



BIOFAAL Journal

Desember 2023 Volume 4 Nomor 2 Halaman 118-127

E-ISSN: 2723-4959



<https://doi.org/10.30598/biofaal.v4i2pp118-127>

ANALISIS FILOGENETIK GEN *gyrA* DAN *gyrB* DARI GENUS *Mesorhizobium*, *Rhizobium* DAN *Ensifer*

PHYLOGENETICS ANALYSIS OF *gyrA* AND *gyrB* GENES FROM GENUS *Mesorhizobium*, *Rhizobium* AND *Ensifer*

Edwin Thomas Apituley*¹, Efraim Samson², Amos Killay³

¹Program Studi Bioteknologi, Fakultas MIPA Universitas Pattimura, Ambon - Indonesia

²Program Studi Biologi, Fakultas MIPA Universitas Pattimura, Ambon – Indonesia

³Program Studi Sains Biomedis, Fakultas MIPA Universitas Pattimura, Ambon - Indonesia

*Corresponding Author e-mail: edwin.apituley.mail@gmail.com

ABSTRACT

Keywords: *GyrA* and *gyrB* genes encoding subunit A and B of gyrase enzyme have often been used as DNA gyrase; molecular chronometer in phylogenetics analysis including nitrogen fixing microorganisms filogeni; such as genus of *Rhizobium*, *Ensifer* dan *Mesorhizobium*. Nucleotide variation and gene rhizobium; copy number usually limit interpretation of phylogenetics analysis using gen sequence as mesorhizobium; molecular chronometer. In this study, *gyrA* and *gyrB* sequences from genus of *Rhizobium*, *Ensifer* and *Mesorhizobium* were analyzed to determine evolutionary relationship among them. Maximum Likelihood and Kimura 2 parameter methods were used to construct phylogenetic tree and measure genetic distance. Phylogenetic tree based on nucleotide sequence of *gyrA* gene was compared to phylogenetic tree based on nucleotide sequence of *gyrB* gene. Comparison of identity percentage among nucleotide sequence of *gyrA* gene from genus *Rhizobium*, *Ensifer* and *Mesorhizobium* show similarity, where each of them have narrow range of identity percentage, however nucleotide sequence of *gyrB* gene from genus *Rhizobium* and *Ensifer* show wider identity percentage range than genus *Mesorhizobium*. Several member of genus *Rhizobium* and *Ensifer* have double copy of *gyrB* gene with identity percentage less than 50 percent between them. Topology of phylogenetic tree based on nucleotide sequence of *gyrA* gene have similar topology to topology of phylogenetic tree based on nucleotide sequence of *gyrB* gene, except for additional branch formed by one of additional copy of *gyrB* sequences.

Article History:

Dikirim: 07 November 2023

Diterima: 26 November 2023

Disetujui: 30 November 2023

© 2023 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Pattimura

How to cite:

Apituley ET, Samson E, and Killay A. 2023. Analisis Filogenetik Gen *gyrA* dan *gyrB* Dari Genus *Mesorhizobium*, *Rhizobium* Dan *Ensifer*. *Biofaal Journal*. 4(2): 118-127.

Copyright © 2023 *Biofaal Journal*

Homepage: <https://ojs3.unpatti.ac.id/index.php/biofaal/index>

E-mail: biofaaljournal@gmail.com



This article is an open access article distributed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

A. PENDAHULUAN

Nitrogen adalah salah satu komponen yang sangat penting di dalam ekosistem dan merupakan komponen penting penyusun protein maupun asam nukleat pada makhluk hidup. Kemampuan bakteri yang hidup pada perakaran tanaman untuk menambat nitrogen dan digunakan tanaman untuk membentuk protein maupun senyawa organik yang lain sangat berpengaruh terhadap kesejahteraan manusia, seperti ketersediaan pangan khususnya pangan sebagai sumber protein. Beberapa spesies prokariot memiliki kemampuan untuk melakukan penambatan nitrogen, misalnya beberapa spesies bakteri seperti *Rhizobium* yang hidup bersimbiosis pada bintil akar tanaman legume maupun sejumlah jenis tanaman yang lain. *Rhizobium* merupakan genus anggota subdivisi Alphaproteobacteria dari ordo *Rhizobiales*, bersama dengan beberapa genus yang lain, seperti *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* (Chen et al., 1988; Jarvis et al., 1997) disebut rhizobia. Anggota ordo *Rhizobiales* hidup bersimbiosis dengan tanaman inang, misalnya *Bradyrhizobium japonicum* yang hidup bersimbiosis dengan *Glycine max*, *Ensifer meliloti* dengan *Medicago sativa*, *Mesorhizobium amorphae* dengan *Amorpha fruticosa* dan *Rhizium trifolii* dengan *Trifolium sp.*

