



Maladie des taches noires de l'ananas : étude des relations hôte-pathogène et compréhension des mécanismes physiologiques de résistance

Bastien Barral

► To cite this version:

Bastien Barral. Maladie des taches noires de l'ananas : étude des relations hôte-pathogène et compréhension des mécanismes physiologiques de résistance. Biologie végétale. Université Montpellier, 2017. Français. NNT : 2017MONTT116 . tel-03522846

HAL Id: tel-03522846

<https://theses.hal.science/tel-03522846>

Submitted on 12 Jan 2022

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biotechnologie et Microbiologie

École doctorale GAIA
Unité mixte de recherche Qualisud-CIRAD

MALADIE DES TACHES NOIRES DE L'ANANAS

Étude des relations hôte-pathogène et compréhension des
mécanismes physiologiques de résistance

Présentée par Bastien BARRAL
Le 14 Décembre 2017

Sous la direction de Sabine SCHORR-GALINDO et Marc CHILLET

Devant le jury composé de

Isabelle Fock-Bastide	Maître de conférences, Université de la Réunion	Rapporteur
Benoît Poinssot	Maître de conférences, Université de Bourgogne	Rapporteur
Florence Mathieu	Professeur, INP-ENSAT	Examineur
Stéphane Poussier	Professeur, Université de la Réunion	Président de jury
Mathieu Léchaudel	Chercheur, CIRAD	Membre invité
Luc de Lapeyre de Bellaire	Chercheur, CIRAD	Membre invité
Marc Chillet	Chercheur, CIRAD	Co-directeur de thèse
Sabine Schorr-Galindo	Professeur, Université de Montpellier	Directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier Marc Chillet qui s'est démené pour que je puisse faire cette thèse, pour son encadrement au quotidien, nos discussions sur les directions à prendre, et bien sûr sa bonne humeur permanente. Alors pour tout cela et pour le reste, Merci chef !

Je remercie particulièrement ma directrice de thèse Sabine Schorr-Galindo pour ses conseils avisés, sa disponibilité malgré la distance. Je lui suis particulièrement reconnaissant pour sa confiance et la liberté qu'elle m'a accordée pour faire ce travail.

Et pour compléter ce trio d'encadrement, je voudrais inclure Mathieu Léchaudel toujours présent malgré la distance encore plus grande.

Votre aide à tous les trois m'a vraiment été précieuse.

Un grand merci à l'UMR Qualisud pour m'avoir accueilli pendant ces trois ans, permis de réaliser de nombreuses missions dans différentes contrées. Au cours de ces voyages j'ai eu la chance de travailler avec trois personnes formidables : Geneviève Conéjéro, Miss Histo ; Raphael Lugan, Mr Métabo and of course Lindy Joy Rose, Miss *Fusa*. Thanks !

Je n'oublie pas la 8^{ème} compagnie avec son leader incontesté M6 aka PSG aka Mr 30 000, ses fidèles acolytes, Herr doctor Weil et Môôôssieur de BO mais aussi Mme de Hoarau, Meunier, Chofie et Dabrioux.

Mes petites mains Lola, Maëva, Mathilde et Sharon.

Merci à l'équipe de Bassin Plat et notamment à Elodie et Marie pour leurs conseils et leur bonne humeur et également Georget et Bernard pour avoir choyé mes petits znanas.

Merci aux VSC qui font le bonheur du Cirad mais le mien également. Je ne vous oublierai pas, en tout cas pas dans l'immédiat...

A mes amis, par peur d'en oublier je n'en citerai aucun, je vous embrasse.

Enfin merci à ma famille, j'ai beau être à huit mille kilomètres vous ne m'oubliez pas, moi non plus.

Table des matières

CHAPITRE I Introduction	- 1 -
Ananas	- 1 -
Histoire, production et distribution	- 1 -
Morphologie, anatomie et taxonomie	- 6 -
La culture de l'ananas	- 12 -
Principaux ravageurs et maladies de l'ananas à la Réunion	- 14 -
Maladie de la tache noire	- 15 -
Historique de la maladie	- 15 -
Moyens de lutte	- 19 -
Influence des facteurs abiotiques.....	- 21 -
Influence des facteurs biotiques propres au fruit.....	- 22 -
Les champignons responsables de la tache noire	- 22 -
<i>Fusarium ananatum</i>	- 23 -
<i>Talaromyces stollii</i> / <i>Penicillium funiculosum</i>	- 28 -
Interaction plante-pathogène.....	- 30 -
Reconnaissance du pathogène par la plante	- 31 -
Les gènes de résistance (gènes-R)	- 31 -
Production des espèces réactives d'oxygène (ROS).....	- 31 -
Flux de calcium	- 32 -
Les composés phénoliques.....	- 32 -
Hormones de défense.....	- 36 -
Problématique scientifique et démarche générale	- 36 -
CHAPITRE II Prévalence, diversité et toxicité des agents pathogènes	- 39 -
Diagnostic survey on the occurrence of pineapple fruitlet core rot and relationship with phenolic compounds in Réunion Island	- 41 -

Introduction.....	- 42 -
Materials and methods	- 43 -
Results and discussion.....	- 45 -
Conclusion	- 46 -
Diversity and toxigenicity of fungi causing pineapple fruitlet core rot disease	- 51 -
Introduction.....	- 52 -
Materials and Methods	- 55 -
Results.....	- 59 -
Discussion.....	- 61 -
État des lieux et caractérisation de la virulence des isolats de l'île Maurice	- 76 -
Introduction.....	- 76 -
Matériels et méthodes.....	- 76 -
Résultats.....	- 77 -
Conclusion	- 78 -
CHAPITRE III Réponse biochimique	- 80 -
Coumaroylisocitric and caffeoylisocitric acids as markers of pineapple fruitlet core rot disease	82
Introduction.....	83
Materials and methods	84
Results and discussion.....	87
Conclusion	89
Evaluating the response to <i>Fusarium ananatum</i> inoculation and antifungal activity of phenolic acids in pineapple.....	94
Introduction.....	95
Materials and methods	96
Results.....	101
Discussion.....	104

Metabolomics analysis suggests the role of maturity in the acquisition of resistance to pineapple fruitlet core rot	113
Introduction.....	114
Matériel et méthodes.....	115
Résultats.....	117
Discussion	- 126 -
CHAPITRE IV Étude microscopique de l'interaction hôte-pathogène	- 129 -
An imaging approach to finding mechanisms for resistance to pineapple fruitlet core rot	- 131 -
Introduction.....	- 132 -
Materials and methods	- 134 -
Results.....	- 137 -
Discussion.....	- 140 -
CHAPITRE V Discussion et perspectives	- 153 -
Epidémiologie, étiologie et étude du potentiel toxigène	- 154 -
Pénétration du pathogène	- 156 -
Infection et réponse biochimique	- 157 -
Perspectives	- 158 -
Références.....	- 161 -
Liste des figures	- 176 -
Liste des tableaux.....	- 181 -

CHAPITRE I

Introduction

Ananas

Histoire, production et distribution

Histoire

Lors de la conquête de l'Amérique par les Européens, l'ananas (*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merr., *Bromeliaceae*) était cultivé dans toutes les plaines néotropicales, depuis la Mésoamérique et les Antilles vers le sud jusqu'au Paraguay et les vallées humides le long de la côte Pacifique du Pérou. Des cultivars spécifiques ont été développés sur les coteaux andins, que l'on retrouve encore en Colombie, au Venezuela et au Pérou. Son nom latin *Ananas* est dérivé du mot *nana* et ses dérivés, tels que *nanas*, ou *nanaí*, largement distribués dans la plupart des langues d'Amérique du Sud et des Antilles. Les Européens ont découvert ce fruit lorsque C. Colomb est arrivé sur l'île de Guadeloupe en 1493. La tranche d'ananas était un cadeau de bienvenue pour les navigateurs, afin qu'ils se désaltèrent, après leur long voyage. Les explorateurs espagnols nommèrent l'ananas 'Piña' de par sa ressemblance à une pomme de pin. Les anglais ajoutèrent 'apple' pour l'associer aux fruits juteux et délicieux (Beauman 2006; Coppens d'Eeckenbrugge et al. 1997; Loison-Cabot 1992).

Les formes sauvages de *A. comosus* se retrouvent dans toutes les plaines néotropicales à l'est des Andes, depuis les rives nord de l'Amérique du Sud jusqu'au sud du Brésil et le Paraguay, à l'exception des plaines inondables du fleuve Amazone et de leurs affluents du sud, où les inondations saisonnières limitent leur dispersion naturelle (Coppens d'Eeckenbrugge and Duval 2009; Coppens d'Eeckenbrugge et al. 1997). Davantage de variations morphologiques, physiologiques et génétiques sont observées au nord de la rivière Amazonie, avec deux variétés botaniques sauvages, *A. comosus* var. *parguazensis* et *A. comosus* var. *ananassoides* (Duval et al. 2003).

Sur la base d'études morphologiques (Duval et al. 1995), biochimiques (Garcia 1988) et de la diversité génétique (Duval et al. 2001), Coppens d'Eeckenbrugge et Leal (2003) ont proposé le bouclier guyanais, région étendue entre la Colombie et le nord du Brésil, comme lieu de domestication de l'ananas. Des travaux sur l'ADN chloroplastique ont permis de resserrer la zone de domestication à la partie orientale du bouclier (Duval et al. 2003). Les formes sauvages étaient cueillies dans la nature puis transférées dans les

jardins domestiques, les plus beaux spécimens échangés parmi la population. Cet échange à long terme soutient l'hypothèse selon laquelle les *Ananas* var. *comosus* aient dérivé des *Ananas* var. *ananassoides* par sélection parmi ces clones des fruits avec des syncarpes nettement plus grands. La divergence entre l'ananas sauvage et l'ananas cultivé se situerait entre 6 000 et 10 000 ans avant aujourd'hui.

Le processus de domestication a continué dans l'Ouest de l'Amazonie, une région où les formes sauvages sont absentes. La sélection portait sur la grosseur et le nombre de fruits individuels. La production de semences a été réduite grâce à une réduction de la fertilité sexuelle et à une plus grande auto-incompatibilité (Coppens d'Eeckenbrugge and Leal 2003).

Les ananas furent introduits en Afrique par les Européens dès le début du 16^{ème} siècle et atteignirent le sud de l'Inde en 1548. Avant la fin du 16^{ème} siècle, on les retrouvait en Chine, à Java et aux Philippines. Le cultivar d'ananas 'Cayenne lisse' a été mentionné pour la première fois dans un journal d'horticulture anglais en 1841. Il est supposé avoir été cultivé par les Indiens Maipure dans la vallée de l'Orinoco longtemps avant d'atteindre la Guyane française. Son fort rendement et ses feuilles lisses en ont fait le cultivar numéro un jusqu'à récemment (Collins 1951). La dispersion du cultivar 'Queen' date de la même époque et a connu un franc succès en Afrique du Sud et en Australie. Hawaii fut le centre de distribution mondial des ananas au cours de la première moitié du vingtième siècle. Le Pineapple Research Institute (PRI) d'Hawaii initia la création d'une nouvelle variété lors d'un programme de sélection lancé dans les années 1960 qui donna naissance à la variété 'MD-2', issu d'un croisement de deux hybrides PRI constitués en forte proportion de 'Cayenne lisse', la variété dominante d'ananas à cette époque. A l'heure actuelle le 'MD-2' a totalement supplanté le 'Cayenne lisse' (Bartholomew et al. 2012).

Distribution

Il existe beaucoup de variétés d'ananas, mais finalement, seulement quatre sont réellement commercialisées dans le monde. La variété 'MD-2' domine le marché mondial depuis le début du millénaire. Derrière on retrouve le 'Cayenne lisse' qui était leader avant d'être supplanté par le 'MD-2' (Bartholomew et al. 2012). En effet, L'hybride 'MD-2' répond mieux aux demandes du marché avec une acidité plus faible et une meilleure résistance au froid et au transport.

Les deux autres variétés connues sont le 'Queen', plus petit et plus parfumé, et l'ananas 'Bouteille', avec une forme allongée et conique. Avec un fort taux de sucre et une faible acidité ces deux variétés sont destinées au marché local pour la consommation en frais. En effet, ils ne supportent pas la conservation au froid et la durée du transport en bateau pour atteindre les marchés européen ou nord-américain.

Une étude comparative menée sur différents cultivars montre que lors d'un stockage à température ambiante la teneur en eau, l'acidité titrable et la vitamine C diminuent, le cultivar 'Queen' étant le plus affecté (Ali et al. 2015; Benitez et al. 2012). D'après une analyse sensorielle entre des fruits récoltés mûrs transportés par avion, et des fruits ramassés vert murissant sur bateau, la préférence des consommateurs va aux fruits récoltés mûrs. L'analyse GC-MS montre des teneurs en composés volatiles responsable du parfum caractéristique de l'ananas plus élevées sur fruits récoltés mûr (Steingass et al. 2015a).

Plus de 25 millions de tonnes d'ananas ont été produites dans le monde en 2014, ce qui place l'ananas en 11^{ème} position dans la production fruitière (Dawson et al. 2016). La production a augmenté de plus de neuf pourcent entre 2010 et 2011, et continue sa progression (Mouret 2015).

Avec l'augmentation de la production, les prix ont eu tendance à diminuer au cours des dernières décennies. Seul fait marquant, l'arrivée de la variété 'MD-2' a provoqué une augmentation des prix sur le marché mondial, jusqu'à ce que sa production augmente suffisamment pour faire chuter son prix. Outre, cet épisode, les fluctuations de prix proviennent principalement de la saison, et de la variété : les fruits de plus petite taille étant vendus plus chers que les plus gros calibres (Dawson et al. 2016).

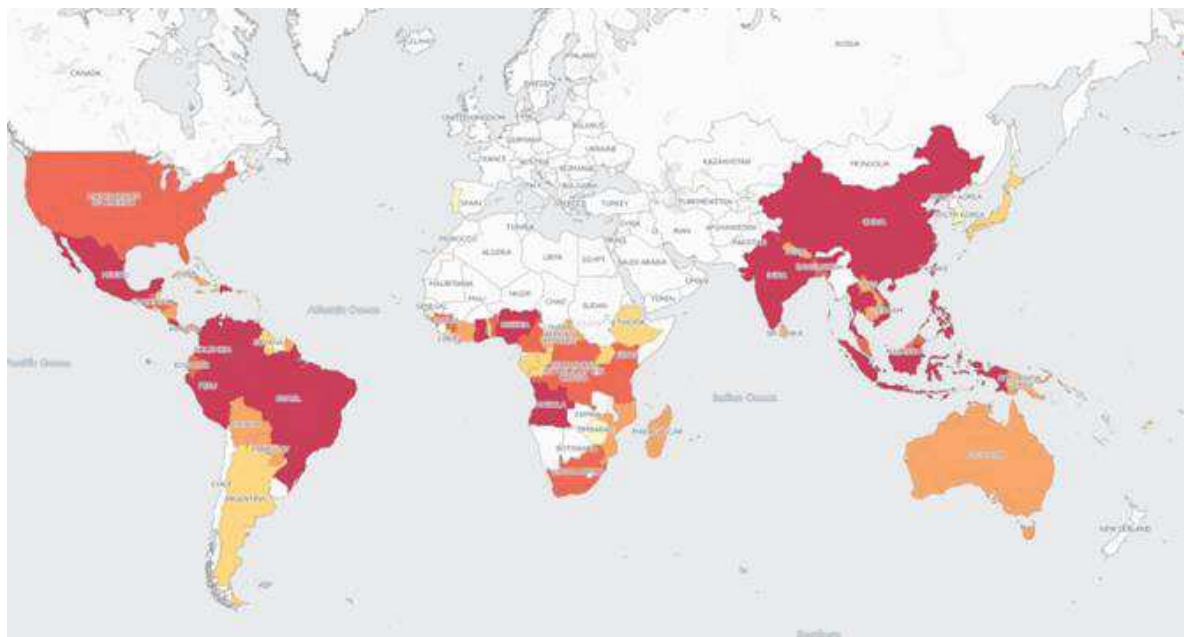


Figure 1 Principaux pays producteurs d'ananas (FAO 2017)

La production d'ananas se situe sur la zone intertropicale car sa culture exige d'importantes quantités de chaleur (Figure 1). Les cinq plus importants pays producteurs d'ananas en 2014 étaient le Costa Rica (2,9 Mt), le Brésil (2,6 Mt), les Philippines (2,5 Mt), la Thaïlande (1,9 Mt) et l'Indonésie (1,8 Mt) (FAOSTAT 2017). L'Amérique centrale et l'Asie dominent encore largement le marché mondial à l'heure actuelle. La majorité de cette production est destinée à la transformation, seuls 13% sont vendus en frais (Mouret 2015). Ce sont trois millions de tonnes de fruits frais qui sont exportées chaque année, dont 2,1 Mt par le Costa Rica suivi par les Philippines avec 461 856 tonnes (Dawson et al. 2016).

Au niveau européen, le marché de l'ananas représente un cinquième de celui de la banane, les principaux importateurs étant la Suisse, la Norvège et l'Islande. Les principaux pays exportateurs vers la France métropolitaine sont la Côte d'Ivoire et le Costa Rica, qui détiennent chacun 30% des parts du marché, suivi par le Ghana (18%) et la Guinée (5%) (Mouret 2015).

Selon son circuit de commercialisation, l'ananas peut être classé en deux groupes : l'ananas bateau et l'ananas avion. Ils se différencient l'un de l'autre par leur stade de récolte. Alors que l'ananas avion est récolté "mûr à point", car distribué dans les jours suivants, l'ananas bateau est récolté "presque mûr". Ce dernier est maintenu au froid (8°C) jusqu'à sa commercialisation.

Sur l'île de la Réunion, la production annuelle d'ananas est de 15 800 tonnes principalement de la variété 'Queen' (Chambre d'Agriculture de la Réunion 2016). L'activité est en pleine expansion ; les surfaces cultivées sont passées de 213 à 357 hectares et le nombre d'exploitations de 191 à 335 entre 2000 et 2010. La commercialisation des produits de la Réunion, se fait encore majoritairement par les circuits courts. Sur les 2152 exploitations fruitières de l'île, 1624 passent par la vente directe ou les circuits courts, 373 commercialisent leurs produits via les marchés de gros ou les grossistes, et 312 font partie d'une organisation de producteurs (Agreste 2014). La filière des fruits et légumes se structure en huit organisations de producteurs sur l'île : SCA VIVEA, ANAFRUIT, SCA Terre Bourbon, SCA Fruits de la Réunion, SCA Ananas, APRFLDT, Vergers de la Réunion, et l'Association des Vergers de l'Ouest. Elles sont rassemblées autour de l'Association Réunionnaise des Organisations de Producteurs de Fruits et Légumes (AROP-FL). L'exportation des fruits est en hausse de 4,4% (Ardoino and Perrain 2016), et en 2010, l'exportation de l'ananas représentait 1500 tonnes. L'ensemble de tous les fruits réunionnais exporté était alors de 1900 tonnes (AROPFL 2011).

Usage

Sur le plan commercial, l'ananas est principalement produit pour la consommation des fruits en frais ou en conserve (Van Tran 2006). Il est également transformé en jus, concentrés et confitures. Le jus d'ananas est le troisième jus de fruit le plus consommé dans le monde après les jus d'orange et de pomme (Cabrera et al. 2000). La transformation des fruits frais en conserve ou en jus génère une importante quantité de déchets (Tanaka et al. 1999). Entre 40 et 80% de la biomasse initiale est éliminée lors de la transformation (Ban-Koffi and Han 1990). Les résidus de pulpes, les épluchures, la tige et les feuilles forment les sous-produits de l'ananas.

La broméline est le composant le plus étudié avec la plus forte valeur ajoutée des déchets d'ananas. Il s'agit d'un complexe d'enzymes protéolytiques, présente dans différentes parties de l'ananas dont la tige et les feuilles, avec de larges applications en pharmaceutique et alimentaire (Bhui et al. 2009; Hebbar et al. 2008; Maurer 2001). La pulpe résiduelle sert également à la production d'éthanol (Ban-Koffi and Han 1990). La peau du fruit est riche en fibre 70%, en acide ascorbique et polyphénols (Larrauri et al. 1997). Les acides cinnamiques dont les acides *p*-coumarique et férulique qui ont été isolés à partir de tiges d'ananas possèdent des propriétés antifongiques (Tawata et al. 1996).

Enfin, les sous-produits sont utilisés comme aliment pour le bétail, fixateur de métaux lourds, source d'énergie et de fibres pour le textile (Upadhyay et al. 2013).

Morphologie, anatomie et taxonomie

Morphologie et anatomie

Ananas comosus (L.) Merr est une herbacée pérenne de la famille des *Bromeliaceae* (monocotylédone), dont l'inflorescence terminale est à l'origine d'un fruit multiple. Après maturation du premier fruit, la plante développe de nouvelles racines et bourgeons axillaires capables de produire un nouveau fruit. Dans les plantations commerciales, les plantes produisent au maximum deux ou trois fruits, à cause de la réduction de la taille des fruits d'un cycle sur l'autre. Pour renouveler une plantation, les producteurs utilisent les rejets ou les couronnes de la culture précédente. La plante adulte mesure entre 1-2 mètres de haut, pour un diamètre compris entre 1-2 mètres selon les cultivars. Les principales structures morphologiques à distinguer sont la tige, les feuilles, les racines, l'inflorescence, le fruit multiple et les rejets.

La tige mesure une trentaine de centimètre avec des entre-nœuds rapprochés. Le système vasculaire, discontinu, est percé d'ouvertures au niveau de l'insertion des feuilles. C'est à ce niveau que prennent naissance les racines adventives.

La plante adulte compte environ 40 à 70 feuilles, disposées en rosette. Les feuilles ont une forme de gouttière, leur permettant de tirer profit de la moindre précipitation, en la collectant à sa base. Sur l'épiderme inférieur, on retrouve des trichomes et les stomates. Les trichomes sont des excroissances de cellules mortes en forme de parapluie qui prennent naissance au fond des sillons. Ceux situés à la base de la feuille interviennent dans l'absorption de l'eau et des solutions nutritives tandis que ceux situés sur le reste de la feuille protègent de la lumière (Aquiye et al. 2011; Souza et al. 2005). Les stomates, montrent quant à eux des caractéristiques visibles exclusivement chez les Broméliacées qui confèrent à la plante une respiration très faible (Bartholomew et al. 2002; Kerns et al. 1936).

Des racines adventives se développent à l'aisselle des feuilles jusqu'à quelques centimètres du sommet de la tige. Seules les racines de la base pénètrent le sol ; les autres s'enroulent sur la tige ou se subérisent très vite, là où elles ont pris naissance. Toutes les

racines proviennent du tissu vasculaire compris entre l'écorce et le cylindre central.

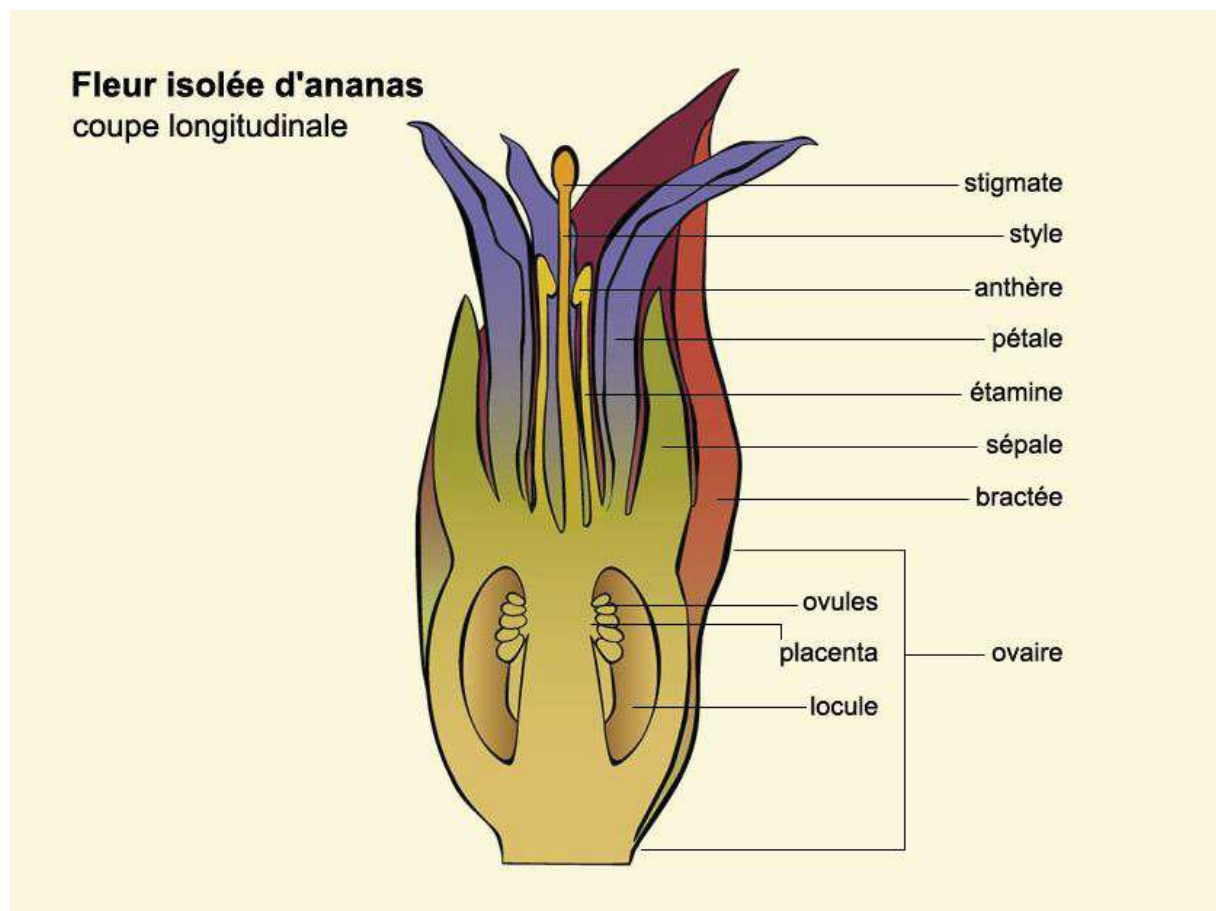


Figure 2 Coupe longitudinale de fleur d'ananas (biologievegetale.be)

L'initiation de l'inflorescence, au cœur du plant d'ananas, interrompt la phase végétative. Au cours de la floraison, le sommet de la tige s'allonge et produit un pédoncule sur lequel les feuilles qui apparaissent sont de plus en plus petites. Elles se réduisent à l'état de bractées. C'est la montaison. Les entre-nœuds s'allongent pour former une hampe florale qui, en son sommet, redevient un axe court-noué où des bractées, disposées en spirale, protègent chacune une ébauche florale. Le tout se termine par un bouquet de feuilles réduites, la couronne. Chaque fleur individualisée est du type trimère. Les étamines, au nombre de six, entourent le style (Figure 2). Les pétales liguliformes et les sépales de forme triangulaire viennent ensuite. Une bractée protège les pièces florales qui surmontent un ovaire à trois loges dont deux sont visibles sur l'image en coupe. Elles contiennent les ovules. Le nombre d'ovules peut atteindre la cinquantaine. Ils sont contenus dans des cavités profondes : les locules. L'ovaire est surmonté par le style et son stigmate. Dans le cas de l'ananas, la placentation de l'ovaire est axile. Les trois carpelles se soudent par leurs parois latérales qui forment des cloisons radiales (Figure 3).

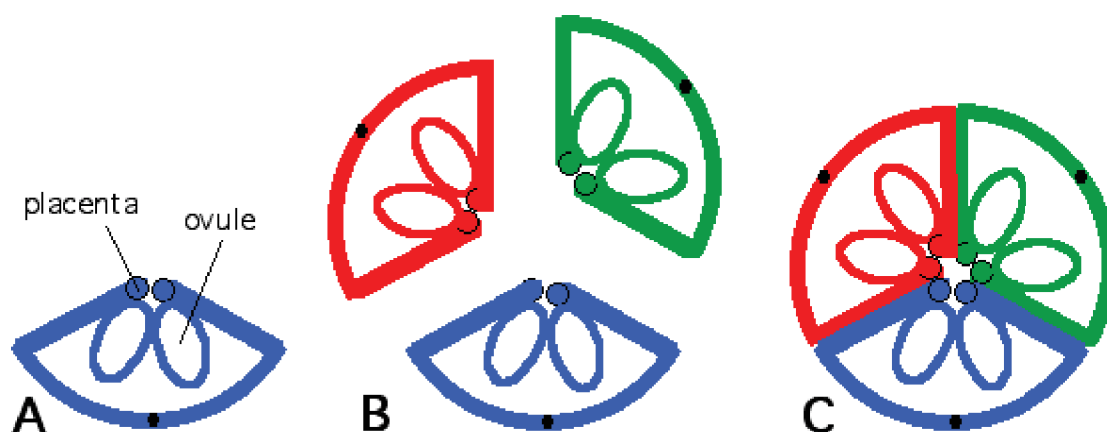


Figure 3 Placentation axile en coupe transversale ; (A) un carpelle fermé. Les deux bords du carpelle se sont soudés au niveau des placentas marginaux ; (B) : trois carpelles fermés (C) : trois carpelles fermés et soudés

Les fleurs étant autostériles, les ovules avortent. Par pollinisation croisée il peut y avoir fécondation et formation de graines rondes et très dures (Pesson and Louveaux 1984). Après l'anthèse, toutes les pièces florales, à l'exception du style, des étamines et des pétales qui se flétrissent, constitueront le fruit parthénocarpique. La base de la bractée sous-jacente et des sépales devient charnue, ces éléments se soudent alors entre eux. A l'approche de la maturité, cette structure s'aplatit pour former la face externe de "l'œil". Un espace libre se trouve ainsi aménagé sous la bractée et les sépales ("blossom cup") ayant pour plancher le sommet de l'ovaire, la base des pétales et des étamines et pour cotés les faces internes des sépales. A l'intérieur de celui-ci on trouve les pièces florales flétries. Le développement des tissus de la base de la bractée et des sépales et de l'ovaire forme l'essentiel de la chair du fruit, tandis que l'axe de l'inflorescence forme le cœur (Kerns et al. 1936; Okimoto 1948).

Les rejets sont nombreux chez l'ananas et portent des noms différents selon l'organe sur lequel ils s'insèrent. La couronne se trouve au sommet du fruit dans un état dormant qui, une fois plantée, reprend son développement. Le cayeu de souche prend naissance sur la partie souterraine de la tige ou sur le collet de la plante. La bulbille prend naissance à la base du fruit. Elle se développe à partir d'un bourgeon axillaire du pédoncule. Le cayeu de tige prend naissance à partir du bourgeon axillaire de la tige. Le cayeu est le plus couramment utilisé comme matériel végétal dans les cultures industrielles (Py 1955).

L'ananas a un métabolisme acide crassulacéen (CAM Crassulacean Acid Metabolism) qui lui permet de s'ajuster aux stress environnementaux. En effet, Les plantes CAM ouvrent

leurs stomates la nuit pour fixer le CO₂ avec la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) puis le stocke dans les vacuoles sous forme d'acide malique. De jour, les stomates se ferment et le CO₂ rentre dans le cycle de Calvin pour former des sucres. Cette séparation temporelle permet à l'ananas de limiter les pertes d'eau grâce à la fermeture des stomates la journée. L'ananas peut également adapter son cycle CAM en fonction de la saison, lorsque les températures nocturnes sont inférieures à 15°C l'activité de la PEPC et l'accumulation de malate sont inhibées (Rainha et al. 2015). Le génome de l'ananas particulièrement bien conservé a servi de modèle pour expliquer l'évolution des plantes C3 vers le système CAM (Ming et al. 2015; Ming et al. 2016).

Taxonomie

Les ananas appartiennent à l'ordre des *Bromeliales*, à la famille des *Bromeliaceae*, et la sous famille des *Bromelioideae*. Les *Bromeliaceae* se sont adaptées à une très large gamme d'habitats. Les *Bromeliaceae* sont divisées en trois sous-familles, les *Pitcarnioideae*, les *Tillandsioideae* et les *Bromelioideae*. L'ananas est la plante économique la plus importante dans les *Bromeliaceae*. Depuis la première observation de l'ananas par les explorateurs Européens jusqu'à nos jours, la taxonomie des ananas a varié considérablement. La première description botanique de l'ananas cultivé a été réalisée par Charles Plumier à la fin du XVIIe siècle lorsqu'il a créé le genre *Bromelia*. Linnaeus en 1753 dans son livre 'Plantarum Species' et y désigna l'ananas comme *Bromelia ananas* et *Bromelia comosa*.

La classification actuelle se base sur des études morphologique (Duval et al. 1995), biochimique (Garcia 1988) et génétique (Coppens d'Eeckenbrugge and Leal 2003; Duval et al. 2001). Le genre *Ananas* se divise en deux espèces avec plusieurs variétés :

- *Ananas comosus* var. *ananassoides*
- *Ananas comosus* var. *bracteatus*
- *Ananas comosus* var. *comosus*
- *Ananas comosus* var. *erectifolius*
- *Ananas comosus* var. *parguazensis*
- *Ananas macrodontes* (anciennement *Pseudananas sagenarius*)

Cultivars étudiés

Les ananas cultivés pour la consommation du fruit appartiennent tous à l'espèce *Ananas comosus* var. *comosus*. Lors de nos travaux nous nous sommes intéressés à trois cultivars

qui ont des sensibilités différentes à la maladie de la tache noire : ‘Queen’, ‘Flhoran 53’ et ‘MD-2’.

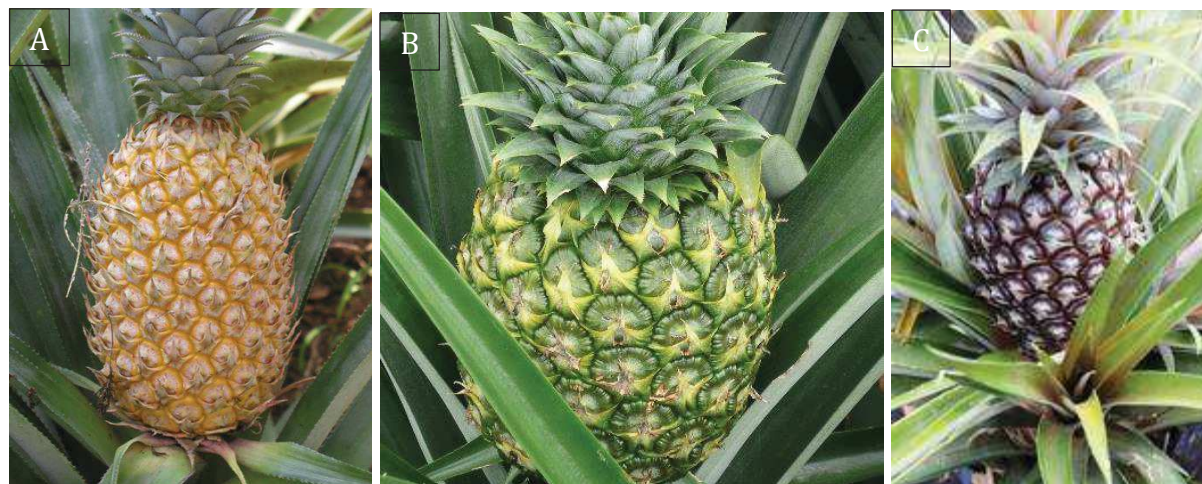


Figure 4 Fruits à maturité et feuilles des cultivars (A) ‘Queen’, et (B) ‘MD-2’ et (C) ‘Flhoran 53’

Queen

Le cultivar ‘Queen’ est largement distribué, mais il est plus particulièrement cultivé dans l’hémisphère sud, en Afrique du Sud, Asie et en Australie, pour le marché local des fruits frais. On le retrouve sous plusieurs dénominations : ‘Maurice’, ‘Malacca’, ‘Ceylan rouge’, ‘Buitenzorg’, ‘Ripley Queen’, ‘Alexandra’, ‘Trad sri thong’, ‘Savee’ et ‘Victoria’ (Luengwilai et al. 2016; Mendiola et al. 1951). En Malaisie, on l’appelle ‘Morris’ (Chan and Lee 1995). ‘Mac Gregor’ est un clone australien vigoureux. ‘Z’ ou ‘James Queen’ sont des mutants tétraploïdes du ‘Natal Queen’, trouvé naturellement en Afrique du Sud (Nyenhuys 1974). La plante est petite (60-80 cm), avec des feuilles courtes et épineuses, et donne de petits fruits (0,5-1 kg), avec une peau jaune à maturité et de petits yeux proéminents (Figure 4). La pulpe jaune dorée est douce (14-20°Brix) avec une excellente saveur. La production de bulbilles et rejets varie considérablement d’un clone à l’autre. Le cultivar ‘Queen’ est sensible à plusieurs ravageurs et maladies, très sensible au froid et au brunissement interne, en particulier si il est récolté avant maturité (Lim 1971; Luengwilai et al. 2016; Lutchmeah 1992; Swarts 1990). La maladie de la tache noire est la principale maladie post récolte affectant le cultivar ‘Queen’.

MD-2

L’industrie mondiale d’exportation d’ananas frais a traversé une transformation remarquable après que l’entreprise Del Monte ait présenté ‘MD-2’ à des consommateurs

aux États-Unis et en Europe (Frank 2003). Jusqu'au milieu des années 1990, l'exportation de fruits frais était relativement restreinte et basée sur le cultivar 'Cayenne lisse'. Avant l'introduction de 'MD-2', l'exportation de l'ananas était axée sur l'ananas en conserve 'Cayenne lisse'. La période suivant la Seconde Guerre mondiale, les producteurs d'ananas Hawaïen ont dû faire face à une concurrence croissante venant des Philippines et de la Thaïlande. L'un des produits prometteurs était l'ananas frais pour les marchés des fruits frais des États-Unis. Lorsque Del Monte s'est tournée vers un système de production de fruits frais, l'un des problèmes auxquels la société a dû faire face était la variation saisonnière de la qualité des fruits. Au cours des programmes de sélection, tous les ananas présentaient des défauts qui les empêchaient de remplacer le cultivar 'Cayenne lisse', soit pour la conserve, soit pour le frais. C'est lors de croisements entre des hybrides PRI que deux clones ont été sélectionnés comme prometteurs, il s'agissait de 'MD-1' et 'MD-2'. Les parents hybrides sont issus de croisement complexes entre 'Smooth Cayenne', 'Smooth Guatemalan', 'Ruby' (un clone 'espagnol'), 'Queen' et 'Pernambuco' (Williams and Fleisch 1992). Les deux clones contiennent quand même plus de 50% du patrimoine génétique de 'Cayenne lisse'. Les deux clones furent nommés d'après le nom de l'épouse du directeur de Del Monte, Frank Dillard : Millie Dillard (Bartholomew et al. 2002). Le 'MD-2' se caractérise par sa couleur chair dorée, une teneur en solides solubles légèrement supérieure à celle de 'Cayenne lisse', une acidité nettement plus faible, en particulier pendant les mois d'hiver, une teneur en vitamine C plus élevée et une durée de conservation plus longue en post-récolte.

Au cours de la période où Del Monte était le seul fournisseur de 'MD-2', les ventes d'ananas déclarées par la société sont passées de 200 millions de dollars en 1996 à 440 millions de dollars en 2002. Le 'MD-2' est maintenant le principal cultivar produit pour le marché du frais dans le monde et se commercialise sous l'appellation 'Extra sweet' et 'Gold' par Del Monte. Les fruits sont exportés vers les États-Unis, l'Europe, l'Asie et le Moyen-Orient. La croissance rapide du 'MD-2' sur le marché a eu un impact dévastateur sur les ventes d'ananas en Afrique et notamment en Côte d'Ivoire et au Ghana (Loeillet 2008). Vers l'an 2000, le Ghana a connu une baisse spectaculaire des exportations d'ananas parce que le marché a favorisé 'MD-2' plutôt que 'Cayenne lisse', le principal cultivar d'exportation du Ghana. Bien que la valeur marchande totale des fruits 'MD-2' ne soit pas connue, il est probable que les ventes annuelles de ce cultivar seules dépassent 1 milliard de dollars. La plupart des recherches sur ananas portent sur ce cultivar. Dernièrement, le séquençage

complet du génome chloroplastique a été réalisé sur 'MD-2' (Redwan et al. 2015; Redwan et al. 2016; Yusuf et al. 2015).

Flhoran 53

Pour satisfaire les besoins des producteurs et des consommateurs et se conformer aux nouvelles réglementations concernant la préservation de l'environnement et la limitation de l'utilisation des pesticides, un programme de sélection a été mis en place et développé par le CIRAD dans les années 90. L'objectif général était de produire de nouveaux hybrides pour les marchés locaux et d'exportation. Les objectifs spécifiques étaient d'améliorer le comportement du fruit en post récolte, la vigueur et la tolérance des hybrides d'ananas aux nématodes (Soler et al. 2009). Les cultivars 'Cayenne lisse' et 'Manzana' ont servi de parents pour les croisements. La descendance donna des plantes vigoureuses avec un système racinaire imposant. Plusieurs des premiers fruits récoltés ont hérité des bonnes qualités fruitées des parents. Certains de ces hybrides ont été distribués aux agriculteurs des Antilles françaises. Les hybrides 'Flhoran 41' et 'Flhoran 53' se sont révélés avoir des qualités pour le marché local et la consommation en frais. Ces bonnes qualités incluent la taille, le taux de sucres et le contenu en acides, la couleur et la fermeté de la chair. Le 'Flhoran 41', création variétale du CIRAD, se caractérise par sa couleur rouge externe à maturité (Brat et al. 2004). Le 'Flhoran 53' a une sensibilité intermédiaire à la maladie de la tache noire.

La culture de l'ananas

Les étapes du cycle cultural de l'ananas sont similaires quel que soit le cultivar (Figure 5). Des trois cultivars étudiés, 'Queen' avait la durée de cycle la plus courte (\approx 18 mois).

Avant la plantation, la phase de préparation du sol est une phase capitale pour la culture de l'ananas car il possède un système racinaire superficiel. Ses racines ne peuvent croître que dans un milieu meuble, homogène, bien drainé et bien aéré. Le sol idéal pour la culture de l'ananas est un sol à taux élevé de matière organique, avec un excellent drainage, poreux, avec des nutriments et de l'oxygène pour les racines. Le pH doit être neutre à acide, ou légèrement alcalin si le taux de calcium n'est pas trop élevé et que l'humidité ne favorise pas les moisissures (Bartholomew et al. 2002). La destruction du précédent cultural est fortement recommandée pour réduire le risque d'infestation (symphytes, nématodes, cochenilles) et apporter de la matière organique au sol (Fournier 2011). Les

résidus des cultures précédentes sont broyés finement puis enfouis lors du labourage après avoir séchés deux à trois semaines. Des billons sont formés à une trentaine de centimètres de hauteur et permettent une meilleure aération et un meilleur drainage du sol. La culture de l'ananas a surtout besoin d'azote et de potassium pour son développement. L'azote va agir sur le volume du plant et le poids du fruit, alors que le potassium agira sur la qualité du fruit (Alvarez et al. 1993). En moyenne les besoins de la plante sur son cycle de développement sont de 300 unités d'azote et 450 unités de potassium (Poletti 2015). Plus la plante se développe et plus ses besoins en azote et en potassium grandissent. Le rythme des apports tend ainsi à augmenter au fil des mois jusqu'à l'induction florale. Les apports de fertilisants sont déconseillés après cette date (Darnaudery et al. 2016; Py et al. 1984).



Figure 5 Principales étapes de l'itinéraire technique pour la culture de l'ananas

La plantation se fait à partir de rejets prélevés sur plantes saines. Pour les ananas commercialisés en frais, les couronnes ne pouvant être utilisées, ce sont les cayeux ou les bulbilles qui sont préférés. Avant plantations les rejets sont nettoyés par séchage ou par

traitement fongicide. Des plants sains permettent de limiter le développement du Phytophthora, de la maladie du Wilt, et des attaques de nématodes. Les plants sont disposés en ligne, entre 8 et 10 cm de profondeur, sur 2 à 4 rangées. La variété et l'objectif économique déterminent la densité de plantation, en moyenne 70 000 pieds par hectare à la Réunion (Fournier 2011). Les variétés avec de longues feuilles comme 'Flhoran 53' seront moins propices à des densités de plantation élevées, contrairement à des variétés comme 'Queen' ou 'MD-2', aux feuilles beaucoup plus courtes.

La floraison est induite naturellement par le climat, par des jours courts et des températures fraîches. Cependant, de nombreux agriculteurs préfèrent induire artificiellement la floraison pour avoir leur parcelle plus homogène. Le produit utilisé pour le traitement d'induction florale (TIF) est l'Ethrel®. Sa matière active, L'éthéphon, se décompose en éthylène ce qui déclenche la floraison (Py and Guyot 1970).

La détermination du stade de maturité auquel l'ananas doit être récolté doit répondre à deux critères : les propriétés gustatives du fruit doivent être correctes, et le fruit doit pouvoir supporter la conservation. L'ananas est un fruit non climactérique. A la Réunion, les ananas sont récoltés lorsque la coloration jaune dépasse la moitié de la hauteur du fruit. Bien que le TIF permette de regrouper la récolte, la maturation des fruits n'est jamais totalement homogène. Certains producteurs ont recours au déverdisage, pratique réalisée par une application d'éthéphon sur les ananas. Cela va entraîner la dégradation de la chlorophylle de l'épiderme et ainsi colorer uniformément les ananas, leur donnant un aspect plus attrayant pour le consommateur.

Après la récolte des fruits, les plants restent sur la parcelle jusqu'à ce que les rejets atteignent une taille suffisante pour la prochaine culture (Py et al. 1984).

Principaux ravageurs et maladies de l'ananas à la Réunion

- Les symphytes sont de petits myriapodes qui attaquent l'appareil racinaire, et plus particulièrement l'extrémité des racines. L'absorption des éléments nutritifs étant entravée, la croissance de la plante et son développement sont donc freinés. Même si les fruits restent commercialisables, les rendements sont affectés. Les symptômes sont uniquement visibles sur l'appareil racinaire.

- Les nématodes ont un impact sur le développement et la croissance des plants en s'attaquant aux extrémités de l'appareil racinaire. Leur incidence sur les rendements est plus importante que les symphytes.
- 'Heart and root rots' est une maladie causée par plusieurs espèces de champignons des genres *Pythium* et *Phytophthora* (Green and Nelson 2015). Elle affecte l'appareil racinaire et la tige. Elle peut entraîner jusqu'à 80% de pertes de la récolte. Le système racinaire pourrit et les feuilles prennent une couleur jaune clair, teintée de rose.
- La maladie du Wilt est due à un complexe de virus, véhiculés par les cochenilles farineuses, qui vivent en association avec les fourmis (Dey et al. 2015). La maladie touche toutes les parties du plant ; le système racinaire est altéré, les feuilles se décolorent et s'incurvent vers la face inférieure, et les fruits sont atrophiés. Ils ne sont donc pas commercialisables, et une parcelle peut être atteinte à plus de 50%. il est nécessaire de détruire et d'enfouir les rejets pouvant servir d'hôte aux cochenilles (Fournier et al. 2015; Py et al. 1984).
- Le 'Black rot' causé par le champignon *Chalara paradoxa* se caractérise par une pourriture noire pouvant gagner l'ensemble du fruit. Les symptômes peuvent atteindre l'ensemble du plant qui se dessèche (de Souza et al. 2015).
- La maladie de la tache noire touche les fruits. Sans symptômes visibles de l'extérieur, elle est due à des champignons des genres *Talaromyces* et *Fusarium*. On ne connaît pas l'impact réel de cette maladie sur la production à cause de sa difficulté à être diagnostiquée.

Maladie de la tache noire

Historique de la maladie

La maladie de la tache noire, 'fruitlet core rot', fut décrite pour la première fois par Tryon (1898) en Australie. Les symptômes de cette 'pourriture du noyau' sont définis comme suit :

"Taches brune foncées bien définies immédiatement sous la surface - La maladie se développe dans le fruit simple. Le cœur de l'infrutescence reste tout à fait sain" (Figure 6).

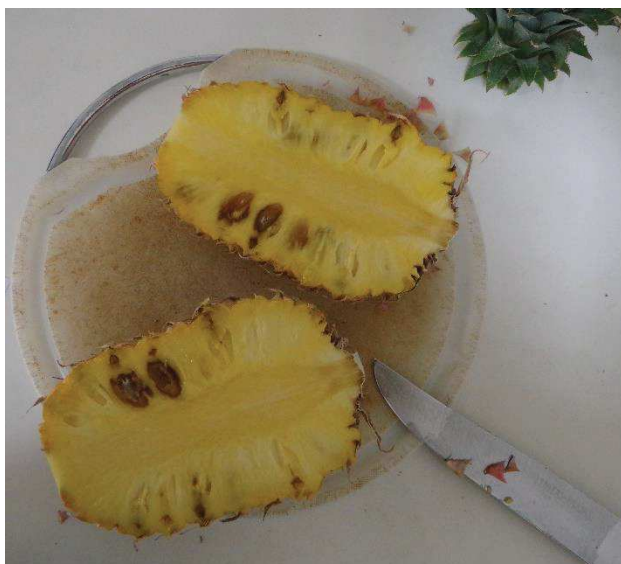


Figure 6 Symptômes de la maladie de la tache noire sur le cultivar ‘Queen’

Tryon (1898) se réfère au travail du Dr A. A. Brown (1896) qui sépara les zones malades des ananas et trouva des spores fongiques et des hyphes dans les tissus. Brown (1896) mit en culture ces spores qu’il identifia comme *Mucor racemosus*. Brown considérait l’invasion de ce champignon comme principale cause de la maladie. Les recherches de Tryon sur la maladie dans l’état du Queensland en 1898 l’ont conduit à conclure, cependant, qu’une blessure du fruit était nécessaire pour que le champignon produise des zones infectées dans les tissus. Le champignon qu’il isola de taches sur la variété ‘Queen’ était *Monilia candida*, et non *Mucor racemosus* tel que rapporté par Brown. Sur la variété ‘Cayenne lisse’, il isola *Penicillium* sp. à partir de fleurs desséchées aussi bien que de zones malades. Il ne considéra pas cela comme significatif vu que les deux champignons sont saprophytes et donc facteurs secondaires de la maladie. Tryon considérait qu’une blessure réalisée par un insecte dans la cavité florale était nécessaire pour que la maladie se développe. La fissuration trouvée à la base de la cavité, au niveau de l’insertion des étamines, ne peut pas servir d’entrée pour les champignons, la couche superficielle des cellules étant subérisée. Pour l’auteur, la colonisation du champignon débute immédiatement sous la base du style puis se répand dans le tissu. Il distinguait les symptômes de la maladie entre les variétés ‘Queen’ et ‘Cayenne lisse’. Dans le fruit de ‘Cayenne lisse’ la maladie se répand latéralement à partir d’un point sous l’insertion des étamines, alors que dans ‘Queen’, l’infection descend vers le bas à partir de la base du style. Il considère ces différences “conformes aux différences structurelles marquées qui existent entre les fruits des deux variétés” sans spécifier desquelles il s’agit. Il explique la

prévalence de la maladie de la tache noire pendant la récolte hivernale, en avançant la théorie selon laquelle les processus de maturation étant prolongés, le champignon peut envahir les tissus sans interférence.

Par la suite, des chercheurs rapportent des observations de symptômes similaires dans les régions productrices d'ananas. À Hawaii, Larsen (1910) décrit une 'décoloration marron' dans les ananas de la variété 'Cayenne lisse' qu'il attribue au genre *Fusarium*. Barker (1926) en Haïti, Serrano (1928) dans les Philippines puis Johannsen (1934) au Guatemala et Thompson (1937) en Malaisie décrivent les mêmes symptômes dû au même genre contaminant.

Leurs travaux portent essentiellement sur la tentative d'identification du pathogène.

En Afrique du Sud, le premier rapport sur la tache noire fut réalisé par Pole-Evans (1924). Il décrit une 'tache noire' due à un mélange de *Penicillium* sp. et *Fusarium* sp.. Simmonds (1939) considérait le champignon du genre *Penicillium* comme seul agent causal de la 'pourriture du noyau' dans les ananas de l'état du Queensland. Il soutient la même théorie que Tryon selon laquelle l'entrée du champignon est rendue possible par des blessures causées par la cochenille *Pseudococcus brevipes* et l'acarien *Tarsonemid*. Parham (1934) associa les champignons *Ceratostomella paradoxa*, *Helminthosporium* sp. ainsi que *Penicillium* sp. à la maladie qu'il qualifiait de 'tache noire des fruits'.

C'est à cette époque que les premiers travaux différencient les symptômes de 'taches humides' et de 'taches sèches' qu'ils attribuent respectivement à la bactérie *Erwinia ananas* et au champignon *Penicillium* sp. (Serrano 1928; Thompson 1937). Johnson (1935) à Hawaii, a trouvé *Penicillium* sp. et *Fusarium* sp. comme agents responsables de la 'pourriture brune'. Thompson (1937) travaillant en Malaisie décrit une 'Pourriture brune du fruit' en distinguant deux types : l'une provoquée par les bactéries et l'autre par les champignons. Il a observé que ce tissu brun était 'plus dur et légèrement plus sec' que le tissu sain. Il a également constaté que les locules de l'ovaire étaient parfois bordées de mycélium blanc. Les sections constituées des zones malades ont montré des hyphes de champignon communément présents au bord extérieur de la pourriture et des bactéries à la marge intérieure. Il a supposé que l'invasion des champignons a probablement suivi celle des bactéries. Il isola le champignon *Penicillium* sp. et la bactérie *Erwinia ananas* de zones malades. La maladie ne se développe que pendant le processus de maturation et ne

semble pas se propager après la maturation ou pendant le stockage. Dans les fruits immatures verts, les traces de la maladie ne sont que rarement trouvées. La maladie ne semble pas affecter les tissus conjonctifs, même si les faisceaux fibreux dans le noyau peuvent devenir bruns.

Pour prouver la pathogénicité des champignons, Edmonstone-Sammons (1955) isola les champignons *Penicillium funiculosum* Thom. et *Fusarium moniliforme* Sheld. à partir de taches noires puis les réintroduisit dans des fruits sains. Il en résulta l'apparition de taches brunes néoformées. Mais les champignons sont toujours considérés comme cause secondaire de la maladie car ils ne peuvent envahir la chair que si l'épiderme a été cassé auparavant. Il n'observe pas de corrélation entre un champignon spécifique et la production de taches humides ou sèches. Tous les pathogènes étudiés ont causé les deux types de taches. Par contre, la maturité et la variété des fruits auxquels l'inoculation est effectuée semblent affecter le type de taches produites. La tache sèche est plus répandue dans les jeunes fruits et sur 'Cayenne lisse' en proportion. Oxenham (1953, 1962) montre que la maturité du fruit à laquelle les champignons ont été inoculés n'affecte pas leur pathogénicité. Collins (1960) est le premier à suggérer que les champignons pénètrent l'intérieur de l'ananas lors de la floraison au travers du style et des canaux nectarifères.

L'ensemble de ces travaux montre que ces taches sèches et humides sont répandues dans toutes les régions productrices d'ananas (Guerout 1974; Py et al. 1984). Hepton and Anderson (1968) sont les premiers à nommer ces taches sèches 'Leathery pocket'. En 1976, une étude menée à Hawaï associe cette maladie aux champignons *P. funiculosum* et *F. moniliforme* (Rohrbach and Pfeiffer 1976). Leur méthode d'inoculation consiste en une pulvérisation de solution de spores lors de la floraison sur différents cultivars. Ils observent les symptômes sur fruits matures et se rendent compte que la sensibilité à cette maladie n'est pas la même pour toutes les variétés d'ananas testées. La virulence de *P. funiculosum* inoculé sur fruits varie selon les souches de champignons (Lim and Rohrbach 1980). Finalement, Jacobs et al. (2010) décrivent une nouvelle espèce de champignon responsable de la maladie de tache noire en Afrique du Sud grâce aux outils génétiques : *Fusarium ananatum*.

Une fusariose causée par *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* apparaît sur les variétés d'ananas cultivées au Brésil dans les années soixante et prend de l'ampleur jusqu'à devenir la préoccupation majeure des producteurs (Kimati and Tokeshi 1964). Le

champignon est même retrouvé sur les feuilles d'ananas (Dianese et al. 1981; Matos 1987; Matos and Souto 1985). Le nom *F. moniliforme* var. *subglutinans* apporta une certaine confusion et quelques articles traitant de la maladie de la tache noire l'utilisent pour décrire l'agent pathogène (Manicom et al. 2006; Petty et al. 2005). Le champignon responsable de la fusariose fut par la suite renommé *Fusarium subglutinans* (Hidalgo et al. 1998; Matos and Cabral 2006; Ventura et al. 1993) puis *Fusarium guttiforme* (Aquiye et al. 2011; Aquiye et al. 2010; Santos et al. 2016). Par ailleurs l'appellation *F. moniliforme* a été abandonnée pour être remplacée par *Fusarium verticillioides* (Hawksworth 2015; Seifert et al. 2003). Enfin, Jacobs et al. (2010) ont permis de différencier *F. guttiforme*, responsable de la fusariose, de *F. ananatum*, responsable de la tache noire, en se basant sur les séquences des gènes 'translation elongation factor-1 α ', 'histone H3' et ' β -tubulin'.

