

Detección de un virus asociado a la Mancha Anular de la palma de aceite en Tumaco, Nariño

Detection of a Fovea-like Virus in African Oil Palms Affected by a Lethal 'Ringspot' Disease in Tumaco, Nariño

F. J. Morales;
I. Lozano,
A. C. Velasco;
J. A. Arroyave¹

Resumen

Un virus con partículas filamentosas de alrededor de 800 nm de longitud se asoció consistentemente con la enfermedad letal de palmas de aceite jóvenes, conocida como 'Mancha Anular' en Colombia, Ecuador y Perú. La caracterización molecular parcial mostró que el virus de la palma de aceite está genéticamente relacionado (40-67% de identidad en la secuencia de aminoácidos del gen ORF 1) con dos especies reconocidas y dos tentativas del género *Foveavirus*: el virus del *Apple stem pitting* y el virus del *Rupestris stem pitting*, y el virus del *Cherry green ring mottle* y el virus del *Cherry necrotic rusty mottle*, respectivamente. El *Foveavirus* constituye un nuevo género de virus a nivel mundial, y hasta ahora no se les conoce un agente vector. En el caso de los virus antes mencionados, su transmisión se realiza por medio de la contaminación causada por el uso de herramientas para podar e injertar en esas especies frutales. En el caso de la palma de aceite se investigan los diferentes mecanismos posibles de transmisión.

Summary

A virus with filamentous particles of about 800 nm in length was consistently associated with the Lethal disease of young African oil palms, referred to as "ringspot" in Colombia, Ecuador and Peru, South America. Partial molecular characterization showed the virus to be distinct but related (51-67% - amino acid (AA) sequence identities ORF 1) to two tentative species of the genus *Foveavirus*, namely *Cherry green ring mottle virus* and *Cherry necrotic rusty mottle virus*; 40-62% AA sequence identities were observed for the same region of the African oil palm virus and the foveaviruses. *Apple stem pitting* and *Rupestris stem pitting-associated virus*, respectively.

Palabras Claves

Taima de aceite. *Elaeis guineensis*,
Mancha Anular. *Bactris* sp.,
Foveavirus, Enfermedades de la
plantas, Virosis.

1 Unidad de Investigación Virología. Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT.
Cali, Colombia (correspondencias F. J. Morales. E-mail: f.morales@cgiar.org
Recibido: enero 2003. Aprobado: abril 2003.

Introducción

La "Mancha Anular" de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) se observó por primera vez en 1969 (Dzido et al. 1978; Arévalo 1988) en el departamento amazónico de San Martín. Perú. La enfermedad afectaba las palmas de 1-3 años de edad, induciendo una clorosis sistémica en las hojas más jóvenes, y manchas anulares en los folíolos, la base del raquis de las hojas flecha y las primeras hojas. Posteriormente, las raíces y la hoja flecha desarrollaban necrosis sistémica, causando la muerte del meristemo. Un corte transversal del tallo de las palmas de aceite afectadas por la Mancha Anular, cerca de la inserción de las raíces, mostró una coloración púrpura característica en el sistema vascular de la raíz. Más arriba del tallo se observó igualmente una necrosis violácea en forma de anillo. Usualmente, las plantas murieron en un término de 3-4 meses a partir de la expresión del síntoma inicial. Las palmas mayores de 5 años de edad no se vieron afectadas.

Una característica importante del virus de la Mancha Anular de la palma de aceite, es su rápida diseminación durante ciertos años y épocas del año.

