

Recherches actuelles de l'I.R.H.O. sur les dépérissements du cocotier et du palmier à huile en Amérique du Sud, associés aux protozoaires flagellés intraphloémiques (*Phytomonas*)⁽¹⁾

M. DOLLET (2)

avec la participation de G. LOPEZ (3), Ph. GENTY (3) et J. L. DZIDO (4)

Résumé. — Sur la côte Ouest de l'Equateur, entre Santo Domingo et l'océan, des cocotiers sont atteints de dépérissements soupçonnés généralement être de « l'anneau rouge ». Or, des contrôles systématiques montrent qu'il s'agit à 80 p. 100 environ d'un problème de protozoaires flagellés. Une étude des adventices trouvées près des plantations de palmiers ou de cocotiers en Equateur, a permis de révéler cinq espèces différentes d'Euphorbes et une Asclépiadacée hébergeant des flagellés. Deux espèces d'Euphorbe, *Euphorbia prostrata* (?) et *E. foliolosa* Boiss. (?) paraissent souffrir de cette infection. De plus, cette dernière se retrouve souvent dans les cercles de palmiers en plantation. Les autres ne présentent pas de symptômes mais *E. hirtella* Boiss. (?) est infectée à environ 90 p. 100 près de certaines plantations de cocotiers. *Asclepias curassavica* L. héberge également des flagellés sans symptômes. Dans une plantation mixte cocotiers-cacaoyers, nous avons pu noter sur cacaoyer un dépérissement semblable à celui de la nécrose du phloème du caféier, maladie à flagellés. Des essais chimiothérapeutiques ont été effectués *in vitro* et par injection dans des palmiers malades avec différents produits fournis par Rhône-Poulenc (Centre de Recherches Nicolas-Grillet de Vitry-France) : pentamidine dichlorhydrate, isometamidium chlorure, stilbamidine isethionate, et avec de l'endrine, insecticide utilisé préventivement contre la Marchitez du palmier.

Il est généralement admis que le développement du cocotier en Equateur est limité par le problème de l'« anneau rouge », maladie due au nématode *Rhadinaphelenchus*. Cette maladie existe en effet en Equateur, et il est possible de le vérifier car il existe un symptôme caractéristique qui sert de diagnostic : l'anneau rouge dans le stipe.

Dans une zone comprise entre Santo Domingo et l'océan Pacifique (Fig. 1) de nombreux cocotiers plantés près des habitations, ou en petites plantations, sont atteints par un dépérissement considéré par les planteurs comme étant de l'anneau rouge. Nous avons disséqué plusieurs de ces cocotiers afin d'étudier la symptomatologie de ces dépérissements et faire des examens en microscopie optique.

L'aspect d'ensemble des cocotiers à un stade avancé du dépérissement ressemble à celui de l'anneau rouge. Mais à ce stade là, l'anneau rouge ressemble également à la « pourriture du cœur » du cocotier, maladie à flagellés qui sévit au Surinam [1, 2]. Ce dépérissement des cocotiers en Equateur se rapproche également de la pourriture du cœur par le jaunissement des feuilles basses au début de la maladie. La chute des noix peut intervenir en même temps que le jaunissement des feuilles basses, ou plus tard. Au stade des premiers jaunissements on peut remarquer une couleur rose très prononcée sur les jeunes noix de 20 à 40 mm de diamètre, couleur que l'on retrouve également sur les organes femelles des inflorescences encore enfermées dans leur spathe.

Des coupes dans le stipe de sept cocotiers malades dans une plantation atteinte à 80 p. 100 environ à Viche, n'ont pas révélé d'anneau rouge. Par contre, les examens en microscopie optique de jus de racine

