

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS EM CULTIVARES DE PALMA (*Opuntia* e *Nopalea*) USANDO O GENE *recA*

IDENTIFICATION OF DIAZOTROPHS ISOLATED FROM PALM CULTIVARS (*Opuntia* and *Nopalea*) USING THE *recA* GENE

Maria Luiza Ribeiro Bastos da SILVA¹; Carolina dos Santos FIGUEIRÔA²;
Adália Cavalcanti do Espírito Santo MERGULHÃO³;
Maria do Carmo Catanho Pereira de LYRA⁴

1. Bióloga, Pós-doutoranda do PNPD/CAPES/FINEP do Instituto Agrônomo de Pernambuco - Recife, PE. maria.luiza@ipa.br; 2. Bióloga, Bolsista de apoio técnico CNPq; 3. Bióloga, Pesquisadora – IPA, Recife, PE; 4. Engenheira Agrônoma, Pesquisadora– IPA, Recife, PE.

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo caracterizar filogeneticamente os isolados bacterianos da cultura da palma forrageira usando o gene *recA*. Para o isolamento caldódios de palma foram maceradas e inoculadas em meios semissólido semi-seletivo NFb, JNFb, LGI e LG sem adição de nitrogênio. Foram obtidos doze micro-organismos cuja análise parcial do gene *recA* possibilitou a identificação dos gêneros *Azospirillum*, *Bacillus* e *Methylobacterium*. Bactérias diazotróficas encontrados na cultura da palma podem ter uma grande função como bactéria promotora de crescimento. O gene *recA* mostrou-se bastante consistente para uso em filogenia molecular de bactérias. Observou-se ainda a presença de bactérias destes gêneros podem ter de grande interesse para futuros estudos considerando seu alto poder biotecnológico.

PALAVRAS-CHAVE: Diversidade. Endofíticos. Filogenia. Reação em cadeia da polimerase (PCR).

INTRODUÇÃO

A cultura da palma forrageira no Nordeste do Brasil tem uma grande importância econômica por ser o alimento principal dos animais na região semiárida. Há alguns anos esta cultura vem sofrendo com o ataque de um inseto chamado cochonilha do carmim (*Dactylopius Opuntiae*) que está devastando toda área plantada e causando prejuízos para os pequenos agricultores que vivem da cultura da palma para alimentação de seu rebanho.

Os micro-organismos endofíticos que estão presentes na cultura da palma forrageira, geralmente são fungos e bactérias, que interagem e vivem sistematicamente no interior dessas plantas, sem causar aparentemente danos aos seus hospedeiros. Existe uma série de razões para que se aprofundem os estudos com endofíticos, pois, vários deles são capazes de produzirem antibióticos e outros metabólicos secundários de interesse farmacológico, muitos têm sido usados como agentes de controle biológico de pragas e doenças e também como bioherbicidas (DÖBEREINER, 1997; CHEANG et al., 2005).

Genes usados para o estudo de filogenia de espécies têm um papel importante na identificação taxonômica principalmente quando se trata de espécies e gêneros relacionados (FELSENSTEIN, 2004; VINUESA et al., 2005). É interessante estabelecer que a filogenia de um único gene não deve ser confundida com a filogenia das espécies já

que cada árvore formada com um único gene é o resultado aleatório de um processo genealógico único. Escobar-Páramo et al, (2004), observaram que nas comparações multilocus a identificação e remoção de seqüências submetidas a transferência lateral dentro e entre espécies pode interferir de forma crítica na filogenia de espécies principalmente quando múltiplos isolados são analisados. Alguns autores como Eisen (1995) e Young (1998), avaliaram o impacto da transferência de genes na interpretação da filogenia de um único gene, como aqueles com base na SSU (pequena subunidade ribossomal) em que se faz necessário estudar mais *loci*. Estes autores observaram dois *loci atpD* e *recA* em espécies representativas de rizóbio de crescimento rápido, e verificaram que as bactérias são consistentes com a SSU correspondente em sua filogenia. O gene *recA* codifica parte do gene da recombinação gênica e no sistema de reparo do DNA, além de possuírem seqüências curtas que podem limitar a detecção de mosaicismos intragênicos, que são, fenômenos que ocorrem quando um indivíduo apresenta dois materiais genéticos distintos, causando uma falha genética através de mutação resultando em linhagens de células distintas geneticamente.