La enfermedad letal Mancha Anular reapareció alrededor de 1974 en la región noroccidental productora de palma de aceite en Ecuador, donde se denominó "amarillamiento letal" y "moteado de los brotes" (Dzido et al. 1978; Chávez 1988). La incidencia de la enfermedad varió entre 3 y 40%, pero a veces ocurrieron pérdidas de hasta el 95% de las palmas de 18-24 meses de edad. En 1985, una enfermedad letal similar alcanzó la región vecina de producción de palma de aceite de Tumaco, en el suroccidente de Colombia (Jiménez 1988). En esta región, sin embargo, los síntomas característicos consisten de manchas amarillas alargadas, que aparecen eventualmente como vetas en los folíolos basales y raquis de las hojas de las palmas de aceite afectadas. La expresión de los síntomas parece

variar con la localización geográfica (Dzido et al. 1978) o tal vez con la latitud y las condiciones ambientales. Hacia 1988, la enfermedad estaba afectando plantaciones jóvenes de hasta 2,5 años de edad, en una área de alrededor de 4.500 hectáreas. La incidencia de la enfermedad varió entre 2 y 45%, y las palmas afectadas se detectaron, usualmente, en focos (Jiménez 1988). Investigaciones diversas efectuadas en los Estados Unidos, Francia y Latinoamérica sobre la etiología de esta enfermedad, no han conseguido demostrar la presencia de un patógeno identificable (Dzido et al. 1978; Dollet et al. 1980; Renard y Quillec 1984; Arévalo 1988; Corley y Wood 1980).

Esta investigación se inició formalmente en el segundo semestre de 1998 y se llevó a cabo en respuesta a la creciente incidencia de la 'Mancha Anular' en el suroccidente de Colombia. Considerando que la enfermedad se había difundido desde las selvas del Perú pasando por las montañas andinas para llegar al norte del Ecuador y, posteriormente, al sur de Colombia, en necesario considerarla como una amenaza a las restantes 130.000 hectáreas de palma de aceite cultivada en este país, el principal productor de este cultivo en Latinoamérica. Esta enfermedad constituye, asimismo, una preocupación para otros países en Latinoamérica, tales como Brasil, Venezuela, Surinam, Costa Rica, Guatemala, Honduras, México y Nicaragua, que cultivan alrededor de 160.000 hectáreas adicionales de palma de aceite. Ecuador y Perú ya tienen más de 100.000 hectáreas de palma de aceite en peligro. Esta investigación puede beneficiar, además, a productores en pequeña escala de palma de aceite en África Occidental, el centro de origen de *E. guineensis* (Sauer 1984), donde se han observado síntomas similares (Renard y Quillec 1984).

Materiales y Métodos

Los aislamientos de virus se adquirieron de hojas flecha de palmas de aceite de 1 a 2 años de edad que manifestaban el amarillamiento foliar característico (Fig. 1) y manchado de las hojas más jóvenes y raquis, en el municipio de Tumaco, Nariño. Los tallos de las palmas afectadas se cortaron en dos partes para observar la necrosis violácea característica de la Mancha Anular. De igual forma, se analizó una muestra de hoja obtenida de una palma silvestre del género *Bactris* (tentativamente identificada como *B. setulosa*) encontrada en el municipio de Tumaco con evidencias de síntomas de amarillamiento foliar, similares a los descritos para la 'Mancha Anular' en la palma de aceite. Así mismo, en todas las pruebas se incluyeron muestras de palmas de aceite libres de síntomas.

Pruebas de Patogenicidad

Las siguientes especies vegetales se inocularon mecánicamente con extractos obtenidos de tejido de hoja afectada por Mancha Anular, diluido 1:4 ó 1:10 (peso/volumen) en agua destilada estéril o tampón preparado como 0,5 ó 0,1 M de tampón de fosfato de potasio, pH 7,5, que contenía 0,5 g de sulfito de sodio y 1 nM de dietilditiocarbamato de sodio (DIECA): *Chenopodium album* L., *C. amaranticolor*, *C. Quinoa* Wild., *C. murale*, *Elaeis guineensis* Jacq., *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* cv. 'Samsun', *Sorghum bicolor* cv. Rio, y *Zea mays* L. Extractos de palma de aceite infectada se inocularon con gasa estéril, alfileres estériles y jeringas en plántulas sanas de esta especie, utilizando 10 plántulas por ensayo.

