

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Évaluation du risque d'introduction du complexe viral dit du « Wilt » de l'ananas via des vitro-plants d'ananas dans les départements d'outre-mer

Rapport d'appui scientifique et technique

Septembre 2015

Édition scientifique



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Évaluation du risque d'introduction du complexe viral dit du « Wilt » de l'ananas via des vitro-plants d'ananas dans les départements d'outre-mer

Rapport d'appui scientifique et technique

Septembre 2015

Édition scientifique

**Demande d'appui scientifique et technique pour
l'évaluation du risque d'introduction du complexe viral dit
du « Wilt de l'ananas » ou *Pineapple mealybug wilt-
associated closterovirus (PMWaV)* via des vitro-plants
d'ananas en Guadeloupe, Martinique, Guyane, Mayotte et
La Réunion**

Demande « 2015-SA-0026 PMWaV »

RAPPORT
d'appui scientifique et technique

ÉTUDE

« Comité d'experts spécialisé Risques Biologiques pour la Santé des Végétaux »

Septembre 2015

Mots clés

Pineapple mealybug wilt associated virus, PMWaV, Ananas, Vitro-plants, Risque d'introduction, Guadeloupe, Martinique, Guyane, Mayotte, La Réunion

Présentation des intervenants

PREAMBULE : Les experts externes, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

RAPPORTEURS

M. Thierry CANDRESSE – Directeur de Recherche INRA Bordeaux, Virologue

M. Bruno HOSTACHY – Responsable de l'unité Ravageurs et agents pathogènes tropicaux (Anses-LSV), Phytopathologiste

M. Alain SOLER – Cadre CIRAD Martinique, Agronome de la culture de l'ananas

COMITE D'EXPERTS SPECIALISE

- CES Risques Biologiques pour la Santé des Végétaux

Président

M. Philippe REIGNAULT – Professeur des universités, Université du Littoral Côte d'Opale, Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant

Membres

M. Claude ALABOUVETTE – Retraité (INRA)

Mme. Marie-Hélène BALESDENT – Chargé de recherche, INRA de Versailles-Grignon, UR BIOlogie et GESTion des Risques en agriculture

M. Philippe CASTAGNONE – Directeur de recherche, INRA PACA, Institut Sophia Agrobiotech

M. Bruno CHAUVEL – Chargé de recherche, INRA de Dijon, UMR Agroécologie

M. Nicolas DESNEUX – Chargé de recherche, INRA PACA, Institut Sophia Agrobiotech

Mme Marie-Laure DESPREZ-LOUSTAU – Directrice de recherche, INRA de Bordeaux, UMR Biodiversité, Gènes et Communautés

M. Abraham ESCOBAR-GUTIERREZ – Chargé de recherche, INRA de Lusignan, UR Pluridisciplinaire Prairies et Plantes Fourragères

M. Laurent GENTZBITTEL – Professeur des universités, École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Laboratoire Écologie Fonctionnelle et Environnement

M. Hervé JACTEL – Directeur de recherche, INRA de Bordeaux, UMR Biodiversité, Gènes & Communautés

M. Thomas LE BOURGEOIS – Directeur de recherche, CIRAD, UMR botAnique et bioInforMatique de l'Architecture des Plantes

M. Xavier NESME – Ingénieur de recherche, INRA, UMR 5557 Écologie microbienne

M. Pierre SILVIE – Chargé de recherche, IRD mis à disposition du CIRAD, UR AÏDA

M. Stéphan STEYER – Attaché scientifique, Centre wallon de Recherches Agronomiques, Département Sciences du Vivant, Unité Biologie des nuisibles et biovigilance

M. Frédéric SUFFERT – Ingénieur de recherche, INRA de Versailles-Grignon, UR BIOlogie et GEstion des Risques en agriculture

Mme Valérie VERDIER – Directrice de recherche, IRD, UMR Résistance des Plantes aux Bioagresseurs

M. Éric VERDIN – Ingénieur de recherche, INRA, Unité de pathologie végétale d'Avignon

M. François VERHEGGEN – Enseignant-chercheur, Université de Liège - Faculté de Gembloux Agro-Bio Tech, Unité Entomologie fonctionnelle et évolutive

M. Thierry WETZEL – Directeur du laboratoire de Virologie Végétale, RLP Agrosience, AIPlanta – Institute for Plant Research

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. Xavier TASSUS – Coordinateur scientifique – Unité Expertise Risques Biologiques pour la Santé des Végétaux – Anses

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	6
Liste des figures	6
Liste des tableaux	6
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la demande	7
1.1 Contexte	7
1.2 Objet de la demande	7
2 Risque d'introduction du Pineapple mealybug wilt associated virus (PMWaV) via les vitro-plants d'ananas	8
2.1 La maladie du « wilt » de l'ananas	8
2.1.1 Les symptômes de la maladie du « wilt » de l'ananas	8
2.1.2 Rôle des cochenilles et des fourmis dans la maladie du « wilt de l'ananas »	9
2.1.3 La recherche du ou des virus associés à la maladie du « wilt ».....	10
2.1.3.1 Les Closteroviridae du complexe MWD	10
2.1.3.2 Les <i>Badnavirus</i>	11
2.1.3.3 Transmission par insecte vecteur.....	11
2.1.3.4 Distribution géographique des <i>Ampelovirus</i> du complexe PMWaV.....	11
2.1.3.5 Distribution géographique des <i>Badnavirus</i> du complexe PMWaV.....	13
2.1.4 Étiologie de la maladie du « wilt »	13
2.2 Évaluation du risque d'avoir des lots de vitro-plants d'ananas porteurs de virus	14
2.2.1 La culture <i>in vitro</i> d'ananas	14
2.2.2 Cas concret d'assainissement de plants d'ananas infecté par des virus par l'utilisation de la culture <i>in vitro</i>	15
2.3 Méthodes analytiques disponibles pour indexer les plantes mères et contrôler les lots de vitroplants	16
3 Conclusion	18
4 Bibliographie.....	19
4.1 Publications	19
4.2 Normes	21
4.3 Législation et réglementation	21
ANNEXES	23
Annexe 1 : Lettre de la demande	24
Annexe 2 : Suivi des actualisations du rapport	26

Sigles et abréviations

ARN : Acid Ribonucleic

CIV : culture *in vitro*

DAAF : Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt

DOM : Département d'Outre-Mer

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ePRV : *endogenous Pineapple pararetrovirus*

IC-RT-PCR : Immunocapture Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

MWD : Mealybug Wilt Disease

NGS : Next Generation Sequencing

PBV : *Pineapple bacilliform virus*

PBCOV : *Pineapple bacilliform comosus virus*

PBERV : *Pineapple bacilliform erectifolius virus*

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCV : *Pineapple closterovirus*

PMWaV : *Pineapple Mealybug Wilt associated Virus*

RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

USDA : United States Department of Agriculture

Liste des figures

Figure 1 : Cycle d'infection du PMWaV _____ 9

Figure 2 : Association symbiotique entre les colonies de cochenilles et les fourmis (Marie Darnaudery, CIRAD Réunion) _____ 10

Liste des tableaux

Tableau 1 : Distribution géographique des virus complexe du PMWaV _____ 12

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la demande

1.1 Contexte

La Direction générale de l'alimentation a été interpellée par la Direction de l'alimentation de l'agriculture et de la forêt (DAAF) de Guadeloupe pour une demande d'introduction de vitro-plants d'ananas d'origine israélienne.

Dans un contexte de déficit de plants d'ananas locaux, l'utilisation de vitro-plants permettrait d'améliorer la production d'ananas très déficitaire en Guadeloupe. C'est pourquoi, la filière sollicite la possibilité de recourir à l'introduction de vitro-plants d'ananas qui seraient sevrés et grossis par des pépiniéristes à l'instar de ceux qui s'occupent des vitro-plants de bananiers importés.

