



Identificación de *Candidatus Liberibacter* spp. como agente causal de la Marchitez letal en palma de aceite

Catalina Cháves¹, David Botero¹, Camila Rodríguez¹, Santiago Mejía-Alvarado¹, Carmenza Montoya¹, Hernán Mauricio Romero^{1,2 *}

¹ Programa de Biología y Mejoramiento. Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma). Bogotá, Colombia.
² Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. *Correo: hromero@cenipalma.org

Introducción

La Marchitez Letal (ML) es una de las principales enfermedades endémicas que causa grandes pérdidas en la región oriental del país (Meta y Casanare), con cerca de 1.500 hectáreas erradicadas en el año 2020. Estudios previos han asociado los síntomas con un microorganismo taponador de floema, sin embargo, el cultivo *in vitro* del patógeno es un desafío, lo que dificulta realizar los postulados de Koch. El objetivo principal de esta investigación fue identificar el agente causal de la ML mediante una estrategia de secuenciación de nueva generación (NGS) dirigida al gen 16s rRNA.

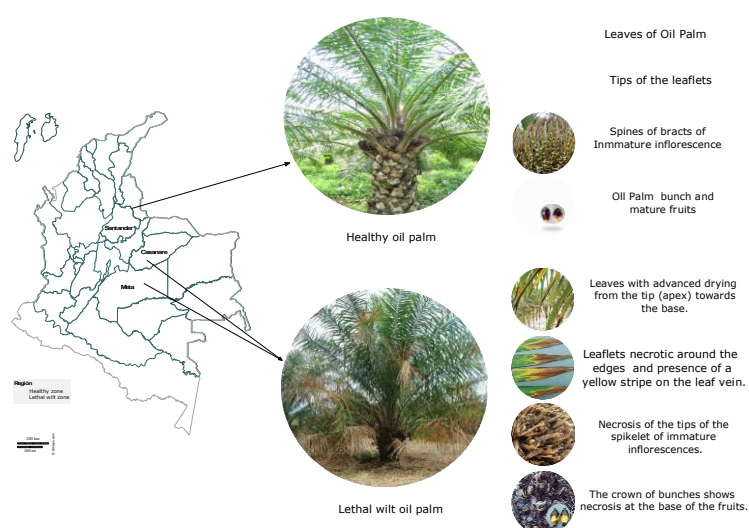


Figura 1. A. Sitios de colecta de las muestras. B. Tejidos característicos de palmas sanas C. Síntomas asociados con la Marchitez letal en los tejidos de las palmas de aceite.

Metodología

Se colectaron muestras de palma de aceite con sintomatología de ML en el departamento del Meta y Casanare (Colombia). Se seleccionaron tres plantaciones en los años 2019, 2020 y 2021. Como control negativo de la enfermedad (palmas sanas), se colectaron muestras en una plantación sin reportes de esta, en el departamento de Santander.

Fueron secuenciadas las regiones V5 y V6 del gen 16s rRNA usando Illumina MiSeq V3 (2x300bp). Se utilizó el programa R, la librería DADA2 y la base de datos RDP para realizar el análisis bioinformático. Para determinar los microorganismos estadísticamente sobrerrepresentados en muestras con ML se utilizó el programa DESeq2 (P ajustado de 10 % y un cambio en el logFC = 2).

Resultados

Se confirmó la presencia de 83 géneros bacterianos en las muestras con ML colectadas en los años 2019 y 2020. La única bacteria taponadora de floema, incultivable y asociada con los síntomas de la Marchitez letal fue *Candidatus Liberibacter* spp, presente con un valor de expresión de hasta Log₂FC=15 en todas las muestras sintomáticas (Figura 2).

