

Etiología de la Pudrición de Cogollo

Investigaciones virológicas conducidas por el IRHO

M. Dollet*

INTRODUCCION

Es a finales de 1983, luego de una misión virológica de 3 semanas en la plantación de Shushufindi en Ecuador, cuando las investigaciones etiológicas sobre la pudrición del cogollo (PC) se iniciaron. La primera fase (1984/87) versó particularmente sobre el cultivo in vitro (CIV) y la microscopía electrónica (ME), la segunda (1987/90) sobre los ácidos nucleicos.

Estos trabajos fueron realizados principalmente en el CIRAD en Montpellier (Francia) con Laurent MAZZOLINI, Veronique BERNARD y Dominique DAMBIER, con la colaboración del Laboratorio Viroológico del INRA de Bordeaux (Guy MACQUAIRE) y del Instituto de Biología Física de la Universidad de Dusseldorf (Eckhart BEUTHER). John RANGLES (WARI Adelaide, Australia) y Heinz SANGER (Max Planck Institut, Munich) nos prestaron igualmente su amable colaboración.

1. SINDROME PATOLOGICO ESTUDIADO

Todas nuestras investigaciones fueron concentradas sobre la enfermedad que afecta la plantación de Palmeras de los Andes en Shushufindi en el Oriente ecuatoriano.

El síndrome de la PC en esta plantación presenta las características siguientes:

- Clorosis (aspecto "amarillento") de las hojas jóvenes.

* División Virología IRHO, Laboratorio de Fitovirología de las Regiones Calidas (LPRC). CIRAD/ORSTOM, CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France

- La observación muy próxima de un árbol con esta clorosis muestra:

- De un lado y del otro del raquis de la flecha, -zonas asimétricas de foliolos necrosados (necrosis húmeda "pudrición")
- síntomas de moteados (puntos verdes sobre un fondo de limbo clorótico - o más o menos amarillo- y de "vein banding", sobre las hojas 4-5 a 8 9
- el extremo de las hojas 4-5 a 7-8 es generalmente de color bronce
- contrariamente a lo que se observa en Brasil (DENPASA), no hay necrosis seca del extremo de los foliolos de hojas jóvenes (3 a 9)
- presencia de escarificaciones marrón en la base de los raquis (parte interna) de hojas jóvenes (FOa-3,-5)
- retraso del crecimiento de flechas jóvenes (-3 a-14)

Una "pudrición ligada a un derrame café parece propagarse de manera externa desde lo alto (las flechas más viejas listas a abrirse) hacia la zona meristemática a lo largo de las flechas jóvenes.

Todas las muestras estudiadas fueron traídas después de las misiones, o enviadas por correo aéreo a Montpellier.

2.CULTIVO IN VITRO

Las investigaciones etiológicas en Virología en las palmáceas presentan enormes problemas debido a la propia naturaleza de la planta (monocotiledonea, tejidos muy duros y fibrosos, masa de la planta...). Actualmente, ninguna partícula viral ha sido detectada de manera directa en esas plantas. Por lo tanto, intentamos modificar la relación volumen plan-

ta/ patógeno utilizando la CIV por embriogénesis somática. En efecto, buscar una partícula de 20 nanómetros en una muestra de foliolos de 1 x 1 mm (tamaño promedio para las muestras de ME) es bastante aleatoria, sobre todo si ese virus tiene una repartición no homogénea en la planta. Buscar ese mismo patógeno en una plántula de 5 a 10 cm de altura en tubo puede revelarse más eficaz, esto ya ha sido demostrado en otros árboles.

Actualmente, ninguna partícula viral ha sido detectada de manera directa en estas plantas que muestran síntomas de Pudrición de Cogollo.