Secara tradisional, hubungan kekerabatan antar organisme direpresentasikan sebagai pohon filogenetik, diagram yang merunut hubungan evolusioner. Sekuens asam amino pada protein disintesis berdasarkan sekuens nukleotida RNA yang ditranskripsi dengan menggunakan DNA sebagai cetakan, sehingga kemiripan nukleotida dapat digunakan untuk memperkirakan kedekatan hubungan secara filogenetik antara satu spesies dengan spesies yang lain. Sekuens gen, seperti gen 16S rRNA dapat digunakan untuk mempelajari hubungan filogenetik dan identifikasi suatu organisme (Woese, 1987; Zuckerkandl & Pauling, 1965). Analisis sekuens gen penanda evolusi yang stabil, seperti gen 16S rRNA digunakan untuk identifikasi, klasifikasi prokariot secara genotip (Weisburg et al., 1991). Diferensiasi bakteri pada tingkat genus dan klasifikasi pada tingkat spesies dan subspecies dapat dilakukan dengan membandingkan sekuens gen 16SrRNA, meskipun demikian terdapat kelemahan dalam penggunaan sekuens gen tersebut, seperti lebih dari satu salinan gen pada kebanyakan bakteri (Conville & Witebsky, 2005). Beberapa alternatif penggunaan sekuens molekul lain, seperti hsp70 (Hu et al., 2018), subunit B dari RNA polymerase (Klenk & Zillig, 1994), Elongation factor Tu or EF-Tu (Creti et al., 1994), gen recA dan glnA (Gutacker et al., 2002). Gen *gyrA* dan *gyrB* merupakan gen- gen yang juga digunakan sebagai kronometer molekuler (Liu et al., 2022; Ménard et al., 2016; Peeters & Willems, 2011). Gen *gyrA* dan *gyrB* merupakan gen yang menyandikan komponen penyusun enzim DNA gyrase atau topoisomerase II, suatu enzim yang berperan dalam mengkatalisis proses pembentukan DNA supercoiling, yang dibutuhkan dalam proses replikasi, transkripsi dan rekombinasi DNA pada bakteri (Gellert et al., 1976; Wang, 1985). Enzim DNA gyrase pada *E.coli* terdiri dari dua subunit A (97-kDa) dan dua subunit B (90-kDa) yang merupakan produk dari gen *gyrA* dan *gyrB*. Kedua subunit tersebut memiliki fungsi yang berbeda dalam mekanisme kerja enzim DNA gyrase mengkatalisis perubahan topologi pada DNA. Subunit GyrA memutuskan dan menyambungkan DNA, sedangkan GyrB memiliki aktivitas ATPase. Gen *gyrA* dan *gyrB* telah digunakan dalam mempelajari hubungan kekerabatan pada rhizobia (Mauchline et al., 2014). Penelitian ini bertujuan

untuk menganalisis sekuen dan filogeni gen *gyrA* dan *gyrB*, dari beberapa strain bakteri dari genus *Rhizobium*, *Ensifer* dan *Mesorhizobium*. *Rhizobium* dan *Ensifer* merupakan anggota famili dari Rhizobiaceae, sedangkan *Mesorhizobium* merupakan anggota famili Phyllobacteriaceae (Ferraz Helene et al., 2022). Ketiga genus tersebut sebelumnya dikelompokkan sebagai *fast-growing rhizobia* (Peter et al., 1996).

B. METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus hingga Oktober 2022 di Laboratorium pada Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Pattimura, Ambon.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat komputer yang dilengkapi dengan program yang dibutuhkan untuk melakukan analisis. Bahan yang digunakan adalah data sekuen nukleotida gen *gyrA* dan *gyrB* yang diperoleh dari National Center for Biotechnology Information (NCBI) Data Bank, United States (Sayers et al., 2021). Sekuens nukleotida gen *gyrA* dan *gyrB* berasal dari 33 spesies bakteri, yaitu; *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2304, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1689, *Rhizobium anhuiense* bv. *trifolii* strain T24, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, *Rhizobium gallicum* bv. *gallicum* R602, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* CB782, *Rhizobium tropici* CIAT 899, *Rhizobium etli* CFN42, *Rhizobium grahamii* strain BG7, *Rhizobium phaseoli* strain N261, *Rhizobium zullae* strain WSM 1592, *Rhizobium rosettiformans* strain MAE2-X, *Rhizobium* sp. 007, *Ensifer fredii* NGR234, *Shinorhizobium americanum* CCGM7, *Shinorhizobium medicae* WSM419, *Ensifer kummerowiae* strain CCBAU 71714, *Ensifer meliloti* strain BIM B-442D, *Ensifer meliloti* strain USDA1157, *Ensifer mexicanum* strain ITTG R7, *Ensifer teranga* strain CB3126, *Mesorhizobium amorphae* CCNWGS0123, *Mesorhizobium australicum* WSM2073, *Mesorhizobium ciceri* biovar *biserrulae* strain WSM1284, *Mesorhizobium ciceri* biovar *biserrulae* WSM1271, *Mesorhizobium erdmanii* strain NZP2014, *Mesorhizobium huakuii* strain 583, *Mesorhizobium japonicum* R7A, *Mesorhizobium jarvisii* strain ATCC 33669, *Mesorhizobium loti* NZP2037, *Mesorhizobium loti* strain SU343, *Mesorhizobium mediterraneum* strain R31, *Mesorhizobium opportunistum* WSM2075. Spesies – spesies tersebut dipilih berdasarkan keterwakilan spesies anggota untuk tiap genus, dan berdasarkan ketersediaan data sekuen gen *gyrA* dan *gyrB* dari tiap spesies.

Analisis Data

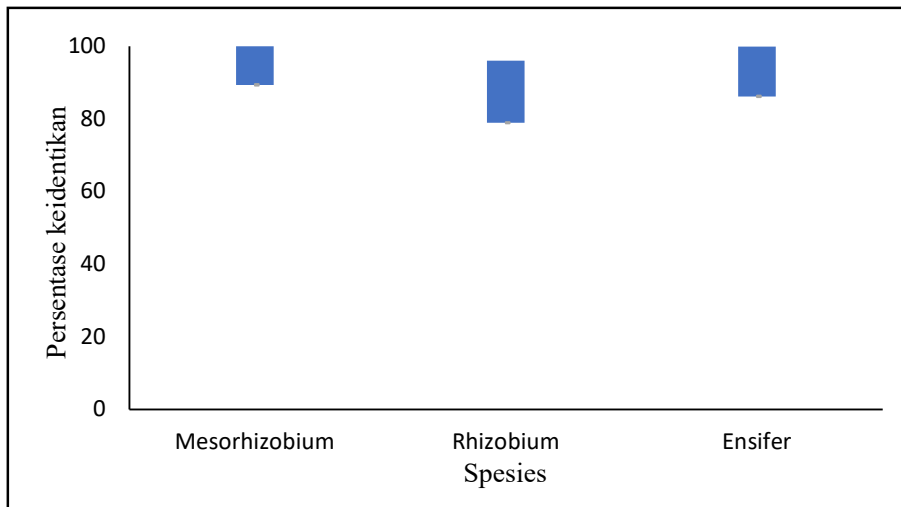
Analisis filogenetik data penelitian ini dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MEGA X (Kumar et al., 2018) dengan menggunakan metode Maximum Likelihood (Felsenstein, 1981) untuk konstruksi pohon filogenetik, dan model Kimura-2 Parameter (Kimura, 1980) untuk memperkirakan jarak genetik. Penjajaran multisekuens dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Clustal-W (Thompson et al., 1994). Analisis bootstrap dilakukan dengan 1000 uji untuk mengevaluasi topologi pohon filogenetik. Persentase keidentikan antar sekuen dihitung sebagai persentase jumlah

nukleotida atau asam amino yang identik pada suatu sekuen relatif terhadap jumlah total nukleotida atau asam amino.

