

Étude sur l'association de protozoaires flagellés à la Marchitez sorpresiva du palmier à huile en Amérique du Sud

M. DOLLET (1) et G. LOPEZ (2)

Résumé. — Après la découverte de protozoaires flagellés dans les tubes criblés d'inflorescences de palmiers à huile du Pérou atteints de Marchitez, une étude en microscopie électronique et en microscopie optique sur des échantillons venant de Colombie, d'Equateur et du Surinam, montre qu'il existe une association spécifique protozoaires flagellés-Marchitez. La morphologie et l'ultrastructure de ces organismes les classent dans la famille des *Trypanosomatidae*, probablement dans le genre *Phytomonas*. Ils se déplacent dans les tubes criblés par les pores et se retrouvent dès les premiers stades de la maladie dans presque tous les organes de l'arbre. L'examen au microscope optique de frottis colorés au Giemsa ou au bleu de toluidine constitue un bon moyen de diagnostiquer la maladie.

I. — INTRODUCTION

Depuis sa première apparition en Colombie en 1963, la « Marchitez sorpresiva » appelée encore « Secamiento ascendente » ou « Tostada », a causé de nombreuses pertes dans certaines plantations d'Amérique du Sud puisqu'elle sévit également depuis 1970 au Pérou, et depuis 1973 en Equateur (Fig. 1). Il s'agit d'un nouveau type de maladie sur palmier à huile africain, *Elaeis guineensis*, de plus de deux ans, caractérisé par un dépérissement brutal.

Les recherches entreprises sur la maladie permirent d'observer qu'une larve de lépidoptère, *Sagalassa valida*, causait de nombreux dégâts sur le système racinaire de l'*Elaeis* sans que l'on puisse lui attribuer un rôle exact dans la maladie [Genty, 1973]. Et, bien que la Marchitez ait pu être presque totalement enrayerée par des traitements réguliers d'endrine [Lopez *et al.*, 1975], aucune solution n'a pu être apportée au problème étiologique. La nature même des symptômes, la rapidité de l'évolution de la Marchitez et son épidémiologie distinguent cette maladie des autres dépérissements connus du palmier à huile ou du cocotier.

Les recherches étiologiques ont été reprises en 1976 avec l'étude ultrastructurale. Dans le phloème d'inflorescences de palmiers du Pérou atteints de Marchitez, des organismes d'un type jamais observé chez le palmier à huile, des protozoaires flagellés, ont pu être mis en évidence [Dollet, 1976 ; Dollet *et al.*, 1977].

Des organismes similaires ont été trouvés dans des cocotiers atteints de « Hartrot ». [Parthasarathy *et al.*, 1976]. Cette maladie du cocotier au Surinam est connue depuis 1906. Mais dans ce pays plusieurs petites plantations de palmiers à huile ont également été décimées par un mal inconnu [Schut, 1976]. On peut observer aujourd'hui de nombreux foyers de maladie sur palmier à huile. Les symptômes de ces palmiers sont identiques à ceux des palmiers atteints de Marchitez dans les Llanos en Colombie [Corrado, 1970] et l'on peut penser qu'il s'agit du même type de maladie.

Afin de vérifier s'il existait vraiment une relation spécifique entre la Marchitez et ces protozoaires

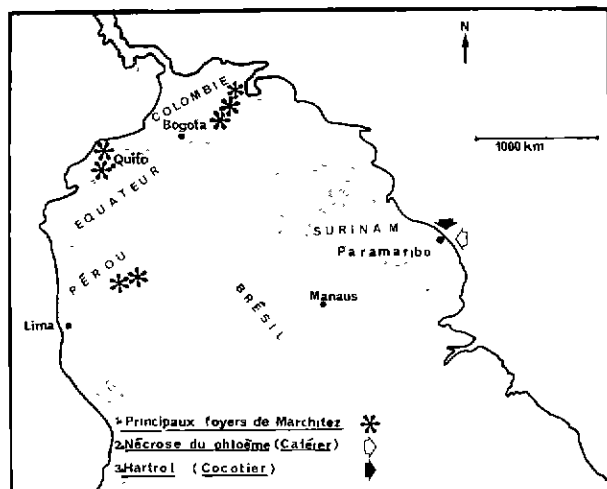


FIG. 1. — Distribution géographique des maladies végétales pour lesquelles des protozoaires flagellés ont été trouvés associés en Amérique du Sud ; foyers de Marchitez (Geographical distribution of plant diseases with which flagellate protozoa have been found to be associated in South America ; foci of Marchitez — Distribución geográfica de las enfermedades de las plantas en las que se encontró asociados protozoarios flagelados en Suramérica ; focos de Marchitez) ;

1. (Principal foci of Marchitez — Principales focos de Marchitez)
2. (Phloem decay in the coffee bush — Necrosis del floema/cafétero)
3. (Hart Rot/coconut — /cocotero).

flagellés, et d'essayer de trouver un test rapide ayant valeur de diagnostic de la maladie, nous avons entrepris des observations comparées, en microscopie électronique et microscopie optique, d'échantillons de palmiers malades provenant du Pérou, de Colombie, d'Equateur, et de Surinam.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Origine du matériel.

Le matériel utilisé pour nos observations provient de différents endroits d'Amérique du Sud :

- du Pérou (secteur de Tocache, à l'est de Tingo Maria),
- d'Equateur (région de Quininde),
- de Colombie (régions de Puerto Wilches, de Cucuta, et des Llanos orientales), et
- du Surinam (Plantation Victoria, 100 km au sud de Paramaribo).

Les observations ont porté sur différents organes du palmier à huile *Elaeis guineensis* : racines, stipe, cœur, bases pétiolaires, inflorescences.

(1) Département Virologie I. R. H. O. ; Station de Recherches de Pathologie Comparée I. N. R. A.-C. N. R. S. ; 30380-St Christol-lez-Alès (France).

(2) Service Phytopathologie, Industrial Agraria La Palma S. A. ; Ap. aéro 1535 Bucaramanga (Colombie).

2) Microscopie électronique.

Les fixations ont été faites soit sur le terrain, soit sur du matériel envoyé en France par avion. Sur le terrain, les échantillons sont fixés dans du glutaraldehyde 4 p. 100 dans du Tampon cacodylate de sodium 0,1 M de pH 7,2 (pression osmotique égale à 550 milliosmoles) pendant 4 à 7 h à froid (4 à 10 °C dans un récipient en polystyrène). Puis le fixateur est dilué dans du Tampon cacodylate de sodium 0,1 M avec 3 p. 100 de glucose (P. O. de 360 milliosmoles) de manière à amener la concentration finale du fixateur à 0,1-0,4 p. 100. Les échantillons sont conservés ainsi quinze jours.

Les échantillons envoyés par avion sont fixés entre quatre et six jours après leur récolte de la même manière puis rincés et post-fixés immédiatement.

Dans les deux cas la post-fixation se fait au tétroxyde d'osmium 1,5 p. 100 pendant 2 h à froid. Puis on déshydrate par un gradient d'acétone et l'inclusion se fait dans la résine de Spurr.

3) Microscopie optique.

Trois types d'examen ont été réalisés :

a. — examens de coupes faites à main levée dans des apex racinaires au niveau du cylindre central, ou dans les pétioles d'inflorescences sans aucune coloration ;

b. — examen direct d'une goutte de jus obtenue en pressant fortement l'échantillon avec une pince ;

c. — examens de frottis faits à partir de pétioles d'inflorescences de la zone méristématique, ou de la base de la flèche. Après avoir extrait à l'aide d'une pince une goutte de jus, déposée sur une lame, on laisse sécher à l'air puis on fixe au méthanol 100 p. 100 et on colore ensuite au Giemsa 1/10 dans du cacodylate de sodium 0,5 M pH 7,2 pendant 30 mn ; on examine après lavage.