En 1983/84, 9 cultivos fueron realizados a partir de 6 árboles afectados de PC, y 2 árboles sin síntomas de PC (supuestamente sanos). Como otro control, realizamos el cultivo a partir de una palma afectada por la enfermedad "mancha anular" (TA). Después de la obtención de los callos, los embriones fueron desarrollados y las plantas fueron obtenidas a partir de 2 palmas afectadas de PC y de la palma afectada de TA. Luego de la aclimatación, las plántulas fueron guardadas en invernadero y observadas durante 12 a 36 meses. Más de 200 plantas de origen PC y 50 de origen TA fueron de esta manera producidas y estudiadas en Montpellier. Por otra parte, 46 plántulas de origen PC, 19 de origen TA y 28 de origen sano fueron plantadas en el Ecuador. Ningún síndrome característico de PC pudo ser observado sobre estas palmas obtenidas en CIV. Contrariamente, algunas plántulas de origen TA mostraron síntomas de manchas beige-amarillo, más o menos circulares, alineadas en el eje de las nervaduras. Es por lo tanto posible que el agente causal de los TA haya sido transferido a través del proceso de CIV por embriogénesis somática. Un estudio más profundo de esos casos permitiría pronunciarse sobre ese tipo de estrategia en el estudio de las enfermedades de origen desconocido de la palma de aceite.

Cinco cultivos, en 14 palmas enfermas afectadas de PC y 4 palmas sin síntomas, fueron intentadas en 1987-88. Lamentablemente, en 5 de esos árboles la pudrición estaba de tal manera avanzada, que los

cultivos fueron muy limitados. Actualmente, 20 plántulas ya fueron producidas a partir de 2 orígenes PC diferentes; embrioides han sido obtenidos de otros 3 orígenes. Si nada apareciera en el "estado tubo" en Montpellier, las plántulas serán enviadas al Ecuador, donde las mismas serán aclimatadas y plantadas en una zona no afectada por el enfermedad.

3. MICROSCOPIA ELECTRONICA

3.1 "Muestras de Campo"

Las muestras fueron fijadas en Shushufindi a partir de diferentes órganos de palmas enfermas (foliolos, base de flechas, inflorescencia, zona meristemática, raíz) a diferentes estados de la enfermedad.

El examen de los conductos libero-leñoso no reveló ningún micro-organismo de tipo bacteria o micoplasma. Los tubos cribosos presentan generalmente un aspecto normal. Dos anomalías retuvieron nuestra atención, sin haber podido ligarlas a la etiología de la PC (causa o consecuencia?): presencia de corpúsculos opacos, densos a los electrones en las células epidérmicas sub-epidérmicas, y presencia de red de fibrillas (ARN?) intravacuolares en algunas células del parénquima floémico. Debe anotarse igualmente, en particular sobre las palmas sometidas a test de inoculación en jaula con insectos, la existencia en superficie de numerosas bacterias localizadas principalmente en las invaginaciones, en el límite de dos células epidérmicas. Esas bacterias parecen protegidas por una capa de una sustancia indefinida, probablemente secretada por las bacterias, lo cual explica sin duda las numerosas contaminaciones obtenidas luego del establecimiento en cultivos por la CIV.

3.2 Material de CIV

Exámenes de microscopía electrónica, ya sea en coloración negativa (exámenes directos de los extractos), o después de la fijación de las muestras e inclusiones, fueron realizados de acuerdo a las diferentes etapas de la CIV: explantes foliares, callos, embrioides, plántulas.

Largas partículas, muy finas, parecidas a los closterovirus (800 a 1600 nanómetros) fueron observadas una vez (una sola vez !) sobre un explante de árbol enfermo. Este explante nunca dió callos y luego se necrosó. No tuvimos el tiempo de establecer una relación entre la necrosis del explante y la presencia de esas partículas.

Otras partículas filamentosas, igualmente muy largas, pero más anchas (125 a 1200 nm y 20 a 25 nm de diámetro), con un canal central, fueron puestas en evidencia en la flecha de palmas obtenidas de origen PC y presentando síntomas de manchas blanco crema. Sin embargo, ese mismo tipo de partículas ha podido ser detectado después en la flecha de palmas sanas.

