Research Article

Received: 26 April 2010 Revised: 25 January 2011 Accepted: 17 February 2011 Published online in Wiley Online Library: 26 April 2011

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.2170

Development and evaluation of a new method for sampling and monitoring the symphylid population in pineapple

Alain Soler,[a]* Jean-Marie Gaude,[a] Paul-Alex Marie-Alphonsine,[a] Fabrice Vinatier,[a] Bernard Dole,[b] Jean-Claude Govindin,[b] Patrick Fournier[c] and Patrick Queneherve[d]

Abstract

BACKGROUND: Symphylids (*Hanseniella* sp.) are polyphagous soilborne parasites. Today, symphylid populations on pineapple are monitored by observing root symptoms and the presence of symphylids at the bottom of basal leaves. The authors developed a reliable method with a bait and trap device to monitor symphylid populations in pineapple or fallow crops. The spatial distribution of the symphylid populations was evaluated using the variance/mean ratios and spatial analyses based on Moran's and Geary's indices. The method has been tested to monitor symphylid populations at different developmental stages of pineapple.

RESULTS: Adding potato baits to the soil samples increased the trapping efficiency of symphylids when compared with 'soil only' and 'bait only' methods. The handling of the samples is also facilitated by the new device. Results showed that the vertical distribution of symphylids may be uniform deeply inside the soil profile under pineapple, up to 50 cm. Results showed that symphylid populations are highly aggregated, showing a spot area about 4–6 m wide for their development.

CONCLUSION: The new method allows better and easier evaluation of symphylid populations. It may be very useful in the evaluation of new IPM methods to control symphylids under pineapple.
© 2011 Society of Chemical Industry

Keywords: symphylids; *Hanseniella* sp.; monitoring method; pineapple

1 INTRODUCTION

Symphylids are the main soilborne parasites of pineapple in many production areas of Australia, Africa and the Caribbean islands[1–3] (Table 1). The importance of this pest was recently increased by the reduction in the use of pesticides imposed by markets as consumers become more and more concerned by possible health problems resulting from residues. Among symphylids, *Hanseniella* sp. (Scutigerellidae) and *Scutigerella* sp. (Scolopendrellidae) are the most common genera involved in crop losses on vegetables, corn, pineapple and many other crops.[1,3,4] Symphylids produce distinctive symptoms on pineapple. They feed on root tips (meristem tissues), producing either short roots with irregular swelling or roots with multiple branching ('witch's brooms'), depending on how recently the feeding occurred.[3,5,6] The loss of root hairs, which symphylids target as food, is another consequence that alters root efficiency. The pineapple plants become reddish and wilted, with poor anchorage and growth. These symptoms probably result from nutritional and water deficiencies due to the reduced efficiency of the root system. The crop appears in the field as an irregular patchwork of reddish wilted plants, similar in appearance to nematode-induced symptoms.[3,7–9] Umble *et al*.[10] reviewed the present strategies to control symphylid populations, but none would give a long-lasting control. Firstly, tillage is efficient but costly in terms of energy. Moreover, in subtropical areas the cost in terms of soil erosion and nitrogen loss due to a faster mineralisation would be high. Secondly, pesticide application is the main option actually used on pineapple farms, but it is no longer an acceptable option in the areas under investigation here.[1,3,8,10] Finally, crops for rotation or less susceptible varieties may be an interesting option for an ecologically based integrated pest management.[10]

Diagnosing the disease and monitoring symphylid populations in pineapple fields are rendered very difficult by possible confusion with other problems (water or nutrient deficiencies,

* *Correspondence to: Alain Soler, CIRAD, PERSYST, Pôle de Recherche Agroenvironnementale de la Martinique, Petit-Morne, BP214, 97285 Le Lamentin, Martinique. E-mail: alain.soler@cirad.fr*

a *CIRAD, PERSYST, Pôle de Recherche Agroenvironnementale de la Martinique, Petit-Morne, BP214, 97285 Le Lamentin, Martinique*

b *CIRAD, PERSYST, Neufchateau – Ste Marie, 97130 Capesterre Belle Eau, Guadeloupe*

c *CIRAD, PERSYST, BP180, 97455 Saint Pierre, La Réunion*

d *IRD, UMR Résistance des Plantes aux Bioagresseurs, Pôle de Recherche Agroenvironnementale de la Martinique, Petit-Morne, BP214, 97285 Le Lamentin, Martinique*

Table 1. Pineapple symphylids Scolopendrellidae (*Scutigerella*) and Scutigerellidae (*Hanseniella*): an overview of their occurrence in pineapple cultivation areas[a]

Symphylids	Region	References
Hanseniella spp.	Australia	Waite, 1993[37]
	Brazil	Wellington de Morais, 2009[15]
Hanseniella unguiculata Hansen	Hawaii	Sakimura, 1966; Carter, 1967 (in Ref. 1)
Hanseniella ivorensis Juberthie-Jupeau, Kéhé	Côte d'Ivoire	Juberthie-Jupeau, Kéhé, 1978 (in Ref. 5)
Hanseniella colombiana Juberthie-Jupeau	Colombia	Juberthie-Jupeau, 1997
Scutigerella sakimurai Scheller	Hawaii	Sakimura, 1966 (in Ref. 1)
Hanseniella spp. (not determined)	Martinique, Guadeloupe	Py *et al*, 1984[3]

[a] Modified from Bartholomew *et al*., 2002.[1]

nematodes, pineapple mealybug wilt). Consequently, Perrier *et al*.[9] recommended a three-step diagnosis based on the symptoms described above: firstly, observation of the spatial distribution of above-ground symptoms in the field; secondly, observation of the symptoms on the root system; thirdly, an observation of symphylids at the basal part of the old leaves. Actually, except for the presence of symphylids, the other symptoms, to some extent, also apply in the case of infestations by species of nematodes such as *Rotylenchulus reniformis* or *Pratylenchus brachyurus*.[3,5] This observation method can be used at the farm level for correct diagnosis of the disease, but it is unsatisfactory for accurate monitoring of symphylid populations in field experiments.

Methods for trapping and counting symphylids have been developed for vegetable crops.[10,11] Umble *et al*.[10] described a method based on the collection of soil samples in which symphylids are counted after the soil aggregates have been broken apart on a dark cloth. Another method employs potato slices provided as bait, sheltered with a protective cover and placed at regular intervals on the surface of the soil throughout the plot. After 3 days, symphylids present on the baits are counted.[10,12] Comparison with a direct count in core soil samples showed that the method is reliable, reflecting relative abundances, even though the number of symphylids found in the soil samples was higher.[4] Other more sophisticated methods have been developed for the identification of many different species of microarthropods. They include the use of a Tullgren-type extractor or a Winkler extractor,[13–15] an elutriation system[16–18] or a heptan floating system.[19] Therefore, these methods, which require sophisticated equipment and are time consuming, are not suitable for monitoring symphylid populations at the field level. To the present authors' knowledge, a standard method for trapping and monitoring symphylid populations in pineapple fields both at the farm level and at the experimental field level is still lacking.

In this study, a method combining bait and soil samples was designed to improve the trapping of symphylids. Different methods for counting the symphylids were tested on symphylid populations at a preplanting stage for pineapple, under a rotation crop (*Mucuna pruriens* cv. *utilis*) and a grass fallow. Two statistical methods were used for data processing. In the first method, the variance/mean ratios based on Ferris's work on nematodes were used for a preliminary evaluation of the level of aggregation of the populations and to compare different modalities of sampling and subsampling.[20] In the second method, spatial statistical analyses (Moran's and Geary's indices) were used to determine more accurately the level of aggregation of the symphylid populations.

Finally, the new sampling method was used to characterise the symphylid population on pineapple at different stages of development of the crop.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Trapping, extracting and counting the symphylids

2.1.1 Three trapping methods: combining potato bait and soil samples, 'soil only' samples and 'potato bait only' samples

The simple potato bait sampling method in which potato baits were placed on the ground and protected by white ceramic pots, as described by Umble *et al*.,[10] was compared with simple soil sampling and with a soil sampling with potato bait. Soil sampling consisted of inserting 250 mL black PVC conical pots (9 cm high × 11 cm wide at the top × 8 cm wide at the bottom, with 76–13 mm diameter holes, of which 16 were at the bottom) 15 cm into the soil, meaning that the whole pot was covered with soil. The trapping pots were gently filled with the soil removed from the same hole. The potato bait + soil consisted of the same type of soil sampling but with three potato slices (2.5 cm diameter, 1.5 cm thickness) placed as bait inside the soil in each trapping pot at 1/3 of the height, and covered with soil. Hereafter, these trapping pots with their potato baits will be referred to simply as 'traps'. For each method, 30 samples were collected after 3 days in an experimental pineapple field at CIRAD-Guadeloupe research station to evaluate the improvement in accuracy owing to the use of combining soil with potato bait. As pineapple is planted on ridges, the 30 traps were aligned on five ridges (six traps per ridge, one trap every metre) in between the pineapple plants. The symphylids were counted in the soil from the traps, including those on the surface, plus those on the potato bait. Other types of bait were also tested, but potato gave the best results (data not shown).

2.1.2 Extracting and counting the symphylids

Two methods of counting the symphylids were evaluated in the laboratory. In the first method, soil aggregates were carefully broken apart before collecting the symphylids;[10] the second method was a floating method, where the soil sample was carefully disaggregated in a 10 L bucket of water. Floating symphylids (Fig. 1) were then picked up with a small soft brush. The juveniles and adults were tentatively differentiated during counting. Adults (12 pairs of legs) and pre-adults (11 pairs of legs) were counted as adult individuals, while the others were counted as juveniles. The percentage of mortality of both populations was determined, as live symphylids may be used for rearing and further inoculations in greenhouse experimentations. Symphylid egg masses were

 © 2011 Society of Chemical Industry

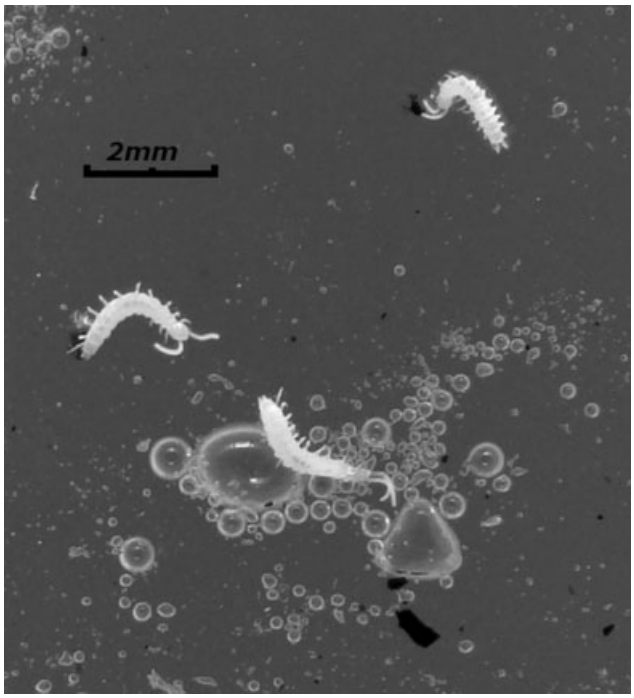


Figure 1. Symphylids recovered with the floating method. The soil content of one trap is carefully disaggregated in a 10 L bucket of water. Floating symphylids are picked up with a soft brush for counting (juveniles and adults being separated).

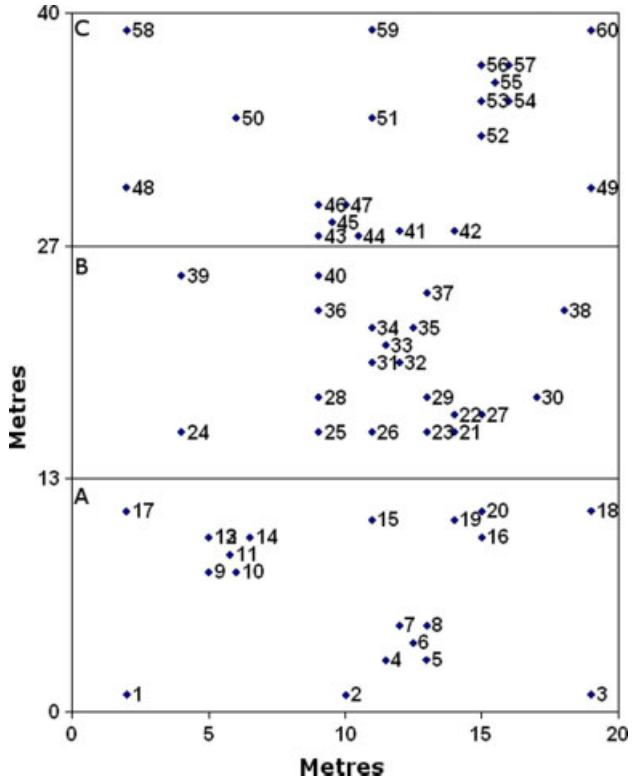


Figure 2. Experimental design for the four plots (PI to PIV) at the pineapple preplanting stage. Sixty traps were heterogeneously spread out in the fields. These fields were divided into three subplots (A, B and C) comprising 20 traps each, carefully geolocalised.

collected, and the number of eggs was counted under a stereomicroscope. Finally, average times for symphylid extraction were evaluated for the two methods. Data were collected on ten traps for each extraction method as described above but inoculated with ten adult symphylids and kept for 2 months at 29 °C with water evaporation corrected by adding the equivalent in distilled water every 2 days.

2.1.3 *Vertical distribution of symphylids*

Using this bait and trap device, the representativeness of superficial sampling versus deeper sampling was evaluated. Traps with bait were located at different depths (4–14 cm; 16–26 cm; 28–38 cm; 40–50 cm) under two crops: a three-year-old grass fallow after banana, and a pineapple field. Five replicates were made for each crop at the four levels.

2.2 Spatial distribution of symphylids

2.2.1 *Experimental design in the field plots*

Three field plots (PI and PII – the same plot sampled at two different times of the year, and PIII) were chosen in the experimental field station in Martinique, cultivated under a rotation system comprising pineapple and velvet bean (*Mucuna pruriens* cv. *utilis*). A fourth plot was established in Guadeloupe (PIV) in a grass fallow after several cycles of bananas, a crop that is known to multiply symphylids in the given conditions. In each field plot (20 m × 40 m), the traps were heterogeneously spread out into the field and their positions were carefully geolocalised (Fig. 2). This design, replicated in the four field plots, was necessary to take advantage of spatial statistical analyses. The total number of traps was 60 per plot. After 3 days in the field, the traps were transported to the laboratory. To avoid soil leakage during transport, each trap was individually placed inside another 250 mL black PVC pot.

2.2.2 *Variance/mean ratios and dispersion coefficient k*

Estimates of means, variances, variance/mean ratios, dispersion coefficients *k* and estimations of the number of samples required for an optimised sampling were made for the four different plots.

For the data analysis, it was hypothesised that the statistical analysis developed for nematode populations could be applied to symphylid populations.[20,21] Actually, both are soilborne parasites developing in similar conditions, and they have many biological traits in common (host–parasite relationship through the root system, spatial pattern distribution of individuals at the field level, sensitivity to agroclimatic conditions). In such negative binomial models, the number of samples needed for a correct evaluation of the population can be estimated by means of the equation[20]

$$n = (t_{0.05})^2 \left(\frac{1}{\bar{x}} + \frac{1}{k}\right) \Big/ d^2 \qquad (1)$$

where n is the number of samples needed for mean evaluation, $t_{0.05}$ is Student's t-statistic at $\alpha = 0.05$, $\bar{x}$ is the average number of symphylids per trap, k is the dispersion parameter and d is the acceptable deviation from the true value of x. For such populations 0.25 (25% deviation) may be acceptable depending on the experiment or sites where symphylids populations are evaluated.

The first approximation of n is made with $t_{0.05} = 1.96$ corresponding to an infinite number of degrees of freedom (df). Then, the correct n can be estimated by repeating the calculation with $t_{0.05}$ determined using the previous n approximation (reducing the df), until repeated estimates for n are very close. A small value of the dispersion parameter k indicates the applicability

 © 2011 Society of Chemical Industry

of a negative binomial model. The coefficient k was calculated by the equation[21]

$$k = \frac{\overline{x}^2}{s^2 - \overline{x}} \quad (2)$$

where k is the dispersion parameter, $\overline{x}$ is the mean calculated as $1/m \times \sum_{j=1}^{m} x_j$ (for the 'nine-sample modalities' $m = 9$ and for the 'six-sample modalities' $m = 6$) and s^2 is the variance, calculated as $1/(m-1) \times \sum_{j=1}^{m} (x_j - \overline{x})^2$.

This type of index is based on sample statistics and differentiates aggregated (or uniform) from random distributions irrespective of the sample location.

In order to reduce the number of traps necessary to estimate symphylid populations more accurately, different sampling modalities were designed and tested.

Samplings, comprising six or nine samples with either three or six traps, each gave the following modalities: 9-6, 9-3, 6-6, 6-3 with respectively 54, 27, 36 and 18 individual traps. Traps were randomly selected from the 60 traps geolocalised in the field by dividing the plots into three subplots (A, B, C) and labelling the traps from 1 to 20, from 21 to 40 and from 41 to 60 for the three subplots A, B and C respectively. Then one or two traps were selected randomly in each subplot for the three-trap or the six-trap modalities. A simple trap was considered as a core unit. Fifteen replicates for each sampling modality were done to estimate means, variances, variance/mean ratios and dispersion coefficients k, and to estimate the number of samples required for an optimised sampling. These data were compared with those obtained using the 60 traps directly.

2.2.3 *Moran's and Geary's indices*

Spatial analyses were made on the different plots, firstly by drawing the distribution maps of the symphylids in the four plots, and secondly by analysing the spatial autocorrelation with Moran's and Geary's indices calculated for the different spacings, which ranged from 1 to 10 m between the traps.

Spatial autocorrelation compares the similarity between pairs of sampling points, within a given radius, with randomly distributed pairs of points.[22] The spatial autocorrelation is described either with Geary's or with Moran's indices.[23] Spatial autocorrelation is represented in correlograms, showing the relationship between autocorrelation and a range of radius.[15] These methods allow (i) the identification of patchy or gradient distributions and (ii) the estimation of population patch size.[24] The indices are expressed mathematically as follows:

Moran's index of autocorrelation[25]

$$I(d) = \frac{\sum\sum w_{ij}(d)(x_i - \overline{x})(x_j - \overline{x})/W(d)}{\sum (x_i - \overline{x})^2/n}$$

Geary's measure[26]

$$c(d) = \frac{\sum\sum w_{ij}(d)(x_i - x_j)^2/2W(d)}{\sum (x_i - \overline{x})^2/(n-1)}$$

where w_{ij} is an element of a distance weight matrix between each pair of elements, x_i is a data count, W is the sum of w_{ij} and n is the number of pairs.

All data were processed using software R.

2.3 Application to the monitoring of symphylid populations in a pineapple (cv. MD2) plot

The method was applied in a pineapple field (cv. MD2) to monitor the evolution of symphylid populations at different stages of crop development in square plots (7 m × 7 m, with 250 plants in a double row, on five ridges). A classical crop management for pineapple grown on ridges with plastic mulch was implemented in this field, including ethoprophos (nematicide/symphylicide) application at planting. Five traps per plot, one per ridge, were placed in such a way that most of the area could be covered by the sampling.

Five replicates (five plots, 7 m × 7 m with a total of 25 traps) were made for each stage of development of the plant: stage 1 = 4 months after planting; stage 2 = 6 months after planting; stage 3 = 9 months after planting (1 month before forcing); stage 4 = 12 months after planting (2 months before harvest); stage 5 = 18 months after planting (4 months after harvest); stage 6 = 24 months after planting. Forcing is a common technique artificially to induce flowering in pineapple plots homogeneously.[1,3,8]

Means, variances, variance/mean ratios, dispersion coefficients k and an estimate of the number of samples required for an optimised sampling were calculated for the last four stages. Data obtained directly from individual traps were also compared with data obtained from a 6-3 sampling modality with five replicates to estimate the means and the variances.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Trapping, extracting and counting the symphylids

3.1.1 *Improvement of the trapping method*

Table 2 shows how the trapping of symphylids was improved by adding potato bait to the soil sample. All the traps containing potato bait contained symphylids, as opposed to 96.5% of the traps in the potato bait samples and 37.9% of the traps in the soil sample. More symphylids (250) were trapped using the first method than using either potato baits (110) or soil samples (14).

3.1.2 *Comparison of the extraction methods*

Figure 3 shows a comparison of the efficiency of the two methods tested, either the direct manual extraction from the soil samples or the floating method in water. The floating method was more efficient in recovering symphylids, especially juveniles (12.9 versus 7; $P < 0.03$), while recovery of adults and eggs did not significantly differ between the two methods. Extraction times were about 6 min per sample with both methods. Nevertheless, the classical manual method recovered symphylids in better condition for subsequent use (rearing, for example), as the mortality was only 7% compared with 59% with the floating method. The low recovery rate of juveniles with the manual extraction may result from the small size of some of the juveniles that may be concealed in small soil aggregates. Finally, the choice of the method for extracting and counting the symphylids depends on the researcher's objectives. Manual extraction can be done in the laboratory or in the field, and allows good recovery of live individuals. Alternatively, the adults/juveniles ratio can be used to determine whether the population is growing, and the floating method appears to give a better picture of the evolution of the population.

3.1.3 *Representativeness of trapping in topsoil versus in deeper soil*

Symphylids colonise the soil under pineapple cover from the topsoil to a depth of 80 cm, depending on root development and

 © 2011 Society of Chemical Industry

Table 2. Comparison of the efficiency of soil sampling, potato bait and potato bait + soil methods

	Percentage of traps with symphylids	Number of symphylids from 30 traps	Mean[a] (symphylids per trap)
Soil only	37.9	14	0.5 ± 0.2 a
Potato bait only	96.6	110	3.7 ± 1.0 b
Potato bait + soil (= trap)	100	250	8.3 ± 1.7 c

[a] Mean ± confidence interval, $\alpha = 0.05$. Values followed by different letters are significantly different.

