

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

Catalina Chaves, David Botero, Camila Rodríguez, Santiago
Mejía, Carmenza Montoya Jaramillo

Diana Ramos, Sandra Vidal, Laura Hernández

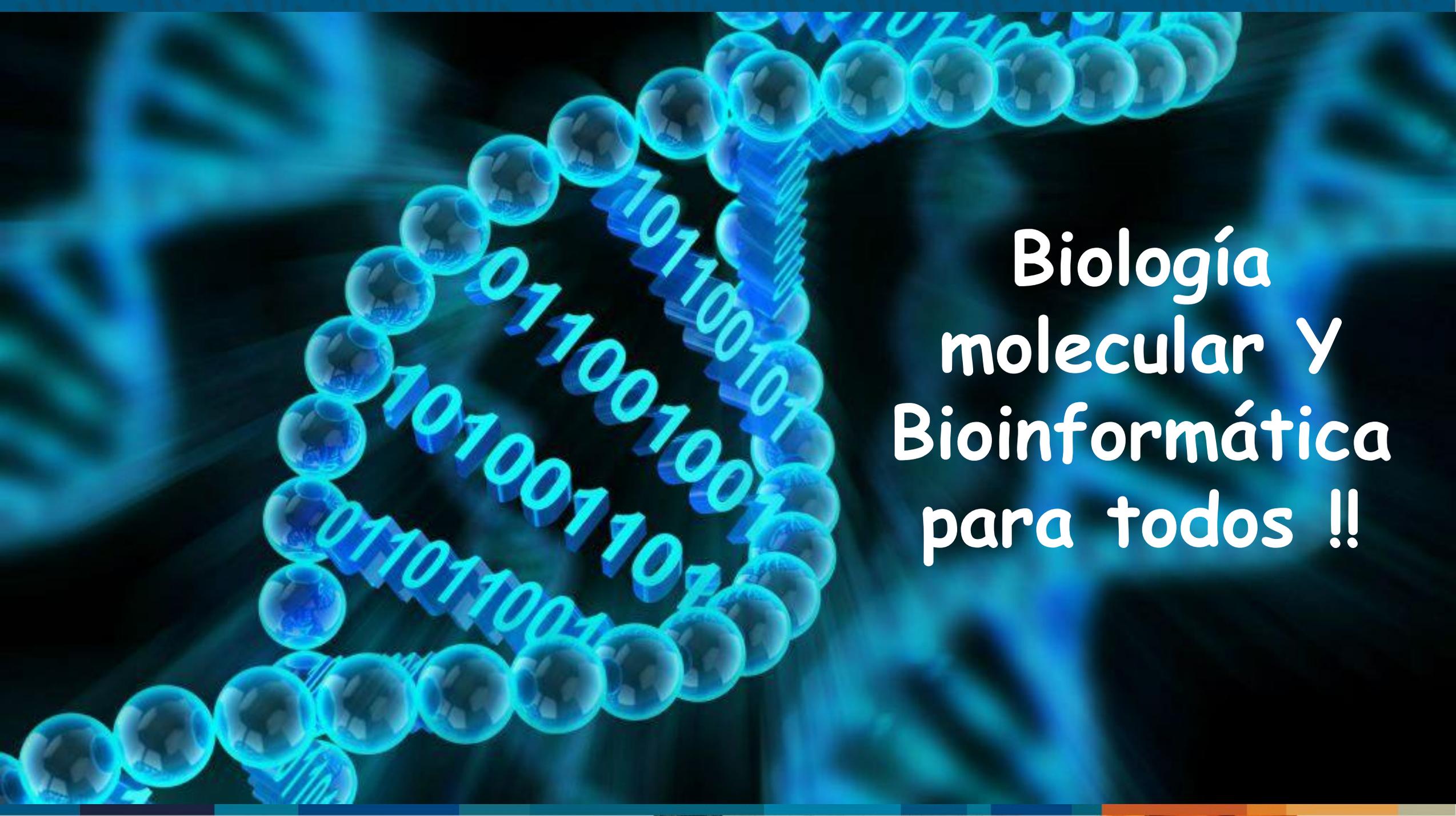
Hernán Mauricio Romero, PhD
PROGRAMA DE BIOLOGÍA Y MEJORAMIENTO
Área de Biotecnología



Identificar el agente causal de la Marchitez Letal en palma de aceite



"Finding Needles in a Haystack"



Biología
molecular Y
Bioinformática
para todos !!