4. ENFOQUES DE UNA HIPOTESIS ETIOLOGICA BACTERIANA

Frente a los numerosos casos de contaminación, observados después de la desinfección con hipoclorito de calcio, luego del establecimiento de los cultivos (CIV) y en razón de las numerosas bacterias observadas en microscopio sobre la superficie de los foliolos, intentamos, con la ayuda del Laboratorio de Bacteriología del CIRAD (P. FROSSARD), aislar una o dos bacterias que estarían específicamente asociadas a la PC: 27 bacterias Gram + y más de una sesentena de Gram - fueron aisladas. En función del color y del aspecto de las colonias, su forma, test de fluorescencia, oxidasa, oxidación/ fermentación, nitrato, arginina, pudimos identificar: cocos, **Erwinia** (*E. herbicola* y *E. spp.*), igualmente otras enterobacterias no patógenas, *Pseudomonas* fluorescentes saprófitas, otras **Pseudomonas** spp.

La mayoría de esas bacterias fueron objeto de un test de hipersensibilidad sobre tabaco. Tres aislados solamente (**1 Erwinia sp.**, **2 Pseudomonas**) dieron un test positivo.

Sin embargo, ensayos de inoculación sobre la palma de aceite, en invernadero en Montpellier o en plantación en Ecuador, se revelaron negativos.

5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

Frente a la imposibilidad de visualizar directamente partículas virales, intentamos poner en evidencia sus ácidos nucleicos, ya sea bajo la forma de genoma viral por sí mismo, o bajo su forma replicativa -RNA doble brin (RNA-db).

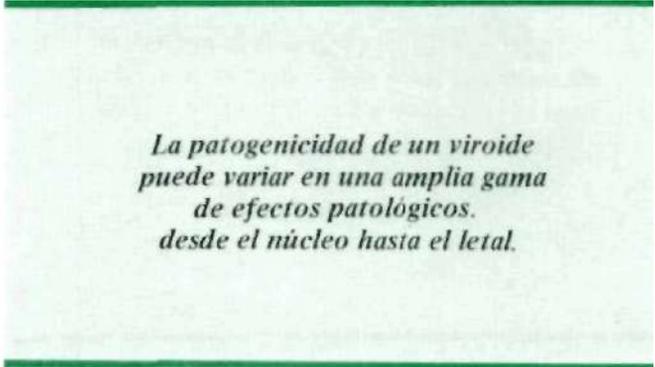
5.1 Geoma Viral

Las electroforésis en gel de poliacrilamida de los ácidos nucleicos totales de palma de aceite enferma y de palma sana no permiten diferenciar una(s) banda(s) relacionada(s) con la enfermedad. Las ban-

das son numerosas para poder ser claramente diferenciadas.

5.2 Acido nucleico de tipo viroide

Los viroides son los más pequeños agentes patógenos conocidos hasta ahora. Ellos están compuestos únicamente de un ácido nucleico —ARN— sin capa protéica. Ellos poseen una estructura particular de molécula circular replegada sobre ella misma, con apareamientos de bases. Esta estructura confiere a los viroides propiedades físico-químicas particulares, utilizadas para su puesta en evidencia. Así, SCHUMACHER et al (Annal. Biochem., 1983, 135: 288-295) han desarrollado una técnica de electroforésis bidireccional - 1ra. dirección en condiciones nativas, 2da. dirección en condiciones desnaturalizadas- para la detección de los viroides y virusoides.



*La patogenicidad de un viroide
puede variar en una amplia gama
de efectos patológicos.
desde el núcleo hasta el letal.*

Hemos podido así, desde 1984, detectar una banda a las propiedades de viroide en las muestras enviadas de Shushufindi. Pero la presencia de esta banda, en las palmas alcanzadas de PC así como en las palmas sanas, hace que no hayamos entonces llegado más lejos en estas investigaciones. En consideración a que las demás pistas etiológicas se habían revelado estériles, en 1988, hemos vuelto sobre esta banda de tipo viroide. Además el hecho que la mayoría de las hipótesis habían sido eliminadas, otros dos elementos nos incitaron a retomar esta pista:

- a. El Cadang-Cadang es una enfermedad viroide del cocotero y de la palma que fue considerada largo tiempo como una enfermedad estrictamente localizada en las Filipinas. Pero en 1982, un viroide muy cercano ha sido identificado en otra enfermedad del cocotero en las Islas Marianas. Y en 1987, un viroide muy cercano, si no idéntico, al viroide del Cadang-Cadang (CCCVd) fue identificado en las Islas