Microscopía Electrónica

Extractos de hoja, tomados de palmas de aceite sintomáticas, se tiñeron negativamente en acetato de uranilo al 2%, pH 3,7, y se examinaron para detectar la presencia de partículas de virus usando un microscopio electrónico JEOL JEM-1010. Se prepararon muestras de tejido de hoja de palmas de aceite enfermas y sanas para citología, como se describió anteriormente (Morales et al. 1990). Los cortes finos de tejido se hicieron con una cuchilla de diamante empleando un ultra-microtomo MT 6000 de la Sorval.

Electroforesis

Las extracciones de ARN de doble cadena (ARNdc) se hicieron a partir de plantas de palma de aceites sanas y afectadas por Mancha Anular según el procedimiento de Dodds y Bar-Joseph (1993). Los pesos aproximados del ARN de doble cadena se estimaron usando un patrón de ADN de 1-Kb (Gibco BRL, Rockville, MD, USA). La muestra procedente de la planta de *Bactris* sp. afectada, se procesó de la misma manera.

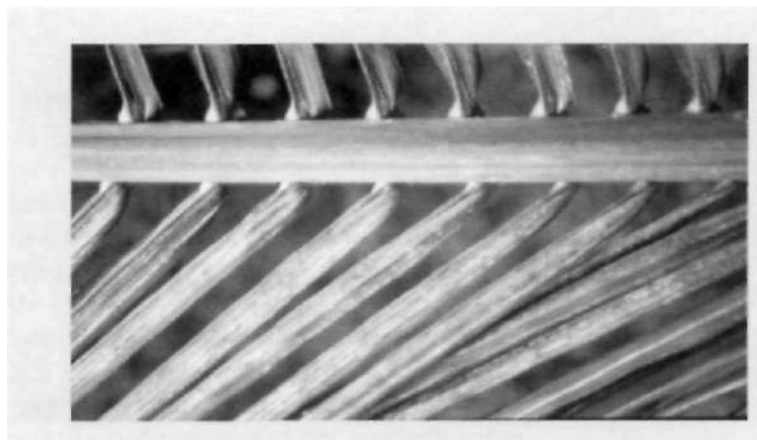


Figura 1

Palma de aceite joven con evidencias de amarillamiento foliar inicial asociado con la enfermedad letal 'Mancha Anular'

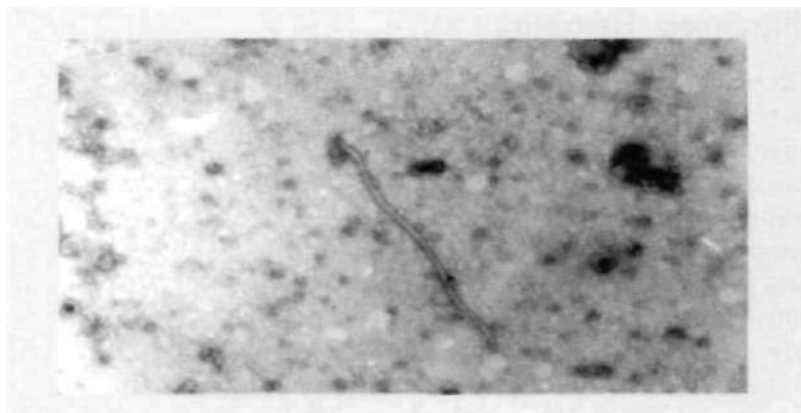


Figura 2 Partícula filamentososa observada en extractos de tejido de hoja de palmas de aceite afectadas por la enfermedad 'Mancha Anular'.
Bar - 200 nm