Si les atouts agronomiques et sanitaires escomptés vis-à-vis des nématodes, bactéries, champignons et insectes sont indubitables via la production de vitro-plants d'ananas, il reste le risque d'introduction du complexe viral dit de la maladie du « Wilt de l'ananas », causée entre autre par les *Pineapple mealybug wilt associated virus* (PMWaV). De plus, l'arrêté du 3 septembre 1990 modifié relatif au contrôle sanitaire des végétaux et plus particulièrement ses annexes V et VI (végétaux ou produits végétaux dont l'introduction est interdite) précisent que pour les provenances autorisées (Hawaï, République Dominicaine, Martinique et Guadeloupe), les plants et boutures d'ananas doivent être issues de zones indemnes de toutes maladies à virus (Tomato spotted wilt virus (TSWV) et virus associés de la Mealybug Wilt Disease (MWD)).

Un élargissement du champ de cette réflexion est demandé aux autres départements d'outre-mer (DOM) : Martinique, Guyane et La Réunion, pour lesquels cette problématique est également importante.

1.2 Objet de la demande

Dans ce contexte, la Direction générale de l'alimentation demande à l'Anses d'évaluer le risque d'introduction du PMWaV via les vitroplants d'ananas et préciser les méthodes d'analyses et leurs critères de performance, en particulier selon des principes immunologiques.

2 Risque d'introduction du *Pineapple mealybug wilt associated virus* (PMWaV) via les vitro-plants d'ananas

2.1 La maladie du « wilt » de l'ananas

La maladie du dépérissement de l'ananas communément appelée « wilt » de l'ananas (Mealybug wilt disease, MWD) est une maladie importante de l'ananas retrouvée à travers le monde. Celle-ci a été décrite pour la première fois à Hawaï en 1910 (German *et al.*, 1992) où elle a entraîné des pertes de rendement de fruits variant de 30 à 35 % en fonction de l'âge de la plante au moment de l'apparition des symptômes de la maladie (Sether et Hu, 2002a). Une première hypothèse a attribué, il y a plus de cinquante ans, les symptômes de la MWD à un relargage de phytotoxine par la plante lors des attaques de cochenilles (Carter, 1933 a et b ; 1945 a et b ; Carter et Collins, 1947 ; Illingworth, 1931). D'autre part, l'identification de plantes symptomatiques et asymptomatiques comme source de la MWD a conduit à proposer la présence d'un facteur latent comme origine de la maladie (Ito, 1959). La transmission de la maladie par un vecteur de type « insecte » a ensuite été observée à partir de plantes infectées incluant des pieds mères et des plantes issues de leur multiplication végétative. Carter (1963) confirma que la maladie était causée par un agent transmissible qui était probablement un virus inconnu. Il suggéra également que les cochenilles en plus d'être le vecteur du pathogène avaient un rôle dans le développement de la MWD en rendant la plante plus sensible à la maladie de part le stress causé par l'insecte au moment où il se nourrit. Ensuite, des virus appartenant à la famille des *Closteroviridae* (genre *Ampelovirus*) et des *Caulimoviridae* ont été identifiés sur des plants d'ananas (German *et al.*, 1992 ; Hu *et al.*, 1996 et 1997 ; Sether *et al.*, 2001 ; Sether *et al.*, 2005 a et b ; Thomson *et al.*, 1996 ; Wakman, 1994 et Wakman *et al.*, 1995). L'ensemble de ces informations tend à soutenir l'hypothèse actuelle selon laquelle la MWD aurait une origine multifactorielle associée à la fois à des attaques de cochenilles (par exemple *Dysmicoccus brevipes*) et à la présence d'un ou de plusieurs virus (Jahn *et al.*, 2003).

2.1.1 Les symptômes de la maladie du « wilt » de l'ananas

La MWD progresse en 4 étapes : (i) le rougissement des feuilles, (ii) les feuilles passent de la couleur rouge à rose, (iii) le bord des feuilles s'enroule vers le bas et (iv) les feuilles perdent leur turgescence, tombent et les plantes dépérissent (Carter, 1945a) (fig.1). À l'étape finale du dépérissement, les feuilles sont complètement desséchées. Avant l'apparition des symptômes sur les feuilles, l'élongation des racines est stoppée et les racines meurent (Carter, 1962 et 1963).

Les symptômes de la maladie peuvent varier en fonction de la variété et du niveau naturel d'anthocyanes dans les feuilles. Pour les variétés avec un faible niveau d'anthocyanes, un jaunissement est observé alors que des symptômes typiques de rougissement sont associés en particulier à la variété Cayenne lisse « smooth Cayenne » (Carter, 1963).

Le développement de la maladie et son incidence sont affectés par l'âge de la plante lors de l'apparition des infestations de cochenilles. Les jeunes plantes présentent des symptômes plus tôt après leur infestation que des plants plus âgés (Carter, 1945b). Ainsi, l'impact de la MWD sur le rendement peut être plus important sur des cultures qui sont infestées précocement durant leur cycle végétatif.

S'ils restent indemnes de cochenilles, des plants d'ananas infectés par la MWD peuvent « récupérer » et produire de nouvelles feuilles asymptomatiques mais resteront un réservoir pour

le ou les virus suspecté(s), qui pourront à nouveau être transmis à d'autres plants (Carter, 1945b). Le phénomène de « récupération » est toujours associé à l'apparition de nouvelles racines (Carter, 1962, 1963) (fig. 1).