Les symptômes 'Leathery pocket' et 'Interfruitlet corking' sont le fait de contaminations précoces (sur inflorescence, jusqu'au fruit immature). Les champignons certainement déjà présents dans la cavité florale dès la floraison profitent de portes d'entrées dans le parenchyme, causées par les insectes (cochenilles, acariens...) ou par des fractures de croissance (Mourichon 1991). Les conditions ne sont pas rassemblées pour le développement du champignon, la plante a donc le temps de mettre en place son système de défense en formant cette barrière qui donne ces petites taches brunes d'aspect liégeux. Le symptôme de 'Fruitlet core rot' apparaît sur fruit mature. Le pathogène se trouve alors en condition favorable pour se propager, l'équilibre attaque-défense s'inverse.

Moyens de lutte

La lutte contre les ravageurs vecteurs de la maladie a déjà été entreprise par Tryon (1898), mais les résultats obtenus par utilisation d'une bouillie sulfocalcique contre *Steneotarsonemus ananas* ne furent pas satisfaisants. En Afrique du sud, Le Grice et Mark (1970) obtiennent une forte diminution des taches noires avec des traitements à l'endosulfan, l'oxythioquinox et lovozal. Cette étude a été entreprise en vue de détruire *S. ananas* mais ne mentionne pas d'observations réalisées sur les arthropodes eux-mêmes. Au Swaziland, l'incidence des taches noires augmentent de 15 à 25 pourcent avec l'application de produit acaricide (Dodson 1968). En Côte d'Ivoire, des essais menés par Guerout (1974) montre une forte diminution de l'infestation par *S. ananas* mais sans incidence sur le nombre de taches noires. Des observations détaillées des fruits des parcelles non traitées ne permettent pas de relier de façon nette la présence d'acariens et

les taches noires (Mourichon et al. 1987). Ces résultats vont dans le même sens qu'une étude plus récente, présentant les effets de l'endosulfan, double action insecticide et acaricide, sur la maladie de la tache noire (Manicom et al. 2006). Une augmentation importante du nombre de taches noires est observée après utilisation d'endosulfan. En revanche, Petty (2005) observe une réduction significative du nombre de taches noires par fruit après application du même acaricide. Cette étude menée en Afrique du Sud portait également sur le contrôle des cochenilles et des champignons. Les applications d'insecticides avant et après l'induction florale n'ont pas donné de résultats significatifs. Ces essais remettent en cause le rôle des acariens et cochenilles dans la maladie de la tache noire.

Le premier essai de traitement fongicide date de 1934. Des résultats satisfaisants ont été obtenus avec la bouillie sulfocalcique et la bouillie bordelaise, grâce à des pulvérisations bimensuelles pendant quatre mois (Serrano 1934). Dodson (1968) au Swaziland obtient 11% de fruits sains supplémentaires avec des pulvérisations de captane mais ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs. En Martinique (1970), des applications variées de bénomyl n'ont pas permis d'amélioration sensible de l'état sanitaire des fruits. A la Réunion, trois pulvérisations des fongicides mancozèbe et de captafol ont permis une diminution de plus de 50% le nombre de taches noires sur la variété 'Queen' (Guerout 1974). En Côte d'Ivoire, Frossard obtient une très légère amélioration de l'état sanitaire avec huit pulvérisations de bénomyl, mais cela n'est pas confirmé par d'autres tests. Une étude réalisée en 2005 avec le mancozèbe et le bénomyl a permis de réduire de 75 % le nombre de taches noires par fruit sur des ananas du cultivar 'Queen' (Petty et al. 2005). Ces différences d'efficacité pour des mêmes matières actives proviennent certainement de la formulation finale du produit, du cultivar, de la fréquence d'application et des stades phénologiques de la plante au moment de l'application. En 2017 tous les produits contenant ces différentes matières actives sont maintenant interdits à la vente ou en passe de l'être en Europe.

Une technique utilisant l'effet antagoniste du champignon *Trichoderma* sp. isolé sur ananas sur *Penicillium funiculosum* a été étudiée en Côte d'Ivoire (Mourichon 1991). Une solution de *Trichoderma* sp. a été pulvérisée directement sur les parties infectées de la plante ou mélangée dans le sol avant la plantation. Aucun effet clair n'a été observé avec le traitement dans le cadre de cette expérimentation. L'action de cet antagoniste n'est pas

connue sur l'autre pathogène *Fusarium* sp. ni sa capacité à survivre dans le sol de ces cultures.

Malgré plusieurs études menées sur le sujet, employant notamment des fongicides et des champignons antagonistes, aucun moyen de lutte fiable contre la maladie n'a à ce jour été trouvé.

Influence des facteurs abiotiques

Il a été démontré que certaines conditions environnementales favorisent le développement de la maladie. Tryon (1898) associait déjà la maladie de la tache noire à la période hivernale. Mourichon et al. (1987) ont indiqué que la maladie de la tache noire était liée à l'humidité relative lors de l'anthèse. La dynamique de l'infestation saisonnière est liée aux conditions climatiques dans la période suivant l'induction florale. De plus, les précipitations élevées associées à des températures fraîches (16-20°C) favorisent l'apparition de la maladie. Ces conditions seraient propices à la multiplication de l'inoculum (Mourichon 1983). D'autres auteurs ont souligné l'importance des conditions climatiques, en particulier des températures fraîches, associées à un stress hydrique dû à un excès ou à un manque d'eau, pendant la phase de forçage (induction forcée de la floraison avec l'éthéphon) (Guerout 1974). A Hawaï, Rohrbach and Taniguchi (1984) ont repéré les principales périodes de contamination pour le 'Cayenne lisse' et d'autres cultivars. Ainsi, les symptômes sont positivement corrélés avec le nombre d'heures de froid (16-21°C) et les précipitations pendant la période de floraison et les semaines suivant celle-ci. Au contraire, des températures élevées ont empêché ce phénomène sur le cultivar 'Queen' cultivé en Côte d'Ivoire (Teisson 2002). En Martinique, il a été montré que l'inoculum de *Penicillium funiculosum* pouvait se conserver dans le sol. Cependant, l'incidence de la maladie ne va pas dépendre exclusivement de la quantité d'inoculum dans le sol, puisque des sols avec une forte concentration d'inoculum ont pu présenter une faible incidence de la maladie (Marie et al. 2000). Fournier et al. (2015) ont également observé que le champignon était présent depuis la plantation, tout en confirmant que la contamination avait bien lieu lors de la floraison. Une corrélation a été établie entre l'incidence de la maladie et l'altitude du lieu de culture, couplée à une forte pluviométrie. Il a été conclu que la présence de la maladie de la tache noire dans les ananas, ne peut pas être uniquement expliquée par les conditions climatiques au moment de la phase d'infection par *Fusarium* sp.

Influence des facteurs biotiques propres au fruit

Il a également été montré que les facteurs biotiques influencent l'apparition de la maladie. Tous les auteurs s'accordent à dire qu'il y a une différence de sensibilité en fonction des cultivars, la variété 'Queen' étant la plus sensible (Fournier et al. 2015). Mourichon (1997) expliquait que la phase de latence était provoquée par des composés présents dans la pulpe qui empêcheraient le développement du champignon. La concentration en acide ascorbique du fruit a été déterminée comme le facteur influençant le plus l'occurrence de la maladie sur le cultivar 'Cayenne lisse' en Martinique (Marie et al. 2000). Plus sa teneur est élevée, et moins le fruit est taché, le climat ayant une incidence directe sur cette teneur. Guerout (1974), en se basant sur des travaux antérieurs, note que les fruits ayant une teneur en sucre élevée et un pH faible sont très souvent sains. Enfin, le calcium, apporté par les amendements, permettrait de lutter contre le développement de la maladie, peut-être par son action pariétale. Les travaux de Gouache (2005) contredisent pourtant cet effet du calcium et du magnésium.

Des recherches ont montré que la couleur des taches est due à l'oxydation de composés phénoliques par des polyphénols oxydases (Avallone et al. 2003). Les composés phénoliques avaient jusqu'ici été observés dans les ananas en réponse à un refroidissement ou une blessure. Mais leur teneur étant plus importante dans les fruits contenant des taches que dans les fruits sains, ils sont donc aussi synthétisés en réponse à une attaque fongique. Ce type de réponse de la plante a également été observé chez le maïs lors de sa contamination par *Fusarium graminearum*, responsable de la fusariose de l'épi. Atanasova-Penichon et al. (2012) ont démontré que chez les variétés de maïs les plus résistantes à cette maladie, l'infection du pathogène entraînait la synthèse d'acides phénoliques dans le grain, et plus particulièrement d'acide chlorogénique.

Les champignons responsables de la tache noire

Depuis la première description de la maladie, de nombreux chercheurs ont tenté de décrire les agents pathogènes. Au fil des recherches les auteurs se sont accordés pour dire que les deux champignons responsables de la maladie de la tache noire appartiennent aux genres *Fusarium* et *Penicillium*.

Fusarium ananatum

Fusarium est un genre de champignons filamenteux d'ascomycètes largement distribués dans le monde. La majorité des espèces de *Fusarium* sont saprophytes mais certaines peuvent induire des maladies chez les plantes, les humains et les animaux domestiques, e. g., (Boonpasart et al. 2002; Goldschmied-Reouven et al. 1993; Krcmery et al. 1997; Martino et al. 1994; Rebell 1981; Vismer et al. 2002). Le taux de mortalité chez les patients humains atteints d'infections systémiques à *Fusarium* est de plus de 70% (Krcmery et al. 1997) et les patients infectés par le VIH sont également sensibles à des infections par *Fusarium* (Eljaschewitsch et al. 1996; Guarro et al. 2000). De plus, les champignons du genre *Fusarium* produisent des métabolites secondaires utilisés commercialement, soit directement, soit en tant que matériau de départ pour les synthèses chimiques des promoteurs de croissance des végétaux et animaux.

Le genre comprend également des agents pathogènes végétaux économiquement importants responsables de maladies chez plusieurs hôtes de plantes (Baayen, 2000, O'Donnell et al., 2009a). Les maladies causées par *Fusarium* sur plantes ont eu plusieurs impacts majeurs. La 'Panama disease' provoquée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* dévasta la production mondiale de banane dans les années 1960 et continue de sévir à l'heure actuelle (Ploetz 2015). La maladie du 'Fusarium head scab' du blé et d'orge entraîna des pertes de plusieurs milliards de dollars aux États-Unis qui poussèrent de nombreux producteurs à la faillite (Windels 2000).

De nombreuses plantes ont au moins une maladie associée au genre *Fusarium*. C'est le cas de l'ananas qui doit faire face à la fusariose provoquée par *F. guttiforme* et la maladie de la tache noire provoquée par *F. ananatum*. La fusariose a décimé la variété d'ananas produite en Amérique latine durant la deuxième moitié du vingtième siècle (Matos 1987; Ploetz 2006). Quant à la maladie de la tache noire, aucun état des lieux n'a été réalisé à l'heure actuelle mais son expansion inquiète au plus haut point les producteurs de la région de l'Océan Indien (Fournier et al. 2015; Manicom et al. 2006).

Taxonomie de Fusarium ananatum

Le genre *Fusarium* a été introduit par Link (1809) puis fut largement débattu. Un processus d'identification simplifié a été proposé par Wollenweber et Reinking (1935), qui ont divisé le genre en fonction de la morphologie des spores. Cette étude a classé 1000

isolats en 16 sections, 65 espèces, 55 variétés et 22 formes. Snyder et Hansen (1940) ont comprimé les 16 sections en 9 espèces. De nombreuses autres classifications ont été faites pour améliorer la classification taxonomique du genre (Booth 1971; Nelson and WFO Toussoun 1983). Dans les années 1990 le séquençage d'ADN bouleversa encore une fois la classification. A l'heure actuelle, les travaux se basent sur le manuel de Leslie et Summerell (2006) qui dénombrent 70 espèces auxquelles il faut rajouter *Fusarium ananatum*.

Jacobs et al. (2010) ont décrit cette nouvelle espèce en comparant deux champignons du genre *Fusarium* pathogènes sur ananas. La maladie causée par *F. guttiforme* se produisait seulement en Amérique du Sud et centrale. L'observation d'une maladie ressemblante en Afrique du Sud a entraîné une réévaluation du *Fusarium* sp. associé à la maladie de la tache noire de l'ananas. Les gènes codant pour 'histone H3', 'translation elongation factor 1 alpha' (TEF-1 α) et ' β -tubulin' ont servi pour l'identification de cette nouvelle espèce. Le TEF-1 α est couramment utilisé pour distinguer des génotypes étroitement liés, en particulier pour le genre *Fusarium* (Jurado et al. 2010; Kristensen et al. 2005; Stępień et al. 2011). Les données phylogénétiques et morphologiques montrent que la maladie de la tache noire en Afrique du Sud est causée par une nouvelle espèce de *Fusarium* décrite comme *F. ananatum* sp. nov.. Le champignon a depuis été isolé par Stępień et al. (2013) sur fruits issus du commerce et par Gu et al. (2015) pour la première fois en Chine.

Caractéristiques morphologiques

La croissance du mycélium aérien se caractérise par la formation de cercles concentriques. Le mycélium aérien est de couleur safran sur PDA (Figure 7).

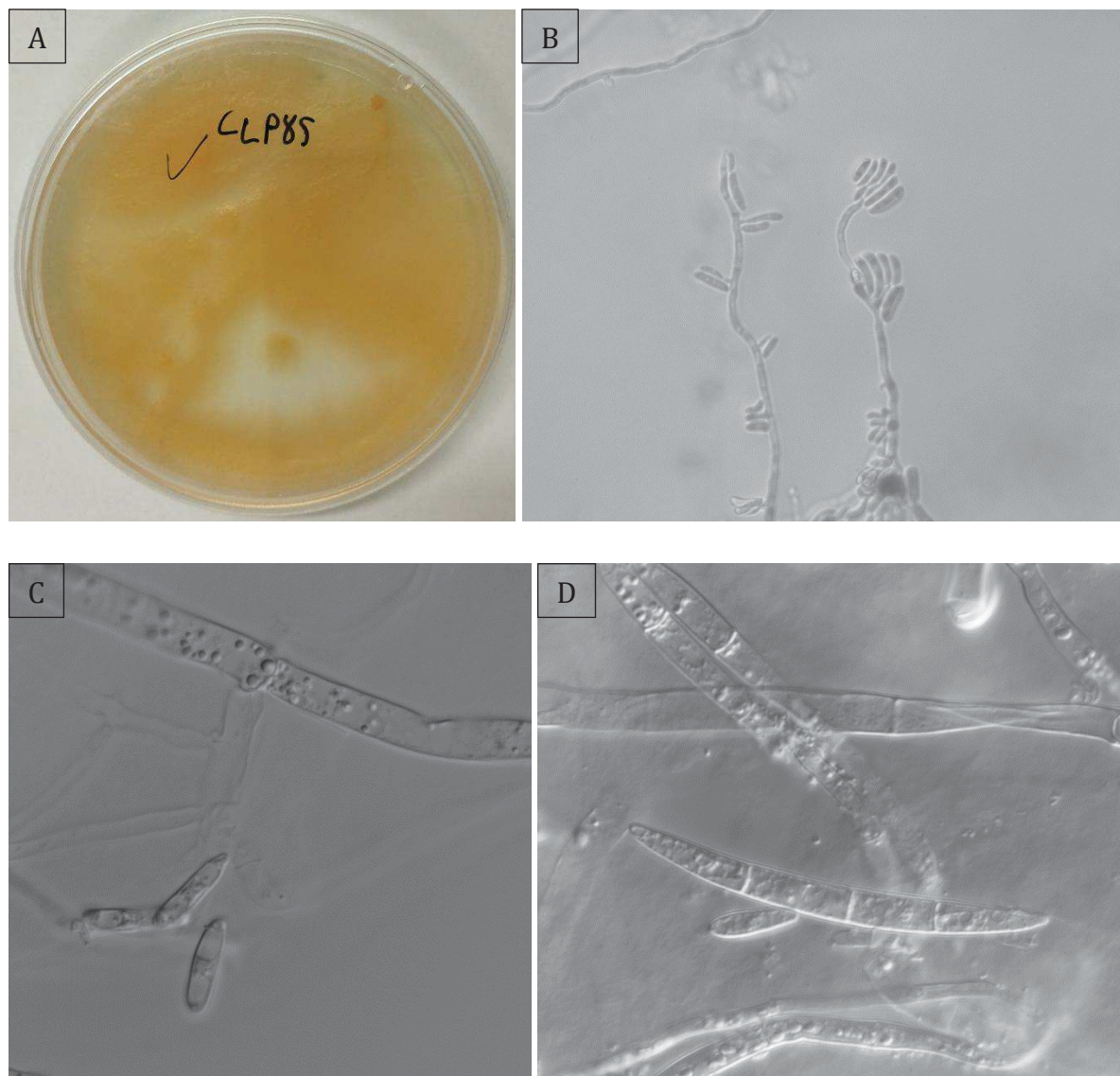


Figure 7 Caractéristiques morphologiques de *Fusarium ananatum*. (A) Colonie sur milieu PDA après 7 jours à 25°C. (B) Fausses conidies sur carnation leaf agar (CLA). (C) Microconidies sur CLA. (D) Macroconidies sur CLA.

Les microconidies et les macroconidies sont visibles sur PDA mais les sclérotés et les chlamydospores sont absents. Les hyphes mesurent trois à cinq micromètres de largeur. Les conidies s'accumulent dans de fausses têtes. Les microconidies et les macroconidies fonctionnent comme inoculum dans les plantes. L'identification morphologique des espèces de *Fusarium* est basée sur la forme et la taille de ces conidies. Dans le cas de *F. ananatum*, les microconidies mesurent entre un et deux micromètres avec zéro septum

voire un septum mais moins fréquemment. Dans le cas de *F. oxysporum* les microconidies sont ovales et sans septum. Chez *F. proliferatum*, les microconidies sont en forme de club avec zéro septum. Les macroconidies chez *F. ananatum* sont presque droites avec des parois fines et trois à quatre septa. Dans le cas de *F. oxysporum* les macroconidies sont courtes avec trois septa. Alors que pour *F. proliferatum*, les macroconidies sont relativement droites avec trois à cinq septa.

Pathogénicité de Fusarium ananatum

À l'heure actuelle, on ne sait rien de la pathogénicité de *F. ananatum*. Le champignon est étroitement associé à la pourriture des fruits et c'est très probablement la cause de cette maladie. Cependant, des tests de pathogénicité seront nécessaires pour déterminer son importance relative en tant qu'agent pathogène. Il est probable que les études antérieures qui décrivaient *F. verticillioides*, anciennement *F. moniliforme* (Manicom et al. 2006; Petty et al. 2005), comme agent pathogène de la maladie de la tache noire désignaient en fait *F. ananatum*.

Les mycotoxines

Certains champignons ont la capacité de produire des métabolites secondaires toxiques, les mycotoxines. Celles-ci sont définies comme des métabolites fongiques de faibles poids moléculaires (entre 150 et 500 daltons) qui sont toxiques pour les vertébrés, donc pour l'homme et de nombreux animaux avec des effets très variés : immunotoxiques, neurotoxiques, cardiotoxiques, et voire cancérogènes et tératogènes (AFSSA 2009). Une réglementation européenne stricte a été mise en place depuis 2001 et concerne principalement les céréales (maïs, blé, orge...) et les fruits, surtout raisin et pomme (Règlement (CE) No 1881/2006 de la commission européenne). Une espèce fongique peut produire différentes toxines et une mycotoxine peut être synthétisée par plusieurs espèces, parfois de genres différents. En tant que métabolites secondaires elles font partie de l'arsenal de défense des champignons contre les bactéries, les autres champignons ou les animaux, mais les facteurs déclencheurs de leur production ne sont pas toujours connus.

Certaines espèces de *Fusarium* produisent des mycotoxines qui affectent gravement la santé humaine et animale si elles entrent dans la chaîne alimentaire. La capacité de ce champignon particulier à provoquer des maladies chez les plantes et les humains a

encouragé des recherches importantes sur ce genre. Des mycotoxines produites par certains de ces champignons ont servi comme armes biologiques (Rosen and Rosen 1982).

L'espèce *F. ananatum* appartenant au genre *Fusarium* pourrait potentiellement produire des mycotoxines qui sont apparentées à ce genre producteur. Les groupes de mycotoxines produites par *Fusarium* sont : les trichothécènes (T-2 et HT-2, diacétyscirpénol (DAS), monoacétyscirpénol (MAS), néosolaniol (NEO), déoxynivalénol (DON), et nivalénol (NIV)), les zéaralénones (EA ou ZON) et les fumonisines divisées en quatre groupes : fumonisine A, B, C et P (Ferrigo et al. 2016). Le groupe B qui est le plus abondants se subdivise en fumonisine B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) et B₃ (FB₃), où FB₁ est la mycotoxine la plus toxique (da Silva Bomfim et al. 2015). Parmi les mycotoxines produites par les espèces du genre *Fusarium* on retrouve également la fusarine, les fusaproliferines (FUS), l'acide fusarique ainsi que la beauvericine (BEA), la moniliformine (MON) et les enniatines. La beauvericine (BEA), la moniliformine (MON) et les enniatines sont des toxines dites émergentes.

Fusarium ananatum a été démontré comme producteur de beauvericine et de fumonisine B₁ *in vitro* (Stępień et al. 2013). La beauvericine a d'abord été isolée de *Beauveria bassiana* (Hamill et al. 1969) mais est produite par de nombreux champignons du genre *Fusarium* (Logrieco et al. 1998). La Beauvericine est un hexadepsipeptide cyclique qui appartient à la famille des antibiotiques enniatines. Cette molécule a des activités antimicrobiennes, antitumorales et insecticides qui lui valent d'être commercialisées. Étant donné que la beauvericine est une mycotoxine, la toxicité pour les cellules humaines a été étudiée et les méthodes de détection pour la sécurité alimentaire ont été développées (Ganassi et al. 2002; Plattner and Nelson 1994). Bien que la découverte de la structure de FB₁ soit récente (Bezuidenhout et al. 1988), son mode d'action est en partie élucidé. Elle agit sur la voie de biosynthèse des sphingolipides en inhibant de façon compétitive la céramide synthase (Merrill et al. 1997; Tsunoda et al. 1998). Cette perturbation de la synthèse des sphingolipides entraîne une accumulation en bases sphingoïdes (la sphinganine et dans une moindre mesure la sphingosine ainsi que leurs métabolites) et une déplétion en céramide et en sphingolipides complexes. Cette rupture de métabolisme provoque de nombreux bouleversements biochimiques. La mycotoxine FB₁ est neurotoxique, hépatotoxique et néphrotoxique chez les animaux, et classé comme cancérigène possible

chez les humains. Les mécanismes cellulaires derrière la toxicité induite par FB₁ incluent l'induction du stress oxydatif, de l'apoptose et de la cytotoxicité, ainsi que des altérations de l'expression des cytokines (Stockmann-Juvala and Savolainen 2008).

Talaromyces stollii* / *Penicillium funiculosum

Tryon (1898) attribuait déjà les symptômes de la tache noire à un champignon du genre *Penicillium*. Doidge et al. (1953) furent les premiers à descendre jusqu'à l'espèce en désignant *Penicillium funiculosum* comme agent responsable, en se basant sur ses caractéristiques morphologiques. Depuis lors, tous les auteurs ont utilisé ce nom dans leurs travaux.

Les champignons du genre *Penicillium* appartiennent à la classe des ascomycètes. On les retrouve dans le sol, généralement présents partout où les matières organiques sont disponibles. Les espèces saprophytes de *Penicillium* vivent principalement de substances organiques biodégradables. Certaines de ces moisissures sont parmi les principales causes de détérioration des aliments (Samson et al. 2004). Leur capacité à se développer sur les graines et autres aliments stockés dépend de leur propension à prospérer dans une faible humidité et à coloniser rapidement par dispersion aérienne tandis que les graines sont suffisamment humides. De nombreuses espèces produisent des mycotoxines hautement toxiques. Certaines espèces sont phytopathogènes comme *P. expansum* sur pommes et poires (Andersen et al. 2004); *P. digitatum* sur agrumes (Daferera et al. 2000); et *P. allii* sur ail (Valdez et al. 2006). D'autres sont pathogènes pour les animaux et les humains comme *P. marneffei* qui infecte de façon opportuniste les personnes infectées par le VIH en Asie du Sud-Est (Ustianowski et al. 2008).

En revanche certaines espèces revêtent une importance économique comme dans les industries agroalimentaire et pharmaceutique. *Penicillium camemberti* et *P. roqueforti* sont les moisissures du Camembert, Brie, Roquefort et beaucoup d'autres fromages. *Penicillium nalgiovense* sert à améliorer le goût des saucissons et des jambons secs et à prévenir la colonisation par d'autres moisissures et bactéries (Färber and Geisen 1994). Les espèces de *Penicillium* servent à la production d'un certain nombre d'enzymes biotechnologiques et d'autres macromolécules telles que les acides glucuronique, citrique et tartrique, ainsi que plusieurs pectinases, lipases, amylases, cellulases et protéases. La pénicilline, médicament très répandu au vingtième siècle, est un antibiotique produit par

P. chrysogenum. D'autres espèces produisent des composés capables d'inhiber la croissance des cellules tumorales *in vitro* qui comprennent : *P. pinophilum* (Nicoletti et al. 2009), *P. canescens* et *P. glabrum* (Nicoletti et al. 2008).

Taxonomie de Talaromyces stollii / Penicillium funiculosum

Le genre *Penicillium* a dans un premier temps été décrit par Link (Link 1809). Par la suite, Pitt (1979) a divisé le genre *Penicillium* en quatre sous-genres basés sur la morphologie des conidiophores et leur motif de ramification : *Aspergilloides*, *Biverticillium*, *Furcatum* et *Penicillium*. L'espèce *Penicillium funiculosum* appartient au sous-genre *Biverticillium*. Des études se basant sur des séquences d'ADN ITS, SSU et/ou LSU montrent que le sous-genre *Biverticillium* est distinct des autres sous-genres de *Penicillium* et doivent être taxonomiquement unifié avec les espèces sexuées de *Talaromyces*, qui résident dans le même clade. En suivant les concepts de nomenclature prioritaire et nomenclature à nom unique, toutes les espèces acceptées de *Penicillium* sous-genre *Biverticillium* ont été transférées à *Talaromyces*. C'est ainsi que *Penicillium funiculosum* se nomme maintenant *Talaromyces funiculosus* (Samson et al. 2011).

Le genre *Talaromyces* a été décrit par Benjamin (1955) comme l'état sexué de *Penicillium* qui produit des ascospores recouverts d'hyphes entrelacés. L'espèce *Talaromyces stollii* a été isolée la première fois par Yilmaz et al. (2012) de poumons de patients immunodéprimés en Hollande. Ils le décrivent comme un champignon saprophyte.

Caractéristiques morphologiques

Le champignon filamenteux *Talaromyces stollii* se développe bien à des températures élevées, de l'ordre de 37°C. Le champignon a un aspect cotonneux produisant des acides organiques sur milieu de culture. La partie aérienne du champignon est de couleur verte et la partie immergée dans le milieu PDA est rouge-orangée. Les conidiophores sont ramifiés de façon biverticilliées. Les conidies ont une forme ellipsoïdale et mesurent entre deux et quatre micromètres.

Les mycotoxines

Les principales mycotoxines produites par les champignons du genre *Penicillium* sont l'ochratoxine A et la patuline (Desjardins and Hohn 1997). L'ochratoxine A que l'on retrouve dans de nombreuses denrées alimentaires a des propriétés cancérigènes, néphrotoxiques, tératogènes, immunotoxiques et éventuellement neurotoxiques. Elle a

également été associée à la néphropathie chez les humains (Amezqueta et al. 2012; Moss 2002). Les symptômes de la patuline chez l'homme se manifestent par des lésions congestives au niveau des poumons, des reins et de la rate à faible dose. La patuline provoque une dégénérescence des neurones du cortex cérébral, d'où peuvent résulter divers symptômes nerveux dont la paralysie (da Rocha et al. 2014). *Talaromyces funiculosus* peut produire les acides secaloniques A et D (Yilmaz et al. 2014). L'acide secalonique D est un métabolite toxique et tératogène. Des effets tératogènes ont été observés dans le développement de rats auxquels exposés à l'acide secalonique pendant le développement du fœtus (Masters and Bräse 2012). *Talaromyces stollii* est capable de produire de l'austine. Des espèces proches de *T. stollii* sont connues pour leurs productions de rubratoxine A et B, rugulovasine A et B, et d'acide spiculisporique (Yilmaz et al. 2014). Mais cette espèce n'a jamais été décrite comme productrice de mycotoxines comme celles répertoriées et réglementées pour le genre *Penicillium*.

Les deux espèces de champignons *F. ananatum* et *T. stollii*, appartiennent à des genres fongiques connus pour leurs productions de mycotoxines. Cependant une seule publication fait état de présence de mycotoxines dans des ananas commerciaux provenant d'Amérique centrale ou d'Asie (Stępień et al. 2013).

Interaction plante-pathogène

L'interaction plante-microorganisme peut être classée comme bénéfique, préjudiciable ou neutre (Schenk et al. 2012). Les interactions plantes-pathogènes ont reçu une attention particulière dans la recherche agronomique afin de comprendre comment la plante et le pathogène se reconnaissent et se différencient pour établir une relation compatible ou incompatible (Mehta et al. 2008). Le champignon pathogène devra surmonter différentes réactions de défense des plantes à différents stades de pénétration et de colonisation. Au cours de l'étape finale de l'infection, le champignon sécrète des enzymes lytiques et des toxines qui conduisent aux symptômes de la maladie, comme la nécrose, la chlorose et le flétrissement. Dès que la plante reçoit des signaux de présence du pathogène, des mécanismes de défense tels que l'épaississement de la paroi cellulaire végétale, le dépôt de papilles, l'acidification apoplastique, la transduction du signal et la transcription des gènes de défense sont initiés (Mehta et al. 2008). Seul un agent pathogène réussi à dépasser ce mécanisme de défense de base de la plante et à développer une maladie chez l'hôte.

Les plantes ont développé des éléments constitutifs (barrières telles que la paroi cellulaire, les cuticules et les écorces) et des défenses induites (production de toxines et enzymes dégradant le pathogène) afin de se protéger contre les agents pathogènes (Freeman and Beattie 2008). La plante déclenche une série de réponses cellulaires et physiologiques après avoir reconnu les signaux du pathogène (Wu et al., 2014)

Reconnaissance du pathogène par la plante

Une reconnaissance rapide est nécessaire pour que la plante se défende avec succès. Les PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) sont les motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes identifiés par les récepteurs de reconnaissance des agents pathogènes (PRR), qui sont des récepteurs de la surface cellulaire et des gènes R (Swarupa et al. 2014). Chaque groupe de micro-organismes possède un certain nombre de PAMP caractéristiques. Parmi les PAMP, on trouve des composants des parois bactériennes (lipopolysaccharides, peptidoglycanes) et des flagelles (flagelline), des mannanes de champignons, des acides nucléiques bactériens et viraux. Les PRR détectent l'agent pathogène ce qui active les mécanismes de défense de la plante (Heese et al. 2007; Li et al. 2012).

Les gènes de résistance (gènes-R)

Les agents pathogènes végétaux produisent certaines molécules appelées “éliciteurs”, codées par des gènes *Avr* (avirulence), directement dans les cellules végétales au stade initial de l'infection. Ces éliciteurs modifient l'état physiologique de la plante hôte afin de favoriser la colonisation des agents pathogènes ou interrompent l'activation des défenses par la plante hôte (Hammond-Kosack and Kanyuka 2007). Cependant, les plantes ont développé les gènes-R dont les produits permettent la reconnaissance des éliciteurs. Ces facteurs de virulence ont conduit à la coévolution des gènes de résistance des plantes pour lutter contre les gènes *Avr* des agents pathogènes (Jones and Dangl 2006). Des gènes de résistance majeure ont été trouvés contre *F. oxysporum* chez la tomate (Simons et al. 1998) et le concombre (Vakalounakis 1996).

Production des espèces réactives d'oxygène (ROS)

La production de ROS, telles que les ions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles, est observée lors d'une attaque par des agents pathogènes. L'accumulation rapide de ROS végétales (éclatement oxydatif) entraîne des changements

du pH cellulaire, la phosphorylation des protéines et un afflux d'ions. Les ROS servent également de signaux pour l'activation d'autres mécanismes de défense tels que l'expression des gènes de défense, l'épaississement des parois, le dépôt de callose et la résistance systémique acquise (Gill and Tuteja 2010; O'Brien et al. 2012). Une étude menée sur les protéines impliquées dans la réponse à une inoculation par *Fusarium oxysporum* sur différentes variétés de pois montre que les protéines liées aux ROS s'expriment plus sur les variétés sensibles et partiellement résistantes. (Castillejo et al. 2015). L'ascorbate participe activement à la réduction des ROS, soit directement donnant du dehydroascorbate puis de l'acide 2,3-dicétogulonique, soit par le biais du cycle ascorbate/glutathion permettant une régénération partielle de l'ascorbate (Mittler 2002).

Flux de calcium

Une augmentation du niveau de Ca^{2+} dans le cytosol cellulaire en réponse à divers PAMP est fréquente chez les plantes. Le calcium agit comme un messager secondaire, qui transmet les signaux pathogènes reçus aux récepteurs cellulaires au cytosol et active les réponses de la défense. Il existe trois principaux types de capteurs de Ca^{2+} dans les plantes, qui sont la calmoduline, les protéines de type Calcineurine B (CBL) et les protéines kinases dépendantes du calcium (CDPK) (Luan 2009).

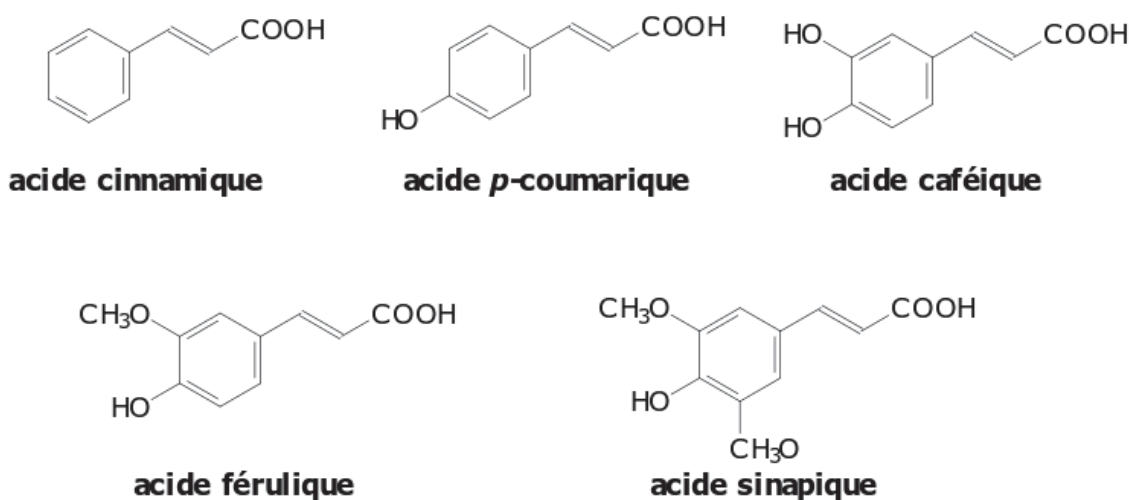
Les composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. Ces métabolites secondaires ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Tableau 1).

Tableau 1 Principales classes de composés phénoliques

Squelette carboné	Classe	Exemple
C ₆	Phénols simples	Catéchol
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	Acide coumarique
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes - Isoflavanoïdes	Cyanidine
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines	/
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés	/

Les acides hydroxybenzoïques dérivent de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆-C₁. On les retrouve plutôt sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent être intégrés dans des structures complexes comme certains tanins. Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide *p*-cinnamique. Ils existent également sous forme d'esters et de glycosides (Figure 8).

**Figure 8** Exemple d'acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés

L'étape initiale dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est la désamination de la phénylalanine en acide cinnamique catalysée par la phénylalanine ammonialyase

(PAL), enzyme clef du métabolisme des composés phénoliques. L'acide cinnamique est le précurseur immédiat des phénols et permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques (Figure 9). La lignine résulte de la polymérisation tridimensionnelle de trois unités phénoliques de bases dénommées monolignols, et qui sont les alcools coumarylique, coniférylique et sinapylique, dérivant respectivement des acides *p*-coumarique, férulique et sinapique (Meyer et al. 1998; Vanholme et al. 2010).

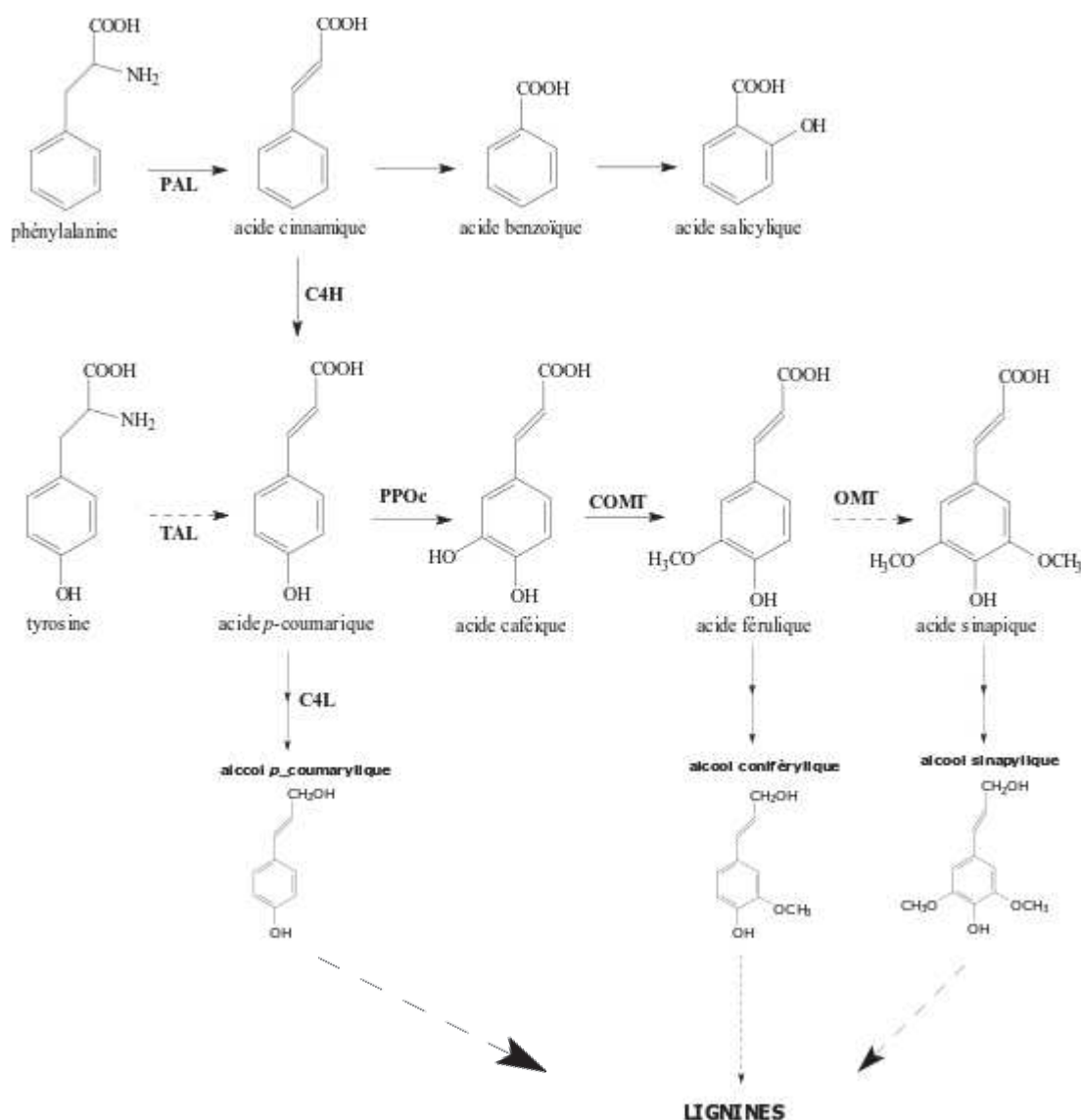


Figure 9 Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes ; PAL : phénylalanine ammonialyase ; TAL : tyrosine ammonialyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; PPOc : activité crésolase de la polyphénol oxydase ; COMT : caféate-O-méthyl transférase ; OMT : O-méthyl transférase ; C4L : p-coumarate CoA ligase. D'après Vanholme et al. (2010)

Les rôles de la lignine sont de conférer une rigidité aux parois cellulaires et de permettre aux plantes de se développer à la verticale, aider au transport des solutés en diminuant la perméabilité des parois cellulaires dans les tissus conducteurs du xylème, et agir comme

barrière physique à la colonisation des pathogènes (Higuchi 1981; Iiyama et al. 1994; Miedes et al. 2014; Nicholson and Hammerschmidt 1992).

En plus de sa fonction dans la biosynthèse de la lignine, la voie des phénylpropanoïdes participe à la synthèse de nombreux autres composés phénoliques, tels que les stilbènes, les coumarines, les néo-lignanes, les conjugués phénylpropanoïdes et les flavonoïdes (Dixon and Paiva 1995; Lo and Nicholson 1998; Naoumkina et al. 2010). La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes peut être canalisée lors de stress biotiques ou abiotiques. Chez le concombre, la régulation positive de la voie des phénylpropanoïdes favorise surtout la branche menant au *p*-coumaryl alcohol; l'activité de l'HCT hydroxycinnamoyl transferase est diminuée (Varbanova et al. 2011). Dans le cas du tabac, l'inhibition de la PAL entraîne une diminution des niveaux en acide chlorogénique et un développement de lésions plus rapide et plus étendu que les plantes de type sauvage après infection par le pathogène fongique *Cercospora nicotianae* (Maher et al. 1994).

De nombreux composés intermédiaires de cette voie sont considérés comme des phytoalexines (Dixon and Paiva 1995; McKeehen et al. 1999). Les acides hydroxycinnamiques ont des propriétés antifongiques. Les fleurs et fruits de lierre riches en acide *p*-coumarique, acide férulique et quercetol possèdent une activité antifongique sur les champignons *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *tulipae*, *Penicillium gladioli* and *Sclerotinia sclerotiorum* (Parvu et al. 2015). L'addition d'acide férulique et d'acide *p*-coumarique au milieu de culture réduit la croissance de *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* (McKeehen et al. 1999). Une concentration de 0.36 g L⁻¹ d'acide coumarique inhibe 50% du développement mycélien d'une souche de *Fusarium verticillioides* isolée de maïs (Zabka and Pavela 2013).

Les composés phénoliques sont également importants dans la reconnaissance des phytopathogènes. Par exemple, l'expression de gènes de Virulence (Vir) d'*Agrobacterium tumefaciens*, est induite par des composés phénoliques et l'infection de la plante hôte ne peut avoir lieu en l'absence de ces composés (Lee et al. 1995; Peng et al. 1998).

L'oxydation de composés phénoliques, particulièrement celle des o-diphénols par les polyphénoloxydases et les peroxydases conduit à l'accumulation d'o-quinones dont la polymérisation entraîne un brunissement de la zone nécrosée (Clérivet et al. 1996).

Hormones de défense

Les hormones végétales, y compris l'acide salicylique (SA), l'acide Jasmonique (JA), l'éthylène (ET) et l'acide abscisique (ABA) jouent un rôle important dans la régulation des réponses de défense des plantes. SA est efficace pour la médiation de la résistance des plantes contre les pathogènes et l'établissement d'une résistance systémique acquise. Les niveaux de SA augmentent dans de nombreuses réponses de défense des plantes, ce qui induit les gènes liés à la pathogénèse (PR). D'autre part, JA et ET sont activés dans la réponse de la défense à des stress biotiques et abiotiques (Dat et al. 2000; Maschietto et al. 2015). L'ABA a un rôle dans la signalisation de la réponse de la plante aux stress abiotiques. L'ABA est également connu pour sa régulation négative, où il inactive parfois d'autres voies de signalisation (Swarupa et al. 2014).

Problématique scientifique et démarche générale

Les consommateurs sont à la recherche de produits alimentaires alliant qualité organoleptique et sanitaire issus de cultures respectant un itinéraire technique durable et raisonné. L'ananas 'Queen' (Victoria), produit emblématique de l'île de la Réunion, est reconnu pour son parfum et sa saveur exceptionnelle. L'augmentation des surfaces dédiées à sa culture témoigne de son succès. Cependant, la maladie de la tache noire qui affecte les fruits à maturité est devenue une des préoccupations majeures du secteur. Les exportateurs et restaurateurs refusent les lots d'ananas tachés, les consommateurs s'inquiètent des dangers que peuvent représenter cette maladie pour leur santé.

Cette étude a été entreprise dans ce contexte, dans le but d'améliorer nos connaissances sur le pathosystème champignon-ananas. Cette connaissance est une condition préalable au développement ultérieur de programmes de prévention et maîtrise adaptés à la maladie de la tache noire.

Dans cette perspective, plusieurs questions spécifiques de recherche ont été posées :

- Quelle est l'occurrence réelle de la maladie de la tache noire sur l'île de la Réunion ?
- Existe-t-il un lien entre pratiques culturales et occurrence de la maladie ?
- Quelles sont les espèces de champignons filamenteux pathogènes impliquées ?
- Comment se répartissent les espèces de champignons sur l'île de la Réunion ?

- Cette maladie a-t-elle une incidence sanitaire pour le consommateur : les agents pathogènes sont-ils producteurs de mycotoxines ?
- Quelle est la réponse biochimique de l'ananas suite à l'infection du pathogène ?
- Quelle est l'histo-pathogénicité de *Fusarium* dans les fruits d'ananas ?
- Comment se différencie le cultivar résistant du cultivar sensible ?

Les travaux entrepris pour répondre aux questions de recherche présentées ici seront traitées au sein des trois chapitres suivants.

Le **Chapitre 2** fait un état des lieux de la maladie de la tache noire sur l'île de la Réunion. Des entretiens ont été menés auprès des producteurs d'ananas pour déterminer l'occurrence de la maladie et son lien possible avec certaines pratiques culturales. Une collection de champignons filamenteux isolés d'ananas a été réalisée, ce qui a permis d'étudier la diversité et le potentiel toxigène des isolats. La première partie intitulée *Diagnostic survey on the occurrence of pineapple fruitlet core rot and relationship with phenolic compounds in Réunion Island* a fait l'objet d'une communication orale lors du congrès ISHS *Postharvest Pathology* en Afrique du Sud. La deuxième partie *Diversity and toxigenicity of fungi causing pineapple fruitlet core rot disease* fera l'objet d'une soumission au journal *Food Microbiology*.

Le **Chapitre 3** décrit la réponse biochimique du fruit suite à l'inoculation de *Fusarium ananatum*. Une technique d'inoculation du pathogène a été mise au point pour suivre la progression de la maladie. Pour suivre la réponse du fruit une méthode d'extraction des métabolites libres a également été mise en place sur pulpe d'ananas. Ce chapitre se décline en trois parties : l'article *Coumaroylquinic and chlorogenic acids as markers of the pineapple fruitlet core rot disease* est actuellement en phase d'évaluation dans la revue *Fruits*, l'article *Evaluating the response to Fusarium ananatum inoculation and antifungal activity of phenolic acids in pineapple* est accepté pour publication dans *Fungal Biology* et enfin une première analyse des données métabolomiques : *Metabolomics analysis suggests the role of maturity in the acquisition of resistance to pineapple fruitlet core rot*.

Le **Chapitre 4** décrit d'abord les différences anatomiques des cavités florales entre les cultivars d'ananas 'MD-2' et 'Queen'. Ce chapitre décrit également la colonisation du pathogène dans le parenchyme ainsi que les modifications structurelles et chimiques des

parois cellulaires des géotypes sensible et résistant, en utilisant des techniques de microscopie multiphoton et spectrale. Toutes ces données feront l'objet d'un article qui sera soumis dans revue *Frontiers in Plant Science*.

Les connaissances acquissent sur les pathogènes, le fruit et leurs interactions seront discutées dans le **Chapitre 5**.

CHAPITRE II

Prévalence, diversité et toxicité des agents pathogènes

Dans la région de l'océan Indien, les producteurs de fruits misent beaucoup sur la culture de l'ananas. Ils se démarquent des principaux pays producteurs en cultivant l'ananas 'Queen' (Victoria) qui possède une forte valeur ajoutée. Mais les producteurs ont régulièrement des retours de lots car les consommateurs attentifs à la qualité du fruit, n'acceptent plus les fruits tachés. La profession est donc particulièrement sensible à cette problématique.

Ce chapitre s'articule autour de deux articles et des résultats d'une étude réalisée sur l'île Maurice. Il traite de la prévalence, de la diversité, de la virulence et du potentiel toxinogène des agents responsables de la maladie de la tache noire.

On s'est rendu compte que l'on ne connaît pas l'impact réel de la maladie sur la production. Des entretiens menés auprès de producteurs réunionnais ont permis de déterminer la prévalence de la maladie. Un lien entre pratique culturale et occurrence de la maladie a également été mis en évidence.

La qualité sanitaire des aliments étant une préoccupation importante il est apparu nécessaire de caractériser la diversité et le potentiel métabolique des différentes espèces de contaminants fongiques impliqués dans la maladie de la tache noire. Une collection de 150 champignons isolés de fruits d'ananas récoltés sur l'île de la Réunion a été caractérisée génétiquement et pour le potentiel toxinogène.

Enfin une étude complémentaire réalisée sur l'île Maurice met en relief l'importance de la maladie de la tache noire dans cette région de l'océan Indien.

Communication orale au IV International symposium on Postharvest Pathology

Diagnostic survey on the occurrence of pineapple fruitlet core rot and relationship with phenolic compounds in Réunion Island

B. Barral¹, L. Filippi¹, M. Chillet¹, M. Léchaudel², and S. Schorr-Galindo³

¹ UMR QualiSud, CIRAD, 7 chemin de l'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, Reunion, France

² UMR QualiSud, CIRAD, Station de Neufchâteau, 97130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe, France

³ UMR QualiSud, Université de Montpellier, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Abstract

Fruitlet core rot (FCR) is a postharvest disease that develops once the pineapple fruit reaches maturity. In the tropical island of Réunion, it mainly occurs during the winter season. The two fungi responsible *Talaromyces stollii* and *Fusarium ananatum* cause black spot in the flesh of the fruit. These internal damages make the FCR difficult to diagnose for the producers and consumers. To get a better idea of the extent of the disease, we conducted a survey of agricultural practices over 27 plots distributed throughout the island. Five hundred forty pineapples were sampled at the same time to determine the occurrence of the disease. During the winter season, almost all pineapples had the FCR symptoms. In order to assess the variability of fruit susceptibility to FCR, 80 pineapple fruits were inoculated with a solution of *Fusarium ananatum* spores (10^3 sp. mL⁻¹). Free and bound phenolic acids were monitored in the healthy and infected fruits. High level of phenolic compounds in healthy fruits provides resistance to FCR. All the infected fruitlets react to the fungal infection with a high accumulation in free and bound phenolic compounds. The links between certain mechanisms of resistance and cultural conditions

are discussed. The problem of the fruitlet core rot is certainly underestimated in view of its strong presence.

Keywords: fruitlet core rot; *Fusarium ananatum*; pineapple; postharvest disease; phenolic acids

Introduction

Pineapple is the first fruit production in Réunion Island and one of the most consumed tropical fruits in the world. Consumer demand increases every year and to meet this demand, producers expand their areas dedicated to pineapple. This intensification favors the development of diseases and notably the fruitlet core rot, a fungal disease.

Fusarium ananatum and *Talaromyces stollii* are the main causal agents. The process of infection start at the flowering stage, the fungus penetrate the plant through the styler canals and nectary ducts (Rohrbach and Pfeiffer 1976). When the fruit ripens, the pathogen emerges from its latency and affects the flesh causing black spot located in the fruitlets. The physiological changes during maturation favor the development of the disease.

Chemical control has been tested (Petty et al. 2005). Two fungicides in combination gave encouraging results. However, they are now submitted to restriction or ban in accordance with European legislation. As these diseases are hard to be controlled with chemical control nowadays, it is important to better understand what fosters its development. Fournier et al. (2015) showed that climatic conditions play a role in the occurrence of the fruitlet core rot. Cold temperatures and high humidity during the open heart to harvest stages promote the appearance of the disease.

If environmental conditions affect the presence of the fruitlet core rot, what about cultural practices?

A diagnostic survey was conducted on the various pineapple production areas of Reunion Island. Firstly, the occurrence of the FCR disease during the winter season was investigated, and the relationships between FCR and the agricultural practices was also

explored. Finally, biochemical analyses were carried out on pineapple fruits and on crown.

Materials and methods

Survey

The survey was conducted during the winter season, between June and October 2016, in the main areas of pineapple production in Réunion Island (Figure 10). Quantitative and open discussion questions were formulated directly at the same time as the sampling. For the quantitative questions, growers were asked to provide average values based on their records for: planting density; amounts of nitrogen (N), phosphorus (P), and potassium (K) applied; total yield; fruit size...

Plot sampling

The 27 plots of pineapples (12 in the east, 12 in the south, 1 in the west and 2 in the north) chosen represent the distribution of pineapple producers. The location of the plots, which is directly related to the temperature and rainfall, and the level of intensification, notably fertilization, planting density and previous crop describe the entire climatic and agricultural practices over the island.

On each selected plot, twenty pineapples at the C3 stage (when the fruit color shell is three-quarter yellow) were harvested and preserved at 22°C for six days.

Assessment of the susceptibility of fruit to FCR

After these 6 days of storage, the number, length and breadth of the natural black spots were measured on the 20 pineapples by separating the upper and lower part of the fruit. The area of the black spots was estimated using the formula for the area of an ellipse. Total soluble solids (°Brix), pH, and titratable acidity of the fruit flesh were also measured.

From the 20 fruits harvested by plot, 4 fruits were inoculated with 25 µL of *Fusarium ananatum* at 1×10^3 spores mL⁻¹, using a 50 µL Hamilton syringe. The fruitlets

were inoculated on one side, at the day of harvest. The healthy part of the fruit and the infected fruitlets were sampled separately, after the 6 days of storage. The area of the black spots was also measured. Free phenolic compounds were extracted as previously described (Barral, 2017). For the bound phenolic acids, 10 mL of ethanol-water solution (80:20, vol:vol) was added to 100 mg of lyophilized pulp and sonicated at 40°C. After centrifugation, only the pellet was kept and 5 mL of NaOH 2N was added for alkaline hydrolysis. After 2 H agitation, pH was adjusted to 5 with HCl. Finally, samples were filtered with a 0.45 µm filter (Millipore) and injected into a high-pressure liquid chromatography (HPLC). Phenolic acids identification was resolved on the basis of ion molecular mass, MS^n , and UV-visible spectra using a LCQ ion trap mass spectrometer fitted with an electrospray interface (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). Quantification of phenolic acids was performed using commercial standards of trans-*p*-coumaric acid, chlorogenic acid, trans-sinapic acid and gallic acid purchased from Sigma-Aldrich (France). HPLC

Diagnosis of mineral nutrition

A sampling of 20 pineapple crown per plot was collected for mineral analysis. The elements analyzed were N, P, K, Ca, Mg, Na, Mn, Fe using the Dumas combustion method and the inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES).

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted in R (R Development Core Team 2015). Due to the large number of quantitative variables from the diagnostic survey and the physicochemical analyses, a Pearson correlation matrix was employed to make a first selection. Then, the variable “number of black spots” has been transformed into qualitative variable and a canonical variate analysis (CVA) was performed.

Results and discussion

Occurrence of the fruitlet core rot

FCR symptoms were present at least once on every plot studied. Regardless of the location of the plots or the technical itinerary, winter conditions are very favorable for the presence of the disease. The disease severity was grouped into five classes ranging from “1-5” black spots to “>20” black spots. Figure 11A shows the distribution of the number of black spots per fruit over the 540 pineapples sampled. 74% of the fruits had at least one black spot. The largest portion of diseased fruits was ranged between one and five spots per fruit. It is noteworthy that 12% of the pineapples sampled had more than 20 black spots per fruit.

The lower part of the fruit has on average more black spots than the upper part as shown in Figure 11B, with respectively 6.5 and 4 black spots. The pineapple is an infructescence; maturity begins at the base and then goes up to the crown (Dou et al. 2010). The lower part is ripe first/earlier with higher sugar levels and structural changes. These conditions favorable to the development of fungi could explain this preferential distribution in the lower part.

