

Análisis evolutivo de dos bacterias de interés agrícola *Candidatus Liberibacter* y *Rhizobium*

Salinas Lugo, Alan Gabriel; Cantero, Jorge
evol94.as@gmail.com; jorgecanterop@gmail.com
Facultad de Ingeniería Agronómica
Universidad Nacional del Este

Resumen.

El huanglongbing (HLB) es una enfermedad, que afecta principalmente a los cítricos (*Citrus spp.*), contra la cual no existe hasta la fecha control químico ni biológico causando daños alrededor de todo el mundo. La enfermedad es causada por bacterias llamadas Liberibacterias (*Candidatus Liberibacter spp.*). La familia Rhizobiaceae contiene dentro de sí especies asociadas al suelo y las plantas, siendo el *Rhizobium* micro simbiontes facultativos habitantes de los suelos y las *Liberibacter*, en su mayoría fitopatógenas. Conforme las diferencias existentes entre los genomas de los organismos se pueden reconstruir su filogenia mediante herramientas computacionales. Se obtuvieron los genomas de la base de datos taxonómica del NCBI y los ortólogos se obtuvieron mediante un BLAST. Con ayuda del software R con sus paquetes se reconstruyó la filogenia de los ortólogos entre ambas especies y del concatenado de los mismos. La reconstrucción filogenética de los árboles consenso y "genoma artificial" fueron coherentes entre, el clado de *Candidatus Liberibacter* con el de trabajos anteriores y a los reportados sobre el estándar (sub-unidad ribosomal 16S). Las marcadas semejanzas entre *Liberibacter crescens* y las especies de *Rhizobium* pueden indicar que la especie fue la última en especiarse del clado de los *Liberibacters*. El marcado largo de rama en árbol de la fosfopantotenoilcisteina descarboxilasa de *Ca. Libetibacter americanus* puede tratarse de un evento de transferencia horizontal desde *Arsenophonus*. La importancia de los análisis bioinformáticos sobre los mecanismos biológicos de *Ca. L.* se vuelven esenciales con los últimos descubrimientos sobre una posible resistencia por parte de los Cítricos.

Palabras claves: Candidatus Liberibacter, Rhizobium, filogenia, HLB

Introducción

El huanglongbing (HLB) es una enfermedad, que afecta principalmente a los cítricos (*Citrus spp.*), contra la cual no existe hasta la fecha control químico ni biológico, la misma causa grandes daños en cuanto a volumen y calidad de producción, puede llevar a la senescencia de la planta; sin embargo, tarda 4 años aproximadamente en matar a la planta y los peores daños se dan en ese intervalo (SENAVE, 2013), por lo cual fue declarada emergencia fitosanitaria en el año 2013 (SENAVE, 2014). La enfermedad es causada por bacterias gram negativas, llamadas Liberibacterias (*Candidatus Liberibacter spp.*), de la clase alfa proteobacterias, son parásitos obligados que viven dentro del floema de las plantas y se transmiten de una planta a otra por psílidos (Bové, 2006), específicamente *Diaphorina citri* de origen asiático y *Trioza erytrea* de origen africano, ambos del orden Hemiptera de la familia Psyllidae. Estos insectos afectan principalmente a los brotes tiernos, sin embargo, en ausencia de la bacteria son considerados plagas menores (Monzó, Urbaneja, & Tena, 2015).

La familia Rhizobiaceae descrita por Conn en 1938 contiene dentro de sí especies asociadas al suelo y las plantas, siendo el *Rhizobium* el primer genero estudiado y establecido dentro de la familia y las Liberibacterias, en su mayoría fitopatogenas, fueron posteriormente

clasificadas dentro de la familia (Ant & Souza, 2015). Las bacterias del genero *Rhizobium* son micro simbioses facultativos y son normalmente encontrados dentro de la micro biota del suelo, principalmente dentro del rizoplaneo y la rizosfera, alimentándose de los compuestos despididos por las raíces de las plantas y teniendo la particularidad de captar el nitrógeno atmosférico y hacerlo disponible para las plantas en simbiosis con las leguminosas y ocasionalmente otras plantas (Wang & Trivedi, 2013). La Liberibacterias están ampliamente distribuidas por todo el mundo; *Ca. Liberibacter asiaticus* (Clasi) principalmente en Asia y América, *Ca. Liberibacter africanus* (Clafr) en África y *Ca. Liberibacter americanus* (Clame) en Sudamérica, son las especies que afectan a los cítricos (*C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. limon*, *C. maxima* y *C. paradisi*), *Ca. Liberibacter solanacearum* (Clisol) en Europa, norte de África, Oceanía (Nueva Zelanda) y centro y norte América, causa enfermedad en solanáceas (*S. tuberosum*, *S. lycopersicum*, *S. betaceum*, *C. annum* y *P. peruviana*), por último *Ca. Liberibacter europaeus* (Cleur) en Europa y *Liberibacter crescens* (Libcre) en el caribe, causan daño a plantas leñosas (*Pyrus communis*, *M. domestica*, *P. spinosa* y *C. monogyna*) (Haapalainen, 2014). En la planta, se hallan concentradas principalmente en el pedúnculo, también en la corteza, nervio central de las hojas, raíces, ápices

radiculares, pétalos, pistilos, estambres, cubierta seminal, fruto joven, sin embargo no se encuentran en el endospermo (Tatineni et al., 2008).