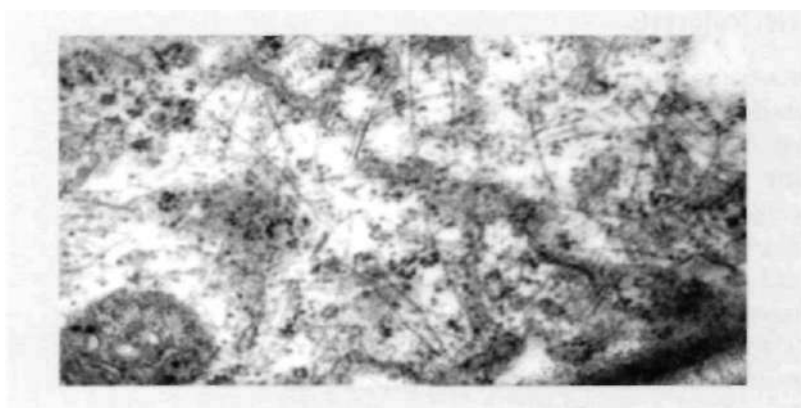


Figura 3 Partículas filamentosas observadas en el citoplasma de células de hoja de palma de aceite afectada por la enfermedad 'Mancha Anular'.
Bar - 400 nm

Extracción de Ácido Nucleico, Síntesis de ADN Complementario y Clonado

Las especies de ARNdc se separaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Gibco BRL) y luego se volvieron a extraer empleando un juego de Rneasy acorde con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA. USA). Los procedimientos de extracción, síntesis de ADN complementario y clonado han sido descritos en detalle en una publicación previa (Morales et al. 2002).

Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo con un secuenciador automático de ADN ABI PRISM 377 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Las secuencias obtenidas se analizaron empleando el programa BLAST del Centro Nacional de Información de Biotecnología (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, USA).

Resultados

Ninguna de las especies vegetales inoculadas mecánicamente desarrolló síntomas o mostró al microscopio electrónico partículas similares a virus. Las plántulas de palma de aceite inoculadas se mantuvieron bajo observación durante un año, pero ninguna de las 10 plántulas inoculadas por los métodos mecánicos describió algún síntoma. En la actualidad se realizan experimentos de transmisión mediante poda de hojas en condiciones de campo.

La observación directa de extractos de tejido de hojas flecha teñidos negativamente, reveló consistentemente la presencia de partículas filamentosas parecidas a virus, de aproximadamente 800 nm de longitud y 15 nm de diámetro (Fig. 2), aunque en muy baja concentración. Partículas filamentosas similares, parecidas a virus, se observaron en el citoplasma de células de hoja de palmas de aceite afectadas por la Mancha Anular. Estas partículas se observaron en el mesofilo (Fig. 3) y no formaron algún tipo reconocible de inclusión o viroplasma. No se observaron partículas filamentosas en extractos de tejido o secciones de tejido de varias palmas de aceite asintomáticas, utilizadas como controles libres de virus.

La extracción y electroforesis del ARNdc de palmas de aceite afectadas por la Mancha Anular reveló la presen-

cía de una banda predominante (Fig. 4) de aproximadamente 8.034 pares de bases (pb) en tamaño. Se visualizaron también dos bandas menores de aproximadamente 7.171 y 5.854 pb, aparentemente sub-productos de la banda predominante.

Se secuenciaron dos conjuntos de secuencias solapadas de un solo clon. El primer conjunto de 15 clones produjo una secuencia continua de 3.491 pb con una identidad de secuencia de aminoácidos (aa) del 51 % para el ORF 1 proximal 5' del virus del *Cherry green ring motile* (CGRMV) y el virus *Cherry necrotic rusty motile* (CNRMV). El CGRMV es una especie tentativa del género *Foveavirus* (Regenmortel et al. 2000) y CNRMV está estrechamente relacionado con el CGRMV (Rott y Jelkmann 2001). La similitud de secuencia de aa para la región ORF 1 del virus de la palma de aceite fue del 70 y del 69% cuando se comparó con el CGRMV y el CNRMV, respectivamente. Identidades de secuencia de aa inferiores (40 y 42%) y similitudes del 62 y 61% se obtuvieron en comparaciones con las secuencias correspondientes del ORF 1 proximal del virus del *Apple stem pitting* (ASPV) y el virus asociado del *Rupestris stem pitting* (RSPaV), las dos especies reconocidas del género *Foveavirus* (Regenmortel et al. 2000).