Potassium, Nitrogen fertilization and climatic conditions affect FCR occurrence

The canonical variate analysis allowed us to extract variables related to the occurrence of FCR. Pluviometry, N and K inputs affected FCR occurrence (Figure 12). There was a large variation in fertilization; One plot did not receive fertilizer while on others N and K application were up to 400 and 600 kg ha⁻¹ respectively. These high levels correspond to the plots where growers continue to fertilize after flower induction. Moreover, Figure 12A shows that the amount of potassium applied is positively correlated with the resistance of the pineapple FCR up to 600 kg ha⁻¹ and beyond that point the fruit becomes extremely susceptible. Nitrogen follow the same pattern (Figure 12B). A reasoned application of nitrogen and potassium could help to regulate the FCR. Finally, the more the rainfall during flowering stage, the more the fruit is susceptible to FCR (Figure 12C), as shown by Fournier et al. (2015).

Tableau 2 shows the average mineral composition of the crown leaves of the 27 plots. Values of the minerals are similar to those found by Alvarez et al (1993) in the “D” leaves. No significant relation has been made between any of those elements and the susceptibility of the fruit to FCR.

Phenolic acids involved in fruit resistance to FCR

Free and bound phenolic acids were measured in the healthy part of the fruits and in the infected fruitlets. Figure 13 shows levels of phenolics acids measured in the healthy part of the fruits and their relation with fruit disease susceptibility. High levels of phenolic acids provide resistance to FCR. For example, in Figure 13A more than 70% of the fruits were healthy with levels in hydroxybenzoic acids above 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ of FW. The same pattern is observed for the other free phenolic acids. It is also true for the bound phenolic acids, levels above 160 and 1400 $\mu\text{g g}^{-1}$ of FW of coumaric and ferulic acids respectively provide more than 60% of healthy fruits (Figure 13E and 14F). Phenolic acids are known for their implication in plant resistance after pathogen infection.

Conclusion

In favorable conditions, 74% of the fruits were affected by the fruitlet core rot. This is a disturbing figure for places where the ‘Queen’ cultivar is produce, like in Réunion Island. We showed that potassium fertilization was positively correlated to pineapple resistance to FCR. However, very high level of Potassium fertilization which correspond to post floral induction application (survey data), had opposite effect. A reasoned application of nitrogen and potassium could help to regulate the FCR, and application of fertilizer after floral induction should be banned.

Finally, we showed that both free and bound phenolics were involved in the natural resistance of pineapple to fruitlet. It would be interesting to find a way to enhance these compounds in order to reduce the risk of infection by the fungus.

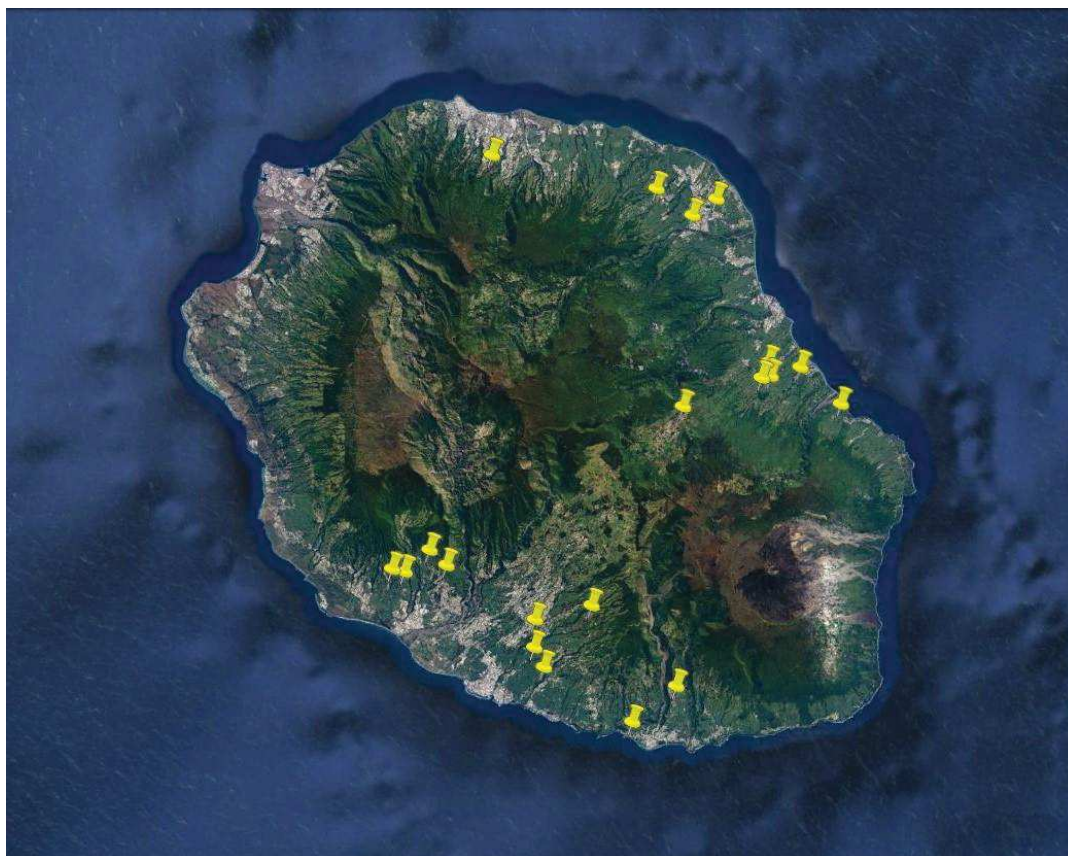


Figure 10 Distribution of pineapple producers on Reunion Island.

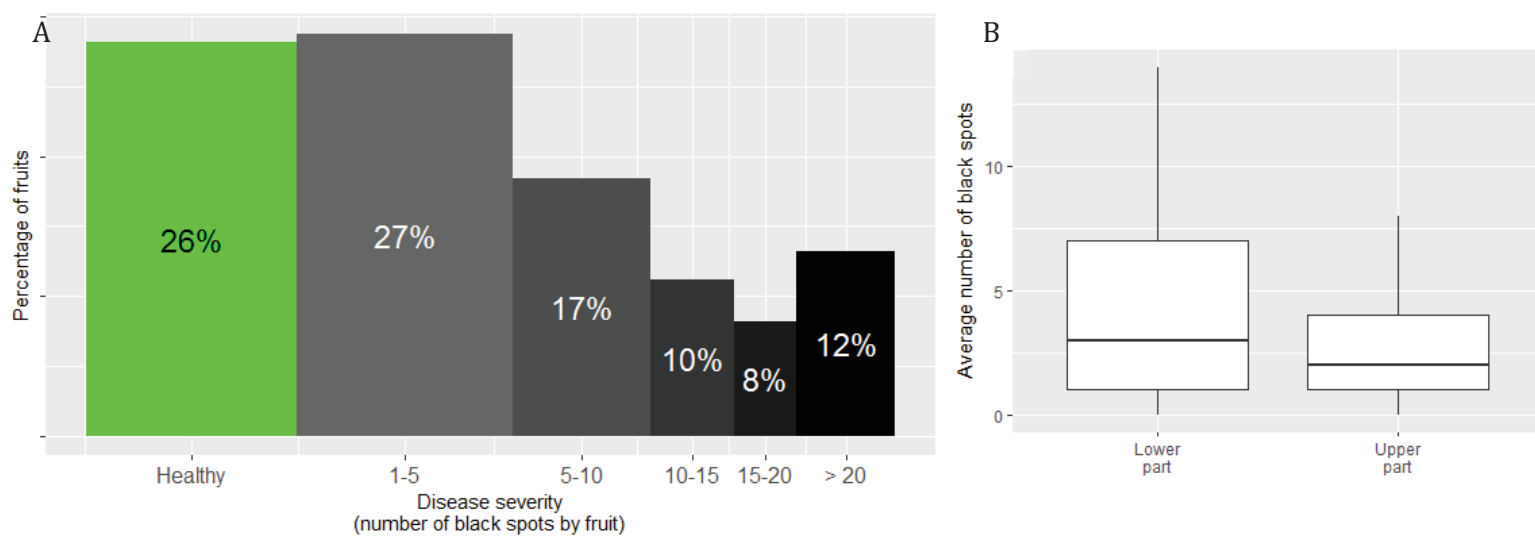


Figure 11 Percentage of healthy fruits (green) and class distribution of the number of black spots (grayscale) over the 540 fruits sampled (A) and mean distribution of the fruitlet core rot symptoms inside the fruit (B).

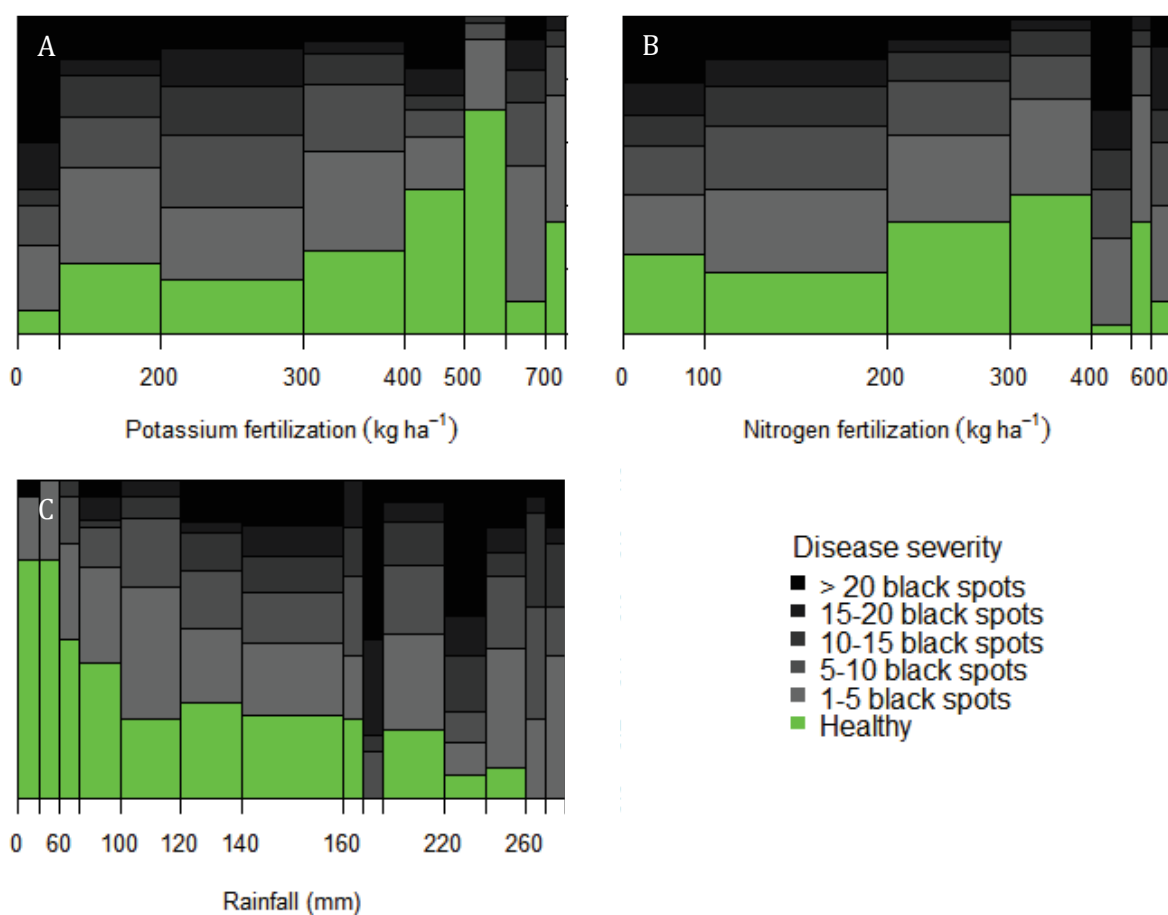


Figure 12 Relation between Potassium fertilization (A), Nitrogen fertilization (B), pluviometry (C) and fruit susceptibility of the fruit to fruitlet core rot. The x-axis integrates the representativeness of each class of fertilizer level or rainfall of all the plots. The y-axis integrates the percentage of each disease severity class.

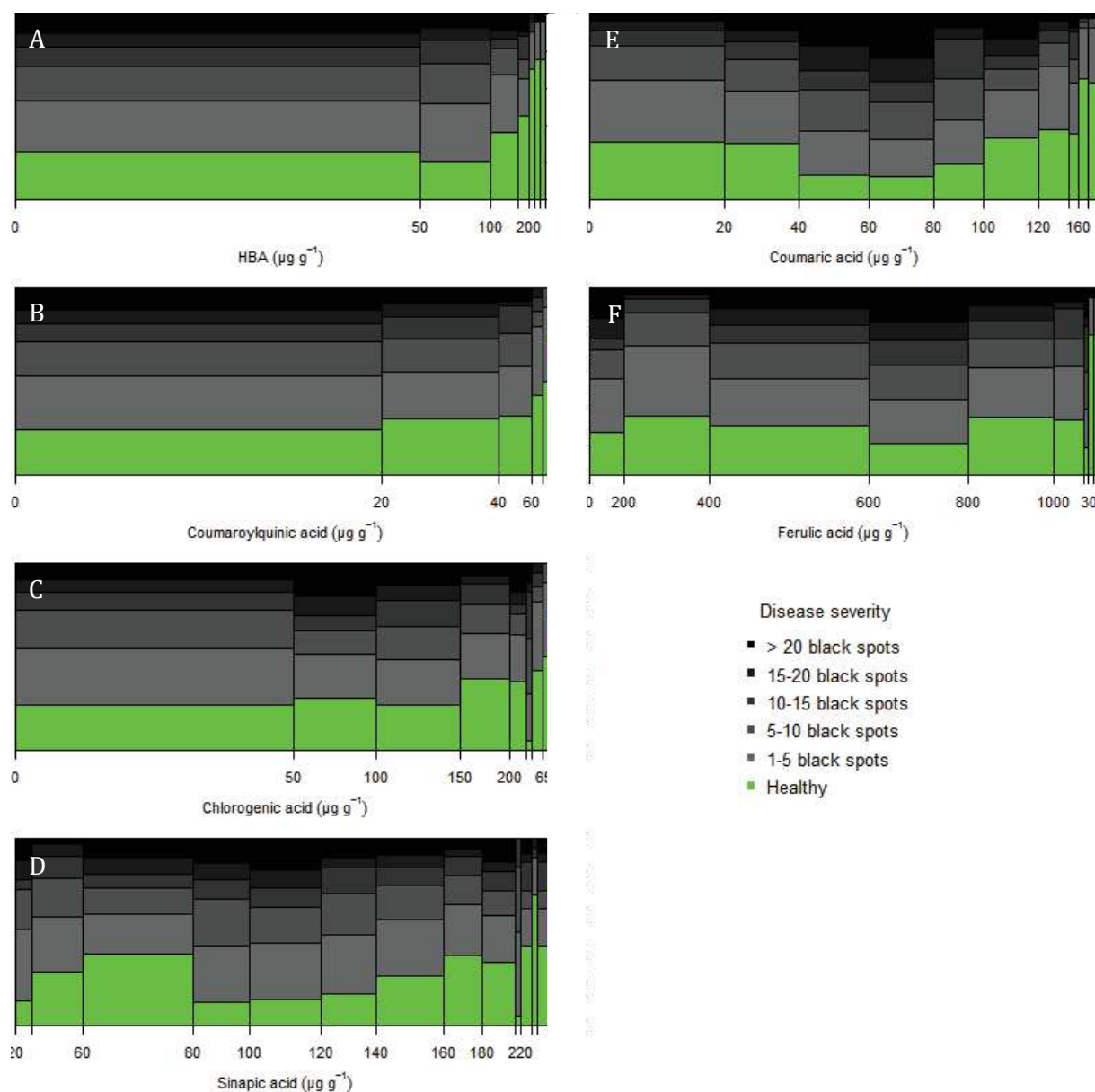


Figure 13 Relation between levels in free phenolic acids (left column: Hydroxybenzoic acids (HBA) (A), coumaroylquinic acid (B), chlorogenic acid (C), sinapic acid (D)); bound cell wall phenolic acids (right column: coumaric acid (E), ferulic acid (F)) measured in healthy part of the fruit and fruit susceptibility of the fruit to fruitlet core rot. The x-axis integrates the representativeness of each class of phenolic compounds of all the plots. The y-axis integrates the percentage of each disease severity class.

Tableau 2 Mineral composition of the crown of pineapple (n = 27)

	Ca (% DW)	Mg (% DW)	P (% DW)	N (% DW)	K (% DW)	C (% DW)	Mn (mg kg⁻¹)	Na (mg kg⁻¹)
Mean	0.113	0.194	0.178	1.129	3.468	46.39	196.71	225.12
Se	0.044	0.051	0.037	0.221	0.74	1.329	150.45	74.14

Article en préparation pour Food Microbiology

Diversity and toxigenicity of fungi causing pineapple fruitlet core rot disease

Bastien Barral¹, Marc Chillet¹, Maëva Grassi^{3,5}, Mathieu Léchaudel², Noel Durand³, Lindy Joy Rose⁴, Altus Viljoen⁴, Sabine Schorr-Galindo⁵

¹UMR Qualisud, CIRAD, 7 chemin de l'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, Reunion, France

²UMR Qualisud, CIRAD, Station de Neufchâteau, 97130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe, France

³UMR Qualisud, CIRAD, Université Montpellier, 34398 Montpellier Cedex 5, France

⁴Department of Plant Pathology, Stellenbosch University, Private Bag X1, Matieland, 7600, South Africa

⁵UMR Qualisud, Université de Montpellier, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Abstract

The identity of fungi responsible for fruitlet core rot (FCR) disease on pineapple has been examined for a long time. This study describes the diversity of fungal species causing FCR in the Indian Ocean and their toxigenic potential. One hundred and fifty fungal isolates were obtained from infected and healthy fruitlets in the Reunion Island. Two genera of fungi were isolated: *Fusarium* and *Talaromyces*. The genus *Fusarium* represented 79% of the isolates including 108 *F. ananatum*, 10 *F. oxysporum* and 1 *F. proliferatum*. The genus *Talaromyces* accounted for 21% of the isolated fungi, all *Talaromyces stollii*. As the isolated *Fusarium* strains are potentially mycotoxigenic identification and quantification of mycotoxins were carried out on different parts of diseased fruits (naturally or artificially infected) and under *in vitro* cultures of potential toxigenic isolates. Fungi did not produce mycotoxins *in vivo* in our conditions of analysis and infection. A pineapple juice media (PJA) was developed to mimic natural conditions and strains of *F. ananatum*, *F. oxysporum* and *F. proliferatum* were able to produce fumonisins FB₁, FB₂ and

beauvericin. The GYAM medium was the most favorable for mycotoxins production with levels of 497876 and 510430 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of fumonisin FB₁ respectively measured for *F. proliferatum* and *F. ananatum*. Finally, mycotoxin production was monitored from fungi grown in culture media amended with phenolic acids and enzyme found naturally in pineapple infructescence. A medium supplemented with sinapic acid and bromelain reduced, respectively, 6 and 9 times the accumulation of toxins for the *F. proliferatum* strain. By contrast, the presence of coumaric acid enhanced the toxin accumulation for *F. oxysporum*.

Keywords *Fusarium ananatum* - *Talaromyces stollii* - Beauvericin - Fumonisin - *Ananas comosus* - Phylogenetic analysis

Introduction

Fruitlet core rot affects pineapple fruit until it becomes unfit for consumption. The earliest reference to investigations of fruitlet core rot (FCR) in pineapples was made by Tryon (1898) in Australia. The symptoms were described as “well defined dark brown markings immediately beneath the surface, and passing inwards to a depth of ¼" to ½" - the malady commencing in separate fruitlets, the central core of the fruit remaining quite healthy”. This description agrees with the symptoms referred to as "black spot".

Tryon (1898) isolated *Penicillium* sp. Link from blossom cup as well as infected fruitlets on the cultivar 'Smooth Cayenne'. Since this first description, numerous attempts have been made to identify the causal pathogens. The majority of investigators attributing the disease to *Penicillium* sp. but Simmonds (1939) considered *Penicillium* alone, as being the cause of FCR in pineapples in Queensland. Barker (1926) in Haiti, Serrano (1928) in the Philippines, Johannsen (1934) in Guatemala and Thompson (1937) in Malaysia made similar observations of *Penicillium*.

Other studies associate the disease with the *Fusarium* genus. In Hawaii, Larsen (1910) described a brown discoloration in pineapples of the 'smooth Cayenne' cultivar, which he attributed to the genus *Fusarium*. A fusariosis caused by *Fusarium guttiforme* Nirenberg and O'Donnell (formerly *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Fusarium subglutinans*) appears on the Brazilian pineapple crop in the 1960s to become the major concern of producers in that region (Aquiye et al. 2011; Aquiye et al. 2010; Kimati and Tokeshi 1964; Santos et al. 2016). This name brought confusion and some articles dealing with FCR used

it to describe the pathogen (Manicom et al. 2006; Petty et al. 2005). Based on DNA sequences, Jacobs et al. (2010) distinguished *F. guttiforme*, responsible for the fusariosis from *F. ananatum*, responsible for FCR. *Fusarium ananatum* was also identified on commercial pineapples from Costa Rica, Ecuador, Hawaii and Honduras (Stępień et al. 2013). This new species has again been observed on pineapple in China (Gu et al. 2015). The gene encoding translation elongation factor 1 alpha (TEF-1 α) was amplified and sequenced to confirm identity of the causal fungus in those studies. TEF-1 α is commonly used to infer phylogenetic relationships between closely related genotypes particularly in the genus *Fusarium* (Jurado et al. 2010; Kristensen et al. 2005; Stępień et al. 2011).

Finally, some studies associate FCR with a combination of *Penicillium* and *Fusarium*. In South Africa, Pole-Evans (1924) made the first report describing a 'black spot' due to a combination of *Penicillium* and *Fusarium*. Johnson (1935) found both fungi responsible for 'brown rot' in Hawaii. Edmonstone-Sammons (1955) isolated *P. funiculosum* and *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (syn. *F. moniliforme* Sheldon), from black spots and then reintroduced them into healthy fruits to prove the pathogenicity of the fungi. *Penicillium funiculosum* belong to the subgenus *Biverticillium*. Phylogenetic information revealed that *Penicillium* subgenus *Biverticillium* and *Talaromyces* form a monophyletic clade. With the recent adoption of the one fungus one name concept, *Penicillium* subgenus *Biverticillium* was transferred to *Talaromyces*. *Penicillium funiculosum* is renamed *Talaromyces funiculosus* (Samson et al. 2011; Yilmaz et al. 2014). *T. funiculosus* was recovered from 67 percent of the isolations and *F. verticillioides* from 25 percent in Queensland (Oxenham 1962). Rohrbach et al. (1981) observed a predominance of *Talaromyces* in a control program of FCR. Petty (2005) isolated *Talaromyces* in all parts of the fruit while isolating *Fusarium* only in deep lesions. *Talaromyces funiculosus* was considered the primary causal agent of RCF in South Africa and the situation is now reversed, with a majority of *Fusarium* observed (Manicom et al. 2006).

FCR is widespread in all pineapple producing regions with a large disparity on fungi (Guerout 1974; Py et al. 1984). A better knowledge of the causal pathogen is an essential step in the development of a disease management strategy.

Moreover, potential fungal contaminants isolated from pineapples in the various studies are possible producers of mycotoxins such as species of the genus *Fusarium*. Stępień

(2013) found fumonisins FB₁, FB₂, FB₃, moniliformin (MON) and beauvericin (BEA) in pineapple juice and skin of commercial pineapple in Costa Rica. The *Fusarium* spp. isolated from pineapple fruits were able to produce those mycotoxins *in vitro*, especially *F. ananatum* and *F. proliferatum*. *Fusarium oxysporum* species were only found as MON and BEA producer. *Fusarium proliferatum* was also described as producer of fumonisins in different studies (Jurado et al. 2010). *Fusarium verticilloides* (syn. *F. moniliforme*) one of the two historically associated fungi to FCR is one of the producer of mycotoxins in cereals especially fumonisins in wheat (Nguyen et al. 2017). *Talaromyces stollii* isolates can produce austinins and chromophore (Yilmaz et al. 2012) but this species was never described as contaminant or mycotoxin producer in pineapple. *Penicillium funiculosum* that was renamed *Talaromyces funiculosus* and often associated with the FCR disease (Edmonstone-Sammons 1955; Mourichon 1983; Rohrbach et al. 2003) was found to produce patulin (PAT), especially in fruit (Nguyen et al. 2017) and sorghum (Yassin et al. 2010). Numerous species of the genera *Penicillium* and *Talaromyces* were described as producer of PAT, and Ochratoxin A (OTA) in fruits (Nguyen et al. 2017; Perrone et al. 2017).

The early symptoms of the FCR are a browning of the flesh under the blossom cup of mature fruit. The black spot can spread to the core but remain confined to the fruitlet. This browning is the result of the phenolic compounds oxidation into quinones by the enzymes polyphenol oxidase and laccase (Avallone et al. 2003). Soluble and cell wall-bound phenolic acids are found in the pineapple fruit parenchyma (Smith and Harris 2001; Steingass et al. 2015b) and increased dramatically after the onset of the first symptoms of FCR. These compounds provide antifungal activity on several species of fungi. Coumaric and ferulic acids inhibit the *in vitro* mycelial growth of *F. ananatum* and slow down the development *in vivo* of the fungus by co-inoculation in the fruit (Barral et al. 2017a). In addition to their antifungal properties, some of these compounds may interfere with the accumulation of mycotoxins. Phenylpropanoids have the capacity of reducing mycotoxin produced by *Fusarium* spp. in cereals into less toxic compounds and to inhibit the toxin biosynthesis (Atanasova-Penichon et al. 2016; Gauthier et al. 2015; Ponts et al. 2011).

In order to establish the safety of the diseased fruit, it is essential (i) to know which species of fungus are the causal agents of the pineapple black spot disease and in what

proportions, (ii) to verify whether they are capable of producing mycotoxins in vitro but especially in vivo and iii) if the production of metabolites or the presence of key enzyme in the pineapple makes it possible to inhibit this toxinogenesis.

Materials and Methods

Determination of fungal diversity

Fruit sampling and fungal isolation

Reunion Island (21.1° South, 55.5° East) is located in the Indian Ocean. The climate in Reunion is tropical, but temperature moderates with elevation. Precipitation levels vary greatly within the island, with the east being much wetter than the west. The pineapple crops are spread all over the Island. Fifty mature fruits were harvested from ten farms on the island during the last quarter of 2015. One to eight spots were isolated from natural infected pineapples. Four healthy-looking blossom cups were also sampled. Sections of approximately 6 mm³ were deposited on Sabouraud Chloramphenicol medium. Daily observations made it possible to transfer the mycelium on potato dextrose agar (PDA) medium. Single conidial cultures were performed according to Leslie and Summerell (2006) after seven days at 25 °C and then stored using a cryopreservation method at -75°C in 15% glycerol aqueous solution. All isolates used in this study are maintained in the *Fusarium* culture collection of the CIRAD La Reunion, Ligne Paradis, France, and in the Université de Montpellier, Qualisud, France.

Morphological comparisons

Preliminary morphological identification work was performed on the pathogens present in the fruits. Isolates were grown on carnation leaf agar (CLA) and PDA for 7 d at 25°C (Nelson et al. 1983). Fungal structures produced on these media were mounted on microscope slides and used in the morphological comparison of the Reunion isolates. Colony color was assigned using the color charts of Rayner (1970) for isolates grown on PDA 7 day at 25 °C.

DNA extraction, PCR, sequencing, and alignment

The fungi were grown on PDA plates for five days and genomic DNA was then extracted from fresh aerial mycelia using the Promega Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Anatech Instruments (Pty) Ltd., South Africa) according to the manufacturer's

recommendations. The extracted DNA was quantified using a Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, USA) and stored at -20°C until further use.

The primer set EF1 (5'-CGAATCTTTGAACGCACATTG-3') and EF2 (5'-CCGTGTTTCAAGACGGG-3') were used to amplify the translation elongation factor-1 α (TEF) gene region of *Fusarium* sp. isolates (Carbone and Kohn 1999). The PCR reaction consisted of 1X Roche Taq reaction buffer with MgCl₂, dNTPs (250 mM each), primers (0.2 mM each), template DNA (25 ng) and Taq polymerase (0.5 U). The conditions for the amplification of the TEF gene, were an initial denaturation at 95 °C for 5 min. This was followed by 30 cycles of denaturing at 94 °C for 45 sec, annealing at 58°C for 45 sec min and elongation at 72 °C for 1 min, followed by a final elongation step at 72 °C for 7 min. The resulting PCR amplicons were purified using a QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

Primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') were used to amplify the internal transcribed spacer (ITS) region of the remaining strains (White et al. 1990). The PCR assay was carried out in a total volume of 20 μ L comprising 1X KAPASYBR® FAST, 2 μ L DNA (10 ng μ L⁻¹), 200 nM of each primer. PCR cycling conditions consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 min followed by 30 cycles at 94°C for 45 sec, 52°C for 30 sec, and 72°C for 60 sec and a final extension step at 72°C for 5 min.

Sequencing of both strands was performed using the ABI 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions in the Genomic Unit of the Universidad Complutense of Madrid (Madrid, Spain). Sequences were edited and aligned using Geneious (Biomatters, <http://www.geneious.com>).

Phylogenetic analysis

The alignments of TEF and ITS sequences were performed using the software Muscle as implemented in the MEGA7 programme (Kumar et al. 2016). The PhyML was used for the Maximum Likelihood (ML) analysis (Guindon et al. 2010). The robustness of trees in the ML analyses was evaluated by 100 bootstrap replications. The phylogram based on TEF sequences was rooted with *F. solani* (GenBank accession number: DQ247710). *Talaromyces dendriticus* (GenBank accession number: JX091486) was selected as outgroup in the ITS analysis. The output tree files were visualized in FigTree v.1.3.1.

Toxigenic potential

Pineapple medium (PJA)

The ability of fungi from the collection to produce mycotoxins was carried out on a pineapple medium optimised for the study. The optimised Pineapple Juice Agar (PJA) results from a solution of water agar (5%) mixed with commercial pineapple juice at a ratio of 20/80 gave a final agar concentration of 1.25%. Five microliters of fungal strains were deposited in the middle of pineapple medium at a concentration of 1.10^6 conidia mL⁻¹. Petri dishes were incubated for seven days at 25 °C before mycotoxin extraction. One gram of agar corresponding to 3 plugs in the fungal colony was used for mycotoxin extraction. The toxigenic potential of the collection strains was tested on PJA. Two technical reps in HPLC/LCMS/MS analyses were performed.

Optimal medium for mycotoxin production

The fungal strains of *F. ananatum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum* and *T. stollii* (isolates CLP10, 23, 28, 42, 70, 81, 101, 105, 117, 120 and 143) were subcultured on solid and liquid media. For Malt Extract Agar (MEA), Czapek Yeast extract Agar (CYA), PDA and PJA, spore suspension were deposited on solid medium and then incubated at 25 °C for seven days. For liquid media Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) and Glucose Yeast Asparagine Malic acid (GYAM), one mycelium plug was deposited in an Erlenmeyer flask with 50 ml of broth. The liquid media were incubated at 30 °C for ten days under stirring (100 rpm).

Culture supplementation with phenolic acids and enzymatic complex

The isolates CLP028, 101, 117 (*F. ananatum*), CLP105 (*F. oxysporum*) and CLP120 (*T. stollii*) were subcultured on PDA and PJA amended with secondary metabolites observed in pineapple fruits, especially in black spot. Standards of coumaric acid, caffeoylquinic acid, ferulic acid, sinapic acid, ascorbic acid and bromelain purchased from Sigma-Aldrich (France) were added at concentrations of 0.25 g L⁻¹, 0.5 g L⁻¹ and 1 g L⁻¹. The control only contained PDA. The compounds were initially dissolved in 0.25% methanol solution in order to facilitate their dissolution in PDA at 44 °C. Fungal inoculations were made as in previous cultures. After seven days of growth at 25 °C, mycotoxins were extracted and two independent extractions were performed. Two technical repetitions in HPLC/LCMS/MS analyses were performed.

Inoculated and naturally infected fruitlets

Inoculations were performed on mature fruits harvested at the CIRAD Experimental Research Station in Reunion Island. Fruits were inoculated with 50 μL of a conidial suspension at 10^3 conidia mL^{-1} of *F. ananatum*, *F. oxysporum* and *T. stollii* isolates (CLP1, CLP105, CLP117 and CLP120), using a 0.25 mm diameter needle. Four fruitlets on one side of the fruit were inoculated and corresponded to the 'infected fruitlet'; two inoculations on the upper part and two on the lower part of the fruit. The syringe was pushed through the peel in the fruitlet perpendicularly to the fruit axis. The flesh between infected fruitlets corresponded to the 'adjacent fruitlet'. The other side of the fruit corresponded to the 'healthy fruitlet'. After an eight days incubation at 24 °C and away from direct sunlight, pineapples were sampled to recover the different areas of interest.

Natural infected fruitlets were sampled from commercially available pineapples originating of Mauritius Island. Adjacent and healthy areas were also sampled to measure the mycotoxins dispersion in the parenchyma.

Mycotoxins extraction and quantification

The extraction of mycotoxins was carried out according to the same protocol for all the experiments. Plugs of one gram for solid media, 10 g of fresh fruit and 1 g of supernatant and pellet from broth were used after centrifugation minutes (8000 rpm). Samples were mixed with 20 mL of (acetonitrile/water/ acetic acid; 50:50:1). After agitation, salts (modified roQ™ QuEChER EN 15562) were added to allow phase separation. Then the supernatant was 100-fold diluted with mobile phase A (water + 0.5% acetic acid) and the internal standard mix was added. The HPLC analysis was carried out on a LCMS-8040 Shimadzu (Kyoto Japan). The separation was performed at 50°C using a 50 x 2 mm, 2.6 μm particle size, endcapped reversed-phase Phenomenex Kinetex XB®. The injection volume was 50 μL and the flow rate 0.4 mL min^{-1} . The mycotoxins were analysed using the following gradient: 10- 55 % B (isopropanol + 0.5% acetic acid) in 1.5 min, 55-85 % B in 1.5 min, 85-80 % B in 0.5 min and 80-2 % B in 7 min, after which the column was washed and equilibrated to the initial conditions. Standards of aflatoxins (AFB1, B2, G1, G2), ochratoxin A (OTA), fumonisins (FB1 and FB2), zearalenone (ZEA), trichothecenes (DON, HT-2, nivalenol, 3ADON, 15ADON, DAS, Fusarenon-x) (R-biopharm) and beauvericin (BEA) (Libios) were used to detect and quantify mycotoxins.

Results

Morphological identification

The morphological comparison of the 150 fungi collected from pineapple fruits in Reunion Island made it possible to separate the isolates into two genera. The 119 isolates of *Fusarium* genus were characterized by macroconidia fusiform with usually 2-3 septa on CLA with two distinguishable groups; the first group of 108 strains with a saffron-colored colonies and the second group with white to pale violet colored colonies on PDA. The 31 isolates belonging to *Talaromyces* were characterized by fast growth and colonies with floccose or loosely funiculose textures on PDA, with white, green and red mycelia. Conidiophores were biverticillate with a minor proportion having subterminal branches, smooth walled, arising from aerial hyphae. The conidial shape was ellipsoidal ($2.5-4 \times 2-2.5 \mu\text{m}$).

Both genera of pathogenic fungi were observed on a single fruit (data not shown). Morphological data is supported by phylogenetic results, as discussed below.

Distribution of isolated fungi

The genus *Fusarium* represented 79% of the isolates and the genus *Talaromyces* accounted for 21% of the isolated fungi. *Fusarium* isolates were collected from fruits grown at an average altitude of 310 m while *Talaromyces* isolates were collected from fruits grown at an average altitude of 399 m (Tableau 3 and Tableau 4). Figure 14 illustrates the distribution of fungi in Reunion Island. The *Fusarium* isolates were found in all production areas as shown on the map. The *Talaromyces* isolates were found in the East and South regions, the rainiest parts of the island.

Phylogenetic analysis

The TEF analysis (Figure 15) was used in this study to define relationships within the isolates belonging to the *Fusarium* clade. The isolates were compared to the reference sequences deposited in the NCBI GenBank using BLASTN. The aligned data set, which includes a subset of species classified in *Fusarium*, had a total length of 709 bp. The model TN93 with gamma distributed (+G) was the most suitable model for ML (Tamura and Nei 1993). *Fusarium solani* was selected as out-group. Three species of *Fusarium* were identified: *F. ananatum*, *F. oxysporum*, and *F. proliferatum*. *Fusarium ananatum* was identified with the highest frequency (108 isolates) followed by *F. oxysporum* (Ten

isolates). Only single occurrence of *F. proliferatum* was observed (Figure 15 and Tableau 3). *Fusarium ananatum* strains isolated from healthy blossom cup ranked in the same clade as strains isolated from infected fruitlets.

The *Talaromyces* genus accounted for 21% of the isolates, and among these 31 strains, five of them were used in phylogenetic analysis. The ITS gene region defined relationships within *Talaromyces*. The aligned data set had a total length of 709 bp. The model TN93 was the most suitable model for ML. *Talaromyces dendriticus* was selected as out-group. Based on the ITS data set, the isolates from infected pineapple grouped together with *T. stollii* strains form a distinct clade to *T. funiculosus* strains with 99% bootstrap support (Figure 16 and Tableau 4). Some differences were found in the sequences of the Reunion pineapple isolates, most likely indicating genetic variation in this population.

Mycotoxins synthesized in vitro and in pineapple fruit

The ability of the isolates to produce mycotoxins was quantified on a pineapple medium (Tableau 3). Of the 141 fungi tested only ten of them were producer of mycotoxins, all of which belonged to the *Fusarium* genus. *Fusarium ananatum* and *F. proliferatum* were producer of fumonisin B₁ and B₂ (FB₁–FB₂) while *F. oxysporum* produced beauvericin (BEA). The analysis carried out on naturally and artificially infected pineapples revealed the absence of mycotoxin production by *F. ananatum*, *F. oxysporum* and *T. stollii* *in planta*. The amounts of FB₁–FB₂ and BEA produced in different media (GYAM, PJA, PDA) amended in phenolic acids by three isolates (*F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. ananatum*) are presented in Tableau 5. *Fusarium proliferatum* was the fungal species with the highest level in FB₁ and FB₂. The GYAM broth was the most favorable medium for mycotoxin production. Moreover, *F. ananatum* CLP028 strain showed mycotoxin production only in GYAM. *Talaromyces stollii* produced no mycotoxins whatever the medium (data not shown). The addition of phenolic compounds or enzymatic complex in the medium show opposite effects depending on the strains. Toxin accumulation was reduced in the presence of bromelain and ferulic acid for *F. proliferatum* but was enhanced in the presence of coumaric acid for *F. oxysporum*. *F. ananatum* strains showing no or low production of FB₁ in solid media, the experimentations with amended media were not made.

Discussion

The phylogenetic analysis shows that two genera of fungi are the causal agents of fruitlet core rot disease. The *Fusarium* genus was the most frequent clade with 79% of isolates, divided in three species: *F. ananatum*, *F. oxysporum* and *F. proliferatum*. Recent studies have identified *F. ananatum* as a new fungus species responsible of fruitlet core rot. Jacobs et al. (2010) were the first to described the fungus isolated from diseased pineapple in South Africa, then Stępień et al. (2013) from commercial fruits and recently Gu et al. (2015) in China. Our results are in agreement with these observations since *F. ananatum* was the most widespread isolate in Reunion Island (91% of *Fusarium* isolates). In fact, *F. verticillioides* (formerly *F. moniliforme*) one of the two historically associated fungi to FCR has never been isolated in our collection of 150 strains (Edmonstone-Sammons 1955; Rohrbach and Pfeiffer 1976; Rohrbach et al. 2003). The descriptions of *F. ananatum* are recent but it is likely to be the causal agent for many years. O'Donnell et al. (1998) described an isolate from pineapple (NRRL 2294, CBS 184.29) as *F. guttiforme* which turns out to be *F. ananatum* (Jacobs et al. 2010). *Fusarium guttiforme* is separated from *F. ananatum* clade in the phylogenetic analysis of TEF with a high bootstrap value. Our work shows that *F. oxysporum* and *F. proliferatum*, 8% and 1% of *Fusarium* isolates respectively, can also produce FCR symptoms. These two fungi have already been isolated on pineapples (Stępień et al. 2013; Stępień et al. 2011) but this is the first time they are directly related to FCR disease. The four fungi isolated from healthy blossom cup all belong to the genus *Fusarium*; three *F. ananatum* and one *F. oxysporum*. They rank on the same clade as their pathogenic counterparts on the phylogenetic tree. Further work on blossom cup isolations could determine the level of contamination by the pathogens and whether the proportion of a particular species is the same between a healthy and an infected area.

Results of this study have shown that *Talaromyces* genus represent 21% of the isolates collected from diseased pineapple, all of them being *T. stollii*. This species can be distinguished from *T. funiculosus* (formerly *P. funiculosus*) based on DNA sequence comparisons and morphology. *T. stollii* isolates were supported as monophyletic with high bootstrap value. All the previous studies associated *T. funiculosus* with the fruitlet core rot disease (Edmonstone-Sammons 1955; Mourichon 1983; Rohrbach et al. 2003). *T. stollii* and *T. funiculosus* are morphologically close. Both species grow fast on general

media, with white, green, orange and red mycelia color, and the same micromorphological characters: biverticillate conidiophores and ellipsoidal conidia. But *T. stollii* produces colonies that are strongly floccose with more marked red mycelia than *T. funiculosus* which produce colonies with stringy funiculose texture. Raper and Thom (1949) described the strain CBS 169.916/NRRL 1033 as *P. funiculosum*. The analysis of the ITS, β -tubulin, calmodulin, RPB1 and RPB gene regions were necessary to attribute the name *T. stollii* to this particular strain. Yilmaz et al. (2012) identified *T. stollii* (CBS 624.93) from pineapple without specifying the isolation zone. Nonetheless, his work confirms the possibility of finding *T. stollii* in pineapple.

The fungi collection was made from pineapples harvested on several producing regions of Reunion. This island by its topography offers a wide variability of temperature and rainfall. This diversity allows growers to produce pineapples throughout the year. Interestingly, pineapples produced at lower altitude had a higher *Fusarium* / *Talaromyces* contamination ratio than those produced at higher altitude. In the same way, the *Fusarium* / *Talaromyces* ratio was higher in the driest parts of the island. Temperature and humidity are factors influencing the growth conditions of fungi and it appears that *Fusarium* isolates prefer warm temperatures with little rainfall and *Talaromyces* cooler temperatures with more moisture.

These pathogens found on pineapple fruitlet develop when the fruit is ready to be consumed. Then raises the question of the toxigenic potential of our strains knowing that both genera can produce a wide range of mycotoxins. Stępień et al. (2013) monitored fumonisins (FB₁–FB₃), moniliformin (MON) and beauvericin (BEA) production on rice cultures of *Fusarium* species isolated from pineapple. *Talaromyces stollii* isolates can produce austins and chromophore group 'HHH' (Yilmaz et al. 2012). To validate the potential risk of pineapple contamination, mycotoxins contents were measured in natural and artificial infected fruitlets. No mycotoxins were found on our infected fruit samples. A larger sample of infected fruit should be carried out to ensure safety for consumers. In addition, a pineapple medium (PJA) has been developed to establish the mycotoxigenic potential of our isolates under controlled conditions close to natural. The fumonisins FB₁ and FB₂ were measured on nine strains of *F. ananatum* and *F. proliferatum*. *Fusarium oxysporum* was the only isolate to produce beauvericin. Our results agree those of Stępień et al. (2013) which showed that *F. proliferatum* produced the highest levels of mycotoxins

in vitro. As *F. proliferatum* was able to produce fumonisins it must also be chosen for the artificial infection of pineapple.

The production of mycotoxin is affected by a large number of metabolites. Barral et al. (2017a) has shown the implication of phenylpropanoids during the host-pathogen interaction in FCR. The influence of the previously identified compounds was tested *in vitro*. Toxin accumulation in supplemented media was reduced in the presence of bromelain and ferulic acid for *F. proliferatum* but was enhanced in the presence of coumaric acid for *F. oxysporum*. A previous report indicated that ferulic acid supplementation led to a reduction of mycotoxin production by *F. graminearum* (Boutigny et al. 2010). This is in contrast with Ponts et al. (2011) who suggest that phenolic acids are enhancers of mycotoxins accumulation. Our results showed variability in mycotoxins accumulation due to metabolites naturally found in pineapple fruits. But while the contaminating strains are toxigenic *in vitro*, it seems that toxigenesis is limited *in vivo* surely because of the metabolites produced by the fruit during the infection.

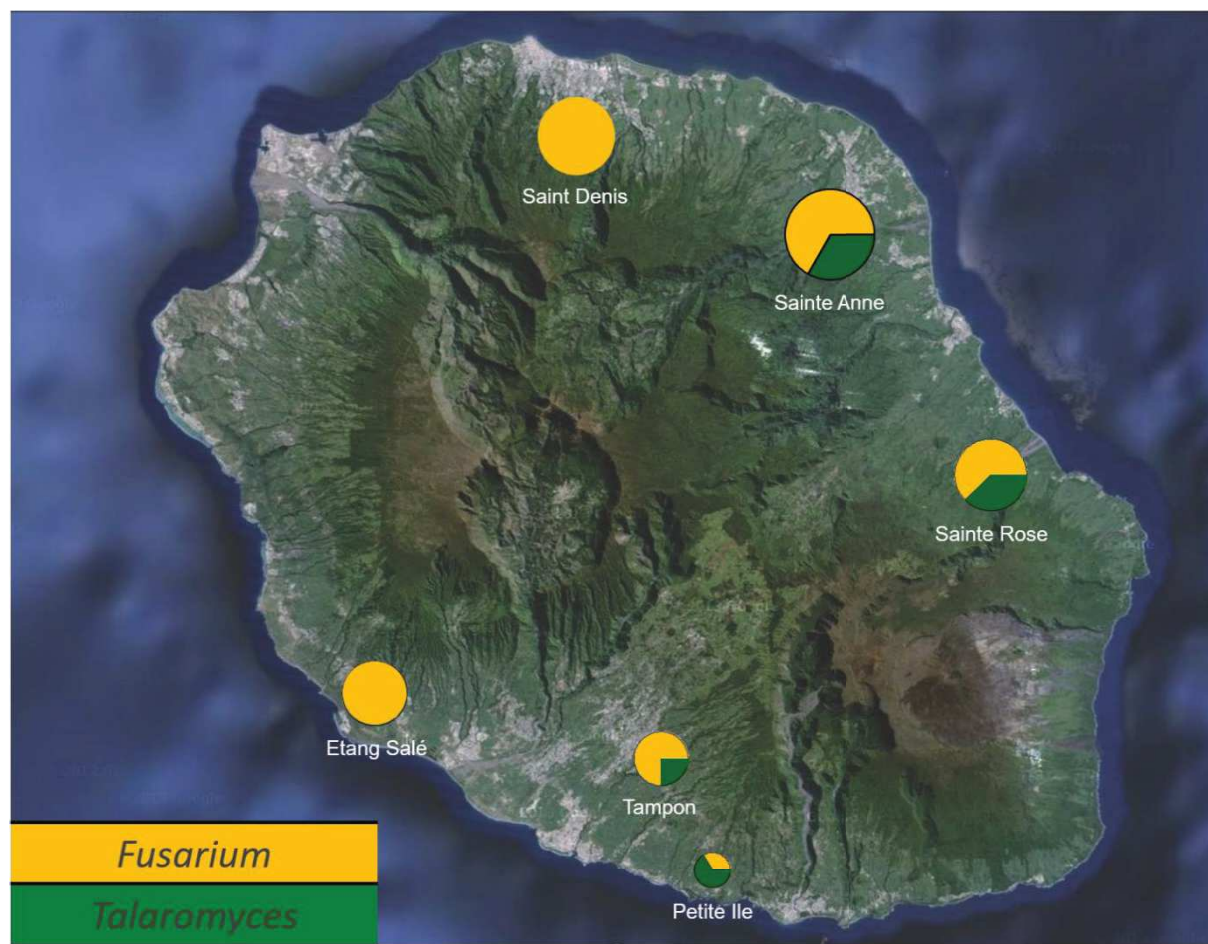


Figure 14 Distribution of isolated fungi genera across the island. Orange color of the pie chart symbolizes the *Fusarium* genus and green color *Talaromyces stollii*. The size of pie chart is proportional to the number of fungi isolated per geographical area.

Phylogenetic tree of *Fusicoccaceae* species based on ITS1 sequence data. The tree shows relationships between various species, with bootstrap values indicated at the nodes. The scale bar represents 0.04 substitutions/site.

Species and Accession Numbers shown in the tree:

- KT716244 *F. verticilloides*
- BB_106
- BB_13
- BB_10
- AF008483 *F. oxysporum*
- BB_36
- BB_119
- BB_24
- BB_35
- BB_33
- BB_32
- JF740878 *F. oxysporum*
- BB_42
- BB_30
- BB_120
- DO282166 *F. guttiforme*
- DO282170 *F. guttiforme*
- DO282165 *F. guttiforme*
- BB_37
- BB_30
- BB_34
- BB_33
- BB_32
- BB_31
- BB_30
- BB_29
- BB_28
- BB_27
- BB_26
- BB_25
- BB_24
- BB_23
- BB_22
- BB_21
- BB_20
- BB_19
- BB_18
- BB_17
- BB_16
- BB_15
- BB_14
- BB_13
- BB_12
- BB_11
- BB_10
- BB_9
- BB_8
- BB_7
- BB_6
- BB_5
- BB_4
- BB_3
- BB_2
- BB_1
- BB_46
- BB_91
- BB_56
- EU668314 *F. ananatum*
- EU668312 *F. ananatum*
- EU668313 *F. ananatum*
- BB_47
- BB_46
- BB_45
- BB_44
- BB_43
- BB_42
- BB_41
- BB_40
- BB_39
- BB_38
- BB_37
- BB_36
- BB_35
- BB_34
- BB_33
- BB_32
- BB_31
- BB_30
- BB_29
- BB_28
- BB_27
- BB_26
- BB_25
- BB_24
- BB_23
- BB_22
- BB_21
- BB_20
- BB_19
- BB_18
- BB_17
- BB_16
- BB_15
- BB_14
- BB_13
- BB_12
- BB_11
- BB_10
- BB_9
- BB_8
- BB_7
- BB_6
- BB_5
- BB_4
- BB_3
- BB_2
- BB_1
- BB_100
- BB_99
- BB_98
- BB_97
- BB_96
- BB_95
- BB_94
- BB_93
- BB_92
- BB_91
- BB_90
- BB_89
- BB_88
- BB_87
- BB_86
- BB_85
- BB_84
- BB_83
- BB_82
- BB_81
- BB_80
- BB_79
- BB_78
- BB_77
- BB_76
- BB_75
- BB_74
- BB_73
- BB_72
- BB_71
- BB_70
- BB_69
- BB_68
- BB_67
- BB_66
- BB_65
- BB_64
- BB_63
- BB_62
- BB_61
- BB_60
- BB_59
- BB_58
- BB_57
- BB_56
- BB_55
- BB_54
- BB_53
- BB_52
- BB_51
- BB_50
- BB_49
- BB_48
- BB_47
- BB_46
- BB_45
- BB_44
- BB_43
- BB_42
- BB_41
- BB_40
- BB_39
- BB_38
- BB_37
- BB_36
- BB_35
- BB_34
- BB_33
- BB_32
- BB_31
- BB_30
- BB_29
- BB_28
- BB_27
- BB_26
- BB_25
- BB_24
- BB_23
- BB_22
- BB_21
- BB_20
- BB_19
- BB_18
- BB_17
- BB_16
- BB_15
- BB_14
- BB_13
- BB_12
- BB_11
- BB_10
- BB_9
- BB_8
- BB_7
- BB_6
- BB_5
- BB_4
- BB_3
- BB_2
- BB_1
- BB_100
- BB_99
- BB_98
- BB_97
- BB_96
- BB_95
- BB_94
- BB_93
- BB_92
- BB_91
- BB_90
- BB_89
- BB_88
- BB_87
- BB_86
- BB_85
- BB_84
- BB_83
- BB_82
- BB_81
- BB_80
- BB_79
- BB_78
- BB_77
- BB_76
- BB_75
- BB_74
- BB_73
- BB_72
- BB_71
- BB_70
- BB_69
- BB_68
- BB_67
- BB_66
- BB_65
- BB_64
- BB_63
- BB_62
- BB_61
- BB_60
- BB_59
- BB_58
- BB_57
- BB_56
- BB_55
- BB_54
- BB_53
- BB_52
- BB_51
- BB_50
- BB_49
- BB_48
- BB_47
- BB_46
- BB_45
- BB_44
- BB_43
- BB_42
- BB_41
- BB_40
- BB_39
- BB_38
- BB_37
- BB_36
- BB_35
- BB_34
- BB_33
- BB_32
- BB_31
- BB_30
- BB_29
- BB_28
- BB_27
- BB_26
- BB_25
- BB_24
- BB_23
- BB_22
- BB_21
- BB_20
- BB_19
- BB_18
- BB_17
- BB_16
- BB_15
- BB_14
- BB_13
- BB_12
- BB_11
- BB_10
- BB_9
- BB_8
- BB_7
- BB_6
- BB_5
- BB_4
- BB_3
- BB_2
- BB_1
- BB_100
- BB_99
- BB_98
- BB_97
- BB_96
- BB_95
- BB_94
- BB_93
- BB_92
- BB_91
- BB_90
- BB_89
- BB_88
- BB_87
- BB_86
- BB_85
- BB_84
- BB_83
- BB_82
- BB_81
- BB_80
- BB_79
- BB_78
- BB_77
- BB_76
- BB_75
- BB_74
- BB_73
- BB_72
- BB_71
- BB_70
- BB_69
- BB_68
- BB_67
- BB_66
- BB_65
- BB_64
- BB_63
- BB_62
- BB_61
- BB_60
- BB_59
- BB_58
- BB_57
- BB_56
- BB_55
- BB_54
- BB_53
- BB_52
- BB_51
- BB_50
- BB_49
- BB_48
- BB_47
- BB_46
- BB_45
- BB_44
- BB_43
- BB_42
- BB_41
- BB_40
- BB_39
- BB_38
- BB_37
- BB_36
- BB_35
- BB_34
- BB_33
- BB_32
- BB_31
- BB_30
- BB_29
- BB_28
- BB_27
- BB_26
- BB_25
- BB_24
- BB_23
- BB_22
- BB_21
- BB_20
- BB_

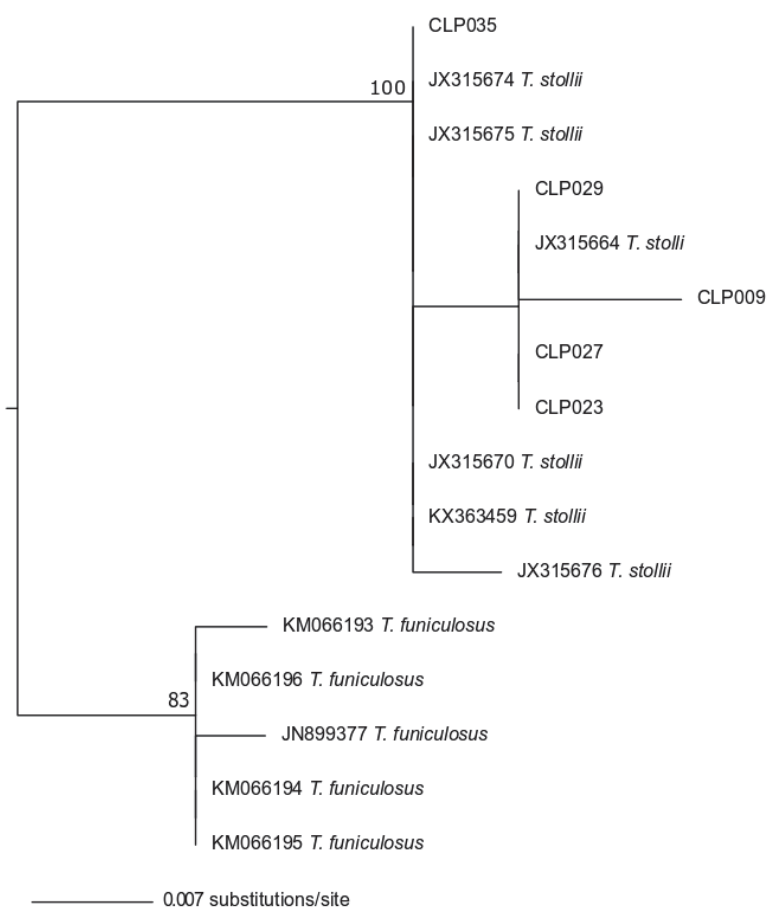


Figure 16 Maximum Likelihood tree calculated using PhyML, based on internal transcribed spacer (ITS) sequences showing the relationships among *Talaromyces stollii* and related species. *Talaromyces dendriticus* was chosen as out-group. Bootstrap values (percentages of 100 bootstrap replicates) are indicated in brackets above the branches of the tree. Model selected: TN93, alignment 623 bp.

Tableau 3 List of the *Fusarium* strains included in the phylogenetic analyses; their geographical origin, host plant species, sampling area, altitude and amounts of fumonisins (FB₁–FB₂) and beauvericin (BEA) synthesized in pineapple juice agar medium (PJA) (µg kg⁻¹) for the Reunion Island isolates.