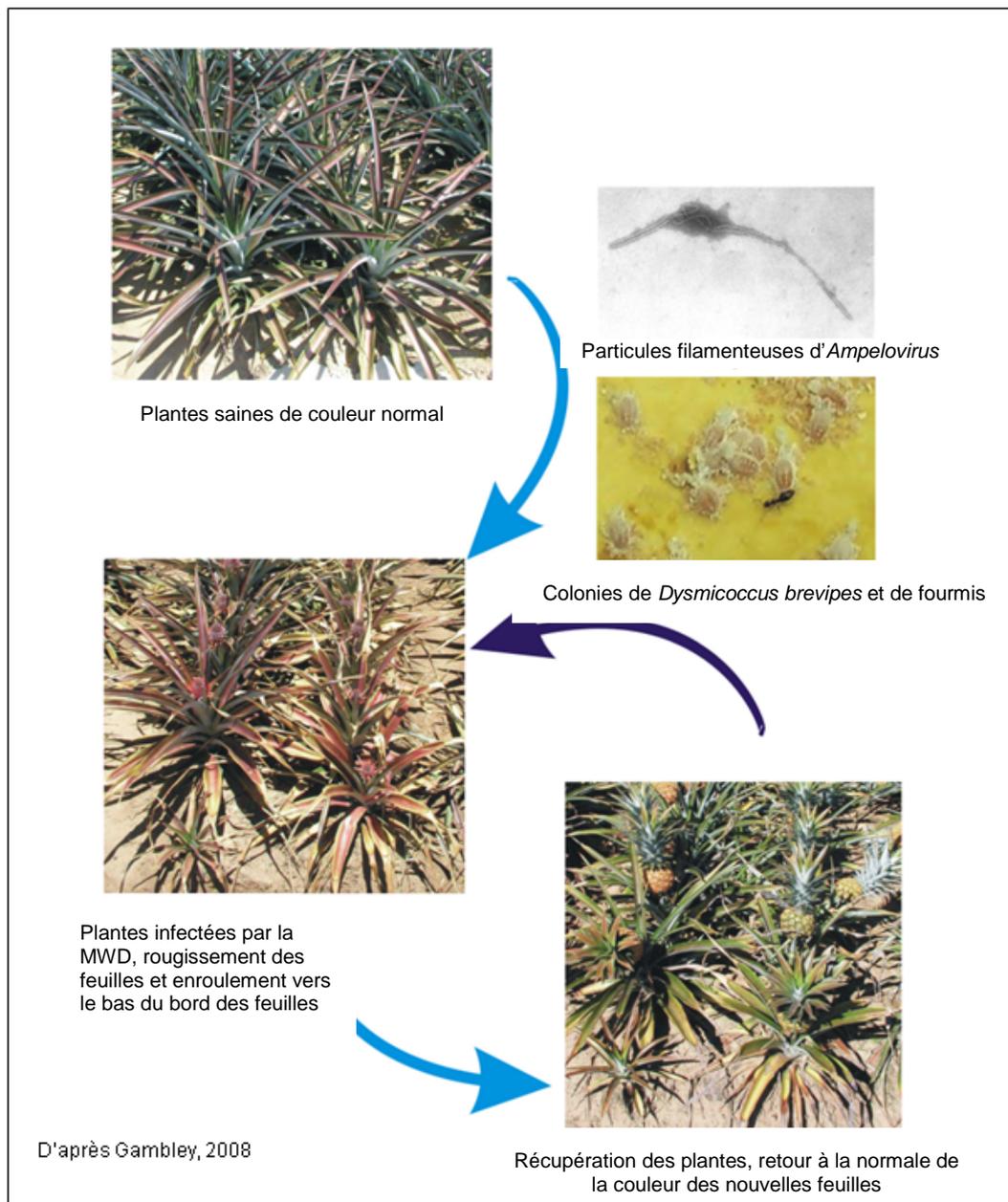


Figure 1 : Cycle d'infection du PMWaV

2.1.2 Rôle des cochenilles et des fourmis dans la maladie du « wilt de l'ananas »

Trois espèces de cochenilles de la famille des *Pseudococcidae* sont associées à la MWD : *Dysmicoccus brevipes*, *Dysmicoccus neobrevipes* et *Pseudococcus longispinus* (Carter, 1933a ; German *et al.*, 1992). *D. brevipes* et *D. neobrevipes* ont des traits d'histoire de vie similaires. Leur durée de vie est comprise entre 90 et 94 jours pendant laquelle ces cochenilles passent par trois stades de développement. Ce processus dure environ 34 jours (Ito, 1938). *Pseudococcus longispinus* a une durée de vie d'environ 60 à 92 jours en fonction des conditions climatiques. Cette cochenille compte 3 stades de développement et ce processus dure environ 1 mois (Cox, 1979). La présence de cochenilles dans les cultures d'ananas est étroitement associée à l'extériorisation des symptômes de la MWD. *Dysmicoccus brevipes* est présent à La Réunion, en

Guyane, Guadeloupe et Martinique, *Dysmicoccus neobrevipes* à La Réunion (un unique signalement en 2012) et *Pseudococcus longispinus* à la Réunion, en Guadeloupe, Martinique et à Mayotte (comm pers. J.-F Germain).

Hormis les désagréments pour les ouvriers agricoles, la présence de fourmis du genre *Pheidole* et *Solenopsis* dans les cultures d'ananas n'est pas un problème en lui-même mais leur association symbiotique avec les colonies de cochenilles (fig. 2) pourrait jouer un rôle indirect dans le développement de la MWD. Ces fourmis largement distribuées dans le monde, fournissent aux cochenilles une protection contre leurs prédateurs et leurs parasites et en retour consomment le miellat sécrété par les cochenilles (Rohrbach *et al.*, 1988). Leur action peut conduire à une augmentation des populations de cochenilles et donc à une sévérité plus grande de la maladie (Jahn *et al.*, 2003).



Figure 2 : Association symbiotique entre les colonies de cochenilles et les fourmis (Marie Darnaudery, CIRAD La Réunion)

2.1.3 La recherche du ou des virus associés à la maladie du « wilt »

2.1.3.1 Les *Closteroviridae* du complexe de la MWD

En 1989, des particules virales filamenteuses typiques de la famille des *Closteroviridae* et des ARN double-brin, qui sont une forme intermédiaire de la réplication virale, ont été identifiés à partir de plants d'ananas atteint de MWD (German *et al.*, 1992). Le virus ainsi identifié a été nommé pineapple closterovirus (PCV) (Ullman *et al.*, 1989 ; Wakman *et al.*, 1995 et Hu *et al.*, 1996). Des anticorps monoclonaux et polyclonaux ont alors été développés à partir d'isolats du PCV provenant d'Australie et de Hawaï et des tests de détection sérologique ont permis sa mise en évidence sur des plants d'ananas en provenance d'Australie, de France, de Malaisie et de Taïwan (Wakman, 1994). Le PCV a aussi été détecté sur *Ananas comosus* var. *bracteatus* (Wakman, 1994 et Hu *et al.*, 1997), *A.comosus* var. *ananassoides* (Hu *et al.*, 1997) et dans des cochenilles prélevées à partir de plants symptomatiques (pas de détection à partir de cochenilles prélevées sur des plants asymptomatiques) (Hu *et al.*, 1996).

Deux sérotypes différents de PCV ont été caractérisés en Australie et à Hawaï, sur la base de l'utilisation d'anticorps polyclonaux (Wakman *et al.*, 1995) et monoclonaux (Hu *et al.*, 1996). La poursuite de la caractérisation du génome de ces virus a graduellement révélé l'existence de quatre *Ampelovirus* distincts sur des plants d'ananas provenant de Hawaï (Sether *et al.*, 2001 ; Sether *et al.*, 2005a et Sether *et al.*, 2005b). Les virus ont alors été nommés *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* (PMWaV-1), -2 (PMWaV-2), -3 (PMWaV-3) et -4 (PMWaV-4). Les PMWaV-

1 et -2 sont des synonymes des deux sérotypes de PCV identifiés précédemment à Hawaï (Hu *et al.*, 1996 et Sether *et al.*, 2001). Enfin, des données de séquence très partielles obtenues à partir d'ananas Australiens ont suggéré l'existence d'un *Pineapple mealybug wilt-associated virus 5* (PMWaV-5, Gambley *et al.*, 2008). Les comparaisons de séquences et les analyses phylogénétiques indiquent que le PMWaV-3 et -5 sont des espèces distinctes plus proches du PMWaV-1 et plus lointainement reliées au PMWaV-2 (Sether *et al.*, 2005a et Gambley, 2008). Tous ces virus sont étroitement liés génétiquement aux virus transmis par cochenilles de la famille des *Closteroviridae* (genre *Ampelovirus*) (Hu *et al.*, 2000 ; Melzer *et al.* ; 2001 ; Sether *et al.*, 2005a et Sether *et al.*, 2005b).

2.1.3.2 Les *Badnavirus*

Une espèce appartenant très vraisemblablement au genre *Badnavirus* dans la famille des *Caulimoviridae* a également été détectée sur ananas en Australie et à Hawaï (Sether et Hu, 2002b et Wakman *et al.*, 1995). Ce virus, nommé *Pineapple bacilliform virus* (PBV), est sérologiquement relié à d'autres *Badnavirus* et sa séquence nucléotidique partielle a permis de confirmer qu'il s'agit d'un agent nouveau jusqu'à présent inconnu (Thomson *et al.*, 1996). Les *Badnavirus* sont principalement transmis par cochenilles mais le vecteur du PBV n'a pas été identifié et le rôle potentiel de ce virus dans le développement de la MWD reste inconnu. Les travaux de Gambley (2008) ont permis de montrer que le PBV initialement identifié comme appartenant au genre *Badnavirus* était en fait plus proche d'espèces de la famille des *Metaviridae*. Dans la même étude, deux nouvelles espèces de *Badnavirus* ont été mises en évidence et respectivement nommées *Pineapple bacilliform comosus virus* (PBCOV) et *Pineapple bacilliform erectifolius virus* (PBERV). Ces deux virus sont transmis par *Dysmicoccus brevipes* et le PBCOV également par *Planococcus citri*. Une troisième séquence de *Caulimoviridae*, non dérivée d'un ADN encapsidé mais plus probablement issue d'un événement d'intégration dans le génome de l'ananas (forme endogène) a aussi été identifiée (Gambley, 2008). Elle a été nommée *endogenous Pineapple pararetrovirus-1* (ePPRV-1). On ne dispose actuellement d'aucune indication sur la contribution éventuelle de l'un ou l'autre de ces différents agents à la MWD ni, de façon plus large, sur leur contribution à tout syndrome pathologique chez l'ananas.