III. — RÉSULTATS

1) Microscopie électronique.

Dans tous les échantillons provenant de différents palmiers présentant les symptômes caractéristiques de Marchitez, nous avons pu observer au niveau des tubes criblés des pétioles des jeunes inflorescences (5 à 15 cm) le même type d'organismes, en nombre variable, allant de l'unité jusqu'à occuper tout l'espace cellulaire d'un tube criblé (Fig. 2, 3, 4, 5). Ces organismes sont entourés d'une membrane tapissée intérieurement de microtubules (Fig. 7). On note parfois un prolongement de ces organismes par un flagelle dont les microtubules sont structurés en neuf groupes de deux microtubules en cercle autour de deux autres centraux (Fig. 6, 8). A l'intérieur de ces organismes on reconnaît, sur certaines coupes, une masse dense correspondant à un noyau, de nombreux corps d'inclusion cytoplasmiques de nature indéfinie et une masse d'aspect fibrillaire dense aux électrons correspondant à de l'ADN, le kinétoplast des protozoaires flagellés (Fig. 2 à 5, Fig. 8). On note parfois deux noyaux dans un même organisme, probablement en voie de division.

On peut voir sur certaines coupes, des organismes

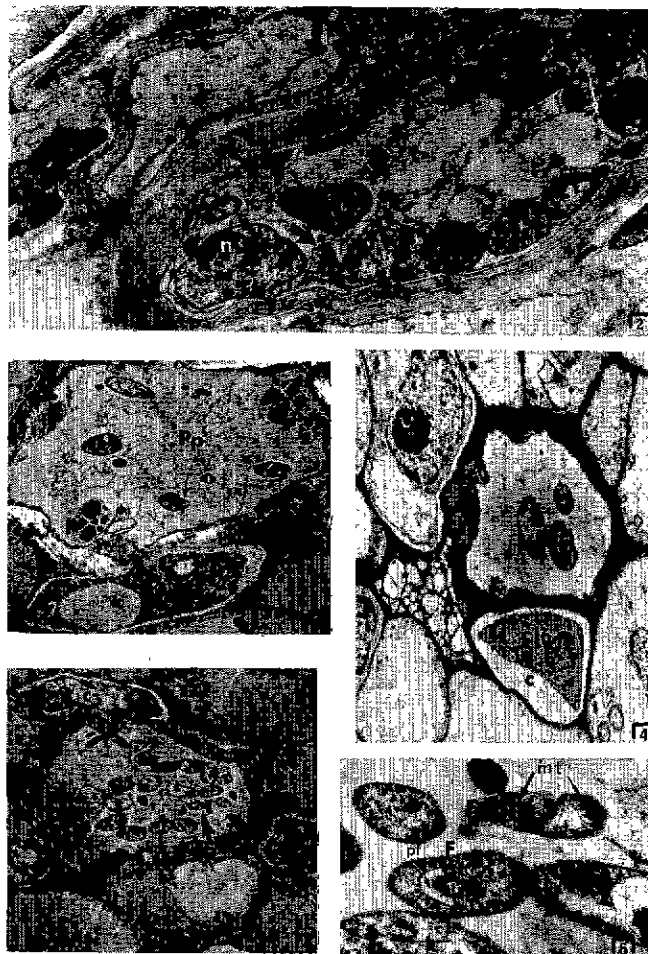


FIG. 2, 3, 4, 5. — Protozoaires flagellés dans des pétioles d'inflorescences de palmiers atteints de Marchitez du Pérou [2, 3, 4] et de Colombie [5] (*Flagellate protozoa in the inflorescence stalks of palms suffering from Marchitez in Peru [2, 3, 4] and Colombia [5]*) — Protozoarios flagelados en los peciolo de inflorescencias de palmas que padecen Marchitez en el Perú [2, 3, 4] y en Colombia [5] ;

n = noyau (nucleus — nucleole) — p = plasides (plastids — plastidos) — Pp = P. protéine (P. protein — P. proteina) — c = cellule compagne (companion cell — célula companera) — flèche = flagelle (arrow : flagellum ; flecha = flagelo).

(Fig. 2 : $\times 8\ 500$; fig. 3 : $\times 3\ 250$; fig. 4 : $\times 3\ 000$; fig. 5 : $\times 2\ 500$).

FIG. 6. — Détail de la figure 5 (*Detail of fig. 5*) — Detalle de la Fig. 5) :

mt = microtubules (microtubulos) — F = flagelle (flagellum — flagelo) — pF = poche flagellaire (flagellate pocket — bolsa flagelar) ($\times 15\ 000$).

engagés dans les pores des tubes criblés dans les jeunes inflorescences de palmier, leur diamètre variant en moyenne de 0,5 à 1,5 micron et celui de ces organismes de 0,6 à 1,2 micron, leur déplacement d'une cellule à l'autre doit pouvoir se faire assez aisément (Fig. 7, 8, 9). Ces passages relativement faciles expliqueraient le nombre assez élevé de cellules infectées. Dans les échantillons de Colombie 10 à 50 p. 100 des faisceaux ont été trouvés infectés et leur nombre varie entre 50 et 80 pour ceux du Pérou. Parmi les faisceaux libéro-ligneux restant, nombreux sont nécrosés rappelant certaines figures décrites dans les plantes infectées par des mycoplasmes.

2) Microscopie optique.

a) Frottis.

Au grossissement 1 000, à l'immersion, on distingue très bien les protozoaires flagellés, par leur noyau et leur kinétoplaste (Fig. 10f) ; mais on peut



FIG. 7. — Coupe passant juste au-dessus d'un pore d'une cellule criblée par lequel passent d'une cellule à l'autre des protozoaires (Section just above the pore of a sieve tube through which protozoa pass from one cell to another — Corte exactamente encima de un poro de célula cribrosa por el que pasan protozoarios de una célula a otra); P = pore (poro) — mt = microtubules (microtubulos) ($\times 24\,000$).

FIG. 8. — Coupe passant au niveau d'un pore dans lequel s'engagent 2 protozoaires. La double flèche indique les microtubules d'un flagelle en coupe transversale présentant les 9 groupes de microtubules caractéristiques (Section through a pore which 2 protozoa are entering; the double arrow indicates the microtubules of a flagellum in cross section showing the 9 groups of characteristic microtubules — Corte encima del nivel de un poro en el que están penetrando dos protozoarios; la doble flecha indica microtubulos de un flagelo en un corte transversal que muestra los 9 grupos de microtubulos característicos);

ci = corps d'inclusions (inclusion bodies — cuerpos de inclusiones) ($\times 15\,000$).

déjà les repérer au grossissement 400. A noter que l'on peut simplifier la procédure de préparation des frottis en colorant directement après séchage de la goutte à l'air, pendant dix minutes, tout en obtenant des résultats significatifs. Mais on peut mieux définir la forme des protozoaires (pour en faire les mesures) avec une coloration au bleu de toluidine (Fig. 10) qui colore également noyaux et kinétoplastes, ou une coloration de Gram. Avec cette dernière, en particulier, on distingue très bien les enroulements en spirale de ces organismes (Fig. 10e). Les formes fines allongées présentent souvent deux ou trois tours de spire autour de leur axe longitudinal.

Les autres colorations essayées (coloration au lugol, à l'hématoxyline ferrique, par la méthode de Bailer) donnent de moins bons résultats.