El segundo conjunto de nueve clones solapados con una secuencia continua de 1.667 pb mostró identidades de secuencia de aa de 67% con la región ORF 1 3' terminal de los virus CGRMV y CNRMV. La similitud de secuencia aa para esta región fue del 78% con estos dos *Foveavirus* tentativos. Nuevamente se observaron identidades de secuencia de aa inferiores (60 y 62%) y similitudes (74 y 76%) entre la palma de aceite y ASPV y RSPaV. Un solo clon de 671 pb contenía un fragmento de 469 bp que mostró identidades de secuencia de aa

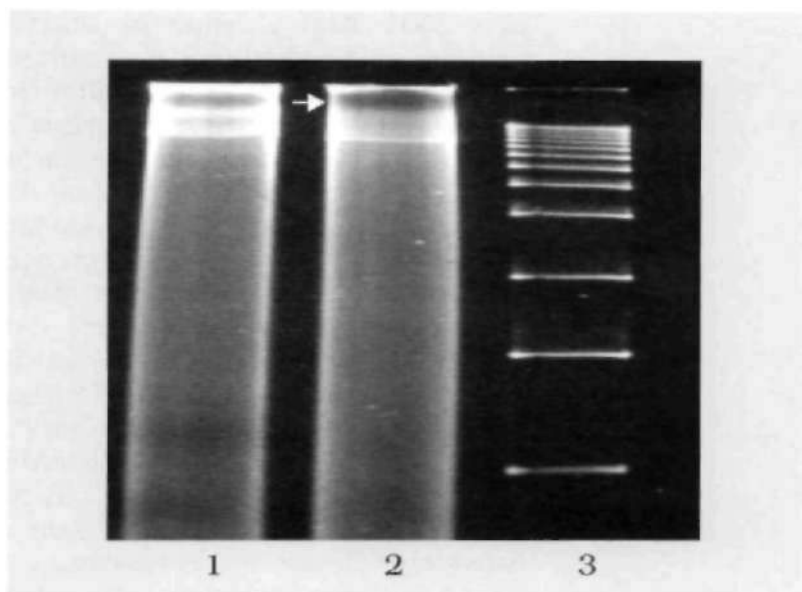


Figura 4

Electroforesis de ARN de doble cadena. Pista 1, hoja flecha de una palma de aceite sana; Pista 2, hoja flecha de una palma de aceite afectada por la enfermedad 'Mancha Anular'; Pista 3, plantilla 1 Kb ADN Ladder

del 50, 48 y 33% con la región ORF 1, 3'-terminal de los virus CGRMV, *Banana mild mosaic* (BanMMV), y ASPV, respectivamente. El fragmento restante 202 bp mostró identidades de secuencia del 42, 34 y 29% con la región ORF 5 5' terminal (cubierta protéica) de los virus CNRMV, CGRMV y BanMMV, respectivamente.

Discusión

Esta investigación mostró que la enfermedad de la 'Mancha Anular' en la palma de aceite en Colombia está asociada con un virus filamentosos relacionado con especies (CGRMV) tentativas y especies actualmente reconocidas (ASPV y RSPaV) del género *Foveavirus* (Zhang et al. 1998; Regenmortel et al. 2000; Rott y Jelkmann 2001). El virus de la palma de aceite se relacionó también con los virus CNRMV y BanMMV, virus que han sido también asociados con los virus ASPV y CGRMV (Gambley y Tho-