1. Código genético

← Microorganismos

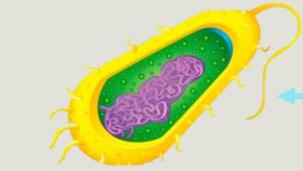
Palma →

1. Palma de aceite

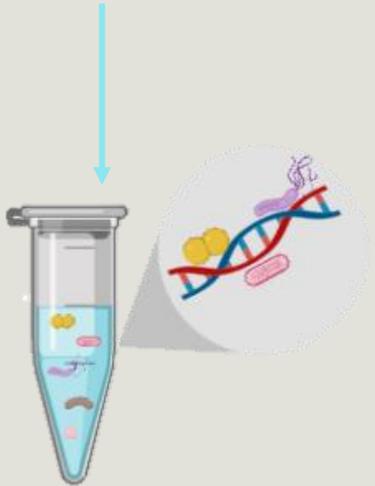


Universe of the Palm

2. microorganismos



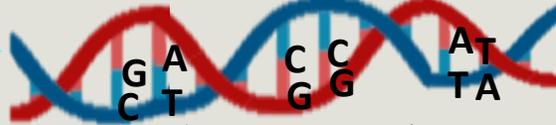
3. Célula microorganismos



4. Código genético de los microorganismos (ADN microbiano)

Código genético = ADN

Combinación A T C G



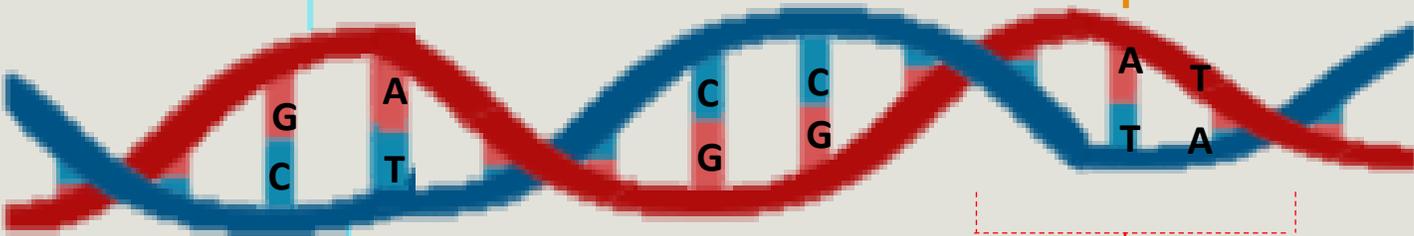
Genes = segmentos de ADN

Instrucciones genéticas



Material genético =DNA

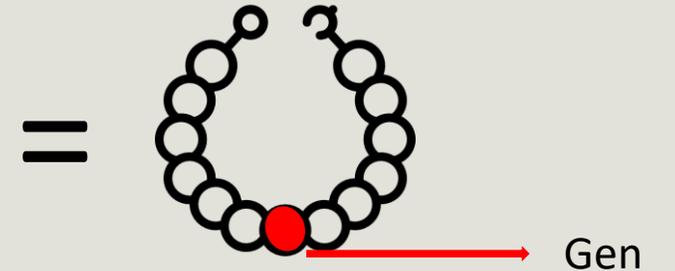
Mecanismos de resistencia /defensa



Mecanismos de infección /ataque

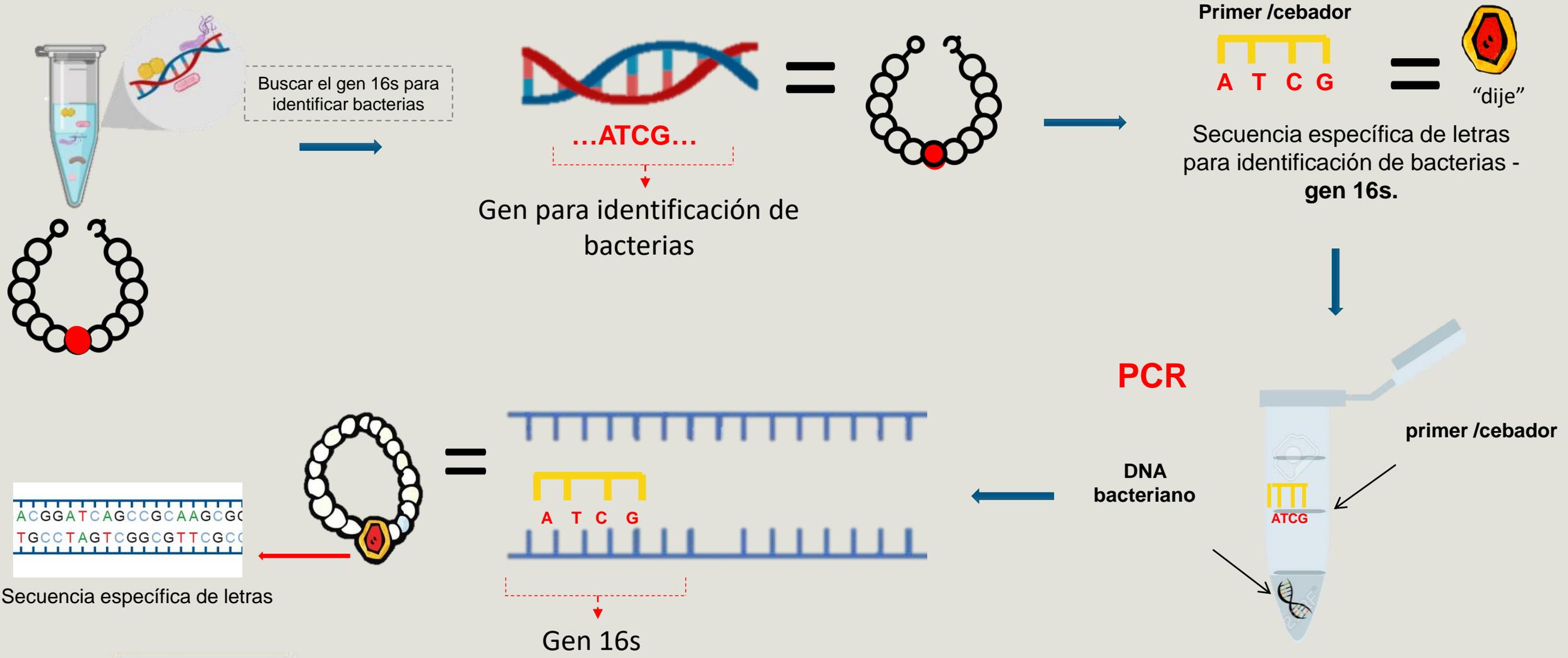


Genes evolutivamente conservados

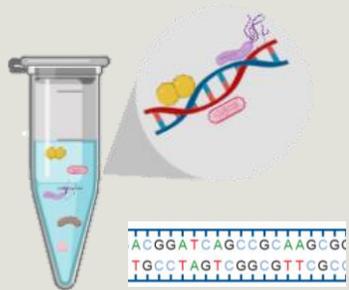


Material genético =DNA

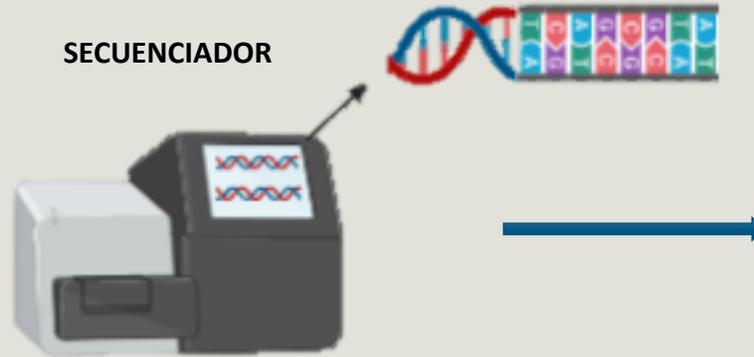
2. Reacción en cadena de la polimerasa o PCR = objetivo identificar el gen de interés (16s)



3. Secuenciación Identificación de genes = orden de las bases ATCG



Necesito saber que microorganismos encuentro en la palma



Identificar la combinación y orden de las bases ATCG

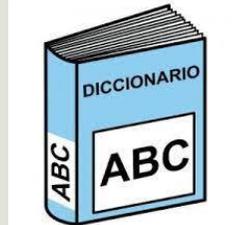
```
C T C T T G G C T C C A G C A T C G A T G A A G A A C G C A
A T T T A G A G G A A G T A A A A G T C G T A A C A A G G T
A C T G T C A A A A C T T T T A A C A A C G G A T C T C T T
T T G C T T C G G C G G C G C C C G C A A G G G T G C C C G
C C T G C C G T G G C A G A T C C C C A A C G C C G G G C C
T C T T G G C T C C A G C A T C G A T G A A G A A C G C A G
G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A C G C G A T
A T A C T T C T G A G T G T T C T T A G C G A A C T G T C A
G A T C T C T T G G C T C C A G C A T C G A T G A A G A A C
A A C G G A T C T C T T G G C T C C A G C A T C G A T G A A
G A T C T C T T G G C T C C A G C A T C G A T G A A G A A C
T G A A G A A C G C A G C G A A A C G C G A T A T G T A A T
```

Secuencia = Orden de las bases ATCG



Búsqueda individual de **secuencias** en una base de datos a nivel mundial

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> lactase (Homo sapiens)	4011	4011	100%	0.0	99%	EAX11622.1
<input type="checkbox"/> lactase-phlorizin hydrolase preproprotein (Homo sapiens)	4011	4011	100%	0.0	100%	NP_002290.2
<input type="checkbox"/> lactase phlorizinhydrolase (Homo sapiens)	4009	4009	100%	0.0	99%	AAA59504.1
<input type="checkbox"/> unnamed protein product (Homo sapiens)	4009	4009	100%	0.0	99%	CAA30801.1

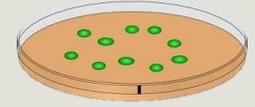


Lista de diferentes microorganismos con diferentes % de identidad Superior al 97%

4. Metagenómica

Metagenómica

→ “ Estudio directo de comunidades de microorganismos en su entorno natural, evitando la necesidad de aislar y cultivar cada una de las especies que componen la comunidad.”



cultivo bacteriano

Objetivos:

- Determinar qué miembros microbianos de una comunidad están presentes y clasificarlos hasta nivel de especie.
- Detectar abundancias relativas de estos microorganismos en la muestra evaluada.



Universo de la Palma

- Una “**imagen**” de la ecología y evolución microbiana en determinado ambiente y momento.
- Un banco de información funcional de genes.



Secuenciación 1990



Secuenciación 2010



Metagenómica actual

Full HD

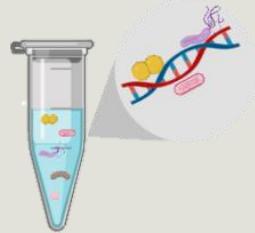
Aumento del poder de secuenciación = Determinar si un microorganismo se encuentra presente en una muestra.

Conceptos claves

1. Código genético



Código genético



Código genético = ADN
Instrucciones genéticas

Combinación A T C G
(Define los diferentes organismo)

2. Secuenciación

```
CTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCA  
ATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGT  
ACTGTCAAAACCTTTAAACAACGGATCTCTT  
TTGCTTCGGCGGGCCCGCAAGGGTGCCCG  
CCTGCCGTGGCAGATCCCCAACGCCGGGCC  
TCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCAG  
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCCAT  
ATACTCTGAGTGTCTTAGCGAACTGTCA  
GATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC  
AACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAA  
GATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC  
TGAAAGAACCGAGCGAAACGCCGATATGTAAT
```

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
1.	North American praxeivine yellow shivholasma strain TY0224.mA.sraerrn.16S.rbosomal.RNA.parcn.acrd.16S-23S.rbosomal.RNA.interspc.ssaactn.parcial.se	2451	2451	98%	0.0	99%	F5238148.1
	North American praxeivine yellow shivholasma strain TY0308.mA.sraerrn.16S.rbosomal.RNA.parcn.acrd.16S-23S.rbosomal.RNA.interspc.ssaactn.parcial.se	2451	2451	98%	0.0	99%	F5238148.1
	Maize bushy stunt shivholasma strain M3.complete.parcn	2451	4903	98%	0.0	99%	F2118148.1
	Mexicoaria charomilla shivholasma.parcial.16S.rRNA.parcn.sacotele.ACLUchar	2451	2451	98%	0.0	99%	F482683.1
	Maize bushy stunt shivholasma strain M8GColombia.16S.rbosomal.RNA.parcn.parcial.seuccion	2451	2451	98%	0.0	99%	F2530152.1

El primer match

1. Identificar el organismo
2. Identidad mayor 97%

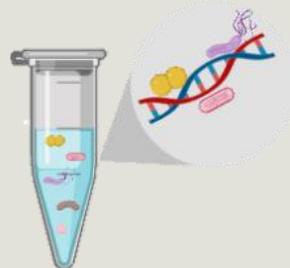
3. Metagenómica



Palma



Microrganismos



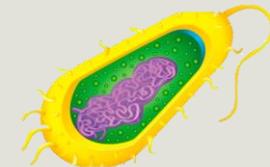
material genético



Secuenciación



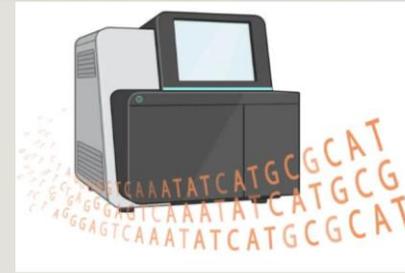
Gen 16s =DNA



Identificación de microorganismos

Metodología

Palma con Marchitez zona central y oriental



Secuenciación para identificación de microorganismos.