Sur ces frottis les formes les plus nombreuses sont les formes allongées fines (85 p. 100 du total environ). Des mesures faites sur 117 de ces formes pour les

échantillons de Colombie et sur 70 pour les échantillons de Surinam donnent une longueur moyenne du corps de 10 à 12 μ pour les protozoaires de Surinam et de 12 à 20 μ pour ceux de Colombie (Fig. 11). Des mesures complémentaires sur différents échantillonnages permettront de dire ultérieurement si cette différence est significative. Ces formes se rencontrent dans tous les types d'organes examinés : racines, zone méristématique, base de la flèche, pétiole d'inflorescence. Mais il existe aussi, principalement dans les racines, des formes rondes ou ovoïdes de 2 à 3 microns de diamètre avec un noyau et un kinétoplaste (Fig. 10c, d, g, h) sans flagelle ou avec un, parfois deux flagelles. Enfin, il existe une gamme de formes intermédiaires entre ces deux types, formes trapues avec flagelle, de 3 à 10 microns de longueur et de 2 à 0,5 microns de largeur.

L'existence dans un même palmier de formes rondes aflagellées (formes *Leishmania*) et de formes allongées avec un flagelle (forme *Leptomonas*) suggère qu'il existe un cycle complet de ces protozoaires dans le palmier.

b) Examen d'une goutte de jus.

L'examen direct d'une goutte de jus de palmier malade obtenue en pressant une racine, permet d'observer au grossissement 400 en contraste de phase, ou en lumière directe en colorant légèrement au lugol et en jouant sur le condenseur, des formes allongées mobiles. La mobilité provient du flagelle qui est animé d'un mouvement de va-et-vient de part et d'autre de l'axe longitudinal de l'organisme. Les formes rondes aflagellées semblent immobiles. Les flagellés des racines sont toujours mobiles après 4-5 jours de voyage avion (transport Colombie-France) ou après 8 jours au réfrigérateur.



FIG. 9. — Déformation, elongation des protozoaires pour passer à travers les pores des tubes criblés (Deformation, elongation of the protozoa to get through the pores of the sieve tubes — Deformación, elongación de protozoarios que pasan a través de los poros de los tubos cribrosos);

pm = pellicule membranaire (membrane pellicle — pellicula de la membrana) — mt = microtubules (microtubulos) — P = pore (poro) — largeur du pore entre les 2 flèches (width of the pore between the 2 arrows — anchura del poro entre las 2 flechas) = 180 nm ($\times 27\,400$).

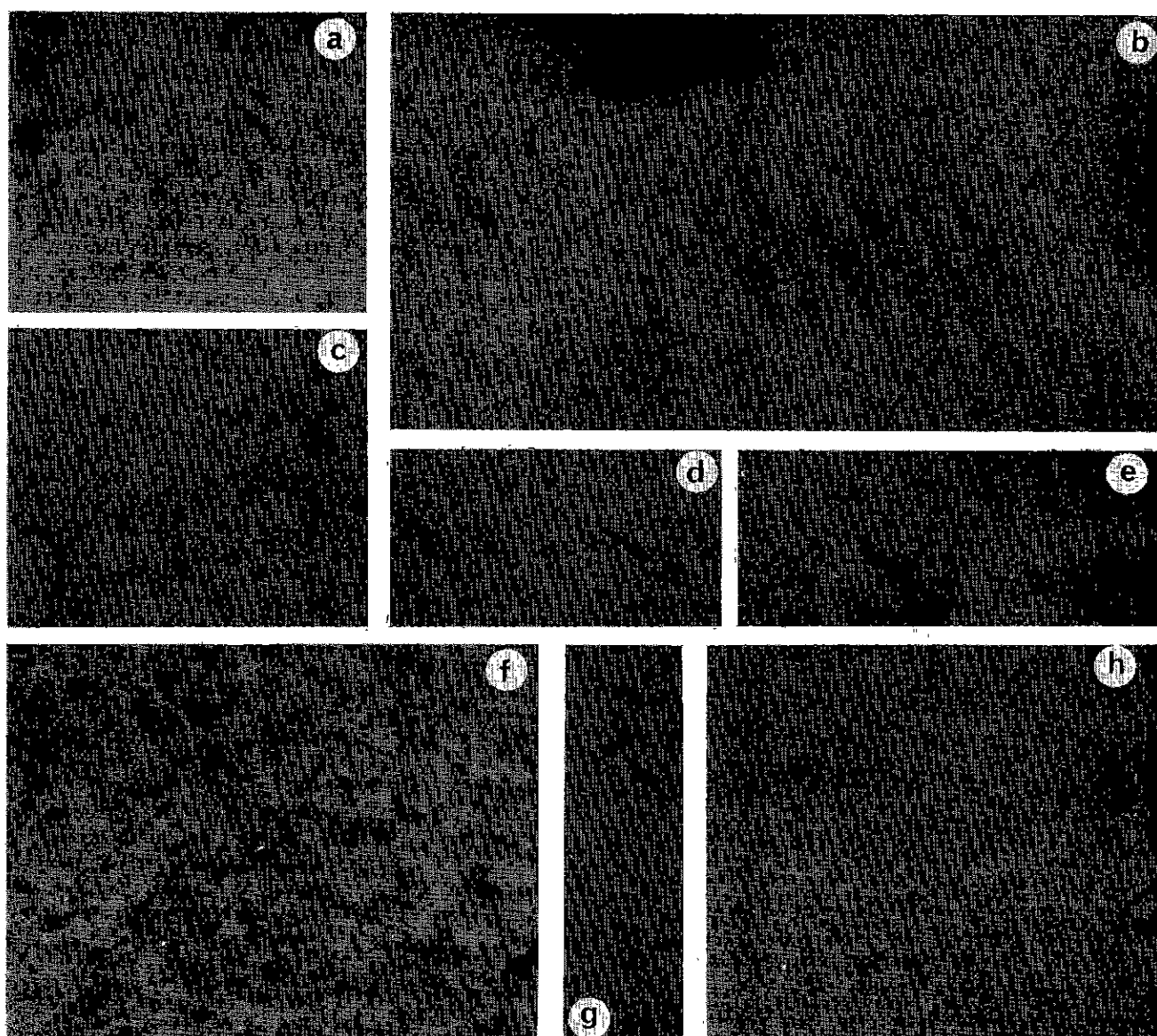


FIG. 10. — Frottis sur lames à partir de racines de palmiers atteints de Marchitez de Colombie [b, c, d, g, h] et du Surinam [a, e, f] avec différentes colorations : bleu de Toluidine [a, b, c, d, g, h], coloration de Gram [e], Giemsa [f] (Smears on slides taken from roots of palms suffering from Marchitez in Colombia [b, c, d, g, h] and in Surinam [a, e, f] using different dyes : toluidine blue [a, b, c, d, g, h], Gram coloring [e] Giemsa [f]) — Frotis en lamine à partir de la racine de palmiers que padecen Marchitez de Colombia [b, c, d, g, h] y Surinam [a, e, f] con diferentes coloraciones : azul de Toluidina [a, b, c, d, g, h], coloración de Gram [e], Giemsa [f] ;

— grosses flèches (*large arrows* — flechas gruesas) = formes rondes avec 2 flagelles (*round forms with 2 flagella* — formas redondas con 2 flagelos) ;

— astérisques (*asterisco*) = formes arrondies sans flagelle (*round forms without flagella* — formas redondas sin flagelo) ;

— petites flèches (*small arrows* — flechas pequeñas) : photo e = enroulements d'une forme allongée (*rolled, elongated shapes* — eroscaamientos de una forma alargada) ;

(× 1 300)

c) Examen de coupes fraîches.

L'examen de coupes faites à main levée au niveau du phloème dans le cylindre central des racines, permet l'observation à immersion des protozoaires flagellés dans les tubes criblés. Certains tubes criblés sont entièrement remplis de formes rondes de 2 à 3 microns qui semblent englobées dans une substance visqueuse. On peut observer parfois dans une même cellule des formes allongées et quelques formes trapues ou arrondies.