2.1.3.3 Transmission par insecte vecteur

L'association entre les cochenilles et la MWD a été signalée pour la première fois en 1933 (Carter, 1933a). Depuis, *D. brevipes* et *D. neobrevipes* ont montré leur capacité à transmettre les PMWaV-1, -2 et -3 (Sether *et al.*, 1998 ; Sether *et al.*, 2001 et Sether *et al.*, 2005a). Le second stade nymphal de la femelle de *D. neobrevipes* transmet le PMWaV-1 avec la plus grande efficacité alors que les post-larves qui donneraient des femelles sont incapables d'acquérir le virus (Sether *et al.*, 1998). L'efficacité de transmission a également été trouvée plus importante quand des groupes de 10, 20 ou 40 *D. neobrevipes* ont été utilisés pour l'inoculation en comparaison avec des groupes de 5 individus (Sether *et al.*, 1998). Il n'y a actuellement pas d'information sur une éventuelle transmission par cochenilles des PMWaV-4 et -5.

Il n'y a actuellement pas d'informations sur la transmission éventuelle des *Badnavirus* de l'ananas par des insectes vecteurs. Cependant, de nombreux *Badnavirus* sont transmis par des cochenilles et on ne peut donc pas rejeter l'hypothèse que les virus de l'ananas soient vectés par cochenille et, potentiellement, par les mêmes espèces que celles transmettant les virus du complexe PMWaV.

2.1.3.4 Distribution géographique des *Ampelovirus* du complexe PMWaV

Les virus du complexe du PMWaV ont une distribution mondiale en étant présents sur 5 continents (Asie, Afrique, Amérique du Nord et du sud ainsi qu'en Europe). Ces virus n'ont pas été recherchés en Guadeloupe et en Martinique mais leur présence a été identifiées dans l'arc antillais à Puerto Rico ainsi qu'en Guyane et au Brésil. Ils n'ont pas non plus été recherchés à La Réunion et Mayotte mais sont connus à Maurice.

La réalisation d'une enquête épidémiologique dans les DOM concernés par cette saisine devrait permettre de préciser leur statut indemne ou infecté vis-à-vis de l'ensemble des agents viraux potentiellement impliqués dans la MWD. (virus du complexe PMWaV et *Badnavirus*).

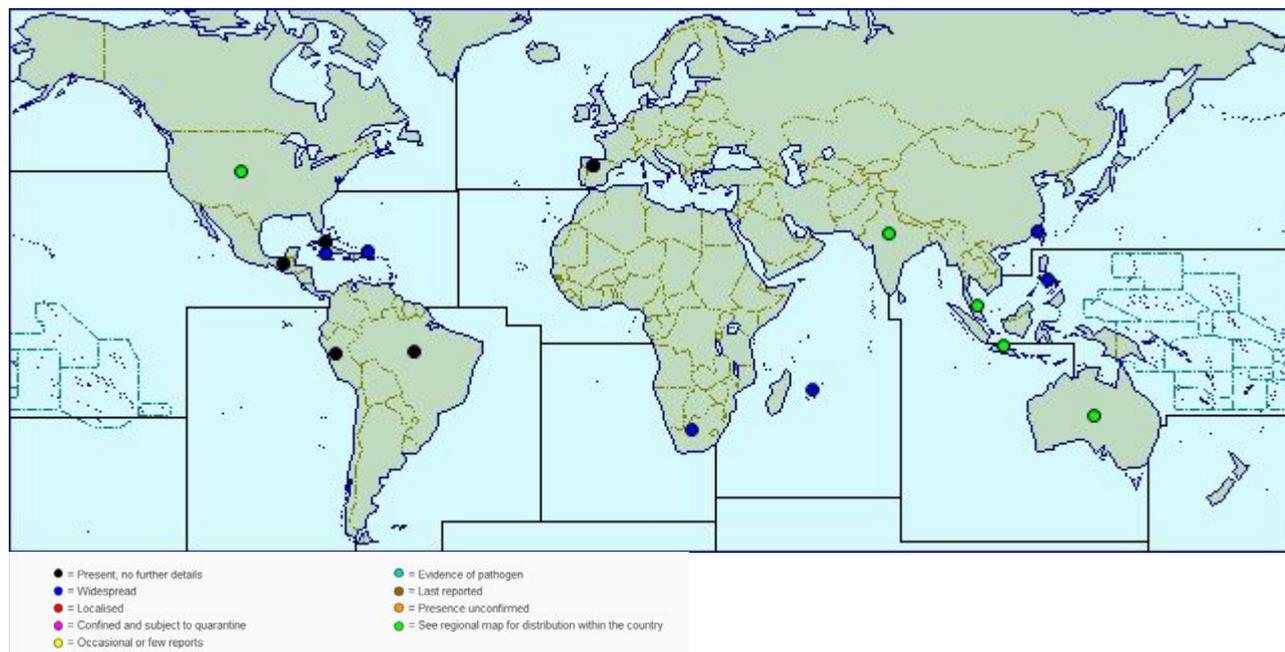


Figure 3 : Distribution géographique des virus du complexe du PMWaV (source CABI)

Tableau 1 : Distribution géographique des virus du complexe du PMWaV (source CABI)

Pays	Distribution	Références
Asie		
Inde		
Uttar Pradesh	Présent	Singh et Sastry, 1974
Indonésie		
Java	Largement disséminé	Carter, 1942
Malaysie		
Malaysie Péninsulaire	Largement disséminé	Carter, 1942
Sabah	Largement disséminé	Carter, 1942
Sarawak	Largement disséminé	Carter, 1942
Philippines		
Taïwan	Largement disséminé	Lee, 1966
Afrique		
Maurice	Largement disséminé	Carter, 1942

Afrique du sud	Largement disséminé	Carter, 1942
Amérique du Nord		
Pays	Distribution	Références
USA		
Floride	Présent	Carter, 1942
Hawaï	Largement disséminé	Larsen, 1910
Amérique Centrale et Caraïbe		
Cuba	Présent	Hernandez <i>et al.</i> , 2010
Guatemala	Présent	Carter, 1946
Jamaïque	Largement disséminé	Carter, 1934
Puerto Rico	Largement disséminé	Plank et Smith, 1940
Amérique du sud		
Brésil	Présent	Carter, 1946
Pérou	Présent	Carter, 1946
Europe		
Espagne	Présent	Carter, 1942
Océanie		
Australie		
Queensland	Présent	Wakman <i>et al.</i> , 1995

2.1.3.5 Distribution géographique des *Badnavirus* potentiellement impliqué dans la MWD

Très peu d'informations sont disponibles sur la distribution géographique des *Badnavirus* potentiellement impliqué dans la MWD. Leur présence a été signalée à Hawaï (Sether et Hu, 2002b) et en Australie Wakman *et al.*, 1995 et Gambley, 2008).

2.1.4 **Étiologie de la maladie du « wilt »**

Des tests de tissus « immunoblot » utilisant des anticorps monoclonaux et des tests RT-PCR utilisant des amorces spécifiques ont été développés pour détecter et différencier les PMWaV-1, -2 et 3 (Hu *et al.*, 1996 ; Sether *et al.*, 2001 et Sether *et al.*, 2005a).

Les recherches sur l'étiologie de la MWD à Hawaï se sont concentrées sur ces trois virus et le PMWaV-2 a été identifié comme pouvant être responsable de la maladie mais seulement en combinaison avec des infestations de cochenilles (Sether et Hu, 2002b). La présence du PMWaV-3 seul ou en combinaison avec des infestations de cochenilles n'a pas été associée à la présence de symptômes de la MWD dans les études hawaïennes (Sether *et al.*, 2005a). Des études sous serre et au champ ont montré que la présence seule du PMWaV-2 ou des cochenilles n'était pas

suffisante pour conduire à l'apparition de symptômes, qui nécessiterait l'action concomitante de ces deux facteurs. Dans les échantillons d'ananas collectés à travers le monde, le PMWaV-1 a été détecté en absence ou en présence de symptôme alors que le PMWaV-2 a été détecté dans tous les échantillons symptomatiques et dans une petite proportion des échantillons asymptomatiques (Sether *et al.*, 2001). Les plantes analysées n'ont cependant pas été testées pour la présence des PMWaV-3, -4 et -5. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent un rôle central du seul PMWaV-2 (et des cochenilles) dans la MWD. Cependant, il est important de souligner que ces travaux ont été conduits par des techniques d'inoculation qui ne permettent pas d'exclure absolument la présence d'autres agents viraux non recherchés (comme les PMWaV-3, -4 et -5, les *Badnavirus*) ou non encore caractérisés (et par conséquent non recherchables). On ne peut donc pas totalement exclure l'implication éventuelle d'autres agents que le PMWaV-2 dans la MWD.