A falta de conhecimento sobre a ocorrência de bactérias endofíticas em plantas quanto a sua identidade, diversidade e os níveis populacionais nos diferentes tecidos das plantas é ainda um enigma para entender a íntima relação que

desenvolveram estes micro-organismos com a sua planta hospedeira (BAZZICALUPO; OKON, 2000; MELLONI et al., 2004). Além de possuírem uma habilidade para sobreviver dentro da planta com pouca ou nenhuma competição microbiana os tornam potenciais candidatos para o controle biológico. Atualmente, não há estudos sobre os endofíticos presentes na cultura da palma forrageira. Diante disto, este trabalho teve como objetivo caracterizar filogeneticamente os isolados bacterianos da cultura da palma forrageira usando o gene parcial *recA*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi coletado como amostra um cladódio de cada variedade de palma (Tabela 1); as amostras de cladódio foram cultivadas em meios de cultivo semissólidos, semisseletivos (NFb, JNFb, LGI e LG) e sem adição de nitrogênio, como descrito por Döbereiner et al. (1995). Para o isolamento, foram utilizados 10 g de cada amostra do cladódio (massa fresca), os quais foram lavados com água corrente, triturados e misturados em 90 mL de solução salina (NaCl, 0,5%) e diluídos serialmente (10^1 - 10^7). De cada diluição, foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e inoculadas em frascos de vidro contendo os meios de cultura (NFb, JNFb, LGI e LG); estes foram incubados a 30°C e o crescimento bacteriano foi avaliado aos três, cinco e sete dias, verificando-se o aparecimento ou não da película característica para as bactérias diazotróficas endofíticas. Após o completo isolamento de uma cultura pura, estes isolados foram crescidos em meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) e foi realizada a extração de DNA genômico. Para identificar o provável gênero bacteriano foram realizadas extração de DNA usando o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. A amplificação do gene *recA* foi realizado usando os *primers* *recA*-6F (5'-CGK CTS GTA GAG GAY AAA TCG GTG GA-3') e *recA*-555R (5'-CGR ATC TGG TTG ATG AAG ATC ACC AT-3') (GAUNT et al., 2001) e as condições de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µl contendo: 40 ng de DNA molde, 1µM de cada *primer*, 12,5 µL de la

GoTaq Colorless (Promega). Os ciclos de temperaturas foram realizados em um termociclador PCT-100™ (MJ Research, Inc, USA) com uma desnaturação inicial de 94°C por 4 min., 30 s a 94°C, 30 s de anelamento a 50°C e 1 min. de extensão a 72°C, seguidos de uma extensão final de 8 min. a 72°C por 30 ciclos.

Os produtos amplificados foram visualizados em eletroforese a 1 % em gel de agarose usando tampão TBE 0,5X, a 100 Volts. Os produtos foram visualizados usando SybrGold (Invitrogen) e fotodocumentados no LPIX-HE da Loccus do Brasil. Após a purificação (LYRA, 2001), os produtos amplificados foram sequenciados na Macrogen Inc. Korea. As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas pelo programa 'ClustalX V.4.0.' (LARKIN et al., 2007), com base no gene *recA*. Além disso, para esta comparação, foi realizada a busca de sequências depositadas no GenBank, com o propósito de agrupar as bactérias nos respectivos gêneros. Para matriz de distância das árvores filogenéticas, foi utilizado o método fenético baseado em distância genética *neighbor-joining* (NJ) (SAITOU; NEI, 1987) e o algoritmo *p-distance*, respectivamente processado pelo programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis-MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007). Todas as sequências do gene *recA* obtidas neste estudo foram enviadas ao banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e receberam os números de acesso: KC312318 a KC312329.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento da bactéria diazotróficas

Foram isolados doze microrganismos provenientes do interior dos cladódios de palma forrageira das regiões do agreste (Caruaru) e sertão de Pernambuco (Arcoverde) (Tabela 1). Rodríguez e Fraga (1999) relataram que os gêneros bacterianos que mais se destacam como promotores de crescimento são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Azospirillum* e *Azotobacter*. Estes dados corroboram com os resultados encontrados neste estudo onde foram isoladas bactérias diazotróficas endofíticas destes gêneros.