Species	Collection no.	Origin	Altitude	TEF barcode	Reference	FB ₁	FB ₂	BEA
<i>Fusarium ananatum</i>	FCC 4253/CMW 28599	South Africa; pineapple	NA	EU668314	Jacobs et al. 2010	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	FCC 4252/CMW 28598	South Africa; pineapple	NA	EU668313	Jacobs et al. 2010	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	FCC 4251/CMW 28597	South Africa; pineapple	NA	EU668312	Jacobs et al. 2010	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	MRC 8166/CBS 118517	South Africa; pineapple	NA	DQ282171	Jacobs et al. 2010	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	MRC 8168/CBS 118519	South Africa; pineapple	NA	DQ282168	Jacobs et al. 2010	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp001	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	NA	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp005/MUCL 53248	South Africa; pineapple	NA	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp006	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp010	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp011	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp012	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp013	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp014	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp015	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp017	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp018	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp019	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study	20	10	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp021	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp024	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp028	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp033	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp034	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	215	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp037	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	215	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp039	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	215	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp040	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	215	-	This study	0	0	0

<i>Fusarium ananatum</i>	Clp043	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp044	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp045	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp047	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp049	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp052	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp053	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp054	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp055	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp057	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp058	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp059	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	110	180	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp061	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp062	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp063	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp064	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp066	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp068	Réunion, Sainte rose; infected pineapple fruitlet	110	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp069	Réunion, Sainte rose; infected pineapple fruitlet	110	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp072	Réunion, Sainte rose; infected pineapple fruitlet	110	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp074	Réunion, Sainte rose; infected pineapple fruitlet	110	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp078	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp079	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	100	240	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp080	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp082	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	10	20	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp083	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp084	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp085	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp086	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp087	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0

<i>Fusarium ananatum</i>	Clp088	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp089	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp090	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp091	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	120	240	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp092	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp093	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp094	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp095	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp096	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	10	30	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp097	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp098	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp099	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp100	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp101	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	20	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp102	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp103	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	120	240	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp104	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp106	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp107	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp108	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp115	Réunion, Saint louis; infected pineapple fruitlet	255	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp116	Réunion, Saint louis; infected pineapple fruitlet	255	-	This study	10	50	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp117	Réunion, Saint louis; infected pineapple fruitlet	255	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp118	Réunion, Saint louis; infected pineapple fruitlet	255	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp119	Réunion, Saint louis; infected pineapple fruitlet	255	-	This study	30	30	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp121	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp122	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp123	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp124	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp125	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0

<i>Fusarium ananatum</i>	Clp126	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp127	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp128	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp129	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp130	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp131	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp132	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp133	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp134	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp135	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp136	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	130	130	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp137	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp138	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp139	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp140	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp141	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp142	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp143	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp144	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp145	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp146	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp147	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp148	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp149	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp150	Réunion, Saint denis; infected pineapple fruitlet	355	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp152	Réunion, unknown; healthy pineapple fruitlet	NA	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp153	Réunion, unknown; healthy pineapple fruitlet	NA	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium ananatum</i>	Clp154	Réunion, unknown; healthy pineapple fruitlet	NA	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium guttiforme</i>	MRC 6782/CBS 124146	Brazil; pineapple	NA	DQ282170	Jacobs et al. 2010	NA	NA	NA
<i>Fusarium guttiforme</i>	MRC 6783/CBS 124145	Brazil; pineapple	NA	DQ282166	Jacobs et al. 2010	NA	NA	NA

<i>Fusarium guttiforme</i>	MRC 7539	Brazil; pineapple	NA	DQ282165	Jacobs et al. 2010	NA	NA	NA
<i>Fusarium oxysporum</i>	NRRL 52937	Turkey; unknown	NA	JF740878	O'Donnell et al. 2012	NA	NA	NA
<i>Fusarium oxysporum</i>	NRRL 26374	Unknown; human	NA	AF008483	O'Donnell et al. 1998	NA	NA	NA
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clp002	Réunion, Bassin martin; infected pineapple fruitlet	450	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clp003	Réunion, Bassin martin; infected pineapple fruitlet	450	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clp032	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clp070	Réunion, Sainte rose; infected pineapple fruitlet	110	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clp073	Réunion, Sainte rose; infected pineapple fruitlet	110	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clp075	Réunion, Sainte rose; infected pineapple fruitlet	110	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clp076	Réunion, Sainte rose; infected pineapple fruitlet	110	-	This study	0	0	7500
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clp077	Réunion, Sainte rose; infected pineapple fruitlet	110	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clp105	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clp151	Réunion, Berive; healthy pineapple fruitlet	NA	-	This study	NA	NA	NA
<i>Fusarium proliferatum</i>	MUCL 31970	Wheat	NA	AF336913	Kwon et al. 2001	NA	NA	NA
<i>Fusarium proliferatum</i>	NRRL 22944	Unknown	NA	AF160280	O'Donnell et al. 2000	NA	NA	NA
<i>Fusarium proliferatum</i>	Clp081	Réunion, Etang sale; infected pineapple fruitlet	109	-	This study	34698	3717	0
<i>Fusarium solani</i>	FRC S1673	Unknown	NA	DQ247710	Zhang et al. 2006	NA	NA	NA
<i>Fusarium verticillioides</i>	-	Northern China; maize ears	NA	KT716244	Zhang et al. 2016	NA	NA	NA

Tableau 4 List of the *Talaromyces* strains included in the phylogenetic analyses; their geographical origin, host plant species, sampling area and altitude.

Species	Collection no.	Origin	Altitude	ITS barcode	Reference
<i>Talaromyces dendriticus</i>	CV2026	Unknown		JX091486	Visagie et al. 2012
<i>Talaromyces funiculosus</i>	CBS 883.70	Unknown		KM066196	Yilmaz et al. 2014
<i>Talaromyces funiculosus</i>	CBS 884.70	Unknown		KM066195	Yilmaz et al. 2014
<i>Talaromyces funiculosus</i>	CBS 885.71	Unknown		KM066194	Yilmaz et al. 2014
<i>Talaromyces funiculosus</i>	CBS 171.91	Unknown		KM066193	Yilmaz et al. 2014
<i>Talaromyces funiculosus</i>	CBS 272.86	Unknown		JN899377	Yilmaz et al. 2014
<i>Talaromyces stollii</i>	CBS 265.93	France; Bronchoalveolar lavage of patient after lung transplantation		JX315670	Yilmaz et al. 2012
<i>Talaromyces stollii</i>	CBS 624.93	Martinique, pineapple fruit		JX315676	Yilmaz et al. 2012
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp004	Réunion, Bassin martin; infected pineapple pineapple fruitlet	450	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp007	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp008	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp009	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp020	Réunion, Grand tampon; infected pineapple fruitlet	720	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp120	Réunion, Ligne paradis; infected pineapple fruitlet	145	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp022	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp023	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp025	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp026	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp027	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp029	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp030	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp031	Réunion, Petite ile; infected pineapple fruitlet	440	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp110	Réunion, Saint louis; infected pineapple fruitlet	255	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp112	Réunion, Saint louis; infected pineapple fruitlet	255	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp113	Réunion, Saint louis; infected pineapple fruitlet	255	-	This study

<i>Talaromyces stollii</i>	Clp114	Réunion, Saint louis; infected pineapple fruitlet	255	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp035	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	215	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp036	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	215	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp038	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	215	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp041	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp042	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp046	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp048	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp050	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp051	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp060	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp065	Réunion, Sainte anne; infected pineapple fruitlet	436	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp067	Réunion, Sainte rose; infected pineapple fruitlet	110	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	Clp071	Réunion, Sainte rose; infected pineapple fruitlet	110	-	This study
<i>Talaromyces stollii</i>	-	South Africa; identified as <i>Penicillium funiculosum</i> by Raper & Thom (1949)	JX315664		Yilmaz et al. 2012
<i>Talaromyces stollii</i>	-	The Netherlands; Ex-type strain of <i>Talaromyces stollii</i> . AIDS patient	JX315674		Yilmaz et al. 2012

Tableau 5 Amounts of fumonisins (FB₁–FB₂) and beauvericin (BEA) produced in different media (GYAM, PJA, PDA) amended in phenolic acids by three isolates (*F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. ananatum*).

Collection no.	Species	Media	Compound/Complex (0.5 g L ⁻¹)	FB ₁ (µg kg ⁻¹)	FB ₂ (µg kg ⁻¹)	BEA (µg kg ⁻¹)
CLP081	<i>F. proliferatum</i>	GYAM	-	497876	5256	ND
CLP081	<i>F. proliferatum</i>	PJA	bromelain	6185 ± 4969	119 ± 207	0
CLP081	<i>F. proliferatum</i>	PJA	coumaric acid	NA	NA	NA
CLP081	<i>F. proliferatum</i>	PJA	ferulic acid	9391 ± 6349	0	0
CLP081	<i>F. proliferatum</i>	PJA	sinapic acid	34959 ± 10691	409 ± 2	0
CLP081	<i>F. proliferatum</i>	PJA	ascorbic acid	47732	879	0
CLP081	<i>F. proliferatum</i>	PJA	caffeoylquinic acid	44966	503	0
CLP081	<i>F. proliferatum</i>	PJA	control	56616	744	0
CLP081	<i>F. proliferatum</i>	PDA	-	7750	0	0
CLP105	<i>F. oxysporum</i>	GYAM	-	0	0	5230
CLP105	<i>F. oxysporum</i>	PDA	bromelain	67	0	237
CLP105	<i>F. oxysporum</i>	PDA	coumaric acid	23201	0	9864
CLP105	<i>F. oxysporum</i>	PDA	ferulic acid	NA	NA	NA
CLP105	<i>F. oxysporum</i>	PDA	sinapic acid	NA	NA	NA
CLP105	<i>F. oxysporum</i>	PDA	ascorbic acid	NA	NA	NA
CLP105	<i>F. oxysporum</i>	PDA	caffeoylquinic acid	NA	NA	NA
CLP105	<i>F. oxysporum</i>	PDA	control	0	0	7500
CLP105	<i>F. oxysporum</i>	PJA	control	0	0	0
CLP028	<i>F. ananatum</i>	GYAM	-	510430	25356	0
CLP028	<i>F. ananatum</i>	PDA		0	0	0
CLP028	<i>F. ananatum</i>	PJA		0	0	0
CLP101	<i>F. ananatum</i>	GYAM		0	0	0
CLP101	<i>F. ananatum</i>	PJA		20	0	0
CLP101	<i>F. ananatum</i>	PDA		0	0	0
CLP117	<i>F. ananatum</i>	GYAM		0	0	0

CLP117	<i>F. ananatum</i>	PJA	0	0	0
CLP117	<i>F. ananatum</i>	PDA	10	0	0

Travaux complémentaires

État des lieux et caractérisation de la virulence des isolats de l'île Maurice

Introduction

L'ananas Queen Victoria est un fruit emblématique de l'océan indien. Avec 16 000 tonnes, il est le fruit le plus produit et le plus exporté de l'île de la Réunion. A Maurice la production annuelle s'élève à 12 000 tonnes, dont une majorité pour l'export. Cette variété donne des petits fruits, riche en sucre et très savoureux. La maladie de la tache noire, qui se traduit par des taches brunes dans les cavités florales du fruit est la principale maladie post récolte. Cette maladie est induite par différentes espèces de champignons. Bien qu'observée depuis 1896, l'étiologie de cette maladie n'est toujours pas bien définie. Or le contexte agricole de l'île Maurice, touché par la concurrence mondiale de la culture de la canne à sucre, laisse envisager une augmentation des surfaces cultivées en ananas, et de fait, une augmentation de la pression des pathogènes responsables de la maladie de la tache noire. L'île Maurice doit également faire face à une concurrence internationale élevée pour la canne à sucre. La culture de l'ananas est une alternative séduisante pour certains agriculteurs.

Les objectifs de cette étude sont de faire un état des lieux de la maladie de la tache noire sur l'île Maurice à travers des rencontres avec les producteurs, des prélèvements de champignons et une caractérisation de la virulence.

Matériels et méthodes

Diversité génétique

Cent fruits d'ananas furent achetés sur les marchés et directement chez des producteurs. Les fruits ont été tranchés longitudinalement sur toute la hauteur du fruit. Lorsqu'une tache était présente sur la tranche, les zones d'intérêts ont été découpées au scalpel en condition stérile. Un travail d'identification morphologique a été réalisé sur les pathogènes présents dans les fruits comme décrit sur l'étude précédente. Succinctement, des morceaux provenant de différentes taches et de différents fruits ont été déposés sur un milieu PDA. Après sept jours de croissance à 25°C, des états frais (prélèvement du

mycélium arien à l'aide d'une hanse de platine puis dépôt dans une goutte d'eau) ont fait l'objet d'observations microscopiques afin de caractériser les espèces des différents champignons et les identifier comme correspondant aux pathogènes recherchés. Le postulat de Koch a été appliqué pour s'assurer de la pathogénicité des souches isolées pour la maladie de la tache noire considérée.

Virulence

Trois souches de pathogènes ont été sélectionnées dans les 3 groupes de pathogènes indentifiés d'après leurs caractéristiques microscopiques. Cent fruits récoltés une semaine avant la date de mi-récolte théorique ont servi lors de cette expérimentation. L'inoculation des ananas a été réalisée via l'injection de solution de spores concentrées à 10^2 , 10^3 , 10^4 et 10^5 spores mL^{-1} , à l'aide d'une seringue 1mL et d'une aiguille 25G, directement le parenchyme du fruit. Après une incubation de 7 jours à température ambiante et éloigné de la lumière directe du soleil, les ananas sont tranchés longitudinalement et la superficie des taches mesurée. La virulence est appréciée par la propagation des taches.

Résultats

Quatre-vingt pourcents des champignons isolés appartiennent à l'espèce *Fusarium ananatum*, 15% à *F. oxysporum*, et les 5% restant à *Talaromyces stoli* (Data not shown).

La souche n°14 est la plus virulente pour les concentrations 10^2 , 10^3 , 10^4 sp. mL^{-1} et correspond à *F. ananatum* (Figure 17). La souche n° 2 est la moins virulente et correspond à l'espèce *F. oxysporum*.

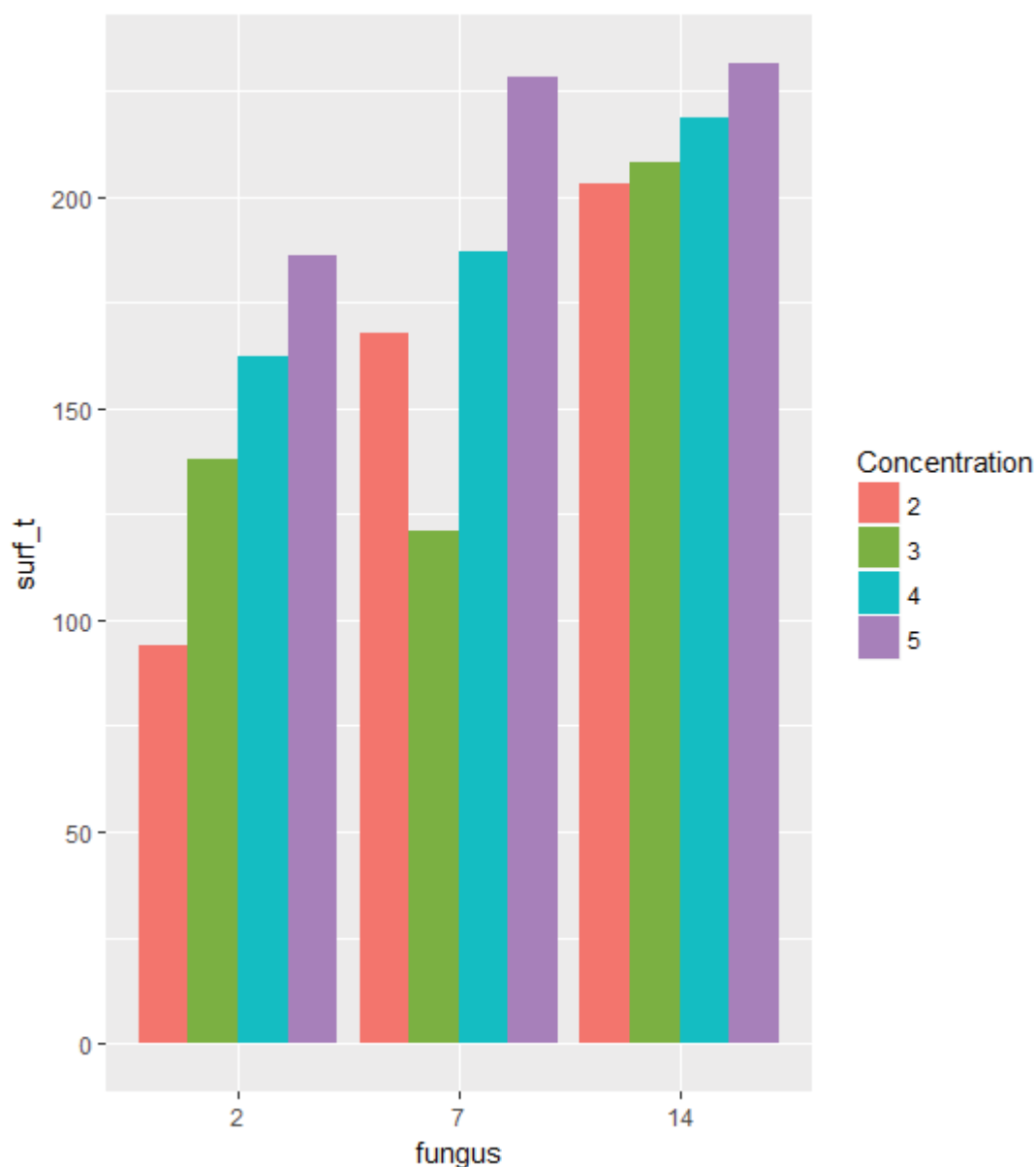


Figure 17 Superficie moyennes à 7 jours post-inoculation des taches causées par différentes souches de champignons inoculés dans le parenchyme de fruits à plusieurs concentrations (n = 20). (2) *F. oxysporum* ; (7) *T. stollii* ; (14) *F. ananatum*

Conclusion

La majorité des fruits échantillonnés présentent des taches. L'Ile Maurice est autant affectée par cette maladie que l'Ile de la Réunion. Les pathogènes isolés correspondent à ceux isolés sur fruits à La Réunion et engendrent les mêmes symptômes après inoculation artificielle. De même, *Fusarium ananatum* est le plus fréquent et un des isolats inoculés est plus virulent que ceux des autres espèces. Il semble y avoir des similitudes de diversité entre l'Afrique du Sud, La Réunion et Maurice. Comme sur l'Ile de la Réunion, de vraies

attentes de la part des producteurs, des exportateurs et des consommateurs ont été exprimées pour trouver une solution face à ce problème.

CHAPITRE III

Réponse biochimique

Le chapitre précédent a mis en relief la prévalence de la maladie sur les ananas du cultivar 'Queen' et la diversité des agents pathogènes. Les champignons de l'espèce *Fusarium ananatum* qui représentent 72% des isolats peuvent servir de modèle pour étudier l'interaction hôte-pathogène.

Ce chapitre, divisé en trois parties, décrit la réponse biochimique du fruit suite à l'infection de *Fusarium ananatum*. Les symptômes de la maladie étant invisibles de l'extérieur, une méthode d'inoculation a été mise au point. Une première analyse de la réponse métabolique a permis de mettre en évidence l'éllicitation de certains composés phénoliques en réponse à une attaque du champignon. Leur évolution a été mesurée à travers des comparaisons variétales et de maturités. Les propriétés antifongiques de ces acides organiques ont pu être testées *in vitro* et *in vivo*. Enfin, un profilage plus complet des métabolites discriminants de la maladie de la tache noire a été réalisé.

Article soumis dans Fruits

Coumaroylisocitric and caffeoylisocitric acids as markers of pineapple fruitlet core rot disease

B. Barral¹, M. Chillet¹, M. Léchaudel², R. Lugan³ and S. Schorr-Galindo⁴

¹ UMR Qualisud, CIRAD, 7 Chemin de l'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, Réunion, France

² UMR Qualisud, CIRAD, Station de Neufchâteau, 97130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe, France

³ UMR Qualisud, Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, Agrosciences, 84000 Avignon, France

⁴ UMR Qualisud, Université de Montpellier, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Significance of this study

What is already known on this subject?

- Fruitlet core rot is the main postharvest disease of pineapple. The internal symptoms are black spots where polyphenol oxidase exhibits high activity.

What are the new findings?

- Two hydroxycinnamic acids are highly synthesized in both resistant and susceptible pineapple cultivars in response to *Fusarium* inoculation. Coumaroylisocitric acid naturally accumulates in the resistant cultivar during ripening.

What is the expected impact on horticulture?

- To enhance levels in phenolic compounds in the susceptible 'Queen' susceptible cultivar in order to contain fruitlet core rot disease.

Summary

Introduction. Fruitlet core rot disease is the major postharvest disease affecting ‘Queen’ pineapple in Reunion Island. The symptoms are black spots located in the pineapple fruitlets. **Materials and methods.** *Fusarium ananatum*, the main causal agent of fruitlet core rot was inoculated in ‘MD-2’ and Victoria (‘Queen’), a resistant and a susceptible cultivar, respectively. A metabolomics approach to healthy and inoculated fruitlets allowed us to determine which putative metabolites are involved in fruitlet core rot disease. We then conducted follow-up work on the evolution of fruitlet core rot with a focus on phenolic compounds. **Results and discussion.** Based on the metabolomics results, the phenolic compounds seemed to be determining markers of black spots. Coumaroylisocitrate and caffeoylisocitrate dramatically increased in the infected fruitlets in both cultivars post-inoculation. Hydroxycinnamic acids increased more rapidly in ‘MD-2’ than in the ‘Queen’ cultivar. ‘MD-2’-infected fruitlets reached higher hydroxycinnamic acid levels in a shorter time than those of the ‘Queen’-infected fruitlets. In healthy fruits of ‘MD-2’, coumaroyl-isocitric acid and hydroxybenzoic acids are naturally produced as the fruit matures. **Conclusion.** These phenolic compounds play a major role in plant disease resistance.

Keywords: *Ananas comosus* / *Fusarium ananatum* / phenolic acids / metabolomics / postharvest disease

Introduction

The ‘Queen’ pineapple cultivar (*Ananas comosus* var. *comosus*) is an emblematic product of Reunion Island, located in the Indian Ocean. Well-known as a sweet and tasty fresh fruit, it is susceptible to disease and pests that affect crop yield and fruit quality.

The major postharvest disease affecting the ‘Queen’ pineapple is fruitlet core rot (FCR) disease caused predominantly by *Fusarium ananatum*, as observed in South Africa (Fournier et al. 2015; Jacobs et al. 2010). The fungus *Talaromyces stollii*, previously described as *Penicillium funiculosum*, can cause the same symptoms (Edmonstone-Sammons 1955; Lim and Rohrbach 1980). The fungal pathogen penetrates the plant at the flowering stage through the stylar canals and nectary ducts, and remains latent until the fruit ripens (Rohrbach and Pfeiffer 1976). Fruitlet core rot is often not detected until the fruit is cut open (Oxenham 1953). Internal symptoms consist of a browning of the

center of the fruitlet beginning immediately below the floral cavity and, in severe cases, extending to the core of the ‘Queen’ pineapple cultivar (Tryon 1898).

On the other hand, some cultivars exhibit no symptoms of FCR, like ‘MD-2’ or, very rarely, like ‘Flhoran 53’. The ‘MD-2’ pineapple is a hybrid produced by the Pineapple Research Institute of Hawaii, now the world’s pre-eminent fresh fruit cultivar (Bartholomew et al. 2012). The ‘Flhoran 53’ cultivar was created by the CIRAD pineapple breeding program in the 1990s (Horry et al. 2007).

Improved knowledge of the pathogen and the plant interaction in resistant and susceptible cultivars will allow the development of novel approaches to enhance the resistance in the susceptible pineapple. Plant defense mechanisms have been intensively studied but information concerning fruitlet core rot is scarce. Avallone et al. (2003) showed a higher activity of polyphenol oxidase in fruitlets adjacent to black spots. This suggests the role of secondary metabolites in response to the fungus infection.

Metabolomics offers the possibility to monitor changes in secondary metabolism during resistance and disease development. Biochemical approaches have also been proposed to describe mechanisms governing host-pathogen interactions (Dixon and Paiva 1995; Knepper and Day 2010; Wojtaszek 1997).

This study aimed (1) to target a family of marker metabolites induced by fruitlet core rot disease, (2) to monitor their accumulation following an inoculation with the fungal pathogen *Fusarium ananatum* in the resistant and the susceptible cultivars, and (3) to compare their eventual accumulation during natural ripening in both cultivars.

Materials and methods

Plant material

This study was conducted in an experimental pineapple field of ‘MD-2’, ‘Flhoran 53’ and ‘Queen’ cultivars at the CIRAD Research Station in Reunion Island (21°10’ South, 55°30’ East). The pineapples were grown according to standard agricultural practices (Fournier 2011). Fruits were inoculated in November 2014 and January 2015 at a mature green stage, corresponding to 80 percent of their expected harvest date. Fruit maturity was determined visually based on shell color. The code G defined a fruit with a green shell, C0

corresponded to the basal section with a yellow hue, C2 to a half basal yellow coloration, and C4 to a totally yellow fruit (Darnaudery et al. 2016).

Inoculum and inoculations

The CLP1 *Fusarium ananatum* strain used for the inoculations was taken from a collection of fungal pathogens. The fungus was isolated from naturally infected ‘Queen’ pineapple on Reunion Island and purified in selective media. The *Fusarium*-specific primer elongation factor *tef-1α* and *tef-2α* made it possible to identify Clp001 as a *Fusarium ananatum*. The single-spore isolate was grown on potato dextrose agar (PDA) for two weeks at 25°C. A fungal suspension was made in sterile water and adjusted to 10³ conidia mL⁻¹. Fruits were immediately inoculated after this step. Twenty-five microliters of the conidial suspension were injected into the parenchyma adjacent to the remnant floral cavity. Four fruitlets were inoculated per fruit in order to form the modality, ‘infected fruitlet’. The uninfected side of the fruit corresponded to the ‘healthy fruitlet’. Parallel to fungal inoculation, 25 µL of sterile water were also inoculated as a control into separate fruits, referred to as ‘H₂O fruitlet’. Pathogenicity tests were conducted to ensure that the black spots observed were due to the CLP1 strain.

Metabolomics

The ‘infected fruitlets’ and ‘healthy fruitlets’ of the resistant ‘MD-2’ and susceptible ‘Queen’ cultivars were sampled 13 days after inoculation. The frozen dissected fruitlets were ground in a Grindomix blender (Retsch, Haan, Germany). An aliquot of the powder was lyophilized for 72 h at -52°C. Twenty milligrams of lyophilized powder were diluted in 600 µL of methanol, 150 µL of chloroform and 400 µL of water. The aqueous fraction was used for GC-EI-MS and UPLC-HRMS analyses. For GC-EI-MS, metabolites were putatively identified based on their spectral similarity and their retention index relative to compounds of the Golm Metabolome Database (GMD). For UPLC-HRMS, putative structures were inferred from MS and MS/MS spectra matched against public databases.

Evolution of free phenolic compounds

Free phenolic kinetics were monitored in the ‘infected fruitlets’, ‘healthy fruitlets’ and ‘H₂O fruitlets’ of the resistant ‘MD-2’, tolerant ‘Flhoran 53’ and susceptible ‘Queen’ cultivars. Analyses were carried out at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 21 and 28 days after inoculation (dai) for ‘MD-2’; 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14 and 25 for ‘Flhoran 53’ cultivars and 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13

and 22 dai for 'Queen'. For each cultivar, three fruits were randomly handpicked at each sampling date. The content of phenolic compounds in 'infected fruitlets' and 'H₂O fruitlets' are presented according to the number of days after inoculation. Preliminary analyses revealed that the kinetics of phenolic compounds in 'healthy fruitlets' are more coherent according to the degree of ripening than to the number of days after inoculation. Indeed, during the experiment, the fruits matured in a heterogeneous way.

Fruitlet sampling was similar to metabolomics but the extraction differed. Five hundred milligrams of lyophilized powder were added to 10 mL of an ethanol-water solution (80:20, vol:vol) and 100 µL of methyl 4-hydroxybenzoate (1 g L⁻¹) was additionally added as an internal standard. The solution was sonicated for 10 min at 35°C and then filtered (Transsonic, TI-H15 MF2, Fisher, Bioblock Scientific). Ultrasound-assisted extraction was repeated after the extract was recovered on the filter. The total solution was concentrated under low pressure and the residual was precisely adjusted to 10 mL in methanol. Ultrasound-assisted extraction was chosen after a preliminary test. The optimal condition for the extraction was determined based on a comparison of different solvents, times, frequencies and temperatures in both stirring and ultrasound extraction. Samples were filtered with a 0.45-µm filter (Millipore) and injected into a high-pressure liquid chromatography (HPLC) column.

Quantification of phenolic acids was performed using commercial standards of trans-*p*-coumaric acid, chlorogenic acid, trans-sinapic acid and gallic acid purchased from Sigma-Aldrich (France). HPLC analysis was performed using a Dionex Ultimate 300 apparatus (Dionex Co., Sunnyvale, CA, USA) equipped with a diode array detector. The column used was a reverse phase, Waters Symmetry Shield C18 250 x 4.6 mm, 5 µm. Peak areas with maximum absorption at 280 nm were converted to µg g⁻¹ dry weight of gallic acid equivalent (GAE) using a standard curve prepared with different concentrations of gallic acid. Peak areas at 320 nm of trans-*p*-coumaric acid, chlorogenic acid, trans-sinapic acid and their derivatives were also converted from their corresponding standards.

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted in R statistical software (R Development Core Team 2015). A Box-Cox transformation was performed to ensure normal distributions of residues and homogeneity of variance of residuals. Comparisons of means in terms of

phenolic acids among the cultivars for each sampling date were made by Tukey's multiple comparison tests.

Results and discussion

Metabolomics

A hierarchical clustering was used to arrange the metabolites on the basis of their relative levels across samples (Figure 18). Metabolites mainly clustered according to inoculation status. The effect of inoculation was also evident within each cultivar. Among the perturbed metabolites, phenolic compounds could be candidates for markers of fruitlet core rot disease. In the infected fruitlets, 28 metabolites are found at higher levels in the 'MD-2' cultivar compared to the 'Queen' cultivar. Two compounds are distinguished from others as markers of the disease: *p*-coumaroyl-isocitric acid and caffeoyl-isocitric acid.

Accumulation in hydroxycinnamoyl isocitrates after Fusarium ananatum

Our results show a high increase of *p*-coumaroyl and caffeoyl isocitrates following inoculation with *Fusarium ananatum* fungus in infected fruitlets (Figure 19). The 'MD-2' cultivar accumulated higher levels of coumaroyl-isocitric and caffeoyl-isocitric acids in the infected fruitlets in a shorter time compared to 'Flhoran 53' and 'Queen'. For example, *p*-coumaroyl-isocitric acid reached a concentration of 3331 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry weight (DW) four days post-inoculation for 'MD-2'. In the infected fruitlets of 'Flhoran 53', the highest amount was 2645 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DW at six dai, and 'Queen' reached 1941 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DW at eight dai.

Phenolics are known to be involved in plant disease resistance (Hammond-Kosak and Jones, 1996). Phytoalexins are plant secondary metabolites, produced de novo mainly through the phenylpropanoid and the terpenoid pathways in response to a variety of stresses (Hammerschmidt, 1998; Wang et al, 2008). In the general phenylpropanoid pathway, these two compounds are the major precursors leading to lignin formation (Vanholme et al. 2010). Lignin biosynthesis is induced upon pathogen infection to protect cell wall polysaccharides from microbial degradation (Bellincampi et al. 2014; Tronchet et al. 2010).

Once they reached their maximum levels, the two hydroxycinnamic acids significantly decreased until the end of the trial. In keeping with our results, Avallone et al. (2003)

found high levels of polyphenol oxidase and laccase activity in well-formed pineapple black spots. These enzymes are able to oxidize phenolic acids into quinones, which then react with other quinones, forming high-molecular-weight polymers with brown pigmentation. These enzymatic activities could explain the decrease in *p*-coumaroyl-isocitric and caffeoyl-isocitric acids.

Hydroxybenzoic acids in infected fruitlets

The levels of hydroxybenzoic acids did not increase following inoculation but only six days after the inoculation for 'Queen', eight days for 'Flhoran 53' and 12 days for 'MD-2' (Figure 19C). In comparison with the healthy fruitlets (Figure 20C), the synthesis of hydroxybenzoic acids was repressed in the infected fruitlets. The phenylpropanoid pathway leading to lignin synthesis could be up-regulated at the expense of the hydroxybenzoic acids during a pathogenic attack. Some studies demonstrate the existence of a channeling pathway in the biosynthesis of phenolic compounds. For example, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamate 4-hydroxylase (C4H) enzymes create metabolic channeling for the early steps in monolignol biosynthesis (Rasmussen and Dixon 1999; Winkel-Shirley 1999). Lee et al. (2012) also suggest a metabolic channeling for two monolignol biosynthetic enzymes involved in lignin formation, caffeic acid O-methyl transferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase. The activation or suppression of genes encoding enzymes of the phenylpropanoid pathway should be investigated to support our hypothesis. Finally, Gauthier et al. (2016) demonstrated the ability of *F. graminearum* to biotransform some simple phenolic acids into a diversity of metabolites. This could explain why the production of hydroxybenzoic acids was repressed in the infected fruitlets.

The increase could be correlated with the evolution of maturation during the trial.

Phenolic compound evolution in healthy fruitlets during ripening

Our results only show an accumulation of *p*-coumaroyl-isocitric acid and hydroxybenzoic acids in healthy fruitlets of 'MD-2' during ripening (Figure 20). Levels of those metabolites started to increase at the C1 maturity stage, when the shell color changed from green to yellow. The level in hydroxybenzoic acids was 2204 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DW at C2 in 'MD-2'. The *p*-coumaroyl-isocitric acid level continued to increase until the C4 stage to reach 281 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DW. In the 'Queen' cultivar, the highest level of hydroxybenzoic acids was 478 $\mu\text{g g}^{-1}$ of

DW monitored at C1 maturity. For all of the cultivars, the caffeoyl-isocitric acid level remained close to zero.

Most of the studies describe a decrease in phenolic acid content during fruit ripening (Burda et al. 1990; Castrejón et al. 2008; Gruz et al. 2011; Lima et al. 2005), whereas our results showed an increase in coumaroyl-isocitric acid and hydroxybenzoic acids. In agreement with our results, (McKeehen et al. 1999) showed an increase in phenolic compounds on wheat grain during maturation. Because bibliographic data concerning the evolution of phenolic acids during pineapple maturation and ripening are scarce, it is not possible to compare the increase we observed with previous reports at this time.

The accumulation of phenolic compounds was related to maturity in the resistant variety. In fact, early accumulation in the resistant cultivar is consistent with the first symptoms in the susceptible cultivar. These compounds are known for their antifungal properties (Aziz et al. 1998; Maher et al. 1994; Zabka and Pavela 2013). The resistant cultivar is already armed if the pathogen tries to penetrate the fruitlet. The response to the attack of the fungus is therefore immediate.

Phenolic compound evolution in H₂O-inoculated fruitlets

The fruitlet reacted to H₂O inoculation (Figure 21). The *p*-coumaroyl and caffeoyl isocitrates accumulated in all three cultivars from the second day after inoculation. Maximum values were obtained at two to four days after inoculation at levels ten times lower than those found in the infected fruitlets. Thereafter, levels in hydroxycinnamic acids decreased to reach similar values as healthy fruitlets. Hydroxybenzoic acids did not appear to be affected by inoculation, like in the case of infected fruitlets. Moreover, the symptoms were not visible except for the occasional trace of the needle (data not shown).

This inoculation with sterile water confirms that the pattern of evolution of the phenolic compounds observed in the infected fruitlets is due to the presence of the pathogenic fungus *Fusarium ananatum*.

Conclusion

Pineapple production is dramatically increasing on the island, making disease management a major challenge for the sector. Metabolomics showed that fungus infection could induce multiple reactions throughout the plant. We showed that the phenolic

compound pathway played a dominant role in the fruit response to a fungal attack. Coumaroylisocitrate and caffeoylisocitrate are abundantly synthesized. These two phenolic compounds are directly involved in the composition of lignin, known as a physical barrier to pathogens. This possible increase in the lignin bound to cell walls could block the access to intracellular nutrients for the fungus. Finally, the resistant cultivar is able to naturally synthesize *p*-coumaroyl-isocitric acid during ripening. Phenolics are pre-formed at the critical stage of disease appearance in the resistant pineapple.

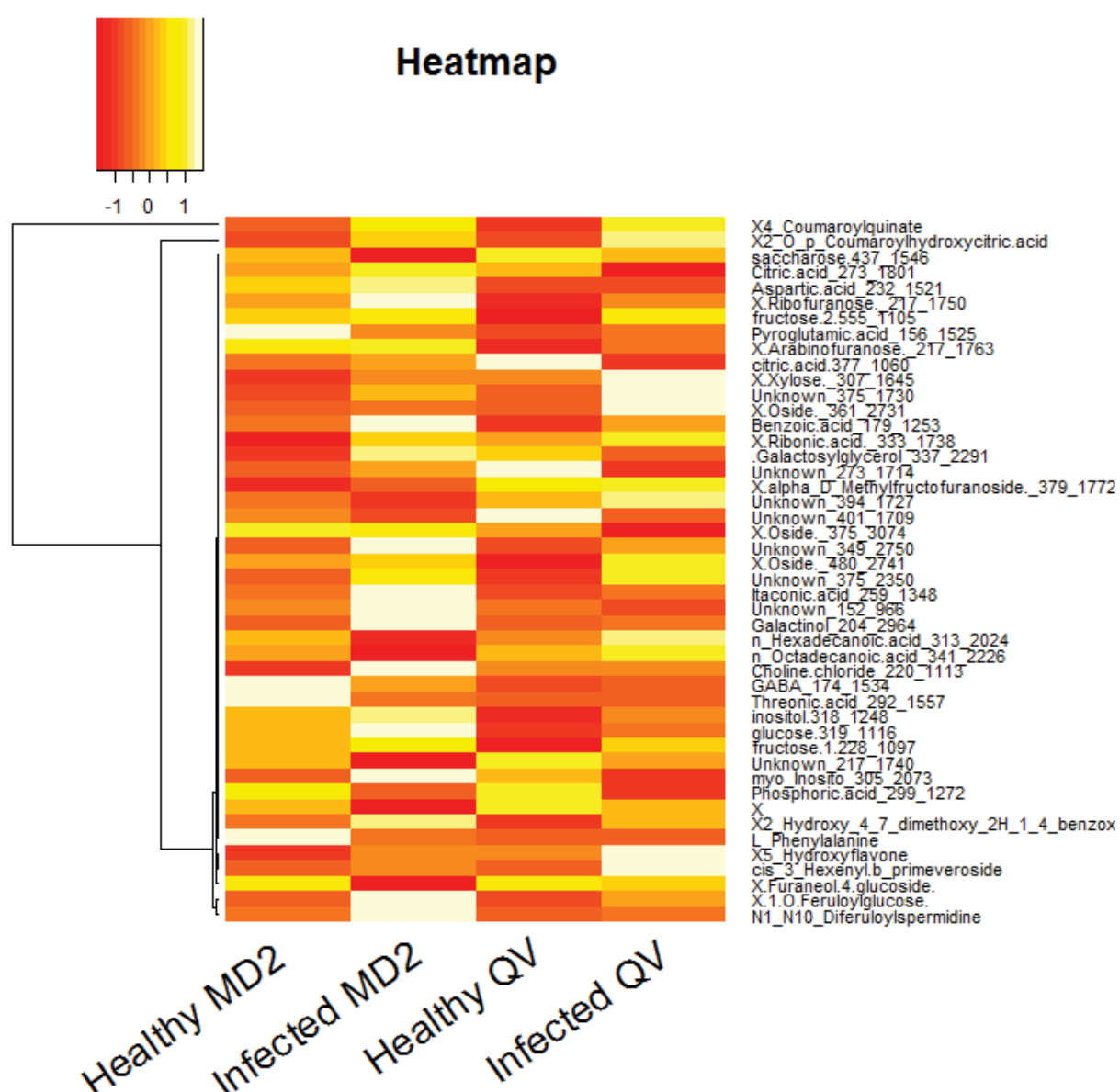


Figure 18 Hierarchical clustering analysis of metabolites in samples obtained from healthy and infected fruitlets of 'MD2' and 'Queen' cultivars. Yellow highlighting indicates high levels of metabolites and red highlighting indicates low levels of metabolites.

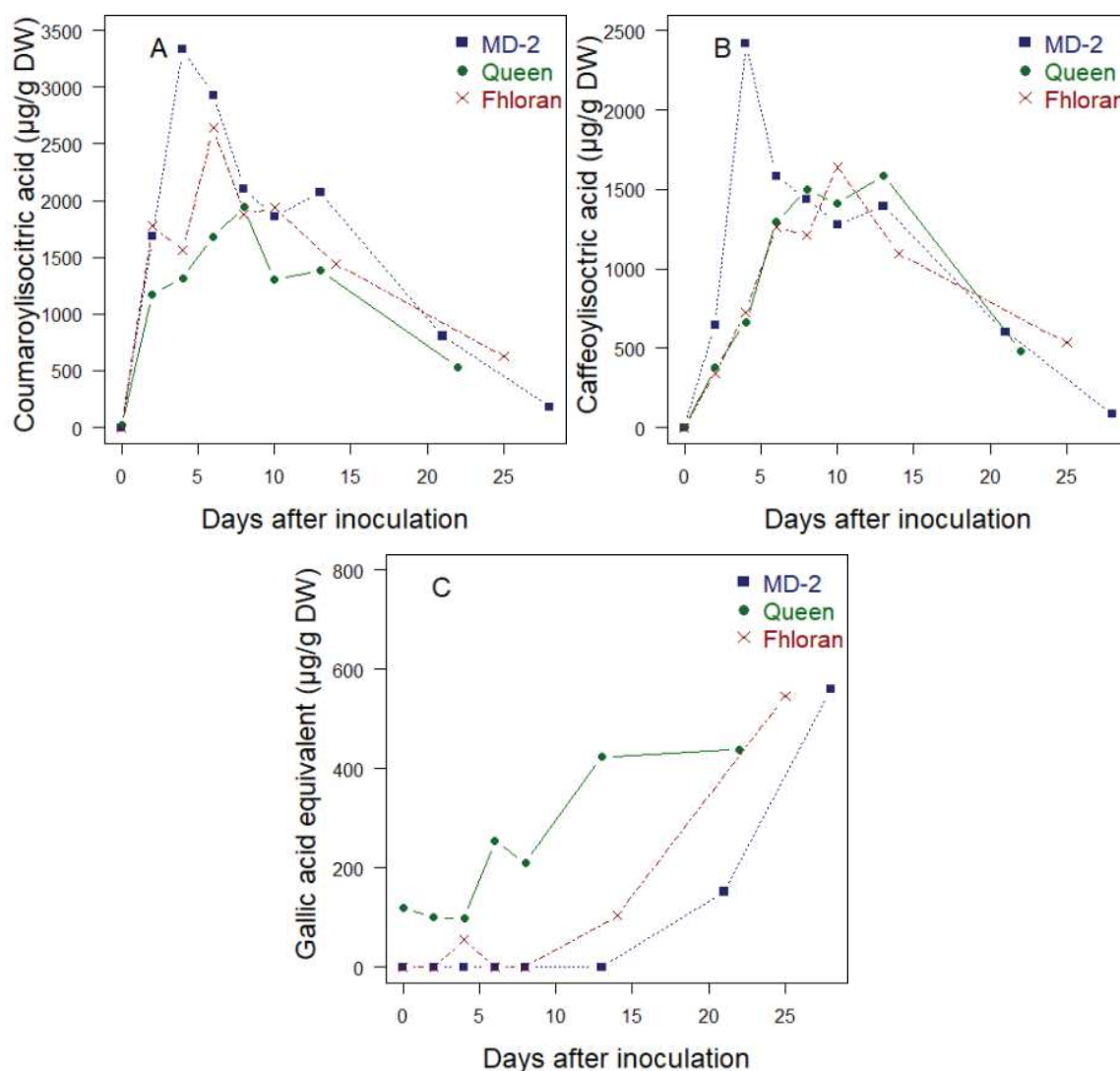


Figure 19 Evolution of *p*-coumaroylisocitrate (A), caffeoylisocitrate (B) and hydroxybenzoic acids (C) after inoculation with *Fusarium ananatum* in infected fruitlets of the 'MD-2' resistant cultivar (■), 'Fhloran 53' tolerant cultivar (x) and the 'Queen' susceptible cultivar (●). Data points are means of 12 infected fruitlets.

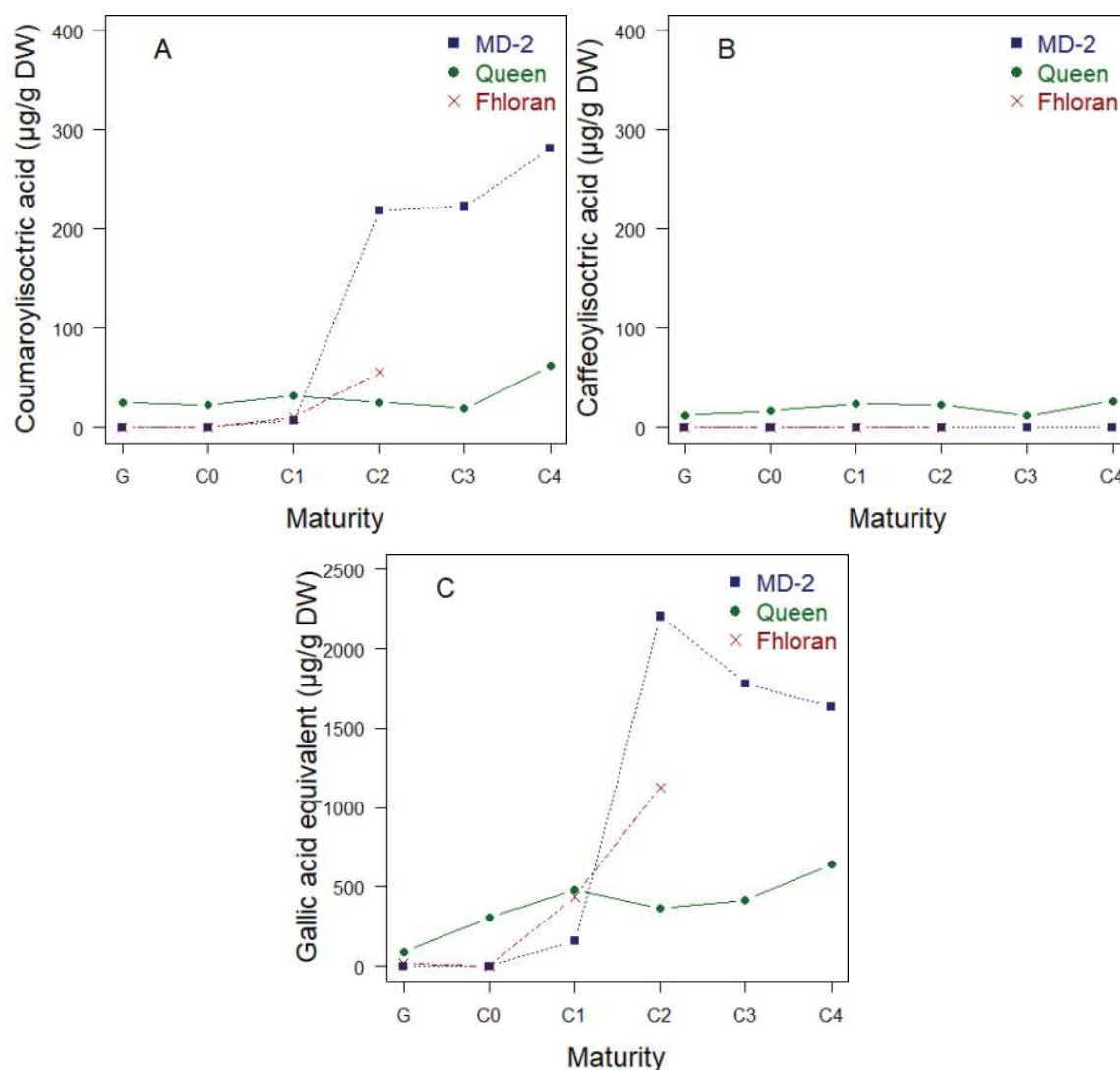


Figure 20 Evolution of *p*-coumaroylisocitrate (A), caffeoylisocitrate (B) and hydroxybenzoic acids (C) in healthy fruitlets during fruit ripening beginning at the green maturity stage (G) to fruit maturity (C4) for the ‘MD-2’ resistant cultivar (■), ‘Fhloran 53’ tolerant cultivar (×) and the ‘Queen’ susceptible cultivar (●). Data points are means of three fruits.

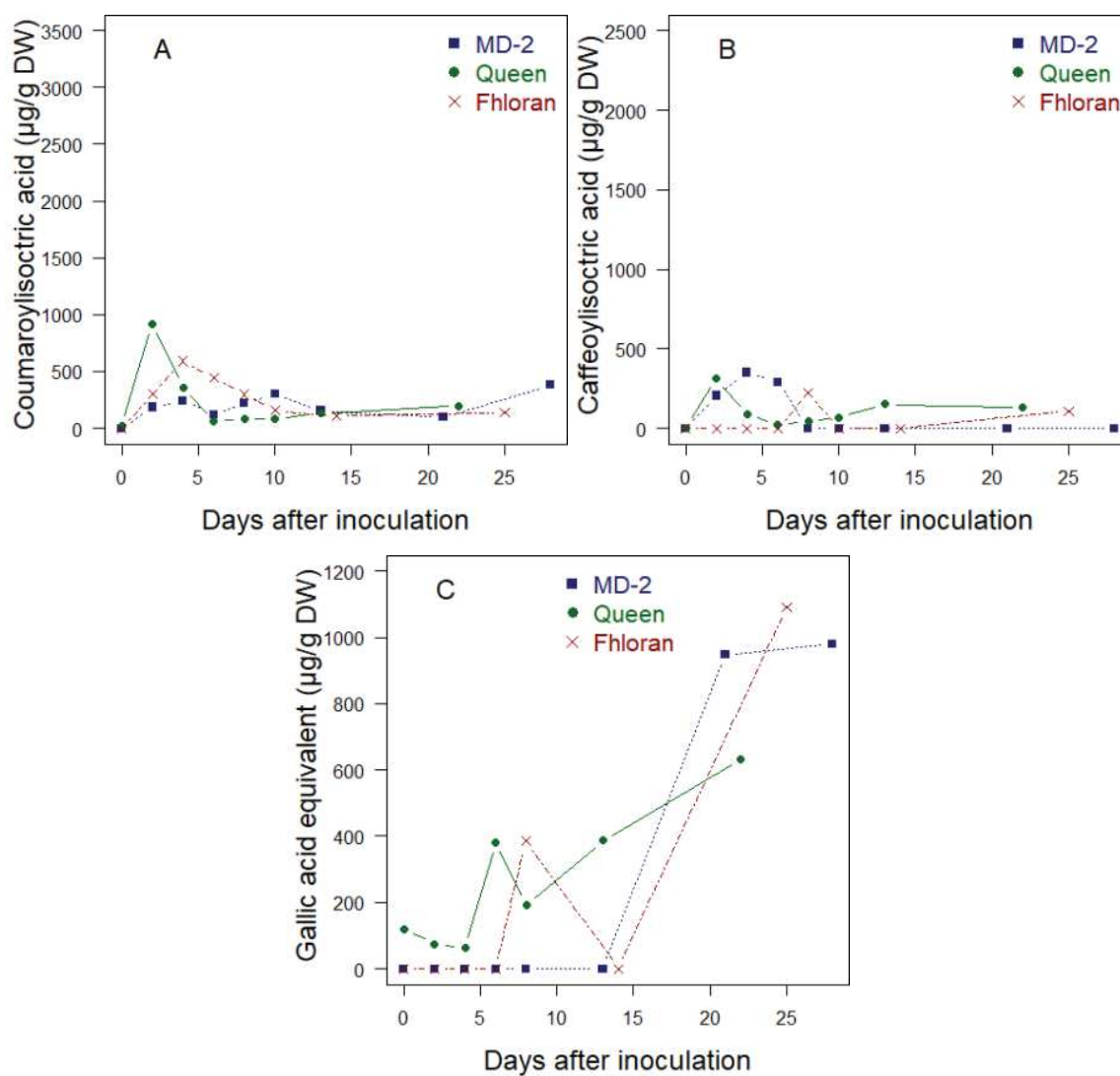


Figure 21 Evolution of *p*-coumaroylisocitrate (A), caffeoylisocitrate (B) and hydroxybenzoic acids (C) in H₂O inoculated fruitlet of the ‘MD-2’ resistant cultivar (■), ‘Fhloran 53’ tolerant cultivar (×) and the ‘Queen’ susceptible cultivar (●). Data points are means of 12 infected fruitlets.

Article accepté dans *Fungal Biology*

Evaluating the response to *Fusarium ananatum* inoculation and antifungal activity of phenolic acids in pineapple

Bastien Barral^{a,*}, Marc Chillet^a, Jerome Minier^a, Mathieu Léchaudel^b, Sabine Schorr-Galindo^c

^aUMR Qualisud, CIRAD, 7 Chemin de L'Irat, Ligne Paradis, 97410 Saint Pierre, Réunion, France

^bUMR Qualisud, CIRAD, Station de Neufchâteau, 97130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe, France

^cUMR Qualisud, Université de Montpellier, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

*Corresponding author.

Corresponding Editor: Kerry O'Donnell

Abstract *Fusarium ananatum* causes fruitlet core rot (FCR) in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*) when the fruit reaches maturity. Hidden symptoms make it difficult to assess the disease, regardless of its stage, and basic questions concerning the involvement of the phenolic compounds in response to infection remain unknown. A direct inoculation method of *F. ananatum* in pineapple fruitlets was developed to monitor the growth of black spots and the changes in phenolic acids and ascorbic acid concentration under controlled conditions. After inoculation, infection began with a flesh discolouration at the inoculation point and then spread in a darker shade to form a black spot. Coumaroyl-isocitric and caffeoyl-isocitric acids levels respectively showed a 150 and 200 fold increase in infected fruitlet when compared to healthy fruitlet. These hydroxycinnamic acids increased minimally in the adjacent fruitlet and remained stable in the other parts of the fruit. By contrast, sinapic acid and hydroxybenzoic acid isomers (HBA) decreased after *F. ananatum* inoculation in the infected fruitlet, whereas they remained stable in the adjacent and healthy fruitlets. Ascorbic acid decreased to zero in the infected fruitlet. The

antifungal activity of phenolic compounds and ascorbic acid was evaluated against the mycelial growth of *F. ananatum*. *p*-Coumaric acid exhibited a total inhibition of the mycelial growth at 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$. Ferulic acid inhibited 64 % of mycelial growth at a concentration of 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$. Caffeoylquinic acid, sinapic acid and ascorbic acid also showed significant antifungal activity, but to a lesser extent. Finally, co-inoculation of the hydroxycinnamic acids with the pathogen restrains its development in the fruit. This is the first study to highlight the involvement of phenolic compounds in the pineapple FCR.

Keywords: *Ananas comosus*; Caffeoyl-isocitric acid; Coumaroyl-isocitric acid; Fruitlet core rot; Fungi; *Fusarium ananatum*

Introduction

Fungi of the *Fusarium* genus are associated with most economically important plants (Leslie et al. 2006). Pineapple is no exception with fruitlet core rot (FCR), a disease commonly named black spot disease that affects the fruit during ripening. The disease was first reported in Australia at the end of the 19th century (Tryon 1898). *Fusarium verticilloides* (syn. *Fusarium moniliforme*) and *Penicillium funiculosum* have long been considered as the causal agents of FCR (Rohrbach and Johnson 2003; Rohrbach and Pfeiffer 1976; Seifert et al. 2003). Recent investigations using molecular tools have made it possible to identify *Fusarium ananatum* as responsible for FCR in South Africa and China (Gu et al. 2015; Jacobs et al. 2010). In Reunion Island, *Fusarium* sp. is also linked to fruitlet core rot in pineapple (Fournier et al. 2015).

The pathogen penetrates the plant during the flowering stage through styler canals and nectary ducts (Rohrbach and Pfeiffer 1976). Once the fungus reaches the floral cavity, it remains latent during fruit growth (Mourichon et al. 1987). A model based on a pluviothermic index established that cold temperatures and high humidity during the open heart to harvest stages promote the appearance of the disease (Fournier et al. 2015). During maturation, some physiological changes allow the fungus to recover and spread in the edible portion of the pineapple fruit. FCR is characterized in ripe fruit by a necrosis of the eyes ranging from a soft and light rot to a darker and drier rot according to the stage of harvest (Mourichon 1983). Leathery pocket and interfruitlet corking are also found in the literature as additional symptoms of FCR (Rohrbach et al. 2003).