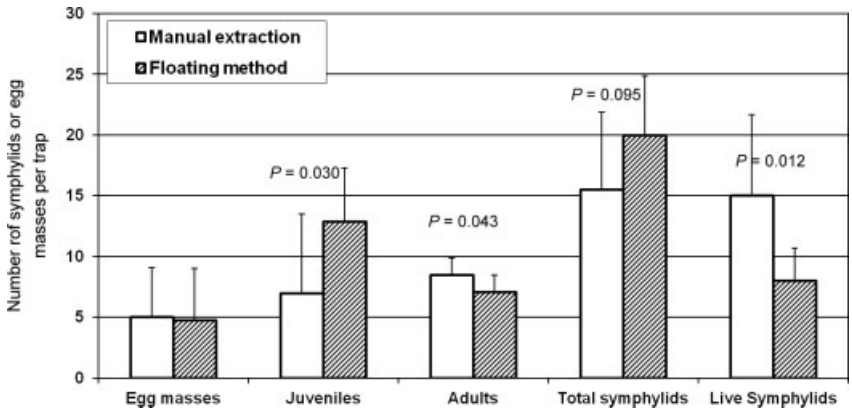


Figure 3. Comparison of manual and floating methods for the extraction and counting of symphylids. Data were collected on ten traps for each method inoculated with ten adult symphylids and kept for 2 months at 29 °C with controlled water evaporation corrected with distilled water every 2 days (P = probability determined by the Student's test means comparison).

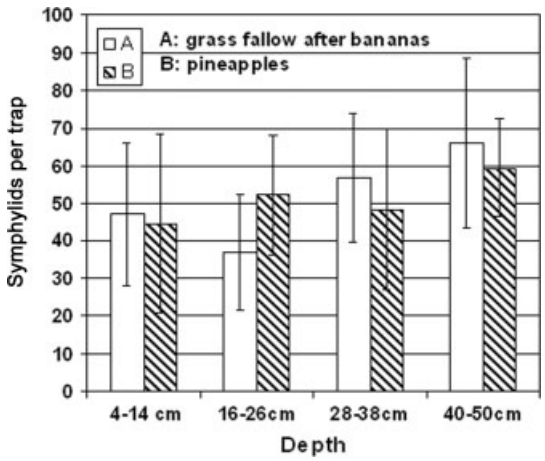


Figure 4. Symphylid distribution in soil. Traps with bait were located at different depths within the two profiles. A: a 3 year grass fallow after banana; B: a pineapple field. Five replicates were made in each profile at the four levels (4–14 cm, 16–26 cm, 28–38 cm, 40–50 cm).

climatic conditions.[3,5] Traps at different depths in the soil were tested in the experimental field PIV in Guadeloupe (grass fallow), as well as in a pineapple field in the same area. Both sites were highly infested, with an average of 47 and 44 symphylids trapped in the topsoil in the grass fallow and in the pineapple field respectively. The number of symphylids did not significantly differ between depths in the two fields (Fig. 4). These results also showed that, in these fields, it was possible to estimate the level of infestation throughout the root zone using the traps on the topsoil only. This should be the case for most fields, providing that climatic conditions at the time of sampling do not lead to a downward movement of the symphylids to find suitable conditions for their survival, for example during dry periods or after heavy rainfalls.[3,5]

3.2 Spatial distribution of symphylids

3.2.1 Variance/mean ratios and dispersion coefficient k

The variance/mean ratios (Fig. 5) showed that, whatever the plot and the sampling modality, the symphylid population exhibited an aggregated distribution, as the sample variances were always greater than their means. This validates the hypothesis of the applicability of statistical methods developed for nematodes. The spatial distribution of such plant parasites can be described by a negative binomial model.[20,21]

Figure 5 also shows that the modalities using fewer samples (six instead of nine samples) gave higher variance/mean ratios. Using the 60 traps as individual samples gave the highest ratios. It may be supposed that the 60 traps gave a better estimate of the aggregation of the symphylid population. In the case of the four sampling modalities, as 15 replicates were made for each modality, their means and variances reflect a certain level of overlapping (traps being used twice or more in the 15 replicates), giving variance/mean ratios lower than those calculated with the 60 traps.

Estimates of population means (calculated using the different sampling modalities) were always satisfactory when compared with the 'true mean' (calculated from the total number of traps for each plot), as no significant differences were found (Table 3).

The coefficients k estimated for the different modalities were higher than those calculated from the 60 traps, for the same reason as mentioned before (Table 4). These data also showed that the dispersion coefficient k depended on the size of the sample

 © 2011 Society of Chemical Industry

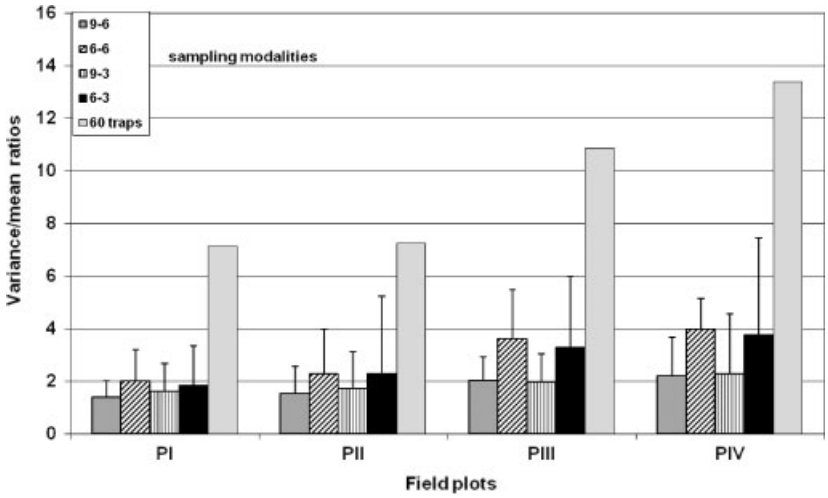


Figure 5. Variance/mean ratio for the four plots PI to PIV with four sampling methods. Sampling comprised six or nine samples with either three or six traps each. Traps were randomly selected from the 60 traps located in the field by dividing the plots into three subplots (A, B and C) and labelling the traps from 1 to 20, then from 21 to 40, then from 41 to 60 for the three subplots respectively. The error bar is the standard variation calculated from 15 replicates – no standard variation for 60 traps, as all the traps are included.

Table 3. Comparison of the 'true' means (number of symphylids per trap) and means calculated from the samples using the four different sampling modalities

	9-6	6-6	9-3	6-3	'True' mean[a]
PI	4.4 ± 2.5[b]	4.5 ± 3.0	4.3 ± 2.6	4.5 ± 2.9	4.4 ± 2.4
PII	12.2 ± 4.3	12.0 ± 5.2	12.4 ± 4.6	12.8 ± 5.4	11.9 ± 3.1
PIII	7.2 ± 3.8	6.9 ± 5.0	7.5 ± 3.8	6.9 ± 4.7	7.2 ± 3.0
PIV	20.0 ± 6.6	20.9 ± 9.1	19.9 ± 6.7	19.2 ± 8.5	21.2 ± 4.1

[a] True means and their standard deviations were calculated from the 60 traps placed in the different plots.
[b] Standard deviations were calculated from the 15 replicates chosen randomly from each sampling modality. The sampling modality is defined, for example, as follows: 9-6 = nine samples in the same plot, each sample composed of six core units (traps).

Table 4. Dispersion coefficients k estimated from the different plots and sampling modalities with equation (2)

	9-6	9-3	6-6	6-3	k for core unit[a]
PI (4.4)[b]	11.4[c]	4.5	6.8	5.4	0.7
PII (11.9)	23.1	9.3	16.8	10.0	1.9
PIII (7.2)	7.1	2.6	7.8	3.0	0.7
PIV (21.2)	16.6	7.0	15.4	7.0	1.7

[a] k estimated from the means and variances of the four plots using the 60 traps.
[b] The true means estimated from 60 traps are shown in parentheses.
[c] The dispersion coefficients were calculated from the 15 replicates chosen randomly from each sampling modality. The sampling modality is defined, for example, as follows: 9-6 = nine samples in the same plot, each sample composed of six core units (traps).

(number of traps per sample), and that there was no clear relation between k and the level of infestation, as already mentioned by Been and Schomaker for nematodes.[21]

Table 5. Estimation of the number of traps needed to evaluate the symphylid populations according to equation (1)

	Sampling modalities[a]				
Site	60 traps	9-6 54 traps	9-3 27 traps	6-6 36 traps	6-3 18 traps
PI (4.4)[b]	110	132	90	156	84
PII (11.9)	41	66	45	66	48
PIII (7.2)	101	120	105	114	98
PIV (21.2)	42	60	42	60	45

[a] The sampling modality is defined, for example, as follows: 9-6 = nine samples in the same plot, each sample composed of six core units (traps). Estimates made with acceptable deviation $d = 25\%$ and $\alpha = 0.05$.
[b] The 'true means' estimated from 60 traps are shown in parentheses.

Next, an estimate was made of the number of traps for an optimised sampling (Table 5) using equation (1) in the different situations (plots and sampling modalities).

The results showed that, using the 60 traps as individual samples, the estimated number of traps required was higher for low levels of infestation (PI and PIII). Actually, in the present experimentation, when the infestation reached ten symphylids per trap (plots II and IV), the number of traps could have been reduced from 60 to 40 and the same precision kept ($d = 0.25$). Beneath this level of infestation, the number of traps required increased strongly, up to 100 traps for plots I and III.

The different modalities tested did not allow a reduction in the estimated number of traps through equation (1). Surprisingly, the modalities 9-3 and 6-3, which comprised the lower number of traps (27 and 18 traps respectively), gave results very close to those obtained with the 60 traps.

As a result of the previous observations, a sampling strategy could be as follows. Firstly, a preliminary sampling should be done to evaluate the level of infestation. It seems possible to make a preliminary evaluation of the infestation (expressed as the number of symphylids per trap) using a relatively low number of

 © 2011 Society of Chemical Industry

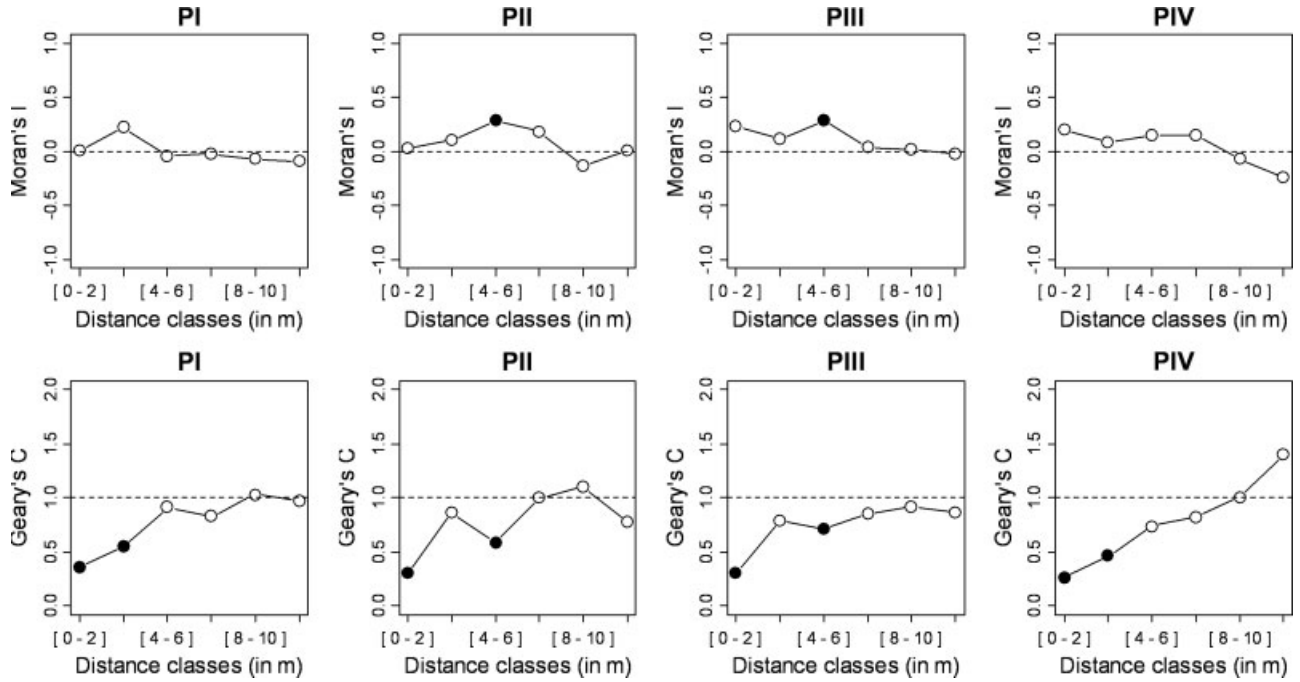


Figure 6. Omnidirectional correlograms of symphylid abundance data using (a) Moran's index and (b) Geary's *C*-index. Solid symbols indicate significant values at 0.05 (Bonferroni correction); open symbols indicate non-significant values. Correlograms were computed using six classes (distance interval = 2 m) (software R).

traps, especially when high infestations are suspected. Secondly, an estimation of the number of traps for a given precision should be carried out. Use of a standardised unit core (trap) should help the researcher to estimate a 'common *k*' (for a given sampling method), which in turn could be used to estimate the number of samples required for a correct evaluation of the symphylid population.

3.2.2 Moran's and Geary's indices

Spatial analyses of the data (Moran's and Geary's indices) were performed to evaluate the scale of aggregation of symphylids in the given conditions. Spatial analyses explicitly included information on the location of traps and thus allowed patchy or gradient distributions to be identified, but also the range of aggregation (i.e. the spacing of the traps in the present case).[24,27]

Moran's indices gave few significant results and only in plots PI and PII corresponding to two stages of development of the *Mucuna* crop (Fig. 6). In these two plots, the symphylid populations increased between the two stages of growth (2 months and 5 months of growth), and they displayed an intermediate level of infestation compared with PIV, which corresponds to the grass fallow. Moran's indices indicated a positive autocorrelation in the range of 4–6 m between traps. For a higher level of infestation (PIV), no autocorrelation was observed, probably because it was possible to find high levels of symphylids anywhere within the plot, as shown in the density map (Fig. 7). From these indices it can be assumed that the spot areas of symphylid population development in the present plots ranged from 4 to 6 m wide. Noticeably, the same level of aggregation was maintained in plots PI and PII between the two sampling dates with two different levels of infestation.

Geary's indices gave more consistent results. Globally, the positive autocorrelation decreased for the four plots from a range of 0–2 m to a range of 4–6 m. Then, the coefficients became very close to 1 (no autocorrelation) in the range of 6–8 m and above. Again, it can be assumed from these analyses that, in the given conditions, the spot area for the development of symphylid populations was about 4–6 m wide. It can also be assumed that optimised sampling should have taken these data into account. Using a regular spacing of about 4 m between the traps would have given a better chance of accurately estimating the populations of symphylids in the field plots.

3.3 Application to the monitoring of symphylid populations in a pineapple plot (cv. MD2)

Figure 8 shows that, under pineapple, symphylid populations increased up to forcing time and then declined after harvest. This probably reflects the reduced rhizogenic activity after harvest, with no treatment at all since planting.

The absence of symphylids up to the fourth month demonstrated the efficiency of the chemical treatment with ethoprophos applied at planting under the mulch. In addition, in the given conditions there are normally two flushes of roots in pineapple.[28] During the first flush, a first set of roots emerges during the first month, and then they grow mainly during the next three months. During the second flush, new roots emerge during the third and fourth months, and then they grow during the next four months. Consequently, symphylid populations may grow faster during these two flushes while feeding on new soft roots. These are well-known observations that led to former recommendations of pesticide applications at planting and 3 months later in pineapple crop.[1,3] Obviously, the present authors did not make the second application of pesticide to observe the development of the symphylid population.

The large standard deviations observed reflect the difficulty involved in obtaining a 'correct' sample in the small pineapple plots (7 m × 7 m). However, they also show that the usual statistics (mean and standard deviation on raw data) are not very convenient

 © 2011 Society of Chemical Industry

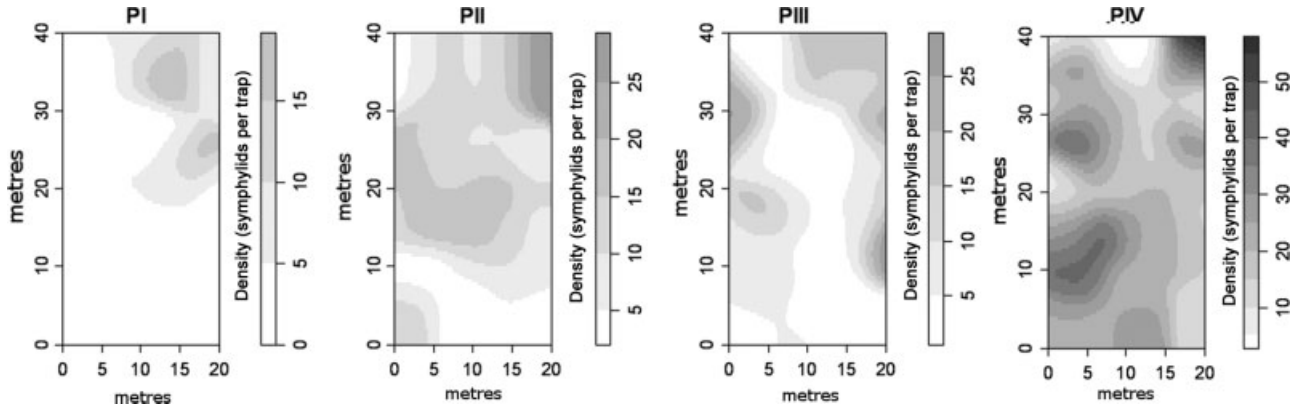


Figure 7. Maps of smoothed abundance data of symphylids observed at irregular locations. Smoothing is performed by Gaussian kernel weighting. The range of grey levels is similar for the four plots (software R).

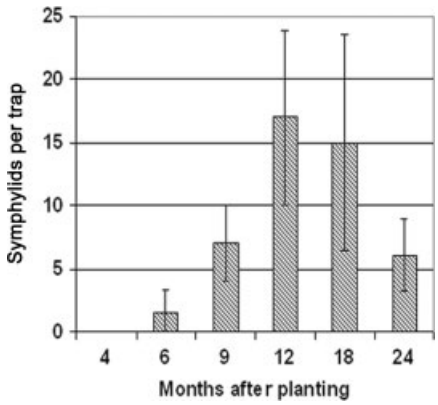


Figure 8. Variations in symphylid populations under MD2 pineapple. Plots included 250 plants on five ridges, giving 7 m × 7 m square plots. Five traps with potato bait were placed with a minimum space of 4 m between two traps. Simple samplings were made 5 times at different periods of the year for each stage of development of the pineapple plants. Time indicated as month after planting. Forcing time at 10 months.

for the description of aggregated populations of symphylids as for nematode populations.[29]

The estimated *k* values for a core unit (Table 6) obtained with equation (2) were very similar to those estimated for the *Mucuna* plots (Table 4) for the two sampling methods, either the 25 traps taken as individual samples or the 6-3 modality. Nevertheless, it must be borne in mind that the experimental designs were not similar because the statistical estimates on pineapple resulted from five replications of smaller plots, with a total number of 25 traps. In the case of the 6-3 sampling modality, estimates were also calculated from five replicates.

The two estimates of the number of traps required for a precision level of $d = 0.25$ were very similar with the two sampling methods. These estimates were greater than those with the 25 traps used initially, and there was no clear relation with the level of infestation. The stage 5 plot (18 months after planting) with the lowest dispersion coefficient *k*, meaning the strongest level of aggregation, required the highest number of traps. The method is presently used to evaluate the tolerance of different pineapple varieties to symphylids (data to be published).

4 CONCLUSION

Symphylids are one of the major pineapple pests in many production areas. During the last decade, their control has mainly been based on pesticide applications that were also used for nematodes. As a consequence of the reduction in the use of such pesticides owing to environmental concerns, the control of symphylid populations in pineapple now requires particular and novel attention by researchers searching for an alternative to the chemical control of symphylid populations. The method for trapping and counting symphylids described in this paper is an efficient tool for monitoring symphylid populations in pineapple field plots and rotation crops. The improvement brought to the 'soil only' or 'potato bait only' methods by combining bait

Table 6. Estimation of means, dispersion coefficients *k* and the number of traps needed to evaluate symphylid populations in the pineapple plots [from equation (1)]

	Means[a] (symphylids per trap)	*k* for core unit[a]	*k*-values estimated from 6-3 modality	Number of traps estimated from 25 traps	Number of traps estimated from 6-3 modality[b]
Stage 3	7.0 ± 3.0[c]	2.7	7.2	37	36
Stage 4	17.0 ± 7.0	2.3	6.0	35	34
Stage 5	13.8 ± 8.5	1.1	6.1	69	68
Stage 6	5.7 ± 2.8	2.0	13.3	48	47

[a] Means and *k* estimated from the five plots using the 25 traps.
[b] The sampling modality is defined as follows: 6-3 = six samples in the same plot, each sample composed of three core units (traps).
[c] Standard deviations were calculated from the 25 traps.