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5	Columna 6	Columna 7	Columna 8	Columna 9	Columna 10
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370
371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430
431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
461	462	463	464	465	466	467	468	469	470
471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
481	482	483	484	485	486	487	488	489	490
491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
521	522	523	524	525	526	527	528	529	530
531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
541	542	543	544	545	546	547	548	549	550
551	552	553	554	555	556	557	558	559	560
561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
571	572	573	574	575	576	577	578	579	580
581	582	583	584	585	586	587	588	589	590
591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
601	602	603	604	605	606	607	608	609	610
611	612	613	614	615	616	617	618	619	620
621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
631	632	633	634	635	636	637	638	639	640
641	642	643	644	645	646	647	648	649	650
651	652	653	654	655	656	657	658	659	660
661	662	663	664	665	666	667	668	669	670
671	672	673	674	675	676	677	678	679	680
681	682	683	684	685	686	687	688	689	690
691	692	693	694	695	696	697	698	699	700
701	702	703	704	705	706	707	708	709	710
711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
721	722	723	724	725	726	727	728	729	730
731	732	733	734	735	736	737	738	739	740
741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
751	752	753	754	755	756	757	758	759	760
761	762	763	764	765	766	767	768	769	770
771	772	773	774	775	776	777	778	779	780
781	782	783	784	785	786	787	788	789	790
791	792	793	794	795	796	797	798	799	800
801	802	803	804	805	806	807	808	809	810
811	812	813	814	815	816	817	818	819	820
821	822	823	824	825	826	827	828	829	830
831	832	833	834	835	836	837	838	839	840
841	842	843	844	845	846	847	848	849	850
851	852	853	854	855	856	857	858	859	860
861	862	863	864	865	866	867	868	869	870
871	872	873	874	875	876	877	878	879	880
881	882	883	884	885	886	887	888	889	890
891	892	893	894	895	896	897	898	899	900
901	902	903	904	905	906	907	908	909	910
911	912	913	914	915	916	917	918	919	920
921	922	923	924	925	926	927	928	929	930
931	932	933	934	935	936	937	938	939	940
941	942	943	944	945	946	947	948	949	950
951	952	953	954	955	956	957	958	959	960
961	962	963	964	965	966	967	968	969	970
971	972	973	974	975	976	977	978	979	980
981	982	983	984	985	986	987	988	989	990
991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000

Lista de microorganismos

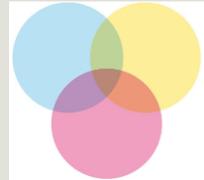


Diagrama de venn

Distribución de las comunidades bacterianas en palmas con marchitez.

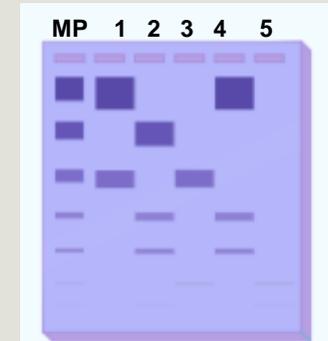
- xcccnsek
- dkndfjgfk
- kdnmdos
- pemcjdso

Lista de microorganismos presentes en todas las muestras con ML

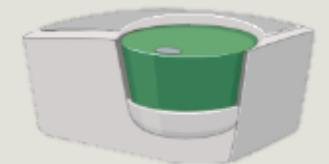
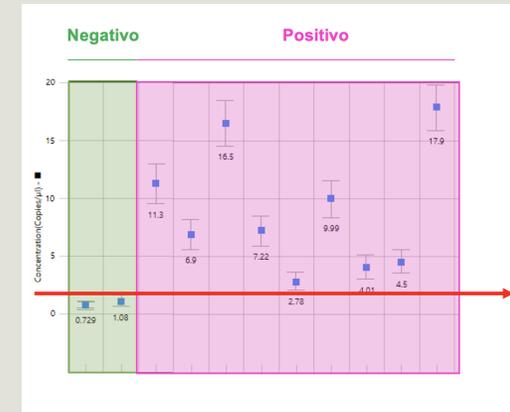


Revisión bibliográfica

Validación en laboratorio



PCR convencional



PCR digital - ddPCR

*Explicación detallada más adelante

Colecta de material vegetal

Colecta material vegetal zona oriental (ZO)

2018	CEPC	Plantación 1 – ML	Plantación 2 -ML	Plantación 3 - ML
Enferma (ML)				
Sana				

2019	CEPC – SFF (sana fuera de foco)	Plantación 1 – ML (enferma)	Plantación 1 – ML (sana dentro de foco)	CEPV – Healthy (sana)
Febrero				
Mayo				

2020	CEPC – SFF (sana fuera de foco)	Plantación 1 – ML (enferma)	Plantación 1 – ML (sana dentro de foco)	CEPV – Healthy (sana)
Mayo				

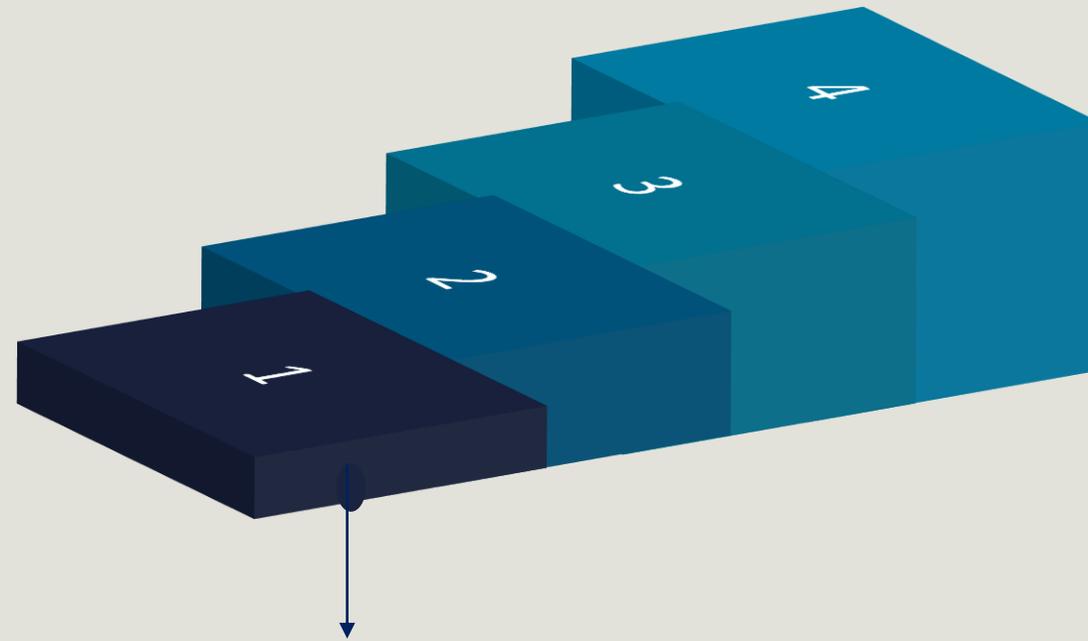
Colecta material vegetal zona central (ZC)

2020	Plantación 1	Plantación 2	Plantación 3	Plantación 4	CEPV – Healthy (sana)
MX					

2021	Plantación 1	Plantación 2	CEPV – Healthy (sana)
MX	 	 	

2022	Plantación 1	Plantación 2	Plantación 3	Plantación 4	Plantación 5
MX					

Se realizó la **Colecta de 450 tejidos vegetales** de palmas de aceite desde el año 2018 en **18 plantaciones de zona oriental y central**