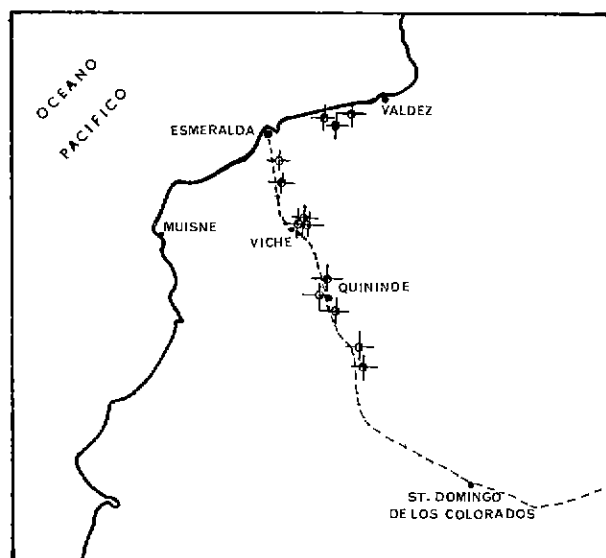


FIG. 1.

ou d'inflorescence effectués sur 5 de ces cocotiers nous ont permis d'observer la présence de protozoaires uniflagellés, similaires à ceux trouvés dans les palmiers à huile atteints de Marchitez [3].

Cinq cocotiers dépérissants pris au hasard entre Viche et Santo Domingo hébergeaient ce même type d'organisme et ne présentaient pas d'anneau rouge dans le stipe.

Sans remettre en question l'importance de l'anneau rouge en Equateur, il apparaît donc que ce dépérissement, lié à la présence des flagellés, a probablement joué un très grand rôle dans l'échec du développement du cocotier en Equateur.

Comme nous l'avons déjà évoqué au cours du troisième meeting dans le cas du jaunissement mortel [4], il apparaît une nouvelle fois que l'étude d'une maladie devrait obligatoirement commencer par une définition précise de la symptomatologie. Ensuite, il est important de trouver un moyen de diagnostic. Pour les dépéris-

(1) Communication présentée au 4^e Congrès de l'International Council on Lethal Yellowing, 13-17 août 1979, Fort-Lauderdale, FL (Etats-Unis).

(2) Département Virologie, I. R. H. O./GERDAT, B. P. 5035, 34032 Montpellier-Cedex (France).

(3) INDUPALMA, Ap. aereo 1535, Bucaramanga (Colombie).

(4) Palmeras de los Andes, Bosmediano 11.67, casilla 5115-Quilo (Equateur).

sements associés aux protozoaires uniflagellés il est nécessaire de prélever des échantillons et de faire des examens en microscopie optique. Avec un peu d'habitude, ils sont repérables dans une goutte de jus frais de racine ou d'inflorescence, grâce surtout à leur mobilité, au grossissement 40 ; autrement, on les identifie facilement en réalisant un frottis sur lame et en colorant au Giemsa ou autre colorant comme nous l'avons déjà publié [3]. Mais, toutes les racines ou toutes les inflorescences n'hébergent pas les flagellés, et il faut souvent faire plusieurs examens. Pour un cocotier de Viche, par exemple, il nous a fallu examiner 12 racines avant de trouver les premiers flagellés, et sur 20 examinées au total, seulement 6 étaient infectées. Sur ce même arbre, 1 inflorescence sur 4 examinées possédait des flagellés.

Une étude des plantes adventices trouvées près des plantations de palmiers ou de cocotiers nous a permis de trouver plusieurs plantes à latex hébergeant des protozoaires uniflagellés. On sait depuis 1909, grâce à Lafont [5], que les plantes à latex peuvent héberger des *Trypanosomatidae* pour lesquels Donovan [6] avait proposé le nom générique de *Phytomonas*. Nous avons trouvé 5 espèces d'euphorbes contaminées à la fois près des plantations de palmiers et près des plantations de cocotiers. Deux de ces espèces, *Euphorbia foliolosa* Boiss. [6 bis] et *E. prostrata* Ait. (la détermination de l'espèce demande à être confirmée) paraissent souffrir de cette infection. Pour *E. foliolosa* par exemple, on a 90 chances sur 100 de trouver des phytomonas dans des plantes présentant des feuilles brunes ou des rameaux sans feuilles, déformés, alors qu'il est très rare d'en trouver dans des plantes d'aspect normal. On observe ce même type de symptôme sur *E. prostrata*, ainsi qu'un aspect chétif et rabougri de la plante. Sur une troisième espèce non déterminée, on trouve des phytomonas associés à un jaunissement puis un brunissement des feuilles. Nous n'avons remarqué, par contre, aucun effet pathologique sur *Euphorbia bacteriana* Balbis ni sur *E. hirtella* Boiss., bien que cette dernière ait été trouvée infectée à près de 100 p. 100 près d'un foyer de maladie sur cocotiers. Parmi ces euphorbes, la première espèce *E. foliolosa* se retrouve fréquemment en Equateur dans les cercles dés herbés