 © 2011 Society of Chemical Industry

and soil sample has been demonstrated. Using this method, it has been demonstrated that symphylid populations are strongly aggregated, showing a spot area for their development of about 4–6 m. It has also been shown that they may be vertically distributed homogeneously throughout the different soil depths explored (here up to 50 cm) unless short-term climate variations such as drought or very wet conditions temporarily affect the presence of symphylids in the topsoil profile. This sampling method is suitable for statistical analyses and consequently may be a very useful tool for evaluating the efficiency of new solutions in regulating symphylid populations. These alternative solutions will use ecologically based integrated pest management (IPM). Examples of such alternative systems are management systems in agroecosystems,[4,30] different cover crops as rotation or association crops,[31] the use of predaceous mites and centipedes[32,33] and the use of fungi[34,35] and entomophagous nematodes.[36]

REFERENCES

1 Bartholomew DP, Paul RE and Rohrbach KG (eds), *The Pineapple: Botany, Production and Uses*. Commonwealth Agricultural Bureau, International, 320 pp. (2002).
2 Halliday RB, Confirmation of the presence of *Scutigerella immaculata* (Newport) in Australia (Symphyla: Scutigerellidae). *Austr J Entomol* **43**:43–45 (2004).
3 Py C, Lacoeuilhe JJ and Teisson C, *The Pineapple, Cultivation and Uses*, ed. by Maisonneuves et Larose, Paris, France, 568 pp (1984).
4 Umble JR and Fisher JR, Suitability of selected crops and soil for garden symphylan (Symphyla, Scutigerellidae: *Scutigerella immaculata* Newport) population development. *J Appl Soil Ecol* **24**:151–163 (2003).
5 Kéhé M, *Hanseniella ivorensis* – Juberthie-Jupeau et Kéhé (1978), Symphyle, myriapode (Scutigerellidae) et le dépérissement racinaire de l'ananas en Côte d'Ivoire. *PhD Thesis*, Université d'Abidjan, Côte d'Ivoire, 180 pp. (1988).
6 Petty GJ, Stirling GR and Bartholomew DP, *Tropical Fruit Pests and Pollinators*, ed. by Pena JE, Sharp JL and Wysoki M. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 157–195 (2002).
7 Kéhé M, Gnonhouri P and Adiko, A, Time course of infestation by *Hanseniella ivorensis* (Symphilid) and *Pratylenchus brachyurus* (Nematode) on pineapple in Côte d'Ivoire. *Act Hort* **425**:465–474 (1995).
8 Soler A, Anan'AS: 150 fiches techniques pour maitriser les techniques culturales de l'ananas. CIRAD-BEPAC, ISBN 2-912929-02-04 (1998).
9 Perrier X, Lacoeuilhe JJ and Malézieux E, An expert system for pineapple disorder diagnosis. *Act Hort* **334**:197–204 (1993).
10 Umble JR, Dufour R, Fisher G, Leap J and Van Horn M, Symphylans: soil pest management options. NCAT ATTRA, 16 pp. (2006).
11 Umble JR and Fisher JR, Influence of below-ground feeding by garden symphylans (Cephalostigmata: Scutigerellidae) on plant health. *Environ Entomol* **32**:1251–1261 (2003).
12 Umble JR and Fisher JR, Sampling considerations for garden symphylans, *Scutigerella immaculata* Newport, in western Oregon. *J Econ Entomol* **96**:969–974 (2003).
13 Crossley DAJ and Blair JM, A high-efficiency, low-technology Tullgren-type extractor for soil microarthropods. *Agric Ecosyst Environ* **34**:187–192 (1991).
14 Marshall VG, Comparison of 2 methods estimating efficiency of funnel extractor for soil microarthropods. *Soil Biol Biochem* **4**:417–426 (1972).
15 Wellington de Morais J and Paixão da Silva E, Occurrence of Symphyla (Myriapoda) in the region of the Upper Solimões River, Amazonas, Brazil. *Pesq Agropec Bras* **4**:981–983 (2009).
16 Edwards CA, Method for assessing population of soil-inhabiting invertebrate: the assessment of populations of soil-inhabiting invertebrates. *Agric Ecos Environ* **34**:145–176 (1991).
17 Seinhorst JW, Modifications of the elutriation method for extracting nematodes from soil. *Nematologica* **8**:117–128 (1962).
18 Von Torne E, An elutriation and sieving apparatus for extracting microarthropoda from soil, in *Progress in Soil Zoology*, ed. by Murphy PW. Butterworths, London, UK, pp. 204–206 (1962).
19 Walters DE, Kethley J and Moore JC, A heptane flotation method for recovering microarthropods from semiarid soils with comparison to the Merchant–Crossley high-gradient extractor method and estimates of microarthropod biomass. *Pedobiologia* **30**:221–232 (1987).
20 Ferris H, Nematode damage functions: the problems of experimental and sampling error. *J Nematol* **16**:1–9 (1984).
21 Been TH and Schomaker CH, Distribution pattern and sampling, in *Plant Nematology*, ed. by Perry RN and Moens M. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, pp. 302–324 (2006).
22 Legendre P and Fortin MJ, Spatial pattern and ecological analysis. *Vegetatio* **80**:107–138 (1989).
23 Legendre L and Legendre P, *Ecologie Numérique. Tome 2. Les Structures des Données Écologiques*, 2nd edition. Masson, Paris, France/Les Presses de l'Université du Québec, Quebec, Canada, 335 pp. (1984).
24 Judas M, Dornieden K and Strothmann U, Distribution patterns of carabid beetle species at the landscape-level. *J Biogeogr* **29**:491–508 (2002).
25 Moran PA, The interpretation of statistical maps. *J R Stat Soc Ser B* **10**:243–251 (1948).
26 Geary RC, The contiguity ratio and statistical mapping. *Incorp Stat* **5**:115–145 (1954).
27 Fortin MJ, Spatial statistics in landscape ecology, in *Landscape Ecological Analysis: Issues and Applications*, ed. by Klopatek JM and Gardner RH. Springer, New York, NY, pp. 253–279 (1999).
28 Soler A, Marie-Alphonsine PA, Topart P and Quénéhervé P, How to evaluate the resistance or tolerance of pineapple varieties to nematodes? *Act Hort* **822**:191–198 (2007).
29 Quénéhervé P and Ferris H, Use of geometric vs arithmetic mean in the prominence value index and diagram frequency vs abundance. 28th Annual Meeting of the Society of Nematologists, Davis, California. *J Nematol* **21**:580 (1989).
30 Bedano JC, Cantúa MP and Doucet ME, Soil springtails (Hexapoda: Collembola), symphylans and pauropods (Arthropoda: Myriapoda) under different management systems in agroecosystems of the subhumid Pampa (Argentina). *Eur J Soil Biol* **42**:107–119 (2006).
31 Peachey RE, Moldenke A, William RD, Berry R, Ingham E and Groth E, Effect of cover crops and tillage system on symphylan (Symphyla: *Scutigerella immaculata*, Newport) and *Pergamasus quisquiliarum* Canestrini (Acari: Mesostigmata) populations, and other soil organisms in agricultural soils. *J Appl Soil Eco* **21**:59–70 (2002).
32 Berry RE, Biology of the predaceous mite, *Pergamasus quisquiliarum*, on the garden symphylan, *Scutigerella immaculata*, in the laboratory. *Ann Entomol Soc Am* **66**:1354–1356 (1973).
33 Waterhouse JS, An evaluation of a new predaceous centipede, *Lamyctes* sp., on the garden symphylan *Scutigerella immaculata*. *J Can Entomol* **101**:1081–1083 (1969).
34 Koontz FR, Biological and ecological relationships of the fungus, *Entomophthora coronata* (Constantin) Kevorkian, and the garden symphylan, *Scutigerella immaculata* (Newport). *PhD Dissertation*, Oregon State University, Corvallis, OR (1968).
35 Getzin LW and Shanks CH, Infection of the garden symphylan, *Scutigerella immaculata* (Newport), by *Entomophthora coronata* (Constantin) Kevorkian and *Metarrhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin. *J Insect Path* **6**:542–543 (1964).
36 Swenson KG, Infection of the garden symphylan, *Scutigerella immaculata*, with the DD-136 nematode. *J Invert Path* **8**:133–134 (1965).
37 Waite GR, *Pineapple Pests and Disorders*, ed. by Broadley RH, Wassmann RC, III, and Sinclair E. DPI, Queensland, Australia, 63 pp. (1993).

 © 2011 Society of Chemical Industry

Annexe 5

Encadrement Etudiants

Encadrement Etudiants et Formation diverses dispensées

Encadrement de VCAT/VSC, thèse, stagiaires Ingénieur, Master et BTS

Date	Nom	Prénom	Titre	Ecole	Diplôme
VCAT-VSC					
2004	CROS	David	Conception d'un logiciel de gestion de la production d'ananas sur la base d'un modèle de prévision intervalle Induction florale - Récolte et Utilisation pour la gestion d'essais agronomiques 'nouvelles variétés'	VCAT	
2005-2006 (2 ans)	BERTRAND	Marilyn	Evaluation des hybrides d'ananas du CIRAD (suivi agronomique de plantations mensuelles de 11 variétés d'ananas et bilan qualitatif global)	VCAT	
2010	FRANCOIS-AUGRIN	Madlyn	Mise au point d'une méthode d'analyse rapide de la chlordécone dans le sol et Mise au point d'analyses enzymatiques intervenant dans le métabolisme de défenses contre les nématodes sur Vitro-plants d'ananas et de bananiers.	VCAT	
2011-2013	CORBION	Claudine	La gestion alternative des bioagresseurs via les résistances systémiques induites : aspects biochimiques et moléculaires.	VSC	
Thèses					
2015 - 2018	DAUMUR	Romain	Contribution à la conception de système de culture innovant pour l'ananas et le bananier en Martinique : la stimulation des défenses naturelles des plantes contre les bio-agresseurs. *Directeur : J Smith-Ravin, encadrant : A Soler*	Université Antilles	Doctorat Université
2013 - 2016	PORTAL-GONZALEZ	Nayanci	Interactions Bananier - Fusarium oxsporum f.sp. Cubense : reactions de défenses de la plante et toxines fongiques		Doctorat Université
2008-2011	RAIMBAULT	Astrid-Kim	Le brunissement interne de l'ananas (Ananas comosus (L). M) induit par un traitement au froid en post-récolte:physiopathie, mise au point d'outils moléculaires, expression de gènes et activités enzymatiques impliquées dans le catabolisme protéique. *Thèse en co-encadrement avec Mme le Prof Zuily Fodil laboratoire d'Ecophysiologie moléculaire (BIOEMCO) Université Paris-Est s'est déroulée en partie dans mon laboratoire au PRAM et en partie à Paris-Est.*	Université Paris EST	Doctorat Université
1989-1991	ASSANI	Souleimana	Influence de la composition minérale de l'ananas sur la résistance au stress de température au champ et l'expression du Jaune de l'ananas	Université d'Abidjan (Côte d'Ivoire)	Doctorat Université

Stagiaires Ingénieur/Master/DESS (6 mois)

2002	CROS	David	La prévision de récolte pour l'ananas de Martinique	INP ENSAT de Toulouse	Ingénieur Agronome
2003	FLICOTEAUX	Stéphanie	Mise en place d'une méthode simple d'extraction et de mesure de résidus de pesticides organophosphorés dans la solution du sol sous culture d'ananas et de banane en Martinique	ESITPA	Ingénieur en Agriculture
2003	DELANOE	Dany	Recherche de marqueurs biochimiques pour le criblage variétal précoce des bananiers contre les nématodes phytoparasites (Co encadrement avec IRD-PRAM)	Université de Reims	DESS Gestion des Agroressources
2003-2004	PANIER	Angela	Etude sur la relation entre la teneur en proanthocyanidines et la résistance aux nématodes de quelques cultivars de bananiers (co en cadrement IRD-PRAM)	Université de Technologie de Compiègne / Technische Universität Dresden	Master /4ème année
2004	BERTRAND	Marilyn	Le Flhoran 41 et les autres nouvelles variétés au CIRAD : essais de conservation au froid, de transformation et tests sensoriels de dégustation.	Université Paris EST	DESS 'Gestion des Systèmes Agro-Sylvo-Pastoraux en zones tropicales »
2004	FONT	Carolina	Détermination des anthocyanes dans la peau du Flhoran 41 (ananas rouge)	ENSAIA / INPLorraine	Diplôme d'Agronomie Approfondie (D.A.A.) Etudiant erasmus
2004	FERNANDEZ	Angela	Recherche de marqueurs biochimiquesassociés à la résistance aux nématodes du bananier (co en cadrement IRD-PRAM)	ENSAIA / INPLorraine	Diplôme d'Agronomie Approfondie (D.A.A.) Etudiant erasmus
2005	BERTOUT	Virginie	Mise en place d'un protocole d'analyse de polyphénoloxydases issues de la chair de l'ananas.	INA Paris-Grignon	Ingénieur Agronome
2005	SAINT-AIME	Mylène	Itinéraire technique de conservation au froid d'une nouvelle variété d'ananas Flhoran 41 destinée à la consommation en frais et à l'industrie : Essai de transformation à la SOCOMOR	ENSIA / SIARC Ecole nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires	Ingénieur de l'ENITIAA de Nantes
2006	EFAYONG	Christel	Mise au point d'un protocole d'extraction et d'analyse des polyphénoloxydases de la chair de l'ananas	ENITA de Clermont-Ferrant	Master 2
2007	GIRAUD	Audrey	Contribution à la mise en place de la démarche "Qualité;Sécurité;Environnement" pour l'activité terrain de l'équipe Agro-physiologie.	ISTOM	2nde année d'ingénieur
2008	GAUDE	Jean-marie	Evaluation de l'effet des plantes de services sur les parasites telluriques de l'ananas en Martinique	Institut National d'Horticulture et du Paysage. Anger	Ingénieur
2008	PEAN	Alexandre	Recherche de marqueurs biochimiques et moléculaires de la résistance aux nématodes chez le bananiers et l'ananas	Université Paris EST	Master 1
2009	ROMUALD	Karell	Caractérisation biochimique des enzymes liées aux réactions de défenses de l'ananas et du bananier en réponse aux stress	Université de Poitier	Master pro Sciences et Technologie
2010	CORBION	Claudine	Caractérisation de résistances systémiques induites contre les nématodes chez le bananier et l'ananas	Université Montpellier II	Master Biotechnologie des plantes tropicales

2010	SAULIA	Laryssa	Mise en évidence d'une résistance systémique induite chez l'ananas et la banane :impact sur le nématode *Rotylenchulus reniformis* de l'ananas	Université Avignon	Master 2 Gestion de la qualité des productions végétales (phytoprotection)
2010	PICARD	Soline	Etude de l'éliciteur Stifénia® dans la résistance systémique et la lutte alternative contre *Pratylenchus coffeae* sur bananiers et *Rotylenchulus reniformis* sur ananas	Institut National d'Horticulture et du Paysage. Anger	Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage
2010	CONSTANT	Jérémie	Recherche de molécules « signal » caractérisant la résistance systémique induite chez le bananier et l'ananas	Université Avignon	Master 1 Gestion de la qualité des productions végétales (phytoprotection)
2012	Nyssens Moraes Da Silva	Thiago	Le potentiel de mycorhization des sols sous culture d'ananas et de bananes en fonction des conditions agrosystémiques.Co-encadrement avec IRD au PRAM	Université de Louvain	
2012	BERIMEE	Marie-Andrée	Dynamique des populations de bioagresseurs telluriques de l'ananas	Université Antilles Guyane	Master 2 Gestion de la qualité des productions végétales (phytoprotection)
2012	DUPUIS	Jean	La gestion alternative des bioagresseurs de l'ananas : Transfert de technologie	ISTOM	Ingénieur
2013	UNEAU	Youri	Indicateurs d'impacts agro-environnementaux pour évaluer des innovations technologiques (Système de cutlture ananas)	Université de Bordeaux	Master 1
2013	DEBAUT-HENOCQ	Lila	Interaction hôte/pathogènes: modélisation de la structure du système racinaire de l'ananas et outils d'évaluation des dégats racinaires	ISA Lille	Master 2
2013	CUESTA	Marion	Mesure du potentiel de mycorhization des sols dans les systèmes ananas, bananiers et plantains	Université Paul Sabatier de Toulouse	Master 2
2015	LIME	Tanguy	Stimulation des défenses naturelles contre le nématode rotylencchulus reniormis: passage du labo au champ	Université de Montpellier	Master 2 Biodiversité végétale tropicale
2015	LAROSE	Camille	Stimulation des défenses naturelles du bananier contre Mycosphaerella fidjiensis	Ecole Ingénieur Purpan Toulouse	Ingénieur Agronome

Stagiaires niveau BTS

2005	HONORE	William	Participation à l'évaluation des potentialités des nouvelles variétés du Cirad	LEGTA Croix-Rivail	BTSA
2005	VIGNE	Francis	Contribution à la mise en place d'un itinéraire technique pour la culture de l'ananas : la lutte phytosanitaire	LEGTA Croix-Rivail	BTSA
2006-2007	BLAY	Sylvia	Utilisation et adaptation du système phastGEL pour l'étude des polyphénoloxydaxes de l'ananas.	Lycée de Bellevue	BTS Biochimie

2007	CANCORIET		Victoria	Caractérisation des ananas hybrides du CIRAD et de variétés sélectionnées: détermination du point de coupe	LEGTA Croix-Rivail	BTSA
2007	BILLARD		Aurélie	Participation à l'élaboration d'un itinéraire technique pour les deux Variétés hybrides du CIRAD en vue de leur exportation : le FLHORAN 41 et le FLHORAN 53	LEGTA Croix-Rivail	BTSA
2007-2008	PRESENT		Gaétan	Les anthocianes du bananier : comparaison des clones classiques verts et rouges et de leur réponse face aux nématodes. (HPLC)	Lycée de Bellevue	BTS Biochimie
2010-2011	MONTLOUIS-BONNAIRE		Valentine	Les anthocianes du bananier : Expression en fonction du milieu de culture et de l'inoculation des 2 principaux nématodes du bananiers (*Radopholus similis* et *Pratylenchus coffeae*). (HPLC)	Lycée de Bellevue	BTS Biochimie
2011-2012	BOLIVARD		Joan	Mise au point du dosage d'une hormone (Methyl-Jasmonate) par SPME GC/MS dans le cas d'une résistance systémique chez l'ananas et le bananier.	Lycée de Bellevue	BTS Biochimie
2014	TINTAR	Ludovic		Résistance systémique chez l'ananas contre les nématodes	LEGTA Croix-Rivail	BTS Biochimie
2015	AMANT	Aurélia		Recherche de marqueurs enzymatiques indiquant la stimulation des défenses naturelles chez l'ananas	Lycée de Bellevue	BTS Bio-analyses et contrôles

Formations dispensées	Lieu	Type de formation	
1979-1980	République Dominicaine	Enseignement Nématologie niveau 'Ingénieur agronome' Université Autonome de Santo Domingo	
1994-2000	Afrique de l'Ouest et du Centre	Formations professionnelles de 'formateurs' au travers de l'organisation de séminaires et ateliers régionaux	
2000-2001	Trinidad & Tobago IICA	Formation techniciens Ministère de l'Agriculture et Producteurs: Transferts de technologie et Organisation ateliers et workshop régional sur les pratiques culturales de l'ananas, la qualité post-récolte, le management des exploitations	
2001	La Dominique	Formation techniciens Ministère de l'Agriculture et Producteurs: Transferts de technologie	
2004 - 2006	Martinique : SOCOMOR (OP ananas)	Participation aux formations producteurs organisées par la Socomor, OP producteurs Ananas de Martinique	
2005	Martinique : Projet FEADER	2005 : formation des techniciens et de producteurs sur le diagnostic parcellaire et l'utilisation du logiciel de gestion / traçabilité;Utilisation du logiciel CIRAD Martananas	
2009	Chine au SSCRI du CATAS (Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences)	Formation de 40 jeunes chercheurs chinois sur invitation du Directeur du SSCRI du CATAS Prof Sun Guang-Ming (Guangdong).	
2015	UA Martinique	Cursus LP Métiers des Bitotechnologies Végétales	

Accueils Chercheurs du Sud

2012, 2013, 2015 et 2016	N Portal Gonzalez	Bactéries endophytes ananas, bananiers et plantains. Determination groupes fonctionnels micro-organismes par profiles lipides membranaires. Analyses par RTqPCR expression génique liée aux interactions plantes/pathogène et resistances systémiques.	Université Ciego de Avila (Cuba)
2013, 2014 et 2015	R Gonzalez Rodriguez	Bactéries endophytes ananas, bananiers et plantains. Isolement Phytophtora, traitement stimulation des ISR par bactéries endophytes sur ananas et bananiers.	Centro Bioplantas (Cuba)
2014	E Amari	*Mycosphaerella fijiensis* et toxine : Induction résistances systémiques sur bananier	Université Houphouet Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire)

Annexe 6

Diapositives présentées lors de la soutenance

(Le mémoire HDR et la présentation Powerpoint sont complémentaires)

Université des Antilles

Soutenance pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches

Alain SOLER
(Juin 2016)

Jury

Mme Juliette SMITH-RAVIN (UA, Pôle Martinique)
M Daniel IMBERT (UA, Pôle Guadeloupe)
M Didier M'BEGUIE (CIRAD Guadeloupe)
M Thierry WOIGNIER (CNRS/IRD Martinique)
M Harry OZIER-LAFONTAINE (INRA Antilles)
M Christophe ROOS (UA, Pôle Martinique)

Rapporteurs

M Amadou BA (UA, Pôle Guadeloupe)
M Didier M'BEGUIE (CIRAD Guadeloupe)
M Jean ROGER-ESTRADE (AgroParisTech)

Bref historique de carrière

Ø **Responsable du Laboratoire 'Agrophysio' au CIRAD Martinique depuis 2000**

- *Docteur en Physiologie végétale de l'Université Montpellier II (1991)*
- *Ingénieur Agronome Paris-Grignon (P75)*

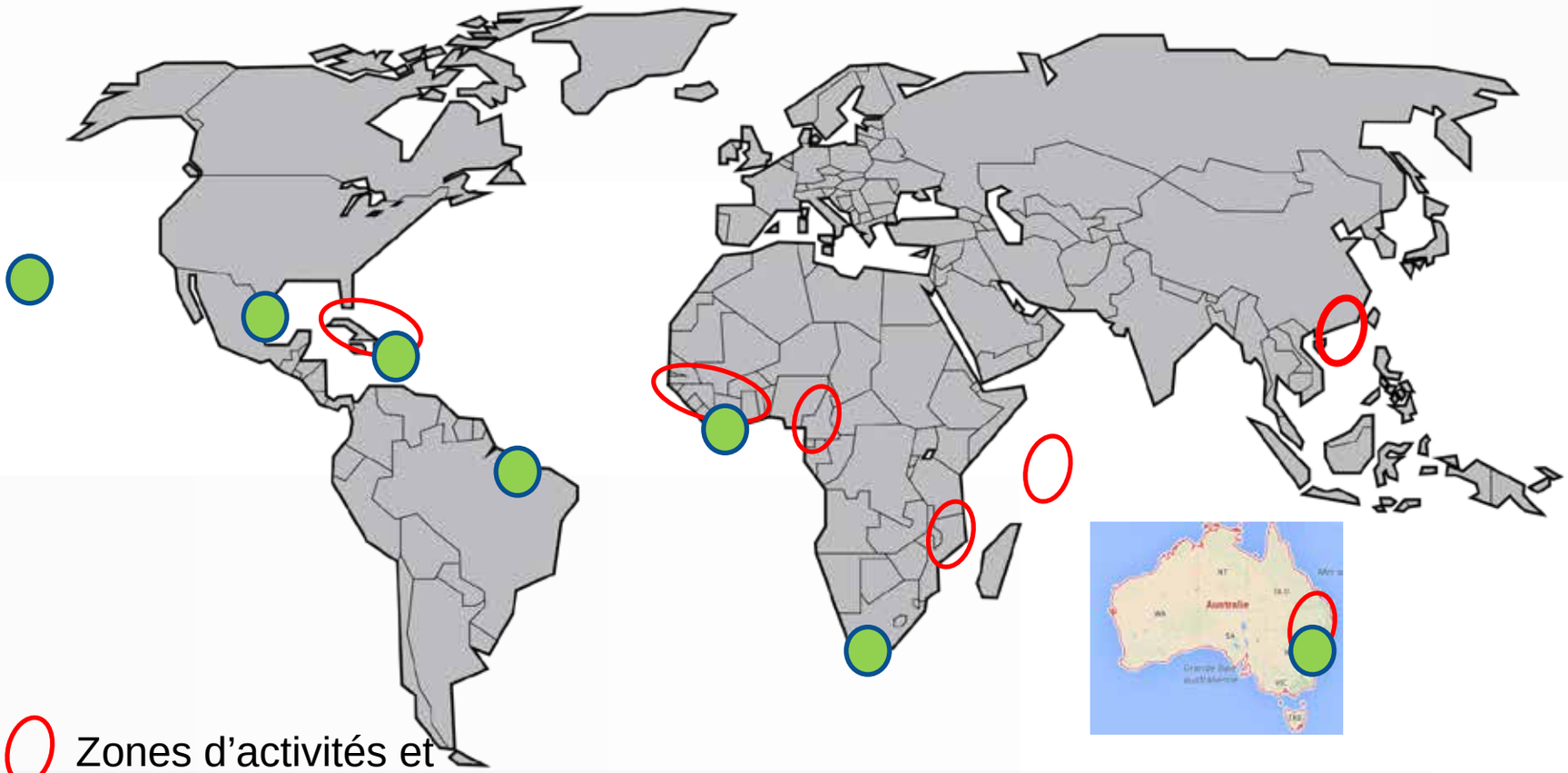
Ø **Vingt ans en Afrique, en station de recherche puis en projets de développement.**

- *Côte d'Ivoire, Station de Recherche Anguédédou (1981 – 1991): Post-récolte, Régulateurs de croissance, Maladie physiologique de l'ananas (stress abiotique)= thèse (maturation et sénescence de l'ananas)*

- *Ghana puis Bénin (1994-2000): Responsable Projet national Ghana (Banque Mondiale) puis Chef du Projet (freelance) régional européen Afrique Ouest et Centre: Appui aux organisations de producteurs ananas , techniques de production, contrôles qualité port-aéroport… Accompagner la croissance de la filière export de13000T à 40000T au Ghana puis développer à l'échelle régionale ce qui avait été fait au Ghana.*

Ø **CAEC Martinique : Quinze ans de collaboration dans la Caraïbe.**

- *Thématique actuelle: systèmes de culture respectueux de l'environnement (gestion alternative des bioagresseurs avec plantes de services et la stimulation des défenses naturelles –résistances systémiques).*
- *Plateforme analytique (biochimie-physiologie, analyses pesticides dont chlordécone…)*
- *Encadrement thèses (3), Master et Ingénieur (26), BTS (10)*



Zones d’activités et d’expertise

Congrès Ananas

Plantation d’ananas sur la Montagne Pelée

Cette photo est pratiquement devenu un témoignage de l’histoire récente mais révolue de la production d’ananas en Martinique !