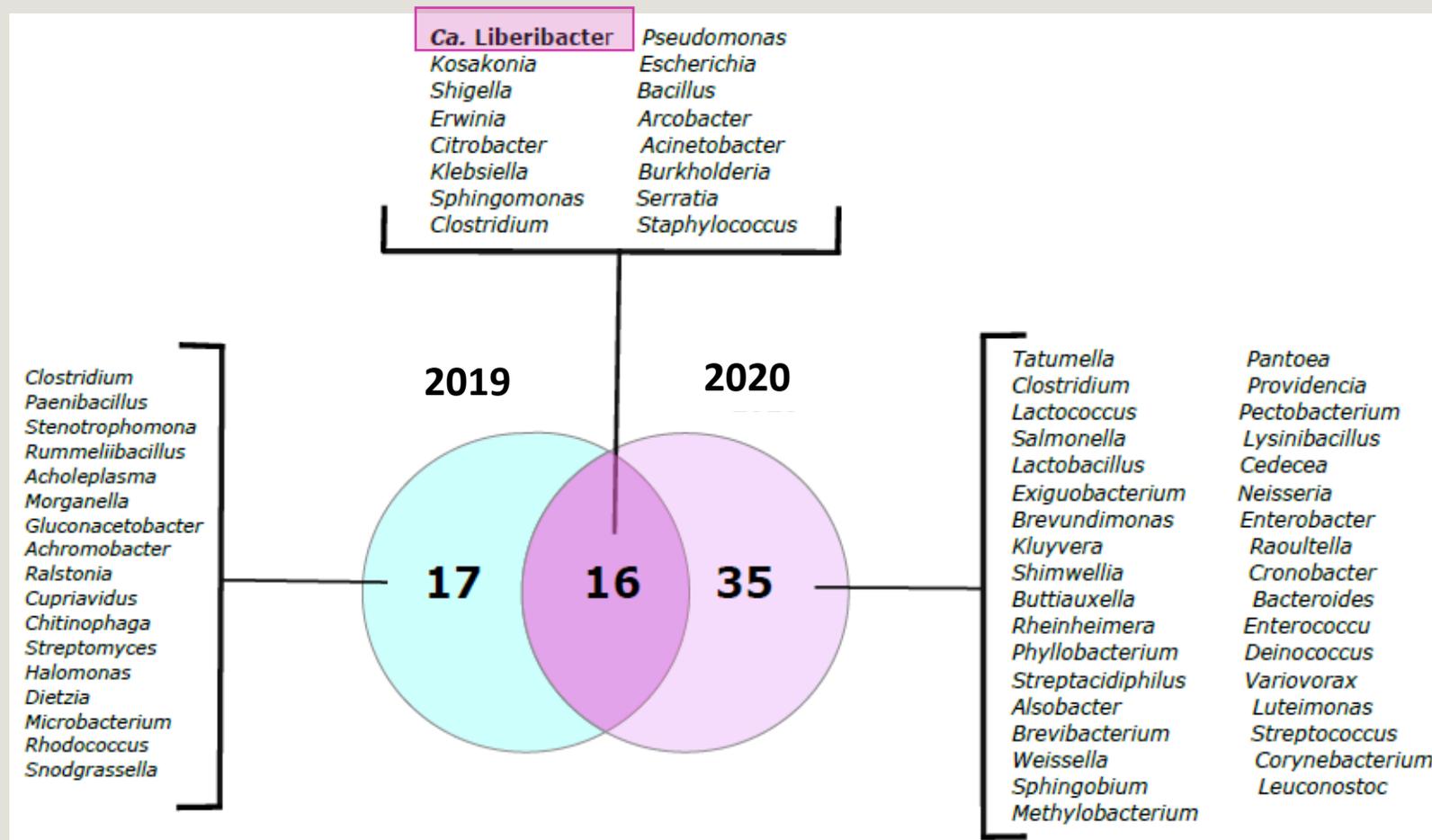


**¿ Cuáles son los
microorganismos asociados a
palmas con marchitez en zona
oriental y central ?**



Diagrama de venn

Lista de **géneros bacterianos compartidos** entre palmas con ML año 2019 y 2020 **Zona Oriental (ZO)**

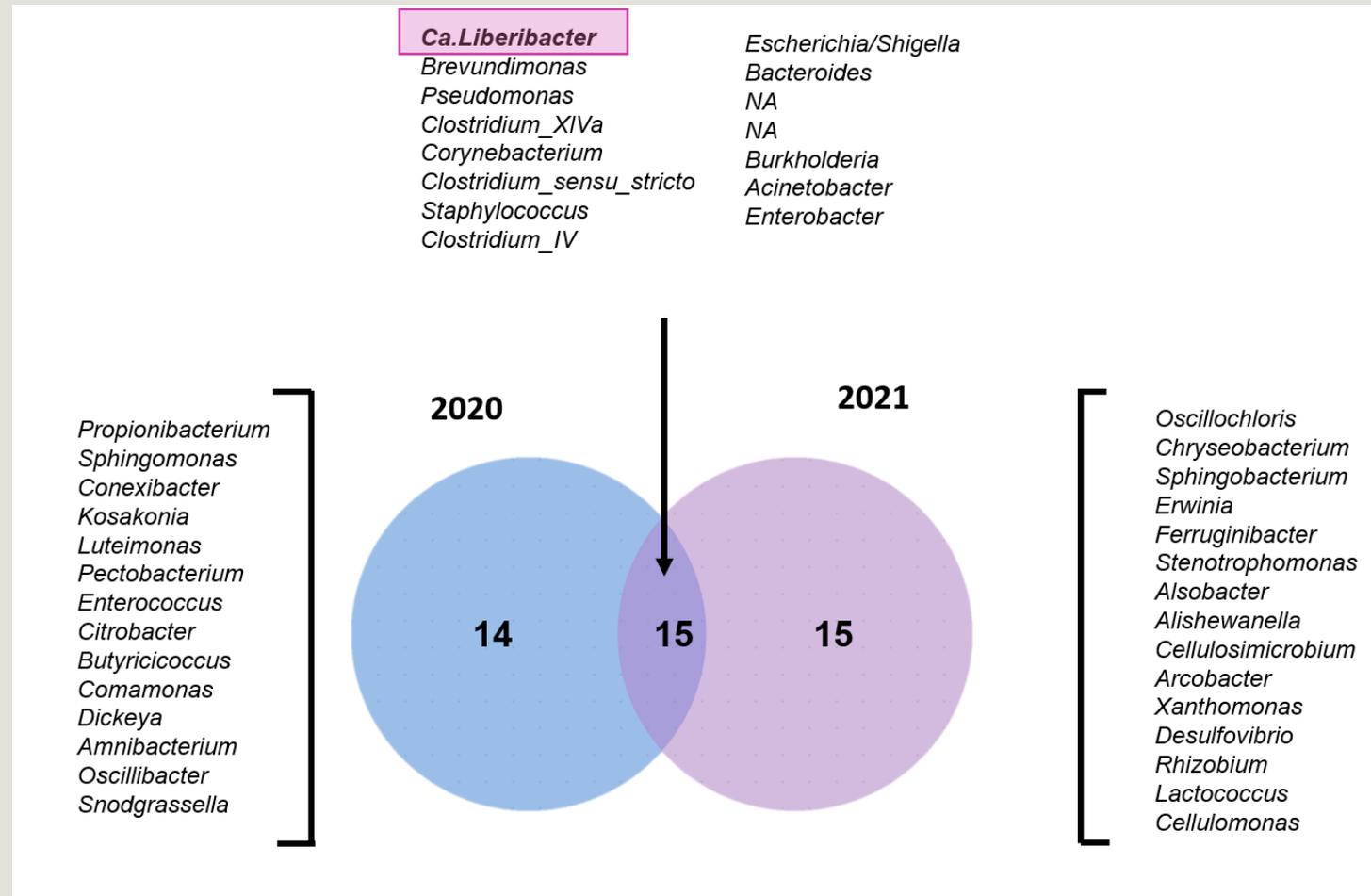


Ca. Liberibacter asociado a los síntomas de **palmas con marchitez en zona oriental**



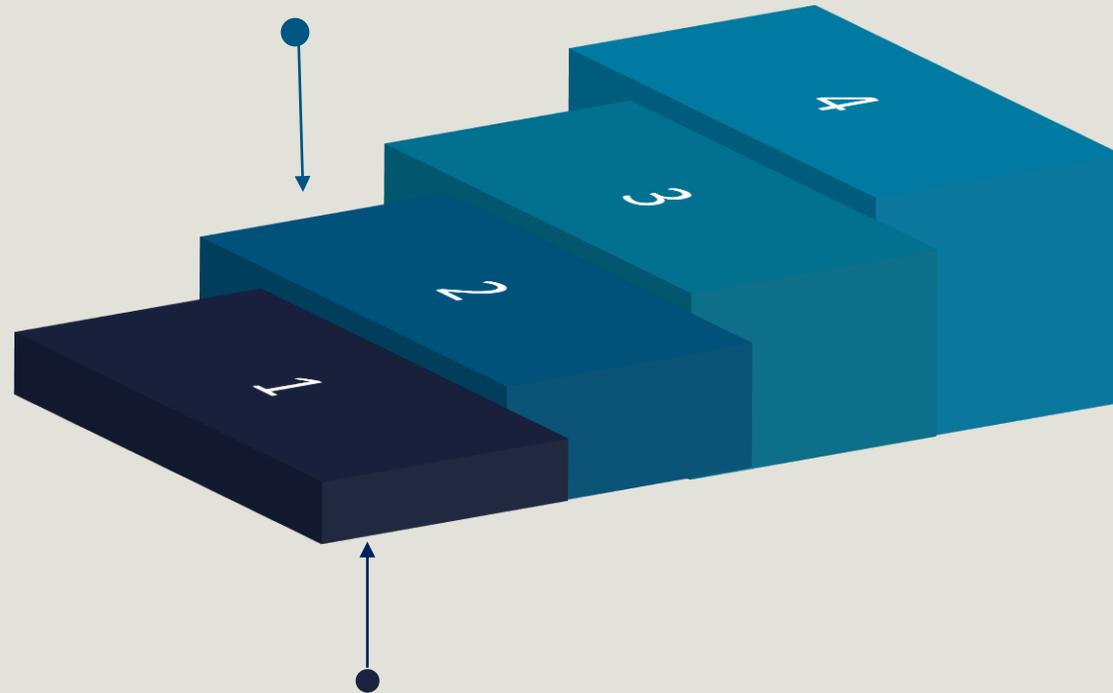
Diagrama de venn

Lista de **géneros bacterianos compartidos** entre palmas con Marchitez año 2020 y 2021 **Zona Central (ZC)**



Ca. Liberibacter asociado a los síntomas de **palmas con marchitez** en **zona central**

¿ Dentro de los microorganismos identificados en palmas con marchitez se encuentra alguno relacionado con la sintomatología?