Le PMWaV-1, -2 et -3 ont été détectés dans différentes accessions de la collection de variété d'ananas maintenue par l'USDA (Sether *et al.*, 2001 et Sether *et al.*, 2005a). Aucune variété ou cultivar résistant au PMWaV-1 n'a été identifiée. La résistance des plantes vis-à-vis du PMWaV-2 et -3 n'a pas été évaluée. Par ailleurs, des accessions précédemment asymptomatiques sont devenues symptomatiques en présence de cochenilles infectées par le PMWaV-1, ce qui soulève la possibilité que ce virus puisse lui aussi être capable de causer la maladie. De fait, dans une étude au champ conduite à Hawaï, l'impact du PMWaV-1 sur le rendement d'une culture d'ananas a été trouvé identique à celui d'une culture recevant une irrigation réduite (Sether et Hu, 2001), ce qui suggère un certain niveau de pathogénicité.

En Australie, des symptômes de MWD n'ont été observés qu'en présence des PMWaV-1 et -3, et ce en l'absence de colonies de cochenilles (Gambley, 2008). L'étiologie de la MWD dans les cultures australiennes d'ananas ne semble donc pas concordante avec la situation décrite à Hawaï, ce qui introduit des incertitudes supplémentaires quand à la ou aux cause(s) de la MWD.

Les résultats des travaux de Gambley (2008) ne fournissent pas d'informations concordantes quant à l'association entre la présence individuelle des virus PMWaVs et le développement de la MWD. L'association avec les virus est seulement accidentelle et seule la complétion des postulats de Koch pourra permettre d'identifier de façon précise l'agent responsable de la MWD. Il est possible que plusieurs virus puissent intervenir seuls ou en combinaison dans la maladie et que la MWD soit la résultante d'un syndrome induit par infection des ananas par divers *Ampelovirus*. Une synergie pourrait par ailleurs s'établir entre différents virus (*Ampelovirus* et *Badnavirus*) pour parvenir à l'extériorisation des symptômes.

2.2 Évaluation du risque d'avoir des lots de vitro-plants d'ananas porteurs de virus

2.2.1 La culture *in vitro* d'ananas

La culture *in vitro* (CIV) est une technique de micro-propagation de matériel végétal utilisée pour la multiplication rapide et à grande échelle de différentes espèces végétales et en particulier de nouvelles variétés d'ananas (DeWald *et al.*, 1988 ; Yapo *et al.*, 2011 ; Buah *et al.*, 2015). La technique la plus courante consiste à utiliser les bourgeons axillaires récupérés sur les tiges de couronnes ou de plants. Ces bourgeons, mis à régénérer en chambre de culture sur un milieu synthétique nutritif, permettent la production de petits plants qui peuvent à leur tour fournir des bourgeons axillaires utilisés pour une micro-propagation de masse. Peu pratique à mettre en œuvre au niveau d'exploitations agricoles, elle nécessite d'investir dans un laboratoire de culture *in vitro* et par conséquent l'intervention d'entreprises spécialisées. Avec cette technique, il est possible de produire des milliers voire des millions de plantes à partir de très peu de plantes d'origines (têtes de clone, pieds mères). Cependant pour l'ananas l'expérience a montré qu'un facteur de multiplication de 1:1000 serait optimal pour limiter le nombre de variants observé dans la descendance.

Des améliorations ont été apportées à cette technique de CIV comme l'immersion temporaire des bourgeons axillaires en réacteur de culture, l'amélioration des conditions de lumière (González-Olmedo *et al.*, 2005) ou la prolifération par étiolement des bourgeons à l'obscurité (Vitropic). Cependant plusieurs contraintes incontournables ralentissent le processus de multiplication. Les délais de régénération et de croissance en CIV entraînent un décalage d'un an entre le début de la culture de tissus *in vitro* et la production des premiers vitro-plants. Ensuite, six mois supplémentaires sont nécessaires pour la phase « d'endurcissement » et de croissance des plantules en serre avant que les jeunes plants ne soient prêts à être transplantés au champ. En conséquence, le coût peut être relativement élevé pour de petites quantités de plantes, ce qui est souvent le cas pour les structures de production d'ananas dans les DOM. Enfin, il peut apparaître pendant les premières générations des variations somatiques telles que des feuilles épineuses ou la croissance de bulbilles à la base des fruits induisant des déformations (Yapo *et al.*, 2011).

Pour l'ananas, la technique de CIV est utilisée notamment pour la multiplication de matériel végétal nouveau. Il peut s'agir de variétés issues de programmes d'hybridation ou de sélections clonales plus performantes faites localement par les producteurs. Enfin, il peut s'agir de l'introduction d'une nouvelle variété venant d'autres zones géographiques de production (Yapo *et al.*, 2011 ; Buah *et al.*, 2015).

D'autre part, comme toutes les autres techniques de multiplication végétative, la CIV conduit à la propagation des virus à la descendance si on part de plantes initiales infectées en conséquence la CIV est très généralement associée à des processus de contrôle qualité ou de certification visant à garantir l'état sanitaire du matériel multiplié.

2.2.2 Cas concret d'assainissement de plants d'ananas infecté par des virus par l'utilisation de la culture *in vitro*

Etant donné le risque potentiel de propager avec la CIV des virus tels que les virus du complexe du PMWaV, les *Badnavirus* ou encore le TSWV, tous connus sur ananas, la question des garanties d'assainissement apportées par les mesures additionnelles à la micro-propagation *in vitro* se pose. Ci-après est exposé schématiquement un cas concret de micro-propagation de plants d'ananas indemnes de pathogènes destinés aux producteurs d'ananas de Martinique et mis en œuvre par la filiale Vitropic du Cirad :

Le plant initial destiné à être multiplié est indexé selon une batterie d'analyses réalisées sur des feuilles et destinées à s'assurer de l'absence des virus suivants : PMWVa1 et 2, PBCOV, PBERV et TSWV. Cette indexation est réalisée quelle que soit l'origine géographique du plant, même s'il s'agit de la Martinique.

Si le plant est sain après indexation, le processus de micro-propagation est le suivant :

- 1- en CIV, production de 50 plants à partir de bourgeons axillaires sur milieu « bactériologique » pour garantir également l'absence de bactéries (*Ralstonia* spp, *Erwinia* spp et *Xanthomonas* spp).
- 2- Les petits plants sont gardés confinés en chambre de culture.
- 3- Une nouvelle indexation vis-à-vis des mêmes virus que décrits précédemment est réalisée sur ces cinquante plants. Si les plants sont sains, ils sont alors destinés à la production de nouveaux rejets qui deviendront le matériel source pour la CIV. Pour cela, les plants sont ensuite conservés en serre insect-proof et indexés périodiquement.
- 4- Les bourgeons axillaires de ces nouveaux rejets sont utilisés pour une micro-propagation de masse *in vitro*. Les vitro-plants sont alors envoyés par avion à un pépiniériste « agréé par la DAAF » qui réalise en Martinique l'acclimatation, le sevrage et la croissance initiale avant leur livraison aux producteurs.

Ce processus de régénération de plants *in vitro* et la production des vitro-plants prêts à être livrés demandent environ 1,5 à 2 ans.

Si l'indexation du plant initial révèle qu'il n'est pas sain, le processus de micro-propagation inclut une phase d'assainissement qui dure environ six mois et est mise en œuvre avant d'entreprendre l'étape 1 de la CIV décrite ci-dessus :

- 1- La technique d'étiollement des bourgeons axillaires à l'obscurité est réalisée en CIV.
- 2- Les bourgeons terminaux des plants étiolés sont mis en CIV pour régénérer de petits plants *in vitro*.
- 3- Ces petits plants subissent une nouvelle indexation pour les virus (PMWaV-1 et -2, PBCOV, PBERV et TSWV) et les plants assainis entrent ensuite dans le même processus décrit précédemment pour des plants sains.