Plantation d’ananas sur la Montagne Pelée

Contexte filière ananas

- **Filière fortement affaiblie depuis la disparition des aides de l'Europe et l'interdiction de la plupart des pesticides**

- **Monoculture intensive = diminution de la biodiversité**
  - **Gestion bioagresseurs avec usage intensif des pesticides**
  - **Disparition des régulations naturelles entre populations micro-organismes,**
  - **Perte des qualités biophysiques du sol**

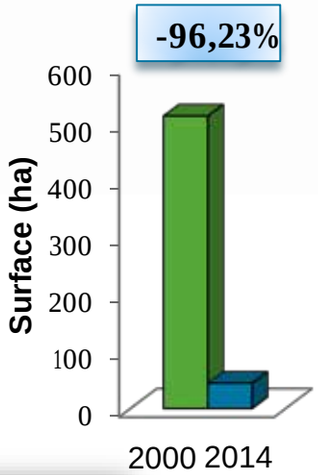
- **Pression sociétale pour une meilleure gestion des risques environnementaux dans des milieux insulaires fragiles et des risques de santé publique : pollution par la chlordécone, disparition de l'usage des pesticides dangereux**

  (= gestion classique des parasites impossible)

- **Contexte biologique : Quatre parasites pour l'ananas chacun capable de réduire à néant les efforts de production.**

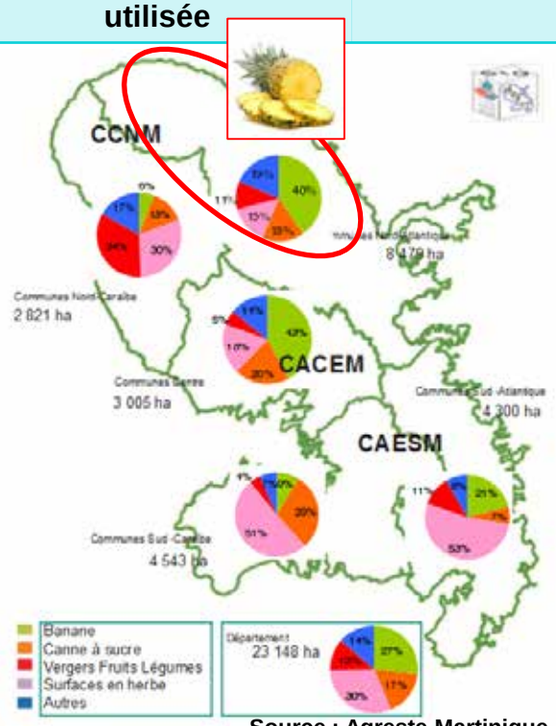
L’ananas et la banane à la Martinique

- **Chute de production de 17000T à quelques centaines de Tonnes**



- **Disparition de l’usine de transformation (*SOCOMOR)***

2014 (ODEADOM)	Ananas	Banane
Surface (ha)	92	9446
Production (tonnes)	650	266792
Surface agricole utilisée	0.40%	40,81%



Source : Agreste Martinique

Contexte filière ananas

Ø **Filière fortement affaiblie depuis la disparition des appuis de l'Europe**

- **Disparition de l'usine de transformation** *(17000T à quelques centaines de T)*
- **Tentative de reconversion variétale pour la production en frais** *(cv MD2)*

Ø **Monoculture intensive = Gestion bioagresseurs avec usage intensif des pesticides**

- **Diminution de la biodiversité**
- **Disparition des régulations naturelles entre populations micro-organismes,**
- **Perte des qualités biophysiques du sol**

Ø **Pression sociétale pour une meilleure gestion des risques environnementaux dans des milieux insulaires fragiles et des risques de santé publique** :

pollution par la chlordécone,

disparition de l'usage des pesticides dangereux

(= gestion classique des parasites impossible)

Ø **Contexte biologique : Quatre parasites pour l'ananas chacun capable de réduire à néant les efforts de production.**

Contexte filière ananas

Ø **Filière fortement affaiblie depuis la disparition des appuis de l'Europe**

- **Disparition de l'usine de transformation** *(17000T à quelques centaines de T)*
- **Tentative de reconversion variétale pour la production en frais** *(cv MD2)*

Ø **Monoculture intensive = diminution de la biodiversité**

- **Gestion bioagresseurs avec usage intensif des pesticides**
- **Disparition des régulations naturelles entre populations micro-organismes,**
- **Perte des qualités biophysiques du sol**

Ø **Pression sociétale pour une meilleure gestion des risques environnementaux dans des milieux insulaires fragiles et des risques de santé publique** :

- **Pollution par la chlordécone**
- **Disparition des pesticides** *(= gestion classique des parasites impossible)*

Ø **Contexte biologique : Quatre parasites pour l'ananas chacun capable de réduire à néant les efforts de production.**

Contexte filière ananas

Ø **Filière fortement affaiblie depuis la disparition des appuis de l'Europe**

- **Disparition de l'usine de transformation** *(17000T à quelques centaines de T)*
- **Tentative de reconversion variétale pour la production en frais** *(cv MD2)*

Ø **Monoculture intensive = diminution de la biodiversité**

- **Gestion bioagresseurs avec usage intensif des pesticides**
- **Disparition des régulations naturelles entre populations micro-organismes,**
- **Perte des qualités biophysiques du sol**

Ø **Pression sociétale pour une meilleure gestion des risques environnementaux dans des milieux insulaires fragiles et des risques de santé publique** :

pollution par la chlordécone,

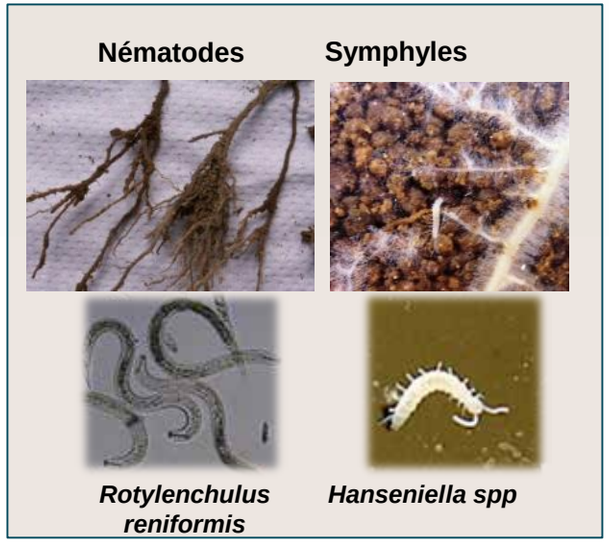
disparition de l'usage des pesticides dangereux

(= gestion classique des parasites impossible)

Ø **Contexte biologique : Quatre parasites principaux pour l'ananas, chacun capable de réduire à néant les efforts de production. Pas de pause hivernale.**

Contexte biologique : complexe parasitaire de l'ananas

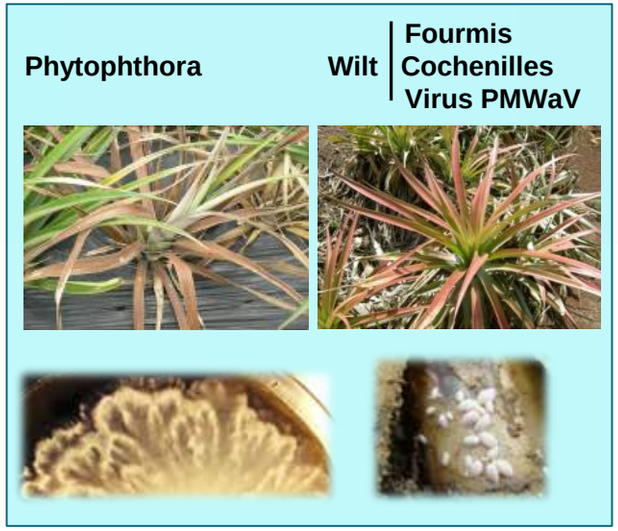
1 - Parasites telluriques



- Très polyphages.
- 2 Populations de type aggrégé, en competition pour la même ressource alimentaire.

- Cycle reproduction : 1 mois.
- Formes de résistance (nématodes).
- Capacité à survivre en se déplaçant en profondeur et en se nourissant sur la MO morte (symphyles).

2 - Parasites de surface



- Très nombreux végétaux 'hôtes'.
- Phytophthora : Dissémination par l'eau et les outils contaminés, Certaines variétés d'ananas très sensibles (MD2).

- Wilt : Association Virus/Cochenilles & Dissémination très rapide par les fourmis.

.

Mesures prophylactiques possibles

Besoin urgent de répondre à l'attente des producteurs

Conception de Systèmes de Culture innovants *sans pesticides*

Objectif principal : Gestion intégrée des bioagresseurs plus écologique et durable.

Une Stratégie de bioprotection s'appuyant sur deux thématiques

Ø **Concevoir des systèmes de culture multi-espèces** pour restaurer des fonctions écosystémiques importantes en s'appuyant sur les traits fonctionnels de plantes de services.

Ø Stimuler les défenses naturelles des plantes (résistances systémiques) avec des variétés capables d'adapter leur métabolisme aux stress.

Le système multi-espèces constitue une base agroécologique indispensable pour l'expression des défenses naturelles efficaces.

Conception de Systèmes de Culture innovants *sans pesticides*

Gestion alternative des bioagresseurs
en conditions d'intensification écologique

Ø Concevoir des systèmes de culture multi-espèces en utilisant des plantes de services (PdS) & Rotation/Association

Ø Stimulation des résistances systémiques de l'ananas

Screening préliminaire des plantes de services de la collection CIRAD pour le contrôle des deux bioagresseurs telluriques

- **Recherche des espèces mauvaises hôtes des Symphyles**
  (Piégeage des symphyles par la méthode 'Bait & Trap' , Soler et al 2011)

- **Recherche des espèces qui sont a priori mauvaises hôtes de *R reniformis***
  (sur la base du fonds documentaire disponible)

Sélection préliminaire de Plantes de Services

Crotalaria spectabilis

Crotalaria retusa

Crotalaria juncea

Paspalum wettsteneii

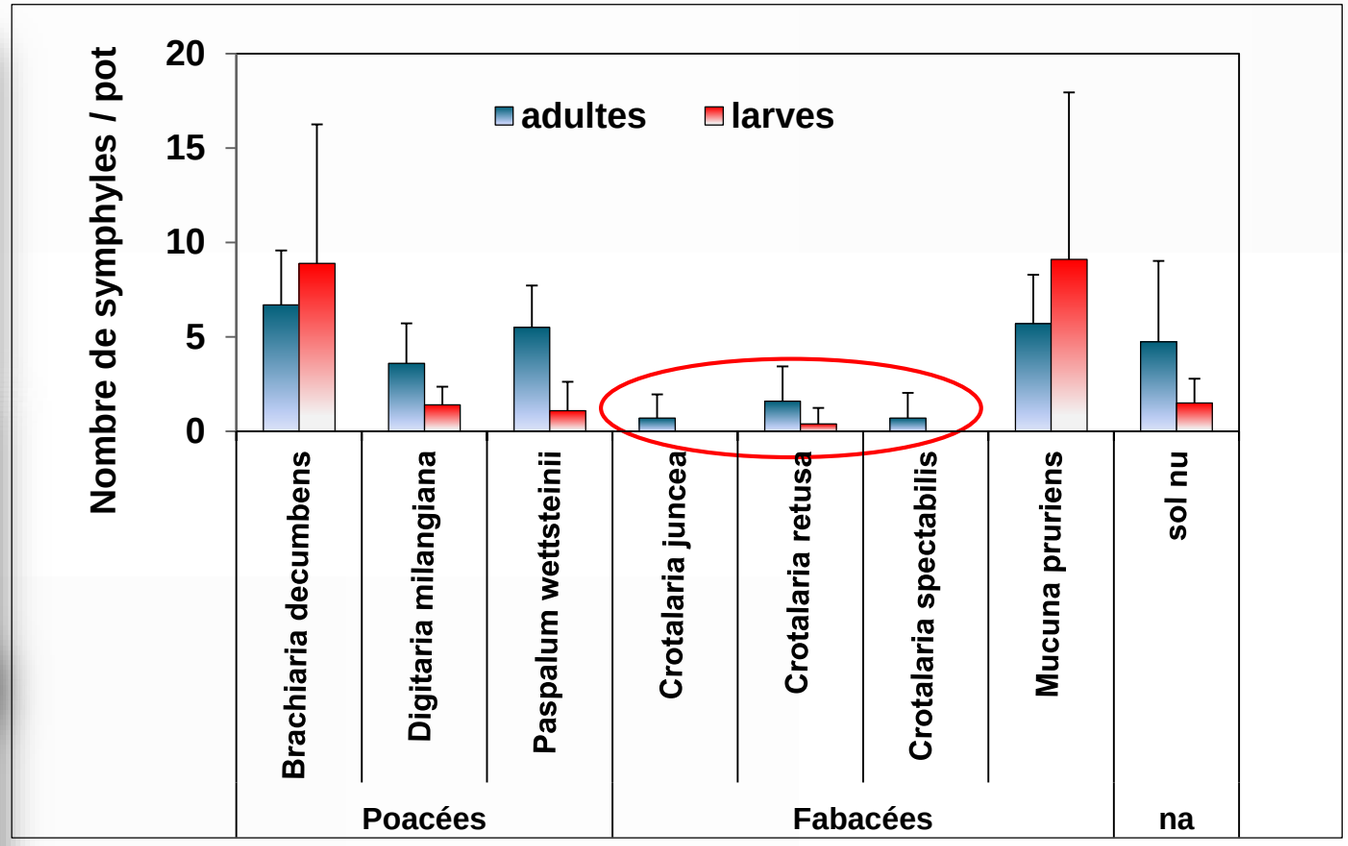
Centrosema pascuorum

Brachiaria decumbens

Pueraria phaseolides

Stylosanthes guayanensis

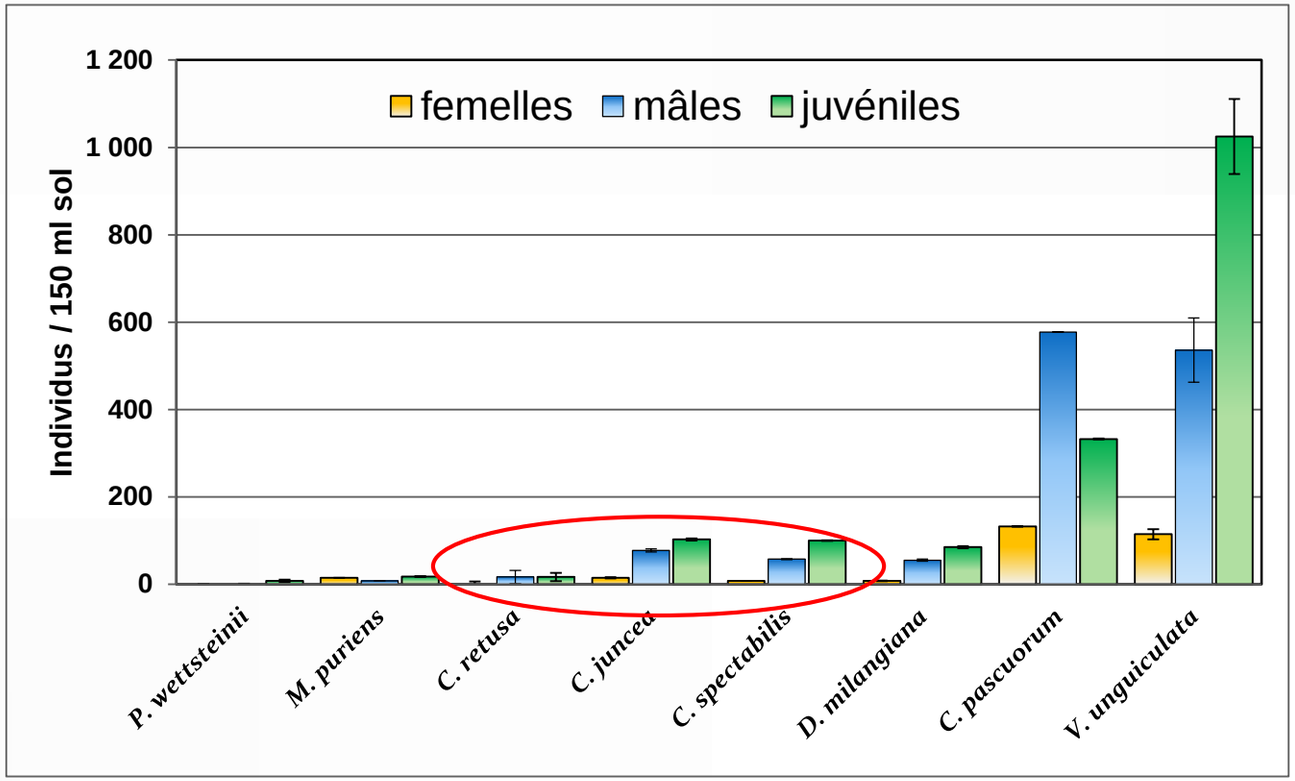
Potentiel de contrôle des symphyles par les plantes de services



En Chambre de culture, les plantes sont inoculées avec 10 symphyles issus de piégeage massif et gardés en élevage.

L'évolution des populations est évaluée 2 mois après inoculation.

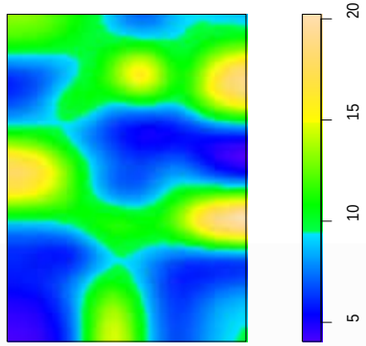
Potentiel de contrôle de *R reniformis* par les plantes de services

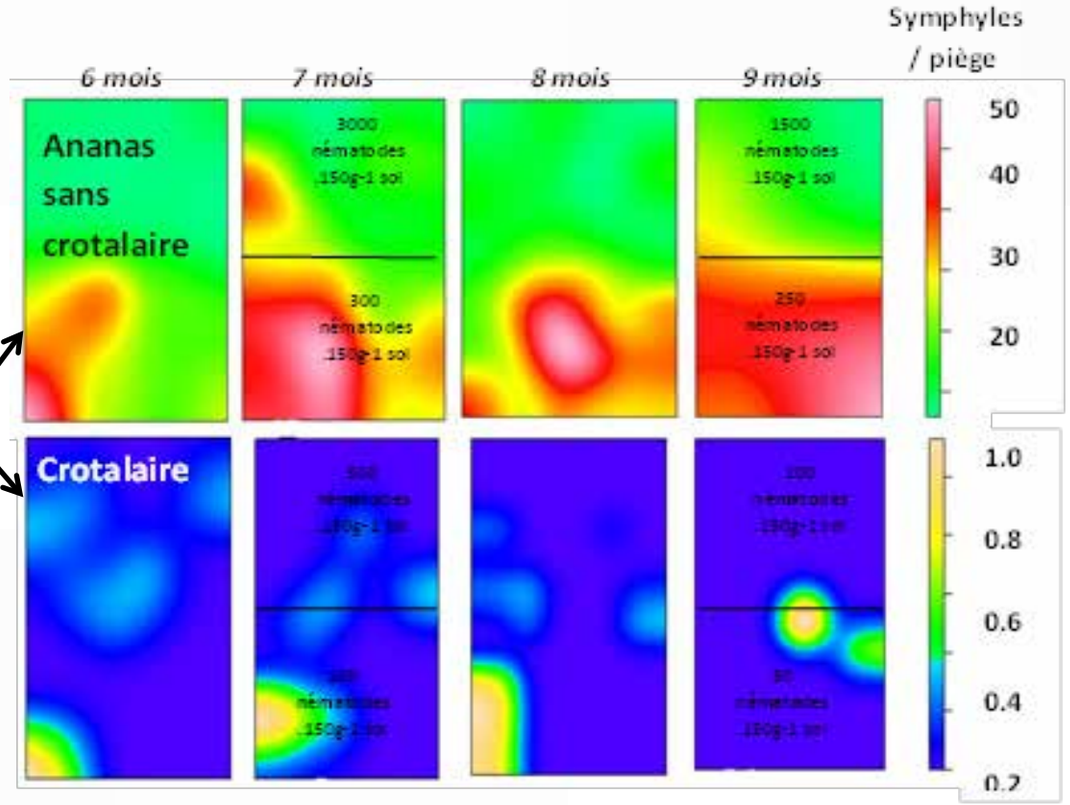


Chambre de culture, 150 ml pots, Inoculation de 4000 nématodes d'une population mono-spécifique élevée sur *Vigna unguiculata* (hôte ref). Elutriation 45 jours après inoculation.
Populations sur Vigna divisées par 10.