¿ Cuáles son los microorganismos asociados a palmas con marchitez en zona oriental y central?

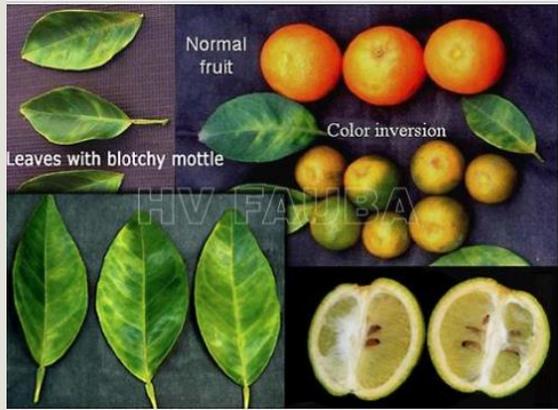
Asociación de síntomas reportados para los diferentes géneros bacterianos y la sintomatología de la ML en palma de aceite



Género bacteriano	Características	Fotografías
<p>Ca. Liberibacter</p>	<p>Bacterias gram negativas Taponador floema rutáceas, solanáceas y apiáceas No cultivable</p>	
<p>Erwinia</p>	<p>Bacterias gram negativas Enfermedades necróticas gotas de un exudado pegajoso perales, manzanos, nísperos, patatas, ornamentales y silvestres</p>	
<p>Pseudomonas</p>	<p>Bacterias gram negativas Manchas amarillas, puntos negros legumbres, guisantes, frutales</p>	
<p>Kosakania</p> 	<p>Bacterias gram negativas</p> <p><small>Open Access Published: 05 May 2020</small></p> <p><i>Kosakoniacowanii</i> as the New Bacterial Pathogen Affecting Soybean (<i>Glycine max</i> Willd.)</p> <p><small>Krzysztof Krawczyk & Natasza Borodynko-Filas</small></p> <p><small>European Journal of Plant Pathology 157, 173–183 (2020) Cite this article</small></p> <p><small>1614 Accesses 4 Citations 2 Altmetric Metrics</small></p>	

Candidatus Liberibacter

HuangLongBing (HLB)



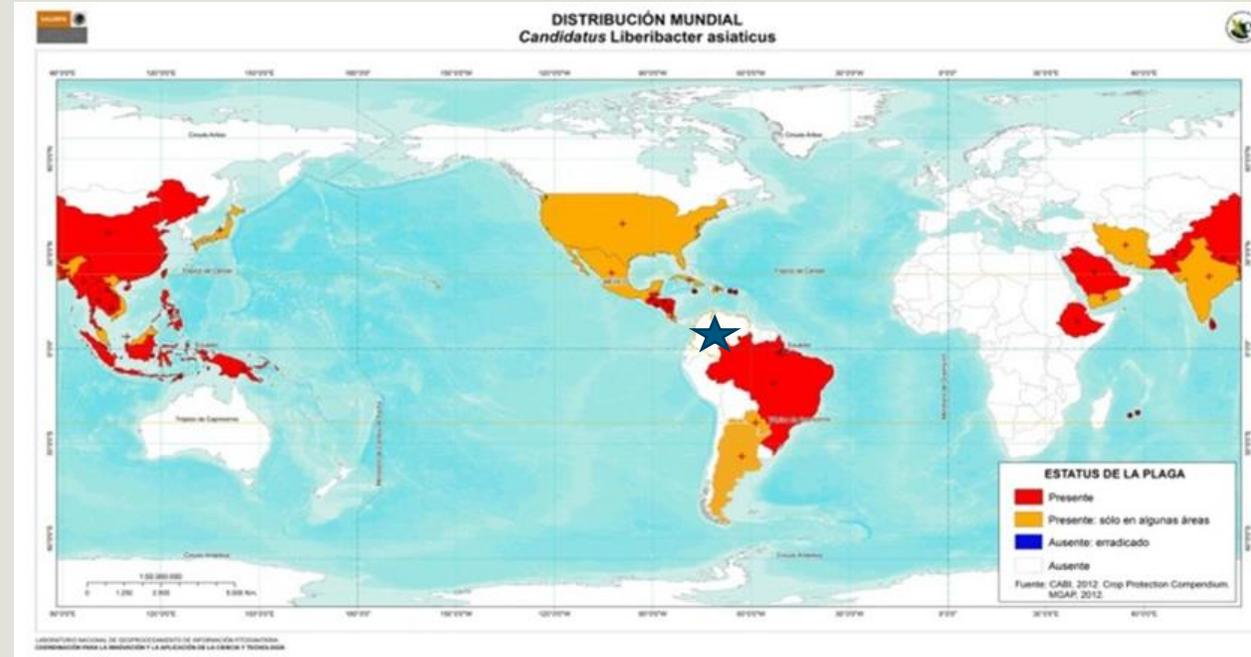
01 *Diaphorina citri*, el psílido asiático de los cítricos, es un hemíptero de la familia Psyllidae,



Zebra chip

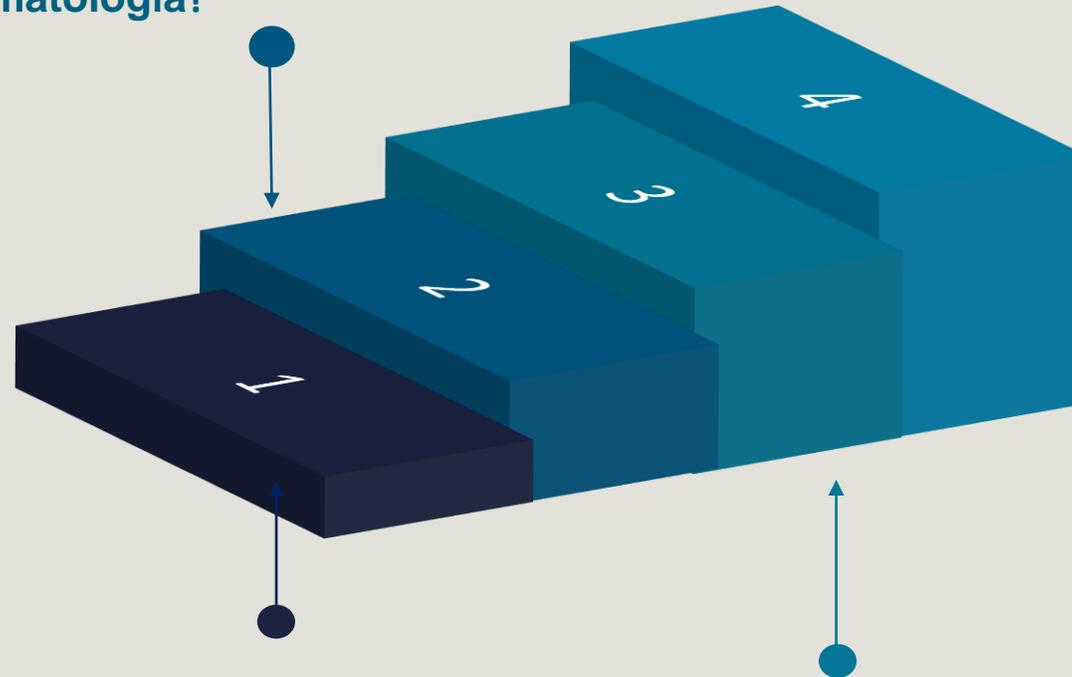
Bacteria - gram negativa

Taponador de floema, incultivable no sobrevive fuera de las plantas e insectos vectores.



- Distribución mundial (Colombia)
- 3.6 bilions per year USD
- 5 especies reportadas
- 1.950 Reportado por primera vez
- 2009 genoma secuenciado
- 2023 Retos en diagnostico en campo y uso de biología molecular.

¿ Dentro de los microorganismos identificados en palmas con marchitez se encuentra alguno relacionado con la sintomatología?



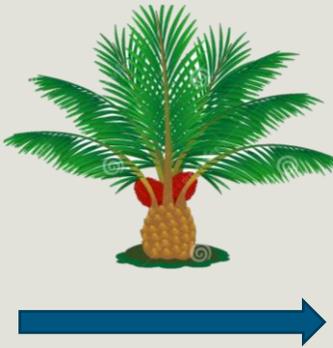
¿ Cuáles son los microorganismos asociados a palmas con marchitez en zona oriental y central?