autour des stipes de palmiers en plantation industrielle. D'après Gildardo Lopez, phytopathologiste d'Indupalma en Colombie, ces euphorbes se retrouvent fréquemment sur la plantation de San Alberto en Colombie. Dans les plantations de cocotiers sans plante de couverture, il existe également une asclépiadacée, *Asclepias curassavica* L. infectée par des phytomonas ne présentant aucun symptôme pathologique. Enfin, dans une plantation mixte cocotier-cacaoyer, où environ 50 p. 100 des cocotiers étaient malades, nous avons remarqué sur cacaoyer un dépérissement identique à celui du caféier au Surinam [7, 8, 9], appelé nécrose du phloème du caféier, et associé à la présence de flagellés. Nous avons examiné une dizaine de racines de ces cacaoyers mais nous n'avons pas trouvé de flagellés, cependant, dans les racines de cocotiers adjacents, prélevées à la base de ces cacaoyers, il y avait de très nombreux flagellés. Il est donc possible que le cacaoyer soit un autre hôte de ces protozoaires uniflagellés.

Des essais chimiothérapeutiques (Fig. 2) contre les flagellés du palmier et du cocotier ont été réalisés au Pérou et en Equateur, *in vitro* et *in vivo* avec des produits de recherches fournis par le centre Nicolas Grillet Rhône-Poulenc de Vitry-sur-Seine en France. Les essais *in vitro* ont été effectués sur des lames à cavité recouvertes d'une lamelle et placées en chambre humide à 20°C environ à l'obscurité. Environ 50 microlitres du produit à tester sont ajoutés à une goutte du jus de plante avec protozoaires de 0,1 ml environ.

La Pentamidine dichlorhydrate s'est révélée active *in vitro* sur les flagellés du palmier au Pérou ; à une concentration de 0,1 g/l, les flagellés ne survivent que 30 min contre 2 à 3 h pour les témoins, et ils sont tués en 2 à 3 min après addition d'une microgoutte de pentamidine à 1,5 g/l.

Sur les flagellés des cocotiers d'Equateur, le Stilbamidine Isethionate, une diamidine, a un léger effet à des concentrations supérieures à 10 g/l, et l'Isoméтамidium chlorure, une phenanthridine produit qui semble beaucoup plus actif. Deux essais *in vitro* ont également été faits avec différentes dilutions d'une solution d'endrine commerciale à 19 p. 100 qui sert à