Las especies de *Candidatus Liberibacter* evolucionaron a su forma actual hace más de 300 millones de años (Ma) en el periodo carbónico de la era paleozoica, cuando todos los continentes estaban unidos en un súper continente llamado Pangea, se presume que la separación entre Clafr y Clasi ocurrió hace 147 Ma en el periodo Jurásico, tras la separación del continente Godwana, formando África e India y la separación de Clame del antecesor común de ambos hace 309 Ma (Nelson, Munyaneza, McCue, & Bové, 2013). Conforme las diferencias existentes entre los genomas de los organismos se puede reconstruir su filogenia (Omland, Cook, & Crisp, 2008), para lo cual en la actualidad es común el uso de herramientas computacionales (Higgs & Attwood, 2005), lo que permite obtener un panorama general sobre la conexión de los organismos en el tiempo.

Teniendo un mejor entendimiento del comportamiento biológico de las especies se pueden potenciar sus puntos favorables o disminuir las afecciones, de los mismos para hombre, en cualquier aspecto de su vida.

Objetivos

General

- Reconstruir la filogenia de dos especies de la familia Rhizobiaceae de interés agrícola.

Específicos

- Obtener los el conjunto de genes ortólogos entre todas las especies estudiadas.
- Reconstruir los arboles evolutivos para cada gen, el consenso de los mismos y el árbol de los ortólogos concatenados.
- Identificar arboles discordantes del conjunto de ortólogos e inferir razones de su discordancia.
- Generar hipótesis de eventos evolutivos para trabajos posteriores.

Materiales y Métodos

- Obtención de genomas

Se realizó una búsqueda en la base de datos taxonómica del Centro Nacional de Información Biotecnología de los E.E.U.U. (NCBI por sus siglas en inglés) (Federhen, 2003) y se incluyeron las especies de *Candidatus Liberibacter* (CaL) y *Rhizobium* (Rhz) cuyo genoma se encontraron totalmente secuenciados, además se designó a *Bartonella bovis*, también una alfa proteobacteria, como grupo externo para enraizar el árbol.

Luego se descargaron el conjunto completo de proteínas de las especies en el formato FASTA.

- Identificación de ortólogos

La identificación de los ortólogos se realizó mediante la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local de proteínas (BLASTp) del NCBI (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990), utilizando el algoritmo para identificar los mejores hits recíprocos (RBH) (Moreno-Hagelsieb & Latimer, 2008) con el parámetro de corte, valor esperado igual a $1e-24$.

Fueron separados en archivos tipo FASTA, donde cada archivo contenía la versión del gen ortólogo de todos los organismos.

- **Alineamientos de secuencias múltiples**

Se construyeron los alineamientos de secuencias múltiples de cada gen mediante el programa MAFFT con sus configuraciones por defecto (Katoh & Standley, 2013) y luego se realizaron cortes de las partes muy variables de los alineamientos, en la que la señal evolutiva se ve saturada por la magnitud de los cambios, esto se realizó con el programa trimAl, de esta manera nos aseguramos de mantener únicamente aquellas regiones del alineamiento en donde la hipótesis de homología es más fuerte (Capella-Gutiérrez, Silla-Martínez, & Gabaldón, 2009).

Con las secuencias alineadas y depuradas se construyó un “genoma artificial”, que consistía en la concatenación

de la secuencia de cada organismo, respetando el alineamiento.

- **Construcción de árboles evolutivos**

Para todas las operaciones de manipulación de datos se utilizó el software R (R Core Development Team, 2015). El análisis de las secuencias se realizó con el paquete “seqinr” (Charif & Lobry, 2007). La identificación de los modelos de tasas de sustitución de aminoácidos que mejor predirían la evolución de los organismos mediante ModelTest del paquete “phangorn” (Schliep, 2011).

Se construyeron los árboles de los ortólogos, en base al mejor modelo de evolución predicho. Para lo cual, primero se analizaron las distancias entre pares de aminoácidos (aa) y luego se realizó un algoritmo de agrupamiento (clustering) para formar estimaciones de árboles con el método unión de vecinos (Neighbor-Joining) (Saitou & Nei, 1987) y utilizarlo como árbol guía. El ModelTest evaluó 17 modelos de sustitución de aa y se seleccionó el modelo en base al criterio de información de Akaike (AIC), a fin de tener en cuenta las distintas tasas de evolución entre sitios que se pueden tener a lo largo del alineamiento, también se incluyó la evaluación de un parámetro de distribución gamma (+G) y/o la proporción de sitios invariantes (+I) para cada modelo, si fuere necesario conforme a cada gen. Se

construyeron los árboles, utilizando la función pml del paquete “phangorn”, en base al modelo seleccionado en el paso anterior. Luego se optimizaron la topología y el largo de ramas. Para escapar de los óptimos locales se utilizó el algoritmo heurístico de intercambio del vecino más cercano (Nearest Neighbor Interchange - NNI). Por último se observaron las distancias topológicas entre los árboles construidos con cada gen y se construyó un árbol consenso a partir de los mismos (Paradis, Claude, & Strimmer, 2004). Para la construcción del árbol con el “genoma artificial” se realizó el mismo procedimiento.

- Análisis de los árboles

Se realizó una transformación de los nodos multicotómicos en dicotómicos a mediante la función multi2di del paquete “ape” (Paradis et al., 2004), de manera a poder proceder con los análisis siguientes.

A modo de determinar el acuerdo entre el árbol consenso y el del “genoma artificial” se calculó la distancia topológicas entre ambos árboles y se representó con un tanglegrama (Paradis et al., 2004).