CONCLUSION. DISCUSSION

Les protozoaires flagellés n'ont jamais ouvert la voie à une nouvelle discipline en phytopathologie.

Pourtant, ils sont connus depuis longtemps [Lafont, 1909] comme parasites de certaines plantes à latex. Ils se multiplient dans les tubes laticifères de ces plantes et il semble que dans certains cas, les euphorbes, ils entraînent un dépérissement caractéristique de la plante [Lafont, 1909, 1910 ; Franca, 1911, 1914].

Au cours de cette étude sur la Marchitez du palmier à huile en Amérique du Sud (Colombie, Equateur, Pérou) et sur un dépérissement du palmier à huile sinon identique du moins très proche de la Marchitez, au Surinam, nous avons pu mettre en évidence l'association spécifique de protozoaires flagellés à ce dépérissement brutal. *En revanche, aucun organisme de ce type n'a pu être mis en évidence sur des palmiers atteints par d'autres maladies, ou sur des palmiers sains.*

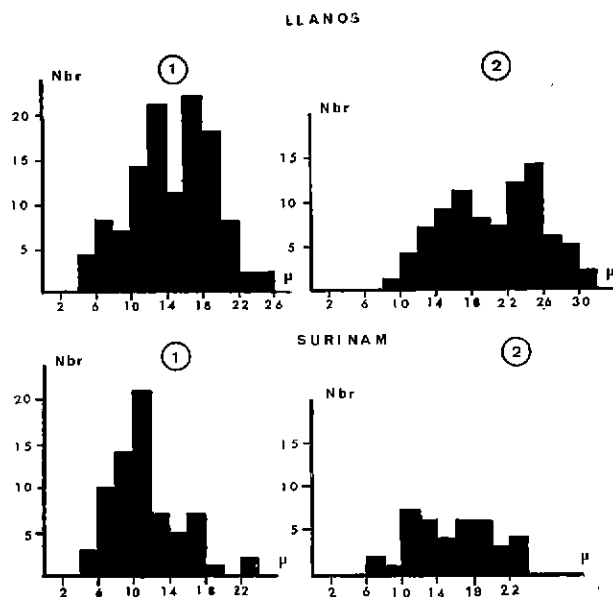


FIG. 11. — Histogramme des longueurs des flagellés filiformes sur frottis colorés au bleu de méthylène ou par une coloration de Gram sur des échantillons de Colombie (Llanos) et de Surinam. Les formes rondes ou ovoïdes ne sont pas prises en considération (Histogram of the lengths of the filiform flagella in smears colored with methylene blue or a Gram coloring from samples taken in Colombia (Llanos) and Surinam. The round and oval forms are not studied — Histograma de las longitudes de flagelos filiformes en frotis colorados con azul de metileno o con una coloración de Gram en muestras de Colombia (Llanos) y Surinam. No se tiene en cuenta las formas redondas u ovoïdes);

1. longueur du corps sans flagelle (length of body without flagellum — longueur del cuerpo sin flagelo),
2. longueur totale avec flagelle (total length with flagellum — longitud total con flagelo).

Par leur morphologie, leur taille [Franca, 1920], leur ultrastructure [Paulin et Mc Ghee, 1971] ils ressemblent aux protozoaires flagellés des plantes à latex. Ils peuvent être classés dans la superclasse *Mastigophora*, dans l'ordre *Kinetoplastida* et dans la famille des *Trypanosomatidae*. On peut les ranger, en attendant les compléments d'études nécessaires, dans le genre *Phytomonas* créé en 1909 par Donovan pour les organismes découverts par Lafont. Mais sans oublier qu'ils diffèrent du *Phytomonas* des euphorbes sur un point essentiel, celui de leur localisation dans la plante : tube laticifère dans les plantes à latex et phloème dans le palmier. On ne connaît actuellement que deux autres cas de maladies associées à ce type d'organismes intraphloémiques, tous deux également localisés dans le Nord de l'Amérique du Sud (Fig. 1). Il s'agit de la nécrose du phloème du caféier étudiée par Stahel [1931, 1932, 1933] puis par Vermeulen [1963] et du Hartrot du cocotier [Parthasarathy *et al.*, 1976] (*).

Les travaux sur la maladie du caféier n'ont jamais pu aboutir à la démonstration de la pathogénicité des *Phytomonas*, aucune culture n'ayant pu être obtenue. Dans le cas des Euphorbes les essais de cultures sont restés très longtemps, incertains, mais récemment Mc Ghee et Postell [1977] viennent de réussir la culture de *Phytomonas davidi*, ce qui ouvrira sûrement la voie à d'autres succès.

On peut penser que pour les organismes vivant au niveau du phloème le problème sera plus difficile dans la mesure où ce milieu a des composantes chimiques et physiques bien spéciales. Cependant nous avons pu dans nos premières tentatives maintenir assez facilement en survie ces protozoaires dans divers milieux : lait de noix de coco immature (10 à 90 mn), lait de coco additionné de sérum de poulain désactivé (v/v), lait de coco additionné de milieu de culture de *Spiroplasma citri* [Saglio *et al.*, 1971] (1 à 8 h) ou sur milieu diphasique constitué de gélose au sang de mouton et de lait de coco (1 à 12 h).

Il est donc impossible dans l'état actuel de nos études d'assurer que ces *Trypanosomatidae* constituent l'agent causal de la maladie. Mais leur nombre élevé dans des palmiers en tout début de symptômes, la présence de nécroses au niveau des faisceaux libéro-ligneux, et leur association spécifique aux symptômes de Marchitez, font penser qu'ils sont à l'origine de ce dépérissement. La présence de protozoaires flagellés en microscopie optique sur un frottis sur lame réalisé à partir de racines de palmier constitue d'ailleurs une excellente méthode de diagnostic facilement réalisable. Des expériences entreprises au Pérou avec des traitements chimiothérapeutiques et en Colombie avec la recherche du vecteur nous apporteront sûrement des renseignements essentiels dans cette étude qui ouvrira probablement les portes à un nouveau domaine de la phytopathologie.

Remerciements. — Nous exprimons nos remerciements à M. le Professeur Bouix (Université de Montpellier) et au Docteur Bruguerolles (Université de Clermont-Ferrand) pour l'intérêt qu'ils ont porté au sujet et pour leurs informations.

Nous remercions également M. Duthoit (St Christol-lez-Alès) pour le tirage des photographies en microscopie électronique, M. Gargani (I. R. H. O.) pour sa collaboration technique et M. Genty (Indupalma, Colombie) pour les échantillons du Surinam.

(*) Il faut noter également les 2 articles parus sur ce même sujet : "Hartrot or fatal Wilt of Palms. I. — Coconuts (*Coco nucifera*), et II. — Oil Palms", dans *Principes* [1978], 22, p. 3-14 et 15-25 par M. V. Parthasarathy et W. G. Van Slobbe, et Van Slobbe, M. V. Parthasarathy et J. A. J. Hesen.

BIBLIOGRAPHIE

- CORRADO F. (1970). — La maladie du palmier à huile dans les Llanos de Colombie. *Oléagineux*, 25, p. 383-384.
- DOLLET M. (1976). — Maladies d'origine inconnue du palmier à huile au Pérou et en Equateur (*Rapport I. R. H. O. non publié* 36 p.).
- DOLLET M., GIANNOTTI J., OLLAGNIER M. (1977). — Observation de protozoaires flagellés dans les tubes criblés de palmiers à huile malades. *C. R. Acad. Sc., Série D, Paris*, 284, p. 643-645.
- DONOVAN C. (1909). — Kala-azar in Madras, especially with regard to its connexion with the dog and the bug (*Conorhinus*). *Lancet*, p. 1495-1496.
- FRANCA C. (1911). — Quelques notes sur *Leptomonas davidi* Lafont. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 4, p. 669-671.
- FRANCA C. (1914). — La flagellose des euphorbes. *Archiv. für Protistenkunde*, 34, p. 108-132.
- FRANCA C. (1920). — La flagellose des euphorbes. *Ann. Inst. Pasteur*, p. 432-464.