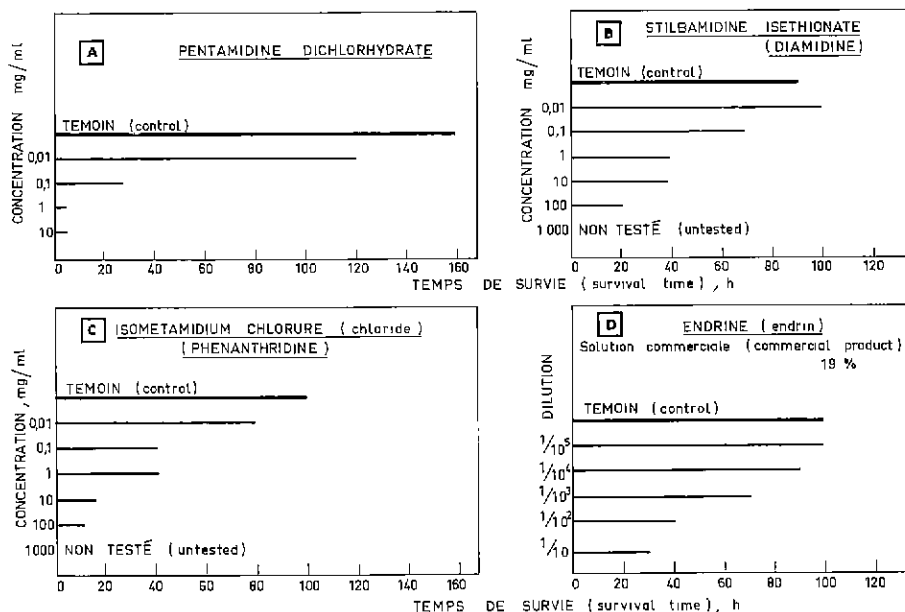


FIG. 2. — Action de produits antitrypanosomiasiques sur les flagellés du cocotier [B, C] et du palmier [A] sur lame *in vitro*, et action de l'endrine [D] *in vitro* sur les flagellés du cocotier.

(Action of antitrypanosomiasis products on coconut [B, C] and oil palm [A] on slides *in vitro*, and action of endrine [D] *in vitro* on coconut flagellates).

faire les traitements insecticides préventifs contre la Marchitez [10]. Les flagellés se sont révélés très résistants à ce produit même à une dilution au dixième.

Des essais *in vivo* ont été faits au Pérou avec la Pentamidine dichlorate. Nous avons d'abord cherché le seuil de phytotoxicité sur des arbres sains ; on n'observe aucune réaction pour 12 ml de produit injecté à une concentration de 2 g/l et seulement quelques taches nécrotiques marron sur 1 à 3 feuilles situées juste au-dessus du point d'injection pour une concentration de 3 g/l. Les essais curatifs sur arbres malades ont commencé avec des injections à 1,2 g/l, puis 3 g/l, mais nous n'avons obtenu aucune rémission sur les 8 palmiers traités dès les premiers symptômes. Trois explications peuvent être envisagées pour cet échec des traitements curatifs : 1 — une trop grande dilution

des produits dans le palmier ; 2 — état trop avancé de la maladie lorsque les symptômes externes apparaissent ; 3 — une plus grande résistance des flagellés au produit *in vivo*, que *in vitro*. Des essais à plus grandes concentrations et une recherche de produits plus actifs sont donc peut-être à envisager. Mais il est certain que ce genre de recherche serait plus facile avec une culture de flagellés sur milieu synthétique. La culture est également une étape essentielle dans la phytopathogénéité de ces organismes, c'est pourquoi nous venons d'aborder ce travail.

Remerciements. — Nous tenons à remercier M. L. Lacroix du Centre de Recherches Nicolas-Grillet, de Rhône-Poulenc, pour la fourniture de produits de recherches antitrypanosomiasés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PARTHASARATHY M. V., VAN SLOBBE W. G., SODANT C. (1976). — Trypanosomatid Flagellate in the phloem of diseased coconut palms. *Science*, 192, p. 1346-1348.
- [2] PARTHASARATHY M. V., VAN SLOBBE W. G. (1978). — Hartrot or fatal wilt of palms. I. Coconut (*Cocos nucifera*). *Principes (J. Palm Soc.)*, 22, N° 1, p. 3-25.
- [3] DOLLET M., LOPEZ G. (1978). — Study of the association between Flagellate Protozoa and « Marchitez sorpresiva » in South American oil palms. — *Oléagineux*, 33, N° 5, p. 209-217 (bilingue français-anglais).
- [4] ICLY (1978). — Proceedings third meeting of the International Council on Lethal Yellowing. — *Publ. Fl.*, 78-2, p. 12-17.
- [5] LAFONT A. (1909). Sur la présence d'un parasite de la classe des flagellés dans le latex de l'*Euphorbia pilulifera*. — *C. R. Soc. biol.*, 66, p. 1011-1013.
- [6] DONOVAN C. (1909). — Kala-azar in Madras, especially with regard to its connection with the dog and the bug (*Conorhinus*). — *Lancet*, Nov. 20, p. 1495-1496.
- [6 bis] — La tentative de détermination des Euphorbes a été faite sous toute réserve par M. Nicolas Halli, sous-directeur chargé des collections du laboratoire de Phanérogamie au Muséum d'Histoire Naturelle, et demande à être confirmée.
- [7] STAHEL G. (1931). — Zur Kenntnis der Siebrohrenkrankheit (Phloemnekrose) des Kaffeebaumes in Suriname. I. *Phytopath. Z.*, 4, N° 1, p. 65-82.
- [8] STAHEL G. (1932). — *Idem*. II. *Phytopath. Z.*, 5, p. 539-548.
- [9] STAHEL G. (1933). — *Idem*. III. *Phytopath. Z.*, 6, p. 335-357.
- [10] LOPEZ G., GENTY Ph., OLLAGNIER M. (1975). — Contrôle préventif de la « Marchitez sorpresiva » de l'*Elaeis guineensis* en Amérique latine. *Oléagineux*, 30, N° 6, p. 243-250 (bilingue français-espagnol).