Ce processus complet d'assainissement demande environ six mois et la durée totale du cycle de multiplication est alors portée à un peu moins de 3 ans.

En conclusion, la micro-propagation *in vitro* de l'ananas permet une multiplication relativement rapide du matériel végétal. Ce matériel peut être garanti sain vis-à-vis d'un certain nombre de contaminations virales ou bactériennes, au moins celles pour lesquelles des techniques de détection existent. Le processus est assez long pour garantir l'état sanitaire des plants mais il reste beaucoup plus rapide que les techniques de propagation « rapides » horticoles plus classiques comme l'amplification à partir de vieilles souches de plants ou bien par écoeurage de plants en début de floraison. Il permet de plus d'apporter une garantie sur l'état sanitaire de bien meilleur niveau que les techniques classiques.

2.3 Méthodes analytiques disponibles pour indexer les plantes mères et contrôler les lots de vitroplants

Tel qu'indiqué plus haut un certain nombre de virus ont été identifiés chez l'ananas, dont certains parmi les PMWaVs ont été associés plus ou moins directement à la MWD.

Parmi les *Ampelovirus*, 4 virus ont été identifiés : PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 et PMWaV-4, ainsi qu'un potentiel cinquième agent, le PMWaV-5. Les PMWaV-1 et -2 seraient les virus qui causeraient le plus dégâts sur les cultures d'ananas, vraisemblablement en association avec des pullulations de cochenilles (German *et al.*, 1992 ; Wakman, 1994 ; Wakman *et al.*, 1995 ; Thomson *et al.*, 1996 ; Hu *et al.*, 1996 et 1997 ; Sether *et al.*, 2001 et Sether *et al.*, 2005 a et b). La détection de ces deux virus apparaît donc prioritaire mais, en l'absence d'informations précises sur l'impact potentiel des autres PMWaVs, il semble important de les prendre en compte également. De plus, en référence à leur signalement sur ananas, 2 *Badnavirus* (contribution éventuelle à la MWD) et un *Tospovirus* (le TSWV, pathogène) semblent devoir également être pris en compte.

Sether *et al.* (2008) ont développé une technique de détection par RT-PCR conventionnelle des PMWaV-1 et -2. Pour la détection du PMWaV-1, les amorces PMW225 et PMW226 et pour la détection du PMWaV-2, les amorces PMW223 et PMW224 permettent l'amplification d'un fragment de la séquence virale codant pour un homologue de la protéine Heat Shock 70 (HSP 70) respectivement d'une taille de 589 pb et 609 pb.

D'autre part, des amorces dégénérées ont également été décrites par Gambley (2008), permettant de détecter simultanément les PMWaV-1, -2 et -3, ce qui pourrait permettre de disposer d'une méthode de première intention applicable sur de grandes séries d'analyses. Toutefois, leur spécificité de détection devra être vérifiée sur un large panel d'échantillons cibles et non cibles.

Une autre technique, l'immunomagnétique capture reverse transcriptase PCR (IMC-RT-PCR) permettrait également de détecter le PMWaV-1 et le PMWaV-2 sur du matériel frais, congelé ou lyophilisé et serait plus sensible (un facteur 10) que l'Immuno Capture RT-PCR (IC-RT-PCR) conventionnelle (Gambley *et al.*, 2009).

Pour la détection des *Badnavirus*, Gambley *et al.* (2008) a mis au point des amorces spécifiques pour la détection par PCR du PBCOV (PBV2dF et PBV2dR, 513 pb) et du PBERV (PBVd4F2 et PBV4dR2, 236 pb).

La mise en œuvre de ces méthodes nécessite de disposer de témoins positifs de références : soit des feuilles d'ananas infectées par chacun de ces virus, soit des extraits d'ARN (PMWaVs, *Badnavirus*) ou d'ADN (*Badnavirus*).

La détection du TSWV peut être réalisée selon des méthodes sérologiques (ELISA) ou de RT-PCR spécifique (Dobhal *et al.*, 2015) ou de RT-PCR génériques (Chen *et al.*, 2012) permettant la détection des virus du genre des *Tospovirus*.

La détection du PMWaV-1 et -2 et potentiellement -3, du PBCOV et du PBERV ne soulève donc pas de problème technique particulier. Les méthodes peuvent être utilisées sur des échantillons symptomatiques ou asymptomatiques. Néanmoins, le transfert de ces méthodes vers des laboratoires agréés par le Ministère de l'Agriculture pour la réalisation d'analyses officielles nécessite certaines mises au point telles que : (i) pour la détection du PMWaV-1, l'élimination de bandes aspécifiques observées (comm pers., Anses LSV La Réunion), (ii) pour détecter le PBERV, il serait nécessaire de valider la méthode avec un panel d'échantillons positifs à rechercher auprès de laboratoires de recherche étrangers (Australie et Hawaï).

Par contre aucune technique sérologique (de type ELISA) ne peut être préconisée en routine du fait qu'aucun kit de réactif n'est proposé dans le commerce ou au niveau des laboratoires de recherche impliqués sur la thématique des virus de l'ananas.

Au final, des techniques de détection sensibles et performantes semblent disponibles pour les agents suivants : PMWaV-1, -2 et -3, PBCOV et PBERV, TSWV. Il n'existe pas actuellement dans la littérature de technique de détection pour les PMWaV-4 et -5 mais, sur la base des données de séquence disponibles des tests de détection, multiplexés ou non, pourraient être développés contre ces agents.

Enfin, la détection des PMWaV-4 et -5 et d'autres agents viraux non encore caractérisés et qui pourraient être présents dans les plants d'ananas pourrait éventuellement être envisagée grâce au progrès des techniques de séquençage haut débit pour l'indexage viral (Boonham *et al.*, 2014 ; Massart *et al.*, 2014 ; Stobbe et Roosinck, 2014), ce qui permettrait d'apporter une garantie supplémentaire de l'état sanitaire des plantes mères destinées à la propagation du matériel végétal.

3 Conclusion

La bibliographie montre que la MWD est une maladie importante et dommageable pour les cultures d'ananas. Ses causes restent encore relativement mal connues mais semblent associer au moins la présence d'un ou de plusieurs agents viraux et une infestation par des cochenilles. Les efforts de caractérisation de virus chez l'ananas ont permis de mettre en évidence un complexe de plusieurs *Ampelovirus* proches nommés PMWaV-1 à -5 et plusieurs *Badnavirus*. La contribution de ces divers agents à la MWD n'est encore qu'incomplètement comprise, même si le PMWaV-2 semble être l'agent impliqué dans la maladie à Hawaï et dans plusieurs autres régions du monde, alors que le PMWaV-1 semble être impliqué en Australie. Plus globalement, la contribution éventuelle des autres agents, PMWaV-3, -4, -5 et *Badnavirus* reste à clarifier, tout comme leur impact éventuel sur les cultures d'ananas, indépendamment du contexte de la MWD.

Pour les départements d'outre-mer concernés par cette saisine, les données épidémiologiques sur la MWD sont limitées, voire inexistantes, et un inventaire des virus présents sur ananas serait utile pour affiner l'évaluation des risques liés à l'introduction éventuelle d'agents viraux non encore présents sur ananas dans ces territoires.

La culture *in vitro* permet d'assurer la production de plants indemnes de virus sous réserve que les plantes mères aient été indexées par des tests de détection appropriés et conduits dans de bonnes conditions et qu'un suivi efficace (certification, assurance qualité) soit réalisé sur l'ensemble du processus de multiplication. Sans un respect strict des contrôles sanitaires décrits précédemment (cf 2.2.2), la culture *in vitro* pourrait représenter un risque grave du fait de son potentiel de multiplication à grande échelle de plants de statut virologique inconnu.