- GENTY Ph. (1973). — Observations préliminaires du lépidoptère mineur des racines du palmier à huile, *Sagalassa valida* Walker. *Oléagineux*, 28, p. 59-65.
- 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.
- LAFONT A. (1910). — Sur la présence d'un leptomonas parasite de la classe des flagellés dans le latex de trois euphorbiacées. *Ann. Inst. Pasteur*, 24, p. 205-219.
- LOPEZ G., GENTY Ph., OLLAGNIER M. (1975). — Contrôle préventif de la Marchitez sorpresiva de l'Elaeis guineensis en Amérique latine. *Oléagineux*, 30, p. 243-250.
- PARTHASARATHY M. V., VAN SLOBBE W. G., SOUDANT C. (1976). — Trypanosomatid Flagellate in the Phloem of Diseased Coconut Palms. *Sciences*, 192, p. 1346-1348.
- SAGLIO P., LAFLECHE D., BONISSOL C., BOVE J. M. (1971). — Isolement et culture in vitro des mycoplasmes associés au « Stubborn » des agrumes et leur observation au microscope électronique. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 272, p. 1387-1390.
- SCHUT B. (1976). — Oil palm accession of Surinam. *Surinam Agriculture*, 24, n° 1, p. 42-47.
- STAHEL G. (1931). — Zur Kenntnis der Siebröhrenkrankheit (Phloemnekrose) des Kallebaumes in Surinam I. *Phytopathol. Z* 4 (1), p. 65-82.
- STAHEL G. (1932). — II. *Phytopathol. Z* 4 (5), p. 539-548.
- STAHEL G. (1933). — III. *Phytopathol. Z* 6 (4), p. 335-357.
- VERMEULEN H. (1963). — A wilt of Coffea liberica in Surinam and its association with a flagellate Phytomonas leptovisorum Stahel., 10 (2), p. 216-222.

SUMMARY

Study of the association of flagellate protozoa and Marchitez sorpresiva in South American oil palms.

M. DOLLET and G. LOPEZ, *Oléagineux*, 1978, 33, N° 5, p. 209-217.

After the discovery of flagellate protozoa in the sieve tubes of inflorescences from oil palms suffering from Marchitez in Peru, a study with electron and optic microscope of samples from Colombia, Ecuador and Surinam showed that specific association exists between flagellate protozoa and Marchitez. The morphology and ultrastructure of these organisms class them in the *Trypanosomatidae* family, probably of genus *Phytomonas*. They move around in the sieve tubes through the pores and are found at the first stages of the disease in virtually every organ in the tree. The optic microscope examination of smears colored with Giemsa or toluidine blue is a good method of diagnosing the disease.

RESUMEN

Estudio de la asociación de protozoarios flagelados con la Marchitez sorpresiva de la palma de aceite en Suramérica.

M. DOLLET y G. LOPEZ, *Oléagineux*, 1978, 33, N° 5, p. 209-217.

Después del descubrimiento de protozoarios flagelados en los tubos cribosos de inflorescencias de palmas de aceite en Perú que padecían Marchitez, un estudio de microscopía electrónica y microscopía óptica sobre muestras procedentes de Colombia, Ecuador y Surinam, muestra que hay una asociación específica entre los protozoarios flagelados y la Marchitez. Por su morfología y su ultraestructura, se debe clasificar estos organismos dentro de la familia de *Trypanosomatidae*, y probablemente dentro del género *Phytomonas*. Viajan dentro de los tubos cribosos atravesando los poros, y a partir de los primeros estados de la enfermedad se los encuentra en casi todos los órganos del árbol. El examen con microscopio óptico de frotis coloreados con Giemsa o con azul de toluidina es un buen medio para diagnosticar la enfermedad.

Study of the Association between Flagellate Protozoa and Marchitez sorpresiva in South American Oil Palms

M. DOLLET (1) and G. LOPEZ (2)

I. INTRODUCTION

Since it was first seen in Colombia in 1963, Marchitez sorpresiva, also referred to as « Secamiento ascendente » or « Tostada », has caused heavy losses on certain plantations in South America. Since 1970 it has been rife in Peru, and since 1973 in Ecuador (Fig. 1). It is a new type of disease in the African oil palm *Elaeis guineensis*, attacking plants over two years old and causing sudden wilting.

Research conducted on this disease showed that the larva of a Lepidoptera *Sagalassa valida*, did great damage to the root system of the *Elaeis*, but no definitive role in the disease could be attributed to it [Genty, 1973]. And although Marchitez has been nearly wiped out by regular endrin treatments [Lopez et al., 1975], the etiological problem remains unsolved. But the nature of the symptoms, the rapidity of the disease's evolution and its epidemiology distinguish it from other known wilts of the oil palm or coconut.

The etiological research was resumed in 1976 with the ultrastructural study. In the phloem of the palm inflorescences in Peru affected by Marchitez organisms never before seen on oil palms, flagellate protozoa, were isolated [Dollet, 1976; Dollet et al., 1977]. Similar organisms were found in coconuts affected by « Hart Rot » [Parthasarathy et al., 1976]. This coconut disease in Surinam has been known since 1906, but several small oil palm plantations in that country have also been decimated by an unknown disease [Schut, 1976]; today many foci of oil palm disease may be observed. Their symptoms are identical to those of palms suffering from Marchitez in the Llanos in Colombia [Corrado, 1970], and it may be thought that it is the same type of disease.

II. MATERIALS AND METHODS

1) Origins of the material.

The material used in our observations came from the following sources in South America :

- Peru (Toocache sector, east of Tingo Maria),
- Ecuador (Quininde region),
- Colombia (Puerto Wilches, Cucuta, and eastern Llanos regions),
- Surinam (Plantation Victoria, 100 kilometres south of Paramaribo).

Observations were made on various organs of *Elaeis guineensis* oil palms : roots, trunk, bud, leaf bases, and inflorescences.

2) Electron Microscopy.

Fixations were made either in the field or on material sent by air to France.

In the field, samples are fixed in 4 p. 100 glutaraldehyde in a sodium cacodylate buffer ; 0.1 M of pH 7.2 (osmotic pressure 550 milliosmotes) for 4 to 7 hours at 4 to 10 °C in a polystyrene recipient. Then the fixator is diluted in a cacodylate buffer 0.1 M with 3 p. 100 glucose (OP 360 milliosmotes) so as to bring the final concentration of the fixator to 0.1-0.4 p. 100. The samples are kept in this state for fifteen days.

The samples sent by air to France are fixed between 4 and 6 days after their collection in the same way, then rinsed and post-fixed immediately.

(1) Department of Virology, I. R. H. O., Compared Pathology Research Station I. N. R. A.-C. N. R. S., 30380-St-Christol-les-Alès (France).

(2) Phytopathology Service, Industrial Agraria La Palma Ap. aéreo. 1535, Bucaramanga (Colombia).

In both cases, post-fixation is in 1.5 p. 100 osmium tetroxide for two hours, chilled. The samples are then dehydrated with an acetone gradient and inserted in a Spurr resin.

3) Optic microscopy.