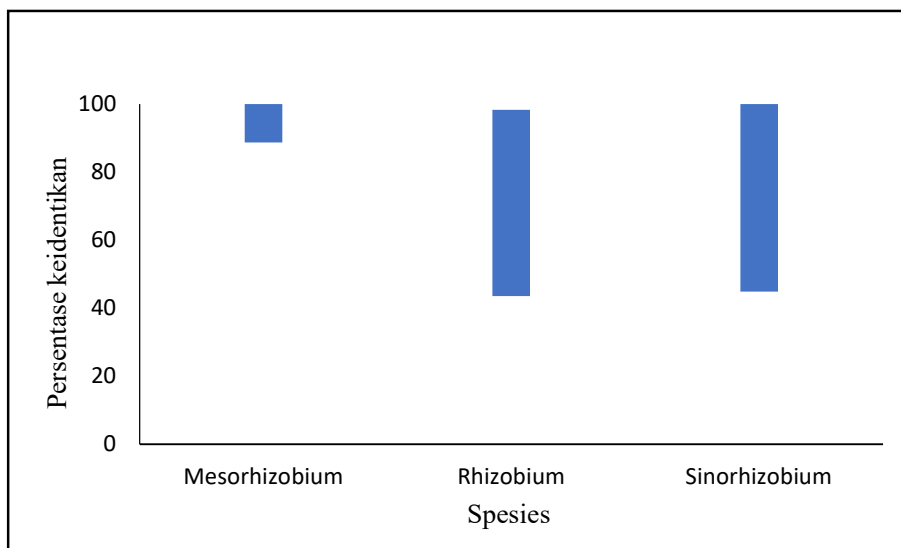
C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tiga belas strain dari genus *Rhizobium*, delapan strain dari genus *Ensifer* dan dua belas strain dari genus *Mesorhizobium* telah dianalisis pada penelitian ini. Semua strain dalam penelitian ini adalah strain yang memiliki gen *gyrA* yang menyandikan subunit A dan gen *gyrB* yang menyandikan subunit B dari enzim gyrase atau topoisomerase II, dan sekens-sekuens tersebut dapat diakses pada basis data NCBI.

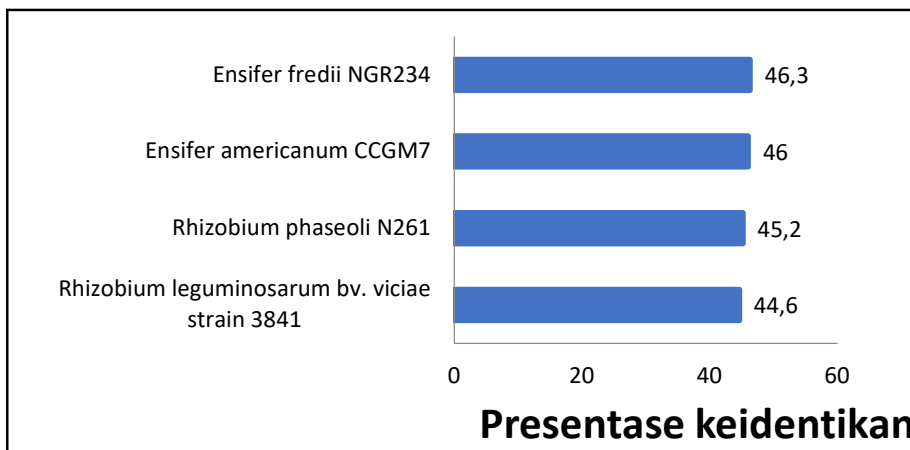
Beberapa strain anggota dari genus *Rhizobium* dan *Ensifer*, yaitu *Ensifer fredii* NGR234, *Ensifer americanum* CCGM7, *Rhizobium phaseoli* strain N261, dan *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 memiliki lebih dari satu sekuen gen *gyrB* (Gambar 5). Rentang persentase kemiripan sekuens yang berasal dari strain bakteri genus *Rhizobium* dalam penelitian ini adalah 78,9 hingga 96 persen dengan rata-rata 85,65 persen untuk gen *gyrA*, dan 43,6 hingga 98,3 persen untuk gen *gyrB* dengan rata-rata 75,21 persen. Persentase kemiripan sekuens diantara strain bakteri dari genus *Ensifer* dalam penelitian ini memiliki rentang dari 86,2 hingga 99,9 persen dengan rata-rata 89,63 persen untuk gen *gyrA*, dan 44,9 hingga 100 persen untuk gen *gyrB* dengan rata-rata 73,98 persen. Strain bakteri dari genus *Mesorhizobium* memiliki rentang persentase kemiripan gen *gyrA* 89,3 hingga 100 persen, dengan rata-rata 92 persen, dan 88,7 hingga 100 persen untuk persentase kemiripan di antara gen *gyrB* dengan rata-rata 73,98 persen. Rentang presentase keidentikan sekuens gen *gyrA* dan *gyrB* pada *Rhisobium*, *Ensifer*, dan *Mesorhizobium* dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2. *Ensifer fredii* NGR234, *Ensifer americanum* CCGM7, *Rhizobium phaseoli* strain N261, dan *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, memiliki 2 salinan gen *gyrB* dengan persentase keidentikan antar 2 gen *gyrB* yang terdapat pada spesies yang sama kurang dari 50, atau berada pada rentang 44,6 hingga 46,3 persen (Gambar 3). Kisaran persentase keidentikan gen *gyrA* untuk genus *Rhizobium* relatif lebih luas dibandingkan pada genus *Ensifer* dan *Mesorhizobium*. Kisaran persentase keidentikan menunjukkan kedekatan hubungan diantara sekuen-sekuens gen tersebut.