Les techniques les plus courantes de biologie moléculaire (PCR) ont des critères de performance requis pour contrôler l'état sanitaire de plants d'ananas à tous les niveaux des dispositifs de multiplication depuis la plante mère au plant d'ananas issu d'un vitro-plant en cours de grossissement en pépinière. Par contre aucune technique sérologique (de type ELISA) ne peut être envisagée en particulier du fait qu'aucun kit de réactif n'est proposé à la commercialisation. Il convient cependant de noter que pour au moins deux membres du complexe des PMWaVs, les PMWaV-4 et -5, aucun test PCR spécifique n'est rapporté dans la littérature. Dans ce contexte, les techniques d'indexage innovantes issues du séquençage haut débit (NGS) pourraient être utilisées pour effectuer des contrôles en amont sur les plantes mères candidates à être introduites dans les dispositifs de multiplication. Ces méthodes qui permettent la recherche très large de séquences virales permettraient d'apporter des garanties supplémentaires quant à l'état sanitaire des vitroplants, en particulier lorsque les pieds mères ne sont pas originaires du département d'outre-mer devant recevoir les vitroplants *in fine*.

Date de validation du rapport : 08 septembre 2015

4 Bibliographie

4.1 Publications

Boonham N., Kreuze J., Winter S., Van der Vlugt R., Bergervoet J., Tomlinson J. and Mumford R. (2014) Methods in virus diagnostics : from ELISA to next generation sequencing. *Virus research*. 186, 20-31.

Buah JN., Paul AS. and Ransford AJ. (2015) *In vitro* growth and multiplication of Pineapple under different duration of sterilization and different concentrations of benzylaminopurine and sucrose. *Biotechnology*, 14 (1), 35-40.

Carter W. (1962) The systemic phytotoxemias: Mealybug wilt of pineapple. In *Insects in relation to plant disease*, pp. 238-265. Edited by W. Carter. New York: Interscience.

Carter, W. (1963) Mealybug wilt of pineapple ; a reappraisal. *Annals of the New York Academy of Sciences* 105, 741-764.

Carter W. (1946) Insect notes from South America with special reference to *Pseudococcus brevipes* and mealybug wilt. *Journal of Economic Entomology*, 42 : 761-766.

Carter W. (1945a) The influence of plant nutrition on susceptibility of pineapple plants to mealybug wilt. *Phytopathology* 35, 316-323.

Carter W. (1945b) Some etiological aspects of mealybug wilt. *Phytopathology* 35, 305-315.

Carter W. (1942) Geographical distribution of mealybug wilt with some other insect pest of pineapple. *Journal of Economic Entomology*, 35 : 10-15.

Carter W. (1934) Mealybug wilt and green spots in Jamaica and Central America. *Phytopathology*, 24 : 424-426.

Carter W. (1933a) The pineapple mealybug, *Pseudococcus hrevipes*, and wilt of pineapples. *Phytopathology* 23, 207-242.

Carter W. (1933b) The spotting of pineapple leaves caused by *Pseudococcus brevipes*, the pineapple mealybug. *Phytopathology*, 23, 243-259.

Carter W. and Collins JL. (1947) Resistance to mealybug wilt of pineapple with special reference to a cayenne-queen hybrid. *Phytopathology*, 37, 332-348.

Chen TC., Li JT., Lin YP., Yeh YC., Kang YC. Huang LH. And Yeh SD. (2012) Genomic characterization of Calla lily chlorotic spot virus and design of broad-spectrum primers for detection of tospoviruses. *Plant pathology*. 61, 183-194.

Cox JM. (1979) Longtailed mealy bug life cycle (*Pseudococcus longispinus*. Information Series of the (New Zealand) Department of Scientific and Industrial Research (DSIR) 105/32.

Dewald MG., Moore GA., Sherman WB and Evans MH. (1988) Production of pineapple plants *in vitro*. *Plant cell reports*, 7, 535-537.

Dobhal S., Arif M., Olson J., Mendoza-Yerbafría A., Aguilar-Moreno S., Perez-García M. and Ochoa-Corona FM. (2015) Sensitive detection and discrimination method for studying multiple infections of five major plant viruses infecting ornamental plants in nursery environments. *Annals of applied biology*. 166, 286-296.

- Gambley CF. (2008) The aetiology of pineapple mealybug wilt disease: the role of viruses – Thèse
- Gambley CF, Geering ADW, Steel V and Thomas JE. (2008) Identification of viral and non viral reverse transcribing elements in pineapple (*Ananas comosus*), including members of two new badnavirus species. *Archive of phytopathology*, 153 : 1599-1604
- Gambley CF., Geering ADW., and Thomas JE. (2009) Development of an immunomagnetic capture-reverse transcriptase-PCR assay for three pineapple ampeloviruses. *Journal of Virological Methods* 155 187-192.
- German TL., Ullman DE. and Gunashinghe UB. (1992) Mealybug wilt of pineapple. In *Advances in Disease Vector Research*, pp 242-259. Edited by KF. Harris. New York : Springer-Verlag.
- González-Olmedo JL., Fundora Z., Molina LA., Abdunour J. and Escalona M. Desjardins Y. (2005) New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 41(1), 87-90.
- Hernández L., Ramos PL., Rodríguez M., Peña I., Pérez JM. (2010) First report of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 infecting pineapple in Cuba. *New Disease Reports*, 22 : 18.
- Hu JS., Sether DM., Melzer M., Busto J, Perez E., Kislán M., Dawson W. and Karasev, AV. (2000) Is mealybug wilt of pineapple a viral problem? *Phytopathology* 90, S92.
- Hu JS., Sether DM., Ullman DE. and Lockhart BEL. (1997) Mealybug wilt of pineapple: pineapple viruses and two-step heat treatment of pineapple crowns. *Acta Horticulturae* 425, 485-492.
- Hu JS., Sether DM. and Ullman DE. (1996) Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. *Plant Pathology* 45, 829-836.
- Illingworth JF. (1931) Preliminary reports on evidence that mealybugs are an important factor in mealybug wilt. *Journal of Economic Entomology*, 24, 877-889.
- Ito K; (1959) Terminal mottle as symptomatological aspect of mealybug wilt with evidence supporting the hypothesis of a virus etiology of the disease, pp 1-37. Hawaii : Pineapple Research Institute.
- Ito K. (1938) Studies on the life history of the pineapple mealybug, *Pseudococcus brevipes* (Ckll.). *Journal of Economic Entomology* 31, 291-298.
- Jahn GC., Beardsley J.W, and Gonzalez-Hernandez H. (2003) A review of the association of ants with Mealybug Wilt Disease of Pineapple. *Procedure Hawaiian Entomology Society*. 36, 9-28
- Larsen LD. (1910) Diseases of pineapple. Hawaii Sugar Planters Association Pathol. Physiol. Ser. Experimental Station Bulletin, 10 : 1-72.
- Lee HS. (1966) Ecological studies on pineapple mealybug (*Dysmiococcus brevipes* (Ckll) in relation to pineapple wilt. *Plant protection bulletin, Taiwan*, 8(3) : 211-219.
- Massart S., Olmos A., Jijakli H. and Candresse T. (2014) Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus research*. 188, 90-96.
- Melzer MJ, Karasev AV., Sether DM. and Hu JS. (2001) Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of Pineapple mealybug wilt-associated virus-2. *Journal of General Virology* 82, 1-7.
- Plank HK. and Smith MR. (1940) A survey of the pineapple mealybugs in Puerto Rico and preliminary studies of its control. *Journal of Agriculture, Puerto Rico*, 24 : 49-76.
- Rohrbach KG., Beardsley JW., German TL., Reimer NJ. and Sanford WG. (1988) Mealybug wilt, mealybugs and ants on pineapple. *Plant Disease* 72, 558-565.

Sether DM., Melzer MJ, Busto J, Zee F. and Hu JS. (2005a) Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. *Plant Disease* 89, 450-456.

Sether DM., Melzer MJ, Subere, CV. and Hu JS. (2005b) Pineapple mealybug wilt associated viruses 1, 3, and 4, and Grapevine leafroll associated viruses 4, 5, 6, and 9 are a distinct group in the genus *Ampelovirus*. In Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies; International Congress of Virology.

Sether DM. And Hu JS. (2002a) Yield impact and spread of Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 and Mealybug wilt of pineapple in Hawaii. *Plant disease* 86, 867-874.

Sether DM. and Hu JS. (2002b) Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology* 92, 928-935.

