

Compte rendu du groupe de travail cocotier de l'ACIAR à Fiji, en novembre 1993, viroides et molécules de type viroïde

Minutes of the ACIAR coconut working group in Fiji, in November 1993, viroids and viroid-like molecules

M. DOLLET⁽¹⁾, F. ROGNON⁽²⁾

L'atelier de travail sur le cocotier organisé à Taveuni (Fidji) en novembre 1993, correspondait à la fin d'une revue externe des programmes engagés par l'ACIAR sur l'amélioration de la culture du cocotier dans le Pacifique. Ont participé à cet atelier. les membres de la revue externe, les chercheurs australiens engagés dans ces projets, des délégués de différents pays du Pacifique, et nous mêmes du CIRAD-CP, sur l'aimable invitation de l'ACIAR.

The coconut workshop organized in Taveuni (Fiji) in November 1993 coincided with the end of the external review of ACIAR's coconut growing improvement programmes in the Pacific. This workshop was attended by the members of the external review, Australian researchers involved in these projects, delegates from different Pacific countries and ourselves from CIRAD-CP, at ACIAR's invitation.

COMMUNICATIONS DES DELEGATIONS REGIONALES

Les mêmes thèmes principaux ont été retrouvés dans toutes les communications :

- diminution très nette des exportations de coprah et de l'huile de coco.
- Les principales causes de cette diminution sont d'une part, économiques -baisse des cours- et d'autre part, agronomiques -cocotiers de plus en plus séniles (souvent plus de 60 ans), faibles producteurs ;
- Les petites îles et atolls sont très dépendants pour leur économie des passages réguliers de bateaux (importations, courrier). Si l'exportation de coprah s'arrêtait, cet important moyen de communication disparaîtrait.
- Il n'y a pas de facteur limitant majeur pour cette culture au niveau phytosanitaire. La lutte biologique contre l'*Oryctes* avec des Baculovirus fonctionne bien sur les îles.
- Tous les pays souhaiteraient replanter avec des variétés ou hybrides plus performants, mais ils voient ces replantations en systèmes associés (cocotier/élevage, cocotier/"cash crop").

RECHERCHES SUR L'AMELIORATION VARIETALE DU COCOTIER

Les chercheurs australiens ont réalisé des prospections dans tout le pacifique, depuis le Sud-Est asiatique jusqu'en Polynésie.

(1) Unité de Recherche Défense des Cultures du CIRAD-CP - Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes (LPRC) CIRAD-ORSTOM - BP 5035 - 34032 Montpellier Cedex 1 - France

(2) Chef du Programme Cocotier du CIRAD-CP - BP 5035 - 34032 Montpellier Cedex 1 - France

PAPERS BY REGIONAL DELEGATES

The same main topics ran through all the papers:

- *very sharp drop in copra and coconut oil exports.*
- *The main causes of this drop are economic - lower prices - and agricultural - increasingly old coconut palms (often more than 60 years old), and low yielders.*
- *The economies of small islands and atolls are highly dependent upon the regular passage of boats (imports, mail). If copra exports came to a halt, this important means of communication would disappear.*
- *There is no major limiting phytosanitary factor for this crop. Biological control of Oryctes using Baculoviruses is working well on the islands.*
- *All the countries would like to replant with higher-yielding varieties or hybrids, but they see these replantings in a coconut-based farming system (coconut/livestock, coconut/cash crop).*

RESEARCH ON COCONUT VARIETAL IMPROVEMENT

Australian researchers have carried out surveys throughout the Pacific, from Southeast Asia to Polynesia.

(1) CIRAD-CP Crop Protection Research Unit - Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes (LPRC), CIRAD-ORSTOM - BP 5035 - 34032 Montpellier Cedex 1 - France

(2) Head of the CIRAD-CP Coconut Programme - BP 5035 - 34032 Montpellier Cedex 1 - France

La culture d'embryons en tube étant maintenant bien maîtrisée, les introductions de nouvelles variétés pourront se faire sous cette forme, éliminant ainsi la majorité des risques phytosanitaires (champignons, acariens, insectes).

Les techniques de biologie moléculaire, telles que les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et les RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) constituent probablement les meilleures approches pour la caractérisation des différentes variétés de cocotier. Les premiers résultats de R. Ashburner montrent une grande homogénéité globale des cocotiers du Pacifique. Par contre, le "Grand de Tahiti" serait très variable.