Because symptoms are not externally visible, they negatively impact producers and consumers and make the study of this disease more challenging. Identification of an artificial inoculation method for disease development in a crop is important to improve our understanding of host–pathogen interactions (Das et al. 2015).

Avallone et al. (2003) studied the enzymatic browning in naturally infected pineapple fruits. Adjacent infected fruitlets showed a higher activity of polyphenol oxidase than healthy fruitlets. This enzyme oxidizes phenolic compounds into quinones, causing the flesh to turn dark brown (Macheix and Fleuriet 1990). These results point out the importance that phenolic compounds may play in FCR disease. In response to pathogen infection, they can be rapidly synthesized by the plant at the site of infection and inhibit the growth of *Fusarium* pathogens, as reported on wheat (McKeehen et al. 1999; Nicholson and Hammerschmidt 1992). The induction of plant defence phenolics following pathogen infection contribute to the arrest of fungal penetration attempts in resistant barley (von Röpenack et al. 1998). Atanasova-Penichon et al. (2012) described the phenolic acid accumulation, mostly caffeoylquinic acid, after *Fusarium graminearum* inoculation on maize kernels. Several *in vitro* studies highlight the antifungal activity of various classes of phenolics such as flavonols, hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids (Daglia 2012; Lattanzio et al. 2006; Ponts et al. 2011). To our knowledge, the possible implication of phenolic acids in the black spot-*F. ananatum* interaction has not yet been studied.

In the present study, we monitored the progression of black spot in pineapple, the types of phenolics that are generated in the fruit in response to pathogen growth and their antifungal potential against *F. ananatum*. The specific objectives were first to develop a calibrated method to inoculate *F. ananatum* in a mature fruit and to describe the evolution of the FCR symptoms, second to identify which free metabolites were involved after inoculation of the pathogen and how they evolve over time in the healthy, adjacent and infected fruitlets. Finally, the antifungal potential of these metabolites was measured *in vitro* and *in vivo*.

Materials and methods

Plant material

Pineapples (*Ananas comosus* L., cv. 'Queen') were grown according to standard cultural practices at the CIRAD Experimental Research Station (21°10' South, 55°30' East) in Réunion Island (Fournier 2011). Three harvests were carried in October and November 2013 in randomized blocks. Twenty-nine fruits were chosen randomly for each harvest date; 21 for inoculation and eight as control fruits. All the fruits were harvested at the C2 colouration stage, defined as a half basal yellow colouration of fruit peel and studied until the C4 colouration stage, defined as a totally yellow fruit (Darnaudery et al. 2016).

Fungal inoculum culture and fruit inoculation

Inoculation was performed immediately after harvest with the Clp001 *F. ananatum* strain of our collection. Preliminary inoculations and growth monitoring were performed on several *F. ananatum* isolated from infected pineapple fruitlets. The Clp001 isolate was selected because of its stability, high pathogenicity, and aggressiveness *in vivo* that were representatives of the biological behaviour of the majority of *F. ananatum* strains. The fungus was grown on potato dextrose agar (PDA) (Biolife) acidified at pH 4 with citric acid for 2 weeks at 25°C. The growing medium acidity was the same as that of a mature fruit (Bartholomew et al. 2002). The fungal suspension was achieved after adding distilled water to the growing plate for conidia recovering. 'Queen' fruits were inoculated with 25 µl of a conidial suspension at 10^3 conidia ml⁻¹, using a 50 µl Hamilton syringe. Four fruitlets on one side of the fruit were inoculated and corresponded to the 'infected fruitlet'; two inoculations on the upper part and two on the lower part of the fruit. The syringe was pushed through the peel in the fruitlet perpendicularly to the fruit axis. The flesh between infected fruitlets corresponded to the 'adjacent fruitlet'. The other side of the fruit corresponded to the 'healthy fruitlet'. After inoculation, pineapples were transferred to a climatic controlled room and stored at 22°C and 85-90 % relative humidity. To ensure that the black spot was due to Clp001, the flesh from noninoculated and inoculated fruitlets were placed on PDA amended with chloramphenicol and left for 8 days at 25°C. The identification of the reisolated fungi was based on morphological criteria.

Black spot growth/disease severity

Pineapple fruits were cut in transverse sections at the site of inoculation and the fruit diameter was measured. The length and the width of every black spot were measured

from pictures. Their areas were estimated using the ellipse formula and then compared to the fruit diameter. Disease severity was rated as a percentage of the fruit transverse section showing *Fusarium* disease symptoms.

Sampling

Assessment of metabolites involved in the fruit response following *Fusarium ananatum* inoculation was carried out over eight dates. Nine inoculated fruits were sampled at 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 days after inoculation (dai). For each inoculated fruit, healthy fruitlet, infected fruitlets and adjacent fruitlet were sampled separately. Three control fruits were also sampled on the day of harvest and at 2, 4, 6, 8, 10, 12, and 14 days after harvest. The fruitlets were dissected and immediately dipped in liquid nitrogen. These frozen samples were ground in a Grindomix blender (Retsch, Haan, Germany) and the powders obtained were stored in opaque plastic pots at -80°C until lyophilization. Frozen samples were lyophilized over 72 h at -52°C. Dried pineapple powders were stored in plastic vials with a desiccation agent at -20°C until analysis.

Free phenolic acid extraction

The extraction of phenolic compounds and ascorbic acid was performed in an ultrasonic bath (Transsonic, TI-H15 MF2, Fisher; Bioblock Scientific). Five hundred milligrams of lyophilized powder was added to 10 ml of an ethanol-water solution (80:20, vol:vol), and 100 µl of methyl 4-hydroxybenzoate (1 g l⁻¹) was additionally added as an internal standard. The solution was sonicated for 10 min at 35°C and then filtered. Ultrasound-assisted extraction was repeated once with the extract recovered on the filter. The total solution was concentrated under low pressure and the residual was precisely adjusted to 10 ml in methanol. Ultrasound-assisted extraction was chosen after a preliminary test. The optimal condition for the extraction was determined based on a comparison of different solvents, times, frequencies and temperatures in both stirring and ultrasound extraction. Samples were filtered with a 0.45-µm PVDF filter (Millipore) and injected into a high-performance liquid chromatograph (HPLC).

HPLC-DAD-MSⁿ analysis of phenolic acids

The HPLC analysis was carried out on a Waters 2690 HPLC system equipped with Waters 996 DAD (Waters Corp., Milford, MA, USA) and Empower Software (Waters). The

separation was performed at 30°C using a 250 mm x 4.6 mm, 5- μ m particle size, endcapped reversed-phase Lichrospher ODS-2 (Interchim, Montluçon, France). The injection volume was 10 μ l and the detection was carried out between 200 and 600 nm. MSⁿ analysis was carried out using a LCQ ion trap mass spectrometer fitted with an electrospray interface (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). The solvents were 0.1 % aqueous formic acid (solvent A) and acetonitrile/water/formic acid (80:19.9:0.1, v/v/v; solvent B). Pineapple phenolic acids were analysed using the following gradient: 5- 35 % B in 50 min, 35-50 % B in 5 min, and 50-80 % B in 5 min, after which the column was washed and equilibrated to the initial conditions. Phenolic acids identification was resolved on the basis of ion molecular mass, MSⁿ, and UV-visible spectra from the method described by (Mertz et al. 2007). Based on these identifications, changes in levels of phenolic acids and ascorbic acid were monitored in control, healthy, adjacent and infected fruitlets of pineapple throughout the duration of the experiment.

Quantitative analysis

Quantification of phenolic acids and ascorbic acid was performed using commercial standards of trans-*p*-coumaric acid, caffeoylquinic acid, trans-sinapic acid, gallic acid and ascorbic acid purchased from Sigma-Aldrich (France). HPLC analysis was performed using a Dionex Ultimate 300 apparatus (Dionex Co., Sunnyvale, CA, USA) equipped with a diode array detector. The column used was a reverse-phase Waters Symmetry Shield C18, 250 x 4.6 mm, 5 μ m. Three peaks of hydroxybenzoic acids (HBA) were identified on the basis of UV spectra at 280 nm. HBA were converted to μ g g⁻¹ fresh weight (FW) of gallic acid equivalent (GAE) using a standard curve prepared with different concentrations of gallic acid. Levels in *p*-coumaroyl-isocitric acid, caffeoyl-isocitric acid, sinapic acid, and their derivatives were measured from their closest standards of trans-*p*-coumaric acid, caffeoylquinic acid and trans-sinapic acid at 320 nm. Peak area with maximum absorption at 245 nm was converted into ascorbic acid (Sánchez-Mata et al. 2000).

Antifungal activity of phenolic acids *in vitro*

Phenolic acids such as *p*-coumaric, caffeoylquinic, ferulic, sinapic, gallic, the combination of *p*-coumaric and caffeoylquinic acids, and ascorbic acid were tested for their antifungal properties by adding them to the culture medium (PDA) at various concentrations. Since *p*-coumaroyl-isocitric acid was unavailable, we used its precursor in the phenylpropanoid

pathway, *p*-coumaric acid. Phenolic acids were dissolved in methanol with a final solvent concentration of 0.25 % vol/vol (Queimada et al. 2009) because *p*-coumaric acid poorly solubilized in an aqueous environment (Zabka and Pavela 2013). The control treatment was also supplemented with methanol. Phenolic acids were added to the medium to achieve concentrations of 500, 1000, 1500 and 2000 $\mu\text{g g}^{-1}$. Citric acid, the most common organic acid present in pineapple fruit, was also added to mimic natural conditions to reach a final pH of 5, closed to the pH measured in pineapple at this maturity stage. Inoculum consisted of a 5-mm diameter disc of the isolate Clp001 taken from a four-day-old acidified PDA medium and inoculated onto a Petri dish that contained PDA medium supplemented with acids. Five replications were performed for each treatment, the experiment repeated twice. The antifungal activity of these compounds was performed following mycelial growth at 26°C. The percentage of mycelial growth inhibition (MGI) was calculated when the control fungi reached the edges of the Petri dish after 8-9 days (Nidiry and Babu 2005). The minimum inhibitory concentration (MIC) was considered to be the lowest concentration that completely inhibited the pathogen growth according to a visual evaluation.

The fungitoxic potential of these compounds was also tested. All the discs from treatments where the mycelium growth was totally inhibited were transferred on a new acidified PDA medium ($n = 10$). After 7 days at 26°C, fungal recovery was monitored based on visual observations. The phenolic acid had a fungitoxic effect if nothing developed from the treated disks. The compound exhibited fungistatic activity if the mycelium grew again.

Effect *in vivo* of phenolic acids

p-Coumaric, caffeoylquinic, and gallic acids were tested for their capacity to restrain the development of the fungus into the fruit. The phenolic acids were added at a final concentration of 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ to a conidial suspension of *Fusarium ananatum* (10^3 conidia ml^{-1}). The mixture was inoculated in four fruitlets per fruit. Four fruits were used by phenolic acid. A negative control with distilled water and a positive control with the conidial suspension of *F. ananatum* (10^3 conidia ml^{-1}) were also tested. The necrosis areas were measured 11 days after inoculation.

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted in R (R Development Core Team 2015). A Box-Cox transformation was performed to ensure normal distributions of residues and homogeneity of variance of residuals. Analyses of variance (ANOVA) on the black spot growth, ascorbic acid and phenolic acids level between sampling dates and sampled fruitlets were carried out on the transformed data, if required. Comparisons of means in terms of phenolic acids among the fruitlets for each sampling date were made by Tukey's multiple comparison test. Differences in antifungal activities among the tested compound concentrations were statistically evaluated for each compound with Tukey's multiple comparison test.

Results

Black spot growth in pineapple fruitlet

Whatever the stage of fruit ripening, the black spot emerged after inoculation. Colouration of fruit peel changed from the C2 stage at the time of inoculation to the C4 stage, defined as a completely yellow fruit. The aspect and size of the black spot evolved during the development of FCR in the fruit flesh. Two dai with Clp001, small translucent yellow spots were observed at the inoculation point. Four dai, the spots occupied 2 % of the fruit diameter (Figure 22). At this stage, coloured spots turned light brown and remained bright. The area then increased linearly until 12 dai, reaching 6 % of the fruit diameter. The spot became darker (dark brown) with a dry aspect, taking on the appearance of a black spot. Between day 12 and day 14, the black spot area did not significantly change. The reisolation of the noninoculated and inoculated fruitlets confirmed that black spot was due to *F. ananatum*.

Identification of free acids in healthy and infected fruitlets

While the same acids were found in the healthy and infected fruitlets, their levels were different at 10 dai. Figure 23 illustrates the HPLC separation of the free phenolic compounds from healthy and infected fruitlets at 320 nm. On the basis of LC-MS data and UV spectra, the ascorbic acid and five hydroxycinnamic acids and derivatives were identified: *m/z* 385 sinapoyl hexose, *m/z* 353; caffeoyl-isocitric acid, *m/z* 498; S-sinapylglutathione, *m/z* 337; coumaroyl-isocitric acid and *m/z* 249; and N-L-y-glutamyl-S-sinapyl-L-cysteine.

Ascorbic acid content decreases to zero in the infected fruitlet

Ascorbic acid in the pineapple fruit flesh was measured at 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ of FW the day of inoculation (Figure 24). The ascorbic acid level decreased until 4 dai, regardless of the fruitlets sampled. After that, ascorbic acid levels continued to drastically decrease, reaching zero at the end of the experiment in the infected fruitlet. However, in the control and healthy fruitlets, ascorbic acid returned to the initial level of 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ of FW. In the adjacent infected fruitlet, the level stabilized around 30 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Coumaroylisocitrate and caffeoylisocitrate contents increase in infected fruitlet

p-Coumaroyl-isocitric and caffeoyl-isocitric acids were synthesized in large quantities after Clp001 inoculation in the infected fruitlet (Figure 25A and Figure 25B). All the phenolic compounds were already present in the fruit as of the C2 colouration stage except caffeoyl-isocitric acid. Levels of the two hydroxycinnamic acids never exceeded 6.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ of FW in the control and healthy fruitlets throughout the experiment (Tableau 8). Phenolic acids levels were not significantly different between control and healthy fruitlets ($P < 0.01$) throughout the duration of the experiment. By contrast, in the infected fruitlet coumaroylisocitrate and caffeoylisocitrate levels were significantly higher than in the other fruitlets as of the second day after inoculation. The *p*-coumaroyl-isocitric acid level significantly increased until 8 dai, reaching 356.3 $\mu\text{g g}^{-1}$ of FW (Figure 25A). Accumulation of caffeoyl-isocitric acid followed the same pattern and reached its maximum value of approximately 375.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ of FW at 10 dai, two days after the *p*-coumaroyl-isocitric acid (Figure 25B). At that time, the level of caffeoyl-isocitric acid in the infected fruitlet was 250 times higher than in the healthy one. Finally, after both acids reached their respective maximum contents, they tended to decrease until the end of the experiment. Coumaroylisocitrate and caffeoylisocitrate levels increased continuously over the adjacent fruitlet, with levels close to zero at the day of inoculation until reaching respectively 54.3 and 51.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ of FW at 14 dai.

Sinapic acid and HBA contents decrease after *Fusarium ananatum* inoculation in infected fruitlet

Sinapic acid and HBA were present in the whole fruit at the beginning of the experiment (C2 stage), with levels of 44 and 31 $\mu\text{g g}^{-1}$ of FW, respectively (Figure 25C and Figure 25D). Inoculation of Clp001 induced a significant decrease in the sinapic acid level of the

infected fruitlet. At 14 dai, the level of sinapic acid in the infected fruitlet was four times lower than in healthy and control ones. By contrast, levels in sinapic acid in uninfected fruitlet significantly increased. Regarding HBA, level remained stable in healthy and adjacent fruitlets, but significantly decreased in the infected fruitlet.

Local response to inoculation

As revealed by the evolution of phenolic acids in different parts of the fruit, the fruit defence remained confined to infected fruitlet. Coumaroylisocitrate and caffeoylisocitrate significantly increased in the infected fruitlet, regardless of whether or not sinapic acid and HBA decreased in the same area, but all these compounds remained stable in the healthy and contiguous fruitlets (Figure 25). Concerning hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids, the only part of the fruit that really differed from the others was the infected fruitlet.

Antifungal susceptibility tests

The antifungal activity of identified metabolites in flesh and infected fruitlets of pineapple fruit was evaluated on *Fusarium ananatum* growth (Tableau 6) (Macheix and Fleuriet 1990; Steingass et al. 2015b). We used the commercially available derivatives of coumaroylisocitrate and caffeoylisocitrate; coumaric acid and caffeoylquinic acid respectively. The standards of ferulic, sinapic, gallic and ascorbic acids were also assessed. All the compounds exhibited antifungal activity mainly by fungistatic effect, apart from gallic acid which had no antifungal activity at any level (data not shown). *p*-Coumaric acid was the most active phenolic acid with a complete growth inhibition at 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$. In combination with caffeoylquinic acid, the fungistatic effect was even higher (MGI = 59 % at 500 $\mu\text{g g}^{-1}$). Ferulic acid inhibited 64 % of mycelial growth at a concentration of 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ and exhibited a total inhibition at 2000 $\mu\text{g g}^{-1}$. Ascorbic, sinapic and gallic acids showed no antifungal activity at natural levels found in the pineapple fruit. Growth recovery of the treated fungus was also tested and was 100 % for almost all cases (data not shown in the table). A fungitoxic effect was obtained with *p*-coumaric acid (80 % growth recovery at 1500 $\mu\text{g g}^{-1}$). With *p*-coumaric and caffeoylquinic acids in combination at 2000 $\mu\text{g g}^{-1}$, growth recovery of the fungus was 40 %.

Effect *in vivo* of the phenolic acids

The necrosis areas of *p*-coumaric and caffeoylquinic acids injected with a conidial suspension of *F. ananatum* were significantly smaller compared to the one of conidia only (Tableau 7). However, the necrosis area of gallic acid injected with the conidial suspension of *F. ananatum* showed no significant difference with the one of conidia only.

Discussion

This work is the first to simultaneously show the changes in the symptoms of FCR disease, i.e., the evolution of black spot and the biochemical response of the fruit through the phenylpropanoid pathway. The inoculation of *Fusarium ananatum* followed by visual observation and measurements of black spot growth was a first approach, providing an estimate of the disease dynamics. In term of progression, black spot reached the maximum area 12 dai and did not significantly change thereafter. This result is consistent with observations made on naturally infected fruits: the disease remains confined and never develops in the whole fruit (Rohrbach and Apt 1986). In terms of colour, the flesh at the inoculation point changed in colour after few days and became brown and dry. The browning process is widely described in several species of fruits in response to injuries or a pathogen attack and corresponds to the enzymatic oxidation of phenolic compounds in quinones to form brown compounds (Pourcel et al. 2007; Raimbault et al. 2011; Stewart et al. 2001). These enzymes activities were also investigated in pineapple black spot disease where infected fruitlet exhibited higher polyphenol oxidase and laccase activities than healthy fruitlet (Avallone et al. 2003). To gain a better insight into the host-pathogen interaction, we separately sampled the different parts of the fruit for phenolic acids analysis.

The same phenolic acids were found in healthy, adjacent and infected fruitlets during fruit ripening and disease development: *p*-coumaroyl-isocitric acid, caffeoyl-isocitric acid, sinapic acid and HBA, which are known constituents of pineapple pulp (Steingass et al. 2015b) and juice (Wen and Wrolstad 2002). However, after inoculation *p*-coumaroyl-isocitric and caffeoyl-isocitric acids reached levels 150 and 250 times higher in infected fruitlet than in healthy fruitlet, respectively. It has been shown that phenolic compounds generally accumulate in the tissues near the site of the infection (Chalker-Scott 1999; Petkovšek et al. 2009). Lattanzio et al. (2001) observed that *Phlyctaena vagabunda* that causes rot in apple leads to a general increase in phenolic levels in infected tissue, compared to a healthy tissue of the same fruit. As shown with symptoms that remain

confined, the plant response by the phenylpropanoid pathway is also mainly located in the infected fruitlet.

Our results showed also similar evolution of free coumaroylisocitrate and caffeoylisocitrate content in infected fruitlet with a lag in time. The fact that *p*-coumaroyl-isocitric acid is a precursor of caffeoyl-isocitric acid in the phenylpropanoid pathway can explain the time lag (Vanholme et al. 2010). Whereas the previous phenolics increase in the infected fruitlet, sinapic and hydroxybenzoic acids levels decreased. Avallone et al. (2003) showed a higher activity of polyphenol oxidase in the adjacent fruitlet and infected fruitlets than in the healthy fruitlet. These results partially explain the decrease in sinapic acid and HBA in the infected fruitlet but not the increased levels in adjacent fruitlet during our experiment.

Ascorbic acid content decreased the first 2 dai in the whole fruit. The stress caused by the harvest could explain this decrease (Lee and Kader 2000). Ascorbic acid is a crucial antioxidant for plant defence against oxidative stress (Noctor and Foyer 1998). The ascorbate peroxidase enzymes catalyze the conversion of hydrogen peroxide into H₂O, using ascorbic acid as a substrate (Mittler 2002). Ascorbic acid level returned to the initial value in the uninfected areas. In contrast, its levels continued to decrease in infected fruitlets, reaching zero at the end of the experiment. Stress could be too important to allow ascorbic acid regeneration.

Coumaroylisocitrate, caffeoylisocitrate, sinapate, hydroxybenzoic acids and ascorbic acid were affected in one way or another by the pathogen. Some of them, like coumaric and caffeic derivatives, are known for their antifungal activities. Adequate levels of caffeoylquinic acid exert antifungal activity by disrupting the structure of the cell membrane against *Candida albicans* (Sung Woo and Lee Dong 2010). Maher et al. (1994) showed that the susceptibility of transgenic tobacco plants increases when the activity of PAL is linked to a lower caffeoylquinic acid concentration. Little is known about the implication of *p*-coumaroyl-isocitric acid for antifungal activity but some studies have focused on coumaric acid, which forms *p*-coumaroyl-isocitric acid in the presence of isocitric acid. All the compounds tested in our study exhibited antifungal activity, except gallic acid. Coumaric acid was the most active compound in our study followed by the ferulic acid. Our results are in agreement with those of Zabka and Pavela (2013) who found a 50 % MGI for *p*-coumaric acid on *F. verticillioides* and *F. oxysporum* at 360 µg ml⁻¹

and 567 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. In comparison, *in vivo* concentrations of *p*-coumaroyl-isocitric acid in pineapple fruit reached a maximum of 356 $\mu\text{g g}^{-1}$ in the infected fruitlet. Caffeoylquinic acid also has an inhibitory effect on mycelial growth but to a lesser extent. Furthermore, we showed that *p*-coumaric acid associated with caffeoylquinic acid had a fungitoxic effect *in vitro*. To get a better insight on the involvement of the phenolic compounds in response to infection we inoculated them with the pathogen. And the *p*-coumaric and caffeoylquinic acids restrains the growth of the black spot. We can assume that these compounds with fungistatic and fungitoxic activities in combination in the fruit contribute to disease resistance.

FCR is the major post-harvest disease on 'Queen' cultivar but barely present on other cultivars like 'MD2'. It would be interesting to compare the 'Queen' cultivar with a resistant one to determine if the phenolic acids are present naturally in the resistant cultivar or produced in higher levels in response to *F. ananatum* infection. In that case, finding agricultural practices which enhance the phenolics acid content could be an alternative to keep the emblematic 'Queen' cultivar in Réunion island (Ruiz-García and Gómez-Plaza 2013; Wang and Millner 2009).

Appendix A. Supplementary data (Tableau 8)

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.09.002>.

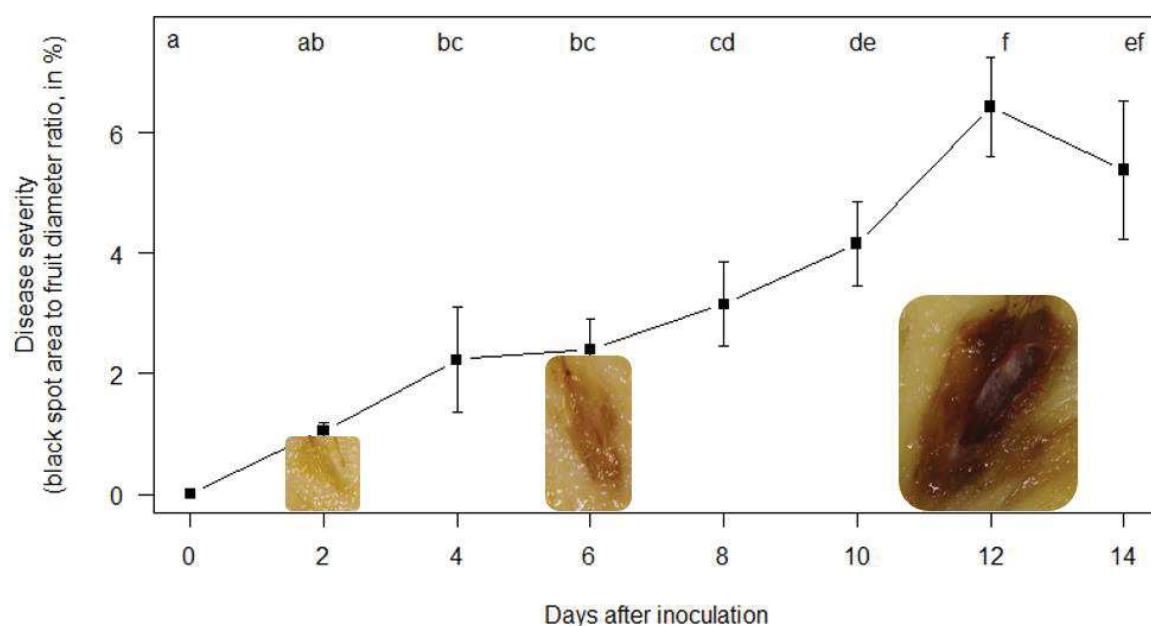


Figure 22 Black spot growth in the infected fruitlet after *Fusarium ananatum* inoculation. Vertical bars represent standard error of means ($n = 9$). Different letters indicate that data are significantly different at $P < 0.05$ between days after inoculation (according to Tukey's multiple comparison test).

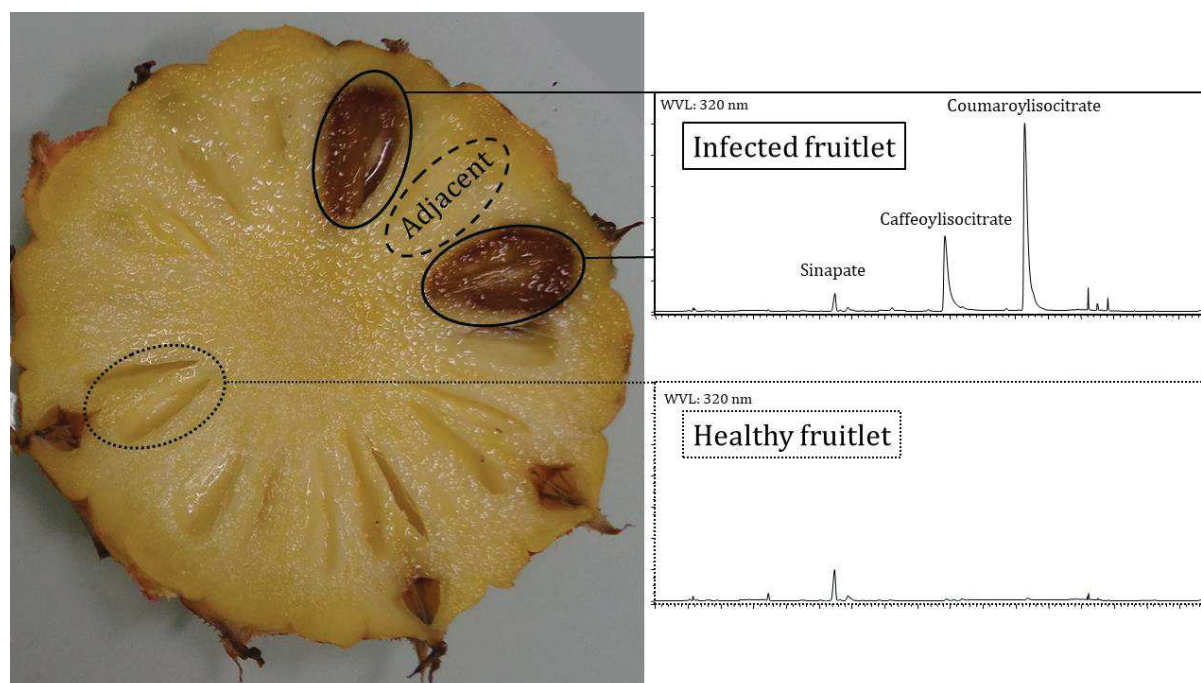


Figure 23 Transversal section of inoculated pineapple (10 dai) with healthy fruitlet (....), adjacent infected fruitlet (---) and infected fruitlets (—) coupled with the HPLC-DAD chromatograms (320 nm) of free phenolic acids in the healthy fruitlet and infected fruitlet.

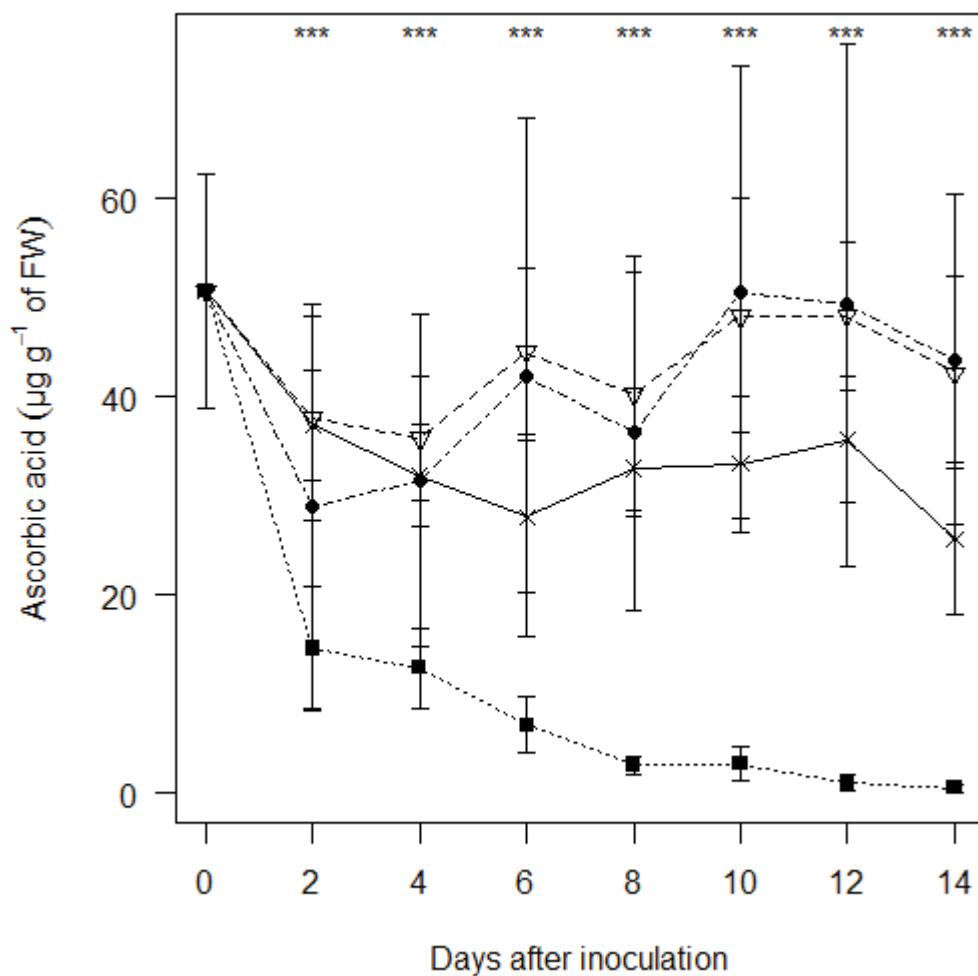


Figure 24 Ascorbic acid evolution after inoculation of *Fusarium ananatum* in pineapple control fruit (●), healthy fruitlet (▽), adjacent infected fruitlet (x) and infected fruitlet (■). Vertical bars represent standard error of means (n = 9). Differences of ascorbic acid level between sampled fruitlets were significant at $P < 0.01$ (***) for each sampling date.

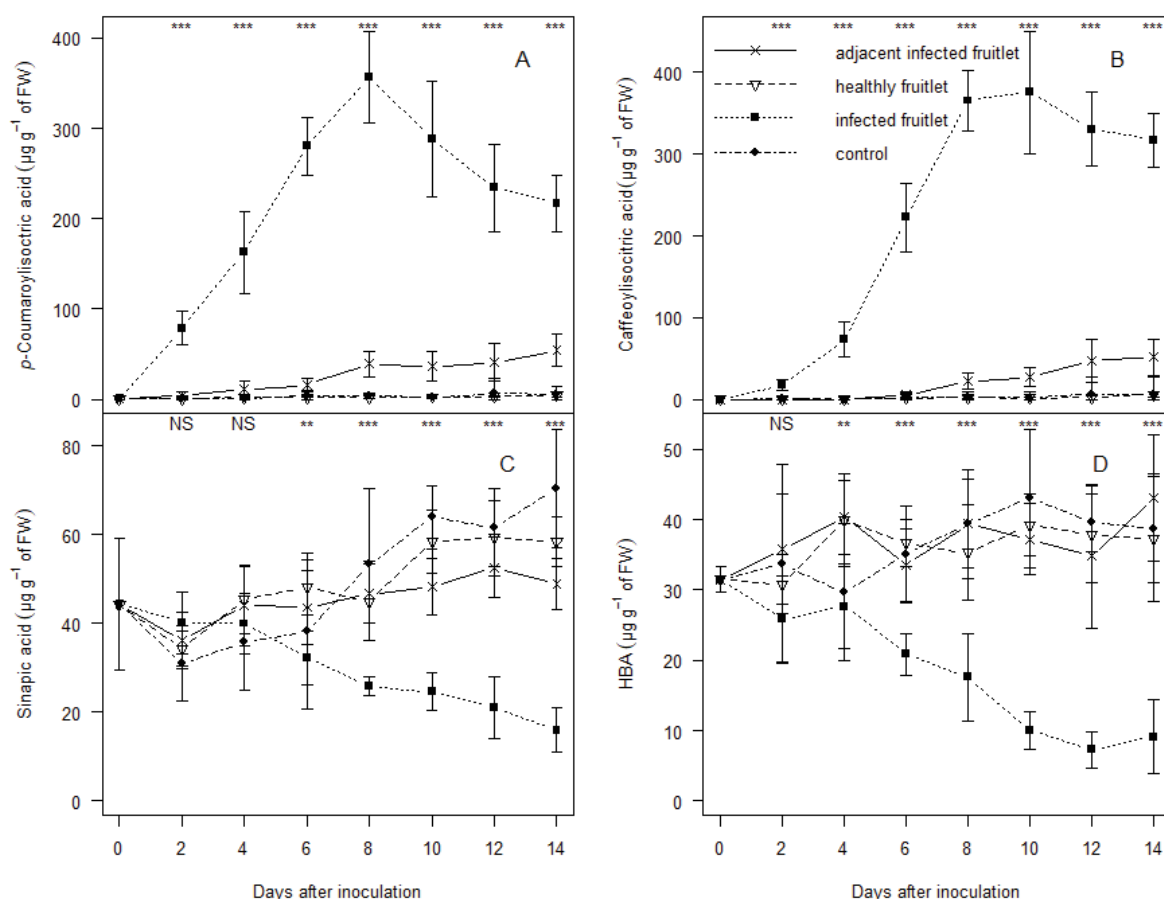


Figure 25 Evolution of *p*-coumaroylquinic acid (A), chlorogenic acid (B), sinapic acid (C) and hydroxybenzoic acids (D) after inoculation with *Fusarium ananatum* in pineapple control fruit (●), healthy fruitlet (▽), adjacent infected fruitlet (x) and infected fruitlet (■). Vertical bars represent standard error of means ($n = 9$ for healthy, adjacent and infected fruitlets; $n = 3$ for control fruit). HBA = sum of hydroxybenzoic acids (expressed in GAE). Differences of phenolic acids level between sampled fruitlets were either significant at $P < 0.05$ (**) or $P < 0.01$ (***), or non-significant (NS) for each sampling date.

Tableau 6 Effect *in vitro* of phenolic acids and ascorbic acid at different concentrations on the mycelial growth of *Fusarium ananatum*.

Compounds, Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Colony diameter (mm)	MGI (%)
<i>p</i> -Coumaric acid		
0	84 \pm 0 a	0
500	42.5 \pm 4.85 b	49.4
1000	0 \pm 0 c	100
1500	0 \pm 0 c	100
2000	0 \pm 0 c	100
Caffeoylquinic acid		
0	84 \pm 0 a	0
500	77.92 \pm 0.47 b	7.24
1000	75.27 \pm 0.33 c	10.39
1500	73.92 \pm 0.23 d	12
2000	70.67 \pm 0.28 e	15.87
<i>p</i> -Coumaric + Caffeoylquinic acids		
0	84 \pm 0 a	0
500	34.5 \pm 2.36 b	58.93
1000	0 \pm 0 c	100
1500	0 \pm 0 c	100
2000	0 \pm 0 c	100
Ferulic acid		
0	84 \pm 0 a	0
500	47.4 \pm 0.4 b	45.95
1000	30.24 \pm 1.55 c	64.05
1500	19.67 \pm 0.85 d	76.67
2000	0 \pm 0 e	100
Sinapic acid		
0	84 \pm 0 a	0
500	77 \pm 1.52 b	8.33
1000	64.26 \pm 1.32 c	23.5
1500	58.5 \pm 1.33 d	30.36
2000	54 \pm 0.94 d	35.71
Ascorbic acid		
0	84 \pm 0 a	0
500	81.6 \pm 0.93 a	2.86
1000	74.6 \pm 0.81 b	11.19
1500	65.4 \pm 1.17 c	22.14
2000	52 \pm 1.64 d	38.1

Values are means \pm standard error (n = 10). Different letters indicate that data for each concentration are significantly different at $P < 0.05$ (according to Tukey's multiple comparison test)

Tableau 7 Effect *in vivo* of coumaric, chlorogenic and gallic acids on the black spot disease severity.

Treatment	Compounds (1000 $\mu\text{g g}^{-1}$)	Necrosis area (mm^2)
H ₂ O	-	5.7 \pm 3.4 c
<i>F. ananatum</i>	<i>p</i> -Coumaric acid	56.1 \pm 7.6 b
<i>F. ananatum</i>	Caffeoylquinic acid	68.1 \pm 9.1 b
<i>F. ananatum</i>	Gallic acid	113.4 \pm 8.1 a
<i>F. ananatum</i>	-	111.4 \pm 12.4 a

Values are means \pm standard error (n = 16). Different letters indicate that data for each treatment are significantly different at $P < 0.05$ (according to Tukey's multiple comparison test).

Tableau 8 Supplementary data Mean concentrations of the free phenolic acids in different part of the pineapple fruit at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 days after inoculation of *Fusarium ananatum*.

Compound, Sampling date (dai)	Concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ Fresh Weight)			
	Control	Healthy fruitlet	Adjacent fruitlet	Infected fruitlet
Coumaroylisocitric acid				
0	0.4 ± 0.4 b	0.4 ± 0.4 b	0.4 ± 0.4 d	0.4 ± 0.4 d
2	0.7 ± 0.7 ab	1 ± 0.3 b	4.3 ± 1.5 d	78.8 ± 8.1 cd
4	0.8 ± 0.4 ab	2.3 ± 0.5 b	10.6 ± 3.9 cd	163 ± 19.6 bcd
6	3.9 ± 1.4 ab	2.4 ± 0.3 b	15.7 ± 3.2 bcd	280.2 ± 13.9 ab
8	3.6 ± 0.7 ab	2.4 ± 0.4 b	39.1 ± 6.3 ab	356.3 ± 22.1 a
10	2.4 ± 0.2 ab	2.6 ± 0.3 ab	36.7 ± 7.1 abc	288.5 ± 27.9 ab
12	2.1 ± 0.5 ab	2.8 ± 0.5 ab	40.3 ± 8.8 ab	233.9 ± 20.9 ab
14	5.6 ± 2.1 a	4.7 ± 0.9 a	54.3 ± 8 a	216.7 ± 13.6 abc
Caffeoylisocitric acid				
0	0 ± 0 a	0 ± 0 b	0 ± 0 d	0 ± 0 c
2	0.6 ± 0.6 a	0 ± 0 b	0 ± 0 d	17.3 ± 2.7 c
4	0 ± 0 a	1 ± 0.7 b	0 ± 0 d	73.7 ± 9.3 c
6	2.1 ± 1.1 a	1.7 ± 0.7 b	5.1 ± 1.6 cd	222.3 ± 18.3 b
8	3.1 ± 1.6 a	1.9 ± 0.7 b	22.2 ± 4.2 bcd	365.4 ± 16.2 a
10	1.7 ± 1.7 a	1.5 ± 0.7 b	27.2 ± 5.2 abc	375.5 ± 32.4 a
12	1.4 ± 1.4 a	2.1 ± 0.9 b	47.1 ± 11.2 ab	330.6 ± 19.8 ab
14	6.3 ± 4.9 a	6.1 ± 1.4 a	51.6 ± 9.6 a	317.2 ± 14.3 ab
Sinapic acid				
0	44.4 ± 3.4 bcd	44.4 ± 3.4 bc	44.4 ± 3.4 ab	44.4 ± 3.4 a
2	30.9 ± 2 d	34.4 ± 1.7 c	36.1 ± 2.7 b	40.2 ± 3 a
4	35.9 ± 2.5 d	45.3 ± 3.4 bc	44 ± 3.9 ab	40 ± 2.9 a
6	38.1 ± 4.1 cd	48.1 ± 2.7 abc	43.6 ± 3.6 ab	32.2 ± 2.6 ab
8	53.3 ± 4 abcd	45 ± 3.8 bc	46.6 ± 2.9 ab	25.9 ± 1 bc
10	64 ± 1.7 ab	58.4 ± 3.1 ab	48.2 ± 2.7 ab	24.6 ± 1.9 bc
12	63.6 ± 1 abc	59.3 ± 3.7 a	52.7 ± 2.9 a	20.9 ± 3 c
14	70.4 ± 3.1 a	58.5 ± 2.4 ab	48.8 ± 2.5 ab	16 ± 2.1 c
HBA				
0	31.5 ± 0.4 b	31.5 ± 0.4 a	31.5 ± 0.4 a	31.5 ± 0.4 a
2	33.7 ± 3.3 b	30.8 ± 1.8 a	35.7 ± 3.4 a	25.8 ± 2.7 ab
4	29.7 ± 2.3 ab	39.9 ± 2.9 a	40.3 ± 2.3 a	27.7 ± 2.6 a
6	35.1 ± 1.6 ab	36.6 ± 1.4 a	33.5 ± 2.2 a	20.8 ± 1.3 ab
8	39.4 ± 1.5 ab	35.3 ± 2.9 a	39.4 ± 3.4 a	17.6 ± 2.7 b
10	43 ± 2.3 a	39.2 ± 1.9 a	37.2 ± 2.2 a	10 ± 1.2 cd
12	40.3 ± 1 ab	37.8 ± 3 a	34.8 ± 4.3 a	7.3 ± 1.1 d
14	38.8 ± 1.8 ab	37.3 ± 3.9 a	43 ± 3.9 a	9.1 ± 2.3 cd

HBA = sum of hydroxybenzoic acids (expressed in GAE). Values are means \pm standard error (n = 9 for healthy, adjacent and infected fruitlets; n = 3 control fruit). According to Tukey's multiple comparison between sampling dates, means in the same column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Metabolomics analysis suggests the role of maturity in the acquisition of resistance to pineapple fruitlet core rot

Une analyse métabolomique comparative révèle le rôle de la maturité dans l'acquisition de la résistance à la maladie de la tache noire de l'ananas

B. Barral^a, M. Chillet^a, M. Léchaudel^b, R. Lugan^c and S. Schorr-Galindo^d

^a(1) CIRAD, UMR Qualisud, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France ; (2) Qualisud, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier, France.

^b(1) UMR Qualisud, CIRAD, Station de Neufchâteau, 97130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe, France ; (2) Qualisud, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier, France.

^c(1) UMR Qualisud, Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, Agrosiences, 84000 Avignon, France ; (2) Qualisud, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier, France.

^dUMR Qualisud, Université de Montpellier, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France ;

Résumé

La maladie de la tache noire (FCR) est due à *Fusarium ananatum*, et provoque des taches noires sur fruits matures les rendant impropres à la consommation. Afin de comprendre la résistance à FCR, nous avons effectué une analyse du métabolome des cultivars d'ananas résistants et sensibles avant et après infection par *F. ananatum* à deux stades de maturité. Trente métabolites à l'identité présumée, extraits de pulpes d'ananas, ont pu être analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). L'analyse multivariée des données a mis en évidence des différences qualitatives caractéristiques des échantillons de la variété 'MD-2' à maturité. Le suivi des métabolites au cours de l'infection montre des différences quantitatives entre le cultivar résistant et sensible, notamment pour les dérivés du glutathion, les composés de la voie des phénylpropanoïdes et la diferuloylspermidine. Ces mêmes métabolites sont également plus concentrés dans les fruits matures du cultivar résistant 'MD-2'.

Mots clefs : *Ananas comosus* / *Fusarium ananatum* / fruit ripening / Metabolomics / Postharvest disease

Introduction

La tache noire est une maladie (fruitlet core rot, FCR) causée par les champignons filamenteux *Fusarium ananatum* et *Talaromyces stollii*. Les pathogènes se développent dans le parenchyme de fruit mature provoquant un brunissement de la chair, rendant les ananas impropres à la consommation. Dans les régions où est cultivé la variété sensible ‘Queen’ cette maladie est problématique puisqu’en période favorable 74% des fruits présentent au moins une tache (Barral et al. 2017b). Des croisements réalisés entre différents cultivars dans le cadre d’un programme de sélection mené dans les années 1970 par le Pineapple Research Institute d’Hawaii ont abouti à l’obtention du cultivar ‘MD-2’ résistant à la maladie de la tache noire (Bartholomew et al. 2012).

Le FCR a une étiologie complexe impliquant l’ananas et ses stades de croissance, des espèces de différents genres de champignons et les interactions environnementales. Les champignons pénètrent les cavités florales lors de la floraison puis restent quiescents jusqu’à ce que le fruit soit mature (Rohrbach et al. 2003). Les symptômes apparaissent sur fruit mature pour le cultivar ‘Queen’ contrairement à ‘MD-2’ qui reste asymptomatique bien que les pathogènes soient présents dans les cavités florales (Barral et al. 2017). Les mécanismes de résistance induite mis en place par le cultivar résistant étant encore inconnus, leur étude implique une comparaison des voies biochimiques de résistance entre la variété sensible et la variété résistante.

Ces dernières années, plusieurs études ont montré le pouvoir de la métabolomique dans l’analyse des interactions hôte-pathogène (Leiss et al. 2009; Sade et al. 2015; Sana et al. 2010). Cette approche a fourni des informations sur les changements métaboliques dans les plantes suite à des attaques de pathogènes et a permis d’identifier des métabolites clefs de la résistance comme les acides hydroxycinnamiques connus comme précurseurs de la lignine et possédant de nombreuses propriétés antifongiques (Atanasova-Penichon et al. 2014; Miedes et al. 2014; Ponts et al. 2011; Vanholme et al. 2010).

Dans cette étude, le métabolome d’ananas a été exploré par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (LC-TOF-MS) de façon non ciblée pour

fournir un large screening de métabolites. Les changements de ces composés au cours de la maturation et suite à l'inoculation par *F. ananatum* ont été mesurés.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le cultivar d'ananas 'MD-2' résistant à FCR et le cultivar 'Queen' qui y est sensible ont été cultivés sur une parcelle expérimentale de la station de recherche du CIRAD de l'île de la Réunion (21 ° 10 'Sud, 55 ° 30' Est). Les deux cultivars ayant des durées de cycle différentes, le logiciel Simpiña a été utilisé pour que les fruits des deux cultivars arrivent à 85% de la date théorique de mi-récolte en même temps (Dorey et al. 2016).

Traitements

Les inoculations ont été réalisées sur plantes à deux stades de maturité : le stade 'vert' pour lequel les fruits ont atteint 85% de leur maturité, et au stade 'mature' qui correspond à la date théorique de mi-récolte. La souche *Fusarium ananatum* Clp001 issue de notre collection a été inoculée dans les cultivars selon la méthode décrite par Barral et al. (2017a). Cette souche isolée à la Réunion a été caractérisée lors d'études précédentes comme des plus virulentes pour le développement de FCR. Vingt-cinq microlitres d'une suspension à 10^3 spores mL⁻¹ ont été injectés dans le parenchyme de 4 fruits simples par cultivar et stade de récolte à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille de 0.25 mm de diamètre.

Récolte et échantillonnage

Pour la maturité verte, les fruits témoins, sains et infectés ont été récoltés à 0 (avant traitement), 4, 8 et 12 jours après inoculation (dpi). Au stade mature, les fruits témoins, sains et infectés ont été récoltés à 0, 3, 6 et 9 dpi. Chaque échantillon consistait en quatre fruits simples plongés dans l'azote liquide, mélangés au Grindomix (Retsch, Haan, Allemagne), la poudre lyophilisée pendant 72 heures à -52 ° C puis stockée à -80 ° C en attente d'analyse ultérieure.

Mesure de couleur, pH et Acidité titrable

Une mesure de couleur (L*a*b*) a été réalisée sur la chair d'un ananas coupé en deux en son milieu, à l'aide d'un chromamètre (Chromameter C-400, Konica Minolta Sensing inc.

Japan). Les données chromamétriques sont ensuite transformées en angle de teinte (h°) et chroma (C), à l'aide des formules (Mcguire, 1992):

$$\theta = \frac{\arctan(\frac{b^*}{a^*})}{2\pi} * 360$$

avec si $a > 0$ et $b > 0$, $h^\circ = \theta$

si $a < 0$ et $b > 0$, $h^\circ = 180 + \theta$

$$C = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Une partie de la pulpe a été broyée pour obtenir du jus servant à la détermination de la teneur en extrait sec soluble (ESS), du pH, et de l'acidité titrable totale (ATT).

L'acidité titrable totale (ATT) et le pH ont été mesurés en utilisant un titrateur automatique (TitroLine easy, Schott, Mayence, Allemagne) avec une solution titre de NaOH à 0,05N. L'extrait sec soluble a été déterminé à l'aide d'un réfractomètre à main Atago (Atago ATC-1E, Tokyo, Japon).

Analyse UPLC-Q-TOF-MS

Les extraits ont été analysés par chromatographie liquide ultra-performante couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (UPLC-Q-TOF-MS). Toutes les analyses ont été réalisées en utilisant un SynaptG2-Si (Waters, Mildorf, MA) équipé d'une source d'ionisation par électronébulisation (ESI) et couplé à un système UPLC Acquity de classe-I (Waters).

La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'une colonne Acquity C18 BEH (150 x 2,1 mm, particules de 1,7 μ m, Waters) munie d'une pré-colonne. La phase mobile consistait en de l'eau (A) et de l'acétonitrile (B), tous deux contenant 0,1% d'acide formique. Le programme a commencé avec 99% de A, puis un gradient linéaire a été appliqué pour atteindre 95% de B à 11 min, suivi d'une période isocratique en utilisant 95% de B pendant 2,5 min. Le retour aux conditions initiales a été réalisé en 2,5 minutes, suivi d'une équilibration de 1 minute, avec un temps total d'exécution de 16 minutes. Les échantillons ont été maintenus à 10 ° C et la colonne à 33 ° C avec un débit de 0,3 ml min⁻¹, en injectant 1 μ l d'échantillon.

L'azote a été utilisé comme gaz de séchage et de nébulisation. Le débit du gaz du nébuliseur a été réglé à 6 bars, le débit du gaz de cône a été porté à 50 L hr⁻¹ et le débit du gaz de désolvatation à 800 L hr⁻¹ (600 en mode négatif). La température de désolvatation était de 500 ° C et la température de la source de 120 ° C. La tension capillaire a été fixée à 0,8 kV (2 kV en mode négatif), tandis que la tension du cône était de 40 V. Les données ont été acquises en mode balayage complet de 100 à 1000 Da, à une résolution de 35000 (FWHM) en utilisant de la leucine enképhaline pour la correction des masses. L'acquisition et l'analyse des données ont été réalisées avec le logiciel MassLynx et Progenesis QI (Waters, Mildorf, MA, USA).

Analyse de données

Le traitement des données et les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team 2015). Les différences entre échantillons ont été validées par le test de Wilcoxon-Mann-Whitney. Le logiciel Metaboanalyst a servi à la réalisation de la heatmap (Xia and Wishart 2016).

Résultats

Les évolutions des métabolites au cours de la maturation et suite à une infection par *F. ananatum* ont été mesurées dans les cultivars 'MD-2' et 'Queen'. Une tentative d'identification des métabolites impliqués a été réalisée en LC-MS haute résolution, à partir de leur masse exacte et des patterns de fragmentation *in source*. Le Tableau 9 donne les caractéristiques de spectrométrie de masse des pics chromatographiques, ainsi que leur structure proposée et leur masse mono-isotopique. Trente métabolites ont été présumés identifiés à partir des extraits de pulpes et répartis en plusieurs groupes selon leurs relations structurelles et leurs schémas de fragmentation.

Tableau 9 Caractérisation par LC-TOF-MS des métabolites isolés de fruits d'ananas (*Ananas comosus* [L.] Merr.)

No	Rt	[M-H] ⁻	Fragmentations (m/z)	[M+H] ⁺	Fragmentations (m/z)	Proposed structure
1	1.17	209 (19)	195 (100), 191 (9) [M+H-H ₂ O] ⁻			Dehydrated diketogulonate
2	1.21	135 (100)				Threonic acid
3	1.26	341	683 (25) [2M-H] ⁻ , 387 (38) [M-H+HCOOH] ⁻			Sucrose
4	2.42	491 (4)	537 (100) [M-H+HCOOH] ⁻ , 329 (5) [M-H-hexosyl] ⁻			Vanilloyl dihexoside
5	2.52	521 (3)	567 (100) [M-H+HCOOH] ⁻ , 359 (17) [M-H-hexosyl] ⁻			Syringoyl dihexoside
6	2.72	164 (100)		166 (8)		L-Phenylalanine
7	2,91	289 (100)	579 [2M-H] ⁻ , 161 (41) [Hexosyl-H] ⁻ , 127 (5) [M-H-hexosil] ⁻ , 127 (5) [4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H) furanone-H] ⁻			4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H) furanone hexoside
8	2,93	329 (100)	375 (19) [M-H+HCOOH] ⁻ , 161 [M-H-vanillic acid] ⁻			Vanilloyl hexoside
9	3,08	329 (100)	327 (25)			Tricin
10	3,13	341 (100)	161 (13) [M-H-caffeic acid] ⁻			Caffeoyl hexoside
11	3,15	359 (100)	197 (1) [M-H-hexosyl] ⁻			Syringoyl hexoside
12	3,24	203 (100)	195 (23)			Tryptophan
13	3,29	355 (100)	209 (16) [M-H-coumaroyl] ⁻ , 209 (16) [aldaric acid-H] ⁻			p-Coumaroyl aldarate
14	3,34	660		662.2231		S-Sinapyl glutathione derivative
15	3,56	331 (100)	169 (2) [gallic acid -H] ⁻ , 169 (2) [M-H-hexosil] ⁻			Galloyl hexoside
16	3,69	385 (100)	223 (6) [M-H-hexosil] ⁻ , 205 (8) [Sinapoyl-H] ⁻			Sinapoyl hexoside
17	3,71	355 (100)	193 (4) [M-H-hexosyl] ⁻ , 175 (9) [feruloyl-H] ⁻		177 (55) [Feruloyl] ⁺	feruloyl hexoside
18	3,80	353 (49)	173 (100) [isocitrate-H- H ₂ O] ⁻ , 191 (25) [M-H-caffeoyl] ⁻			Caffeoylisocitrate
19	3,95	438 (100)	306 (19) [M-H-coumaryl] ⁻ , 306 (19) [glutathione-H] ⁻			S-p-coumarylglutathione
20	4,01	498 (100)	498 (100) [M-H] ⁻ , 306 (5) [M-H-sinapyl] ⁻ , 306 (5) [glutathione-H] ⁻	500 (100)	193 (5) [M+H-glutathione] ⁺	S-Sinapylglutathione
21	4,14	441 (100)		443 (100)	251 (33) [Glu-Cys+H] ⁺ , 193 (8) [M+H-Glu-Cys] ⁺	N-L-γ-Glutamyl-S-sinapyl-L-cysteine
22	4,18	411		413	251 (28) [Glu-Cys+H] ⁺ , 193 (11) [M+H-Glu-Cys] ⁺	N-L-γ-Glutamyl-S-coniferyl-L-cysteine
23	4,25	337 (52)	173 (100) [isocitrate-H- H ₂ O] ⁻ , 111 (16)		361 (59) [M+H+Na] ⁺	p-Coumaroylisocitrate
24	4,39			498 (100)	177 (15), 145 (17)	[N1,N10-Diferuloylspermidine]
25	4,43	367 (73)	173 (100) [isocitrate-H- H ₂ O] ⁻ , 111 (11)			2-feruloylisocitrate
26	4,63	579 (100)	417 (33) [M-H-hexosyl] ⁻		603 (100) [M+H+Na] ⁺	Syringaresinol hexoside
27	5,46	415 (100)	514 (5) [M+Fe-4H+HCOOH] ⁻			Dicaffeoylglycerol
28	5,91	399 (100)	235 (15) [M-H- coumarate] ⁻			p-Coumaroyl-caffeoylglycerol
29	6,01	429 (100)	235 (5)			Feruloyl-caffeoylglycerol
30	6,47	413 (100)	235 (9)			p-Coumaroyl-feruloylglycerol

Hydroxycinnamic acid depsides. Les composés **13**, **18**, **23** et **25** ont été identifiés comme des composés phénoliques constitués de deux cycles aromatiques. Le composé **13** ($m/z = 355$) a été identifié comme le *p*-coumaroyl aldarate en se basant sur sa fragmentation présentant une perte de groupement coumaroyl et de l'ion déprotoné (m/z 209) correspondant à l'aldarate. Les composés **18**, **23** et **25** ont un profil de fragmentation similaire, indiquant leur similarité structurale. L'ion fragmentaire majoritaire (m/z 173) peut résulter de l'élimination d'acides hydroxycinnamiques avec des pertes massiques de 180 Da (acide caféique), 164 Da (acide *p*-coumarique) et 194 Da (acide férulique). L'ion majoritaire déprotoné (m/z 173) correspond à l'ion isocitrique déshydraté [M-H-H₂O]. L'acide isocitrique produit des ions fragmentaires à (m/z 173, 155 et 111) caractéristiques qui permettent de le différencier de l'acide quinique qui a des ions fragmentaires de masses très proches (Masike et al. 2017). Le composé **18** possède également un ion fragmentaire (m/z 191) pouvant correspondre à l'unité caffeoyl. Le caffeoylisocitrate, le *p*-coumaroylisocitrate et le feruloylisocitrate ont été attribués respectivement aux composés **18**, **23** et **25**.