Posteriormente se identificaron los árboles discordantes, mediante las distancias topológicas y geodésicas dentro del conjunto de ortólogos, mediante el método descrito en el paquete KDETtree que estima las distribuciones de los árboles y sus diferencias dentro del conjunto

(Weyenberg, Huggins, Schardl, Howe, & Yoshida, 2014). Para las diferencias topológicas se utilizaron los parámetros de densidad del Kernel $k=0,97$ y para las diferencias geodésicas $k=1,30$, estos parámetros se definieron mediante un corte representativo en el gráfico de la clasificación (score) de las densidades no normalizadas.

Por último se analizaron de forma individual los árboles discordantes para poder identificar los falsos positivos y excluirlos, observando los largos de rama y la topología, verificando los alineamientos y su similitud con otros organismos utilizando el BLASTp contra la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes del NCBI. Con el propósito de fortalecer o rechazar hipótesis establecidas en trabajos anteriores.

Resultados y discusión

- Obtención de secuencias

Se obtuvieron los genomas totalmente secuenciados de seis especies de *Candidatus Liberibacter* y *Rhizobium* (Tabla 1); *Ca. Liberibacter asiaticus* (Clasi), *Ca. Liberibacter africanus* (Clafr), *Ca. Liberibacter americanus* (Clame), *Ca. Liberibacter solanacearum* (Clisol), *Liberibacter crescens* (Libcre), *Rhizobium leguminosarum* (Rlegu), *Rhizobium etli* (Retli), *Rhizobium gallicum* (Rgall), *Rhizobium mesoamericanum* (Rmeso), *Rhizobium phaseoli* (Rphas), *Rhizobium anhuiense* (Ranhu), *Rhizobium leucaenae*

(Rleuc), *Rhizobium sullae* (Rsull),
Rhizobium tropici (Rtrop), *Rhizobium*
rhizosphaerae (Rrhiz), *Rhizobium tibeticum*
(Rtibe), *Rhizobium oryzae* (Roryz),
Rhizobium favelukesii (Rfave), *Rhizobium*

bangadeshense (Rbang), *Rhizobium*
acidisoli (Racid), *Rhizobium alamii*
(Ralam), *Rhizobium pusense* (Rpuse) y se
designó como grupo externo a la *Bartonella*
bovis (Barto).

Tabla 1. Identificación de los organismos para el análisis filogenético.

| Nro | Nombre | ID | Size (Mb) | GC% | Proteínas |
|-----|---|---------|-----------|------|-----------|
| 1 | <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> | 1.750 | 1,27 | 36,6 | 1.082 |
| 2 | <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> | 16.492 | 1,20 | 31,1 | 953 |
| 3 | <i>Candidatus Liberibacter africanus</i> | 38.432 | 1,19 | 34,5 | 991 |
| 4 | <i>Liberibacter crescens</i> | 15.865 | 1,50 | 35,4 | 1.245 |
| 5 | <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> | 2.244 | 1,26 | 35,2 | 1.048 |
| 6 | <i>Rhizobium leguminosarum</i> | 744 | 7,55 | 60,7 | 7.029 |
| 7 | <i>Rhizobium etli</i> | 827 | 6,53 | 61,1 | 6.148 |
| 8 | <i>Rhizobium gallicum</i> | 14.339 | 7,31 | 59,6 | 6.759 |
| 9 | <i>Rhizobium mesoamericanum</i> | 12.540 | 6,69 | 58,9 | 6.113 |
| 10 | <i>Rhizobium phaseoli</i> | 12.244 | 6,73 | 61,3 | 6.224 |
| 11 | <i>Rhizobium anhuiense</i> | 55.528 | 7,22 | 61,1 | 6.716 |
| 12 | <i>Rhizobium leucaenae</i> | 17.319 | 6,76 | 59,3 | 6.191 |
| 13 | <i>Rhizobium sullae</i> | 14.213 | 7,53 | 59,9 | 6.968 |
| 14 | <i>Rhizobium tropici</i> | 11.072 | 7,26 | 60,0 | 6.675 |
| 15 | <i>Rhizobium rhizosphaerae</i> | 52.931 | 5,35 | 64,6 | 4.547 |
| 16 | <i>Rhizobium tibeticum</i> | 50.473 | 6,98 | 59,7 | 6.240 |
| 17 | <i>Rhizobium oryzae</i> | 49.832 | 5,39 | 62,8 | 4.653 |
| 18 | <i>Rhizobium favelukesii</i> | 45.735 | 7,20 | 59,6 | 7.021 |
| 19 | <i>Rhizobium bangadeshense</i> | 45.174 | 6,61 | 60,9 | 6.082 |
| 20 | <i>Rhizobium acidisoli</i> | 40.956 | 7,36 | 61,1 | 6.686 |
| 21 | <i>Rhizobium alamii</i> | 33.170 | 7,35 | 60,1 | 6.909 |
| 22 | <i>Rhizobium pusense</i> | 21.527 | 5,98 | 59,1 | 5.383 |
| 23 | <i>Bartonella bovis 91-4</i> | 155.194 | 1,62 | 37,4 | 1.330 |

En la búsqueda de genes ortólogos mediante el BLASTp identificaron 468 genes entre los organismos, los cuales fueron separados en 468 archivos tipo FASTA, donde cada archivo contenía la versión del ortólogo del gen en todos los organismos.