VIROÏDE DU CADANG-CADANG (CCCVD) ET MOLECULES DE TYPE VIROÏDE

Par des techniques de biologie moléculaire (électrophorèse) puis détection à l'aide de sondes moléculaires après transfert sur membrane des acides nucléiques du gel d'électrophorèse, l'équipe du Waite Agricultural Research Institute (J. Randles et collaborateurs) a mis en évidence l'existence de séquences d'acides nucléiques présentant de fortes homologies avec la séquence de l'ARN du CCCVd. Ces "molécules de type viroïde" (MTV) ont été identifiées dans 25 des 26 pays testés, situés entre l'Indonésie et la Polynésie. Les pourcentages d'arbres possédant ces MTV varient de 17 à 100 % suivant les zones géographiques. Or, aucun de ces arbres, exceptés ceux des Philippines et de Guam - où l'on sait déjà que des viroïdes phytopathogènes du cocotier existent - ne présentent de syndrome pathologique. Seules de faibles productions ou des sommets de stipes rétrécis ont parfois été notés, mais ce sont des symptômes classiques pour de vieux arbres sans entretien).

Suite à ces résultats, la FAO et l'IBPGR ont publié des "Technical guidelines for the safe movement of coconut germplasm"⁽¹⁾ dans lesquelles apparaît une recommandation d'indexation systématique - pour ces MTV - de tous les échanges de germplasm depuis des pays où ces MTV sont présentes vers des pays indemnes de MTV. Cependant, ces recommandations ne sont pas applicables car la liste des pays "contaminés" n'est pas publiée. Par ailleurs, l'équipe de virologie du CIRAD-CP à Montpellier a montré que des palmiers à huile malades ou sains d'Amérique du Sud ou d'Afrique hébergeaient ce que l'on pourrait aussi appeler des MTV en raison des techniques mises en jeu pour les détecter. Mais en utilisant d'autres techniques telles que l'électrophorèse en thermogradient ou la sérologie avec des anticorps monoclonaux anti ARN double-brin, il s'avère que ces MTV sont probablement des ARN double-brin et non des viroïdes. Ils ne sont par ailleurs aucunement associés à un syndrome pathologique quelconque. Un long débat a donc été engagé sur la nécessité ou l'inutilité de contrôler tous les échanges de germplasm pour la présence de MTV. J. Randles maintient sa position pour le contrôle, en s'appuyant sur le fait qu'un isolat très sévère du CCCVd qui présente une séquence très proche - mais avec quelques mutations - de celle du "CCCVd normal", a été identifié aux Philippines. Mais cet isolat provient d'un arbre inoculé mécaniquement sous pression avec des molécules extraites biochimiquement qui ne sont donc pas transmises dans des conditions naturelles.

La grande majorité des participants a admis que cette demande d'indexation reposait sur une succession d'événements hypothétiques (que ces MVT soient bien des viroïdes, qu'elles subissent des mutations qui les rendent

As embryo culture in test tubes has now been mastered, new varieties could be introduced in this form, thereby eliminating most of the phytosanitary risks (fungi, mites, insects).

Molecular biology techniques, such as RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) and RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) are probably the best way of characterizing different coconut varieties. The initial results obtained by R. Ashburner reveal considerable overall homogeneity within the coconuts of the Pacific, but the Tahiti Tall seems to be very variable.

CADANG-CADANG VIROID (CCCVD) AND VIROID-LIKE MOLECULES

The Waite Agricultural Research Institute (J. Randles and colleagues) have discovered the existence of nucleic acid sequences very similar to the CCCVd RNA sequence, using molecular biology techniques: electrophoresis, then detection using molecular probes after transferring the nucleic acids from the electrophoresis gel to membrane. These "viroid-like molecules" (VLM) have been identified in 25 of the 26 countries tested, between Indonesia and Polynesia. The percentages of trees with these VLM varied from 17 to 100% depending on the geographical zones. None of the palms, apart from those in the Philippines and on Guam - where viroid coconut pathogens are already known to exist - revealed a pathological syndrome. Only low yields or tapered stem tops were sometimes seen (but these are standard symptoms on old palms without upkeep).