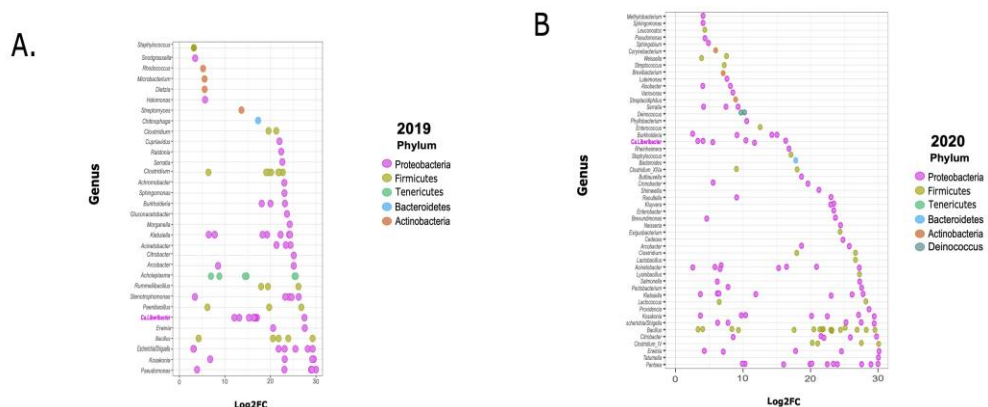


Figura 2. Microorganismos sobrerrepresentados ($p\text{-adj} \leq 0.10$ and $\text{Log}_2 \text{Fold Change} \geq 2$) en muestras con ML colectadas en dos años diferentes A. 2019 B. 2020.

Se identificaron los géneros bacterianos únicos y compartidos sobrerrepresentados en muestras de palma de aceite con ML, colectadas entre 2019 y 2020 (Figura 3).

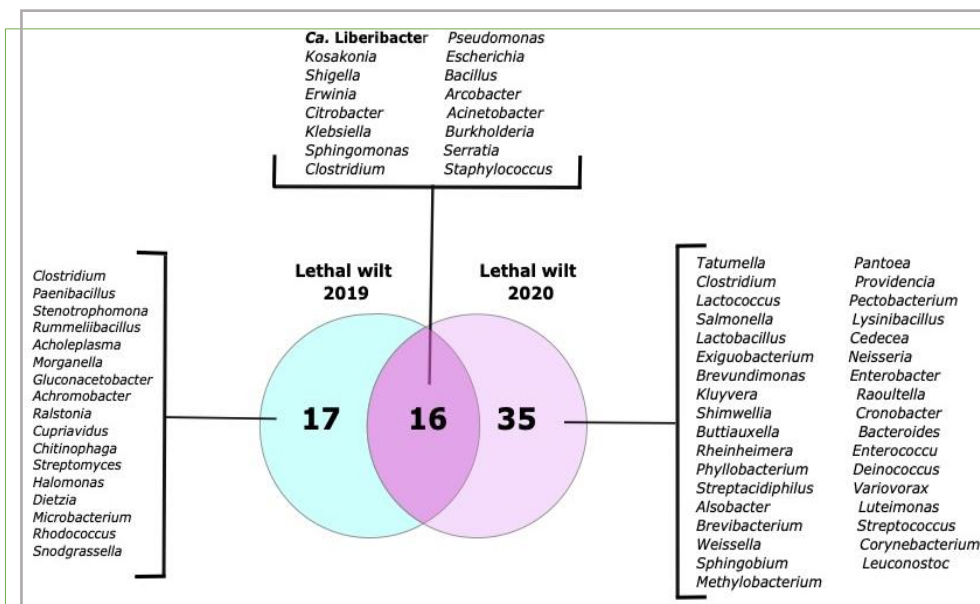


Figura 3. Géneros bacterianos compartidos entre palmas con ML, colectadas en 2019 y 2020.

El análisis filogenético basado en la reconstrucción del gen 16s rRNA mostró la estrecha relación de las secuencias obtenidas de palma con ML y con cinco secuencias de *Ca. Liberibacter* asiaticus con un soporte del 79 %, siguiendo su relación con otros cuatro representantes de la especie *Ca. Liberibacter* y de la subdivisión alfa de Proteobacteria (Figura 4), respaldados por el 87 % y el 100 %, respectivamente. Los resultados apoyan la hipótesis de que el agente causal de la ML en Colombia se encuentra en el grupo taxonómico de *Ca. Liberibacter* spp.