mas 2001; Rott y Jelkmann 2001). Aunque es posible que un trabajo taxonómico posterior pueda conducir a la reclasificación de los *Foveavirus* y especies similares descritas hasta la fecha, el virus aislado de palmas de aceite afectadas por la Mancha Anular se encuentra muy estrechamente relacionado con las especies reconocidas y tentativas actuales del género *Foveavirus*. Una característica importante del virus de la Mancha Anular de la palma de aceite (AOPRV), es su rápida diseminación durante ciertos años y épocas del año. Este patrón epidemiológico es interesante, considerando que los *Foveavirus* no tienen vectores biológicos conocidos (Regenmortel et al. 2000) y la palma de aceite no requiere tratamientos culturales de ninguna clase, tales como injertos o podas, durante su intervalo susceptible de vida (primeros tres años de edad). Con base en la observación que la enfermedad de la Mancha Anular de la palma de aceite

se difunde más rápidamente durante épocas de precipitación relativamente baja, no puede descartarse en este momento la posible existencia de un vector artrópodo.

Esta investigación y un trabajo anterior (Morales et al. 2002), han demostrado la existencia de dos virus filamentosos diferentes en palmas de aceite cultivadas en el suroccidente de Colombia. Estos hallazgos podrían explicar o corroborar informes anteriores sobre la presencia de partículas con apariencia de virus filamentosos (Plumb et al. 1978) y potyvirus (Chinchilla et al. 1995; Solomon y Babu 1988) en palma de aceite cultivada en otras partes del mundo.

Reconocimientos

Esta investigación fue posible gracias al apoyo logístico y financiero del Centro de Investigación de Palma de Aceite - Cenipalma.

Bibliografía

- AREVALO. E. 1988. Principales enfermedades de la palma aceitera en Tocache, Perú. En: B. Ramakrishna (Ed.). VI Seminario Problemas Fitopatológicos de la Palma Africana. Prociandino, Bucaramanga. Colombia, p.117-133.
- CHÁVEZ, F. 1988. Enfermedades presentes en la palma africana en Ecuador y su incidencia. In: B. Ramakrishna (Ed.). VI Seminario Problemas Fitopatológicos de la Palma Africana. Prociandino. Bucaramanga. Colombia, p.113-116.
- CHINCHILLA. C.; RIVERA. C.; MOREIRA. I.; PEREIRA. R. 1995. Síntomas asociados a virus en viveros de palma aceitera en Ecuador. Informe Especial ASD. Costa Rica.
- CORLEY. R.H.V.; WOOD, B.J. 1990. Fatal Yellowing and Bud Rot Conditions of Oil Palm in South America. Report on a Visit to Brasil. Ecuador and Colombia. Cenipalma. Document No. D-0277.
- DODDS. J.A.; BAR-JOSEPH. M. 1993. Double-stranded RNA from plants infected with closteroviruses. Phytopathology (Estados Unidos) v.73. p.419-423.
- DOLLET. M.; GARGANI. D.; DZIDO. J.L. 1980. Recherches sur l'etiologie de la maladie des taches annulaires du palmier á huile (*Elaeis guineensis*) sevrissant en Equateur et au Perou. Cenipalma. Document No. 1559.
- DZIDO, J.L.; GENTYP.; OLLAGNIER. M. 1978. Les principales maladies du palmier á huile en Equateur. Oléagineux (Francia) v.33. p.55-60.
- GAMBLEY. C.F.; THOMAS. J.E. 2001. Molecular characterization of Banana mild mosaic virus, a new filamentous virus in *Musa* spp. Archives of Virology (Austria) v.146. p. 1369-1379.
- JIMÉNEZ, O.D. 1988. Mancha anular de la palma africana de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en Colombia. Ascoli Informa (Colombia) v.14. p.55-57.
- MORALES. F.J.; NIESSEN. A.; RAMÍREZ. B.; CASTAÑO. M. 1990. Isolation and partial characterization of a geminivirus causing bean dwarf mosaic. Phytopathology (Estados Unidos) v.80. p.96-101.