Three types of examination were carried out :

- cross-sections of root apices taken straight away in the central cylinder, or in the inflorescence stalks (without dyeing) ;
- direct examination of a drop of sap obtained by pressing the sample hard with a pincers ;
- examination of smears from the inflorescence stalks in the meristematic zone or at the base of the spear. After having extracted a drop of sap with pincers and placed it on a slide it is air-dried and then fixed in 100 p. 100 methanol and dyed with Giemsa 1/10 in sodium cacodylate 0.5 M pH 7.2 for thirty minutes. It is washed and then examined.

III. RESULTS

1) Electronic microscopy.

In all samples from different palms with symptoms characteristic of Marchitez, we found the same type of organisms in the sieve tubes of the stalks of young inflorescences (5 to 15 cm) ; the numbers varied from a single unit to sufficient to fill the entire cell space of a sieve tube (Fig. 2, 3, 4, 5). These organisms are surrounded by a membrane lined with microtubules (Fig. 7). Sometimes it is noted that these organisms are prolonged by a flagellum of which the microtubules are constructed in nine groups of two microtubules in a circle around the two central ones (Fig. 6 and 8). In certain interior sections of these organisms a dense mass corresponding to a nucleus, numerous cytoplasmic inclusion particles and a dense fibrillary mass with electrons corresponding to ADN, the kinetoplast of the flagellate protozoa (Fig. 2 to 5, and 8), are all noted. Sometimes two nuclei are noted in one organism, probably preparing to divide.

In certain sections, organisms can be seen in the pores of the sieve tubes of young oil palm inflorescences which have a mean diameter of 0.5 and 1.5 microns and the diameter of the organisms being 0.6-1.2 microns, they must be able to pass from one cell to another easily, and this would explain the rather high number of infected cells. In the Colombian samples, 10-50 p. 100 of the bundles were found to be infected, and the rate was 50-80 p. 100 in Peru. Among the remaining bast bundles, many are decayed, recalling certain figures described in plants infected by mycoplasmas (Fig. 7, 8, 9).

2) Optic microscopy.

a) Smears.

Enlarged 1,000 times and immersed, flagellate protozoa are easily distinguished by their nucleus and kinetoplast (Fig. 10 f). They can already be seen enlarged 400 times. It is to be noted that the preparation of the smear can be simplified by direct dyeing after drying the drop of sap in the air for 10 minutes, and still produce significant results. But the form of the protozoa can be better defined for measurement with toluidine blue dye (fig. 10) which dyes the nucleus and also the kinetoplasts, or with a Gram coloring. With the latter in particular spiral convolutions of these organisms can be clearly distinguished (Fig. 10 e). The fine elongated forms often make two or three spiral turns around their longitudinal axis. Other dyes tried (lugol, ferrous, hematoxyline, Baulanger method) give less satisfactory results.

In the smears the most numerous forms are the fine elongated ones, (about 85 p. 100 of the total). Measurements taken on 117 of these forms for the Colombian samples and on 70 for the Surinam samples give an average body length of 10-12 μ for the Surinam protozoa and 12-20 μ for those of Colombia (Fig. 11). Complementary measurements on various samplings will show ultimately whether or not the difference is significant. These forms are found in all types of organ examined : roots, meristematic zone, spear base, inflorescence stalks. But we also find mainly in the roots, round or oval forms 2-3 microns in diameter, with a nucleus and kinetoplast (Fig. 10 c, d, g, h) without flagellum or with one — sometimes two. Last, there is a range of intermediary forms between the two types — squat, with flagellum, 3-10 microns long and 2-05. microns wide.

The presence of several forms in one palm — round without flagellum (*Leishmania* form), elongated with flagellum (*Lepidomonas* form) suggests that these protozoa go through a complete cycle in the palm.

b) Examination of a drop of sap.

Direct examination of a drop of sick palm sap obtained by pressing ($\times 400$ in phase contrast or in direct light, slightly dyed with lugol and adjusting the condense) shows elongated

mobile forms. Mobility is due to the flagellum, which wags back and forth either side of the longitudinal axis of the organism. The round, aflagellate forms appear immobile. Root flagellates are always mobile after 4-5 days' air transport (Colombia-France), or after 8 days under refrigeration.

c) Examination of fresh sections.

Examination of sections taken straight from the phloem in the central cylinder of the roots allows flagellate protozoa in sieve tubes to be observed under immersion. Some sieve tubes are entirely filled with round forms of 2-3 microns which seem to be coated with a viscous substance. Sometimes both the long forms and a few squat or round ones can be seen.

CONCLUSION-DISCUSSION

Flagellate protozoa have never led to a new field of research in phytopathology, yet they have been known for a long time [Lafont, 1909] to be parasites of certain latex plants. They multiply in the lactiferous tubes of these plants, and seem in certain cases, such as that of the Euphorbiaceae, to cause willing in the plant [Lafont, 1909, 1910 ; Franca, 1911, 1914].

Through this study on oil palm Marchitez in South America (Colombia, Ecuador, and Peru) and on an oil palm wilt in Surinam identical or at least very close to it, we were able to show a specific association between flagellate protozoa and this sudden willing. On the other hand, no organism of this kind was seen on healthy palms or those suffering from another disease.

In their morphology, their size [Franca, 1920], and their ultrastructure [Paulin and Mc Ghee, 1971], they resemble the flagellate protozoa found in latex plants. They may be described as belonging to the super-class Mastigophora, order Kinetoplastida and the family Trypanosomatidae. Until the further studies required are completed, we shall place them in the genus *Phytomonas* created by Donovan in 1909 for the organisms discovered by Lafont. Of course they differ from the phytomonads of Euphorbes in one essential manner, namely their localization in the plant : the lactiferous tubes in latex plants, the phloem in the oil palm. At the present time only two other diseases are known to be associated with this type of intraphloemic organism, both limited to northern South America as well (Fig. 1). They are phloem rot in the coffee-bush studied by Stahl [1931, 1932, 1933], then by Vermeulen [1963] and Hart Rol in the coconut [Parthasarathy et al., 1976] (*).

Research on the coffee-bush disease has never proved the pathogenicity of the phytomonads, since no culture could be obtained. In the case of the Euphorbes efforts to culture remained inconclusive for a long time, but recently, Mc Ghee and Postell [1977] succeeded in obtaining a *Phytomonas davidi* culture, which will certainly open the way to further progress.

It may be thought that for organisms living at phloem level the problem will be more difficult in so far as this medium has very specific chemical and physical components. However in our first attempts we were able to keep this protozoa alive without much difficulty in several media : immature coconut milk (10-90 mn), coconut milk reinforced with deactivated foal serum (v/v), coconut milk reinforced with *Spiroplasma citri* culture medium [Saglio et al., 1971] (1-8 hours) or in a diphasic medium of gelose with sheep's blood and coconut milk (1-12 hours).

It is thus impossible at the present time to demonstrate from our studies that these Trypanosomatidae are the causal agent of the disease. But their high number in palms with early symptoms, the rot in the bast bundles and their specific association with Marchitez symptoms lead us to believe that they are the origin of this wilt. The detection of flagellate protozoa in a smear under optic microscope is an excellent and easy method of diagnosis. Chemico-therapeutic experiments in Peru and research in Colombia for the vector will surely provide vital information for this study, which will probably open up a new field of phytopathology.

Acknowledgements. — We would like to express our thanks to Professor Bouix at the University of Montpellier and Dr Brugerolles at the University of Clermont-Ferrand for the interest they have taken in our work and the information they have contributed.

We would also like to thank Mr. Dulhoit at St-Christol-lez-Ales for developing the electron microscopy photographs, Mr. Gargani at I. R. H. O. for his technical collaboration, and Mr. Genty of Indupalma (Colombia) for the Surinam samples.

(* See also the 2 articles already published on this subject : "Hartrol or fatal Wilt of Palms. I. — Coconuts (*Coco nucifera*), and II. — Oil Palms", in *Principes* [1978], 22, p. 3-14 and 15-25 by M. V. Parthasarathy and W. G. Van Slobbe, and Van Slobbe, M. V. Parthasarathy and J. A. J. Hesen.