Sether DM., Karasev AV., Okumura C., Arakawa C., Zee F., Kislán MM., Busto JL. and Hu JS. (2001) Differentiation, distribution and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. *Plant Disease* 85, 856-864.

Sether DM. and Hu JS. (2001) The impact of Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 and reduced irrigation on pineapple yield. *Australasian Plant Pathology* 30, 31-36.

Sether DM., Ullman DE. and Hu JS. (1998) Transmission of pineapple mealybug wilt-associated virus by two species of mealybug (*Dysmicoccus* spp.). *Phytopathology* 88, 1224-1230.

Singh SJ. and Sastry KSM. (1974) Wilt of pineapple - a new virus disease in India. *Indian Phytopathology*, 27(3) : 298-303

Stobbe AH. And Roossinck MJ. (2014) Plant virus metagenomics : what we know and why we need to know more. *Frontiers in plant science*. 5,1-4

Thomson KG., Dietzgen RG., Thomas JE. and Teakle DS. (1996) Detection of Pineapple bacilliform virus using the polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology* 129, 057-069.

Ullman DE., German TL., Gunashinge UB. and Ebesu RH. (1989) Serology of a closterovirus like particle associated with mealybug wilt of pineapple. *Phytopathology* 79, 1341-1345.

Wakman W., Teakle DS., Thomas JE. and Dietzgen RG. (1995) Presence of a clostero-like virus and a bacilliform virus in pineapple plants in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 46, 947-958.

Wakman W. (1994) Two clostero-like viruses and a bacilliform virus in pineapple plants in Australia. PhD thesis, Department of Microbiology, The University of Queensland, St Lucia, Australia p. 144.

Yapo ESS., Kouakou KL., Bognonkpe JPI, Kouame P. and Kouatou TH. (2011) Comparison of pineapple fruit characteristics of plants propagated in three different ways : by suckers, micropropagation and somatic embryogenesis. *Journal of nutrition food sciences*. 1(4), 1-8.

4.2 Normes

NF X 50-110 (mai 2003) Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

4.3 Législation et réglementation

Départements de la Guadeloupe, de la Martinique et de Guyane :

Arrêté du 3 septembre 1990 modifié par l'arrêté du 3 décembre 1991 (annexes DOM).

Département de Mayotte : Arrêté préfectoral du 10 avril 1995, relatif au contrôle sanitaire des végétaux et produits végétaux.

- Annexe I : Organismes nuisibles dont l'introduction sous toutes leurs formes est interdite à Mayotte : Les organismes nuisibles suivants sont formellement interdits d'introduction à Mayotte, qu'ils se présentent (i) à l'état isolé, (ii) sur des végétaux ou produits végétaux, (iii) sur substrats, emballages ou sur tout support.

d) Virus et pathogènes similaires aux virus :

Organisme interdit à l'importation	Nom français de l'ennemi ou maladie induite (modes de propagation)
Pineapple wilt virus	Maladie du Wilt (plants et couronne d'ananas)
Pineapple chlorotic streak virus	Végétaux d'ananas sp (plants et couronne)

Pineapple wilt virus

- Annexe II : Végétaux et produits végétaux dont l'introduction est interdite à Mayotte :
 - Ananas spp ; Végétaux et produits végétaux destinés à la plantation : toutes origines

Département de la Réunion :

Arrêté préfectoral N°2011-1479 du 30 septembre 2011.

- Annexe II Organismes nuisibles dont l'introduction et la dissémination doivent être interdites sur le territoire de l'île de la Réunion s'ils se trouvent sur certains végétaux ou produits végétaux

* Chapitre II : Organismes nuisibles présents sur le territoire de l'île de la Réunion et dont la dissémination doit être limitée :

6.	Pineapple mealybug wilt-associated closterovirus	Végétaux du genre Ananas destinés à la plantation à l'exception des semences
----	--	--

- Annexe IV Exigences particulières requises pour l'introduction et la circulation des végétaux, produits végétaux et autres objets sur le territoire de l'île de la Réunion :

52	Végétaux d'Ananas issus d'un programme de multiplication in-vitro	Constatation officielle que : a) les végétaux se présentent sous forme stricte de vitroplants non acclimatés conditionnés dans un emballage scellé ; et b) Les pieds-mères sont certifiés indemnes de Pineapple mealybug wilt-associated virus, souches responsables de la pathologie du wilt de l'ananas, après indexation par une méthode qui sera précisée en déclaration supplémentaire.
53	Végétaux de la famille des Bromeliaceae destinés à la plantation à l'exception du genre Ananas et à l'exception des fruits et des semences	Constatation officielle que : a) les végétaux sont originaires d'un pays connu comme exempt de : - Fusarium guttiforme - Metamasius sp. se développant sur les Bromeliaceae - Thecla basilides et ont été soumis à un traitement adéquat pour le rendre exempt de tous arthropodes ou b) les végétaux se présentent sous forme stricte de vitroplants non acclimatés conditionnés dans un emballage scellé.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de la demande



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE FORÊT

Direction Générale de l'Alimentation
Service de la prévention des risques sanitaires de
la production primaire

Sous-Direction de la Qualité et de la Protection
des Végétaux

Bureau des Semences et de la Santé des
Végétaux

Adresse : 251, rue de Vaugirard
75 732 PARIS CEDEX 15

Dossier suivi par : Emmanuel Koen
Tél. : 01 49 55 57 54 / Fax : 01 49 55 59 49

Courriel institutionnel :

bssv.sdqpv.dgal@agriculture.gouv.fr

Le Directeur Général de l'Alimentation

à

**Monsieur le Directeur Général
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du
travail**

253 avenue du Général Leclerc
94701 - MAISONS ALFORT CEDEX

Réf. Interne : BSSV/2015-01-012

Paris, le 27 janvier 2015

Objet: Demande d'appui scientifique et technique sur les risques d'introductions d'organismes nuisibles via les vitro-plants d'ananas en Guadeloupe et dans les autres départements d'outre-mer (DOM).

La Direction générale de l'alimentation a été interpellée par la Direction de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt (DAAF) de Guadeloupe sur une demande d'introduction de vitro-plants d'ananas origine Israël.

Il y a toujours eu un déficit de plants d'ananas locaux. L'utilisation de vitro-plants (VP) d'ananas permettrait d'améliorer la production d'ananas très déficitaire en Guadeloupe. C'est pourquoi, la filière sollicite la possibilité de recourir à l'introduction de VP d'ananas qui seraient sevrés et grossis par des pépiniéristes qui s'occupent des VP de bananiers importés. Nous souhaitons élargir aussi le champ de cette réflexion aux autres départements d'outre-mer (DOM) : Martinique, Guyane, Mayotte et Réunion, pour lesquels cette problématique est également importante.

Si les atouts agronomiques et sanitaires escomptés vis-à-vis des nématodes, bactéries, champignons et insectes sont indubitables via la production de VP d'ananas, il reste le risque d'introduction du complexe viral dit du Wilt de l'ananas ou Pineapple mealybug wilt-associated closterovirus (PMWaV). Dans ce cadre, nous vous demandons d'évaluer ce risque. Par ailleurs, il existe des méthodes d'analyses sérologiques. Il conviendrait de déterminer si ces méthodes permettent de détecter tous les virus du complexe du PMWaV.

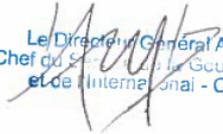
Une réponse favorable pourrait permettre d'envisager d'autoriser officiellement l'introduction dans les DOM de VP d'ananas quel que soit leur établissement producteur.

Je vous saurais gré de bien vouloir me faire part de cet avis **avant le 30 juin 2015**.

Mes services se tiennent à votre disposition pour vous apporter toute information complémentaire.

En cas de difficulté rencontrée dans l'accomplissement de cette demande, je vous prie de m'en informer dans les meilleurs délais.

Je vous remercie de bien vouloir accuser réception de la présente demande.


Le Directeur Général Adjoint
Chef du Service de la Gouvernance
et de l'International - C.V.O.

Jean-Luc ANGOT

Copie : Direction du LSV, DAAF Guadeloupe, Pierre Ehret.

2/2

Notes



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr
www.anses.fr / [@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)