Salomón sobre palma de aceite, sin síntomas de Candang-Cadang.

b. Un viroide latente ha sido puesto en evidencia sobre Lúpulo en numerosos países. Ahora bien sabemos, gracias a los trabajos de mutagénesis dirigida, que la patogenicidad de un viroide puede variar, en una amplia gama de efectos patológicos, yendo de un efecto patogénico casi nulo a un efecto letal, por cambios muy puntuales, de una sola base, en la secuencia de los nucleótidos del viroide.

Cabe destacar que utilizando la misma técnica, hemos podido verificar la presencia de esta misma banda de tipo viroide en muestras sanas y enfermas del Brasil (DENPASA).

Se ha puesto en evidencia la presencia de números ARN doble brin en asociación con el síndrome de Pudrición de Cogollo. Aún no se ha establecido si son una consecuencia de la enfermedad o el origen de la misma.

5.3 Hibridaciones moleculares

La mayoría de los viroides presentan homologías de secuencia entre ellos, homologías variables que van de 35 a 76%. Ciertas regiones son muy conservadas. Es entonces posible hibridar varios viroides con una sonda molecular ARN ó ADN de secuencia complementaria a un viroide dado. Y así, servirse de esas sondas como herramienta de diagnóstico.

Hemos utilizado sondas químicas de detección de Crysanthemum Stunt Viroid (CSVd), de el Avocado Sunblotch Viroid (ASVd) y del CCCVd.

Hemos igualmente empleado las sondas radioactivas marcadas al 32p del CCCVd, CSVd, del Hop Stunt Exocortis (HSVd), Tomato Apical Stunt Viroid (TASVd), Citrus Exocortis Viroid (CEVd) y del Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd). Las hibridaciones han sido realizadas en Dot-Blot (ácidos nucleicos en mezcla depositada sobre nitrocelulosa) o en Northen-Blot (después separación de los diferentes acidos nucleicos en electroforésis y transfe-

rencia del electroforegrama sobre nitrocelulosa o nylon).

En Dot-Blot, las hibridaciones han sido obtenidas con cada una de las sondas testadas (para 10 a 30% de las muestras).

En Northern-Blot, ninguna hibridación ha sido obtenida con sondas HSVd, y una sonda híbrida CEVd-CSVd. Una ligera hibridación ha sido obtenida con TASVd. Una membrana de nitrocelulosa idéntica enviada a J. RANGLES en Australia se ha revelado igualmente positiva con una sonda CCCVd. Sin embargo, ensayos complementarios realizados en laboratorio con una sonda CCCVd (BRESSA-TEC) estuvieron negativos con las muestras PC, y los testigos CCCVd reaccionaron positivamente.

5.4 ARN doble brin

Si los viroides presentan entre ellos homologías de secuencia, presentan también homologías estructurales y de secuencia con los virusoides y los ARN satélites de virus, que podemos considerar como ARN doble brin (ARN db). Sabemos por otra parte que los virus de ARN, cuando ellos se multiplican en las células, pasan por una "forma replicativa" que es un ARN doble brin, tipo de molécula que no existe en una planta sana. Hemos entonces investigado la presencia de ARN db en las palmas afectadas de PC. Utilizando la técnica de cromatografía sobre CF11 celulosa (MORIS and DOBB, Phytopathology, 1979, 69: 854 - 858), hemos podido poner en evidencia la presencia de una decena de bandas sensibles a la RNase a baja fuerza iónica.