Estudio de la asociación de protozoarios flagelados con la Marchitez sorpresiva de la palma de aceite en Suramérica

M. DOLLET (1) y G. LOPEZ (2)

I. — INTRODUCCIÓN

Desde que se observó por primera vez en Colombia en 1963, la « Marchitez sorpresiva » que también se llama « Secamiento ascendente » o « Tostada », ocasionó muchos estragos en ciertas plantaciones de Suramérica, puesto que también se manifiesta en Perú desde 1970 y en el Ecuador desde 1973 (Fig. 1). Se trata de un nuevo tipo de enfermedad de la palma africana, *Elaeis guineensis*, de más de dos años, que se caracteriza por un marchitamiento brusco.

Las investigaciones iniciadas sobre la enfermedad mostraron que una larva de lepidóptero, *Sagalassa valida*, causaba muchos daños en el sistema radicular del *Elaeis*, pero no se podía determinar su función exacta en la enfermedad [Genty, 1973]. Y a pesar de haberse cortado la Marchitez casi totalmente mediante tratamientos regulares de endrin [Lopez y al., 1975], no se encontró ninguna solución al problema de etiología. Sin embargo, por la propia índole de los síntomas, por la rapidez de la evolución y por su epidemiología, esta enfermedad resulta ser diferente de los demás marchitamientos conocidos de la palma de aceite o del cocotero.

En 1976 se reanudaron las investigaciones etiológicas con el estudio ultraestructural. En el floema de inflorescencias de palmas del Perú que padecían Marchitez, se descubrió organismos de un tipo que nunca se había observado en la palma de aceite, y eran protozoarios flagelados [Dollet, 1976; Dollet y al., 1977].

Se encontró organismos similares en cocoteros que padecían « Hartrot » [Parthasarathy y al., 1976]. Esta enfermedad del cocotero en Surinam es conocida desde 1906, pero en este país una enfermedad desconocida también alóso varias plantaciones pequeñas de palma de aceite [Schul, 1976]. Hoy en la palma de aceite se observan muchos focos de enfermedad; por ser los síntomas idénticos a los de las palmas que padecen Marchitez en los Llanos en Colombia [Corrado, 1970], conviene pensar que estamos ante el mismo tipo de enfermedad.

A fin de verificar si efectivamente había una relación específica entre la Marchitez y estos prolozoarios flagelados, procurando encontrar una prueba rápida que tenga el valor de un diagnóstico de la enfermedad, iniciamos observaciones comparadas en microscopía electrónica y microscopía óptica, sobre muestras de palmas enfermas procedentes del Perú, de Colombia, del Ecuador y de Surinam.

II. — MATERIAL Y MÉTODOS

1) Origen del material.

El material que utilizamos en nuestras observaciones procede de varios lugares de Suramérica :

- Perú (área de Tocache, al este de Tingo María),
- Ecuador (región de Quininde),
- Colombia (región de Puerto Wilches, Cucuta, Llanos orientales),
- Surinam (Plantación Victoria, 100 kilómetros al Sur de Paramaribo).

Las observaciones se refieren a diferentes órganos de la palma de aceite *Elaeis guineensis*, como raíces, estipe, cogollo, bases peciolares, inflorescencias.

2) Microscopía electrónica.

Las fijaciones se realizaron bien sea en el sitio, o en material enviado a Francia por vía aérea. En el sitio las muestras son fijadas en glutaraldehído 4 % en un tapón de cacodilato sódico 0,1 molécula gramo y 7,2 de pH (presión osmótica 550 millomoléculas/gramo) durante 4 a 7 horas en frío (4 a 10 °C en un recipiente de poliestireno), diluyéndose luego el fijador en un tapón de cacodilato sódico 0,1 molécula gramo con 3 % de glucosa (presión osmótica 360 millomoléculas gramo),

para que la concentración final del fijador viniera a ser de 0,1-0,4 %. Así se conservan las muestras durante 15 días.

Las muestras enviadas por vía aérea son fijadas de 4 a 6 días después de la cosecha de la misma manera, y luego son enjuagadas y postfijadas inmediatamente.

En ambos casos se realizó una postfijación con Tetróxido de osmio 1,5 % durante dos horas en frío, deshidratando luego mediante un gradiente de acetona y realizando la inclusión en resina Spurr.

3) Microscopía óptica.

Se realizó 3 tipos de exámenes :

- a. — examen de los cortes hechos a mano alzada en ápices radicales a nivel del cilindro central, o en los pecíolos de inflorescencias desprovistas de coloración ;
- b. — examen directo de una gota de zumo obtenida estrujando fuertemente la muestra con una pinza ;
- c. — examen de frotis realizados a partir de pecíolos de inflorescencias en la zona del meristema o de la base de la flecha. Después de extraer una gota de zumo con una pinza, se la coloca en una lámina, dejándola secar al aire, luego se la fija con metanol 100 %, se la colora con Giemsa 1/10 en cacodilato sódico 0,5 molécula gramo y 7,2 de pH durante 30 minutos. Después de lavarla se procede a examinarla.

III. — RESULTADOS

1) Microscopía electrónica.

En todas las muestras procedentes de diversas palmas con síntomas característicos de Marchitez, a nivel de los tubos cribosos de los pecíolos de inflorescencias jóvenes (5 a 15 cm), observamos un número variable del mismo tipo de organismos, comprendido entre uno solo y un número tan grande que llegaban a ocupar todo el espacio celular de un tubo criboso (Fig. 2, 3, 4, 5). Una membrana cuyo interior es revestido por microtubulos (Fig. 7), rodea dichos organismos (Fig. 7). A veces se observa que estos organismos son prolongados por un flagelo cuyos microtubulos son estructurados dentro de nueve grupos de dos microtubulos que rodean a otros dos microtubulos centrales (Fig. 6 y 8). Dentro de tales organismos ciertos cortes muestran una masa densa que corresponde a un núcleo, muchos cuerpos de inclusión citoplásmica de índole poco definida, y una masa densa para los electrones y de aspecto fibrillar que corresponde al ADN, y es el kinetoplast de los protozoarios flagelados (Fig. 2 a 5 y 8). A veces se notan dos núcleos dentro del mismo organismo, que probablemente se halla en vías de división.

En ciertos cortes se observan organismos metidos en los poros de los tubos cribosos de las jóvenes inflorescencias de palma, cuyo diámetro suele variar de 0,5 a 1,5 micrones ; el diámetro de dichos organismos varía de 0,6 a 1,2 micrones, y han de poder viajar bastante fácilmente de una célula a otra, lo cual explicaría el número bastante elevado de células infectadas. En las muestras de Colombia se encontró 10 a 50 % de hacillos infectados, y el número de los mismos varía de 50 a 80 % en las del Perú. Muchos hacillos liberoleñosos que quedan están con necrosis, y se parecen a ciertas figuras descritas en las plantas infectadas por micoplasmas (Fig. 7, 8, 9).

2) Microscopía óptica.

a) Frotis.

La inmersión con aumento 1 000 permite diferenciar perfectamente los protozoarios flagelados, por el núcleo y el kinetoplasto (Fig. 10f). Ya se puede identificarlos con aumento 400. Es de notar que se puede simplificar el proceso de preparación de frotis sin dejar de obtener resultados significativos, coloreando directamente previo secamiento de la gota al aire durante diez minutos. Pero se puede definir mejor la forma de protozoarios para medirlos, mediante una coloración con azul de toluidina (Fig. 10), que también colora los núcleos y los kinetoplastos, o con coloración de Gram. Esta especialmente permite diferenciar muy bien los enroscamientos

(1) Departamento de Virología, I. R. H. O., Estación de Investigaciones de Patología comparada, I.N. R. A.-C. N. R. S., 30380 St-Christol-lez-Alès (France).