Contrôle au champ des symphyles et des nématodes par les crotalaires

Infestation à la plantation





A 6 mois la parcelle d'ananas est déjà fortement infestée, à 9 mois elle l'est totalement. Dans le même temps la crotalaire a réduit et maintenu même après le dessèchement des plantes un niveau très faible des populations de parasites.

Utilisation des PdS dans une rotation en parcelles expérimentales

Crotalaria retusa / Ananas / Jachère spontanée / Aubergine

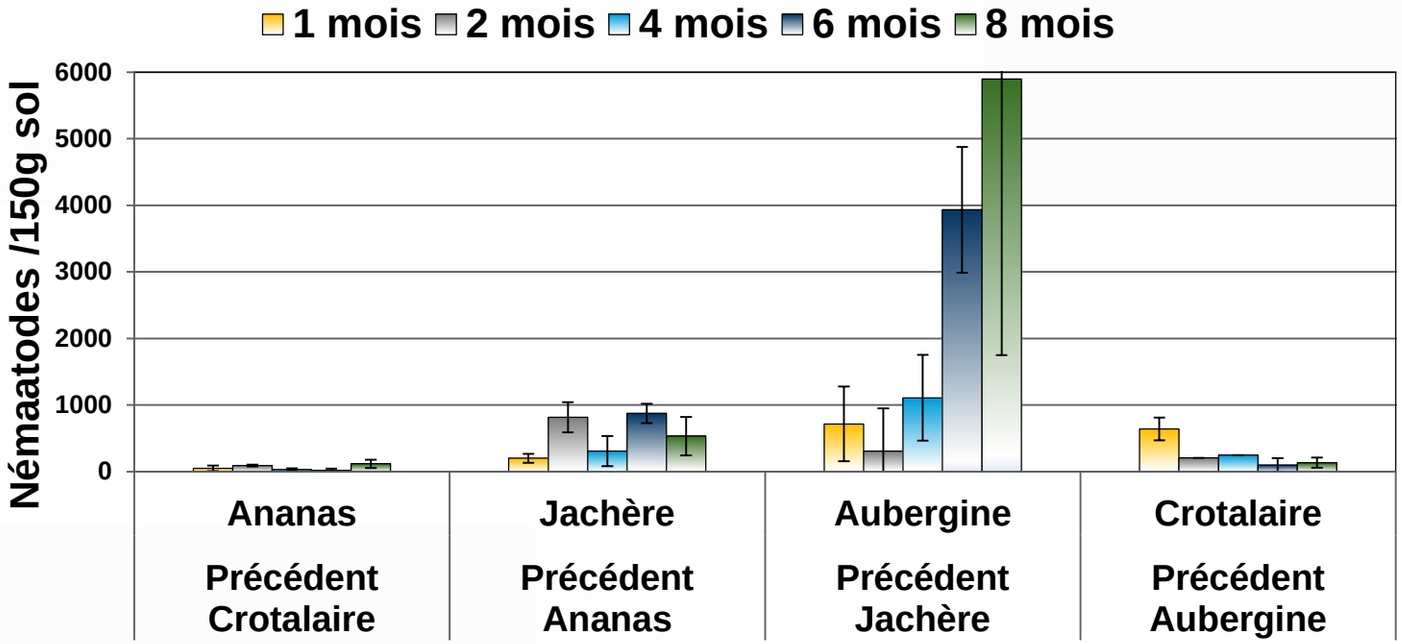
Aubergines

Crotalaria retusa

Ananas

Jachère Spontanée

Les populations de nématodes dans la rotation avec *Crotalaria retusa*



Ø Sur ananas après crotalaire les populations de nématodes sont restées très basses jusqu'au TIF (8-9 mois).

Ø Jachère crotalaire >>>> Jachère spontanée

La Jachère naturelle a maintenu des populations de nématodes non négligeables, sous Aubergines elles ont augmenté, mais ensuite sous *C. retusa* elles ont re diminué fortement.

Statut d'hôte vis-à-vis de *R. reniformis* de la flore adventices ou en jachère spontanée ou sous ananas *(SdC intensif)*

Nombre d'espèces	*Jsp courte	Jsp longue	Ananas
Hôte	10	5	22
H/NH **	7	5	4
Non Hôte	2	2	3
ND	5	10	76
Total espèces	24	22	105

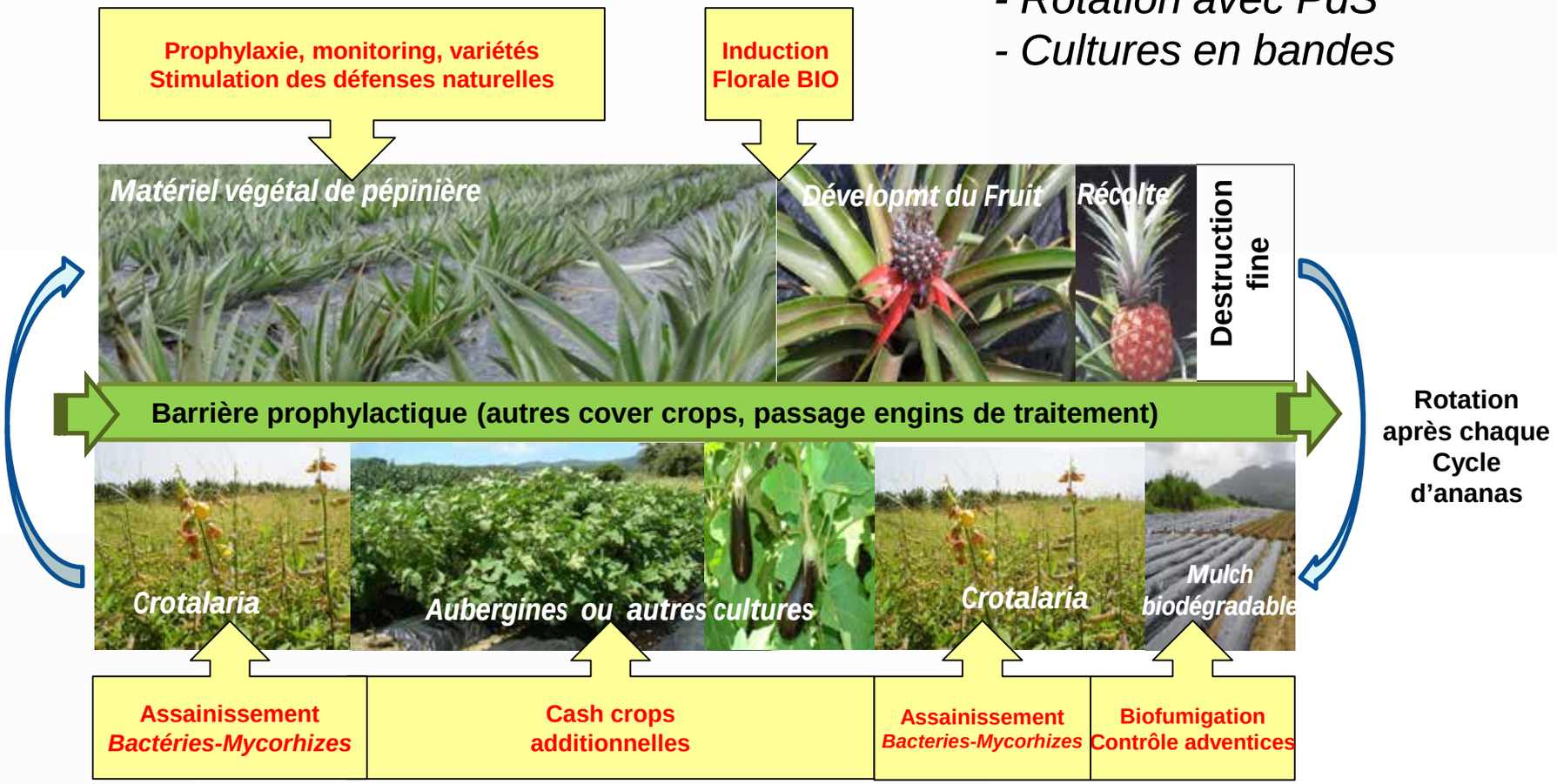
Observations faites sur la base d'une étude floristique de parcelles individuelles.
Jsp = Jachère spontanée. Statut incertain hôte ou non hôte suivant les auteurs.*

- Efficacité de la jachère contrôlée vs jachère spontanée sans doute lié à la présence de nombreuses espèces hôtes de *R reniformis*.

- Importance du contrôle des adventices (PdS : technique alternative aux herbicides pendant la culture ?)

Prototype de SdC pour une unité de production intégrée

- *Rotation avec PdS*
- *Cultures en bandes*



Une 'unité de production' = 2 parcelles synchronisées, l'une ananas l'autre Crotalaire – Aubergine. Puis alternance sur les 2 mêmes parcelles sans transfert de matériel végétal vers d'autres parcelles.

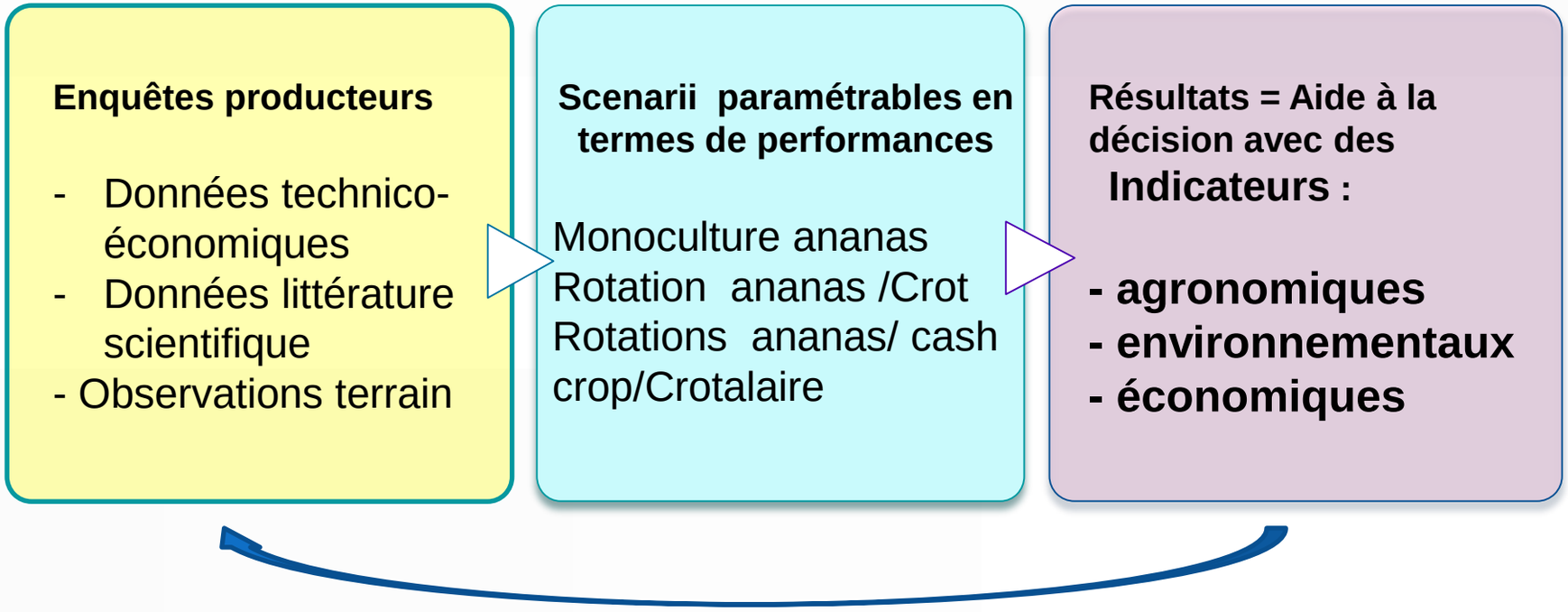
Systèmes de rotation proposés par les producteurs

Rotation & parcelles synchronisées
(la biodiversité introduite dans le système a permis d'éviter tout traitement sur aubergine mouches blanches, thrips, acariens, punaises)

Unités de production à 2 ou 3 cultures en bandes

Pb : Transfert de l'innovation technique difficile à cause du Phytophthora et Wilt/Cochenilles (mauvaise maîtrise de la prohylaxie)

Modèle d'évaluation des performances agro-économiques et environnementales



Processus itératif

- **Évolution de l'innovation technique**
- **Nouveau questionnement scientifique**

Transfert des innovations techniques via les RITA niveau régional et national (inter DOM)

RITA MARTINIQUE
Réseau d'innovation et de transfert agricole

Date publication Décembre 2012 | Pages : 2

Version 1

Objet : Le Traitement d'Induction Florale Bio (TIF Bio)

Il existe plusieurs méthoc
récoltes.

- **L'Ethrel** (M.A éth
  françaises, en rai

RITA MARTINIQUE
Réseau d'innovation et de transfert agricole

Date publication Décembre 2012 | Pages : 2

Version 1

Objet : Fiche agronomique *Crotalaria spectabilis* en culture d'ananas

GENERALITES

Classification et dénom

Famille : Fabacées

Espèce : spectabilis

Fiche agronomique

Crotalaria spectabilis en culture d'ananas

Date de publication : décembre 2012 — Version 1

RITA MARTINIQUE
Réseau d'innovation et de transfert agricole

Généralités

Classification et dénominations Origine

Conception de Systèmes de Culture multi- espèces

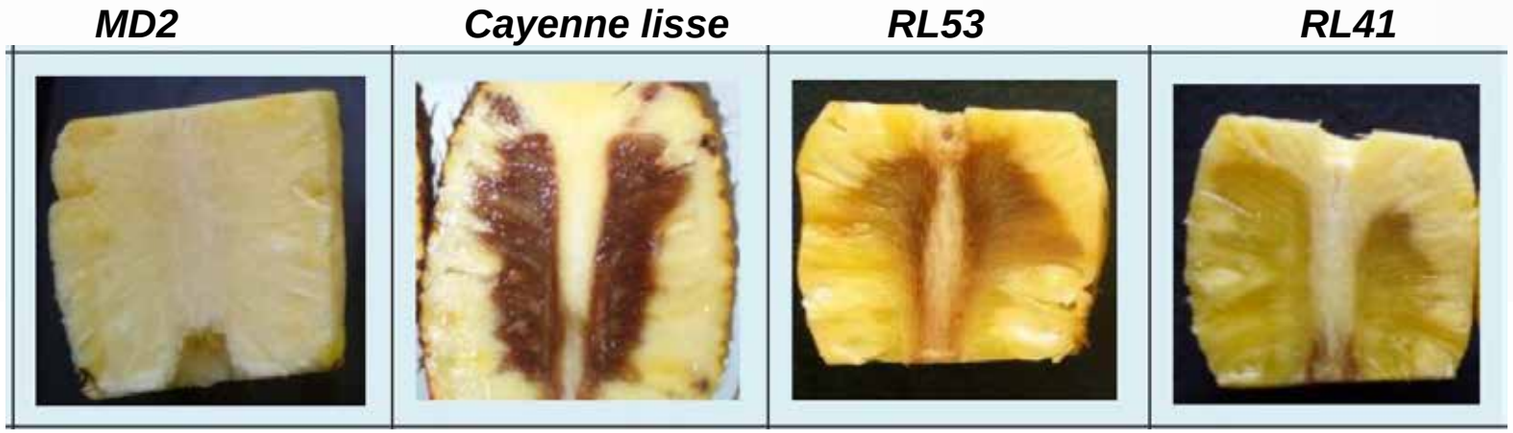
sans pesticides

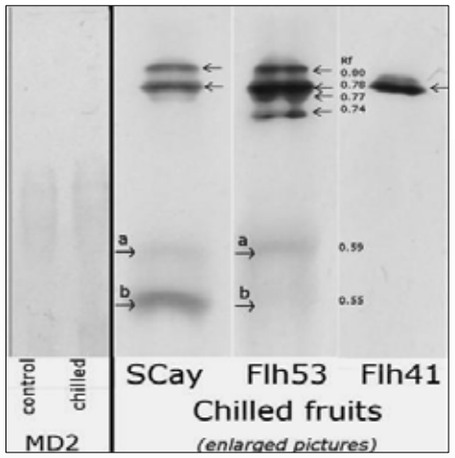
Gestion alternative des bioagresseurs
en conditions d'intensification écologique

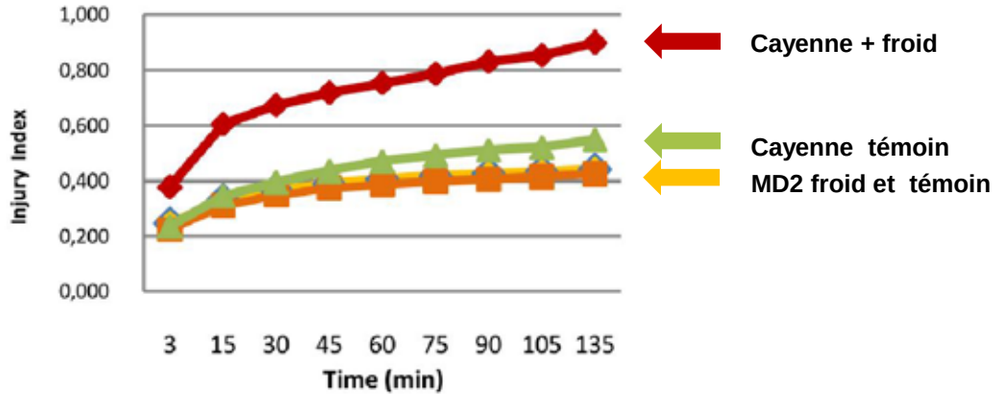
Ø Concevoir des systèmes de culture multi-espèces en utilisant des plantes de services (PdS) & Rotation/Association

Ø Stimulation des résistances systémiques de l'ananas et tolérance aux stress.

Brunissement interne de l'ananas induit par un stress de froid







Isoformes de Polyphenol oxydases

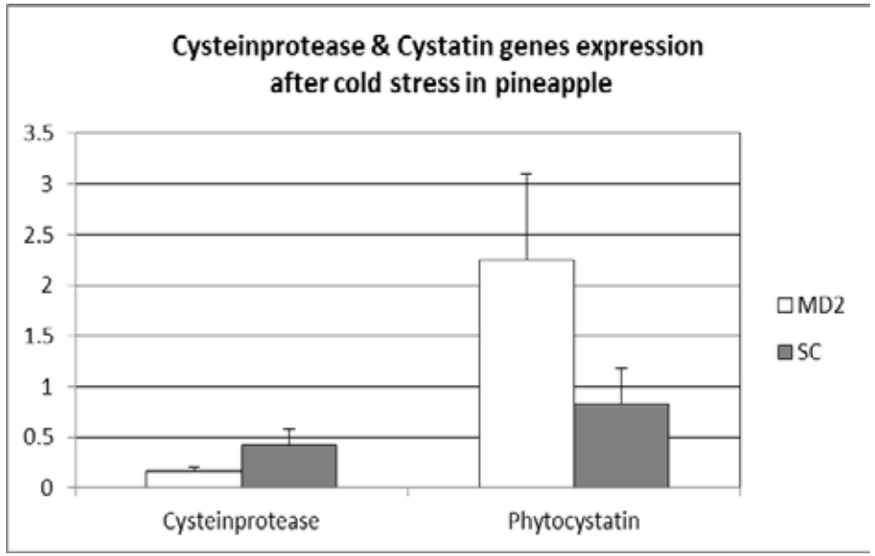
Relargage d'électrolytes cellulaires en milieu isotonique

Collaboration avec Université Paris Est (UMR BIOEMCO) thèse Raimbault 2011.