- Mejores modelos de sustitución de aa

El 64,32% de los genes evaluados (Figura 1) prefirió el modelo de sustitución de aa LG (Le & Gascuel, 2008), por la fuerte influencia del *Rhizobium* dentro del conjunto. En trabajos anteriores (Salinas & Cantero, 2017), se determinó que mejor

modelo para *Candidatus Liberibacter* fue el cpREV de evolución de plastidios y organismos fotosintetizadores (Adachi, Waddell, Martin, & Hasegawa, 2000). Lo cual induce a pensar que CaL co-

evoluciona con su hospedero por ser dependiente del mismo (Haapalainen, 2014), a diferencia del Rhz simbiote facultativo (Burdass, 2002).

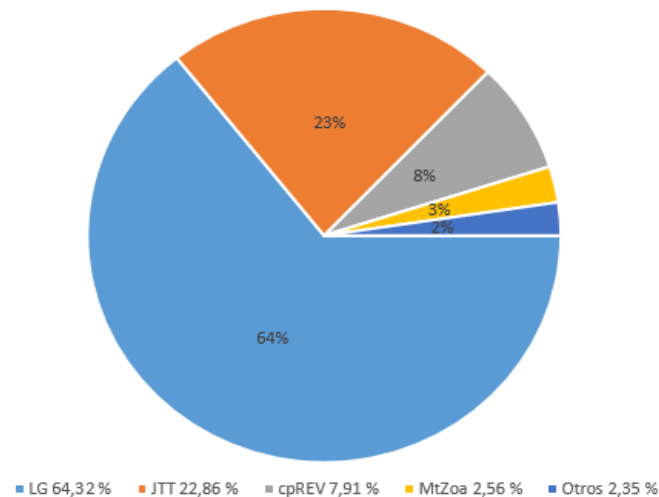


Figura 1. Modelos de sustitución de aminoácidos estimados para el conjunto de genes ortólogos.

El árbol filogenético reconstruido a partir del “*genoma artificial*” mediante el método de Máxima Verosimilitud, utilizando el modelo LG+G+I (logLike = -2366687) se muestra en la Figura 2.

Los arboles de ambas especies están claramente separados, a una distancia de 0,387 de largo de rama y estos a su vez a 0,629 de Barto, con lo que se demuestra la diferencia evolutiva entre ambas especies. Se observa que Libre es el miembro más lejano de los CaL, por lo que es el más emparentado con Rhz, lo

cual puede ser una explicación del porque los genes discordantes de Libre encontrados en trabajos anteriores se muestran muy emparentados con especies de Rhz. Se puede inferir que fue la última especie de los CaL que sufrió un evento de especiación. El sub árbol de CaL concuerda con trabajos anteriores (Salinas & Cantero, 2017) y a su vez con otros estudios que reportan la filogenia (Bové, 2006; Fagen et al., 2014; Nelson et al., 2013; Raddadi et al., 2011; Vegetale, 2011) de la sub unidad ribosomal 16S

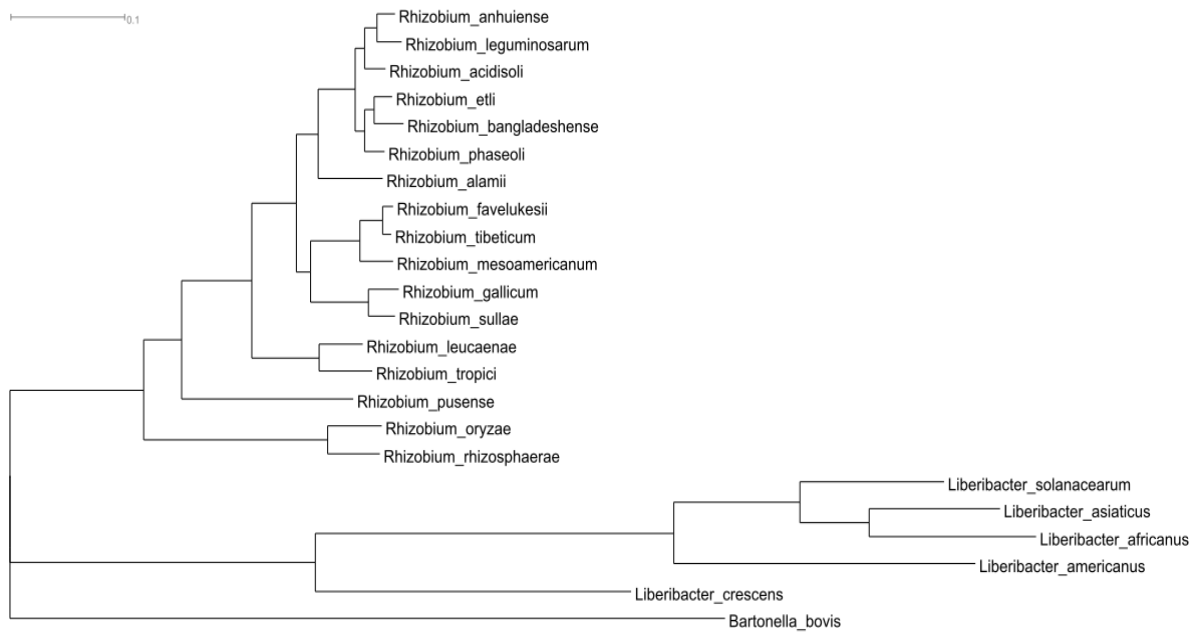


Figura 2. Árbol filogenético de las especies de *Ca. Liberibacter* y *Rhizobium* construidas a partir del “genoma artificial” mediante el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo LG+G+I (logLike = -2366687).