Gambar 1. Rentang presentase keidentikan sekuens gen *gyrA* pada *Rhisobium*, *Ensifer* dan *Mesorhizobium*.

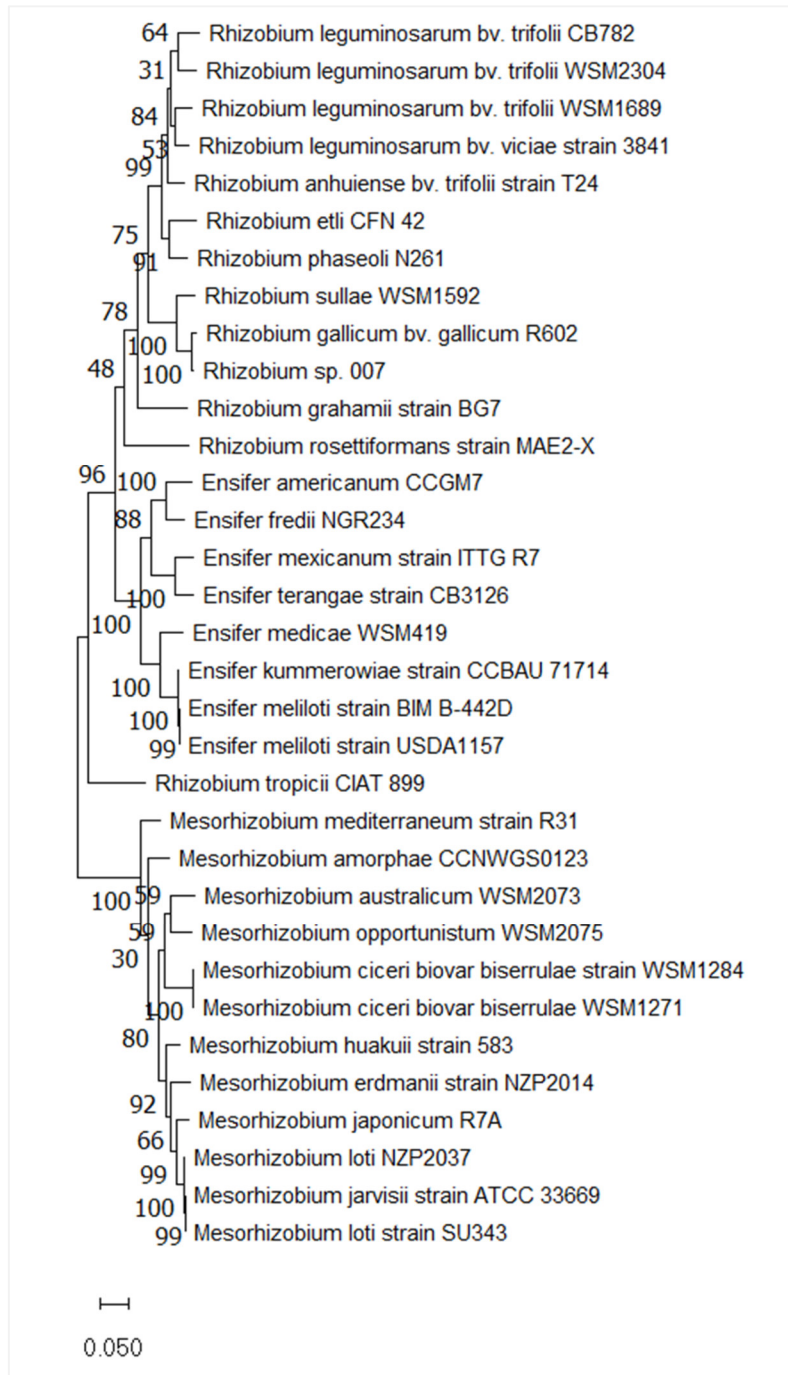


Gambar 2. Rentang presentase keidentikan