Des marqueurs de tolérance variétale aux stress abiotiques

- **Cystéine protéase** *(serait liée au turnover des protéines)*
- **Cystatine** *(inhibiteur naturel de la cystéine protéase)*
- *Ac aspartique protéase* *(liée à l'activation des protéines enzymatiques stockées)*

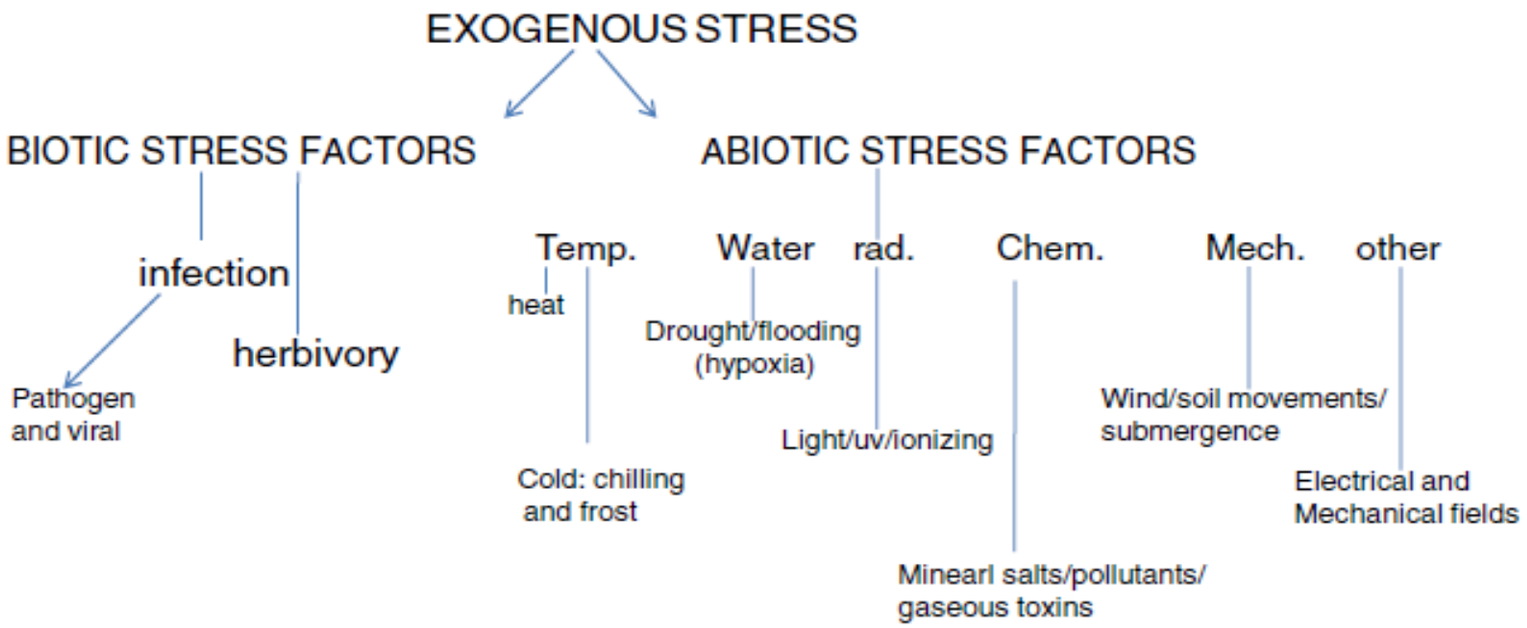
Une variété tolérante voit en cas de stress l'activité de la cystéine protéase doublement réduite : expression réduite de la protéase elle-même et expression augmentée de son inhibiteur.



Expression différentiée des gènes de la cystéine protéase (Broméline)
et de la cystatine (AcCYS1) après stress de froid chez Cayenne lisse (SC) et MD-2.
(évaluée par RTqPCR)

Collaboration avec Université Paris Est (UMR BIOEMCO) thèse Raimbault 2011.

Les stress et les plantes dans leur habitat



Choudhary et al 2012

- L'état naturel d'une plante dans son milieu, c'est d'être stressée.
- Dans un Ecosystème, la maladie serait plutôt l'exception mais pas dans un Agrosystème.
- Les plantes ont développé des moyens de défenses contre les stress et les maladies.

Trois Clés de ces systèmes de défense

Ø **Reconnaissance** (récepteurs membranaires)

Des récepteurs similaires chez tous les eucaryotes: **Immunités innées.**

Ø **Résistances Systémiques**

Signalisation dans toute la plante – 2 voies :

- **SAR** (ac salicylique) *interaction avec pathogènes*
- **ISR** (ac jasmonique) *interaction avec non pathogènes*

Ø **Priming**

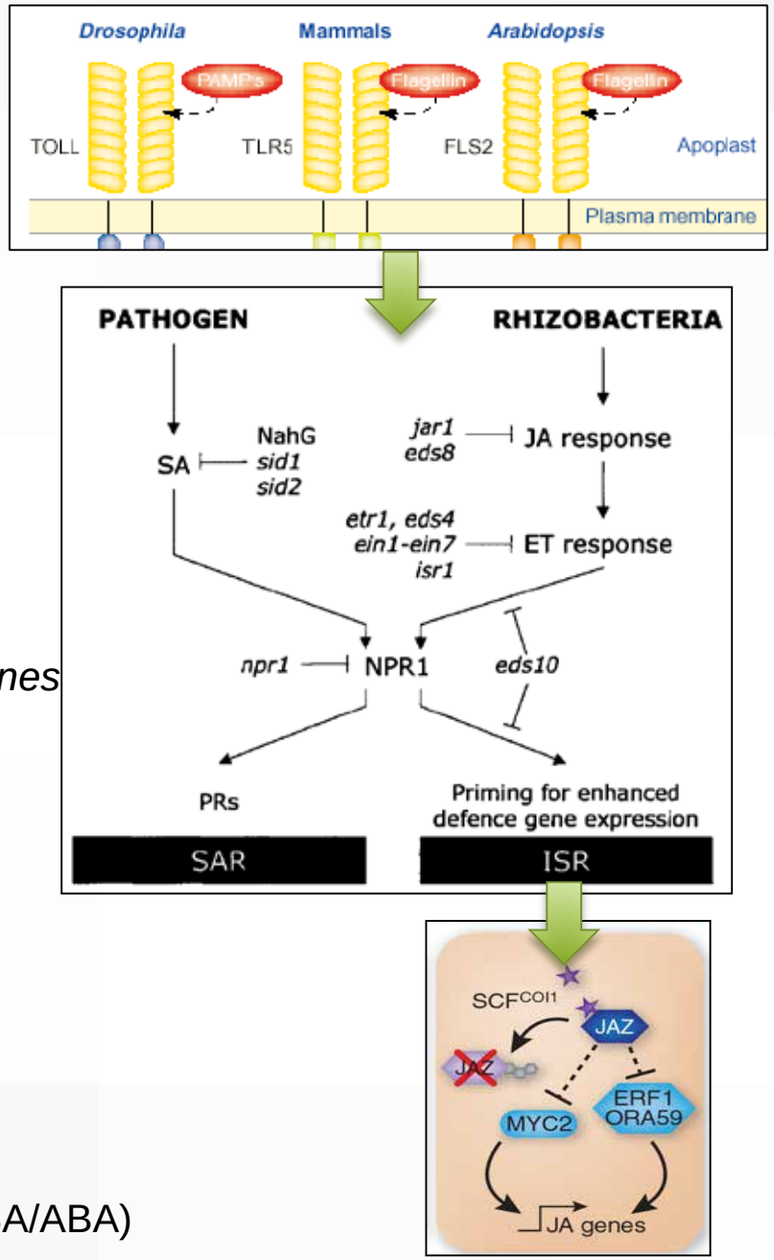
Sensibilisation du système 'immunitaire'

Deux vagues de réactions de défense:

1) quelques heures, jours
2) plusieurs mois à trans-générationnel

Réactions liées aux ROS et Hormones

(Stress oxydatif + interactions Hormonales JA/SA/ABA)



Trois Clés de ces systèmes de défense

Ø **Reconnaissance** (récepteurs membranaires)

Des récepteurs similaires chez tous les eucaryotes: **Immunités innées.**

Ø **Résistances Systémiques**

Signalisation dans toute la plante – 2 voies :

- **SAR** (ac salicylique) *interaction avec pathogènes*
- **ISR** (ac jasmonique) *interaction avec non pathogènes*

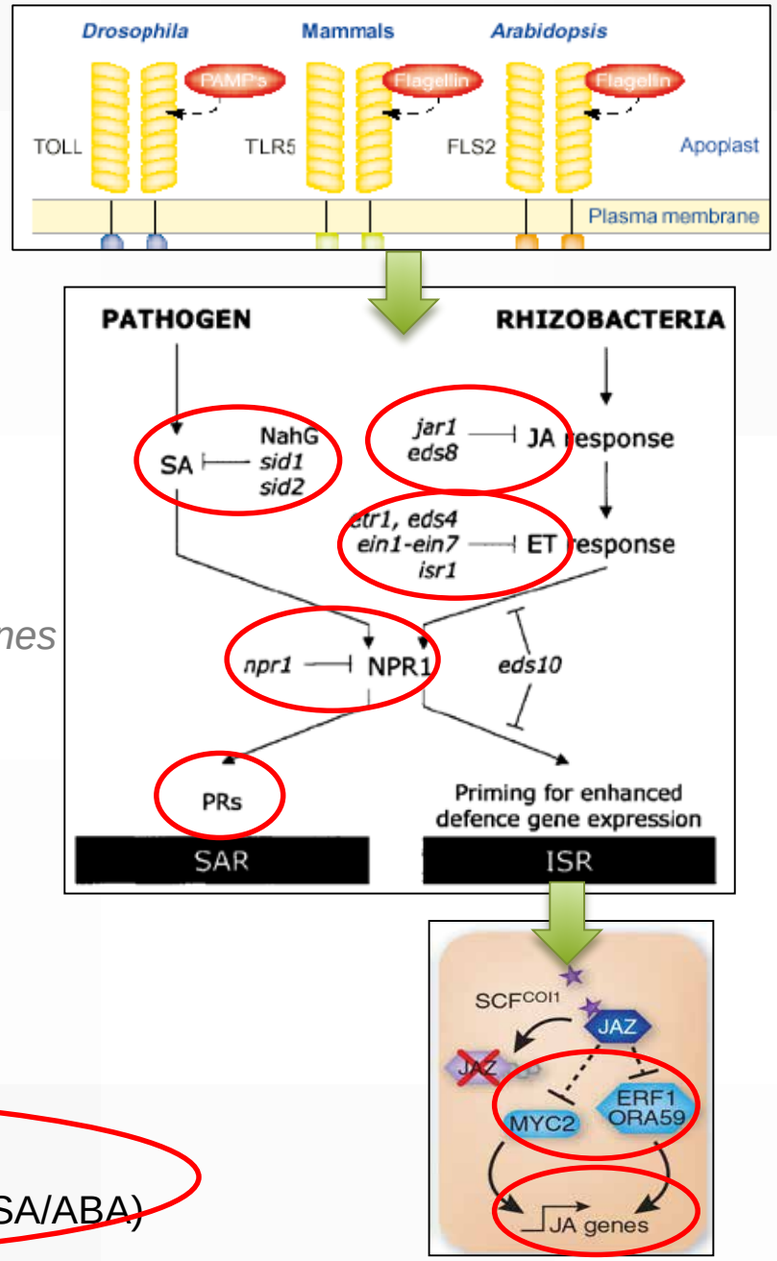
Ø **Priming**

Sensibilisation du système 'immunitaire'

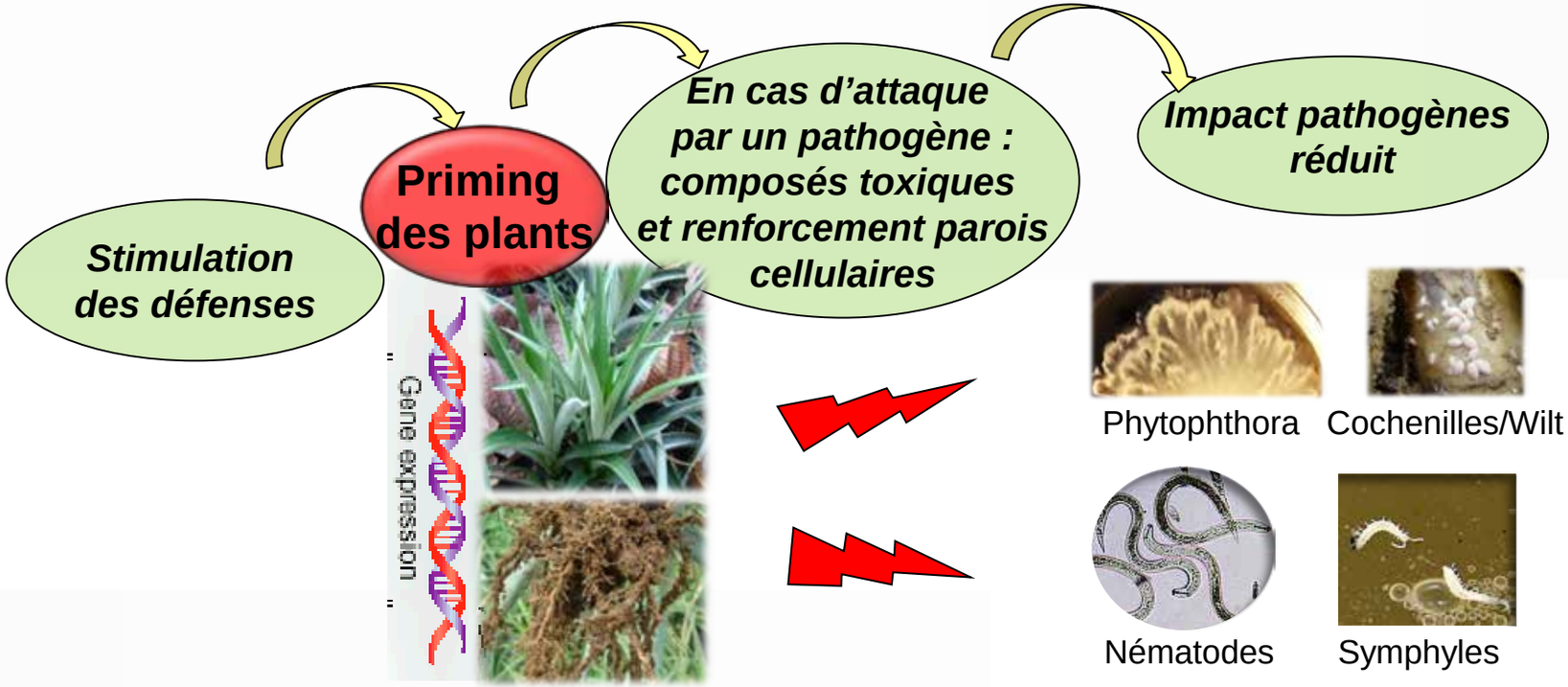
Deux vagues de réactions de défense:

1) quelques heures, jours
2) plusieurs mois à trans-générationnel

Réactions liées aux ROS et Hormones
(Stress oxydatif + interactions Hormonales JA/SA/ABA)



Stimulation des défenses naturelles



Comment la caractériser et la mettre en oeuvre?

- Identifier quelles variétés sont stimulables.
- Evaluer l'efficacité des ISR en cas d'impact multi-stress.

- Stimulation artificielle : éliciteurs chimiques ou bactéries et/ou mycorhizes.
- Stimulation naturelle : Favoriser les populations de micro-organismes bénéfiques dans le sol, (mycorhization & bactéries avec les PdS).

Partenaires : UMR LSTM, IRD, UAG, Univ. Paris Créteil (Bioemco) & Unica Cuba

Caractérisation des résistances systémiques de l'ananas contre *R reniformis* par éliciteurs chimiques sur MD-2

Stimulation
T0

1h *2h* *4h* *10h*

Marqueurs Moléculaires Biochimiques

Inoculation
Nématodes
+ 8 jours

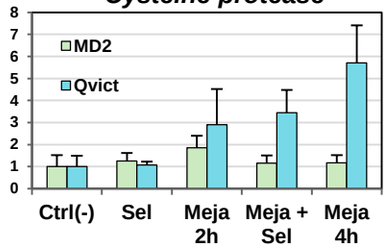
Marqueurs Biochimiques

Effets Biologiques

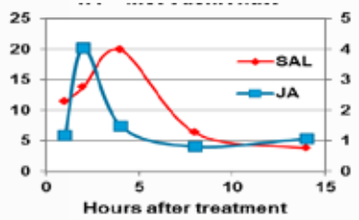
Mise en place du Priming

1h : Régulation des gènes de défenses

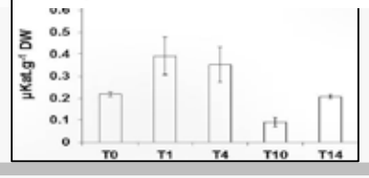
Cystéine protéase



1-2h : Mobilisation d'hormones des voies de signalisation



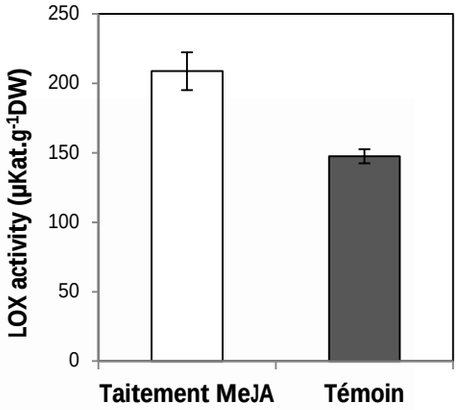
1-10h : Enzymes de stress oxydatif initial (ex: LOX)



18j : Effet Priming

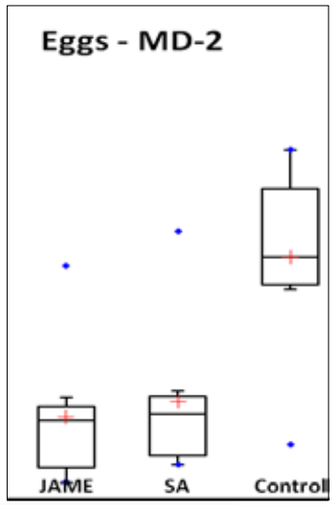
Défenses plus rapides et plus fortes

Activité LOX sur racines d'ananas

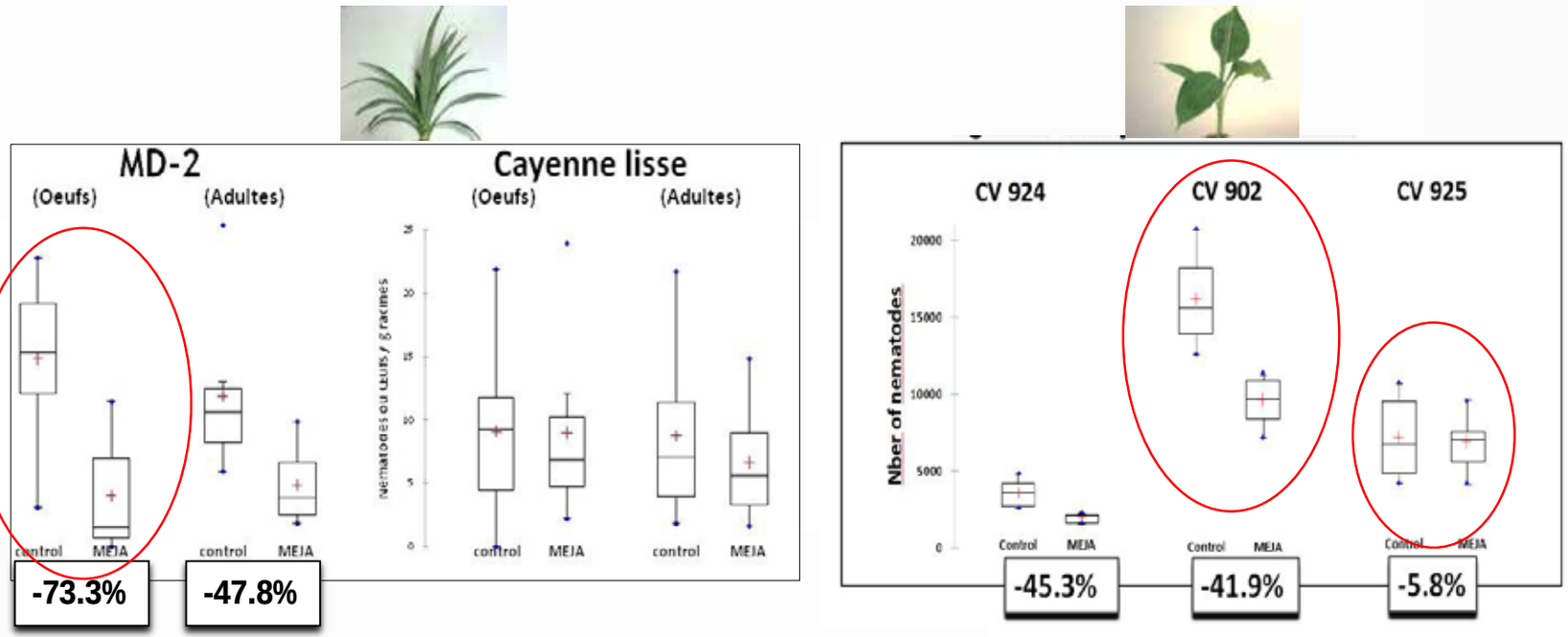


60j : Réduction de la fécondité du parasite

& le développement des racines



Effet biologique : Réduction de la fécondité des populations de *R reniformis* sur ananas et de *P coffeae* sur bananier

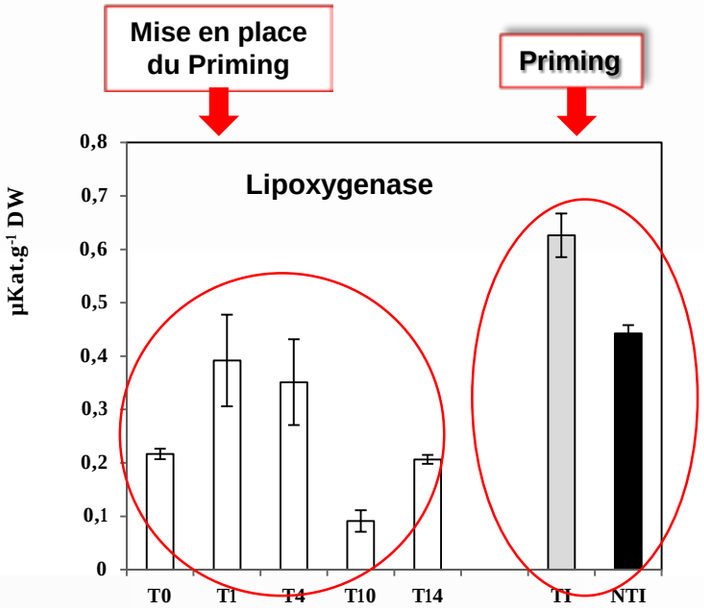


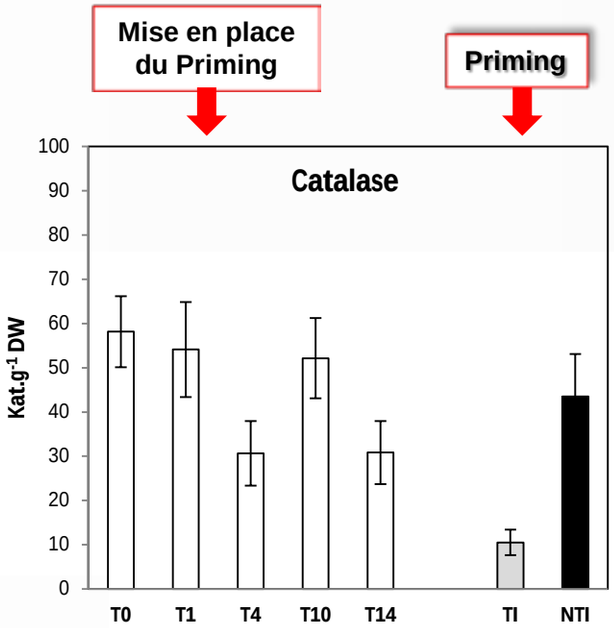
Densité de nématodes (*R reniformis*, adultes et œufs sur ananas et *P coffeae*, juvéniles, sur bananier) 60 jours après inoculation sur des plants pré-traités ou non avec du méthyl-jasmonate (10^{-4} M).