-Comparación de arboles

En la Figura 3 se muestra un tangrama donde se observa que árbol

consenso de los ortólogos y el reconstruido con el “genoma artificial” son topológicamente idénticos, lo que da más solidez a la reconstrucción filogenética.

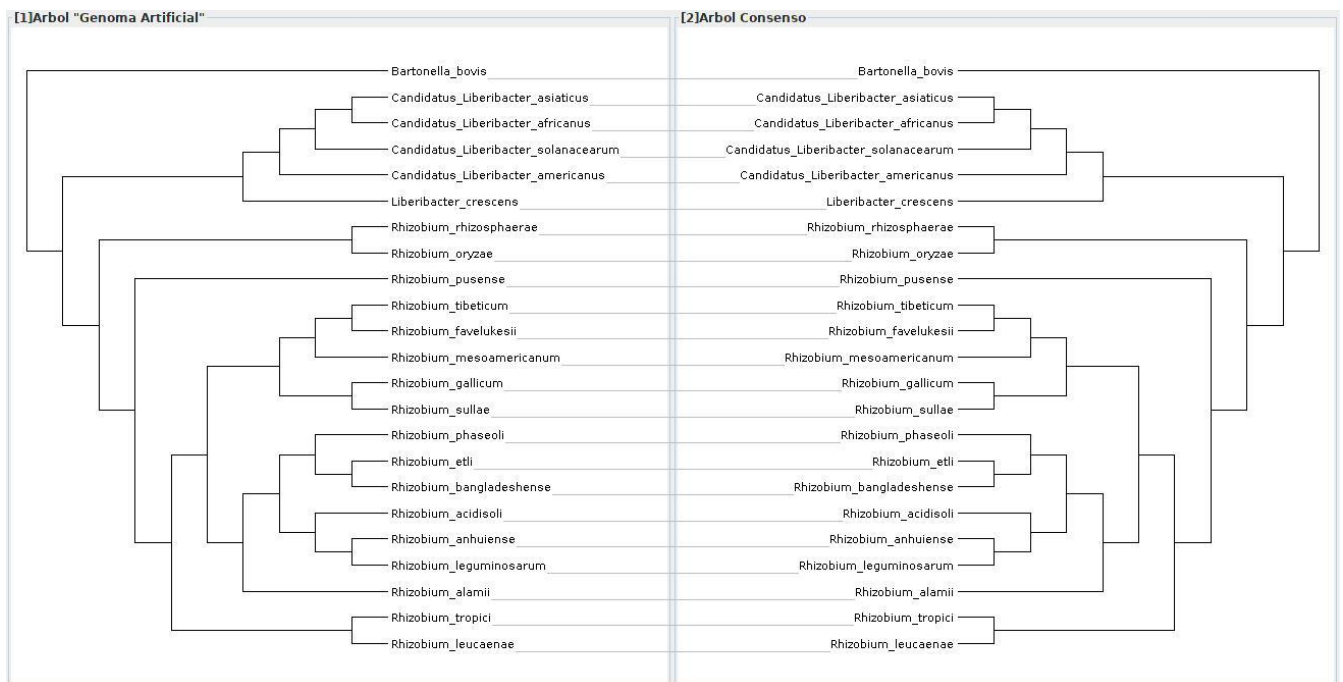


Figura 3. Tanglegrama del árbol consenso y el árbol del “genoma artificial” mediante el programa Dendroscope3 muestran una historia evolutiva coherente (Huson & Scornavacca, 2012).

Del conjunto de árboles reconstruidos con los genes ortólogos se identificaron 16 y 17 árboles discordantes, teniendo en cuenta diferencias geodésicas y topológicas respectivamente Figura 4, los cuales fueron observados de forma individual para discriminar a los falsos positivos.

En un trabajo anterior se habían identificado 9 genes discordantes de Libre, estrechamente relacionados con Rhz, 1 gen de Clame relacionado con *Arsenophonus*, según BLASTp y 1 gen de Clafr del cual se presumía una aceleración evolutiva (Salinas & Cantero, 2017)