SUMMARY

Current I. R. H. O. research on coconut and oil palm wilts in South America associated with intraphloemic flagellate protozoa (*Phytomonas*).

M. DOLLET, *Oléagineux*, 1979, 34, N° 10, p. 449-452.

On the West coast of Ecuador, between Santo Domingo and the ocean, coconuts suffer from wilts generally suspected of being « Red Ring ». Now, systematic checks show that in about 80 p. 100 of cases flagellate protozoa are involved. A study of the weeds found near the oil palm or coconut plantations in Ecuador has revealed five different species of euphorbia and one *Asclepiadaceae* harbouring flagellates. Two species of euphorbia, *Euphorbia prostrata* Ait. (?) and *E. foliolosa* Boiss. (?) seem to suffer from this infection. Moreover, the latter is often seen in the palm circles in plantation. The others manifest no symptoms, but *E. hirtella* Boiss. (?) is 90 p. 100 infected close to certain coconut plantations. *Asclepias currasavica* L. is also host to flagellates, but without symptoms. In a mixed plantation of coconut and cocoa we noted a cocoa-tree suffering from a wilt similar to that of phloem necrosis of the coffee-bush, a flagellate disease. Chemotherapeutic trials have been done *in vitro* and by injection in the diseased palms with different products supplied by Rhône-Poulenc (Centre de Recherches Nicolas-Grillet, Vitry, France) — pentamidine dichlorhydrate, isometamidium chloride, stilbamidine isethionate, and with endrine, the insecticide used preventively against Marchitez in oil palms.

RESUMEN

Investigaciones actuales del I. R. H. O. sobre marchitamientos del cocotero y de la palma de aceite en Suramérica, asociados con protozoarios flagelados intrafloémicos (*Phytomonas*).

M. DOLLET, *Oléagineux*, 1979, 34, N° 10, p. 449-452.

En la costa occidental del Ecuador, entre Santo Domingo y el océano, hay cocoteros que padecen marchitamientos que se consideran las más veces manifestaciones del « anillo rojo ». Ahora bien, controles sistemáticos muestran que se trata en unos 80 % de un problema de protozoarios flagelados. Un estudio de adventicias que se encontraron cerca de las plantaciones de palmas o cocoteros en el Ecuador, demostró que cinco especies distintas de Euforbias y una *Asclepiadícea*, eran hospedadoras de flagelados. Dos especies de Euforbio, que son *Euphorbia prostrata* (?) y *E. foliosa* Boiss. (?), al parecer padecen esta infección. Esta además se observa a menudo en los círculos de palmas en las plantaciones. Las demás no muestran síntomas, pero *E. hirtella* Boiss. (?) es infectada en unos 90 % cerca de algunas plantaciones de cocoteros. *Asclepias currasavica* L. también hospeda flagelados pero no muestra síntomas. En una plantación mixta de cocoteros y cacao, advertimos en los cacao un marchitamiento parecido al de la necrosis del floema del café, que es una enfermedad de flagelados. Se realizaron ensayos de quimioterapia *in vitro* y por inyección en palmas enfermas con diversos productos facilitados por Rhône-Poulenc (Centre de Recherches Nicolas-Grillet, Vitry, France), que son : pentamidina diclorhidrato, isometamidio cloruro, stilbamidina isetonato, y con endrina, que es un insecticida usado en forma preventiva contra la Marchitez de la palma.