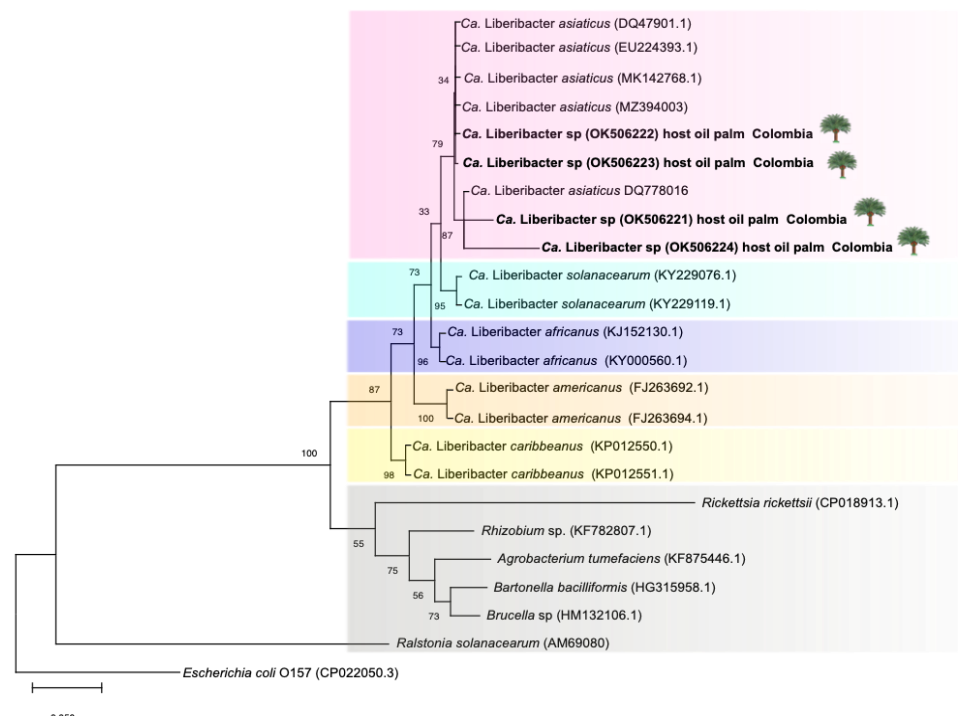


Figura 4. Análisis filogenético rDNA 16S *Ca. Liberibacter* spp y subdivisión alfa-proteobacterias.

Conclusiones y perspectivas

- Se identificó a *Ca. Liberibacter* spp. como agente causal de la ML en palma de aceite.
- Los síntomas de la enfermedad ML son consistentes con bacterias taponadoras de floema no cultivadas, descritas en otros patosistemas, como cultivos de cítricos, tomates y pimientos.
- La relación del microbioma asociado con *Ca. Liberibacter* se estudiará para determinar su papel en la incidencia y duración de la enfermedad.

Agradecimientos

Al Programa de biología y mejoramiento de Cenipalma, Al Programa de plagas y enfermedades y a los colaboradores del Laboratorio de biología molecular D. Ramos, S. Vidal y L. Hernández.

Esta investigación fue financiada por el Fondo de Fomento Palmero (FFP), administrado por Fedepalma.

6. Bibliografía

- Jagueix S, Bové JM, Garnier M. PCR detection of the two 'Candidatus' Liberobacter species associated with greening disease of citrus. Mol Cell Probes. 1996 Feb;10(1):43-50. doi: 10.1006/mcpr.1996.0006. PMID: 8684375.
- Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2016). Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses [version 2; referees: 3 approved]. *F1000Research*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8986.2>