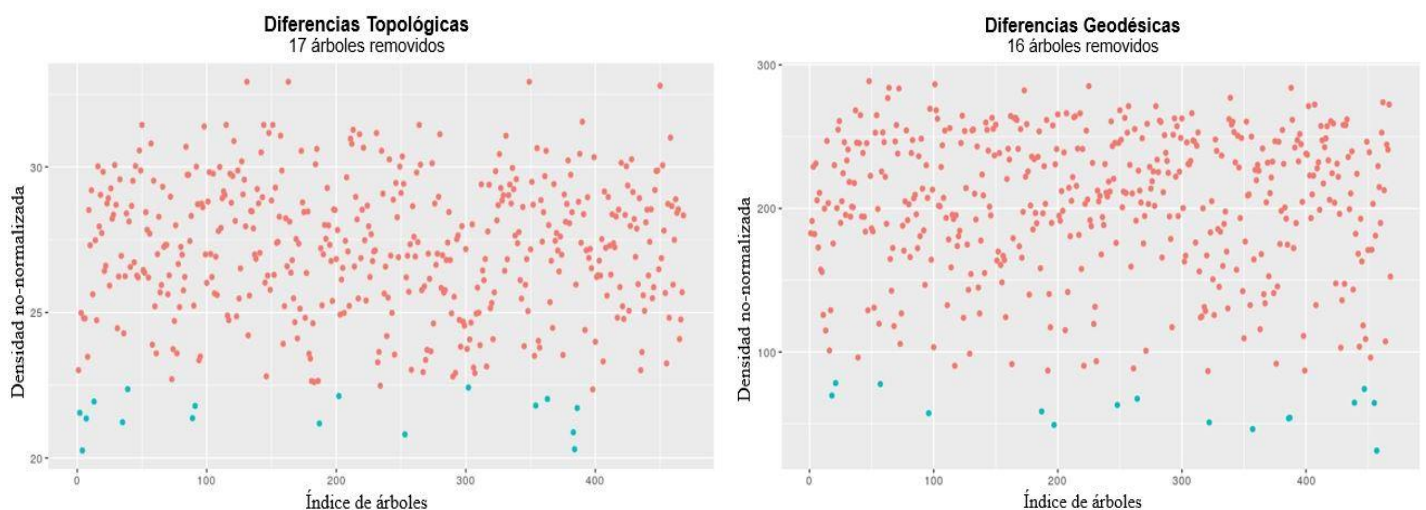


Figura 4. Árboles discordantes del conjunto (puntos azules), discriminados por diferencias geodésicas (izquierda) y topológicas (derecha).

Se trató de identificar a los genes de Libre relacionados con Rhz dentro del conjunto de genes discordantes identificados en este trabajo, sin embargo no se encontraron a todos y se identificaron 3 genes nuevos con las mismas características, totalizando 12 genes hasta el momento, los cuales además de estar emparentados con Rhz *Agrobacterium* del

mismo grupo y *Ensifer* de la misma familia, al igual que CaL. Por lo cual se presume que la razón de la semejanza entre las especies se debe a que Libre fue el último especiarse dentro de los CaL (Handwerk, 2006).

El gen de la fosfopantotenoilcisteína descarboxilasa perteneciente a Clame volvió a mostrar un largo de rama mayor a

las otras especies (Figura 5), lo cual da más consistencia a la hipótesis de un evento de transferencia horizontal (Koonin, Makarova, & Aravind, 2001) desde

Arsenophonus, mientras compartían hábitat en algún momento de su historia evolutiva (Jousselin, Cœur D'Acier, Vanlerberghe-Masutti, & Duron, 2013

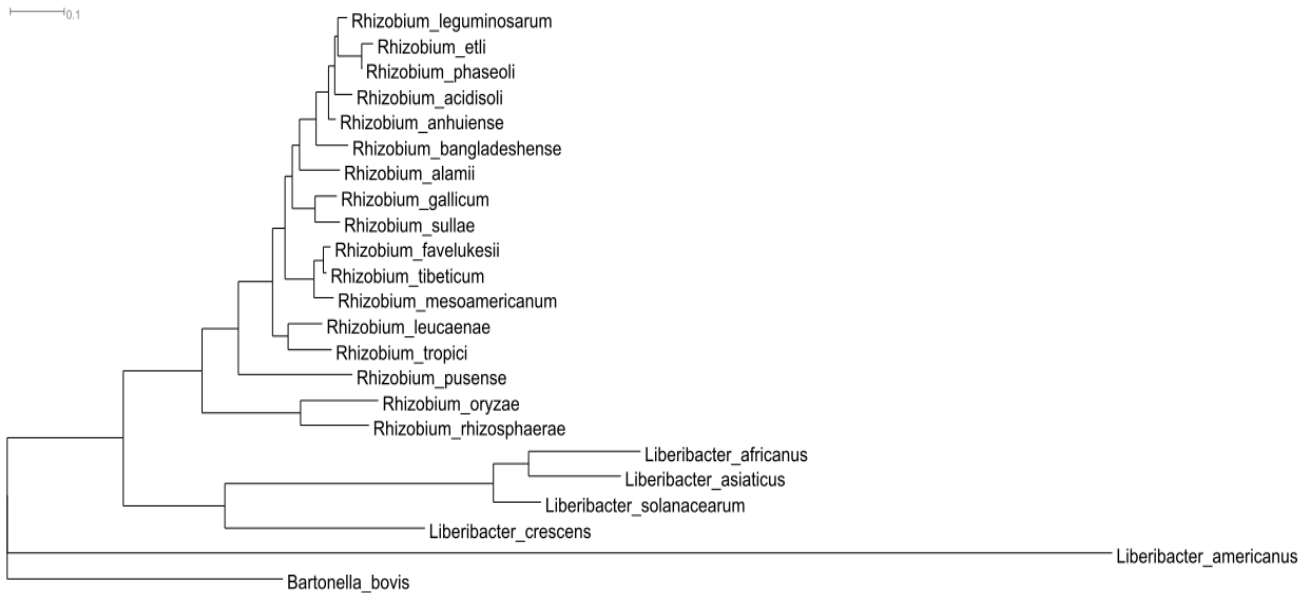


Figura 5. Árbol filogenético de la proteína fosfopantotenoilcisteina descarboxilasa donde se aprecia el largo de rama de Clame en comparación a las otras especies (logLike = -7115.08).