¿Podemos relacionar nuestras secuencias de *Ca. Liberibacter* encontradas en palmas con marchitez a los reportes a nivel mundiales?



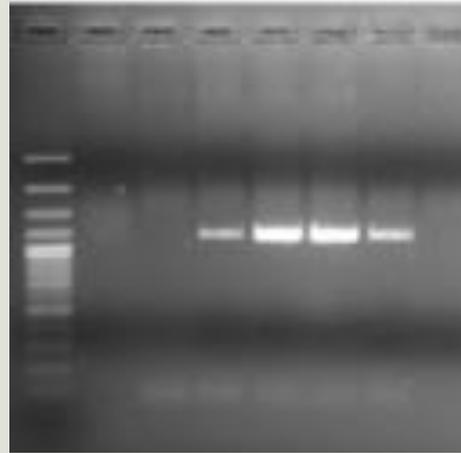
Validación de **Ca. Liberibacter** en palma de aceite por PCR convencional

Foliolo
Raquis
Inflorescencia
Pedúnculo
Meristemo
Estípite
Raíz



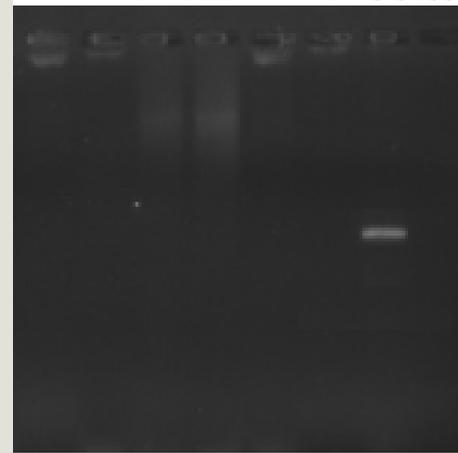
Palma ML

MP F Rq I P M S Rz



Palma sana

F Rq I P M E (+) (-)



■ (+) Ca. Liberibacter

■ (-) Ca. Liberibacter

PCR convencional

1. Presencia / ausencia de un microorganismo
2. Banda en un gel (positivo para el microorganismos)
3. Ausencia de banda (negativo para microorganismo)
4. Control (+) y (-)

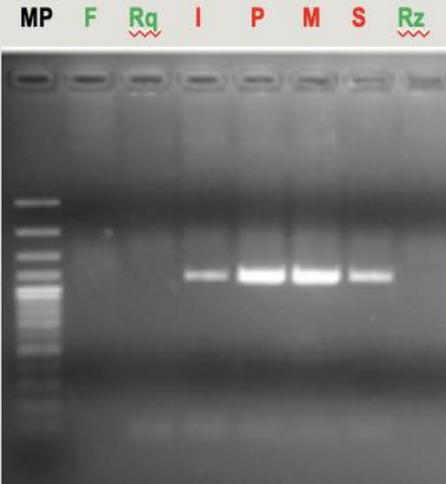
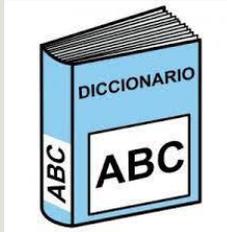
Confirmación de **Ca. Liberibacter** en palmas enfermas con ML en 3 plantaciones zona oriental y central



Validación de *Ca. Liberibacter* en palma de aceite por PCR secuenciación

100% identidad con *Ca. Liberibacter asiaticus*

Palma ML



```

CTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCA
ATTTAGAGGAAGTAAAAAGTCGTAACAAGGT
ACTGTCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTT
TTGCTTCGGCGGGCGCCCGCAAGGGTGCCCG
CCTGCCGTGGCAGATCCCCAACGCCGGGCC
TCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAACGCAG
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGAT
ATACTTCTGAGTGTTCCTTAGCGAACTGTCA
GATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC
AACGGATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAA
GATCTCTTGGCTCCAGCATCGATGAAGAAC
TGAAGAACGCAGCGAAACGCGATATGTAAT
    
```

Graphics Distance tree of results **New** MSA Viewer

Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
1917	1917	99%	0.0	100.00%	1167	MK142763.1
1917	1917	99%	0.0	100.00%	1146	MK142752.1

Host-free biofilm culture of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*," the bacterium associated with Huanglongbing

Phuc T. Ha ^a, Ruifeng He ^b, Nabil Killiny ^c, Judith K. Brown ^d, Anders Omsland ^e, David R. Gang ^b, Haluk Beyenal ^a  

Foliolo - Raquis - Inflorescencia - Pedúnculo - Meristemo - Estípites - Raíz

Confirmación de *Ca. Liberibacter* en palmas enfermas con ML en 3 plantaciones zona oriental y central

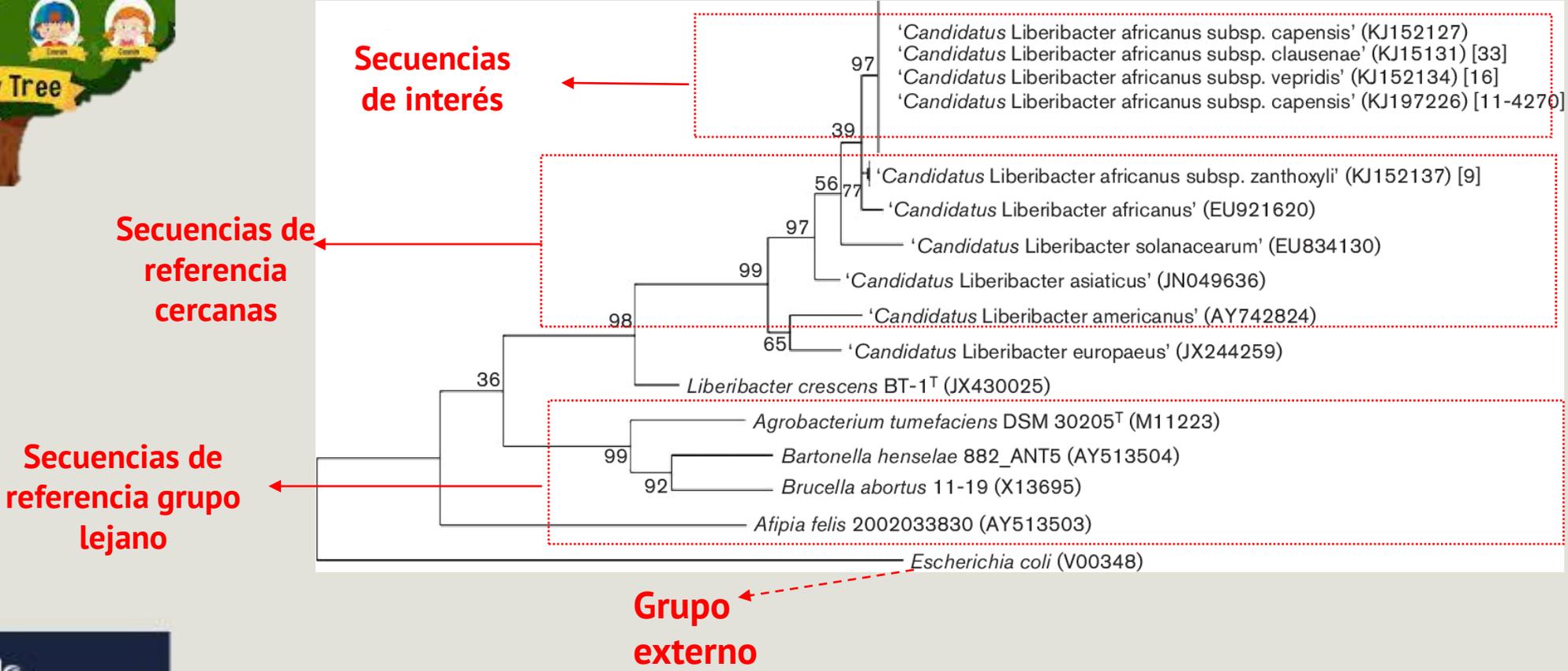
EJEMPLO

Relación filogenética de Ca. Liberibacter en palmas enfermas con ML y el género Liberibacter a nivel mundial