sekuens gen *gyrB* pada *Rhisobium*, *Ensifer* dan *Mesorhizobium*.

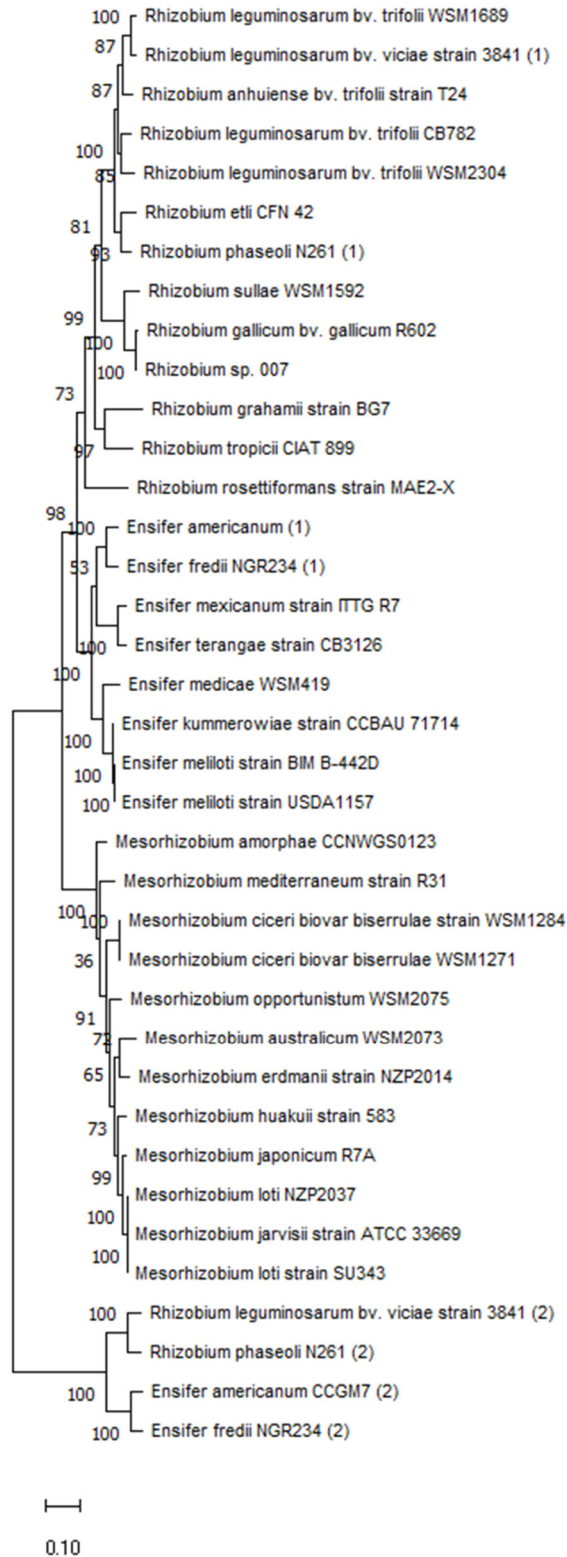


Gambar 3. Persentase keidentikan antar 2 gen *gyrB* yang terdapat pada spesies yang sama