Following these results, the FAO and IBPGR published "Technical guidelines for the safe movement of coconut germplasm"⁽¹⁾, in which systematic indexing for these VLM was recommended for any germplasm transfers from countries where the VLM exist to VLM-free countries. However, these recommendations are not applicable as the list of "contaminated" countries has not been published. Moreover, the CIRAD-CP virology team in Montpellier has shown that diseased or healthy oil palms in South America or Africa harbour what could be called VLM given the specific techniques required to detect them. However, other techniques such as thermogradient electrophoresis or serology with anti-double stranded RNA monoclonal antibodies have revealed that these VLM are probably double stranded RNA and not viroids. Furthermore, they are not associated with any pathological syndrome. A long debate has therefore begun as to the necessity or pointlessness of checking all germplasm exchanges for the existence of VLM. J. Randles remains in favour of checks, based on the fact that a very severe isolate of the CCCVd with a very similar sequence - though with a few mutations - to that of the "normal CCCVd" has been identified in the Philippines. Nevertheless, this isolate comes from a palm artificially inoculated under pressure with biochemically extracted molecules which are therefore not transmitted under natural conditions.

The great majority of participants agreed that this request for indexing was based on a succession of hypothetical events (that the VLM are indeed viroids, that they undergo mutations that make them pathogenic, that they multiply better than non-mutated VLM and, finally, that they are transmitted from tree to

(1) FAO/IBPGR Technical guidelines for the Safe movement of coconut germplasm. Ed E.A. Frison, C.A.J. Putter and M. Dieckmann 1993

(1) FAO/IBPGR Technical guidelines for the Safe movement of coconut germplasm. Ed E.A. Frison, C.A.J. Putter and M. Dieckmann 1993

pathogènes, qu'elles se multiplient mieux que les MTV non mutées et qu'enfin elles soient transmises d'arbre à arbre pour créer une épidémie). La justification du coût de tels contrôles a donc été mise en doute. Cependant les délégués présents des pays du Pacifique ont préféré, au bénéfice du doute -et seulement dans le cas des échanges dans le Pacifique- s'en tenir aux recommandations de la FAO-IBPGR.

Un communiqué final a toutefois fait expressément ressortir qu'il fallait :

- conduire des recherches sur l'éventuelle pathogénicité de ces MTV,
- caractériser ces MTV -démonstration de la nature "viroïdale"
- connaître l'étendue géographique de ces MTV,
- trouver les moyens nécessaires pour établir des centres d'indexation, car tout le monde a reconnu la nécessité, le besoin de continuer les échanges de germplasma pour le renouvellement et l'amélioration de la culture du cocotier.

COCONUT FOLIAR DECAY VIROID (CFDV)

J. Randles a présenté l'avancement des travaux sur le CFDV et plus particulièrement la mise au point d'hybridations moléculaires avec des sondes radioactives, puis des sondes "froides" (chimiques). La sensibilité des tests s'améliore mais il reste toujours des résultats inexplicables. Par contre, l'utilisation des anticorps monoclonaux reste toujours très difficile à mettre en oeuvre.

Remerciements. — Les auteurs remercient les organisateurs de la réunion, l'ACIAR, et plus particulièrement le Dr Mike Foale pour avoir bien voulu les inviter à cette réunion.

Remarque. — Le compte rendu de cet atelier de travail sera publié par l'ACIAR et cette note ne présente donc que les impressions des auteurs.

tree, creating an epidemic). It was therefore doubted that the costs of such checks could be justified. Nevertheless, for the benefit of the doubt, the delegates from Pacific countries preferred to follow FAO-IBPGR recommendations, though only for exchanges within the Pacific region.

Be that as it may, a final communiqué emphasized that it was necessary:

- to carry out research on the possible pathogenicity of these VLM,*
- to characterize these VLM - demonstration of their viroid nature,*
- to ascertain the geographical extent of these VLM,*
- to find the necessary resources to set up indexing centres, since everyone acknowledged the need to continue with germplasm exchanges to renew and improve coconut cultivation.*

COCONUT FOLIAR DECAY VIROID (CFDV)

J. Randles reported on the progress made in CFDV work, particularly the development of molecular hybridizations with radioactive probes, then "cold" probes (chemical). Test sensitivity is improving but unexplained results remain. However, the use of monoclonal antibodies is still very difficult.

Acknowledgments. — *The authors would like to thank ACIAR for organizing the meeting, particularly Dr. Mike Foale for inviting them*

Comment.— *The proceedings of this workshop are to be published by ACIAR and this brief note merely recounts the impressions of the authors.*