- MORALES, F.J.; LOZANO. I.; SEDANO. R.; CASTAÑO. M.; ARROYAVE. J. 2002. Partial characterization of a potyvirus infecting African oil palm in South America. *J. Phytopathol* (Alemania) v. 150, p. 1-6.
- PLUMB, R.T.; DABEK. A.J.; SHAW, D.E. 1978. Viruses in oil palm. *Tropical Agriculture* (Trinidad y Tobago) v.55, p.59-63.
- RENARD. J.L.; QUILLEC. G. 1984. Les maladies graves du palmier à huile en Afrique et en Amérique du Sud. *Oléagineux* (Francia) v.39, p.57-62.
- REGENMORTEL. M.; FAUQUET. H.V. van C.M.; BISHOP, D.H. CARSTENS. E.B.; ESTENS. M.K. LEMON. S.M.; MANILOF, J. MAYO. M.A.. McGEOCH, D.J. PRINGLE. C.R.; WICKNER, R.B. 2000. *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, USA.
- ROTT, M.E.; JELKMANN, W. 2001. Complete nucleotide sequence of cherry necrotic rusty motile virus. *Archives of Virology* (Austria) v.146. p.395-401.
- SAUER, J.D. 1994. *Historical geography of crop plants: a select roster*. CRC Press, London. UK.
- SOLOMON. J.J.; BABU. M.K.; 1998. Incidence of potyvirus disease in oil palm nursery seedlings. *Journal of Oil Palm Research* (Malasia) v.10. p.52-56.
- ZHANG. Y.P.; KIRKPATRICK, B.C.; SMART. C.D.; UYEMOTO. J.K. 1998. cDNA cloning and molecular characterization of cherry green ring mottle virus. *Journal of General Virology* (Inglaterra) v.79, p.2275-2281.



Agroexport de Colombia Ltda

FERTILIZANTES Y MATERIAS PRIMAS

GRADOS SIMPLES

IMPORTADORES ✓	30-6-0 Nitrofosfato de Amonio Nitrasam 28-4-0-6 Sulfato de Potasio 0-0-50 (K ₂ O) 16(S) Fosfacid's (F) Total 25% Rapidamente asimilable 10% Lentamente asimilable 15% Calcio 36% (CaO) Azufre 5% (S)	Urea (46-0-0) Cloruro de Potasio DAP 18-46-0 Superfosfato Triple 0-46-0 Bórax 48% (USA) Sulfomag 22(K ₂ O) - 22% (S) -18% (MgO) Kieserita (25% MgO) (20% S) Cal Dolomita 33% MgO
DISTRIBUIDORES ✓	Calfos 20% P ₂ O ₅ (Roca Acidulada) A-micisur (Aminoácido) + NPK Sulfato de Calcio (Yeso Agrícola) 99% Sulfato de Amonio 21-0-0-24%(S) Oxido de Magnesio (88%)	Roca Fosfórica 22%, 26%, 30% Sinergiprón (Acido Húmico) Sulfato de Magnesio (18% MgO) Sumigilfo (R) 480SL (Glifosato)
REPRESENTANTES ✓		

GRADOS COMPUESTOS QUÍMICOS: 25-15-0-2-3 25-15-5-3-4
 17-6-18-2-3-1,6-0,1

EL PALMERO (Abono Químico) 15-4-23-4 (MgO) 2 (S)-0,1(B)-0,1(Zn)-0,04(Cu)

MEZCLAS ESPECIALES CON MATERIAS PRIMAS DE EXCELENTE CALIDAD

Bogotá D.C.: Avenida Eldorado No. 84A 55 Centro Cial. Dorado Plaza Of. 211
 Tels.: 5421766 - 2950503 - 2951685 - 2951472. Fax: 2958717 - 5402174
 Villavicencio: Av. 40 No. 35A-97 (Vía Acacias) Tels.: 633351 - 633832
 Ibagué: Cra. 5a. No. 39-78. Of. 404 Telefax: 654860
 Espinal: Calle 9a No. 3-30 Tels.: 484360- 485357



Abonos
NUTRIMON
 producen más ganancias
Tejas
 Techoline
IMPORTADOR