Rentang persentase keidentikan sekuen gen *gyrA* dan *gyrB* yang berasal dari genus *Mesorhizobium* relatif tidak lebar, dan tidak banyak berbeda antara gen *gyrA* dan *gyrB*. Rentang persentase keidentikan pada gen *gyrB* dari genus *Mesorhizobium* lebih sempit dibandingkan gen *gyrA* pada genus *Rhizobium* dan *Ensifer*, yang dipengaruhi keberadaan jumlah salinan rangkap gen *gyrB* dengan persentase keidentikan yang rendah pada beberapa anggota genus *Rhizobium* dan *Ensifer*, gen-gen tersebut mungkin diperoleh melalui mekanisme transfer gen secara horizontal. Transfer gen secara horizontal pada bakteri, dapat terjadi melalui penyebaran elemen genetik yang mobil, plasmid dan elemen konjugasi integratif (Iranzo et al., 2016; Koonin, 2016), dan diketahui elemen-elemen ini dimobilisasi didalam populasi bakteri rhizobial (Wardell et al., 2022). Hasil analisis pohon filogenetik berdasarkan sekuens gen *gyrA* (menunjukkan bahwa kedua pohon memiliki kemiripan topologi dengan jarak genetik pada pohon filogenetik berdasarkan sekuens gen *gyrA* adalah 0.05 dan jarak genetik pada pohon filogenetik berdasarkan sekuens gen *gyrB* adalah sebesar 0.1 (Gambar 4 dan Gambar 5).



Gambar 4. Pohon filogenetik berdasarkan analisis sekuens gen *gyrA* yang berasal dari strain bakteri genus *Rhizobium*, *Ensifer* dan *Mesorhizobium*. Jarak genetik diindikasikan dengan skala.



Gambar 5. Pohon filogenetik berdasarkan analisis sekuens gen *gyrB* yang berasal dari strain bakteri genus *Rhizobium*, *Ensifer* dan *Mesorhizobium*. Angka di dalam tanda kurung menunjukkan nomor salinan dari gen *gyrB*. Jarak genetik diindikasikan dengan skala.

Pohon filogenetik berdasarkan analisis sekuens gen *gyrA* yang berasal dari strain bakteri genus *Ensifer* dan *Mesorhizobium* menunjukkan bahwa sekuens *gyrA* dari spesies-spesies anggota pada tiap genus membentuk kelompok percabangan yang terpisah pada pohon filogenetik (Gambar 4). Gen *gyrA* dari *Rhizobium tropicii* CIAT 899 membentuk percabangan terpisah dari kelompok sekuens *gyrA* genus *Rhizobium* pada pohon filogenetik. Pohon filogenetik berdasarkan analisis sekuens gen *gyrB* yang berasal dari bakteri genus *Rhizobium*, *Ensifer* dan *Mesorhizobium* juga menunjukkan bahwa masing-masing genus membentuk percabangan tersendiri pada pohon filogenetik (Gambar 5), meskipun demikian terdapat percabangan terpisah yang dibentuk oleh salinan kedua dari sekuens gen *gyrB* yang berasal dari *Ensifer fredii* NGR234, *Ensifer americanum* CCGM7, *Rhizobium phaseoli* strain N261, dan *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. Gen *gyrA* merupakan gen *housekeeping* yang diketahui memberikan hasil resolusi filogenetik yang lebih tinggi dibandingkan gen 16S rRNA untuk beberapa isolat dari bakteri genus *Bacillus* (Chun & Bae, 2000), dan pohon filogenetik yang stabil pada resampling dengan metode bootstrap dengan pemisahan yang baik pada taxa *Helicobacter* (Ménard et al., 2016). Sekuens nukleotida gen *gyrB* memiliki laju evolusi yang lebih tinggi dibandingkan sekuens gen 16S rRNA (Yamamoto & Harayama, 1995) dan digunakan sebagai penanda filogenetik pada berbagai penelitian hubungan filogenetik dan taksonomi, seperti pada kelompok *Bacillus* (Wang et al., 2007), kelompok *Pseudomonas* (Yamamoto & Harayama, 1995), *Salmonella*, *Shigella* dan *Escherichia coli* (Fukushima et al., 2002), dan *Flavobacterium* (Peeters & Willems, 2011).