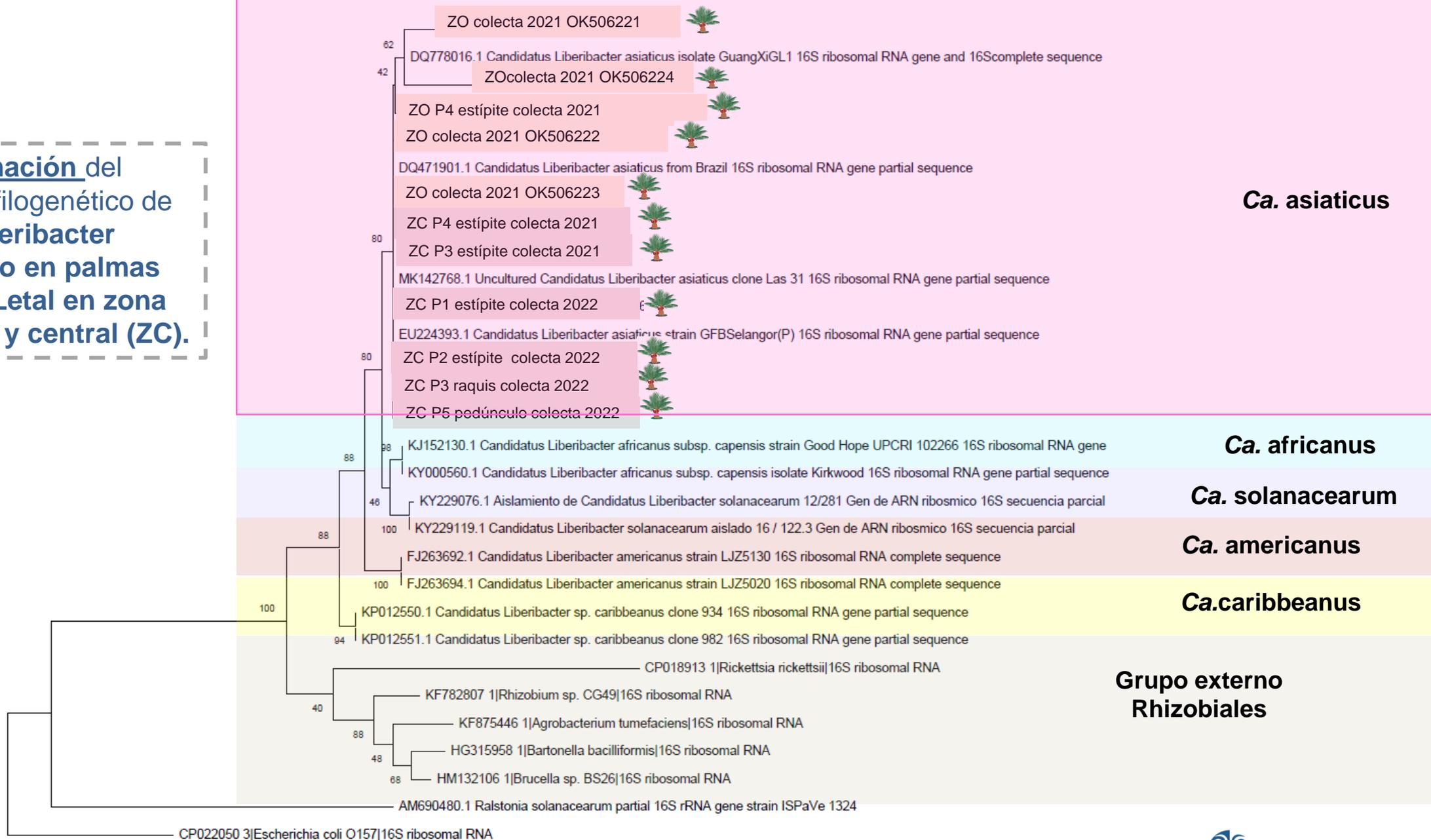


Puede interpretar el **relación entre dos organismos examinando** sus posiciones en un árbol filogenético.

Three novel lineages of '*Candidatus Liberibacter africanus*' associated with native rutaceous hosts of *Trioza erytreae* in South Africa
Ronel Roberts,^{1,2} Emma T. Steenkamp¹ and Gerhard Pietersen^{1,2}

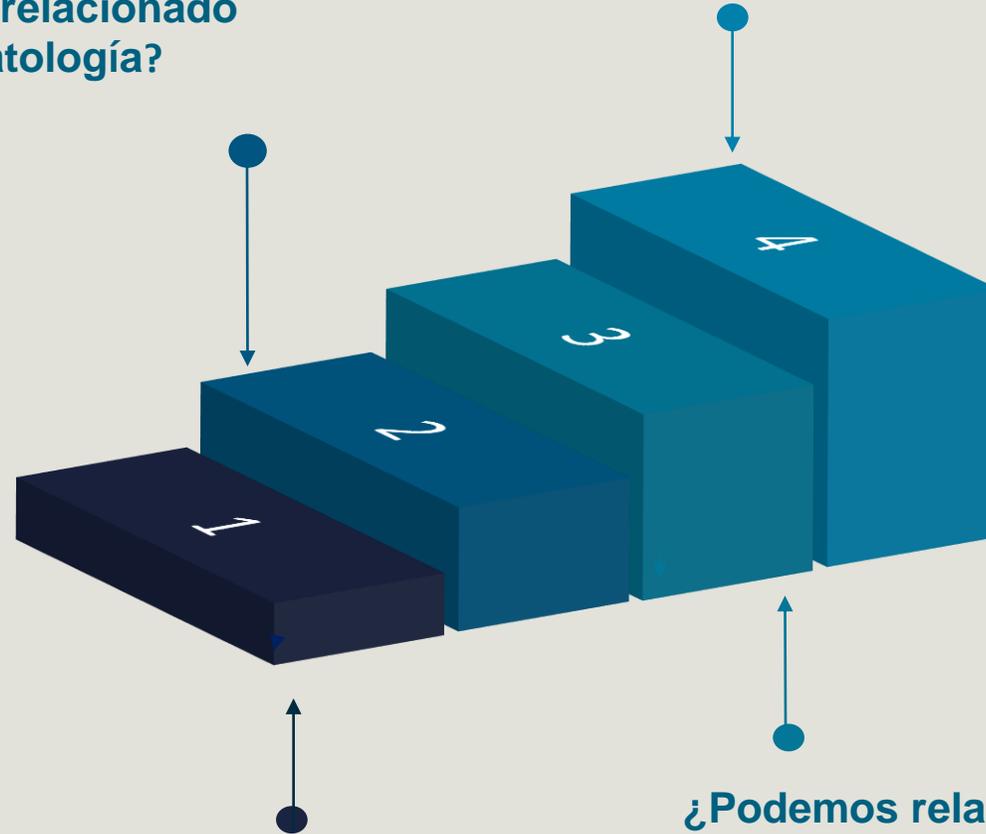


Confirmación del parentesco filogenético de *Ca. Liberibacter* identificado en palmas Marchitez Letal en zona oriental (ZO) y central (ZC).



¿ Dentro de los microorganismos identificados en palmas con marchitez se encuentra alguno relacionado con la sintomatología?

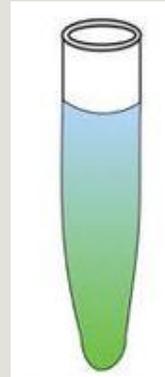
¿Es posible validar por técnicas moleculares la presencia de *Ca. Liberibacter* en palmas con marchitez en zona oriental y central?



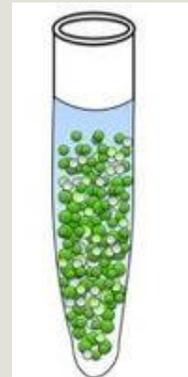
¿Cuáles son los microorganismos asociados a palmas con marchitez en zona oriental y central?

¿Podemos relacionar nuestras secuencias *Ca. Liberibacter* encontradas en palmas con marchitez a los reportes a nivel mundiales?