Tabela 1: Resultados da busca por similaridade no NCBI GenBank dos isolados pelo seqüenciamento parcial do gene *recA*

Legenda	Genbank	Meio de isolamento	Variedade de Palma/Local de Coleta	Micro-organismo	Homologia NCBI	no	Identidade	E-value
isolAM01	KC312318	NFb	(1327) Marmillon Fodder/Caruaru	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B (NC_016622.1)	97%		100%	5e-125
isolAM02	KC312319	LG	(1327) Marmillon Fodder/Caruaru	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B, (NC_016622.1)	97%		100%	7e-125
isolAM04	KC312320	NFb	27(1294) Mexico Vegetable/Arcoverde	<i>Azospirillum lipoferum</i> 4B (NC_016622.1)	100%		100%	2e-120
isolAM05	KC312321	NFb	27(1294) Mexico Vegetable/Arcoverde	<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245 (NC_016617.1)	99%		100%	7e-120
isolAM06	KC312322	JNFb	AM6 16-F21 (403) Forrageira México/Arcoverde	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> (NC_010505.1)	91%		100%	1e-126
isolAM20	KC312323	LGI	IPA 90-92/Caruaru	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PA15 (NC_011365.1)	49%		100%	4e-06
isolAM24	KC312324	NFb	422 CPTSA 1281 (2001800)/Caruaru	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 (NC_009848.1)	80%		89%	6e-72
isolAM26	KC312325	NFb	F3 Rojo Vigor – Frutífera/Arcoverde	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 (NC_009848.1)	94%		93%	0.0
isolAM28	KC312326	NFb	Palma de Espinho Frutífera	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831 (NC_010505.1)	90%		95%	6e-115
isolAM29	KC312327	NFb	/Arcoverde51-1317 Chile Fruit/Arcoverde	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 (NC_009848.1)	92%		94%	0.0
isolAM30	KC312328	NFb	43 – Miúda Tradicional/Arcoverde	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 (NC_009848.1)	91%		92%	0.0
isolAM36	KC312329	JNFb	(438) F8 Forrageira/Caruaru	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	89%		91%	0.0

Oito do total de bactérias diazotróficas endofíticas foram provenientes do meio NFB (*Azospirillum brasilense*; *A. lipoferum*; *Bacillus pumilus*, *Methylobacterium radiotolerans*). Segundo Magalhães e Döbereiner (1984) mostraram mesmo sendo as espécies de *Azospirillum* - favorecidas nos meios NFB, outros microrganismos diazotróficos podem crescer nestes meios, como ocorreu no presente estudo. O meio LG cresceu apenas um isolado que obteve homologia com *Azospirillum brasilense* e no meio LGI, o isolado teve uma homologia muito baixa com *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15 de 49%. Foram encontrados dois isolados no meio JNFb (*Bacillus* e *Methylobacterium*) do total das bactérias diazotróficas isoladas. Apesar de descrito na literatura segundo Döbereiner (1997) que o meio

JNFb (Tabela 1) seja um meio para isolar *Herbaspirillum*, no nosso estudo, os isolados que cresceram neste meio foram: *Methylobacterium radiotolerans* e *Bacillus pumilus* (Figura 1). A falta de especificidade do meio JNFb, já considerada por Baldani et al. (1999), indica que o meio JNFb permite o crescimento de outras bactérias endofíticas, principalmente aquelas capazes de tolerar a maior acidez inicial deste meio.

A diversidade da comunidade endofítica ainda tem muito a ser elucidada. Algumas bactérias diazotróficas como *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Azoarcus* spp. e *Azospirillum* spp (CHARENTREUIL et al., 2000), antes descritas somente com localização na região de rizosfera, agora também são descritas em regiões endofíticas.