Current I.R.H.O. research on coconut and oil palm wilts in South America associated with intraphloemic flagellate protozoa (*Phytomonas*) (1)

M. DOLLET (2)

with the participation of G. LOPEZ (3), Ph. GENTY (3) and J. L. DZIDO (4)

It is generally accepted that coconut development in Ecuador is limited by the problem of Red Ring, a disease due to the nematode, *Rhadinaphelenchus*. This disease does indeed exist in Ecuador and it is possible to verify it, because there is a characteristic symptom which serves as a diagnosis: the red ring in the trunk.

In a zone lying between Santo Domingo and the Pacific (Fig. 1), numerous coconuts planted near dwellings or in small groves are affected by a wilt considered by the planters to be Red Ring. We have dissected several of these coconuts so as to study the symptomatology of these wilts and make examinations under optic microscope.

At an advanced stage of the wilt the overall appearance of the coconuts resembles that produced by Red Ring; but at that stage Red Ring also resembles coconut Hart-Rot, a flagellate disease, which is rife in Surinam [1, 2]. The coconut wilt in Ecuador also resembles Hart-Rot by the yellowing of the lower leaves at the start of the disease, and the nuts may fall at this moment or later. At the time of the first yellowing the young nuts 20-40 mm in diameter can be seen to have taken on a pronounced pink hue, a colour which is also found on the female organs of the inflorescences still ensheathed in their spathe.

Sections of the trunks of 7 diseased coconuts in a plantation near Viche in which about 80 p. 100 of the trees are affected did not reveal Red Ring. On the other hand, optic microscope examinations of root or inflorescence sap from 5 of these coconuts showed that uniflagellate protozoa were present, similar to those found in oil palm infected by Marchitez [3]. Five wilting coconuts chosen at random between Viche and Santo Domingo also sheltered the same type of organisms and yet had no red ring in the trunk. Without questioning the importance of Red Ring in Ecuador, it does seem that this wilt associated with the presence of flagellates has probably played a very great part in the failure of coconut development in that country.

As we already said in the course of the 3rd Meeting in the case of Lethal Yellowing [4], it is evident once again that the study of a disease must imperatively start by the precise definition of the symptomatology. After that, a means of diagnosis must be found. For wilts associated with uniflagellate protozoa, it is necessary to take samples and make optic microscope examinations. With a little practice, the organisms can be seen in a drop of fresh root or inflorescence sap at objective 40, mainly thanks to their mobility. Otherwise, they can be identified easily by making a smear on slide and dyeing with Giemsa or another dye, as described in our earlier publications [3]. However, neither all the roots nor all the inflorescences house flagellates, and it is sometimes necessary to make several examinations. For example, for one coconut at Viche we had to examine 12 roots before finding the first flagellates, and out of 20 examined in all only 6 were infected; on the same tree, one inflorescence out of four had flagellates.

A study of the weeds growing near the oil palm or coconut plantations revealed several latex plants containing flagellate protozoa. Thanks to Lafont, it has been known since 1909 [5] that latex plants can be hosts to *Trypanosomatidae*, for which Donovan [6] proposed the generic name of *Phytomonas*. We found 5 species of euphorbia contaminated near both oil palm and coconut plantations. Two of these species, *Euphorbia foliolosa* Boiss. [6 bis] and *E. prostrata* Ail. (the determination of the species needs to be confirmed) seemed to suffer from this infection. In *E. foliolosa*, for example, there are