PCR digital o ddPCR

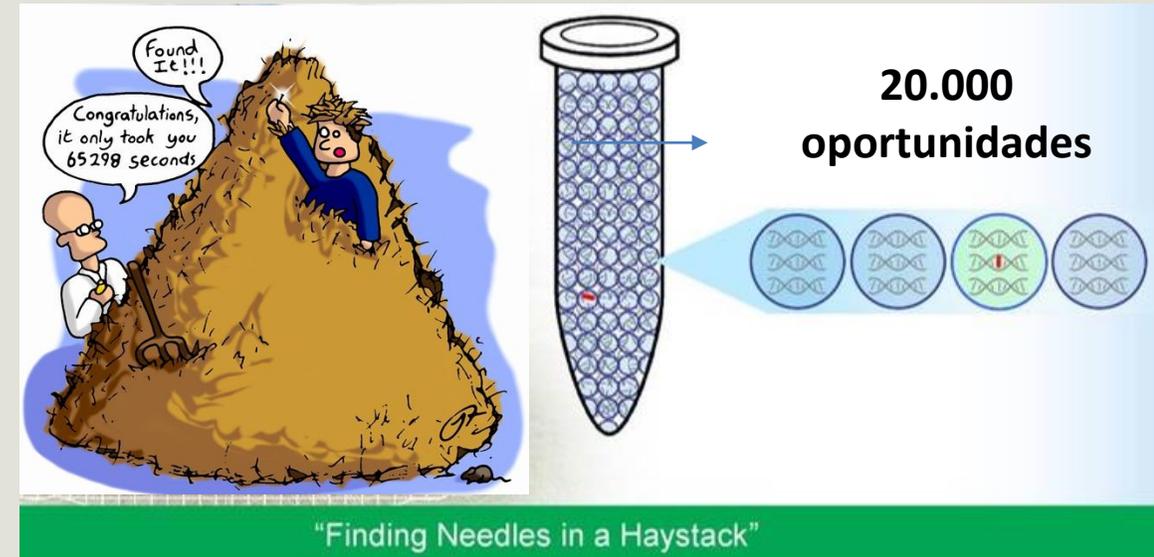


VS

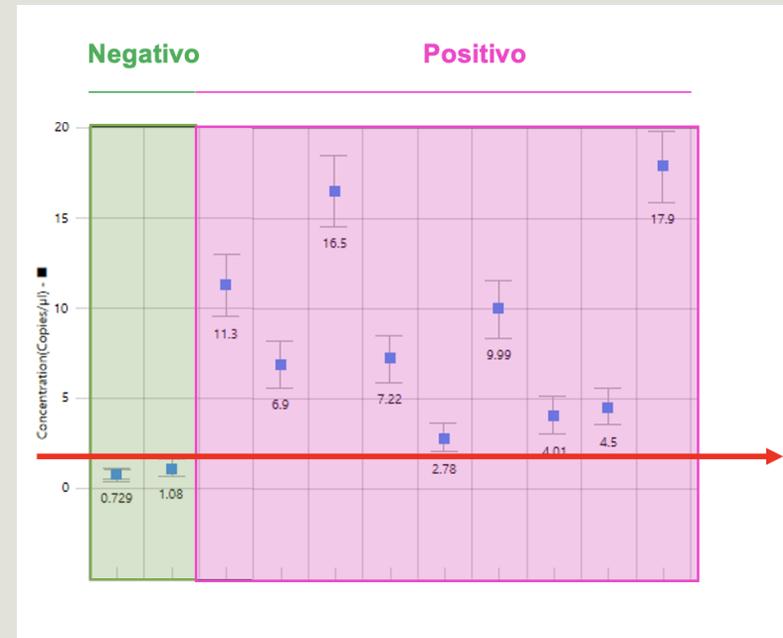


Una sola
medición
**PCR
convencional**

20.000
mediciones
**PCR
digital**



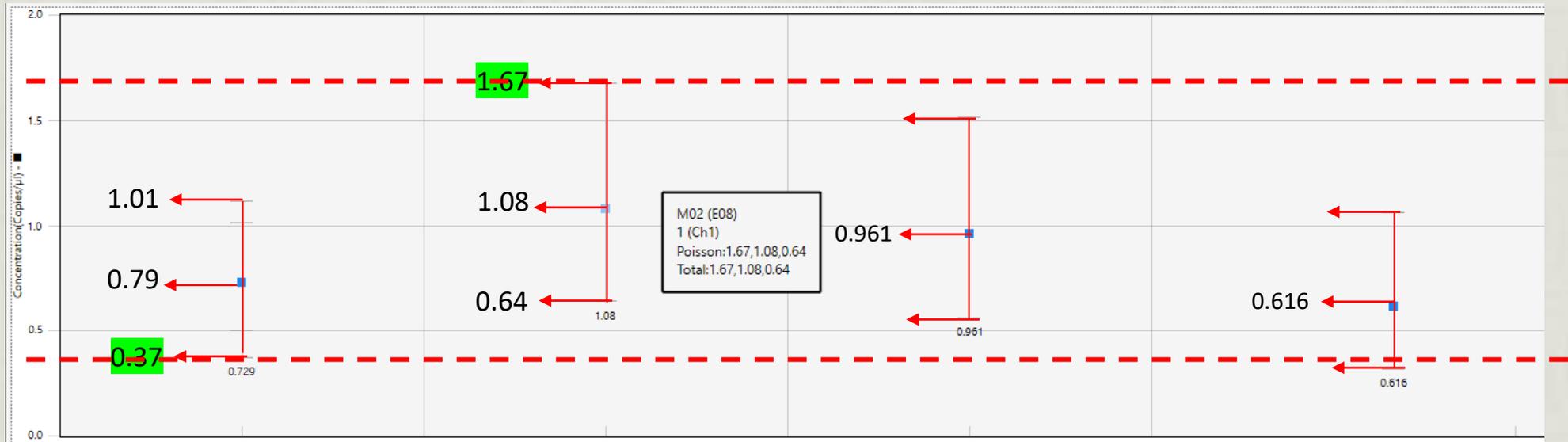
Una técnica de
**identificación eficiente
y oportuna** reduce
tiempo y costos



Identificación de *Ca. Liberibacter* por PCR digital - ddPCR

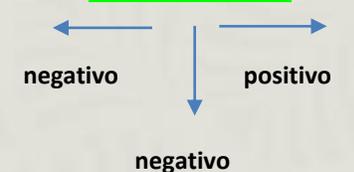
Verdaderos negativos

NTC No template control Negativo de reactivos	 Oleífera	 Limón 1 (-)HLB Cundinamarca	 Limón 2 (-)HLB Cundinamarca
---	--	---	---



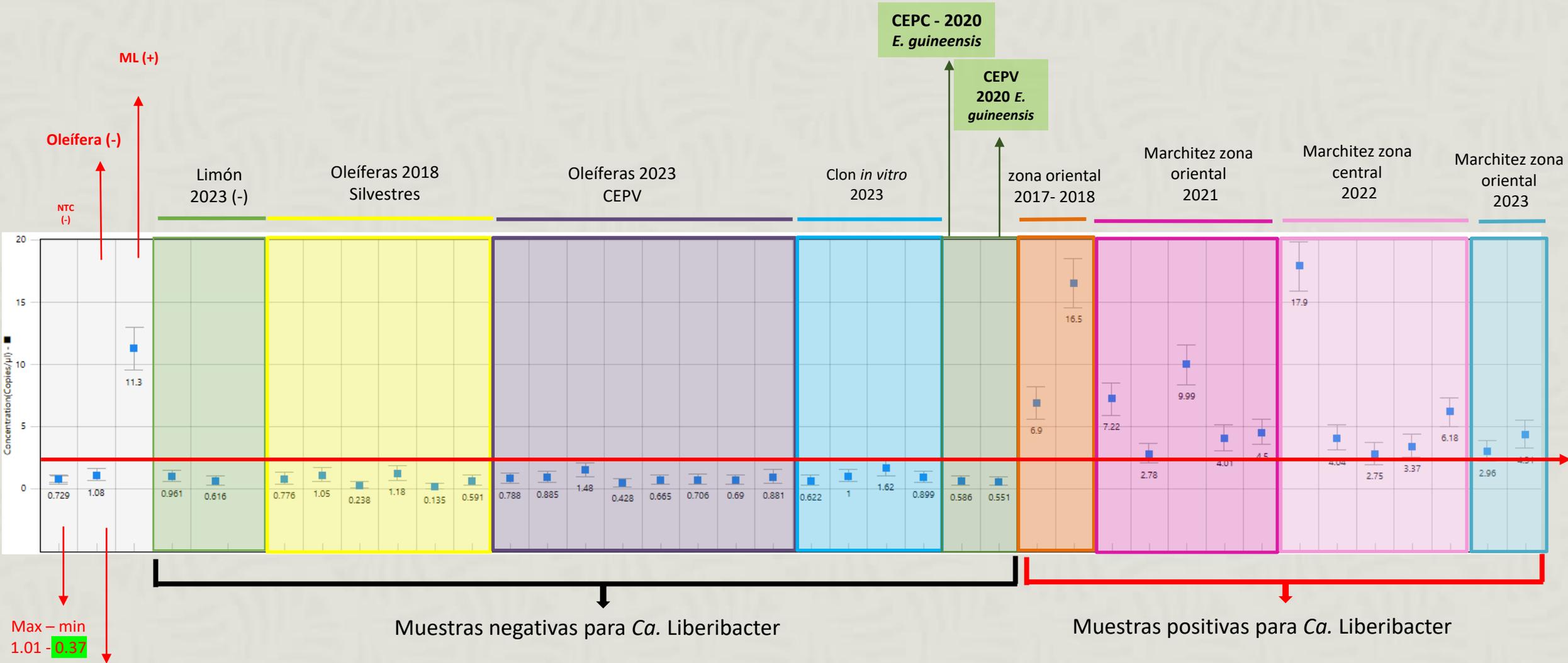
Intervalo para determinar un Verdadero negativo

0.37 - 1.67



Distribución de poisson: la probabilidad de ocurrencia de sucesos con probabilidades muy pequeñas, o sucesos «raros». determinar el número de hechos de cierto tipo que se pueden producir en un intervalo de tiempo o de espacio, bajo presupuestos de aleatoriedad y ciertas circunstancias restrictivas.

Análisis de diferentes muestras con ddPCR



Se confirma mediante PCR digital la presencia de *Ca. Liberibacter* en palmas con marchitez letal en zona oriental y central.

CONFIRMADO

Las herramientas moleculares como la metagenómica y la PCR digital permitieron confirmar la presencia de **Ca. Liberibacter** como agente causal de **Marchitez Letal** en palmas de aceite en **zona oriental y central** permitiendo enfocar los protocolos de manejo integrado de una manera exitosa, contribuyendo con el estatus fitosanitario del cultivo



Gracias