Les inocula monospécifiques de Rotylenchulus reniformis (4000 nématodes) et de Pratylenchus coffeae (400 nématodes), respectivement pour ananas et bananier, ont été appliqués après élicitation au méthyl-jasmonate 10^{-4}M ; l'augmentation des populations a été évaluée 2 mois après.

Partenaires : IRD Martinique (lab Nématologie)

Effets biochimiques sur MD-2 : Stress oxydatif transitoire et activités oxydatives et de défenses

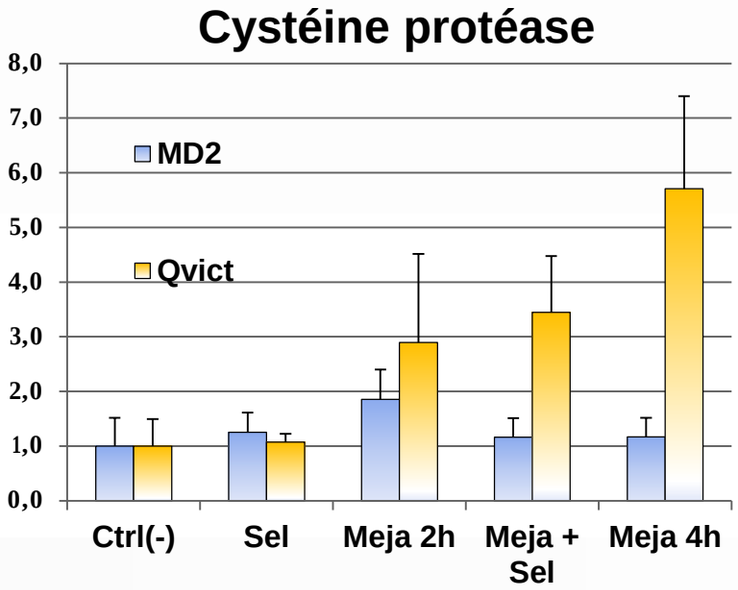


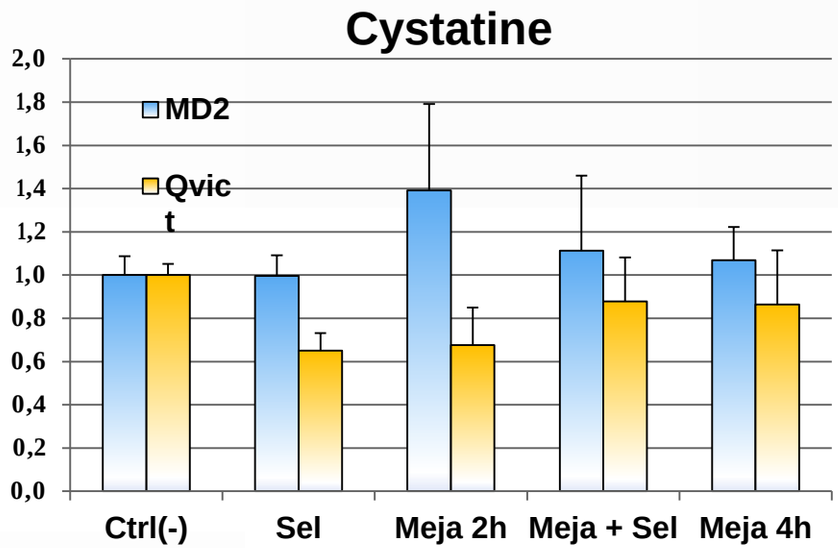


- **LOX** Signalisation ISR (synthèse Ac Jasmonique)
- **PAL** Signalisation SAR (synthèse Ac salicylique, composés phénoliques)
- **Superoxyde dismutase** Protection ROS / synthèse H_2O_2
- **Chitinase** PR3 (ISR – Jasmonate)
- **Peroxydase** Protection ROS / synthèse lignine
- **Polyphénoloxydase** Composés toxiques

CAT Signalisation et Toxicité de H_2O_2
1,3-β-Glucanase PR2 (SAR)

Marqueurs moléculaires : Recherche de variétés tolérantes aux stress dans le germplasm du CIRAD (>550 variétés)





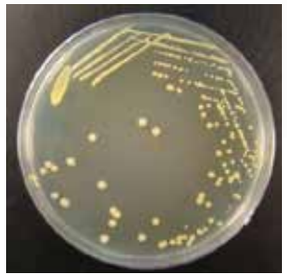
Stress abiotique (salin) + stimulation ISR (Methyl jasmonate 10^{-4}M)
Les figures représentent l'effet Systémie de la racine vers la feuille
& mesure de l'expression des gènes sur la feuille
La mise au point des mesures sur racines est en cours (présence d'inhibiteurs de PCR).

Autres expressions de gènes évaluées : Facteurs de transcription (MYC2, NPR1, ORA47 & ORA59) et gènes codant pour protéines de défenses (LOX, AOS & AOC, CAT), protéines PR.

Stimulation des défenses naturelles de l'ananas (et du bananier) par des micro-organismes

Ø Bactéries diazotrophes endophytes

Isolement de bactéries indigènes issues du système racinaire de l'ananas et des bananiers



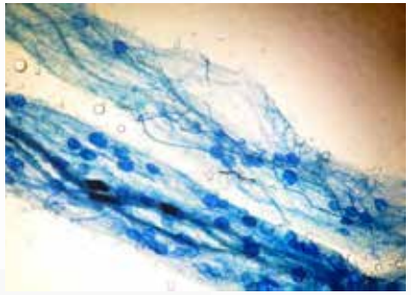
- **Identification**
- **Lyophilisation**

- **Collection (-80°C)**

Université Ciego de Avila – Cuba & UMR LSTM CIRAD

Ø Champignons mycorhiziens

Potentiel de mycorhization du sol par les crotalaires



Test biologique (dilution de sol et détermination du MPN) adapté avec la crotalaire comme plante piège de la technique de S Declerk (Univ Louvain)

Stimulation des défenses naturelles de l'ananas (et du bananier) par des bactéries endophytes

ØBactéries diazotrophes endophytes

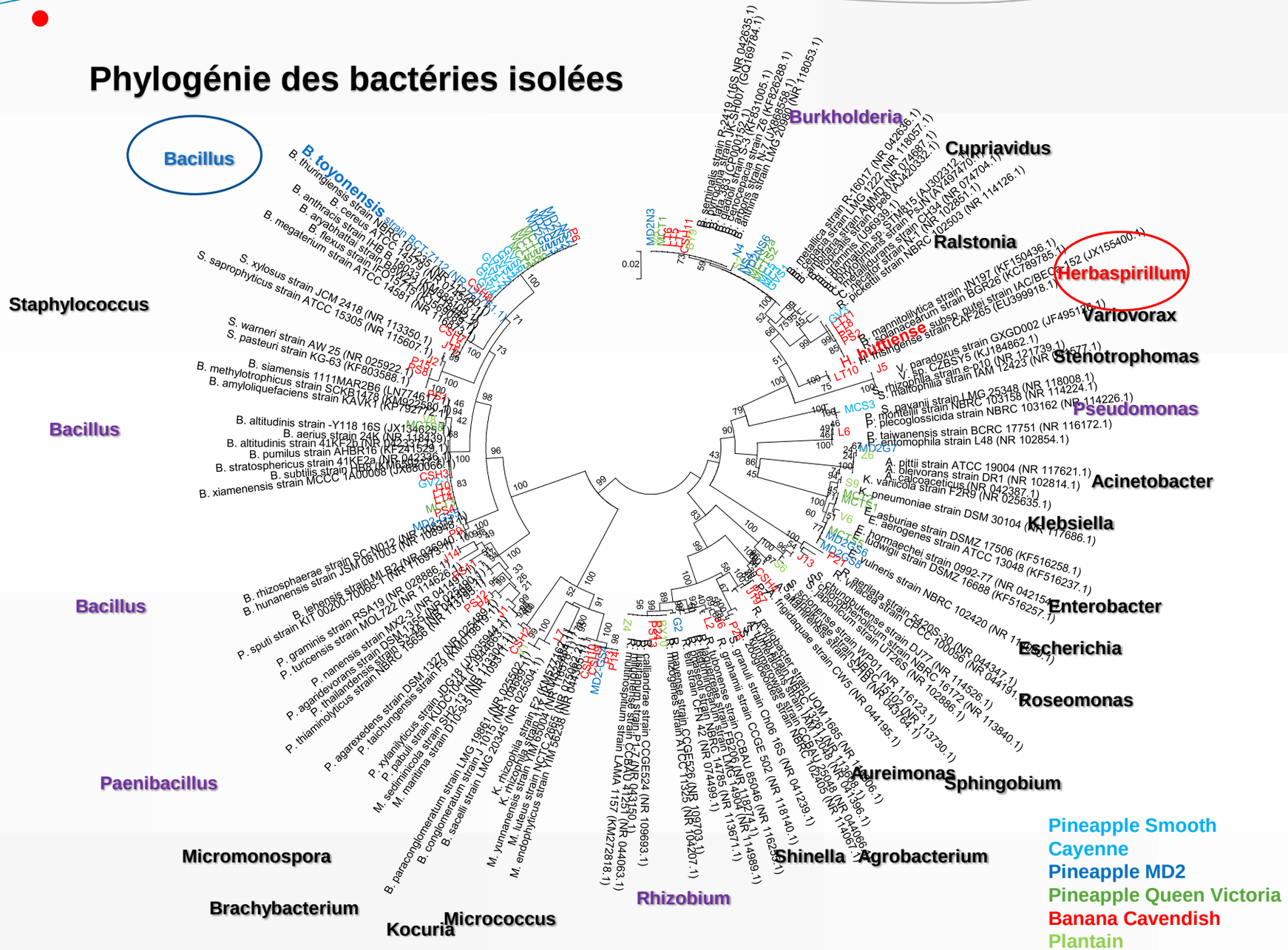
Isolement à partir des ananas, bananiers et plantains de Martinique dans des SdC variés (BIO au systèmr intensif classique)

178 souches isolées : Identification et test du potentiel inducteur des bactéries isolées

	Identifiées *(ADN16S)*
Bananier	**48**
Ananas	**39**
Plantain	**12**

CIRAD - UMR LSTM, Caribéens: Centro de Bioplantas - Université Ciego de Avila – Cuba –Université Abidjan (CI)

Phylogénie des bactéries isolées



Peut-on intégrer les RS dans un système de culture?

Passage du laboratoire au champ

Milieu contrôlé

Serre ou
Chambre climatique

Efficacité

?

Durabilité

Milieu non-contrôlé

Au champ: contraintes environnementales additionnelles

Stress biotiques:
Bioagresseurs
champignons, bactéries
nématodes, virus

Stress abiotiques:
température
stress hydrique
salinité ou acidité du sol

Thèse en cours UA/CIRAD

Passage du laboratoire au champ avec Queen / MD2

Petits rejets stimulés en serre par Bacillus toyonensis ou méthyl-jasmonate puis transplanté en champ sur système de culture rotation crotalaire

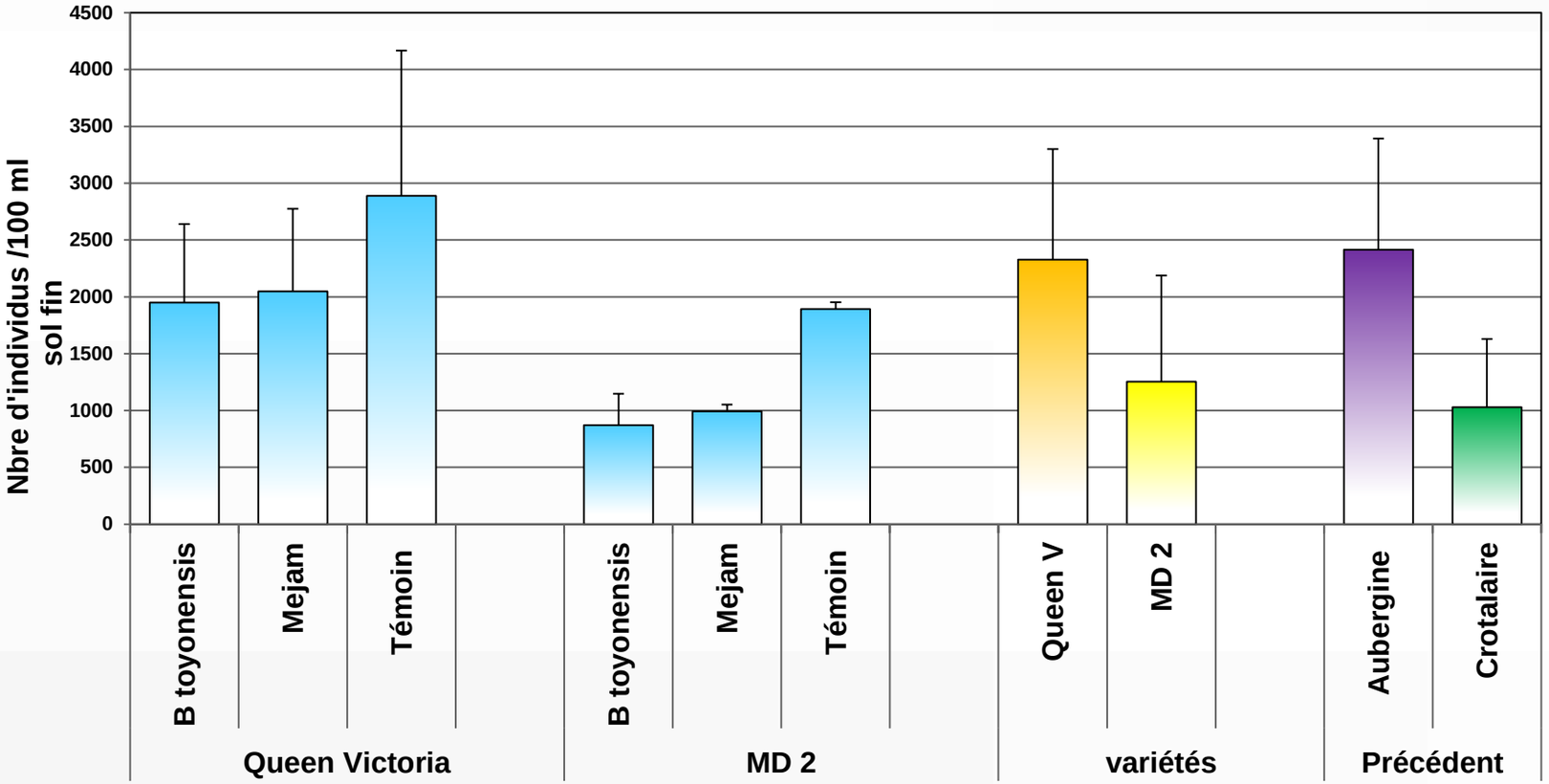
1 mois après plantation

8 mois après plantation

Passage au champ : Evaluation de l'efficacité des ISR au champ

(jeunes plants d'ananas stimulés en serre puis transplantés au champ)

Populations de *R reniformis* après 8 mois de culture



Profile racinaire & modélisation de la croissance et du fonctionnement du système racinaire

Grilles d'impacts racinaires : visualiser et quantifier la densité de longueur racinaire à travers le modèle.

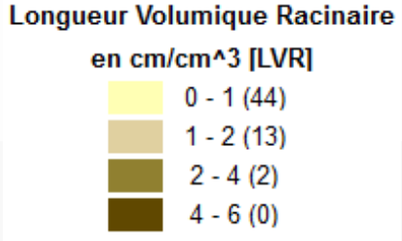
Chopart, Soler et al, 2015

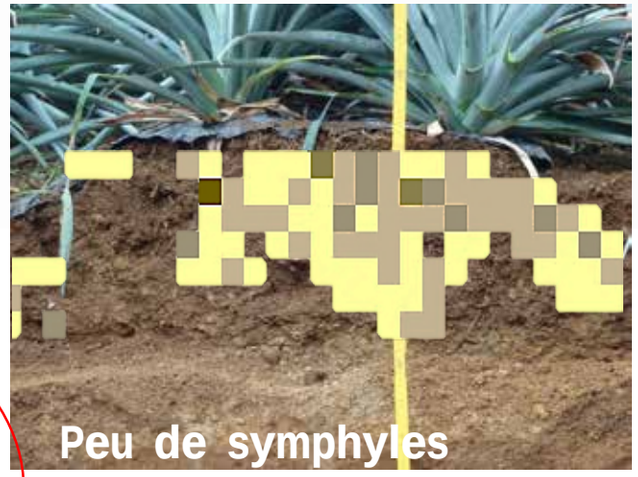
Profil racinaire & modélisation de la croissance et du fonctionnement du système racinaire

Les données de la grille et le modèle permettent de quantifier et de visualiser (Racin2) l'impact de pratiques et/ou des pathogènes telluriques sur les racines.

Simple observation (sans quantification)

Evaluer avec précision le volume de sol exploré par les racines et la répartition spatiale

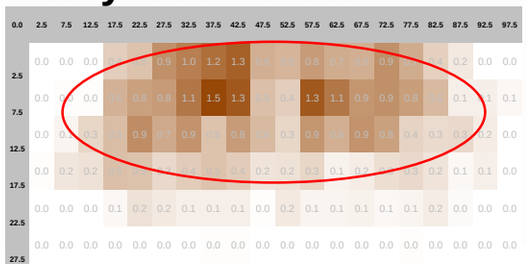




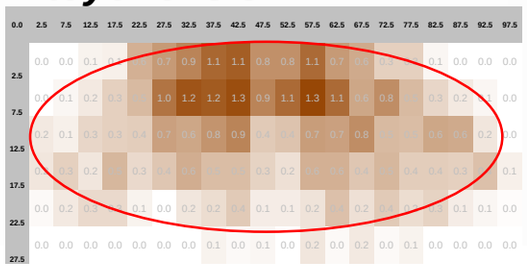
Chopart, Soler et al, 2015

Evaluation du développement racinaire : Grilles RLD, exploration du sol par les racines

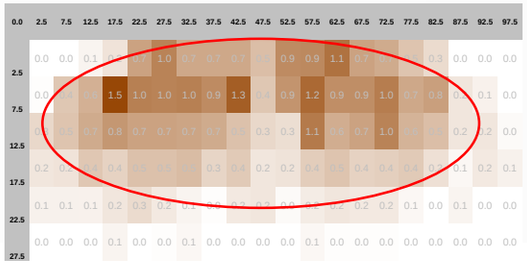
Méthyl-Jasmonate



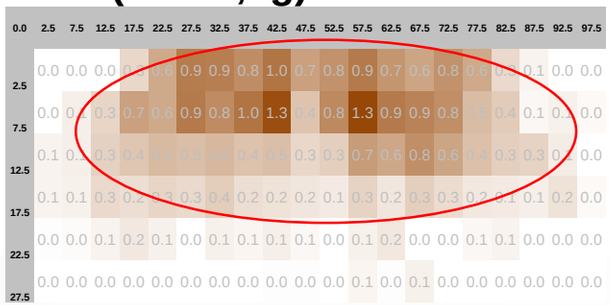
B toyonensis



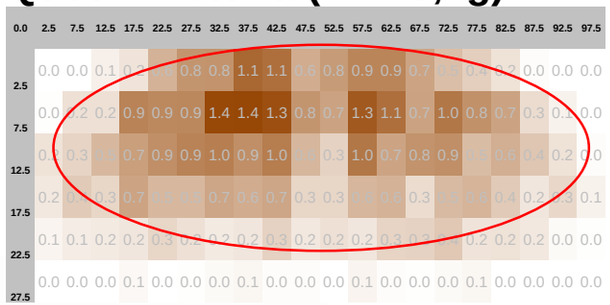
Témoin



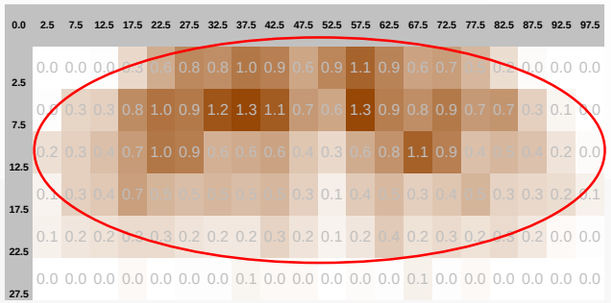
MD2 (FD 61,4g)



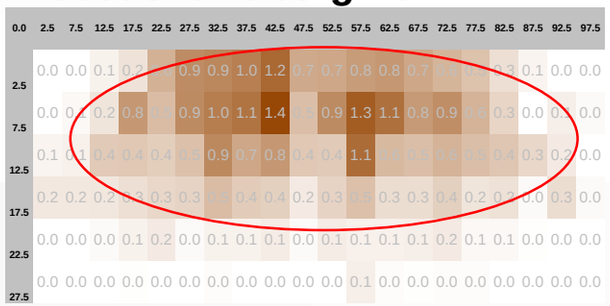
Queen Victoria (FD 43,4g)



Précédent Crotalaire



Précédent Aubergine



Longueur /unité de vol de sol ($cm.cm^{-3}$)

5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0

Processus complet de mise en place du SdC innovant et des résistances systémiques

Sevrage / Grossissement Vitroplants sains ou Rejets sains de pépinières

Traitements par Bactéries et Champ. mycorhiziens lyophilisés réhydratés

Plants en état de Priming livrés prêts à planter

Précédent crotalaire

Système de culture innovant (gestion intégrée des bioagresseurs (rotation PdS et Stimulation des défenses naturelles sur variétés sélectionnées)

Conclusion & Perspectives 1

Les Plantes de services dans le Système de Culture

Ü Rotations assainissantes pour réduire les populations de pathogènes du sol avant de planter l'ananas.