En electroforésis bidimensional (con primera dimensión en condiciones desnaturalizadas y segunda en condiciones nativas), se pone igualmente en evidencia numerosos ARN db: ARN de alto peso molecular quedan en lo alto del gel y algunos ARN de PM pudiendo corresponder a estructuras de tipo viroide o satélite. Los ARN db de alto PM son mucho más concentrados en las plantas enfermas que en las plantas sanas. La verificación de la naturaleza de db de todos estos ARN ha sido hecha por reacción serológica con un anticuerpo monoclonal 1 específico de los ARN db, producido por la Universidad de Dusseldorf. Pero la "banda de tipo viroide" que nosotros habíamos aislado desde 1984 reacciona igualmente con este anticuerpo. Además el perfil de electroforésis en termogradiante (en Urea 5M) de esta "banda de tipo viroide" muestra un punto de desnaturalización a 46 C, lo que corres-

ponde más a una estructura de tipo ARNdb que a una estructura viroide.

6. TRANSMISION MECANICA DE LA PC

6.1 Transmisión mecánica del virus

Hemos ensayado la transmisión de la PC siguiendo las técnicas clásicas de virología vegetal, de palma a palma o de palma a planta test: **Chenopodium amaranticolor**, **Gomphrena globosa**, **Vinca rosea**, **Datura stramonium**, **Nicotiana rustica**, **N. tabacum**, **N. benthamiana**, **Beta vulgaris**, **Phaseolus vulgaris**, **Vigna unguiculata**, **Cucumis sativus**.

Ninguna transmisión mecánica ha podido ser obtenida, cualquiera que sea el protocolo utilizado (variación del inóculo, variación del tampón...).

6.2 Transmisión del ARN de tipo Viroide.

La banda de tipo viroide aislada por la técnica denominada específica de los viroides, de electroforesis bidireccional, podría existir en las palmas enfermas bajo una forma diferente -y sobre todo patógena- de la forma encontrada en las palmas sanas. Esta diferencia podría no detectarse en electroforesis (mutación puntual). Nosotros hemos entonces ensayado probar la eventual patogenicidad de esta banda.

Habiendo dado las débiles concentraciones obtenidas después de una purificación completa de este ARN, no hemos hecho sino purificaciones parciales que hemos inoculado inmediatamente a palmas sanas, bajo presión con la ayuda de un dermojet y sobre diferentes plantas test: pepino, tomate.

Ningún síntoma ha sido obtenido sobre las plantas test después de 2 meses en invernadero y no hemos podido volver a encontrar la banda de tipo viroide en esas plantas. Las palmas, aún en observación para algunos, no presentan ningún síntoma de PC, 2 años después de la inoculación.

7. CONCLUSION.

Después de las eliminaciones sucesivas por diferentes equipos independientes de las hipótesis etiológicas nematodo, insecto, hongo, bacteria, y en el estado de nuestros conocimientos actuales, que los agentes patógenos de tipo micoplasma, virus o viroides. Las investigaciones en microscopía electró-

nica permiten descartar la hipótesis micoplasma. A pesar de la ausencia de visualización directa de partículas virales hasta éste día, no podemos descartar definitivamente esta hipótesis en razón de la talla de esas eventuales partículas, de su posible débil concentración y de una posible desigual repartición en la planta. No podemos tampoco descartar definitivamente la hipótesis viroide y sería interesante identificar claramente la naturaleza de esta banda de tipo viroide y comparar eventualmente la secuencia de esta banda en las palmas sanas y palmas enfermas. En fin hemos podido poner en evidencia la presencia de numerosos ARN doble brin en asociación con el síndrome de PC, y habrá que intensificar las investigaciones en ese dominio ensayando para comprender, si ellos no son una consecuencia de la enfermedad o si ellos pueden ser el origen de la misma.

BOMBAS



Ofrecemos los más altos índices de rendimiento y duración en el manejo de sólidos y líquidos abrasivos

ingeniería aplicada al desarrollo de Colombia

USOS MAS FRECUENTES

- * PALMISTERIA
- * LAVADORES DE FRUTA
- * ACEITE CRUDO
- * HIDROCICLONES

26 AÑOS PRODUCIENDO LOS EQUIPOS DE BOMBEO MAS EFICIENTES DEL MERCADO NACIONAL

VACIO TURBINA MULTITETAPAS PIÑONES

FABRICANTES



Calle 14 No. 32-44 Tels.: 2775051 - 2472613 - 2471272
Fax (91) 2372565 A.A. 29625 BOGOTA D.E.