El gen de la chaperona dependiente de ATP de Clafv volvió a presentar un largo de rama considerable, sin embargo se identificó que el gen entro duplicado en el

BLAST, junto con su ortólogo en Rfave, lo cual deja una brecha a ser aclarada en trabajos posteriores

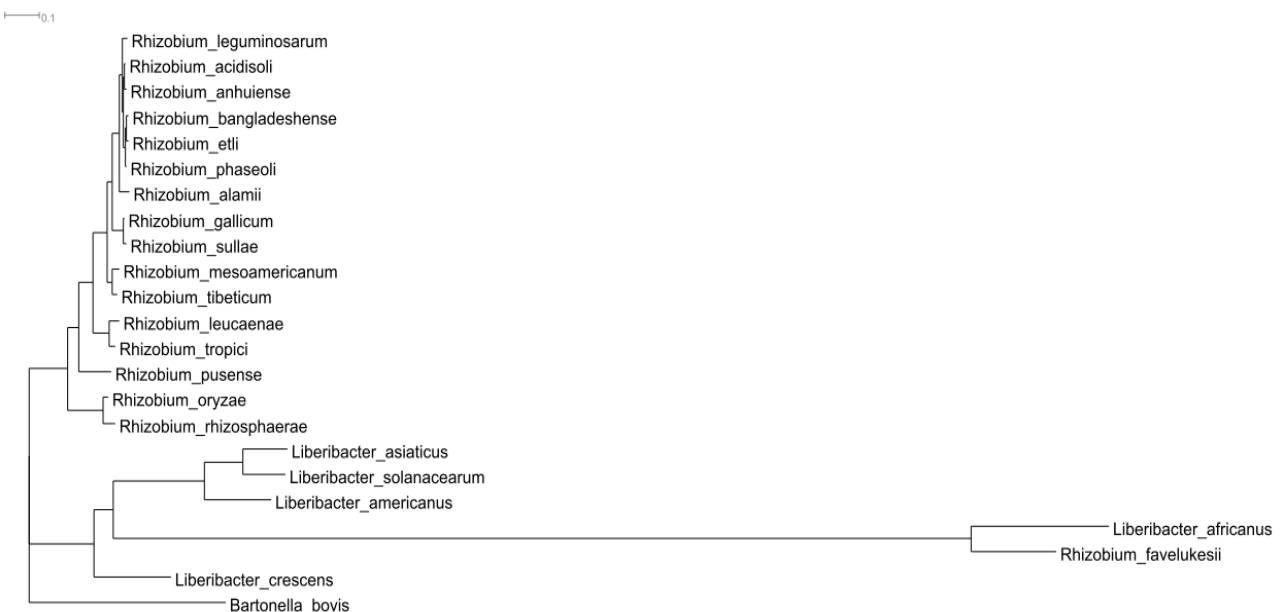


Figura 6. Árbol filogenético de la proteína Chaperona dependiente de ATP ClpB (logLike = -6036.84).

Conclusión

El análisis evolutivo de las especies de *Candidatus Liberibacter* mediante la reconstrucción de árboles filogenéticos de genes ortólogos, en conjunto con especies de *Rhizobium*, fueron coherentes entre sí, con el de trabajos anteriores y a los reportados sobre el estándar, la subunidad ribosomal 16S. Lo que da mayor evidencia a la filogenia inferida para la especie.

Las marcadas semejanzas entre *Liberibacter crescens* y las especies de *Rhizobium*, al mantener siempre la topología del árbol, pueden indicar que la especie fue la última en especiarse del clado de los *Liberibacters*, no obstante la brecha sigue abierta para lo cual es necesario realizar análisis más profundos para aumentar la precisión de la inferencia.

Se observa un marcado largo de rama en árbol de la fosfopantotenoilcisteina descarboxilasa de la especie Clame, al igual que en trabajos anteriores, pudiendo se tratar de un evento de transferencia horizontal en algún momento de su historia evolutiva donde compartieron hábitats.

Los organismos causantes del HLB son causantes de pérdidas económicas

alrededor de todo el mundo, así también en varias zonas del Paraguay. La constante lucha contra este patógeno sigue vigente, aunque se están realizando trabajos sobre inducción a resistencia por parte de los cítricos (Jia et al., 2017), el mecanismo de acción aún queda sin resolver, he ahí la importancia del uso de herramientas computacionales para tener un mejor panorama del mecanismo biológico de afección por parte del patógeno. Quizás mirando atrás en el tiempo se pueda encontrar soluciones para el futuro.

Literatura citada

- Adachi, J., Waddell, P. J., Martin, W., & Hasegawa, M. (2000). Plastid Genome Phylogeny and a Model of Amino Acid Substitution for Proteins Encoded by Chloroplast DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 50(4), 348–358. <https://doi.org/10.1007/s002399910038>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