Hydroxybenzoyl glycosides. Le composé **8** (m/z 329) a été attribué à un vanilloyl hexoside à partir de l'ion (m/z 375) qui correspond à l'ion pseudo-moléculaire avec un adduit d'acide formique et l'ion fragmentaire (m/z 161) à la perte de l'acide vanillique. Le composé **4** a été identifié comme le vanilloyl dihexoside, l'ion pseudo-moléculaire (m/z 491) se fragmente en vanilloyl hexoside par la perte d'un hexosyl. Les composés **11** et **5** ont été identifiés comme le syringoyl hexoside et le syringoyl dihexoside en se basant sur le même schéma de fragmentation (Van Acker et al. 2017). L'ion pseudo-moléculaire (m/z 331) a été attribué au galloyl hexoside (**15**) de par sa fragmentation en ion (m/z 169, acide gallique) et par la perte d'un hexosyl.

Hydroxycinnamoyl glycosides. Les composés **10**, **16**, **17** ont été identifiés comme des acides hydroxycinnamiques estérifiés à des hexoses en se basant sur leur fragmentation présentant une perte de groupement hexosyl. Les ions fragmentaires (m/z 179) acide caféique, (m/z 205) sinapoyl et (m/z 172) feruloyl ont permis d'identifier le composé **10** comme le caffeoyl hexoside, le **16** comme le sinapoyl hexoside et le **17** comme le feruloyl hexoside.

Lignan glycoside. Le composé **26** a été identifié comme le syringaresinol hexoside par comparaison des spectres de masse ES⁺ et ES⁻ avec l'appui des travaux de Eklund et al.

(2008). En mode positif, l'ion protoné (m/z 498) correspond à l'ion pseudo moléculaire avec un adduit de sodium. En mode négatif, la perte d'un groupement hexosyl a été mise en évidence.

Dérivés du glutathion, *N*-L- γ -glutamyl-L-cysteine et L-cysteine. Les composés **14**, **19** et **20** sont des dérivés du glutathion (307 Da) qui a pu être détecté en mode d'ionisation ES+ et ES- (Dieckhaus et al. 2005; Steingass et al. 2015b). Deux dérivés de la *N*-l- γ -glutamyl-l-cysteine (γ -EC) ont été détectés ; le *N*-l- γ -glutamyl-*S*-sinapyl-l-cysteine (**21**) et le *N*-l- γ -glutamyl-*S*-coniferyl-l-cysteine (**22**). Ces deux composés ont déjà été mentionnés comme constituant de l'ananas (Wen and Wrolstad 2002; Zheng et al. 2010).

Hydroxycinnamoyl (di)glycerides. Les travaux de Ma et al. (2007) sur ananas ont permis l'identification des composés **19**, et **27-30** en tant que des hydroxycinnamoyl glycerols (Tableau 9).

Hydroxycinnamoylspermidine. L'ion pseudo-moléculaire protoné (m/z 498) a pu être identifié comme le *N,N'*-diferuloylspermidine (**24**) avec des ions fragmentaires (m/z 177 et 147) et comme référence les travaux de Youhnovski et al. (1998).

Autres composés. Les dérivés de l'ascorbate, le diketogulonate déhydraté (**1**) et l'acide threonic (**2**) ont été identifié à partir des travaux de Cioffi et al. (2000) et Szultka et al. (2014). Le composé **6** est identifié comme la L-phénylalanine par comparaison des spectres ESI+ et ESI-. Le 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone-hexoside (**7**) a pu être identifié à partir des travaux de caractérisation des métabolites trouvés dans le jus d'ananas (Wen and Wrolstad 2002). Le composé (**3**) est identifié comme un dihexoside, probablement le saccharose, avec un ion déprotoné pseudo-moléculaire (m/z 341) et la référence de Ogawa et al. (2017).

Le profilage des métabolites obtenu par LC-MS a permis de quantifier les changements métaboliques induit par l'inoculation du pathogène et par la maturation chez 'MD-2' et 'Queen'. Les comparaisons des spectres ne révèlent pas de différences qualitatives entre le cultivar 'MD-2' et le cultivar 'Queen'. En revanche, les intensités du signal étaient beaucoup plus élevées pour les métabolites du cultivar résistant. Une analyse en

composante principale (ACP) a été réalisée sur l'ensemble des données pour les combinaisons des facteurs 'Maturité' x 'Infection' x 'Cultivar' (Figure 26).

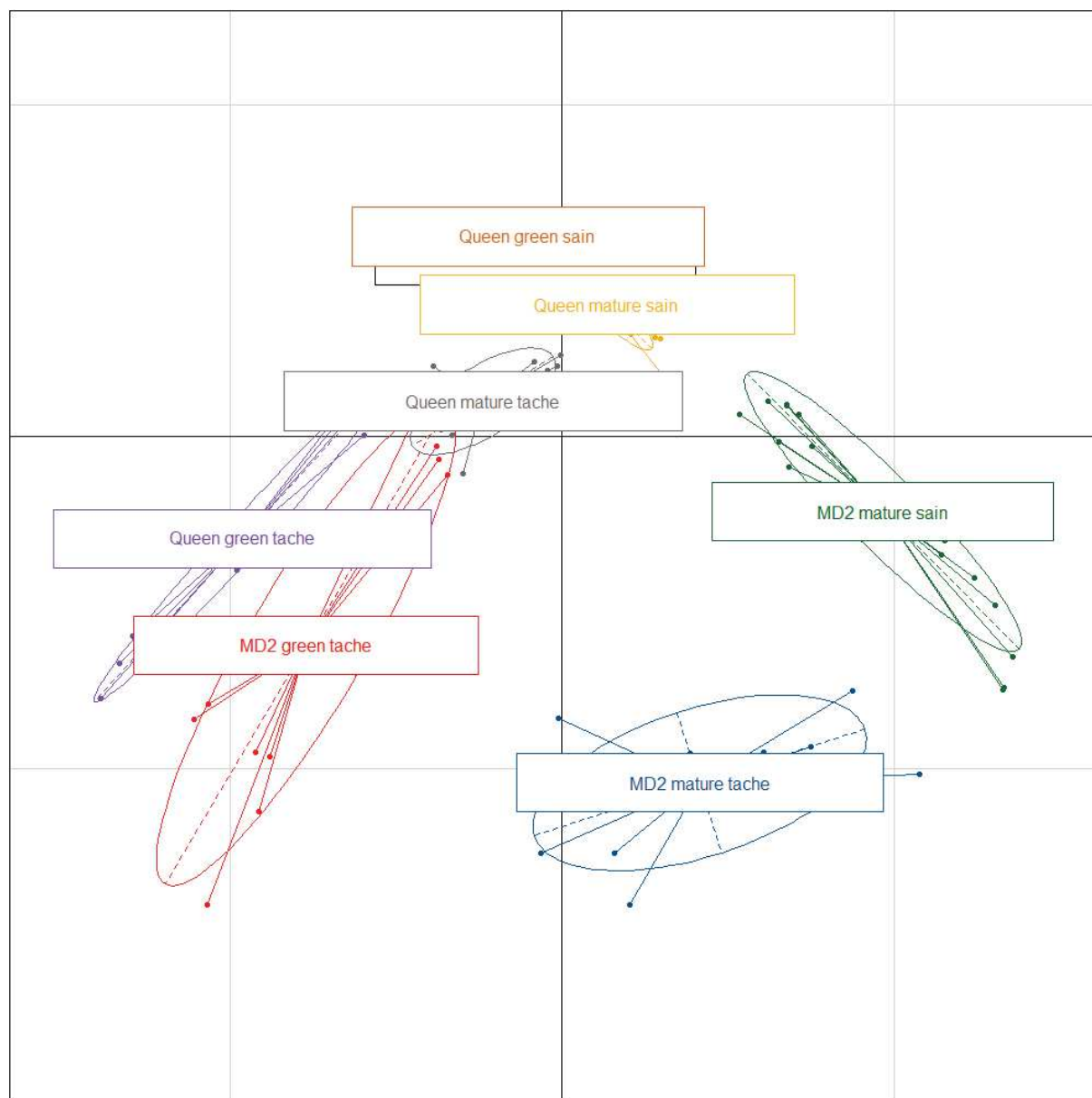


Figure 26 ACP des données métabolomiques réalisée sur les combinaisons de facteurs Cultivar x Maturité x Infection. Les axes 1 et 2 expliquent 31 et 28% de la variabilité respectivement. Les modalités Témoin et Sain de la variable Infection ont été fusionnées ensemble car elles se superposaient sur l'ACP globale.

L'ACP permet de distinguer plusieurs clusters et cela en gardant les différents dpi dans l'analyse. Les profils métaboliques de la variété MD-2 à maturité se distinguent nettement des autres selon l'axe 1, qui semble plutôt associé à la maturité, tandis que l'axe 2 semble surtout séparer les profils d'infection des profils sains. Deux clusters se trouvent isolés des autres : les 'MD-2_mature_tache' et 'MD-2_mature_sain'. Cette première observation

est mise en relief dans la Figure 27 qui montre les ratios logarithmiques des 30 composés discriminant les échantillons.

Des différences variétales dans l'accumulation des composés dans les fruits matures sont observées que ce soit en condition saine ou infectée ; elles impliquent plusieurs métabolites marqueurs de stress biotiques, comme les dérivés du glutathion, jusqu'à 150 fois plus abondants dans le cultivar résistant que dans le sensible sur fruit sain mature (Figure 27A). Les profils métaboliques de réponses à l'infection sont en revanche qualitativement similaires pour les deux cultivars (Figure 27B et C) mais avec des niveaux d'accumulation beaucoup plus élevés pour le cultivar 'MD-2' (Figure 27D).

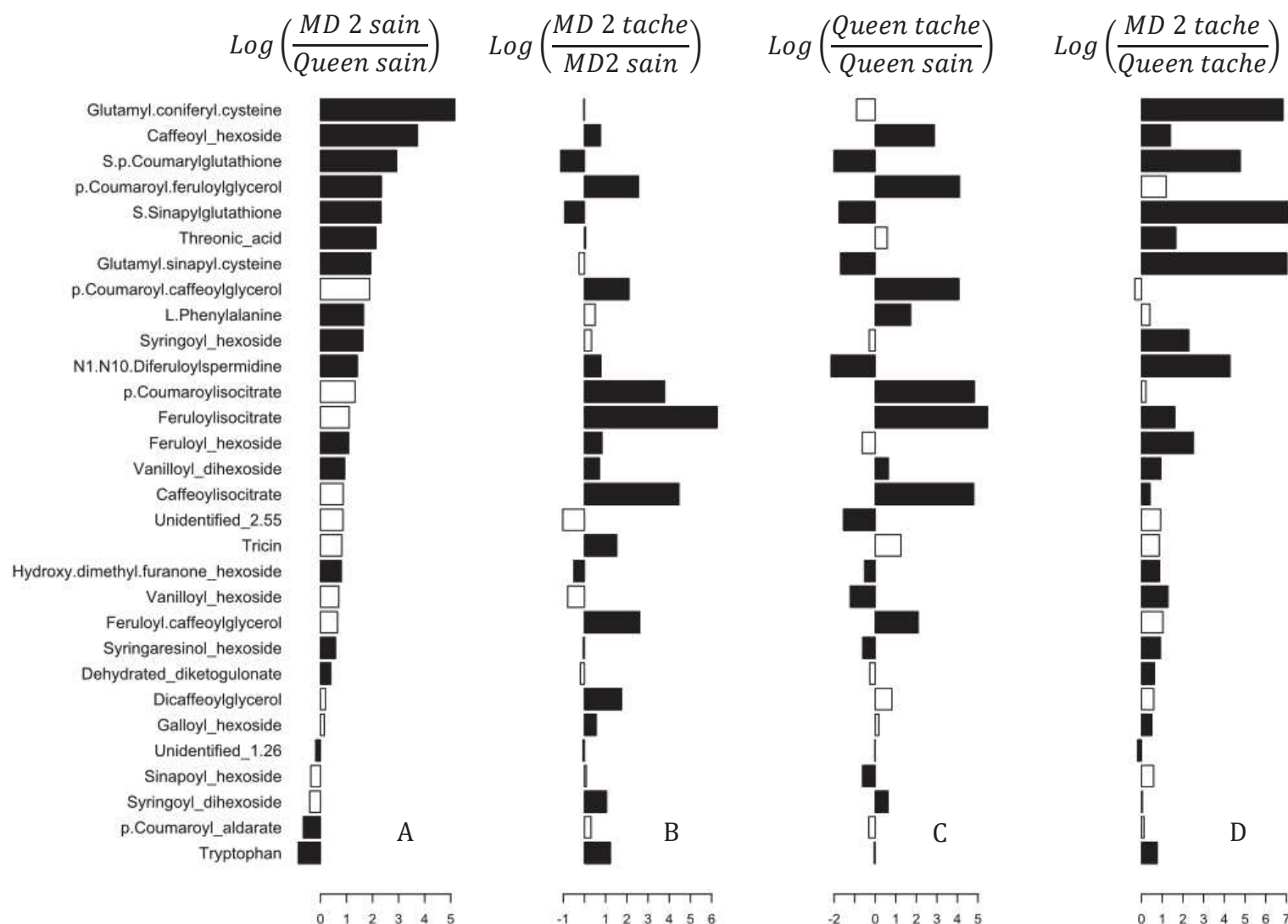


Figure 27 Ratios logarithmiques des concentrations moyennes des métabolites dans les fruits matures. Les barres positives indiquent les métabolites qui sont plus abondant dans le numérateur. Les barres noires indiquent des différences significatives avec $P < 0.001$ (Fruits sains $n=10$; fruits tachés $n=8$)

La Figure 28 permet d'identifier plusieurs clusters de métabolites à partir de leur concentration relative. Plusieurs clusters regroupent les métabolites d'une même famille de composés comme décrit à partir du Tableau 9. Les acides hydroxycinnamiques glycérides se retrouvent dans un même cluster et les feruloyl, coumaroyl et caffeoyl isocitrates forment un autre cluster. Pour modéliser l'évolution des métabolites au cours de la maturation les métabolites identifiés ont été regroupés par famille (Figure 29).

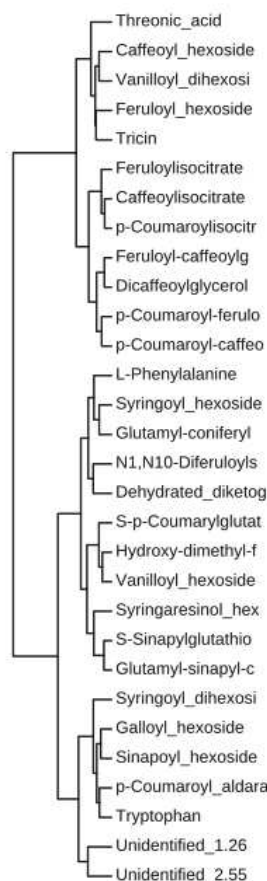


Figure 28 Classification hiérarchique des 30 métabolites identifiés par LC-MS en fonction de leurs concentrations, selon la méthode de Ward sur les données normalisées (log).

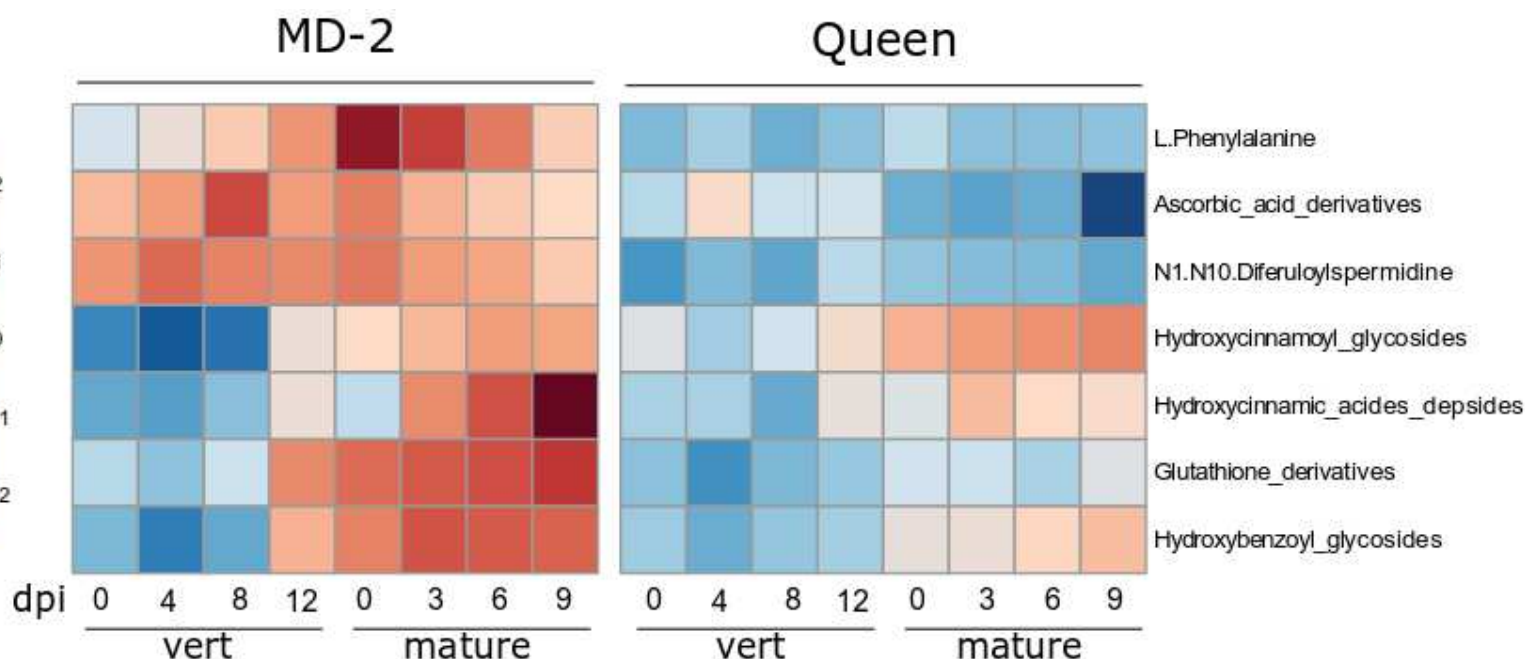


Figure 29 Evolution des concentrations en phénylalanine, diferuloylspermidine et certaines familles de métabolites au cours de la maturation dans les fruits sains du cultivar résistant 'MD-2' en comparaison avec le cultivar sensible 'Queen'. Chaque famille est représentée par la moyenne des aires normalisées. Chaque cellule représente la concentration moyenne relative d'une famille de métabolite pour une date d'échantillonnage par rapport aux autres dates d'échantillonnages (n=5 ; transformation logarithmique des données).

Le suivi métabolique a pu être effectué dans la continuité des deux maturités car le stade physiologique du stade vert atteint après 12 jours d'observation précède juste celui du stade mature à 0 jours (Figure 33). Le profil métabolique des deux cultivars est similaire au jour 0 du stade vert mais au cours de la maturation le cultivar résistant accumule beaucoup plus ces différentes familles de métabolite, à l'exception des dérivés d'acide ascorbique et de la diferuloylspermidine qui sont déjà présents au stade vert dans le cultivar résistant. Il en résulte qu'à maturité le cultivar 'MD-2' possède un arsenal métabolique plus élevé que 'Queen'.

Le Tableau 10 présente l'évolution des données physicochimiques entre les stades de maturité vert et mature pour les deux cultivars. On note deux points essentiels de différences entre les 2 cultivars. 'Queen' possédait un taux de sucres solubles (TSS) plus important que 'MD-2' et ce quel que soit le stade de maturité. De plus, durant la période entre le stade vert et le stade mature, l'acidité a diminué de moitié dans les fruits du cultivar 'sensible' alors qu'elle évolue peu pour le cultivar résistant.

Tableau 10 Poids des fruits, acidité totale titrable (TTA) et extrait sec soluble (TSS) dans la pulpe des cultivars 'MD-2' et 'Queen', selon le stade de maturité. Les valeurs sont des moyennes \pm se (n = 12).

	Maturité	Cultivar	
		MD-2	Queen
Weight (g)	vert	895.32 \pm 36.22	748.62 \pm 18.43
	mature	1078 \pm 33.2	1210.33 \pm 70.64
Length (mm)	vert	104.47 \pm 2.14	108.48 \pm 1.87
	mature	113.6 \pm 2.31	134 \pm 2.70
Width (mm)	vert	104.54 \pm 1.11	101.31 \pm 0.82
	mature	110.93 \pm 0.48	109.67 \pm 2.4
Lightness	vert	75.65 \pm 0.44	78.37 \pm 0.47
	mature	71.58 \pm 0.21	69.7 \pm 0.27
a*	vert	-4.18 \pm 0.07	-3.41 \pm 0.07
	mature	-4.39 \pm 0.32	-3.74 \pm 0.37
b*	vert	21.93 \pm 0.54	27.91 \pm 0.76
	mature	35.89 \pm 1.39	30.22 \pm 1.31
TSS	vert	9.3 \pm 0.24	15 \pm 0.32
	mature	13 \pm 0.58	14.33 \pm 0.6
TTA (meq 100 g ⁻¹)	vert	9.68 \pm 0.27	12.95 \pm 0.26
	mature	7.87 \pm 0.37	6.25 \pm 0.02

Luminosité (lightness) = CIE Lab Luminosité (sombre à brillant) par classe (von Röpenack, Parr et Schulze-Lefert). a* = CIE Lab a* (vert à rouge) et b* = CIE Lab b* (bleu à jaune), tous deux dans la plage [-100 ... 100]. Lab avec le D65 comme étalon colorimétrique

Discussion

La sensibilité à FCR est très variable d'un cultivar à l'autre. Le cultivar résistant 'MD-2' et le sensible 'Queen' ont servi de modèle pour améliorer les connaissances sur les mécanismes physiologiques impliqués dans l'interaction hôte-pathogène. Cette étude décrit l'évolution du métabolome au cours de la maturation et suite à l'infection du pathogène dans les fruits des cultivars résistant et sensible.

Une ACP réalisée sur l'ensemble des données a permis de séparer plusieurs clusters dont les 'MD-2' matures sains et tachés qui se démarquent des autres groupes de combinaison de facteurs. Une comparaison des profils métaboliques réalisée suite à ce constat montre que si les profils métaboliques sont similaires dans les deux cultivars les niveaux de réponses sont beaucoup plus élevés chez 'MD-2' avec notamment l'éllicitation des acides hydroxycinnamiques depsides : coumaroyl, caffeoyl et feruloylisocitrate. Barral et al. (2017a) ont mis en évidence l'accumulation des deux premiers composés en réponse à une infection par *F. ananatum*. L'accumulation de feruloylisocitrate est intéressante car

Smith and Harris (1995; 2001) ont identifié l'acide férulique dans les parois cellulaires parenchymateuse de l'ananas.

La diferuloylspermidine est une autre molécule élicitée dans la réponse à l'attaque du pathogène dans le cultivar résistant contrairement au cultivar sensible ou son niveau diminue dans la zone infectée. Les polyamines sont associées à la tolérance aux stress abiotiques et biotiques (Burritt 2008; Tiburcio et al. 2014). Une étude en transcriptomique effectuée chez *Arabidopsis* a révélé que des lignées surexprimant les gènes de synthèse des polyamines induisent une tolérance à des stress abiotiques (Alcázar et al. 2010). La diferuloylspermidine, par une série d'oxydation donne l'acide γ -aminobutyrique (GABA). Le GABA peut protéger les tissus contre les espèces réactives de l'oxygène ou peut avoir un rôle de signalisation (Fait et al., 2008). Le GABA exerce ses effets sur les plantes par la régulation du métabolisme du carbone ou par une voie de signalisation non identifiée. Le GABA peut être utilisé comme inducteur de la résistance systémique et notamment sur ananas (Chinnasri et al. 2006). Dans notre étude on retrouve la spermidine en association avec l'acide férulique. Muroi et al. (2009) identifient la feruloylputrescine, une autre polyamine associée à un acide férulique, dans la défense d'*Arabidopsis thaliana* contre un *Alternaria brassicola*.

L'ACP fait également ressortir le cluster 'MD-2' mature sain. L'évolution des principales familles de métabolites au cours de la maturation montre que les deux cultivars ont des profils métaboliques similaires au stade le plus précoce. Par la suite, 'MD-2' accumule beaucoup plus de métabolites et notamment ceux décrits précédemment qui sont également marqueurs de FCR. La concentration des composés de la voie des phénylpropanoïdes augmente au cours de la maturation avec notamment un pic de L-phénylalanine à mi maturation, le précurseur des composés phénoliques. Ogawa et al. (2017) décrit également une accumulation globale en composés phénoliques dans l'ananas 'Vitória' en lien avec la maturation du fruit.

La différence variétale pour l'accumulation des dérivés du glutathion est également très marquée. Ces métabolites ont déjà été identifiés dans l'ananas par Dieckhaus et al. (2005) et leur implication dans la signalisation des stress biotiques et abiotiques a été largement décrite (Dubreuil-Maurizi and Poinssot 2012; Foyer et al. 1997; Noctor and Foyer 1998; Szalai et al. 2009). Le glutathion a un rôle d'antioxydant lors de stress oxydatif et est aussi un précurseur de l'acide salicylique, une molécule de communication intercellulaire. Une

étude menée sur *Arabidopsis* montre qu'un déficit en glutathion observé chez un mutant (*pad2-1*) affecte les événements liés au stress oxydatif, à l'expression des gènes de défense et à la réponse hypersensible (Dubreuil-Maurizi et al. 2011). L'acide salicylique est utilisé sur ananas pour éliciter les défenses de la plante contre des nématodes (Soler et al. 2013; Soler et al. 2016). Les dérivés de l'acide ascorbique, connus également pour leur pouvoir antioxydant, sont également présent en plus grande quantité dans 'MD-2'. D'ailleurs le glutathion et l'acide ascorbique sont associés dans le cycle 'glutathion-ascorbate' de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (Mittler 2002).

Enfin, les fruits du cultivar sensible possèdent un taux de sucres solubles plus important que le cultivar résistant et une acidité diminuée de moitié dans les fruits matures. Ces deux facteurs peuvent influencer l'infection des champignons pathogènes, des teneurs variables en sucres pouvant freiner ou favoriser son développement (Herbers et al. 1996; Vanderplank 2012)

Cette étude apporte de nouvelles connaissances sur le pathosystème *Ananas-F. ananatum* de la maladie de la tache noire. Au stade naturel d'apparition de la maladie, le cultivar résistant possède déjà un arsenal de métabolites impliqués dans les mécanismes de résistance des plantes contrairement au cultivar sensible.

CHAPITRE IV

Étude microscopique de l'interaction hôte- pathogène

La plupart des métabolites impliqués dans la réponse biochimique sont des composés phénoliques. Le coumaroylisocitrate et le cafféoylisocitrate, les deux composés majoritairement élicités, font partie des derniers maillons de la voie des phénylpropanoïdes conduisant à la synthèse de lignine. Ce polymère apporte une rigidité aux parois cellulaires et agit alors comme barrière physique au développement du champignon. Des progrès récents en imagerie permettent d'histolocaliser ces composés. Il apparaît intéressant de voir si ces métabolites se lient effectivement aux parois cellulaires chez l'ananas et sur quelles structures. Cela a donc ouvert sur une étude plus globale en imagerie.

Ce chapitre repose sur l'article intitulé 'An imaging approach to finding mechanisms for resistance to pineapple fruitlet core rot' à soumettre au journal *Frontiers in Plant Science*.

Une approche par imagerie a permis d'observer des particularités anatomiques pouvant jouer un rôle dans la résistance au champignon. En utilisant la même technique d'inoculation que précédemment, le processus de colonisation du champignon dans le parenchyme a été suivi sur les cultivars sensible et résistant. Enfin, des analyses spectrales et biochimiques couplées ont mis en évidence l'importance de la composition des parois cellulaires, particulièrement des composés phénoliques, pour bloquer le développement du champignon.

Article en préparation pour Frontiers in Plant Science

An imaging approach to finding mechanisms for resistance to pineapple fruitlet core rot

Bastien Barral^{a, *}, Marc Chillet^a, Mathieu Léchaudel^b, Marc Lartaud^c, Jean Luc Verdeuil^c, Geneviève Conéjéro^d, Sabine Schorr-Galindo^e

^a(1) CIRAD, UMR Qualisud, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France ; (2) Qualisud, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier, France.

^b(1) UMR Qualisud, CIRAD, Station de Neufchâteau, 97130 Capesterre-Belle-Eau, Guadeloupe, France ; (2) Qualisud, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier, France.

^c(1) CIRAD, UMR AGAP, platform PHIV, Montpellier, France ; (2) Qualisud, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier, France

^dINRA, UMR BPMP, platform PHIV, Montpellier, France

^eUMR Qualisud, Université de Montpellier, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 5, France

Abstract

Fruitlet core rot is a major postharvest disease of pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). In the past, control programs were designed to eliminate symptoms without addressing their causes or mechanisms, thus achieving only moderate success. In this study: we (i) focused on the anatomy of the fruitlets in resistant ‘MD-2’ and susceptible ‘Queen’ pineapple cultivars; (ii) identified the key role played by the carpel margin in the infection process; (iii) identified the key role played by the sinuous layer of thick-walled cells on the colonization inhibition of *Fusarium ananatum*; and (iv) linked the anatomy of the fruitlets with the phenolic content of cell walls. The fruitlet anatomy of the two cultivars was studied using X-ray, fluorescence and multiphoton microscopy. Sepals and bracts were not perfectly fused with each other, allowing the pathogen to penetrate the fruit even after flowering. In fact, the fungi were found in the blossom cups of both cultivars, but only become pathogenic in the flesh of ‘Queen’ pineapple fruit in natural conditions. The outer layer of the ‘MD-2’ cavity was continuous with thick cell walls

composed of ferulic and coumaric acids. The cell walls of 'Queen' were less lignified at the extremities and the outer layer was interspersed with cracks. The carpel margins were fused all over in 'MD-2' contrary to 'Queen'. This blemish allows the fungus to penetrate deeper in the susceptible cultivar. In order to monitor the colonization pattern, the flesh of mature pineapple fruits was inoculated with a conidia suspension of *Fusarium ananatum*. In pineapple fruitlets, hyphae mainly progressed directly between cell walls into the parenchyma, but never reached the vascular region. The colonization was stopped by a layer of thick-walled cells in the case of the resistant cultivar, probably the infralocular septal nectaries. Anatomical and histochemical observations coupled with spectral analysis of the hypodermis suggested the role of lignin deposition in the resistance to *F. ananatum*. Coumaric and ferulic acids were shown to be the major phenolics bound to the cell walls and were found in higher amounts in the resistant cultivar post-inoculation. The combination of fruitlet anatomy and lignification plays a role in the mechanism of host resistance to fruitlet core rot.

Keywords: fruitlet core rot, disease resistance, microscopy, spectral analysis, carpel margin, septal nectaries, ferulic acid, coumaric acid, *Ananas comosus*

Introduction

Over the past decades, the pineapple has become one of the leading commercial fruit crops worldwide. This development was the result of successful breeding programs. The Pineapple Research Institute produced the 'MD-2' cultivar, now the world's pre-eminent pineapple (Bartholomew et al. 2012). With better yields and a longer lifespan during shipment, 'MD-2' almost replaced the historical 'Smooth Cayenne'. The 'Queen' cultivar, intended mainly for the fresh local market, was not affected by these changes, and its sweet and fruity flavor and exceptional aroma are particularly appreciated by consumers. However, it is susceptible to cold storage temperatures and numerous diseases (Luengwilai et al. 2016; Stewart et al. 2001).

Damage caused by fruitlet core rot disease (FCR) depends on the cultivar. Almost non-existent for the 'MD-2' cultivar, FCR is extremely worrisome for the 'Queen' cultivar. The economic consequences of FCR in South Africa, which are far more serious than for any other post-harvest disease, led pineapple growers and researchers to investigate means of control. Petty et al. (2005) sprayed a combination of two fungicides at flower induction

and observed a significant reduction of the total number of black spots per fruit. Another program aimed at controlling a vector mite had the opposite effect to that expected: application of the miticide increased the incidence of black spots (Manicom et al. 2006). In any case, these phytosanitary products are already banned in the European Union. It is important to better understand the mechanisms of the disease and the plant reaction to consider effective treatments that are more respectful of the environment and living beings.

Morphological and anatomical structures influence the host plant resistance to pathogens. Aquije et al. (2011) showed structural differences between resistant and susceptible pineapple leaves to fusariose. The most recent descriptions of pineapple fruitlet core rot disease were made on 'Smooth Cayenne', a moderately susceptible cultivar. The pathogen penetrates through the stigma during flowering, continues down the stylar canal into the locule, and frequently colonizes the placental tissue (Rohrbach and Apt 1986). The fungus remains latent during fruit growth (Mourichon et al. 1987) and spreads once the fruits reach maturity. Fruitlet core rot has a complex etiology due to environmental conditions, fungal diversity and pineapple physiology.

Few studies have characterized biochemical changes during pineapple fruitlet core rot disease. Barral et al. (2017a) showed an accumulation of free coumaroylisocitrate and caffeoylisocitrate following infection by *F. ananatum*. Hydroxycinnamic acids play an important role in plant-pathogen interaction with their antifungal properties and has an implication in lignin biosynthesis. Various biotic and abiotic stress conditions such as wounding, pathogen infection and metabolic stress induce lignin biosynthesis, making cell walls rigid and impervious (Tronchet et al. 2010; Vanholme et al. 2010). Recent advances in spectral imaging suggest the role of lignin deposition in vanilla roots in the resistance to *Fusarium oxysporum*. An algorithm connects the spectra of standard lignin compounds to the spectral image of the area of interest (Koyyappurath et al. 2015). Anatomical and histochemical observations coupled with biochemical analysis of cell wall-bound phenolics should lead to the development of novel approaches to enhance resistance durability.

In this study, we focused on host-pathogen interactions through host structures and cell wall composition. First, we described the morphological and anatomical differences of infructescence potentially related to FCR in resistant and susceptible pineapple cultivars.

Second, we described the colonization pattern of *Fusarium ananatum* in pineapple fruitlets, and investigated the anatomy and kinetics of cell wall events associated with *F. ananatum* infection using the resistant 'MD-2' and susceptible 'Queen' pineapple cultivars. Finally, biochemical analyses of cell wall-bound phenolic compounds following inoculation were made in order to confirm spectral results.

Materials and methods

Fungal inoculum

The *F. ananatum* isolate Clp001 (CIRAD collection, Ligne Paradis, Reunion Island) was used in this study. The fungus strain was isolated on naturally infected fruit in Reunion Island, purified and integrated into the collection. This isolate was selected because of its stability, high pathogenicity and aggressiveness on 'Queen' and 'MD-2' cultivars. For spore production, Clp001 was grown on PDA plates and stored in the dark for two weeks at 25°C. Conidia were recovered from the media with sterile water and the concentration of the conidial suspension was adjusted to 10^3 conidia ml⁻¹. Twenty-five microliters of the conidial suspension were injected into the fruitlet using a micro-syringe.

Cell wall-bound phenolic monitoring

Plant material

The experiment was conducted on a pineapple field of 'MD-2' and 'Queen' cultivars at the CIRAD Experimental Research Station (21°10' South, 55°30' East) in Reunion Island according to standard agricultural practices (Fournier 2011). The inoculations were directly performed in November 2014 and January 2015 on mature green fruits in the field, 26 weeks after floral induction for 'MD-2' and 19 weeks for 'Queen' (80 percent of their expected harvest date). The analyses were carried out at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13 and 22 days post-inoculation (dpi) for 'Queen' and 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14 and 25 dpi for 'MD-2'. Four fruits were harvested at each sampling date for both cultivars. The level of maturity was determined according to the shell color. G was defined as a green mature fruit, C2 as a half basal yellow fruit, and C4 as a totally yellow fruit (Darnaudery et al. 2016).

Phenolics extraction and identification

The healthy fruitlet and infected fruitlet were sampled separately. The fruitlets were dissected directly after harvest and dipped in liquid nitrogen. These frozen samples were ground in a Grindomix blender (Retsch, Haan, Germany) and the powders obtained were

stored at -80°C. Frozen samples were lyophilized over 72 h at -52°C. Extraction of cell wall-bound phenolics was performed after several assays of extraction solvent and mobile phase in order to optimize the saponification (Mertz et al. 2007; Mussatto et al. 2007; Tilay et al. 2008). One hundred milligrams of the dried powder were extracted twice for 10 min with 15 mL of 80% aqueous ethanol in an ultrasonic bath. Five milliliters of 2 N NaOH were added to the pellet for two hours under stirring. The mixture was acidified to pH 2 with 3 N HCl and filtered with a 0.45-µm filter (Millipore).

Identification was carried out on an UPLC-DAD-MS system. Separations were performed using a Waters Acquity UPLC-DAD system (Milford, MA, USA) on an Acquity BEH C18 column (150 × 1 mm i.d.) (Waters, Milford, MA, USA; 1.7µm), operating at 35°C. The mobile phase consisted of water/formic acid (99/1, v/v) (eluant A) and methanol/formic acid (99/1, v/v) (eluant B). The flow rate was 0.08 mL/min. The elution program was as follows: isocratic for 1 min with 2% B, 2-15% B (1-6.5 min), isocratic with 15% B (6.5-9 min), 15-30% B (9-12 min), isocratic with 30% B (12-14 min), 30-75% B (14-27 min), 75-95% B (27-32 min). ESI-MS/MS analyses were performed with a Bruker Daltonics Amazon (Bremen, Germany) mass spectrometer equipped with an electrospray source and an ion trap mass analyser. The spectrometer was operated in the positive and negative ion mode (end plate offset: -500 V; temperature: 200°C; nebulizer gas: 10 psi; dry gas: 5 L/min; capillary voltage: 2.5 kV in positive mode and 4.5 kV in negative mode). Collision energy for fragmentation used for MS² experiments was set at 1 eV. Based on these identifications, changes in levels of phenolic acids were monitored in healthy and infected pineapple fruitlets according to a previously published study (Barral et al. 2017a).

Anatomical study of pineapple fruit

Plant material consisted of commercially-available pineapple fruit from Costa Rica for the 'MD-2' cultivar and from Reunion and Mauritius Islands for the 'Queen' cultivar. The inoculated *in vitro* plants were examined for *F. ananatum* inoculation and colonization at 2, 4 and 6 dpi in at least two independent experiments.

Wide-field microscopy:

Fresh fruit sections (100 µm) obtained with a Microm HM650 V vibratome (Thermo Scientific, Walldorf, Germany) were dipped in a methyl blue (CI 42780) solution for three

minutes to stain fungi and slides were observed with a Nikon Eclipse Ni-E (Tokyo, Japan) wide-field microscope (filter cube UV-2A, exc 330-380, em 420-800), with a PLAN APO 2x 0.1 NA objective and a Nikon CMOS DS-Ri2 camera, and processed with ImageJ v1.51n software.

X-ray μtomography:

A whole young fruit of 'Queen' cultivar was observed using a SkyScan 1076 microtomograph (Microphotronics, Belgium). The 3D reconstruction was done with NRecon (Microphotronics, Belgium) and Avizo (FEI Visualization Sciences Group) software.

Scanning electron microscopy:

Small pieces of fruit in the blossom cup region were observed with a Hitachi S4000 SEM.

Visualization of *Fusarium ananatum* by multiphoton microscopy and spectral analysis:

Fresh fruit sections (100 μm) obtained with the vibratome were mounted on a glass slide and observed with an LSM 880 multiphoton microscope (Zeiss, Jena, Germany) with a W-Plan-Apochromat 20x/1.0 objective, equipped with a Chameleon Ultra II laser (Coherent, Santa Clara, CA, USA). The optimal excitation wavelength to observe the auto-fluorescence of cell walls is 720 nm and detection was achieved at between 410 and 650 nm.

Image acquisition was performed using ZEN 2 software (Zeiss, Germany). The acquired images were merged and processed using ZEN 2 (Zeiss, Germany) and ImageJ v1.51n software.

Emission Spectral Analysis

The pulsed laser of the multiphoton microscope allows excitation of secondary metabolites in a manner similar to that of a UV laser (Conéjéro et al. 2014; Talamond et al. 2015). Optimal excitation to observe the tissues of the fresh fruit of pineapple was obtained at a wavelength $\lambda = 720$ nm with a band-pass emission in the 410–650 nm range using an array of 32 photomultiplier tube detectors (Zeiss), each with an 8.8-nm bandwidth. This spectral detector yielded spectral images and emission spectra in different parts of the fresh sections. The Linear Unmixing function was executed on these spectral acquisitions to separate, pixel by pixel, the mixed signals of four defined pure auto-fluorescent compounds: ferulic acid, sinapic acid, p-coumaric acid and caffeoylquinic

acid (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), using the entire emission spectrum of each compound plus a residual channel. This image analysis showed each compound present in the sample with coded colors. In the residual channel, the intensity values represented the difference between the acquired spectral data and the fitted linear combination of the reference spectra

All acquisitions were obtained using the facilities of the regional MRI (Montpellier Ressources Imagerie) platform, a member of France BioImaging.

Statistical analysis

All statistical analyses were conducted in R (R Development Core Team 2015). A Box-Cox transformation was performed to ensure normal distributions of residues and the homogeneity of variance of residuals. Analyses of variance (ANOVA) on phenolic acids level between sampling dates were carried out on the transformed data, if required. Comparisons of means in terms of phenolic acids among the fruitlets were statistically evaluated for each sampling date using Tukey's multiple comparison tests.

Results

Pineapple fruitlet overview

Transverse sections of pineapple fruit of 'Queen' cultivar were observed with an X-ray microtomograph. Figure 30 shows syncarpic infructescence resulting from the fusion of the basal part of the flowers and their ovaries, separated by the parenchymatous tissue of the sepals and bract bases. The blossom cup corresponds to a floral cavity that is surrounded by bracts and sepals fused with each other at their base (Figure 30A). The apical part of the sepals did not fuse with each other and the bracts did not unite with the sepals (Figure 30B). Spaces between two sepals up to 100 μm were observed (arrows). Mites and ants were frequently found in the floral cavities of mature fruit during the trial. The withered style is visible in the middle of the cavity and is inserted at the base of the ovary. The ovary below the blossom cup is tricarpellate and trilocular, with the three septa forming an inverted Y when seen in the tangential section of the inflorescence. The ovules are located in the upper part of the deep cavities, known as locules (Coppens d'Eeckenbrugge and Leal 2003).

Blossom cup

A scanning electron microscope examination of the blossom cup indicated the presence of fungi in both cultivars in natural conditions (Figure 31). The surface of the 'MD-2' floral cavity was partially covered by mycelia and conidia with an ellipsoidal shape (Figure 31A and Figure 31C). The micrographs of symptomless 'Queen' blossom cup showed a dense mycelial network with fusiform conidia characteristic of *F. ananatum* (Jacobs et al. 2010) (Figure 31B and Figure 31D). The microorganisms were isolated from the floral cavity and grown in pure culture to which chloramphenicol was added. The pathogen was found in all floral cavities regardless of the cultivar.

Transversal sections were carried out on uninfected fruitlets of both cultivars. The shape of the blossom cup is more flattened and flared for 'MD-2' (Figure 32A) than 'Queen' (Figure 32B). The lining of the cavity differs in thickness, composition and continuity between the two cultivars. Spectral analyses of the epidermal layers of the floral cavity of susceptible 'Queen' and resistant 'MD-2' were compared with reference spectra of lignin precursors (see close-ups in Figure 32). Based on the fluorescence of these phenolic compounds, the images are similar for both cultivars in the style and stamen regions. Ferulic acid is the major compound of the cell walls, followed by *p*-coumaric acid. 'MD-2' cell walls of the outer layer retain the same composition, even in the regions the furthest away from these floral parts. On the other hand, images of 'Queen' lost the characteristic fluorescence signal of the cell wall phenolics. In the susceptible cultivar, the outer layer colored with ferulic acid is discontinuous or very thin, while the resistant cultivar shows a strong and continuous lignin thickening on the outer walls of the blossom cup.

Carpel delimitation

Cross-sections of the ovaries at the placenta level were observed under UV excitation to visualize a blue auto-fluorescence of the cell walls (Figure 33). Septa separating the three carpels are less conspicuous in 'Queen' than in 'MD-2' (arrows). The line where the carpels are facing each other is thick and continuous in the 'MD-2' ovary (Figure 33A), unlike 'Queen' where the fluorescence signal is weak and discontinuous (Figure 33B). The empty spaces indicated by the ellipses correspond to septal nectaries. This anatomical feature is present only in 'Queen' cultivar and not even for all carpel margins.

Colonization of the parenchyma

Fusarium ananatum was inoculated just below the blossom cup in both cultivars and the progression of the hyphae was monitored in the parenchyma (Figure 34). The fungus was detected in the parenchyma of both genotypes from the second day after inoculation. A labyrinthine layer of thick-walled cells passed through the parenchyma of the resistant cultivar (Figure 34A, arrows). This constitutive particular structure of 'MD-2' was not observed in the susceptible 'Queen' pineapple. The blue and red emission channels revealed cell walls and hyphae, respectively. Two days post-inoculation, the hyphae had already spread in the parenchyma of susceptible and resistant pineapple fruitlets. Inoculations resulted in fungal colonization and the death of tissue in the infected area, characterized by signal decrease. At four days post-inoculation, fungal colonization was blocked against the layer of thick-walled cells in 'MD-2' (Figure 34C). In contrast, hyphae were present in large areas in the 'Queen' cultivar, with no structure to slow them down (Figure 34D). Six days post-inoculation, hyphae bypassed the 'MD-2' barrier (Figure 34E) and largely occupied the 'Queen' parenchyma (Figure 34F), the bright red color emphasizing the pathogen density. The layer of thick-walled cells slowed the progression of the hyphae without completely stopping it. Phloem and xylem were not affected by the pathogen even six days post-inoculation (data not shown). The fungi preferentially colonized the tissues by apoplasm, but were able to penetrate and spread through the cells (Figure 34G and 34H).

Subsequent biochemical composition changes of the labyrinthine layer in the resistant cultivar

Spectral analyses of the infected region of susceptible and resistant cultivars were compared with reference spectra of four lignin precursors and constituents (chlorogenic acid, ferulic acid, sinapic acid and *p*-coumaric acid). Figure 35 shows the evolution of the cell wall histochemical composition of the labyrinthine layer in 'MD-2' following *F. ananatum* inoculation. This thick layer and parenchyma cell walls had a similar composition before inoculation (Figure 35A). After inoculation, the layers of thick-walled cells displayed very divergent unmixed spectra compared to pre-inoculation. Ferulic and *p*-coumaric acids are the main constituents binding the thick cell wall layer after fungal inoculation (Figure 35B and Figure 35C). The cell walls composition in the parenchyma evolves also according to fungal colonization. The upper part of the image shows the

healthy parenchyma and the lower part the infected parenchyma. The cell walls exhibit a green color characteristic of ferulic acid in the upper part and a brown color in the lower part two days post-inoculation.

*Increase in cell wall-bound phenolics after *F. ananatum* infection*

The evolution of cell wall-bound phenolics in 'MD-2' and 'Queen' pineapple fruits was monitored in pineapple fruitlets after *F. ananatum* inoculation and during natural ripening (Figure 36). UPLC-MS made it possible to identify *p*-coumaric acid and ferulic acid as the only phenolic compounds of the pineapple fruit cell walls. Hydroxycinnamic acids are found in both healthy and infected fruitlets with varying patterns of evolution. In the infected fruitlet of the resistant cultivar, the level in ferulic acid significantly increased after two days of inoculation, reaching a maximum of 5841 $\mu\text{g g}^{-1}$ of dry weight (DW). In comparison, the ferulic acid level significantly increased eight days post-inoculation and reached a maximum of 2102 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DW in the susceptible cultivar (Figure 36A). Concerning the *p*-coumaric acid, fungal inoculation of *F. ananatum* generated a direct response in the resistant cultivar. In the susceptible cultivar, changes were detectable within four days post-inoculation (Figure 36B). The *p*-coumaric acid level reached a maximum at 13 dpi with 1012 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DW for 'MD-2'. In 'Queen', the peak was 920 $\mu\text{g g}^{-1}$ of DW at 8 dpi. The resistant 'MD-2' had a shorter time and higher level of response to fruitlet core rot infection than the susceptible 'Queen' pineapple. After those respective maximums were reached, the level of cell wall-bound phenolics slightly decreased to a level similar to the one found in the healthy fruitlet.

Evolution of cell wall-bound phenolics in healthy fruitlets was monitored according to maturity stages (Figure 36C and Figure 36D). The ferulic acid level are not significantly different between 'MD-2' and 'Queen' and remain stable throughout the fruit maturation, except at the last stage of ripening of 'MD-2' where the level in ferulic acid significantly increases from 1277 $\mu\text{g g}^{-1}$ to 1915 $\mu\text{g g}^{-1}$. The coumaric acid level is approximately ten times lower than that of ferulic acid in the healthy fruitlet. 'MD-2' and 'Queen' are not significantly different in terms of the coumaric acid level.

Discussion

Fruitlet core rot has been affecting the pineapple industry for decades. Much research was conducted in order to eradicate the pathogen at the assumed moment of its penetration

(Mourichon 1983; Rohrbach and Pfeiffer 1976). The experiments gave mixed results, partly because of a lack of knowledge of the host-pathogen interaction. In this study, complementary tools such as spectral cell imaging linked to accurate biochemical analyses allowed us to increase our knowledge about host-pathogen interactions. First, the anatomy of the fruitlet was precisely described and several anatomical structures involved in FCR resistance were unveiled. Second, the colonization pattern of *F. ananatum* in the resistant and the susceptible cultivars revealed the predominant role of the septal nectaries on colonization inhibition. Finally, biochemical analyses confirmed the involvement of cell wall-bound phenolics in the resistance to fruitlet core rot previously highlighted using image acquisition.

All of the previous studies concurred that the fungus penetrates at the time of flowering. The pathogen was never observed on our cross-section of flowers. To check if the fungus is present at the time of flowering it would be interesting to isolate the different floral parts at the time of flowering on growth medium. However, the presence of mealybugs and other insects in the floral cavity of mature fruit was observed in 'Queen' cultivar (personal observation). There is therefore a post-flowering means to access the floral cavity. In the literature, the floral cavity is described as a fusion of the bracts and sepals (Okimoto 1948). 3D X-ray tomography showed that this fusion was imperfect, leaving sufficient space for fungi and other insects to get through. To confirm these observations, the causal agent was found growing on floral remnants of the blossom cup. Hyphae and characteristic conidia of *F. ananatum* covered the surface of the susceptible cultivar, whereas the hyphal network was more scattered on the resistant cultivar. Fungi were found in the blossom cups of both cultivars, but the symptoms of the disease are expressed only on the susceptible cultivar. Other mechanisms are therefore involved in the disease resistance.

Spectral analysis using a multiphoton microscope made it possible to differentiate the lining of the blossom cup. The cell walls of the outer layer are mainly composed of ferulic and coumaric acids. In susceptible 'Queen', the presence of lignin is discontinuous or very thin, whereas the resistant 'MD-2' shows a strong and continuous lignin thickening on the outer cell walls of the blossom cup. Lignin is known to be a physical barrier to pathogen progression (Nicholson and Hammerschmidt 1992). It is assumed that lignified cell walls hamper hyphal penetration and colonization of the intercellular spaces. Moreover, the

lining of the 'Queen' blossom cup is occasionally cracked, with numerous mycelia observed around it. Oxenham (1953) mentioned the possibility that the pathogen enters the pineapple flesh from growth cracks or insect feeding areas. Ripening causes the disintegration of the walls and occasional cellular break-down in pineapple fruitlets (Okimoto 1948). The pathogen could take advantage of these weaknesses to penetrate the flesh.

The transverse section of the ovary revealed a cellular layer clearly delimiting the carpels in the resistant cultivar. However, the susceptible cultivar exhibited a low intensity fluorescence with discontinuities in the layer characteristic of necrotic tissues. During carpel development the sides where two carpels meet sometimes fail to close up completely and leave a small, narrow, elliptical opening extending downwards between the carpels, from the bottom of the blossom cavity of the cup, permitting air to enter these spaces (Kerns et al. 1936). As the fruit develops to maturity the cells of the carpel walls thus exposed to air become necrotic tissue by oxidation. Only 'Queen' has this anatomical feature in our observations.

Pineapple is a monocotyledonous plant which possess trimeric flowers with three sepals, three petals and three carpels. In the Bromeliaceae family, carpels are presented in an axillary position. The ovary consists of three locules delimited by three carpels facing each other as seen on the cross-sections of the resistant cultivar (carpel margin). Sajo et al. (2004) showed the presence of interlocular nectaries in some Bromelioideae that open to hypanthium floor. They form at the unfused regions of otherwise fused carpel margins. The nectaries are glandular tissues secreting mainly sugars offer to pollinator as reward (Proctor et al. 1996; Stiles and Freeman 1993). The pathogen takes advantage of this duct to penetrate deeper into the fruit of the susceptible cultivar. Moreover, the early symptoms of FCR often come from this area.

We monitored the progression of the pathogen in order to understand what may slow down or even block its development in the parenchyma. Since the symptoms are not external, we inoculated *F. ananatum* directly into the flesh to track its progression over time in both cultivars. Two days post-inoculation, both cultivars exhibited fungal growth in the flesh of the fruit. The hyphae invaded the parenchyma mainly through the intercellular spaces, but tips of hyphae were observed in the cells. These unlignified cell walls were histochemical shown to be non-cellulosic polysaccharides (Smith and Harris

1995). The pathogenic fungi easily progress in this kind of interparietal structure. At four days post-inoculation, the fungus spread continuously into the parenchyma of 'Queen'.

On the resistant cultivar, hyphae development was blocked by a labyrinthine layer of thick-walled cells. This anatomical feature is very similar to what is described as a infralocular nectary by Sajo et al. (2004) and Rudall (2002). This constitutive layer prevents fungus from spreading any further into the flesh. Spectral analysis showed differences in cell wall composition between parenchyma and the septal nectaries after infection. Ferulic and coumaric acids are the main constituents of these lignified cell walls. The structural complexity of lignin, its high molecular weight and its insolubility make its degradation very difficult (Pérez et al. 2002). Currently, the ability of *F. ananatum* and *T. stollii* to degrade lignin is unknown. This layer, with large amounts of ferulic and coumaric acids only in the resistant genotypes, suggests the important role of lignified walls. An accumulation of acid ferulic acid occurs on the parenchyma near the infected area. Parenchyma cells are unlignified but contain ester-linked ferulic acid (Smith and Harris 2001). This increase in phenolic acids may be a preventive defense mechanism to fungal colonization.