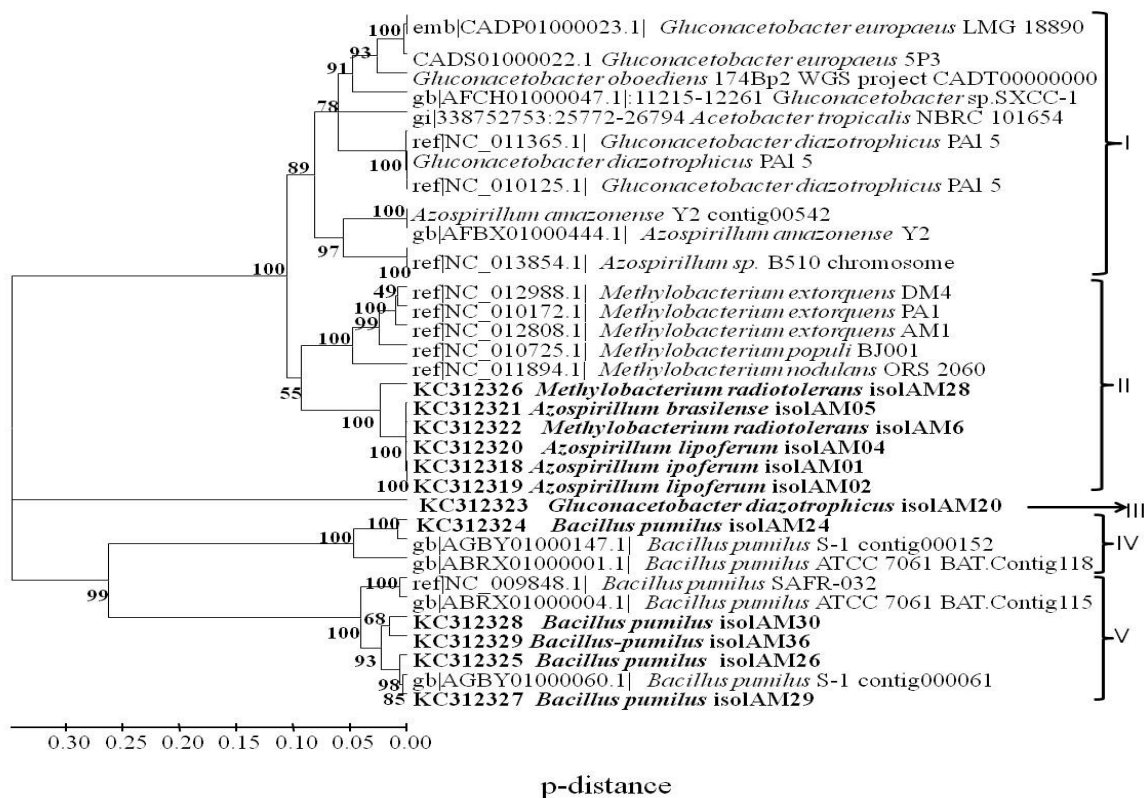


Figura 1. Dendrograma baseado na sequência do gene *recA*, mostrando as posições filogenéticas dos isolados em relação às sequências já depositadas em banco de dados. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão. A régua é a distância de similaridade do agrupamento em questão.

Análise e sequenciamento baseada no gene *recA*

A qualidade do DNA genômico isolado foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose. Foi utilizado o padrão 100 pb DNA ladder

(Invitrogen) como padrão de tamanho molecular e o tamanho gerado pela amplificação do gene *recA* foi de 700 pb. As sequências do gene *recA* foram submetidas ao programa BLASTn do GenBank

onde se realizou uma pesquisa cuja comparação ocorreu entre os dados obtidos neste trabalho com os que já se encontram no banco de dados. A análise por clusterização baseada nas sequências do gene *recA* permitiu um agrupamento mais congruente entre todos os gêneros distribuídos no dendrograma, porque os isolados estudados neste trabalho ficaram agrupados de acordo com suas espécies, mostrando que este gene tem uma capacidade de determinar a posição taxonômica de novos isolados segundo mostrado por Scholz et al. (2008) (Figura 1).

De acordo com análise comparativa foram formados cinco grupos. O grupo I formado apenas por sequências de bactérias retiradas do GenBank, dos gêneros *Gluconacetobacter* e *Azospirillum*. O grupo II formado pelas sequências dos isolados (isolAM01, isolAM02, isolAM04 e isolAM05) que apresentaram elevada homologia ao gênero *Azospirillum*, mas separadas em ramos diferentes. O grupo III e IV foi formado pelos isolados (isolAM20 e isolAM24) respectivamente. Já o grupo V foi representado pela sequência dos isolados (isolAM26, isolAM29, isolAM30 e isolAM36) apresentaram elevada homologia com o gênero *Bacillus*. O predomínio dos gêneros *Bacillus* e *Azospirillum* corrobora com os resultados obtidos por (LALANDE et al., 1989).

Os resultados entre as sequências obtidas em relação às do banco de dados apresentaram entre 80-100% de similaridade, o que indica confiabilidade para os resultados encontrados.

Apenas o isolado isolAM20 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) apresentou uma baixa homologia com 49% com as sequências de bactérias diazotrófica endofítica. Segundo Payne et al. (2006) e Scholz et al. (2008), o gene *recA*, permite melhor discriminação do que o gene 16S rDNA e genes *rrs* (Ribossomais). Entretanto, as análises obtidas do gene *recA* não são exatamente semelhantes às obtidas pela filogenia da sequência do gene 16S rDNA, indicando maior grau de resolução entre espécies relacionadas.

CONCLUSÕES

O sequenciamento parcial do gene *recA* mostrou-se eficiente para o estudo filogenético de bactérias em palma forrageira. A presença dos gêneros *Azospirillum*, *Bacillus* e *Methylobacterium* pode ser de grande interesse para futuros estudos, uma vez, que estes gêneros apresentam grande potencial biotecnológico.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA, pela estrutura física e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (PNPD - n°. 02714/09-4 Linha MCT/FINEP), e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro concedido.