- Ant, J., & Souza, M. De. (2015). The Family Rhizobiaceae. *International Review of Cytology*, (December 2014).
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 85(4), 265–270.
- Burdass, D. (2002). Rhizobium , Root Nodules & Nitrogen Fixation. *Society for General Microbiology*, 16, 1–4.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- Charif, D., & Lobry, J. R. (2007). SeqinR 1.0-2: A Contributed Package to the R Project for Statistical Computing Devoted to Biological Sequences Retrieval and Analysis. In U. Bastolla, M. Porto, H. E. Roman, & M. Vendruscolo (Eds.), *Structural Approaches to Sequence Evolution: Molecules, Networks, Populations* (pp. 207–232). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-35306-5_10
- Fagen, J. R., Leonard, M. T., Coyle, J. F., McCullough, C. M., Davis-Richardson, A. G., Davis, M. J., & Triplett, E. W. (2014). *Liberibacter crescens* gen. nov., sp. nov., the first cultured member of the genus *Liberibacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 7), 2461–2466. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.063255-0>
- Federhen, S. (2003). 4. The Taxonomy Project. In M. J & Ostell J (Eds.), *The NCBI Handbook [Internet]* (pp. 1–34). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>
- Haapalainen, M. (2014). Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. *Annals of Applied Biology*, 165(2), 172–198. <https://doi.org/10.1111/aab.12149>
- Handwerk, B. (2006). Evolution Comes in Bursts, Gene Study Finds.
- Higgs, P. G., & Attwood, T. K. (2005). Phylogenetic methods. In *Bioinformatics and Molecular Evolution* (pp. 158–195).
- Huson, D. H., & Scornavacca, C. (2012). Dendroscope 3: An interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Systematic Biology*, 61(6), 1061–1067.

- <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys062>
- Jia, H., Zhang, Y., Orbović, V., Xu, J., White, F. F., Jones, J. B., & Wang, N. (2017). Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal*, 15(7), 817–823. <https://doi.org/10.1111/pbi.12677>
- Jousselin, E., Cœur D'Acier, A., Vanlerberghe-Masutti, F., & Duron, O. (2013). Evolution and diversity of *Arsenophonus* endosymbionts in aphids. *Molecular Ecology*, 22(1), 260–270. <https://doi.org/10.1111/mec.12092>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Aravind, L. (2001). Horizontal Gene Transfer in Prokaryotes: Quantification and Classification. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 709–742. <https://doi.org/10.1146/annurev.micr.0.55.1.709>
- Le, S. Q., & Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307–1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Monzó, C., Urbaneja, A., & Tena, A. (2015). Los psílicos *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae* como vectores de la enfermedad de cítricos Huanglongbing (HLB): reciente detección de *T. erytreae* en la Península Ibérica. *Boletín SEEA*, 2011, 29–37.
- Moreno-Hagelsieb, G., & Latimer, K. (2008). Choosing BLAST options for better detection of orthologs as reciprocal best hits. *Bioinformatics*, 24(3), 319–324. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm585>
- Nelson, W. R., Munyaneza, J. E., McCue, K. F., & Bové, J. M. (2013). The Pangaeian origin of “*Candidatus Liberibacter*” species. *Journal of Plant Pathology*, 95(3), 455–461. <https://doi.org/10.4454/JPP.V95I3.001>
- Omland, K. E., Cook, L. G., & Crisp, M. D. (2008). Tree thinking for all biology: the problem with reading phylogenies as ladders of progress. *BioEssays*, 30(5), 854–867. <https://doi.org/10.1002/bies.20794>

- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289–290.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>
- R Core Development Team. (2015). R: a language and environment for statistical computing, 3.2.1. Document freely available on the internet at: <http://www.r-project.org> (Vol. 2).
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Raddadi, N., Gonella, E., Camerota, C., Pizzinat, A., Tedeschi, R., Crotti, E., Alma, A. (2011). “Candidatus *Liberibacter europaeus*” sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid *Cacopsylla pyri* apparently behaves as an endophyte rather than a pathogen. *Environmental Microbiology*, 13(2), 414–426.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02347.x>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
<https://doi.org/citeulike-article-id:93683>
- Salinas, A., & Cantero, J. (2017). Análisis Filogenético de bacterias del genero *Candidatus Liberibacter* causantes del HLB en Cítricos y otras enfermedades en plantas vasculares. In *Anais: I Seminário Internacional de Pós-Graduação em Desenvolvimento Rural Sustentável e IV Jornada Questão Agrária e Desenvolvimento* (20th ed., Vol. 94). Marechal Candido Rondon: UNIOESTE-PPGDRS. Retrieved from <https://midas.unioeste.br/sgevevents/SIPGDRS/anais>
- Schliep, K. P. (2011). phangorn: Phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4), 592–593.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- SENAVE. (2013). Manual técnico de identificación a campo del huanglongbing (HLB) de los cítricos y el insecto vector. *Diaphorina citri*. Dirección de Protección Vegetal, Departamento de Vigilancia Fitosanitaria.
- SENAVE. (2014). Campaña de emergencia fitosanitaria para el Huanglongbing de los cítricos (HLB) en el Paraguay. Dirección de Protección Vegetal, Departamento de Vigilancia Fitosanitaria, 9.

Tatineni, S., Sagaram, U. S., Gowda, S., Robertson, C. J., Dawson, W. O., Iwanami, T., & Wang, N. (2008). In Planta Distribution of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' as Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. *Bacteriology*, 98, 592–599.

Vegetale, P. (2011). MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF 16S rRNA FROM A NEW "CANDIDATUS LIBERIBACTER" STRAIN ASSOCIATED WITH ZEBRA CHIP DISEASE OF POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) AND THE POTATO PSYLLID (*BACTERICERA COCKERELLI* SULC). *Journal of Plant Pathology*, 16–17.

Wang, N., & Trivedi, P. (2013). Citrus Huanglongbing: A Newly Relevant Disease Presents Unprecedented Challenges. *Phytopathology*, 103(7), 652–665.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0331-RVW>

Weyenberg, G., Huggins, P. M., Schardl, C. L., Howe, D. K., & Yoshida, R. (2014). KDETREES: Non-parametric estimation of phylogenetic tree distributions. *Bioinformatics*, 30(16), 2280–2287.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu258>