Fusarium ananatum never reached the parenchyma vascular system even at six days post-inoculation, indicating that the spread of the fungus was mainly due to the destruction of the parenchyma cells. Phloem and xylem were not affected by the pathogen, which is perhaps the reason why the disease does not spread all over the fruit and remains restricted to small areas. The members of the *Fusarium* genus are generally vascular and cause sudden wilt in plants by rapidly invading the vascular bundles (Ndambi et al. 2012).

Based on these observations, the composition of cell walls seems determinant in the resistance to fruitlet core rot. We therefore biochemically monitored the evolution of cell wall-bound phenolics during natural ripening and post-inoculation with *F. ananatum*. In reaction to the infection, plant-induced resistance lead to an accumulation of ferulic acid and, to a lesser extent, of coumaric acid. The resistant cultivar exhibits a faster and stronger response than the susceptible one. In a previous study, we found large amounts of coumaroylquinic and hydroxybenzoic acids as soluble phenolic compounds in the flesh of healthy mature fruitlets of 'MD-2' (Barral et al., 2017). In addition to their antifungal properties, these compounds are precursors of lignin. Their availability may explain the rapid accumulation of ferulic acid in the cell walls of the resistant variety. Furthermore,

the amount of ferulic acid significantly increased in the resistant cultivar during the late stages of natural ripening. However, the susceptible cultivar exhibited no change in the amount of ferulic acid. Moreover, the symptoms of FCR appear naturally at this stage of maturity in 'Queen'. This change in hydroxycinnamic acids may contribute to slowing down the fungal pathogen.

Altogether, our analyses revealed a considerable difference in the physical properties of the resistant and susceptible cultivars, with more structural integrity associated with higher levels of cell wall-bound phenolics found in the resistant cultivar.

Acknowledgements

We thank the MRI imaging facility, which is part of the UMS BioCampus Montpellier and a member of the national infrastructure, France-BioImaging, supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04) (www.mri.cnrs.fr, www.france-bioimaging.org).

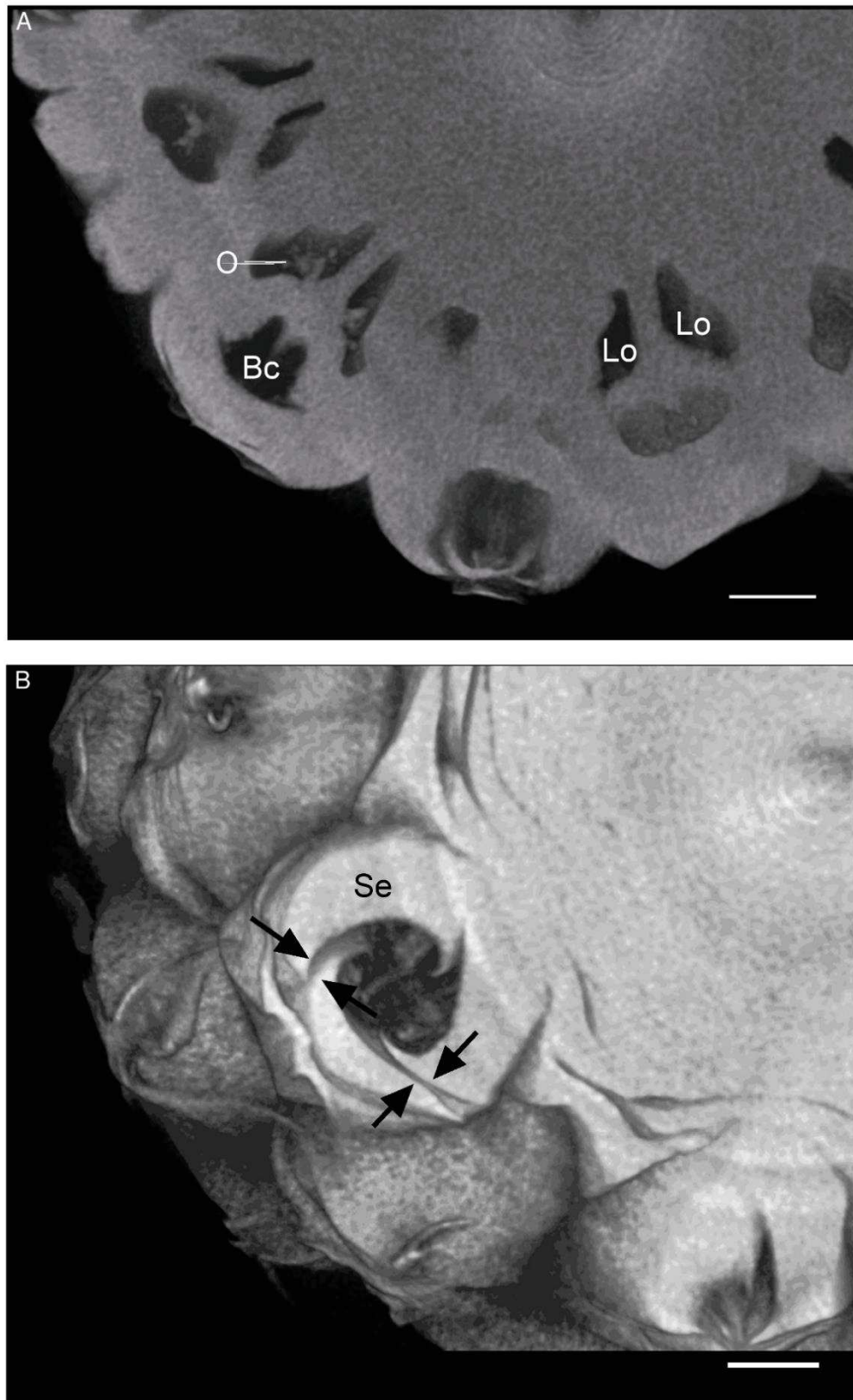


Figure 30 3D reconstructed dataset visualizing transverse section of pineapple fruit. (A) Fruitlets. (B) Blossom cup; black arrows indicate imperfect fusions between sepals. Bc, blossom cup; Lo, locule; O, ovule; Se, sepal (scale bar = 1 cm)

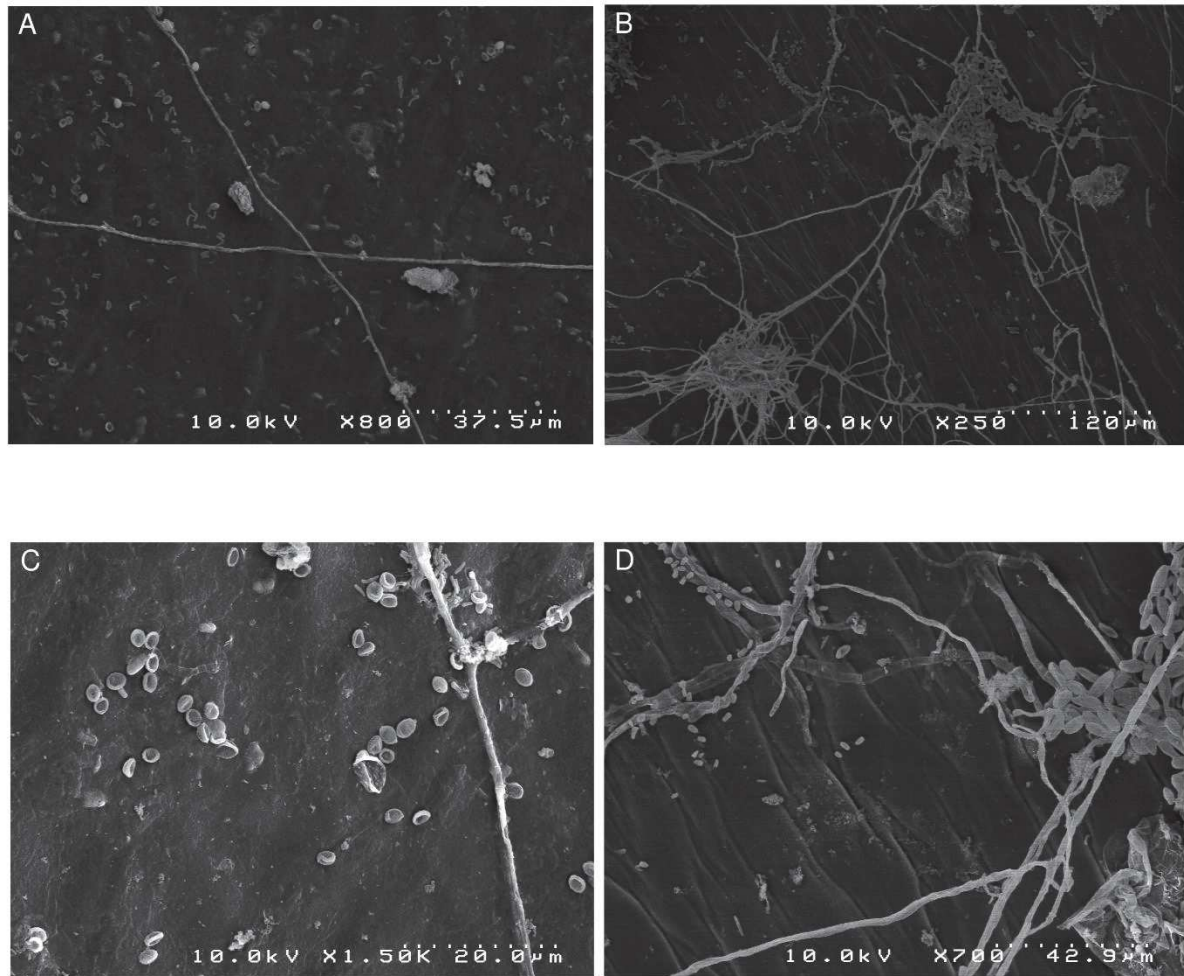


Figure 31 Scanning electron microscopy images of natural fungal colonization of the asymptomatic blossom cup of 'MD2' and 'Queen', respectively the resistant and susceptible cultivar to pineapple fruitlet core rot disease. Image (A) represents the sparse mycelial network of 'MD-2' blossom cup; (B) the dense mycelial network in 'Queen'; (C) conidia with ellipsoidal shape dispersed in 'MD-2' cultivar; and (D) displays conidia with fusiform shape into 'Queen' blossom cup

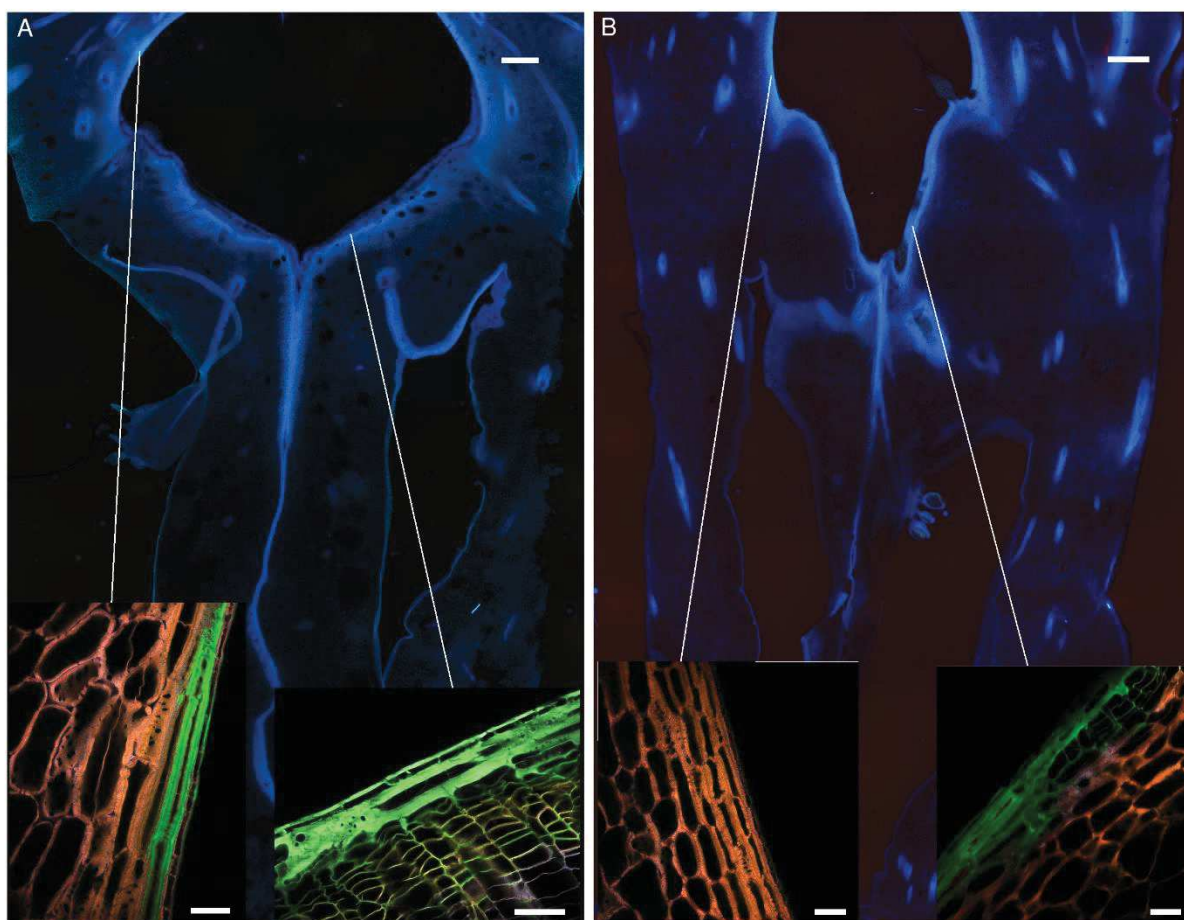


Figure 32 Fruitlet cross section observed with an epifluorescence microscope of (A) 'MD-2' resistant pineapple cultivar and (B) 'Queen' susceptible cultivar (filter exc: 340–380 nm, em: 425–800 nm) (scale bar = 1000 μ m). The close-up rendering illustrates spectral merged images of the lining cell wall composition of blossom cup observed with a multiphoton microscope, using four reference emission spectra compounds: ferulic acid = green color; *p*-coumaric acid = blue color; sinapic acid = yellow color; caffeoylquinic acid = red color (scale bar = 50 μ m)

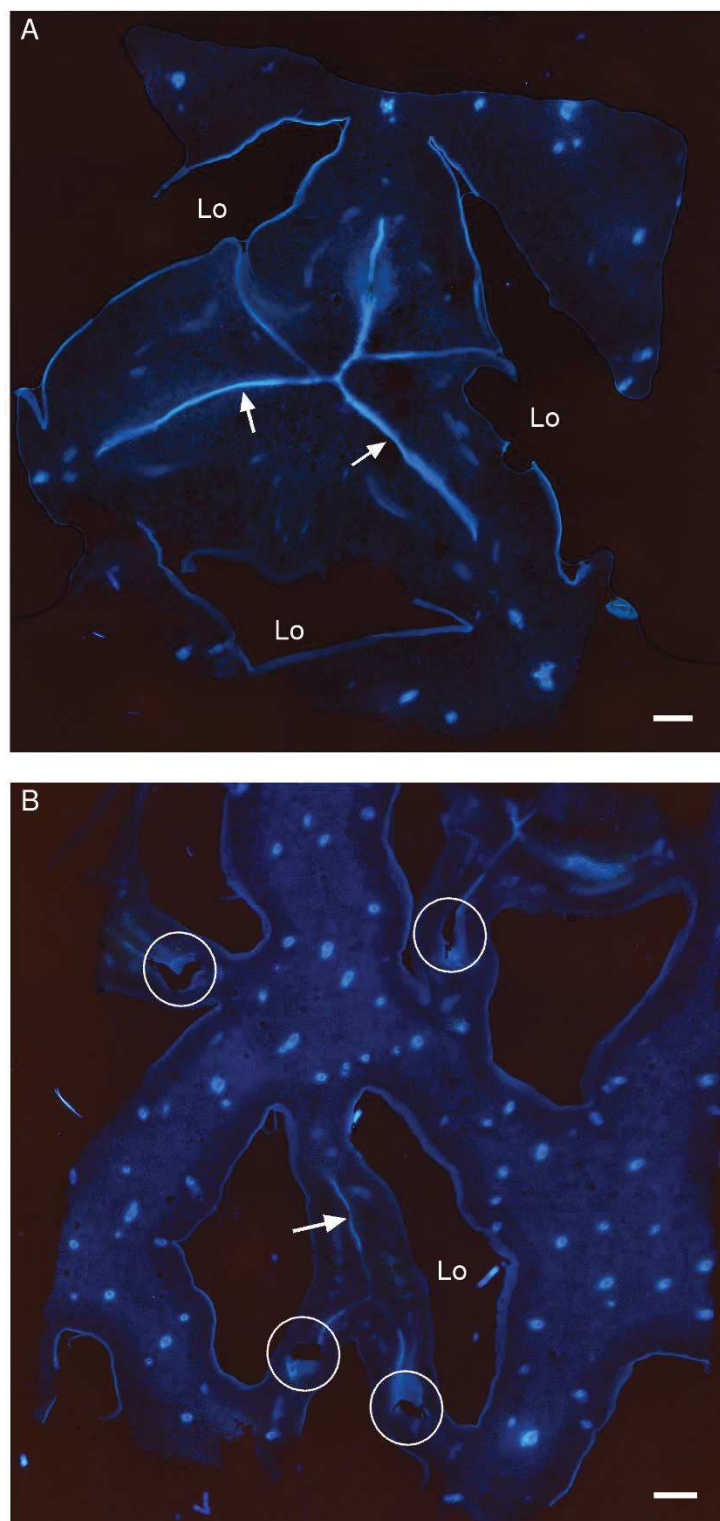


Figure 33 Autofluorescence images of the ovary in a cross section of pineapple fruits observed with an epifluorescence microscope (filter exc: 340–380 nm, em: 425–800 nm) in (A) 'MD-2' resistant cultivar and (B) 'Queen' susceptible cultivar; white arrows indicate carpel margin; white ellipses indicate septal nectaries; Lo, locule

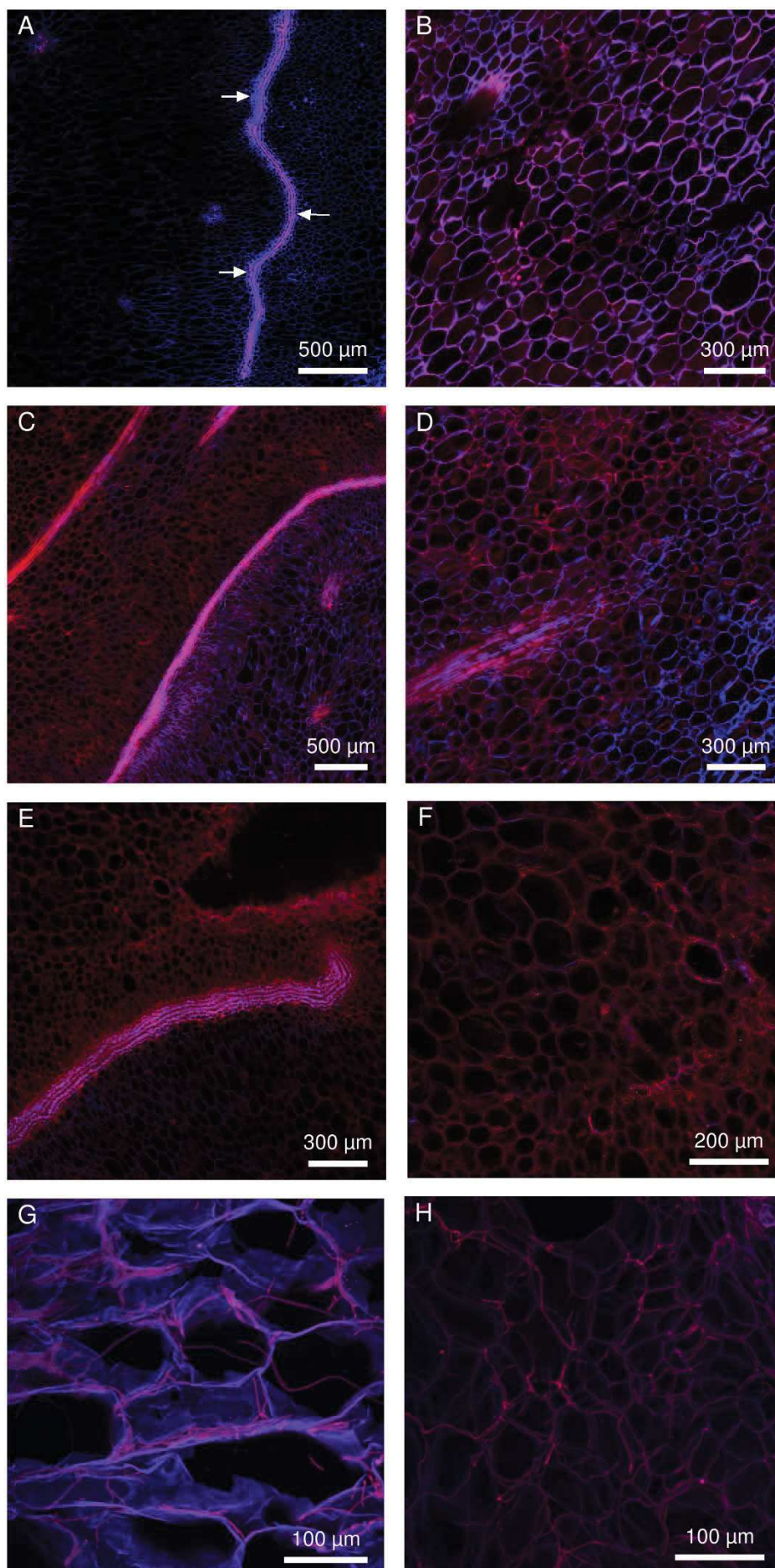


Figure 34 Multiphoton microscopic images showing colonization pattern of *Fusarium ananatum* stained with methyl blue in parenchyma of resistant fruitlet pineapple cultivar 'MD-2' (left column) and susceptible cultivar 'Queen' (right column). Images (A, B) show interparietal hyphae progression at two days post-inoculation; (C, D) Four days post-inoculation the thick-walled cells barrier block hyphae progression in 'MD-2' (C), hyphae continue to develop in 'Queen' parenchyma (D); (E, F) At 6 dpi, hyphae bypass the lining limit in 'MD-2' (E) and continue to develop in 'Queen' parenchyma (F); (G, H) 3D reconstructed Z-stack images of hyphae progression in pineapple fruit parenchyma at four days post-inoculation. (exc: laser IR 720 nm, em: channel 435–485 nm in blue, channel 670–700 nm in red)

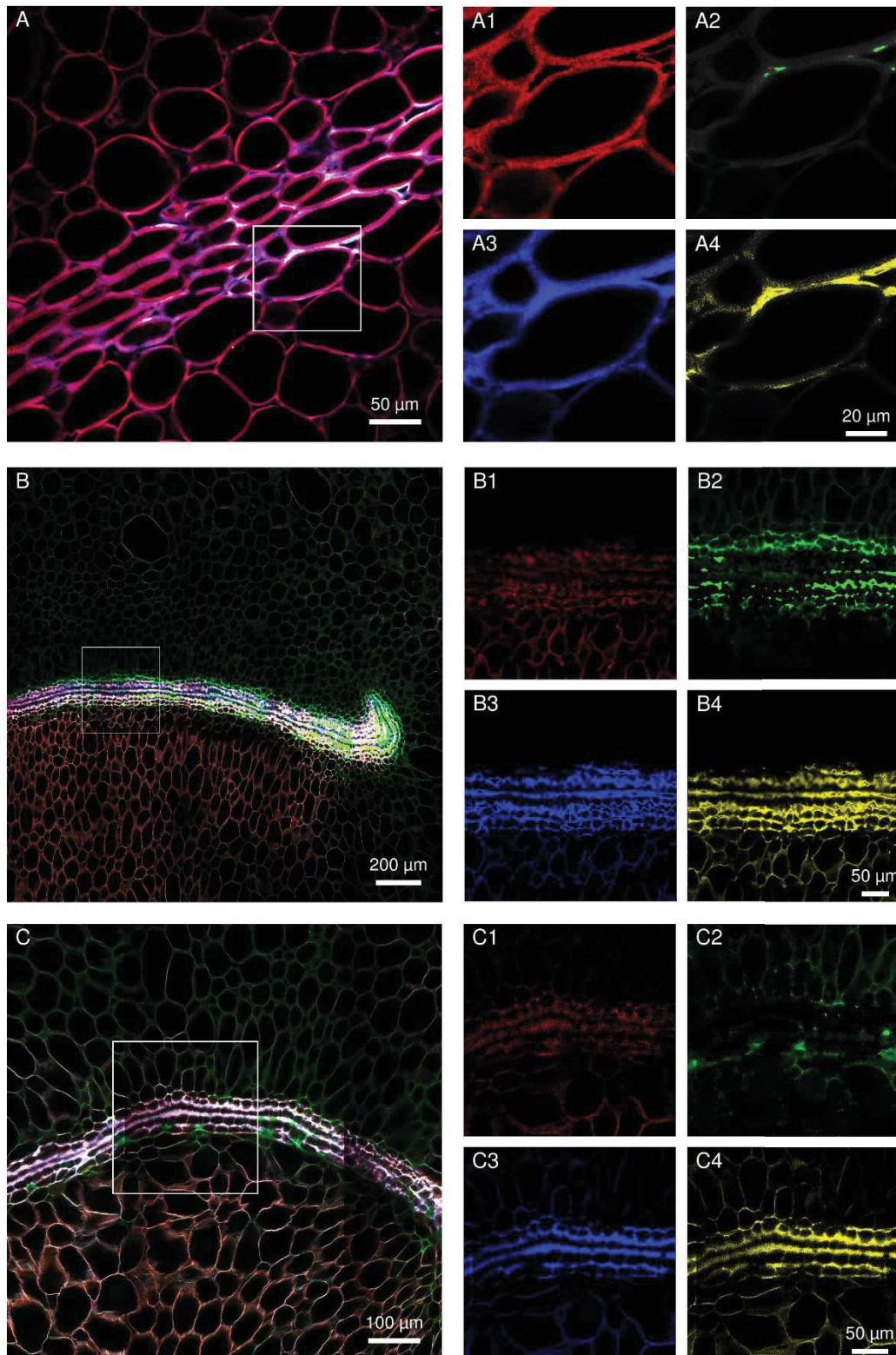


Figure 35 Evolution of septal nectary cell wall histochemical composition following *Fusarium ananatum* inoculation in 'MD-2' resistant pineapple. (A): Spectral image of septal nectary before inoculation. (B, C): Histochemical composition of septa nectaries at different levels two days post-inoculation. Merged images (A, B and C) were splitted into four base images (1, 2, 3, and 4). The close-up (1) illustrates histolocalization of caffeoylquinic acid; (2) ferulic acid; (3) *p*-coumaric acid and (4) sinapic acid.

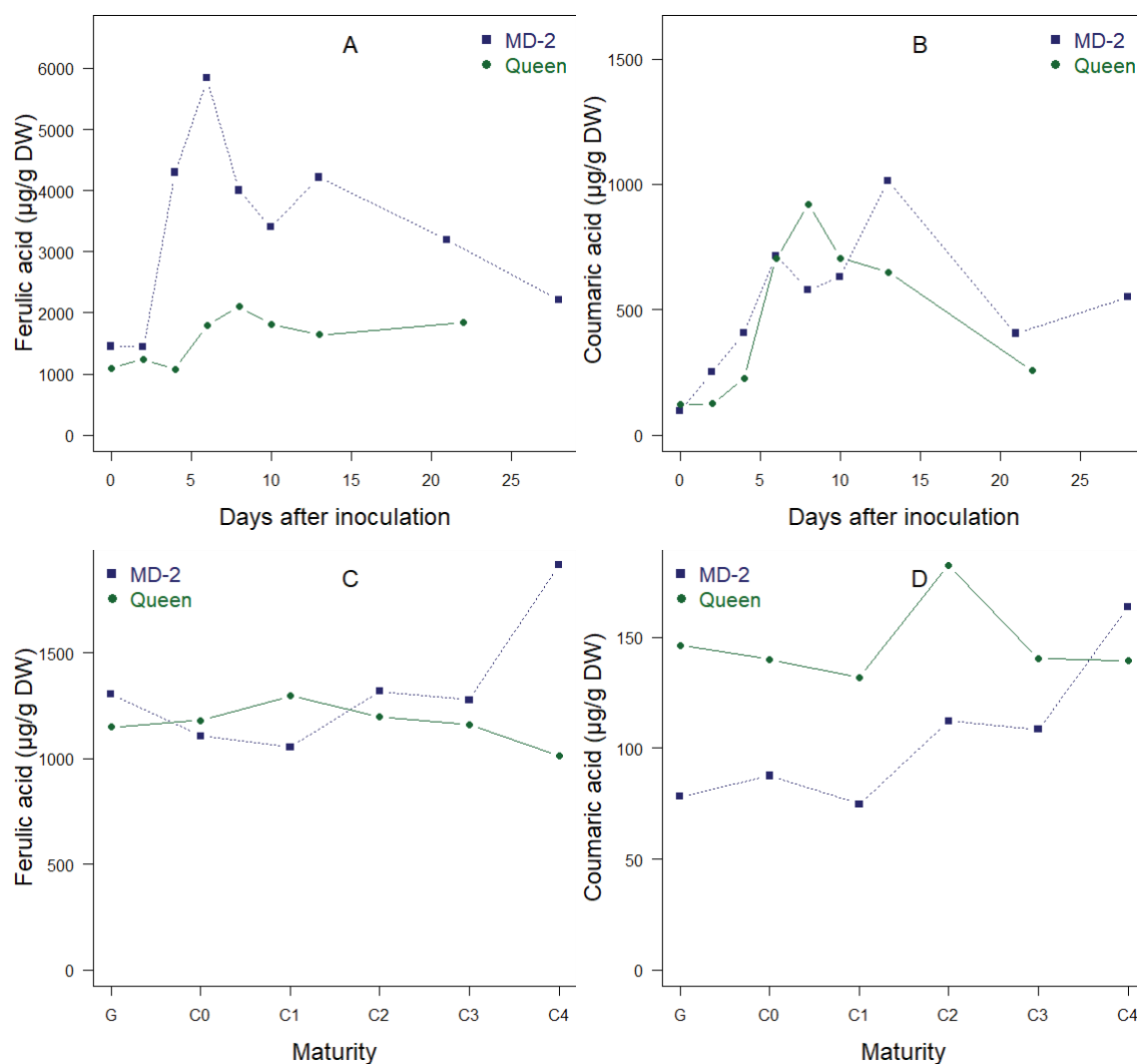


Figure 36 Evolution of cell wall-bound ferulic acid (A, C) and p-coumaric acid (B, D) and in 'Queen' (●) and 'MD-2' (■) pineapple fruits; in infected fruitlets after *F. ananatum* inoculation (A, B) and in healthy fruits during natural ripening (C, D). Vertical bars represent standard error of means ($n = 4$ for healthy fruitlets and $n = 3$ for infected fruitlets). Differences between sampled fruitlets were either significant at $p < 0.05$ (**) or $p < 0.01$ (***), or non-significant (NS) for each sampling date.

CHAPITRE V

Discussion et perspectives

Depuis la première description de la tache noire par Tryon (1898) la plupart des recherches portent sur la description des agents pathogènes et des moyens de lutttes conventionnels. Sur l'île de la Réunion cette maladie affecte la profession qui se trouve désarmée face aux nouvelles réglementations concernant les produits phytosanitaires. L'objectif principal de la thèse était d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de résistances impliqués dans l'interaction hôte-pathogène. L'objectif à plus long terme étant d'utiliser les connaissances nouvellement acquises pour trouver des moyens de prévention et maîtrise de cette maladie dévastatrice.

Epidémiologie, étiologie et étude du potentiel toxinoène

L'hiver austral est une période favorable à la maladie de la tache noire mais aucune donnée n'est connue sur sa réelle occurrence (Fournier et al. 2015). Des entretiens et échantillonnages réalisés avec et chez les producteurs sur des parcelles représentatives de l'ensemble des conditions culturales et environnementales de l'île de la Réunion montrent que 74% des fruits présentent au moins une tache. Un tel chiffre justifie à lui seul de porter une attention particulière à cette maladie. Nos résultats sont en accord avec ceux de Fournier et al. (2015) puisqu'une pluviométrie élevée à la floraison et des températures fraîches à la maturité du fruit favorisent l'apparition de symptômes. Les pratiques culturales influencent également le développement de la maladie, celui-ci sera limité avec des apports raisonnés en potassium et azote mais complètement favorisé avec des apports excessifs et notamment lorsqu'ils sont effectués après le traitement d'induction florale. Darnaudery et al. (2016) ont montré que les plants d'ananas possèdent des réserves suffisantes lors de la floraison pour alimenter le fruit et que des fertilisations post-floraison n'influencent pas la taille du fruit. Un itinéraire technique se basant sur des apports raisonnés pourrait être un premier élément de réponse dans la lutte contre la maladie de la tache noire. Des analyses biochimiques réalisées sur les ananas échantillonnés montrent que les fruits les plus riches en composés phénoliques sont ceux qui présentent le plus faible nombre de taches. Cette première approche laisse supposer l'importance du rôle des composés phénoliques dans la résistance du fruit.

Ces résultats confirment les observations faites par la profession : la tache noire est le principal problème post-récolte. Dans une optique de prévention et maîtrise de la maladie, la première étape est de connaître les agents pathogènes.

Une large collection de souches isolées à partir de cavités florales et zones infectées de fruits d'ananas ont montré que *Fusarium ananatum* est la principale espèce responsable de la maladie de la tache noire à l'île de la Réunion. Cette étude est la première à démontrer la présence de cette espèce sur l'île de la Réunion. *F. ananatum* a été décrit la première fois par Jacobs et al. (2010) en Afrique du Sud puis identifié par Stepień et al. (2013) sur des ananas originaires d'Amérique du Sud et enfin par Gu et al. (2015) en Chine. La prédominance de cet isolat (72%) comme champignon responsable de la maladie de la tache noire est montrée pour la première fois dans un travail de recherche. Le séquençage du gène de ménage EF1- α sur les champignons du genre *Fusarium* a également permis l'identification des espèces *F. oxysporum* et *F. proliferatum*. Ces isolats sont des pathogènes connus de nombreuses plantes cultivées (Bacon and Nelson 1994; Gordon and Martyn 1997; Leslie et al. 2006; Summerell et al. 2010), il n'est donc pas étonnant de les retrouver sur ananas même s'il s'agit de leur première description comme responsable du FCR. Les isolats restants, appartenant supposément à l'espèce *Talaromyces funiculosus* (anciennement *Penicillium funiculosum*), ont été identifiés à partir du séquençage du gène de ménage ITS. Tous appartiennent à l'espèce *Talaromyces stollii* et représentent 21% de l'ensemble des isolats de la collection. Notre analyse phylogénétique est en accord avec les travaux de classification des champignons du genre *Talaromyces* menés par Yilmaz et al. (2014) qui différencient l'espèce *T. funiculosus* de *T. stollii*. Il s'agit de la première description de cette espèce comme agent causal du FCR.

Les études phylogénétiques ont révélé une importante diversité génétique parmi les isolats de la Réunion.

Des données géographiques et climatiques récoltées lors des isolements de champignons complètent cette étude épidémiologique. L'île offre une grande variabilité de températures et de précipitations de par sa topographie. Le ratio de contamination *Fusarium* / *Talaromyces* des ananas était plus élevé dans les zones de production de basse altitude avec une faible pluviométrie. La température et l'humidité sont des facteurs influençant les conditions de croissance des champignons et il semble que les isolats du genre *Fusarium* sont plus adaptés à des températures chaudes avec peu de précipitations

et les champignons du genre *Talaromyces* prennent le dessus avec des conditions fraîches et humides. Les conditions environnementales influencent le rapport de force dans la répartition des genres de champignons.

La capacité des espèces *F. ananatum* et *T. stollii* à produire des mycotoxines est relativement méconnue du fait de leur description récente. En revanche, ces deux champignons appartiennent à des genres toxigènes. Une vingtaine de mycotoxines produites par les espèces du genre *Fusarium* ont été identifiées et pour lesquelles l'exposition pour l'homme et l'animal est dangereuse (Bottalico and Perrone 2002; Glenn 2007). Les champignons du genre *Talaromyces* produisent une large gamme d'extrolites (Frisvad and Samson 2004; Houbroken et al. 2011; Yilmaz et al. 2014). Le potentiel toxigène de l'ensemble des souches de la collection a donc été testé *in vitro* et *in planta*. Les souches de *F. ananatum*, *F. oxysporum* et *F. proliferatum* ont été capables de produire des fumonisines FB₁, FB₂ et de la beauvericine *in vitro*. Un milieu de culture à base de jus d'ananas a été mis au point pour se rapprocher des conditions naturelles d'infection. Sur ce milieu, une concentration en beauvericine de 34959 µg kg⁻¹ a été mesurée pour l'espèce *F. proliferatum*. La beauvericine est une mycotoxine émergente et il n'existe pas actuellement de réglementation spécifique. On peut prévoir dans les années à venir une expansion progressive des réglementations visant les mycotoxines harmonisées à l'échelle de l'Union européenne.

Pénétration du pathogène

Le schéma de pénétration du pathogène dans l'ananas a toujours été décrit comme se déroulant au moment de la floraison, une pénétration post-floraison étant impossible à cause de la fusion des carpelles et sépales entre eux (Edmonstone-Sammons 1955; Rohrbach and Pfeiffer 1976; Rohrbach et al. 2003). Cependant, notre étude utilisant des dispositifs d'imagerie modernes montre une fusion imparfaite de ces pièces florales sur la variété 'Queen'. Il existe donc une voie d'entrée post-floraison de la cavité florale. C'est en accord avec nos observations de cochenilles dans les cavités florales. Il serait intéressant de répéter cette expérience sur le cultivar résistant 'MD-2'.

Il est admis que le pathogène reste latent jusqu'à ce que le fruit soit mûr (Mourichon 1983). Au cours de la maturation de nombreux événements physiologiques entrent en jeu comme l'augmentation de la teneur en sucre et une baisse de l'acidité des fruits. Les

champignons sont hétérotrophes et utilisent le sucre comme source de carbone. Une analyse biochimique révèle que les concentrations en sucres sont plus élevées chez le cultivar sensible que chez le résistant et ce quel que soit le stade de maturité. Chez la variété sensible, la teneur en sucre est même plus élevée dans un fruit à 80% de maturité que dans un fruit mature.

Des observations réalisées sur fruits matures montrent que le champignon tapisse la surface des cavités florales de la variété sensible contrairement à la variété résistante où le champignon ne retrouve pas de conditions favorables à son développement. Le champignon se trouve sous forme latente dans la variété sensible puisque le mycélium et les spores recouvrent la surface de la cavité sans forcément induire de symptômes. De plus, la couche de cellules superficielles de la cavité chez 'Queen' est moins lignifiée que chez 'MD-2' et parsemée de fractures de croissances. Ces différences histochimiques pourraient expliquer en partie cette différence d'occupation, le champignon ayant accès plus précocement à plus de ressources nutritives dans le cultivar sensible.

Quoiqu'il en soit, le pathogène est toujours présent dans les cavités des deux cultivars mais les symptômes ne s'expriment jamais chez 'MD-2' et seulement dans quelques fruits simples formant l'infrutescence de 'Queen'. L'étude anatomique des anciennes pièces florales apporte un élément de réponse. Lors de la floraison les trois carpelles formant l'ovaire se soudent les uns aux autres en une paroi carpellaire (Reynders et al. 2012; Sajo et al. 2004). Nos observations montrent que chez le cultivar résistant les carpelles ont fusionné sur l'ensemble de la longueur. En revanche chez le cultivar sensible certaines fusions sont incomplètes aux extrémités des carpelles. Cette particularité anatomique correspond certainement au canal nectarifère qui ne s'est pas refermé à la floraison. Les champignons peuvent donc profiter de cette espace pour pénétrer plus profondément le fruit. Bubán and Orosz-Kovács (2003) identifient les nectaires comme site d'infection primaire de la bactérie *Erwinia amylovora* causant le feu bactérien chez le pommier et le poirier.

Infection et réponse biochimique

Les interactions entre *F. ananatum* et les cultivars d'ananas ont également été documentées dans cette étude. Les symptômes de la maladie ne sont pas visibles de l'extérieur. Une méthode d'inoculation du pathogène directement dans le parenchyme a

été mise au point pour suivre de façon contrôlée la maladie. Une analyse de la réponse métabolique a permis de mettre en évidence le rôle des composés phénoliques en réponse à une attaque du champignon, et particulièrement du caffeoylisocitrate et du coumaroylisocitrate qui sont élicités. Un suivi histologique de la colonisation du parenchyme vient confirmer ces données. Dans l'interaction compatible ('Queen'), l'invasion se propage rapidement dans le parenchyme, colonisant préférentiellement de façon apoplastique, sans pénétrer les vaisseaux conducteurs. En revanche, des mécanismes de défense constitutifs et induits par les agents pathogènes ont été décrits chez 'MD-2'. Les membranes nectarifères qui traversent le parenchyme, observées seulement chez le cultivar résistant, bloquent le développement mycélien. Une analyse spectrale couplée à une analyse biochimique a mis en évidence un dépôt de lignine, et particulièrement d'acide férulique et coumarique, dans les parois cellulaires de cette structure en réponse à une infection de l'agent pathogène.

Le potentiel antifongique des composés phénoliques a été évalué *in vitro*. Les acides coumarique, caffeoylquinique et férulique inhibent la croissance du mycélium sa capacité à produire des mycotoxines à des concentrations similaires à celle trouvées dans les fruits infectés. Enfin, une étude comparative des cultivars à deux stades de maturité indique que la résistance physiologique s'acquiert avec la maturité. Les profils métaboliques du cultivar sensible et résistant sont proches au stade vert. A maturité, le profil métabolique du cultivar sensible évolue peu, contrairement au cultivar résistant pour lequel la majorité des métabolites sont produits en plus grand nombre. Une comparaison variétale montre que la variété résistante produit naturellement le coumaroylisocitrate à maturité.

Perspectives

Pour répondre à l'objectif final de prévention et maîtrise de la maladie, de nombreuses questions restent encore à être élucidées.

Il existe une différence de sensibilité à la maladie en fonction de la saison. Nos résultats sont en accord avec ceux de Fournier et al (2015) et montrent que l'hiver austral est la période la plus propice au développement de la maladie. Nos travaux ont été réalisés en période d'hiver austral. Il serait intéressant de reproduire certains travaux en été pour savoir si les profils métaboliques changent en fonction des saisons mais aussi pour évaluer s'il s'agit de la même pression et répartition des champignons qu'en hiver.

Une étude plus poussée des pratiques culturales sur l'incidence de la maladie serait une approche intéressante. Un apport raisonné d'azote semblerait diminuer le nombre de taches dans les fruits. Cette pratique couplée avec des rotations culturales pourrait permettre de diminuer la pression d'inoculum sur la parcelle. De plus, des études montrent que des apports limités en azote favorisent la production des composés phénoliques (Delgado et al. 2004; Kováčik et al. 2007). Nous avons mis en évidence l'implication de ces composés dans l'interaction ananas-*F. ananatum*.

Au niveau de la plante, nous avons remarqué que la maladie ne se déclare pas systématiquement chez le cultivar sensible alors que toutes les cavités florales sont contaminées. Les descriptions anatomiques apportent un premier élément de réponse mais il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en corrélant le nombre d'ovaires à fusion incomplète avec le nombre de taches par fruit. Des travaux préliminaires réalisés sur l'île Maurice montrent également des différences de virulence entre souches de champignons. Il est également possible qu'une microflore antagoniste joue sur la pression de l'inoculum. L'état physiologique du fruit joue également un rôle, le nombre de taches étant plus élevé dans la partie basse du fruit (l'ananas est une infructescence avec une maturation verticale temporelle).

L'analyse du métabolome a mis en évidence la présence chez le cultivar résistant de métabolites précurseurs d'éliciteurs de la résistance de la plante face à un bioagresseur. Par exemple, l'acide salicylique et le GABA ont été utilisés pour le contrôle du nématode *Rotylenchulus reniformis* de l'ananas (Chinnasri et al. 2006; Soler et al. 2013). D'autres agissent sur la voie des phénylpropanoïdes (Farag et al. 2008; Mandal and Mitra 2007). Il serait intéressant de transposer ces essais d'induction de la résistance systémique pour contrôler la maladie de la tache noire.

Les agents de contrôle biologique représentent une autre alternative aux produits phytosanitaires classiques. *Bacillus megaterium* est un agent biologique prometteur pour inhiber *F. moniliforme* et supprimer la maladie de la pourriture de l'épi du maïs (Fu et al. 2015). Un autre exemple est l'application d'une bactérie du genre *Brevibacillus* antagoniste à *Fusarium* sp., qui bloque le développement du champignon (Joo et al. 2015). Des travaux de thèse menés dans notre unité (UMR QualiSud) sur la lutte biologique de champignons filamenteux toxigènes des céréales montrent l'intérêt de souches d'actinomycètes pour limiter la croissance et la toxigenèse de *F. verticillioides* (Nguyen

et al. 2017). Il serait intéressant de transposer cette méthode de contrôle au modèle ananas-FCR.

Références

- AFSSA. 2009. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Page 308. Agence française de sécurité sanitaire des aliments.
- Agreste. 2014. La production fruitière à la Réunion. Page 12, La Réunion.
- Alcázar, R., Planas, J., Saxena, T., Zarza, X., Bortolotti, C., Cuevas, J., Bitrián, M., Tiburcio, A. F., and Altabella, T. 2010. Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous Arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:547-552.
- Ali, S. M. Y., Ahiduzzaman, M., Akhter, S., Biswas, M. A. M., Iqbal, N., Onik, J. C., and Rahman, M. H. 2015. Comparative effects on storage period of varieties Pineapple fruits. *Research in Agriculture Livestock and Fisheries* 2:395.
- Alvarez, C. E., Carracedo, A. E., Iglesias, E., and Martinez, M. C. 1993. Pineapples Cultivated by Conventional and Organic Methods in a Soil from a Banana Plantation. A Comparative Study of Soil Fertility, Plant Nutrition and Yields.
- Amezqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., Gonzalez-Peñas, E., De Cerain, A. L., and Guiraud, J. 2012. OTA-producing fungi in foodstuffs: a review. *Food Control* 26:259-268.
- Andersen, B., Smedsgaard, J., and Frisvad, J. C. 2004. *Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:2421-2428.
- Aquije, G. M. D. V., Zorzal, P. B., Buss, D. S., Ventura, J. A., Fernandes, P. M., and Fernandes, A. A. 2010. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. *Plant Cell Rep* 29:1109-1117.
- Aquije, G. M. D. V., Korresa, A. M. N., Buss, D. S., Ventura, J. A., Fernandes, P. M. B., and Fernandes, A. A. R. 2011. Effects of leaf scales of different pineapple cultivars on the epiphytic stage of *Fusarium guttiforme*. *Crop Protection* 30:375-378.
- Ardoino, M., and Perrain, D. 2016. La filière canne-sucre face à la libéralisation du marché européen du sucre en 2017. Institut d'Emission des Départements d'Outre-Mer.
- AROPFL. 2011. Filière organisée Fruits et Légumes de la Réunion.
- Atanasova-Penichon, V., Barreau, C., and Richard-Forget, F. 2016. Antioxidant secondary metabolites in cereals: potential involvement in resistance to *Fusarium* and mycotoxin accumulation. *Frontiers in Microbiology* 7.
- Atanasova-Penichon, V., Bernillon, S., Marchegay, G., Lornac, A., Pinson-Gadais, L., Ponts, N., Zehraoui, E., Barreau, C., and Richard-Forget, F. 2014. Bioguided isolation, characterization, and biotransformation by *Fusarium verticillioides* of maize kernel compounds that inhibit fumonisin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27:1148-1158.
- Atanasova-Penichon, V., Pons, S., Pinson-Gadais, L., Picot, A., Marchegay, G., Bonnin-Verdal, M. N., Ducos, C., Barreau, C., Roucolle, J., Sehabiague, P., Carolo, P., and Richard-Forget, F. 2012. Chlorogenic acid and maize ear rot resistance: a dynamic study investigating *Fusarium graminearum* development, deoxynivalenol production, and phenolic acid accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 25:1605-1616.
- Avallone, S., Guiraud, J. P., Brillouet, J. M., and Teisson, C. 2003. Enzymatic browning and biochemical alterations in black spots of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. *Current Microbiology* 47:113-118.

- Aziz, N. H., Farag, S. E., Mousa, L. A., and Abo-Zaid, M. A. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* 93:43-54.
- Bacon, C. W., and Nelson, P. E. 1994. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Journal of Food Protection* 57:514-521.
- Ban-Koffi, L., and Han, Y. W. 1990. Alcohol production from pineapple waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 6:281-284.
- Barral, B., Chillet, M., Minier, J., Léchaudel, M., and Schorr-Galindo, S. 2017a. Evaluating the response to *Fusarium ananatum* inoculation and antifungal activity of phenolic acids in pineapple. *Fungal Biology*.
- Barral, B., Flippi, L., Chillet, M., Léchaudel, M., and Schorr-Galindo, S. 2017b. Diagnostic survey on the occurrence of pineapple fruitlet core rot and relationship with phenolic compounds in Réunion Island. in: IV International Symposium on Postharvest Pathology.
- Bartholomew, D. P., Paull, R. E., and Rohrbach, K. G. 2002. The pineapple: botany, production, and uses. CABI Publishing.
- Bartholomew, D. P., Hawkins, R. A., and Lopez, J. A. 2012. Hawaii Pineapple: The Rise and Fall of an Industry. *Hortscience* 47:1390-1398.
- Beauman, F. 2006. The pineapple: king of fruits. Random House.
- Bellincampi, D., Cervone, F., and Lionetti, V. 2014. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science* 5:228.
- Benitez, S., Chiumenti, M., Sepulcre, F., Achaerandio, I., and Pujola, M. 2012. Modeling the effect of storage temperature on the respiration rate and texture of fresh cut pineapple. *Journal of Food Engineering* 113:527-533.
- Benjamin, C. R. 1955. Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologia* 47:669-687.
- Bezuidenhout, S. C., Gelderblom, W. C., Gorst-Allman, C. P., Horak, R. M., Marasas, W. F., Spiteller, G., and Vleggaar, R. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*:743-745.
- Bhui, K., Prasad, S., George, J., and Shukla, Y. 2009. Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway. *Cancer letters* 282:167-176.
- Boonpasart, S., Kasetsuwan, N., Puangsricharn, V., Pariyakanok, L., and Jittpoonkusol, T. 2002. Infectious keratitis at King Chulalongkorn Memorial Hospital: a 12-year retrospective study of 391 cases. *Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaihet thangphaet* 85:S217-230.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. The genus *Fusarium*.
- Bottalico, A., and Perrone, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108:611-624.
- Boutigny, A. L., Atanasova-Penichon, V., Benet, M., Barreau, C., and Richard-Forget, F. 2010. Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression. *European Journal of Plant Pathology* 127:275-286.
- Brat, P., Hoang, L. N. T., Soler, A., Reynes, M., and Brillouet, J.-M. 2004. Physicochemical Characterization of a New Pineapple Hybrid (FLHORAN41 Cv.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:6170-6177.
- Bubán, T., and Orosz-Kovács, Z. 2003. The nectary as the primary site of infection by *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.: a mini review. *Plant Systematics and Evolution* 238:183-194.
- Burda, S., Oleszek, W., and Lee, C. Y. 1990. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38:945-948.
- Burritt, D. J. 2008. The polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene causes oxidative stress and alters polyamine metabolism in the aquatic liverwort *Riccia fluitans* L. *Plant, cell & environment* 31:1416-1431.
- Cabrera, H., Menezes, H., Oliveira, J., and Batista, R. 2000. Evaluation of residual levels of benomyl, methyl parathion, diuron, and vamidothion in pineapple pulp and bagasse (smooth cayenne). *Journal of agricultural and food chemistry* 48:5750-5753.

- Carbone, I., and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*:553-556.
- Castillejo, M. A., Bani, M., and Rubiales, D. 2015. Understanding pea resistance mechanisms in response to *Fusarium oxysporum* through proteomic analysis. *Phytochemistry* 115:44-58.
- Castrejón, A. D. R., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L. W., and Huyskens-Keil, S. 2008. Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry* 109:564-572.
- Chalker-Scott, L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70:1-9.
- Chambre d'Agriculture de la Réunion. 2016. Les productions végétales.
- Chan, Y., and Lee, H. 1995. Evaluation of performance and stability of six genotypes of Queen pineapple. *MARDI RESEARCH JOURNAL* 23:1-10.
- Chinnasri, B., Sipes, B., and Schmitt, D. 2006. Effects of inducers of systemic acquired resistance on reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Rotylenchulus reniformis* in pineapple. *Journal of nematology* 38:319.
- Cioffi, N., Losito, I., Terzano, R., and Zambonin, C. G. 2000. An electrospray ionization ion trap mass spectrometric (ESI-MS-MSn) study of dehydroascorbic acid hydrolysis at neutral pH. *Analyst* 125:2244-2248.
- Clérivet, A., Alami, I., Breton, F., Garcia, D., and Sanier, C. 1996. Les composés phénoliques et la résistance des plantes aux agents pathogènes. *Acta Botanica Gallica* 143:531-538.
- Collins, J. L. 1951. Notes on the origin, history, and genetic nature of the Cayenne pineapple. *Pacific Science* 5.
- Collins, J. L. 1960. The pineapple. New York.
- Conéjéro, G., Noirot, M., Talamond, P., and Verdeil, J.-L. 2014. Spectral analysis combined with advanced linear unmixing allows for histolocalization of phenolics in leaves of coffee trees. *Frontiers in Plant Science* 5.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., and Leal, F. 2003. Morphology, anatomy and taxonomy. The pineapple: botany, production and uses:13-32.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., and Duval, M.-F. 2009. The domestication of pineapple: context and hypotheses. *Pineapple News*:15-27.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., Leal, F., and Duval, M. 1997. Germplasm resources of pineapple. *Hort Rev* 21:133-175.
- da Rocha, M. E. B., Freire, F. d. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., and Rondina, D. 2014. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 36:159-165.
- da Silva Bomfim, N., Nakassugi, L. P., Faggion Pinheiro Oliveira, J., Kohiyama, C. Y., Mossini, S. A., Grespan, R., Nerilo, S. B., Mallmann, C. A., Alves Abreu Filho, B., and Machinski, M., Jr. 2015. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chem* 166:330-336.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., and Polissiou, M. G. 2000. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:2576-2581.
- Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23:174-181.
- Darnaudery, M., Fournier, P., and Léchaudel, M. 2016. Low-input pineapple crops with high quality fruit: promising impacts of locally integrated and organic fertilisation compared to chemical fertilisers. *Experimental Agriculture*:1-17.
- Das, I. K., Rakshit, S., and Patil, J. V. 2015. Assessment of artificial inoculation methods for development of sorghum pokkah boeng caused by *Fusarium subglutinans*. *Crop Protection* 77:94-101.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., and Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57:779-795.
- Dawson, C., S., G., and Y., Z. 2016. Pineapple. Page 22 in: United Nations Conference On Trade And Development, U. Nations, ed.