ABSTRACT: This study aimed to characterize phylogenetically isolated bacterial culture of Cactus Pear using the partial gene *recA*. For isolation cladodes were macerated and inoculated in semi-selective semisolid media NFB, JNFb, LGI and LG without added nitrogen. Twelve micro-organisms were obtained whose analysis of partial gene *recA* enabled the identification of the genera *Azospirillum*, *Bacillus* and *Methylobacterium*. Diazotrophic bacteria found in the culture of Cactus Pear may have a great function as growth-promoting bacteria. The partial gene *recA* was shown to be quite consistent for use in molecular phylogeny of bacteria. We also observed the presence of bacteria of these genera may be of great interest for future studies considering its high power biotechnology.

KEYWORDS: Diversity. Endophytic. Phylogeny. PCR. DNA.

REFERÊNCIAS

BALDANI, J. I.; AZEVEDO, M. S.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; OLIVARES, F. L.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G., eds. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, SBCS/UFLA/DCS, 1999. p. 621-666.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G.; NEWTON, W. E., eds. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. p. 409-410. 2000.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J. BÂ, A.; GILLIS, M.; LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic Bradyrhizobia Are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 12, p. 5437-5447. 2000. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.12.5437-5447.2000>

CHEANG, A. J. R.; CERÓN, I. D. T.; BRINGAS, Y. F.; BADÍA, M. M. R.; CASTAÑEDA, J. M.; PÉREZ, M. H. Caracterización fisiológica de la comunidad microbiana endófito de la caña de azúcar. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 1. p. 66-75. 2005.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 771-774. 1997. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00226-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00226-X)

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** – Brasília: EMBRAPA-SPI; Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB. 1995. 60p.

EISEN, J. A. The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, p. 1105-1123. 1995. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00173192>

ESCOBAR-PÁRAMO, A. P.; SABBAGH, P.; DARLU, O.; PRADILLON, C.; VAURY, G.; LECOINTRE, DENAMUR, E. Decreasing the effects of horizontal gene transfer on bacterial phylogeny: the *Escherichia coli* case study. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 30, p. 243-250. 2004. [http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00181-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00181-7)

FELSENSTEIN, J. **Inferring phylogenies**, Sinauer Associates, INC, Sunderland, MA, 2004, p. 664.

GAUNT, M. W.; TURNER, S. L.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LLOYD-MACGILPS, S. A.; YOUNG, J. P.W. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2037-2048. 2001. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-51-6-2037>

LALANDE, R.; BISSONNETTE, N.; COUTLEÉ, D.; ANTOUN, H. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potencial. **Plant and Soil**, v. 115, p. 7-11, 1989. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02220688>

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R. McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H. VALENTIN, F.; WALLACE, L. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. I Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>

LYRA, M. C. C. P. **Estudios genéticos y fisiológicos del gen *nolT* de la región específica de cultivar, *nolXWBTUV*, de la bacteria de amplio rango de nodulación HH103 y sus implicaciones en el Sistema de Secreción de Tipo III (TTSS).** 2001. 159 f. Tese (Doutorado em Biologia)-Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, 2001.

MAGALHÃES, F. M. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 15, p. 246-252, 1984.

PAYNE, G. W.; RAMATTE, A.; ROSE, H. L.; WEIGHTMAN, A. J.; JONES, T. H.; TIEDJE, J. M. MAHENTHIRALINGAM, E. Application of a *recA* gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novel diversity in Burkholderia species. **FEMS Microbiology Letters**, Holanda, v. 259, p. 126-132, 2006.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16. 1986.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 17, p. 319-339, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-25, 1987.

SCHOLZ, H. C.; AL DAHOUK, S.; TOMASO, H.; NEUBAUER, H.; WITTE, A. SCHOTER, M.; KAMPFER, P.; FALSÉN, E.; PFEFFER, M.; ENGEL, M. Genetic diversity and phylogenetic relationships of bacteria belonging to the *Ochrobactrum-Brucella* group by *recA* and 16S rRNA gene-based comparative sequence analysis. **Systematic Applied Microbiology**, West chester, v. 31, n. 1, p. 1-16. 2008.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology Evolutionary**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092>

VINUESA P.; SILVA, C., LORITE, M. J.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; BEDMAR, E. J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 702–716, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2005.05.007>

YOUNG, J. P. W. Bacterial evolution and the nature of species. In **Advances in Molecular Ecology**, p. 119–131. Edited by G. R. Carvalho. Amsterdam: IOS Press. 1998.