(2) Servicio de Fitopatología, Industrial Agraria La Palma S. A., Apartado Aéreo 1535-Bucaramanga (Colombia).

de estos organismos en forma de espiral (Fig. 10e). Las formas finas alargadas muestran a menudo dos o tres vueltas de espira alrededor de su eje longitudinal. Se probó otras coloraciones (con lugol, con hematoxilina férrica, con el método de Bailanger), pero los resultados no fueron tan satisfactorios.

En tales frotis las formas más numerosas son alargadas y finas (representan poco más o menos 85 % del total). Medidas realizadas en 117 de estas formas en muestras de Colombia, y en 70 de las mismas en muestras de Surinam, indican que la longitud promedio del cuerpo es de 10 a 12 μ por los protozoarios de Surinam, y de 12 a 20 μ por los de Colombia (Fig. 11). Medidas complementarias en diversos muestreos permitirán decir en lo sucesivo si esta diferencia es significativa. Se encuentra estas formas en todos los tipos de órganos examinados: raíces, zona del meristema, base de la flecha, peciolo de inflorescencias. Pero hay también, especialmente en las raíces, formas redondas u ovoides de 2 a 3 micrones de diámetro con núcleo y kinetoplasto (Fig. 10c, d, g, h), sin flagelo o con él, a veces con dos. Por último, hay una serie de formas intermedias entre estos dos tipos; consisten en formas achaparradas con flagelo, de 3 a 10 micrones de largo y 2 a 0,5 micrones de ancho.

La existencia en una misma palma de formas redondas sin flagelo (formas Leishmania) y de formas largas con flagelo (forma Leptomonas), da a pensar que existe un ciclo completo de estos protozoarios en la palma.

b) Examen de una gota de zumo.

El examen directo de una gota de zumo de palma enferma obtenida estrujando una raíz, muestra con aumento 400 en contraste de fase, o en la luz directa coloreando levemente con lugol y utilizando el proyector, formas largas móviles. La movilidad se debe al flagelo que es animado por un movimiento de vaivén de una parte y otra del eje longitudinal del organismo. Las formas redondas sin flagelo parecen inmóviles. Los flagelos de las raíces siempre son móviles después de 4 o 5 días de viaje en avión (con motivo del transporte de Colombia a Francia), o después de 8 días en la nevera.

c) Examen de cortes frescos.

La inmersión de cortes hechos a mano alzada al nivel del floema en el cilindro central de las raíces, muestra que hay protozoarios flagelados en los tubos cribosos. Ciertos tubos cribosos están completamente llenos de formas redondas de 2 a 3 micrones que parecen englobados en una substancia viscosa. A veces en una misma célula se observan formas alargadas y algunas formas achaparradas o redondas.

CONCLUSIÓN-DISCUSIÓN

Los protozoarios flagelados nunca dieron lugar a una nueva disciplina en fitopatología, y sin embargo hace mucho tiempo que se sabe que son parásitos de ciertas plantas de látex [Lafont, 1909]. Se multiplican en los tubos laticíferos de dichas plantas, y parece que en ciertos casos (en los euforbios), producen un marchitamiento característico de la planta [Lafont, 1909, 1910; Franca, 1911, 1914].

Durante este estudio sobre la Marchitez de la palma de aceite en Suramérica (Colombia, Ecuador, Perú) y sobre un marchitamiento de la palma de aceite no idéntico sino por lo menos muy parecido a la Marchitez en Surinam, logramos demostrar la asociación específica de protozoarios flagelados con este marchitamiento brusco. En cambio no se encontró ningún organismo de este tipo en palmas que padecían otras enfermedades, o en palmas sanas.

Por su morfología, su dimensión [Franca, 1920], su ultraestructura [Paulin y Mc Ghee, 1971], se parecen a los protozoarios flagelados de las plantas de latex. Se puede clasificarlos dentro de la superclase *Mastigophora*, dentro del orden *Kinetoplastida* y dentro de la familia de *Trypanosomatidae*. Hasta que sea disponible el complemento de estudios se puede colocarlos dentro del género *Phytomonas* creado por Donovan en 1909 para los organismos descubiertos por Lafont. Ahora bien no hay que olvidar que se diferencian del *Phytomonas* de los euforbios en un aspecto esencial, que es el de la ubicación en la planta, o sea en el tubo laticífero de las plantas de látex, y en el floema de las palmas. Ahora sólo se conoce otros dos casos de enfermedades asociadas con este tipo de organismos intrafloémicos, ambos ubicados en el Norte de Suramérica (Fig. 1). Se trata de la necrosis del floema del café estudiada por Stahel [1931, 1932, 1933] y luego por Vermeulen [1963], y del Hartrot del cocotero [Parthasarathy *et al.*, 1976] (*).

Los trabajos sobre la enfermedad del café nunca permitieron demostrar el carácter patógeno de los *Phytomonas*, porque no se pudo obtener ningún cultivo. En el caso de los Euforbios los ensayos de cultivos quedaron dudosos durante mucho tiempo, pero Mc Ghee y Postell [1977] acaban de acertar a cultivar *Phytomonas davidi*, lo cual seguramente dará lugar a otros éxitos.

Conviene pensar que el problema será más difícil en el caso de los organismos que viven a nivel del floema, en la medida en que este medio tiene componentes químicas y físicas muy especiales. Sin embargo, con motivo de nuestros primeros intentos logramos mantener estos protozoarios bastante fácilmente en condiciones de supervivencia y en diversos medios: leche de nuez de coco sin madurar (1 a 90 mn), leche de coco a la que se agregó suero de potro desactivado (v/v), leche de coco a la que se agregó medio de cultivo de *Spiroplasma citri* [Saglio *et al.*, 1971] (1 a 8 horas), o en medio difásico constituido por agar-agar o sangre de carnero y leche de coco (1 a 12 h). O sea que considerando el estado actual de nuestros estudios es imposible afirmar que estos *Trypanosomatidae* constituyen el agente causal de la enfermedad. Pero considerando lo numerosos que son en palmas cuyos primeros síntomas empiezan a manifestarse, además de la presencia de necrosis a nivel de haces liberoleñosos y de la asociación específica de tales organismos con los síntomas de la Marchitez, conviene pensar que este marchitamiento se origina de ellos. Además la presencia de protozoarios flagelados en microscopía óptica en un frotis en una lámina, sacado de raíces de palma, constituye un excelente método de diagnóstico fácil de realizar. Experiencias iniciadas en Perú con tratamientos de quimioterapia, y en Colombia con la investigación del vector, seguramente traerán informaciones esenciales en este estudio que probablemente dará el paso a un nuevo campo en fitopatología.

Agradecimientos. — Queremos agradecerles al Profesor Bouix (Universidad de Montpellier), y al Doctor Brugerolles (Universidad de Clermont-Ferrand), su interés en el tema, y sus informaciones. También agradecemos al Sr Duthoit (St-Christol-lez-Alès) la tirada que hizo de fotografías de microscopía electrónica, al Sr Gargani (I. R. H. O.) su colaboración técnica, y al Sr Genty (Indupalma, Colombia), sus muestras de Surinam.

(* Conviene señalar también los 2 artículos publicados sobre el mismo tema: "Hartrot or fatal Wilt of Palms. I. — Coconuts (*Coco nucifera*), y II. — Oil Palms" *Princtpes* [1978], 22, p. 3-14 y 15-25 M. V. Parthasarathy y W. G. Van Slobbe, y Van Slobbe, M. V. Parthasarathy y J. A. J. Hesen.