? *Optimisation (PdS en tant que plantes de couverture en début de culture pour réduire l'impact des adventices, agencement spatio-temporel, mélanges d'espèces de PdS…)*

? *Réduction des infestations de Cochenilles (Wilt) ou de Phytophthora (optimisation de la biodiversité introduite, composition chimique ou exsudats racinaires des PdS…)*

Effet plante de couverture

sous Crotalaria juncea

sous Crotalaria spectabilis

Jachère spontanée

Contrôle des adventices dans les inter-rangs durant les premiers mois du cycle de l'ananas

Arachis pintoï permanent ou Crotalaire fauchée à 3-4 mois pourraient permettre de réduire l'impact des adventices en début de culture

Optimiser l’effet positif de la biodiversité par l’agencement spatio-temporel

Optimiser l’utilisation des traits fonctionnels des plantes de services avec un mélange de différentes espèces

Mélange Brachiaria / Crotalaires pour le bananier

Conclusion & Perspectives 2

Les résistances systémiques (RS) dans le Système de Culture

Ü Caractérisation des RS chez l'ananas et le bananier (marqueurs)

Ü - ? Bactéries diazotrophes endophytes capables de stimuler les RS

Ü - ? Passage au Champ et modalités de mise en œuvre (traitements au champ et pépiniériste)

Ü - ? Adaptabilité du métabolisme pour les tolérances aux stress abiotiques et biotiques : évaluation germplasm

? Effets sur les autres pathogènes majeurs (Phytophthora & Cochenilles-Wilt)

? Effets antagonistes directs des bactéries

? Effets de la Mycorhization indirecte par les PdS

Conclusion & Perspectives 3

La Plante et son Microbiome

Microbiome fonctionnel du sol : solutions souterraines pour résoudre des problèmes de la partie aérienne

(Lakshmanan et al, 2014)

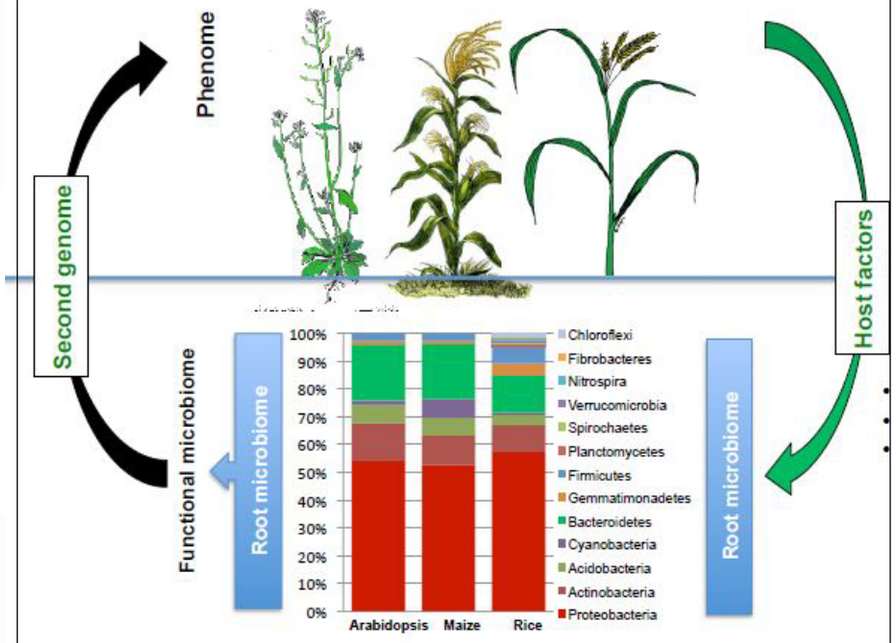
Importance du microbiome

Microbiome
Impact sur le phénotype

Stimulation de la croissance

Et

des défenses ISR/SAR



Plantes Hôte
Génotype
Tolérance aux stress
Santé globale (SdC)

Aérien

Sous-terrain
Exsudats racinaires
Chimiotactisme
Reconnaissance

Colonisation / bactéries

- Sélection génotype capable de mettre en oeuvre interactions > 0 avec le microbiome
- Selection par la plante des communautés bact et fongiques dont la symbiose est bénéfique et lui donne un avantage compétitif
- Mobilisation par la plante d'un second génome (micro organismes) qd elle en a besoin

- Expression du potentiel de production de la plante à attribuer au couple plante-microbiome

Comment utiliser ces interactions pour des concevoir systèmes de production écologiques mais efficaces ?

(Orrell et al, 2013)

- Faciliter l'installation de organismes mutualistes bénéfiques
  - Champignons mycorhiziens (AM)
  - Rhizobactéries PGPR endophytes ou pas (faciliter l'installation et la croissance)
  - Vers de terre… autres

  (Rotation avec pds assainissantes et améliorantes)

- Réduire les pertes dues aux interactions négatives (bioagresseurs – stress abiotiques)
  - **Priming de défenses de <u>variétés sélectionnées</u>**
  - Toxines - VOC (mutualistes sous-terrain promoteurs de défenses – augm. attraction prédateurs/auxilliaires ou réduction attraction bioagresseurs)
  - Gestion du timing de l'installation des premiers bioagresseurs *(interactions SAR-ISR)*

- *A*ugmenter les limites de production de la plante (Microbiome modifié – effet intercropping résultant en une modification phénotypique)

  (Sélection d'endophytes diazotrophes stimulateurs et rotation pds)

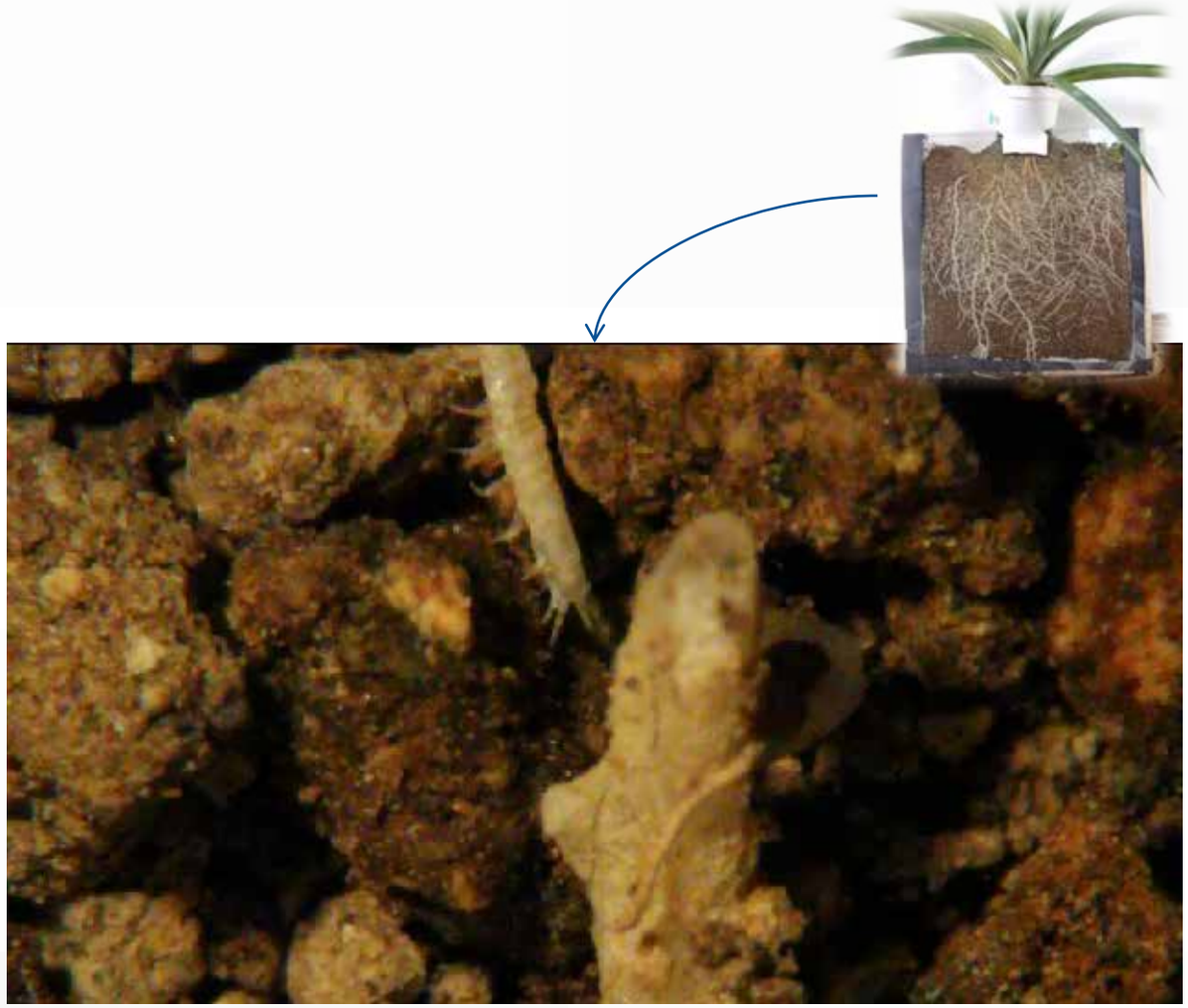
Merci de votre attention

Des outils pour la recherche mais aussi pour les techniciens

Matériel supplémentaire

Les symphyles dans leur milieu

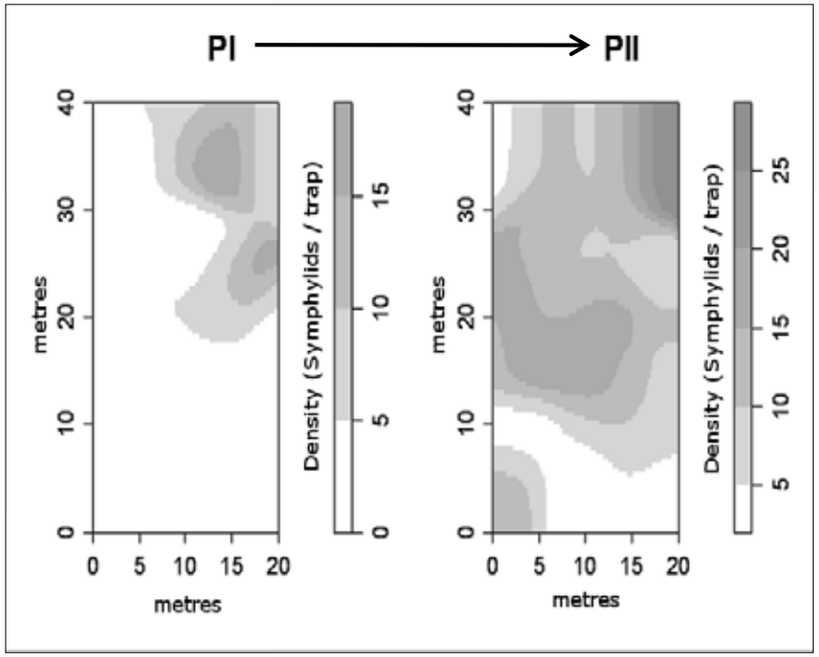
Les symphyles consomment les poils absorbants et apex des racines



Matériel supplémentaire

Bait & Trap : méthode de piégeage et suivi des populations de symphyles et de nématodes

Parcelle non traitée 4 mois



- Adaptation suivi mixte nématodes Symphyles

- Transfert RITA

Cartes de densités de population

Répartition hétérogène & augmentation des populations de symphyles

Soler, A. et al, 2011. Pest Management Science.

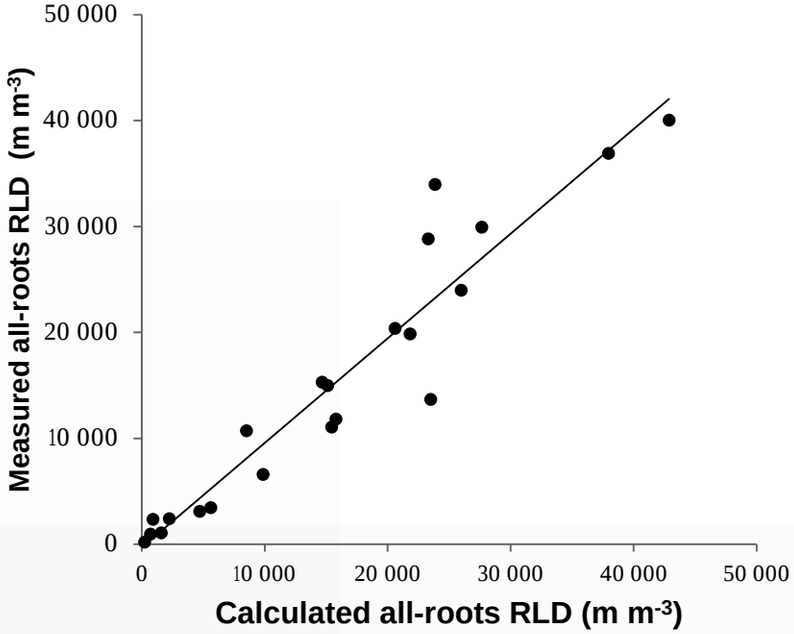
Matériel supplémentaire

Profile racinaire & modélisation de la croissance et du fonctionnement du système racinaire

Modélisation de la RLD à partir de cubes prélevés dans les profiles culturaux

RLD= RID.CO.CE

CO = 2.65 (orientation coefficient)
CE= 1.69 (experimental coefficient)



Chopart, Soler et al., 2015

Profile racinaire & modélisation de la croissance et du fonctionnement du système racinaire

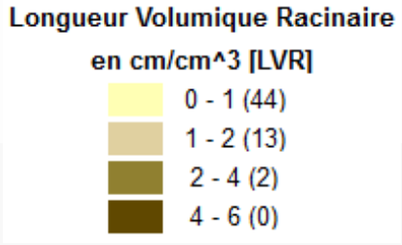
Grilles d'impacts racinaires : visualiser et quantifier la densité de longueur racinaire à travers le modèle.

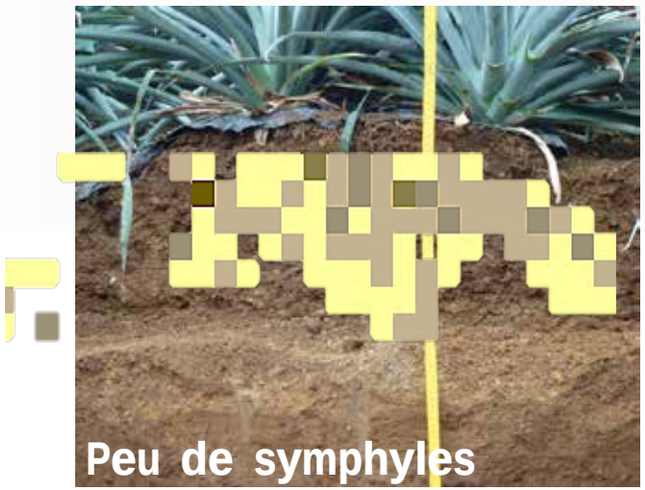
Profil racinaire & modélisation de la croissance et du fonctionnement du système racinaire

Les données de la grille et le modèle permettent de quantifier et de visualiser (Racin2) l'impact de pratiques et/ou des pathogènes telluriques sur les racines.

Simple observation (sans quantification)

Evaluer avec précision le volume de sol exploré par les racines et la répartition spatiale





Chopart, Soler et al, 2015

Matériel supplémentaire

Split-root : dispositif permettant d'étudier un effet systémique avec les nématodes

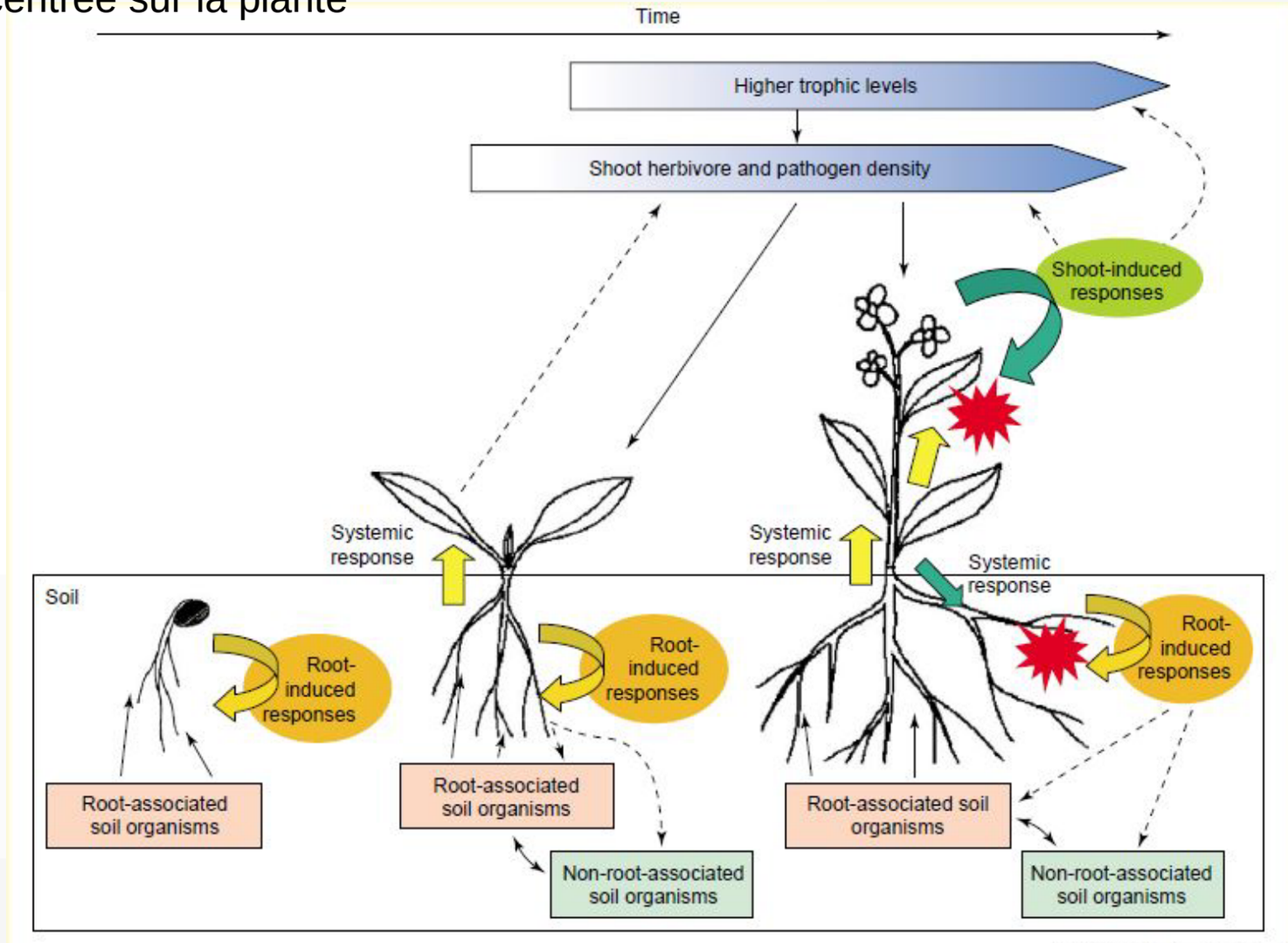
Comment utilise-t-on le split-root ?

Le stimulateur est appliqué sur la moitié du système racinaire et les réactions de la plante sont mesurées sur l'autre moitié après y avoir inoculé les pathogènes.

Défense et Intégration des processus aériens et souterrains

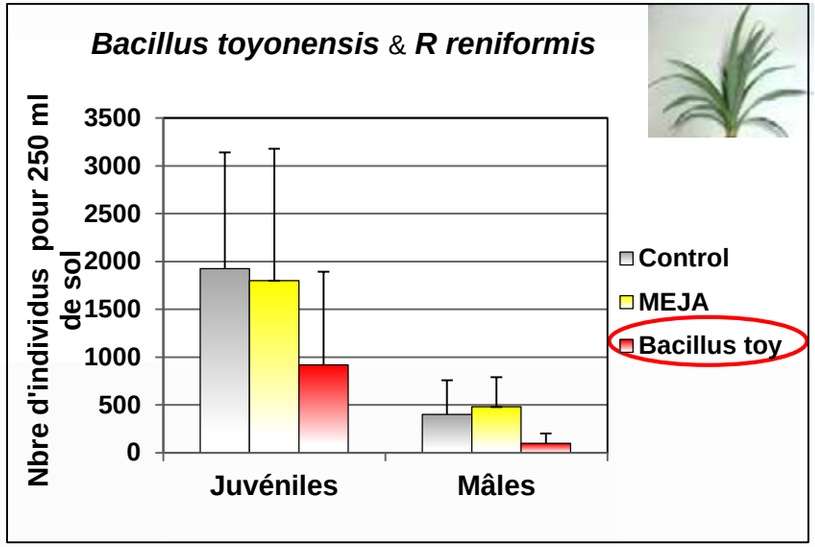
(Bezemer et van Dam, 2005)

Vision centrée sur la plante



Effets biologiques des bactéries diazotrophes endophytes *B toyonensis* et *H huttiense*

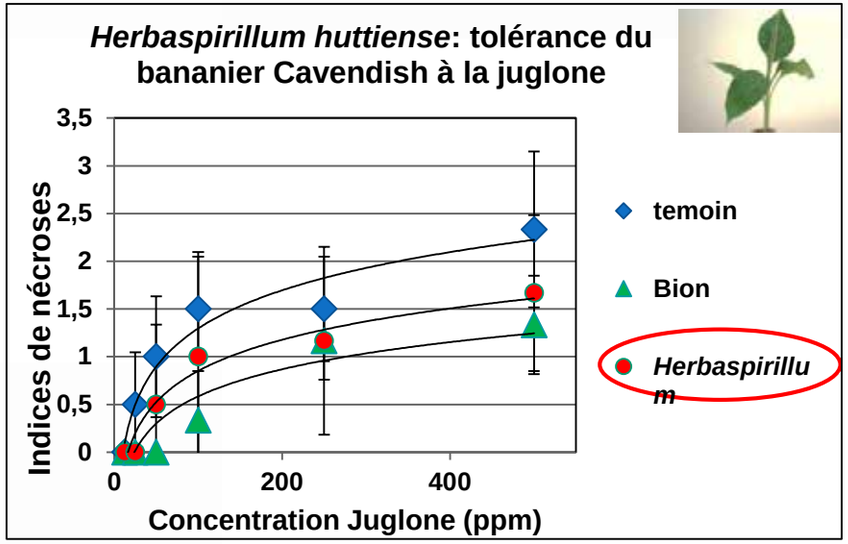
Réduction de la fécondité des populations de *R reniformis* sur ananas



Université Ciego de Avila – Cuba

A venir : tests Phytophthora et Cochenilles

Réduction des nécroses dues à la juglone toxine de *M fijiensis* sur bananier



Université Abidjan (CI)

A venir : tests *Mycosphaerella fijiensis*