90 chances out of 100 of finding *Phytomonas* in plants with brown leaves or deformed, leafless branches, whereas it is very rare to find them in plants of normal appearance. The same type of symptoms is seen on *E. prostrata*, associated with a sickly and stunted look. In a third, indeterminate species *Phytomonas* is present in conjunction with yellowing then browning of the leaves. On the other hand, we noted no pathological effect on *Euphorbia bacteriana* Balbis or *E. hirtella* Boiss., although the latter has been found 100 p. 100 infected near a disease focus in coconut. Amongst these euphorbia, the first species, *E. foliolosa*, is frequent in Ecuador in the weeded circles at the foot of the palms in industrial plantations. According to Gildardo Lopez, phytopathologist of Indupalma in Colombia, these euphorbia are very common on the San Alberto Plantation in that country. In coconut plantations without a cover plant there is also an *Asclepiadaceae*, *Asclepias curassavica* L. infected by *Phytomonas* but without any pathological symptoms. Finally, in a mixed coconut-cocoa plantation where about 80 p. 100 of the coconuts were sick, we noted on cocoa-bushes a wilt identical to that known as phloem rot which affects coffee in Surinam [7, 8, 9] and which is associated with the presence of flagellates. We examined a dozen roots of these cocoa-bushes but found no flagellates; however, in the roots of nearby coconuts taken at the foot of the cocoa-bushes they were very abundant. It is possible, therefore, that cocoa is another host of uniflagellate protozoa.

Chemotherapeutic tests (Fig. 2) against oil palm and coconut flagellates were carried out in Peru and Ecuador, *in vitro* and *in vivo*, with research products supplied by the Rhône-Poulenc Nicolas Grillet Research Centre in Vitry-sur-Seine, France. The trials *in vitro* were done on cavity slides covered with another slide and placed in a humid chamber at about 20 °C in the dark. About 50 µl of the product to be tested are added to a 0.1 ml drop of plant sap containing protozoa.

Pentamidine dichlorhydrate proved active *in vitro* on flagellates of the oil palm in Peru; at a concentration of 0.1 g/l, the flagellates only survive for 30 minutes against 2-3 h. for the controls, and they are killed in 2 or 3 minutes after the addition of a microdrop of Pentamidine at 1.5 g/l. On flagellates of coconuts in Ecuador, Stilbamidine Isethionate, a diamidine, has a slight effect at concentrations of over 10 g/l, and Isometamidium chloride, a phenanthridine product, seems much more active. Two tests *in vitro* were also made with different dilutions of a commercial solution of endrine at 19 p. 100 used for preventive insecticide treatments against Marchitez [10]. The flagellates turned out to be very resistant to this product, even at a 1/10 dilution.

Tests *in vivo* were conducted in Peru with Pentamidine dichlorate. We first sought the phytotoxicity threshold on healthy trees; there was no reaction with 12 ml of product injected at a concentration of 2 g/l, and only a few brown, necrotic spots on 1 to 3 leaves immediately above the point of injection when the rate was 3 g/l. Curative trials on diseased trees were started with injections at 1.2 g/l, then 3 g/l, but we obtained no remission on the 8 palms treated as soon as the first symptoms appeared. There are three possible explanations for this failure: 1. — the product was too diluted inside the palm, 2. — the disease was too far advanced when the first external symptoms appeared, 3. — the flagellates are more resistant to the product *in vivo* than *in vitro*. Consequently, trials at higher concentrations and research for more active products should perhaps be contemplated. But it is certain that this type of research would be easier with a culture of flagellates on a synthetic medium. Culturing is also an essential step in the phytopathogenicity of these organisms, and this is why we have lacked this work.

Acknowledgements. — We would like to thank Mr. L. Lacroix of the Nicolas Grillet Research Centre, Rhône-Poulenc, for the supply of the antitrypanosomiasis research products.

(1) Communication presented at 4th Meeting of the International Council on Lethal Yellowing, August 13-17, 1979; Fort-Lauderdale, Fl. (U. S. A.).

(2) Virology Department, I. R. H. O.-GERDAT, B. P. 5035, 34032, Montpellier-Cedex (France).

(3) INDUPALMA, Ap. aereo 1535, Bucaramanga (Colombia).

(4) Palmeras de los Andes, Bosmediano 11.67, casilla 5115-Quito (Equator).