- de Souza, W. C. O., do Nascimento, L. C., Vieira, D. L., dos Santos, T. S., and de Assis Filho, F. M. 2015. Alternative control of *Chalara paradoxa*, causal agent of black rot of pineapple by plant extract of *Mormodica charantia*. *Eur J Plant Pathol* 142:481-488.
- Delgado, R., Martín, P., del Álamo, M., and González, M.-R. 2004. Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84:623-630.
- Desjardins, A. E., and Hohn, T. M. 1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:147-152.
- Dey, K., Borth, W., Melzer, M., Wang, M.-L., and Hu, J. 2015. Analysis of Pineapple Mealybug Wilt Associated Virus -1 and -2 for Potential RNA Silencing Suppressors and Pathogenicity Factors. *Viruses* 7:969-995.
- Dianese, J. C., Bolkan, H. A., Dasilva, C. B., and Couto, F. A. A. 1981. Pathogenicity of Epiphytic *Fusarium-Moniliforme* Var *Subglutinans* to Pineapple. *Phytopathology* 71:1145-1149.
- Dieckhaus, C. M., Fernández-Metzler, C. L., King, R., Krolkowski, P. H., and Baillie, T. A. 2005. Negative ion tandem mass spectrometry for the detection of glutathione conjugates. *Chemical research in toxicology* 18:630-638.
- Dixon, R. A., and Paiva, N. L. 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* 7:1085-1097.
- Dodson, P. G. C. 1968. Black spot investigations. *Ann . Rep. Swaziland*:66-69.
- Doidge, E., Bottomley, A., Van der Plank, J., and Pauer, G. 1953. A revised list of plant diseases occurring in South Africa. Union of South Africa: Dept. Agr. Sci. Bul 346.
- Dorey, E., Fournier, P., Léchaudel, M., and Tixier, P. 2016. Modeling sugar content of pineapple under agro-climatic conditions on Reunion Island. *European Journal of Agronomy* 73:64-72.
- Dou, M. A., Yao, Y. L., Du, L. Q., Sun, G. M., Zhang, X. M., and Li, J. G. 2010. Sugar Accumulation Difference between the Various Sections during Pineapple Development. Pages 141-149 *VII International Pineapple Symposium*.
- Dubreuil-Maurizi, C., and Poinssot, B. 2012. Role of glutathione in plant signaling under biotic stress. *Plant Signal Behav* 7:210-212.
- Dubreuil-Maurizi, C., Vitecek, J., Marty, L., Branciard, L., Frettinger, P., Wendehenne, D., Meyer, A. J., Mauch, F., and Poinssot, B. 2011. Glutathione deficiency of the Arabidopsis mutant pad2-1 affects oxidative stress-related events, defense gene expression, and the hypersensitive response. *Plant Physiology* 157:2000-2012.
- Duval, M. F., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Ferreira, F., Bianchetti, L., and Cabral, J. R. S. 1995. First results from joint EMBRAPA-CIRAD *Ananas* germplasm collecting in Brazil and French Guyana. First results from joint EMBRAPA-CIRAD *Ananas* germplasm collecting in Brazil and French Guyana. Pages 137-144 in: *II International Pineapple Symposium* 425.
- Duval, M. F., Noyer, J.-L., Perrier, X., d'Eeckenbrugge, C., and Hamon, P. 2001. Molecular diversity in pineapple assessed by RFLP markers. *Theoretical and applied genetics* 102:83-90.
- Duval, M. F., Buso, G. S., Ferreira, F. R., Noyer, J. L., Coppens d'Eeckenbrugge, G., Hamon, P., and Ferreira, M. E. 2003. Relationships in *Ananas* and other related genera using chloroplast DNA restriction site variation. *Genome* 46:990-1004.
- Edmonstone-Sammons, C. 1955. The fungal flora associated with black spot of pineapples. Some aspects of the microflora of citrus soils.
- Eklund, P. C., Backman, M. J., Kronberg, L. Å., Smeds, A. I., and Sjöholm, R. E. 2008. Identification of lignans by liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry* 43:97-107.
- Eljaschewitsch, J., Sandfort, J., Tintelnot, K., Horbach, I., and Ruf, B. 1996. Port-a-cath-related *Fusarium oxysporum* infection in an HIV-infected patient: treatment with liposomal amphotericin B. *Mycoses* 39:115-119.
- FAOSTAT. 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT statistics database.

- Farag, M. A., Huhman, D. V., Dixon, R. A., and Sumner, L. W. 2008. Metabolomics Reveals Novel Pathways and Differential Mechanistic and Elicitor-Specific Responses in Phenylpropanoid and Isoflavonoid Biosynthesis in *Medicago truncatula* Cell Cultures. *Plant Physiology* 146:387-402.
- Ferrigo, D., Raiola, A., and Causin, R. 2016. Fusarium Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management. *Molecules* 21:627.
- Fournier, P. 2011. La culture de l'ananas Victoria à la Réunion pour l'exportation. Recueil de bonnes pratiques. CIRAD, ed., France.
- Fournier, P., Benneveau, A., Hardy, C., Chillet, M., and Léchaudel, M. 2015. A predictive model based on a pluviothermic index for leathery pocket and fruitlet core rot of pineapple cv. 'Queen'. *European Journal of Plant Pathology* 142:449-460.
- Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., and Scott, I. M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100:241-254.
- Frank, R. 2003. Going for 'The Gold' turns pineapple world upside down. *Wall St. J* 7.
- Freeman, B. C., and Beattie, G. A. 2008. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*.
- Frisvad, J. C., and Samson, R. A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in mycology* 49:C174.
- Fu, R., Yu, F., Gu, Y., Xue, T., Guo, Y., Wang, Y., Wu, X., Du, M., and Chen, W. 2015. Improvement of Antagonistic Activity of *Bacillus megaterium* MHT6 against *Fusarium moniliforme* using He-Ne Laser Irradiation. *International Journal of Agriculture and Biology* 17:1141-1148.
- Färber, P., and Geisen, R. 1994. Antagonistic activity of the food-related filamentous fungus *Penicillium nalgioense* by the production of penicillin. *Applied and environmental microbiology* 60:3401-3404.
- Ganassi, S., Moretti, A., Pagliai, A. M. B., Logrieco, A., and Sabatini, M. A. 2002. Effects of beauvericin on *Schizaphis graminum* (Aphididae). *Journal of invertebrate pathology* 80:90-96.
- Garcia, M. L. 1988. Etude taxinomique du genre *Ananas*. Utilisation de la variabilité enzymatique.
- Gauthier, L., Atanasova-Penichon, V., Chéreau, S., and Richard-Forget, F. 2015. Metabolomics to decipher the chemical defense of cereals against *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol accumulation. *International Journal of Molecular Sciences* 16:24839-24872.
- Gauthier, L., Bonnin-Verdal, M. N., Marchegay, G., Pinson-Gadais, L., Ducos, C., Richard-Forget, F., and Atanasova-Penichon, V. 2016. Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: New insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. *Int J Food Microbiol* 221:61-68.
- Gill, S. S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909-930.
- Glenn, A. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 137:213-240.
- Goldschmied-Reouven, A., Friedman, J., and Block, C. 1993. *Fusarium* species isolated from non-ocular sites: a 10 year experience at an Israeli general hospital. *Journal de mycologie médicale* 3:99-102.
- Gordon, T., and Martyn, R. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual review of phytopathology* 35:111-128.
- Gouache, D. 2005. Analyse de la variabilité des conditions d'apparition de la maladie des taches noires de l'ananas à la Réunion (et considérations sur la qualité). Mémoire. Institut national agronomique Paris-Grignon, Paris, Réunion.
- Green, J., and Nelson, S. 2015. Heart and root rots of Pineapple. *Plant Disease*.
- Gruz, J., Ayaz, F. A., Torun, H., and Strnad, M. 2011. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit at different stages of ripening. *Food Chemistry* 124:271-277.

- Gu, H., Zhan, R. L., Zhang, L. B., Gong, D. Q., and Jia, Z. W. 2015. First report of *Fusarium ananatum* causing pineapple fruitlet core rot in China. *Plant Disease* 99:1653-1653.
- Guarro, J., Nucci, M., Akiti, T., and Gené, J. 2000. Mixed infection caused by two species of *Fusarium* in a human immunodeficiency virus-positive patient. *Journal of clinical microbiology* 38:3460-3462.
- Guerout, R. 1974. Les taches noires de l'ananas. *Fruits* 29:489-499.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59:307-321.
- Hamill, R. L., Higgins, G. E., Boaz, H. E., and Gorman, M. 1969. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett.*:4255-4258.
- Hammond-Kosack, K. E., and Kanyuka, K. 2007. Resistance genes (R genes) in plants. eLS.
- Hawksworth, D. L. 2015. Naming fungi involved in spoilage of food, drink, and water. *Current Opinion in Food Science* 5:23-28.
- Hebbar, H. U., Sumana, B., and Raghavarao, K. 2008. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. *Bioresource Technology* 99:4896-4902.
- Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M., He, K., Li, J., Schroeder, J. I., Peck, S. C., and Rathjen, J. P. 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:12217-12222.
- Hepton, A., and Anderson, E. 1968. Interfruitlet corking of pineapple fruit, a new disease in Hawai. *Phytopathology* 58:74-&.
- Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W. B., Metraux, J. P., and Sonnewald, U. 1996. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell* 8:793-803.
- Hidalgo, O., Matos, A. P., Cabral, R., Tussel, R., Arzola, M., Santos, R., and Pérez, M. 1998. Phytotoxic effect of culture filtrate from *Fusarium subglutinans* the causal agent of fusariose of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr. *Euphytica* 104:73-77.
- Higuchi, T. 1981. Biosynthesis of Lignin. Pages 194-224 in: *Plant Carbohydrates II*, vol. 13 / B. W. Tanner and F. Loewus, eds. Springer Berlin Heidelberg.
- Horry, J.-P., Quénéhervé, P., and Soler, A. 2007. News from France. CIRAD Pineapple breeding program. *Pineapple News*:15-16.
- Houbraken, J., Frisvad, J. C., and Samson, R. A. 2011. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA fungus* 2:87-95.
- Iiyama, K., Lam, T. B. T., and Stone, B. A. 1994. Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiology* 104:315-320.
- Jacobs, A., Van Wyk, P. S., Marasas, W. F., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J., and Coutinho, T. A. 2010. *Fusarium ananatum* sp. nov. in the *Gibberella fujikuroi* species complex from pineapples with fruit rot in South Africa. *Fungal Biology* 114:515-527.
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323.
- Joo, H. J., Kim, H. Y., Kim, L. H., Lee, S., Ryu, J. G., and Lee, T. 2015. A *Brevibacillus* sp antagonistic to mycotoxigenic *Fusarium* spp. *Biol Control* 87:64-70.
- Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vázquez, C., and González-Jaén, M. T. 2010. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiology* 27:50-57.
- Kerns, K. R., Collins, J. L., and Kim, H. 1936. Developmental studies of the pineapple *Ananas comosus* (L) Merr. *New Phytologist* 35:305-317.
- Kimati, H., and Tokeshi, H. 1964. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* causando resinose em abacaxi. *Revista de Agricultura* 39:131-133.
- Knepper, C., and Day, B. 2010. From perception to activation: the molecular-genetic and biochemical landscape of disease resistance signaling in plants. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* 8:e012.

- Kováčik, J., Klejdus, B., Bačkor, M., and Repčák, M. 2007. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Science* 172:393-399.
- Koyyappurath, S., Conéjéro, G., Dijoux, J. B., Lapeyre-Montès, F., Jade, K., Chiroleu, F., Gatineau, F., Verdeil, J. L., Besse, P., and Grisoni, M. 2015. Differential Responses of Vanilla Accessions to Root Rot and Colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae*. *Frontiers in Plant Science* 6:1125.
- Krcmery, V., Jesenska, Z., Spanik, S., Gyrfas, J., Nogova, J., Botek, R., Mardiak, J., Sufliarsky, J., Sisolakova, J., and Vanickova, M. 1997. Fungaemia due to *Fusarium* spp. in cancer patients. *Journal of hospital infection* 36:223-228.
- Kristensen, R., Torp, M., Kosiak, B., and Holst-Jensen, A. 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research* 109:173-186.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Larrauri, J. A., Ruperez, P., and Calixto, F. S. 1997. Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry* 45:4028-4031.
- Larsen, L. D. 1910. Disease in pineapple. Page 72. Hawaiian Sugar Planter's Assoc.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., and Cardinali, A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research* 661:23-67.
- Lattanzio, V., Di Venere, D., Linsalata, V., Bertolini, P., Ippolito, A., and Salerno, M. 2001. Low temperature metabolism of apple phenolics and quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:5817-5821.
- Le Grice, D. S., and Mark, G. S. 1970. Studies on the control of pineapple fruit diseases . *Phytophylactica* 2:63-54.
- Lee, S. K., and Kader, A. A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology* 20:207-220.
- Lee, Y., Escamilla-Treviño, L., Dixon, R. A., and Voit, E. O. 2012. Functional analysis of metabolic channeling and regulation in lignin biosynthesis: A computational approach. *PLoS Comput Biol* 8:e1002769.
- Lee, Y.-W., Jin, S., Sim, W.-S., and Nester, E. W. 1995. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:12245-12249.
- Leiss, K. A., Maltese, F., Choi, Y. H., Verpoorte, R., and Klinkhamer, P. G. L. 2009. Identification of Chlorogenic Acid as a Resistance Factor for Thrips in Chrysanthemum. *Plant Physiology* 150:1567-1575.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A., and Bullock, S. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Wiley Online Library.
- Li, C.-y., Deng, G.-m., Yang, J., Viljoen, A., Jin, Y., Kuang, R.-b., Zuo, C.-w., Lv, Z.-c., Yang, Q.-s., and Sheng, O. 2012. Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *BMC genomics* 13:374.
- Lim, T.-K., and Rohrbach, K. G. 1980. Role of *Penicillium funiculosum* strains in the development of pineapple fruit diseases. *The American Phytopathological Society* 70.
- Lim, W. 1971. Evaluating the susceptibility of pineapple cultivars to bacterial heart rot. *Malay Pineapple Ind Board Malays Pineapple*.
- Lima, V. L. A. G., Mélo, E. A., Maciel, M. I. S., Prazeres, F. G., Musser, R. S., and Lima, D. E. S. 2005. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chemistry* 90:565-568.
- Link, H. 1809. *Observationes in Ordines plantarum naturales, Dissertatio 1 ma* (Berlin Ges. NatKde 3: 1–42). Berlin, Germany.

- Lo, S.-C. C., and Nicholson, R. L. 1998. Reduction of Light-Induced Anthocyanin Accumulation in Inoculated Sorghum Mesocotyls Implications for a Compensatory Role in the Defense Response. *Plant Physiology* 116:979-989.
- Loeillet, D. 2008. Close-up – *FruiTrop.*:30.
- Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., Kosteki, M., Golinski, P., Ritieni, A., and Chelkowski, J. 1998. Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3084-3088.
- Loison-Cabot, C. 1992. Origin, phylogeny and evolution of pineapple species. *Fruits* 47:25-32.
- Luan, S. 2009. The CBL–CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in plant science* 14:37-42.
- Luengwilai, K., Beckles, D. M., and Siriphanich, J. 2016. Postharvest internal browning of pineapple fruit originates at the phloem. *Journal of Plant Physiology* 202:121-133.
- Lutchmeah, R. 1992. Common disorders and diseases of pineapple fruit cv. Victoria in Mauritius. *Revue agricole et sucrière de l'île Maurice* 71:27-31.
- Ma, C., Xiao, S.-y., Li, Z.-g., Wang, W., and Du, L.-j. 2007. Characterization of active phenolic components in the ethanolic extract of *Ananas comosus* L. leaves using high-performance liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1165:39-44.
- Macheix, J.-J., and Fleuriet, A. 1990. Fruit phenolics. CRC press.
- Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R. A., and Lamb, C. J. 1994. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:7802-7806.
- Mandal, S., and Mitra, A. 2007. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71:201-209.
- Manicom, B. Q., Rabie, E. C., and Tustin, H. A. 2006. Further investigation of the effects of Thioflo on black spot of pineapples. Pages 157-162 International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.
- Marie, F., Malezieux, E., Marchal, J., and Perrier, X. 2000. On farm approach of pineapple fruitlet core rot disease in Martinique. Pages 261-264 International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.
- Martino, P., Gastaldi, R., Raccach, R., and Girmenia, C. 1994. Clinical patterns of *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Journal of Infection* 28:7-15.
- Maschietto, V., Marocco, A., Malachova, A., and Lanubile, A. 2015. Resistance to *Fusarium verticillioides* and fumonisin accumulation in maize inbred lines involves an earlier and enhanced expression of lipoxygenase (LOX) genes. *Journal of Plant Physiology*.
- Masike, K., Mhlongo, M. I., Mudau, S. P., Nobela, O., Ncube, E. N., Tugizimana, F., George, M. J., and Madala, N. E. 2017. Highlighting mass spectrometric fragmentation differences and similarities between hydroxycinnamoyl-quinic acids and hydroxycinnamoyl-isocitric acids. *Chemistry Central Journal* 11:29.
- Masters, K.-S., and Bräse, S. 2012. Xanthonenes from Fungi, Lichens, and Bacteria: The Natural Products and Their Synthesis. *Chemical Reviews* 112:3717-3776.
- Matos, A. P. 1987. Pineapple fusariosis in Brazil : an overview. *Fruits* 42:417-422.
- Matos, A. P., and Souto, G. F. 1985. Reaction of pineapple cultivars pérola and smooth cayenne, to inoculation with *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans*. *Fruits* 40:641-645.
- Matos, A. P., and Cabral, J. R. S. 2006. Evaluation of pineapple genotypes for resistance to *Fusarium subglutinans*. *Acta hort* 702:73-77.
- Maurer, H. R. 2001. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:1234-1245.
- McKeehen, J. D., Busch, R. H., and Fulcher, R. G. 1999. Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1476-1482.

- Mehta, A., Brasileiro, A., Souza, D. S., Romano, E., Campos, M. A., Grossi-de-Sá, M. F., Silva, M. S., Franco, O. L., Fragoso, R. R., and Bevitori, R. 2008. Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us? *The FEBS journal* 275:3731-3746.
- Mendiola, N., Capinpin, J., and Mercado, T. 1951. Pineapple breeding in the Philippines 1922-1941. *Philippine Journal of Agriculture* 16, 51-84.
- Merrill, A., Schmelz, E., Dillehay, D., Spiegel, S., Shayman, J., Schroeder, J., Riley, R., Voss, K., and Wang, E. 1997. Sphingolipids—the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142:208-225.
- Mertz, C., Cheynier, V., Günata, Z., and Brat, P. 2007. Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:8616-8624.
- Meyer, K., Shirley, A. M., Cusumano, J. C., Bell-Lelong, D. A., and Chapple, C. 1998. Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:6619-6623.
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., and Molina, A. 2014. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in plant science* 5.
- Ming, R., Wai, C. M., and Guyot, R. 2016. Pineapple Genome: A Reference for Monocots and CAM Photosynthesis. *Trends in Genetics*.
- Ming, R., VanBuren, R., Wai, C. M., Tang, H., Schatz, M. C., Bowers, J. E., Lyons, E., Wang, M.-L., Chen, J., and Biggers, E. 2015. The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. *Nature Genetics*.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410.
- Moss, M. O. 2002. Mycotoxin review—1. *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist* 16:116-119.
- Mouret, L. 2015. L'ananas, l'autre référence en fruit exotique. *Détail fruits et légumes*:316.
- Mourichon, X. 1983. Contribution à l'étude des taches noires (Fruitlet core rot) et leathery pocket de l'ananas causés par *Penicillium funiculosum* Thom. en Côte d'Ivoire. *Fruits* 38:209-224.
- Mourichon, X. 1991. Etude sur les maladies du fruit : les taches noires et leathery pocket = Study of fruit diseases : fruitlet core rot and leathery pocket. *Fruits* 46:390-394.
- Mourichon, X. 1997. Pineapple fruitlet core rot (black spot) and leathery pocket: review and prospects. Pages 501-508 *International Society for Horticultural Science (ISHS)*, Leuven, Belgium.
- Mourichon, X., Perrier, X., and Thibaud, B. 1987. Les taches noires (fruitlet core not) et leathery pocket de l'ananas en Côte d'Ivoire. Recherche des principaux facteurs explicatifs = Fruitlet core rot and leathery pocket of pineapple in Côte d'Ivoire. Research into the main explanatory factors. *Fruits* 42:343-352.
- Muroi, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Ishizuka, A., Takabayashi, J., Miyoshi, H., and Nishioka, T. 2009. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 230:517.
- Mussatto, S. I., Dragone, G., and Roberto, I. C. 2007. Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products* 25:231-237.
- Naoumkina, M. A., Zhao, Q., GALLEG0-GIRALDO, L., Dai, X., Zhao, P. X., and Dixon, R. A. 2010. Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular plant pathology* 11:829-846.
- Ndambi, B., Cadisch, G., Elzein, A., and Heller, A. 2012. Tissue specific reactions of sorghum roots to the mycoherbicide *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* versus the pathogenic *F. proliferatum*. *Biocontrol science and technology* 22:135-150.
- Nelson, P. M., and WFO Toussoun, T. 1983. *Fusarium* Species: an Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University.
- Nguyen, P.-A., Strub, C., Fontana, A., and Schorr-Galindo, S. 2017. Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biological Control* 104:10-27.
- Nicholson, R. L., and Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30:369-389.

- Nicoletti, R., Manzo, E., and Ciavatta, M. L. 2009. Occurrence and Bioactivities of Funicone-Related Compounds. *International Journal of Molecular Sciences* 10:1430.
- Nicoletti, R., Buommino, E., De Filippis, A., Lopez-Gresa, M. P., Manzo, E., Carella, A., Petrazzuolo, M., and Tufano, M. A. 2008. Bioprospecting for antagonistic *Penicillium* strains as a resource of new antitumor compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:189-195.
- Nidiry, E. S. J., and Babu, C. S. B. 2005. Antifungal activity of tuberose absolute and some of its constituents. *Phytotherapy Research* 19:447-449.
- Nirenberg, H. I., and O'Donnell, K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*:434-458.
- Noctor, G., and Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:249-279.
- Nyenhuis, E. 1974. 'James Queen'. A new pineapple variety. *Farm. South Afr* 40:54-56.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., and Nirenberg, H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*:465-493.
- Ogawa, E. M., Costa, H. B., Ventura, J. A., Caetano, L., Pinto, F. E., Oliveira, B. G., Barroso, M. E. S., Scherer, R., Endringer, D. C., and Romão, W. 2017. Chemical profile of pineapple cv. Vitória in different maturation stages using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Okimoto, M. C. 1948. Anatomy and histology of the pineapple inflorescence and fruit. *Botanical Gazette* 110:217-231.
- Oxenham, B. 1953. Notes on two pineapple diseases in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural Science* 10:237-245.
- Oxenham, B. 1962. Etiology of fruitlet core rot of pineapple in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural Science* 19:27-31.
- O'Brien, J. A., Daudi, A., Butt, V. S., and Bolwell, G. P. 2012. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236:765-779.
- Parham, B. E. V. 1934. Annual report of general Mycological and Botanical work.
- Parvu, M., Vlase, L., Parvu, A. E., Rosca-Casian, O., Gheldiu, A. M., and Parvu, O. 2015. Phenolic Compounds and Antifungal Activity of *Hedera helix* L. (Ivy) Flowers and Fruits. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 43:53-58.
- Peng, W.-T., Lee, Y.-W., and Nester, E. W. 1998. The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are broadened by a high level of the sugar binding protein ChvE. *Journal of bacteriology* 180:5632-5638.
- Perrone, G., Logrieco, A. F., and Frisvad, J. C. 2017. Comments on "Screening and Identification of Novel Ochratoxin A-Producing Fungi from Grapes. *Toxins* 2016, 8, 333"—In Reporting Ochratoxin A Production from Strains of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces*. *Toxins* 9:65.
- Pesson, P., and Louveaux, J. 1984. Pollinisation et productions végétales. Editions Quae.
- Petkovšek, M. M., Štampar, F., and Veberič, R. 2009. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74:60-67.
- Petty, G. J., Tustin, H. A., and Dicks, H. M. 2005. Control of black spot disease/fruitlet core rot in Queen pineapple with integrated mealybug, pineapple fruit mite and fungus control programmes. Pages 143-149 in: V International Pineapple Symposium 702.
- Pitt, J. I. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.
- Plattner, R. D., and Nelson, P. E. 1994. Production of beauvericin by a strain of *Fusarium proliferatum* isolated from corn fodder for swine. *Applied and environmental microbiology* 60:3894-3896.
- Ploetz, R. C. 2006. *Fusarium*-Induced Diseases of Tropical, Perennial Crops. *Phytopathology* 96:648-652.
- Ploetz, R. C. 2015. *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology* 105:1512-1521.
- Pole-Evans, I. B. 1924. Annual report, Division of Plant Industry.
- Poletti, S. 2015. La fertilisation organique de L'ananas Victoria à la Réunion. Page 9.

- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Boutigny, A.-L., Barreau, C., and Richard-Forget, F. 2011. Cinnamic-derived acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and *in vitro* synthesis of type B trichothecenes. *Phytopathology* 101:929-934.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L., and Debeaujon, I. 2007. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* 12:29-36.
- Proctor, M., Yeo, P., and Lack, A. 1996. The natural history of pollination. HarperCollins Publishers.
- Py, C. 1955. Les différents types de rejets d'Ananas. *Fruits* 10:25-42.
- Py, C., and Guyot, A. 1970. La floraison contrôlée de l'ananas par l'Ethrel, nouveau régulateur de croissance.(1ère partie). *Fruits* 25:253-262.
- Py, C., Lacoëuilhe, J.-J., and Teisson, C. 1984. L'ananas : sa culture, ses produits. Maisonneuve et Larose, Paris, France.
- Pérez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., and Martinez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5:53-63.
- Queimada, A. J., Mota, F. L., Pinho, S. P., and Macedo, E. A. 2009. Solubilities of biologically active phenolic compounds: measurements and modeling. *The Journal of Physical Chemistry B* 113:3469-3476.
- R Development Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raimbault, A. K., Marie-Alphonsine, P. A., Horry, J. P., Francois-Haugrin, M., Romuald, K., and Soler, A. 2011. Polyphenol oxidase and peroxidase expression in four pineapple varieties (*Ananas comosus* L.) after a chilling injury. *J Agric Food Chem* 59:342-348.
- Rainha, N., de Medeiros, V. P., Câmara, M., Faustino, H., Leite, J. P., Barreto, M. d. C., Cruz, C., Pacheco, C. A., Ponte, D., and Bernardes da Silva, A. 2015. Plasticity of crassulacean acid metabolism at subtropical latitudes: a pineapple case study. *Physiologia Plantarum*:n/a-n/a.
- Raper, K. B., and Thom, C. 1949. Manual of the *Penicillia*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Rasmussen, S., and Dixon, R. A. 1999. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *The Plant Cell* 11:1537-1551.
- Rayner, R. W. 1970. A mycological colour chart.
- Rebell, G. 1981. *Fusarium* infections in human and veterinary medicine. *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park:210-220.
- Redwan, R. M., Saidin, A., and Kumar, S. V. 2015. Complete chloroplast genome sequence of MD-2 pineapple and its comparative analysis among nine other plants from the subclass *Commelinidae*. *BMC Plant Biology* 15:196.
- Redwan, R. M., Saidin, A., and Kumar, S. V. 2016. The draft genome of MD-2 pineapple using hybrid error correction of long reads. *DNA Research* 23:427-439.
- Reynders, M., Vrijdaghs, A., Larridon, I., Huygh, W., Leroux, O., Muasya, A. M., and Goetghebeur, P. 2012. Gynoecial anatomy and development in Cyperoideae (Cyperaceae, Poales): congenital fusion of carpels facilitates evolutionary modifications in pistil structure. *Plant ecology and evolution* 145:96-125.
- Rohrbach, K. G., and Pfeiffer, J. B. 1976. Susceptibility of pineapple cultivars to fruit diseases incited by *Penicillium funiculosum* and *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 66:1386-1390.
- Rohrbach, K. G., and Taniguchi, G. 1984. Effects of temperature, moisture, and stage of inflorescence development on infection of pineapple by *Penicillium funiculosum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Effects of temperature, moisture, and stage of inflorescence development on infection of pineapple by *Penicillium funiculosum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Phytopathology* 74:995-1000.
- Rohrbach, K. G., and Apt, W. J. 1986. Nematode and disease problems of pineapple. *Plant Disease* 70:81-87.

- Rohrbach, K. G., and Johnson, M. W. 2003. Pests, diseases and weeds. The pineapple: botany, production and uses 203:251.
- Rohrbach, K. G., Namba, R., and Taniguchi, G. 1981. Endosulfan for control of pineapple inter-fruitlet corking, leathery pocket and fruitlet core rot. Pages 1006-1007, T. A. P. Society, ed.
- Rohrbach, K. G., Schmitt, D., and Ploetz, R. C. 2003. Diseases of pineapple. Pages 443-464 in: Diseases of tropical fruit crops.
- Rosen, R. T., and Rosen, J. D. 1982. Presence of four *Fusarium* mycotoxins and synthetic material in 'yellow rain': Evidence for the use of chemical weapons in Laos. *Biological Mass Spectrometry* 9:443-450.
- Rudall, P. 2002. Homologies of inferior ovaries and septal nectaries in monocotyledons. *International Journal of Plant Sciences* 163:261-276.
- Ruiz-García, Y., and Gómez-Plaza, E. 2013. Elicitors: a tool for improving fruit phenolic content. *Agriculture* 3:33-52.
- Sade, D., Shriki, O., Cuadros-Inostroza, A., Tohge, T., Semel, Y., Haviv, Y., Willmitzer, L., Fernie, A. R., Czosnek, H., and Brotman, Y. 2015. Comparative metabolomics and transcriptomics of plant response to Tomato yellow leaf curl virus infection in resistant and susceptible tomato cultivars. *Metabolomics* 11:81-97.
- Sajo, M., Rudall, P., and Prychid, C. 2004. Floral anatomy of Bromeliaceae, with particular reference to the evolution of epigyny and septal nectaries in commelinid monocots. *Plant Systematics and Evolution* 247:215-231.
- Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F., Houbraken, J., and Frisvad, J. C. 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Phylogenetic analysis of Penicillium subgenus Penicillium using partial β -tubulin sequences. *Stud Mycol* 49:175-200.*
- Samson, R. A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K. A., Peterson, S. W., Varga, J., and Frisvad, J. C. 2011. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology* 70:159-183.
- Sana, T. R., Fischer, S., Wohlgemuth, G., Katrekar, A., Jung, K.-h., Ronald, P. C., and Fiehn, O. 2010. Metabolomic and transcriptomic analysis of the rice response to the bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Metabolomics* 6:451-465.
- Santos, C., Ventura, J. A., and Lima, N. 2016. New Insights for Diagnosis of Pineapple Fusariosis by MALDI-TOF MS Technique. *Current Microbiology* 73:206-213.
- Schenk, P. M., Carvalhais, L. C., and Kazan, K. 2012. Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? *Trends in biotechnology* 30:177-184.
- Seifert, K. A., Aoki, T., Baayen, R. P., Brayford, D., Burgess, L. W., Chulze, S., Gams, W., Geiser, D., de Gruyter, J., Leslie, J. F., Logrieco, A., Marasas, W. F. O., Nirenberg, H. I., O'Donnell, K., Rheeder, J., Samuels, G. J., Summerell, B. A., Thrane, U., and Waalwijk, C. 2003. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research* 107:643-644.
- Serrano, G. B. 1928. Bacterial fruitlet rot of pineapple in the Philippines. *Phillipine Jour. of Sci.* 36.
- Serrano, G. B. 1934. *Phill. J. Sci.* 4.
- Simmonds, H. J. 1939. Work of the Pathological Branch.
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., and de Both, M. 1998. Dissection of the *Fusarium* I2 gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *The Plant Cell* 10:1055-1068.
- Smith, B. G., and Harris, P. J. 1995. Polysaccharide Composition of Unlignified Cell Walls of Pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] Fruit. *Plant Physiology* 107:1399-1409.
- Smith, B. G., and Harris, P. J. 2001. Ferulic acid is esterified to glucuronoarabinoxylans in pineapple cell walls. *Phytochemistry* 56:513-519.
- Snyder, W. C., and Hansen, H. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*:64-67.
- Soler, A., Marie-Alphonsine, P.-A., Topart, P., and Quénéhervé, P. 2009. How to evaluate the resistance or tolerance of pineapple varieties to nematodes? Pages 191-198 in: VI International Pineapple Symposium.

- Soler, A., Marie-Alphonsine, P.-A., Corbion, C., and 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.
- Soler, A., Marie-Alphonsine, P. A., Corbion, C., Fernandes, P., Portal Gonzalez, N., Gonzalez, R., Repellin, A., Declerck, S., and Quénéhervé, P. 2016. Bioprotection of pineapple in ecological cropping systems. Pages 159-168 International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.
- Souza, G. M. D., Estelita, M. E. M., and Wanderley, M. D. G. L. 2005. Leaf anatomy of Brazilian species of *Aechmea* subgenus *Chevaliera* (Gaudich. ex Beer) Baker, *Bromelioideae-Bromeliaceae*. *Brazilian Journal of Botany* 28:603-613.
- Steingass, C., Dell, C., Lieb, V., Mayer-Ullmann, B., Czerny, M., and Carle, R. 2015a. Assignment of distinctive volatiles, descriptive sensory analysis and consumer preference of differently ripened and post-harvest handled pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) fruits. *Eur Food Res Technol*:1-11.
- Steingass, C. B., Glock, M., Schweiggert, R., and Carle, R. 2015b. Studies into the phenolic patterns of different tissues of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) infructescence by HPLC-DAD-ESI-MSn and GC-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*:1-17.
- Stewart, R. J., Sawyer, B. J. B., Bucheli, C. S., and Robinson, S. P. 2001. Polyphenol oxidase is induced by chilling and wounding in pineapple. *Functional Plant Biology* 28:181-191.
- Stiles, F. G., and Freeman, C. E. 1993. Patterns in floral nectar characteristics of some bird-visited plant species from Costa Rica. *Biotropica*:191-205.
- Stockmann-Juvala, H., and Savolainen, K. 2008. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human & experimental toxicology* 27:799-809.
- Stępień, Ł., Koczyk, G., and Waśkiewicz, A. 2011. Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. *Journal of Applied Genetics* 52:487.
- Stępień, Ł., Koczyk, G., and Waskiewicz, A. 2013. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. *J Appl Genet* 54:367-380.
- Summerell, B. A., Laurence, M. H., Liew, E. C., and Leslie, J. F. 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity* 44:3-13.
- Sung Woo, S., and Lee Dong, G. 2010. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. Page 219 in: *Pure and Applied Chemistry*.
- Swarts, D. 1990. The effects of pre-storage conditions and storage temperatures on the keeping quality of Queen pineapples under simulated sea freight conditions. *Inligtingsbulletin-Navorsingsinstituut vir Sitrus en Subtropiese Vrugte*:15-17.
- Swarupa, V., Ravishankar, K., and Rekha, A. 2014. Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. *Planta* 239:735-751.
- Szalai, G., Kellős, T., Galiba, G., and Kocsy, G. 2009. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* 28:66-80.
- Szultka, M., Buszewska-Forajta, M., Kaliszan, R., and Buszewski, B. 2014. Determination of ascorbic acid and its degradation products by high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *ELECTROPHORESIS* 35:585-592.
- Sánchez-Mata, C. M., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C., and Torija-Isasa, E. M. 2000. Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Food Research and Technology* 210:220-225.
- Talamond, P., Verdeil, J.-L., and Conéjéro, G. 2015. Secondary Metabolite Localization by Autofluorescence in Living Plant Cells. *Molecules* 20:5024.
- Tamura, K., and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution* 10:512-526.

- Tanaka, K., Hilary, Z. D., and Ishizaki, A. 1999. Investigation of the utility of pineapple juice and pineapple waste material as low-cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87:642-646.
- Tawata, S., Taira, S., Kobamoto, N., Zhu, J., Ishihara, M., and Toyama, S. 1996. Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60:909-910.
- Teisson, C. 2002. Examen des nuisances sur ananas en Afrique de l'Ouest.
- Thompson, A. 1937. Pineapple fruit rots in Malaya. *Malay Agric. Jour.* 1937.
- Tiburcio, A. F., Altabella, T., Bitrián, M., and Alcázar, R. 2014. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. *Planta* 240:1-18.
- Tilay, A., Bule, M., Kishenkumar, J., and Annapure, U. 2008. Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: its improved extraction and purification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:7644-7648.
- Tronchet, M., Balague, C., Kroj, T., Jouanin, L., and Roby, D. 2010. Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Molecular plant pathology* 11:83-92.
- Tryon, H. 1898. Fruitlet core rot of pineapple. *Queensland agricultural journal* 3:458-467.
- Tsunoda, M., Sharma, R. P., and Riley, R. T. 1998. Early fumonisin B1 toxicity in relation to disrupted sphingolipid metabolism in male BALB/c mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 12:281-289.
- Upadhyay, A., Lama, J. P., and Tawata, S. 2013. Utilization of Pineapple Waste: A Review. 2013 6:9.
- Ustianowski, A. P., Sieu, T. P., and Day, J. N. 2008. *Penicillium marneffe* infection in HIV. *Current opinion in infectious diseases* 21:31-36.
- Vakalounakis, D. J. 1996. Allelism of the Fcu-1 and Foc genes conferring resistance to fusarium wilt in cucumber. *European journal of plant pathology* 102:855-858.
- Valdez, J. G., Makuch, M. A., Ordovini, A. F., Masuelli, R. W., Overy, D. P., and Piccolo, R. J. 2006. First report of *Penicillium allii* as a field pathogen of garlic (*Allium sativum*). *Plant Pathology* 55:583-583.
- Van Acker, R., Déjardin, A., Desmet, S., Hoengenaert, L., Vanholme, R., Morreel, K., Laurans, F., Kim, H., Santoro, N., and Foster, C. 2017. Different metabolic routes for coniferaldehyde and sinapaldehyde with CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE1 deficiency. *Plant Physiology*:pp. 00834.02017.
- Van Tran, A. 2006. Chemical analysis and pulping study of pineapple crown leaves. *Industrial Crops and Products* 24:66-74.
- Vanderplank, J. E. 2012. Disease resistance in plants. Elsevier.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W. 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology* 153:895-905.
- Varbanova, M., Porter, K., Lu, F., Ralph, J., Hammerschmidt, R., Jones, A. D., and Day, B. 2011. Molecular and biochemical basis for stress-induced accumulation of free and bound *p*-coumaraldehyde in cucumber. *Plant Physiol* 157:1056-1066.
- Ventura, J. A., Zambolim, L., and Gilbertson, R. 1993. Pathogenicity of *Fusarium subglutinans* to pineapples. Pathogenicity of *Fusarium subglutinans* to pineapples. *Fitopatol. Bras. Supl* 18:280.
- Vismer, H., Marasas, W., Rheeder, J., and Joubert, J. 2002. *Fusarium dimerum* as a cause of human eye infections. *Medical mycology* 40:399-406.
- von Röpenack, E., Parr, A., and Schulze-Lefert, P. 1998. Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *Journal of Biological Chemistry* 273:9013-9022.
- Wang, S., and Millner, P. 2009. Effect of different cultural systems on antioxidant capacity, phenolic content, and fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:9651-9657.
- Wen, L., and Wrolstad, R. E. 2002. Phenolic composition of authentic pineapple juice. *Journal of Food Science* 67:155-161.

- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18:315-322.
- Williams, D. D. F., and Fleisch, H. 1992. Historical review of pineapple breeding in Hawaii. Pages 67-76 in: I International Pineapple Symposium.
- Windels, C. E. 2000. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. *Phytopathology* 90:17-21.
- Winkel-Shirley, B. 1999. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum* 107:142-149.
- Wojtaszek, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322 (Pt 3):681-692.
- Wollenweber, H. W., and Reinking, O. A. 1935. Die fusarien, ihre beschreibung, schadwirkung und bekämpfung. P. Parey.
- Xia, J., and Wishart, D. S. 2016. Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*:14.10. 11-14.10. 91.
- Yassin, M. A., El-Samawaty, A.-R., Bahkali, A., Moslem, M., Abd-Elsalam, K. A., and Hyde, K. D. 2010. Mycotoxin-producing fungi occurring in sorghum grains from Saudi Arabia. *Fungal Diversity* 44:45-52.
- Yilmaz, N., Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., and Samson, R. A. 2014. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology* 78:175-341.
- Yilmaz, N., Houbraken, J., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C., Visagie, C. M., and Samson, R. A. 2012. Delimitation and characterisation of *Talaromyces* purpurogenus and related species. *Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 29:39-54.
- Youhnovski, N., Bigler, L., Werner, C., and Hesse, M. 1998. On-Line Coupling of High-Performance Liquid Chromatography to Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry (HPLC/APCI-MS and MS/MS). The Pollen Analysis of *Hippeastrum x hortorum* (Amaryllidaceae). *Helvetica chimica acta* 81:1654-1671.
- Yusuf, N. H. M., Ong, W. D., Redwan, R. M., Latip, M. A., and Kumar, S. V. 2015. Discovery of precursor and mature microRNAs and their putative gene targets using high-throughput sequencing in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Gene* 571:71-80.
- Zabka, M., and Pavela, R. 2013. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere* 93:1051-1056.
- Zheng, Z.-P., Ma, J., Cheng, K.-W., Chao, J., Zhu, Q., Chang, R. C.-C., Zhao, M., Lin, Z.-X., and Wang, M. 2010. Sulfur-containing constituents and one 1H-pyrrole-2-carboxylic acid derivative from pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.] fruit. *Phytochemistry* 71:2046-2051.

Liste des figures

Figure 1 Principaux pays producteurs d'ananas (FAO 2017)	4 -
Figure 2 Coupe longitudinale de fleur d'ananas (biologievegetale.be)	7 -
Figure 3 Placentation axile en coupe transversale ; (A) un carpelle fermé. Les deux bords du carpelle se sont soudés au niveau des placentas marginaux ; (B) : trois carpelles fermés (C) : trois carpelles fermés et soudés.....	8 -
Figure 4 Fruits à maturité et feuilles des cultivars (A) 'Queen', et (B) 'MD-2' et (C) 'Flhoran 53'	10 -
Figure 5 Principales étapes de l'itinéraire technique pour la culture de l'ananas.....	13 -
Figure 6 Symptômes de la maladie de la tache noire sur le cultivar 'Queen'	16 -
Figure 7 Caractéristiques morphologiques de <i>Fusarium ananatum</i> . (A) Colonie sur milieu PDA après 7 jours à 25°C. (B) Fausses conidies sur carnation leaf agar (CLA). (C) Microconidies sur CLA. (D) Macroconidies sur CLA.	25 -
Figure 8 Exemple d'acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés	33 -
Figure 9 Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes ; PAL : phénylalanine ammonialyase ; TAL : tyrosine ammonialyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; PPOc : activité crésolase de la polyphénol oxydase ; COMT : caféate-O-méthyl transférase ; OMT : O-méthyl transférase ; C4L : p-coumarate CoA ligase. D'après Vanholme et al. (2010)-	34 -
Figure 10 Distribution of pineapple producers on Reunion Island.	47 -
Figure 11 Percentage of healthy fruits (green) and class distribution of the number of black spots (grayscale) over the 540 fruits sampled (A) and mean distribution of the fruitlet core rot symptoms inside the fruit (B).	47 -
Figure 12 Relation between Potassium fertilization (A), Nitrogen fertilization (B), pluviometry (C) and fruit susceptibility of the fruit to fruitlet core rot. The x-axis integrates the representativeness of each class of fertilizer level or rainfall of all the plots. The y-axis integrates the percentage of each disease severity class.....	48 -
Figure 13 Relation between levels in free phenolic acids (left column: Hydroxybenzoic acids (HBA) (A), coumaroylquinic acid (B), chlorogenic acid (C), sinapic acid (D)); bound cell wall phenolic acids (right column: coumaric acid (E), ferulic acid (F)) measured in healthy part of the fruit and fruit susceptibility of the fruit to fruitlet core rot. The x-axis	

integrates the representativeness of each class of phenolic compounds of all the plots. The y-axis integrates the percentage of each disease severity class.....	- 49 -
Figure 14 Distribution of isolated fungi genera across the island. Orange color of the pie chart symbolizes the <i>Fusarium</i> genus and green color <i>Talaromyces stollii</i> . The size of pie chart is proportional to the number of fungi isolated per geographical area.	- 64 -
Figure 15 Maximum Likelihood tree calculated using PhyML, based on translation elongation factor 1 α gene (tef-1 α) sequences showing the relationships among <i>Fusarium ananatum</i> and related species. <i>Fusarium solani</i> was chosen as out-group. Bootstrap values (percentages of 100 bootstrap replicates) are indicated in brackets above the branches of the tree. Model selected: TN93 +G, alignment 709 bp.	- 65 -
Figure 16 Maximum Likelihood tree calculated using PhyML, based on internal transcribed spacer (ITS) sequences showing the relationships among <i>Talaromyces stollii</i> and related species. <i>Talaromyces dendriticus</i> was chosen as out-group. Bootstrap values (percentages of 100 bootstrap replicates) are indicated in brackets above the branches of the tree. Model selected: TN93, alignment 623 bp.....	- 66 -
Figure 17 Superficie moyennes à 7 jours post-inoculation des taches causées par différentes souches de champignons inoculés dans le parenchyme de fruits à plusieurs concentrations (n = 20). (2) <i>F. oxysporum</i> ; (7) <i>T. stollii</i> ; (14) <i>F. ananatum</i>	- 78 -
Figure 18 Hierarchical clustering analysis of metabolites in samples obtained from healthy and infected fruitlets of 'MD2' and 'Queen' cultivars. Yellow highlighting indicates high levels of metabolites and red highlighting indicates low levels of metabolites.....	90
Figure 19 Evolution of <i>p</i> -coumaroylisocitrate (A), caffeoylisocitrate (B) and hydroxybenzoic acids (C) after inoculation with <i>Fusarium ananatum</i> in infected fruitlets of the 'MD-2' resistant cultivar (■), 'Flhoran 53' tolerant cultivar (x) and the 'Queen' susceptible cultivar (•). Data points are means of 12 infected fruitlets.....	91
Figure 20 Evolution of <i>p</i> -coumaroylisocitrate (A), caffeoylisocitrate (B) and hydroxybenzoic acids (C) in healthy fruitlets during fruit ripening beginning at the green maturity stage (G) to fruit maturity (C4) for the 'MD-2' resistant cultivar (■), 'Flhoran 53' tolerant cultivar (x) and the 'Queen' susceptible cultivar (•). Data points are means of three fruits.	92
Figure 21 Evolution of <i>p</i> -coumaroylisocitrate (A), caffeoylisocitrate (B) and hydroxybenzoic acids (C) in H ₂ O inoculated fruitlet of the 'MD-2' resistant cultivar (■),	

'Flhoran 53' tolerant cultivar (x) and the 'Queen' susceptible cultivar (•). Data points are means of 12 infected fruitlets.....	93
Figure 22 Black spot growth in the infected fruitlet after <i>Fusarium ananatum</i> inoculation. Vertical bars represent standard error of means (n = 9). Different letters indicate that data are significantly different at $P < 0.05$ between days after inoculation (according to Tukey's multiple comparison test).....	107
Figure 23 Transversal section of inoculated pineapple (10 dai) with healthy fruitlet (), adjacent infected fruitlet () and infected fruitlets () coupled with the HPLC-DAD chromatograms (320 nm) of free phenolic acids in the healthy fruitlet and infected fruitlet.	107
Figure 24 Ascorbic acid evolution after inoculation of <i>Fusarium ananatum</i> in pineapple control fruit (•), healthy fruitlet (▽), adjacent infected fruitlet (x) and infected fruitlet (■). Vertical bars represent standard error of means (n = 9). Differences of ascorbic acid level between sampled fruitlets were significant at $P < 0.01$ (***) for each sampling date.	108
Figure 25 Evolution of <i>p</i> -coumaroylquinic acid (A), chlorogenic acid (B), sinapic acid (C) and hydroxybenzoic acids (D) after inoculation with <i>Fusarium ananatum</i> in pineapple control fruit (•), healthy fruitlet (▽), adjacent infected fruitlet (x) and infected fruitlet (■). Vertical bars represent standard error of means (n = 9 for healthy, adjacent and infected fruitlets; n = 3 for control fruit). HBA = sum of hydroxybenzoic acids (expressed in GAE). Differences of phenolic acids level between sampled fruitlets were either significant at $P < 0.05$ (**) or $P < 0.01$ (***), or non-significant (NS) for each sampling date.	109
Figure 26 ACP des données métabolomiques réalisée sur les combinaisons de facteurs Cultivar x Maturité x Infection. Les axes 1 et 2 expliquent 31 et 28% de la variabilité respectivement. Les modalités Témoin et Sain de la variable Infection ont été fusionnées ensemble car elles se superposaient sur l'ACP globale.	121
Figure 27 Ratios logarithmiques des concentrations moyennes des métabolites dans les fruits matures. Les barres positives indiquent les métabolites qui sont plus abondant dans le numérateur. Les barres noires indiquent des différences significatives avec $P < 0.001$ (Fruits sains n=10 ; fruits tachés n=8)	123

Figure 28 Classification hiérarchique des 30 métabolites identifiés par LC-MS en fonction de leurs concentrations, selon la méthode de Ward sur les données normalisées (log). - 124 -

Figure 29 Evolution des concentrations en phénylalanine, diferuloylspermidine et certaines familles de métabolites au cours de la maturation dans les fruits sains du cultivar résistant 'MD-2' en comparaison avec le cultivar sensible 'Queen'. Chaque famille est représentée par la moyenne des aires normalisées. Chaque cellule représente la concentration moyenne relative d'une famille de métabolite pour une date d'échantillonnage par rapport aux autres dates d'échantillonnages (n=5 ; transformation logarithmique des données). - 125 -

Figure 30 3D reconstructed dataset visualizing transverse section of pineapple fruit. (A) Fruitlets. (B) Blossom cup; black arrows indicate imperfect fusions between sepals. Bc, blossom cup; Lo, locule; O, ovule; Se, sepal (scale bar = 1 cm) - 145 -

Figure 31 Scanning electron microscopy images of natural fungal colonization of the asymptomatic blossom cup of 'MD2' and 'Queen', respectively the resistant and susceptible cultivar to pineapple fruitlet core rot disease. Image (A) represents the sparse mycelial network of 'MD-2' blossom cup; (B) the dense mycelial network in 'Queen'; (C) conidia with ellipsoidal shape dispersed in 'MD-2' cultivar; and (D) displays conidia with fusiform shape into 'Queen' blossom cup - 146 -

Figure 32 Fruitlet cross section observed with an epifluorescence microscope of (A) 'MD-2' resistant pineapple cultivar and (B) 'Queen' susceptible cultivar (filter exc: 340–380 nm, em: 425–800 nm) (scale bar = 1000 µm). The close-up rendering illustrates spectral merged images of the lining cell wall composition of blossom cup observed with a multiphoton microscope, using four reference emission spectra compounds: ferulic acid = green color; *p*-coumaric acid = blue color; sinapic acid = yellow color; caffeoylquinic acid = red color (scale bar = 50 µm) - 147 -

Figure 33 Autofluorescence images of the ovary in a cross section of pineapple fruits observed with an epifluorescence microscope (filter exc: 340–380 nm, em: 425–800 nm) in (A) 'MD-2' resistant cultivar and (B) 'Queen' susceptible cultivar; white arrows indicate carpel margin; white ellipses indicate septal nectaries; Lo, locule - 148 -

Figure 34 Multiphoton microscopic images showing colonization pattern of *Fusarium ananatum* stained with methyl blue in parenchyma of resistant fruitlet pineapple cultivar 'MD-2' (left column) and susceptible cultivar 'Queen' (right column). Images (A, B) show

interparietal hyphae progression at two days post-inoculation; (C, D) Four days post-inoculation the thick-walled cells barrier block hyphae progression in 'MD-2' (C), hyphae continue to develop in 'Queen' parenchyma (D); (E, F) At 6 dpi, hyphae bypass the lining limit in 'MD-2' (E) and continue to develop in 'Queen' parenchyma (F); (G, H) 3D reconstructed Z-stack images of hyphae progression in pineapple fruit parenchyma at four days post-inoculation. (exc: laser IR 720 nm, em: channel 435–485 nm in blue, channel 670–700 nm in red)..... - 150 -

Figure 35 Evolution of septal nectary cell wall histochemical composition following *Fusarium ananatum* inoculation in 'MD-2' resistant pineapple. (A): Spectral image of septal nectary before inoculation. (B, C): Histochemical composition of septa nectaries at different levels two days post-inoculation. Merged images (A, B and C) were splitted into four base images (1, 2, 3, and 4). The close-up (1) illustrates histolocalization of caffeoylquinic acid; (2) ferulic acid; (3) *p*-coumaric acid and (4) sinapic acid. - 151 -

Figure 36 Evolution of cell wall-bound ferulic acid (A, C) and *p*-coumaric acid (B, D) and in 'Queen' (●) and 'MD-2' (■) pineapple fruits; in infected fruitlets after *F. ananatum* inoculation (A, B) and in healthy fruits during natural ripening (C, D). Vertical bars represent standard error of means (n = 4 for healthy fruitlets and n = 3 for infected fruitlets). Differences between sampled fruitlets were either significant at $p < 0.05$ (**) or $p < 0.01$ (***), or non-significant (NS) for each sampling date. - 152 -

Liste des tableaux

Tableau 1 Principales classes de composés phénoliques.....	- 33 -
Tableau 2 Mineral composition of the crown of pineapple (n = 27)	- 50 -
Tableau 3 List of the <i>Fusarium</i> strains included in the phylogenetic analyses; their geographical origin, host plant species, sampling area, altitude and amounts of fumonisins (FB1–FB2) and beauvericin (BEA) synthesized in pineapple juice agar medium (PJA) ($\mu\text{g kg}^{-1}$) for the Reunion Island isolates.....	- 67 -
Tableau 4 List of the <i>Talaromyces</i> strains included in the phylogenetic analyses; their geographical origin, host plant species, sampling area and altitude.....	- 72 -
Tableau 5 Amounts of fumonisins (FB1–FB2) and beauvericin (BEA) produced in different media (GYAM, PJA, PDA) amended in phenolic acids by three isolates (<i>F. proliferatum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. ananatum</i>).....	- 74 -
Tableau 6 Effect <i>in vitro</i> of phenolic acids and ascorbic acid at different concentrations on the mycelial growth of <i>Fusarium ananatum</i>	110
Tableau 7 Effect <i>in vivo</i> of coumaric, chlorogenic and gallic acids on the black spot disease severity.....	111
Tableau 8 Supplementary data Mean concentrations of the free phenolic acids in different part of the pineapple fruit at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 days after inoculation of <i>Fusarium ananatum</i>	112
Tableau 9 Caractérisation par LC-TOF-MS des métabolites isolés de fruits d'ananas (<i>Ananas comosus</i> [L.] Merr.)	118
Tableau 10 Poids des fruits, acidité totale titrable (TTA) et extrait sec soluble (TSS) dans la pulpe des cultivars 'MD-2' et 'Queen', selon le stade de maturité. Les valeurs sont des moyennes \pm se (n = 12).....	- 126 -

RÉSUMÉ

La maladie de la tache noire affecte les fruits d'ananas mature, les rendant impropre à la consommation. Actuellement, aucune méthode de contrôle n'est disponible pour cette maladie. Une meilleure connaissance du pathosystème est nécessaire pour trouver des moyens de lutte efficaces.

Des entretiens et échantillonnages menés auprès de producteurs durant l'hiver austral révèlent une prévalence de la maladie de 74%. Les champignons pathogènes appartiennent à plusieurs espèces : *Fusarium ananatum* (72% des isolats), *Talaromyces stollii* (21%), *F. oxysporum* (6%) et *F. proliferatum* (1%). Leur potentiel toxigène a été déterminé, les champignons du genre *Fusarium* ont produit des mycotoxines identifiées comme les fumonisines FB₁, FB₂ et la beauvericine. Sur un milieu de culture ananas, une concentration en beauvericine de 34959 µg kg⁻¹ a été mesurée pour l'espèce *F. proliferatum*.

Une méthode d'inoculation de *Fusarium ananatum* directement dans le parenchyme a permis de décrire la réponse biochimique du fruit. La voie des phénylpropanoïdes est sollicitée, particulièrement avec l'élicitation du caffeoylisocitrate et du coumaroylisocitrate dans la zone infectée. Une comparaison des profils métaboliques montre que la réponse du fruit à une inoculation est plus importante chez le cultivar résistant 'MD-2' que chez le cultivar sensible 'Queen'. La majorité des métabolites élicités par l'attaque sont déjà présents dans les fruits sains matures de la variété résistante. Le potentiel antifongique des composés phénoliques a été évalué. Les acides coumarique, caféoylquinique et férulique inhibent la croissance du mycélium à des concentrations similaires à celle trouvées dans les fruits infectés.

Une approche par imagerie a permis de caractériser l'anatomie des fruits des deux cultivars et notamment la fusion imparfaite des sépales et bractée chez le cultivar sensible 'Queen'. Les nectaires et les parois carpellaires jouent un rôle clef dans le processus d'infection et de colonisation de *Fusarium ananatum*.

Mots clefs : maladie de la tache noire, *Fusarium ananatum*, *Talaromyces stollii*, ananas

Fruitlet core rot (FCR) disease affects the fruits of mature pineapples. Current disease controls are not available. A deeper knowledge of the pathosystem is needed to find an effective means of control FCR.

A diagnostic survey conducted with producers during the southern winter revealed a prevalence of the disease of 74%. Pathogenic fungi belong to several species: *Fusarium ananatum* (72% isolates), *Talaromyces stollii* (21%), *F. oxysporum* (6%) and *F. proliferatum* (1%). Their toxinogenic potential was determined. *Fusarium* fungi produced mycotoxins identified as fumonisins FB₁, FB₂ and beauvericin. On a pineapple culture medium, a concentration of beauvericine of 34959 µg kg⁻¹ was measured for the species *F. proliferatum*.

A method of inoculating *Fusarium ananatum* directly into the parenchyma allowed to describe the biochemical response of the fruit. The phenylpropanoids pathway is involved, particularly with the elicitation of caffeoylisocitrate and coumaroylisocitrate in the infected zone. A comparison of the metabolic profiles shows that the response to inoculation of resistant cultivar 'MD-2' is higher than in the sensitive cultivar 'Queen'. Most of the metabolites elicited by the attack are already present in healthy mature fruits of the resistant variety. The antifungal potential of the phenolic compounds was evaluated. Coumaric, caffeoylquinic and ferulic acids inhibit mycelial growth at concentrations similar to those found in infected fruits.

An imaging approach allowed to characterise the anatomy of the fruits of the two cultivars especially imperfect sepal and bract fusion in susceptible cultivar 'Queen' and to identify the key roles played by nectaries and carpel margins in the infection and colonization process of *Fusarium ananatum*.

Keywords: Fruitlet core rot disease, *Fusarium ananatum*, *Talaromyces stollii*, pineapple

ABSTRACT