D. KESIMPULAN

Jarak genetik pada pohon filogenetik berdasarkan gen *gyrB* lebih besar dibandingkan jarak genetik pada pohon filogenetik berdasarkan gen *gyrA*. Rentang persentase kemiripan sekuens nukleotida gen *gyrB* pada genus *Rhizobium* and *Ensifer* lebih lebar dibandingkan *Mesorhizobium*, dipengaruhi oleh adanya sejumlah anggota genus *Rhizobium* dan *Ensifer* yang memiliki dua salinan gen *gyrB* dengan persentase kemiripan antar salinan gen yang rendah, salinan kedua dari masing-masing tersebut membentuk percabangan tersendiri pada pohon filogenetik, sehingga duplikasi gen *gyrB* dapat membatasi penggunaannya sebagai kronometer molekuler pada genus *Rhizobium* dan *Ensifer*.

E. DAFTAR PUSTAKA

- Chen, W. X., Yan, G. H., & Li, J. L. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 392–397.
- Chun, J., & Bae, K. S. (2000). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78, 123–127.
- Conville, P. S., & Witebsky, F. G. (2005). Multiple copies of the 16S rRNA gene in *Nocardia nova* isolates and implications for sequence-based identification procedures. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2881–2885.
- Creti, R., Ceccarelli, E., Bocchetta, M., Sanangelantoni, A. M., Tiboni, O., Palm, P., & Cammarano, P. (1994). Evolution of translational elongation factor (EF) sequences: reliability of global phylogenies inferred from EF-1 alpha (Tu) and EF-2 (G) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 3255–3259.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of*

- Molecular Evolution*, 17, 368–376.
- Ferraz Helene, L. C., Klepa, M. S., & Hungria, M. (2022). New insights into the taxonomy of bacteria in the genomic era and a case study with rhizobia. *International Journal of Microbiology*, 2022.
- Fukushima, M., Kakinuma, K., & Kawaguchi, R. (2002). Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2779–2785.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O’Dea, M. H., & Nash, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), 3872–3876.
- Gutacker, M., Valsangiacomo, C., Bernasconi, M. V., & Piffaretti, J.-C. (2002). *recA* and *glnA* sequences separate the *Bacteroides fragilis* population into two genetic divisions associated with the antibiotic resistance genotypes *cepA* and *cfiA*. *Journal of Medical Microbiology*, 51(2), 123–130.
- Hu, Y., Sun, F., & Liu, W. (2018). The heat shock protein 70 gene as a new alternative molecular marker for the taxonomic identification of *Streptomyces* strains. *AMB Express*, 8, 1–8.
- Iranzo, J., Puigbò, P., Lobkovsky, A. E., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2016). Inevitability of genetic parasites. *Genome Biology and Evolution*, 8(9), 2856–2869.
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., & Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), 895–898.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Klenk, H.-P., & Zillig, W. (1994). DNA-dependent RNA polymerase subunit B as a tool for phylogenetic reconstructions: branching topology of the archaeal domain. *Journal of Molecular Evolution*, 38, 420–432.
- Koonin, E. V. (2016). Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions. *F1000Research*, 5.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547.
- Liu, Y., Štefanič, P., Miao, Y., Xue, Y., Xun, W., Zhang, N., Shen, Q., Zhang, R., Xu, Z., & Mandic-Mulec, I. (2022). Housekeeping gene *gyrA*, a potential molecular marker for *Bacillus* ecology study. *AMB Express*, 12(1), 133.
- Mauchline, T. H., Hayat, R., Roberts, R., Powers, S. J., & Hirsch, P. R. (2014). Assessment of core and accessory genetic variation in *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *trifolii* strains from diverse locations and host plants using PCR-based methods. *Letters in Applied Microbiology*, 59(2), 238–246.
- Ménard, A., Buissonnière, A., Prouzet-Mauléon, V., Sifré, E., & Mégraud, F. (2016). The *GyrA* encoded gene: a pertinent marker for the phylogenetic revision of *Helicobacter* genus. *Systematic and Applied Microbiology*, 39(2), 77–87.
- Peeters, K., & Willems, A. (2011). The *gyrB* gene is a useful phylogenetic marker for exploring the diversity of *Flavobacterium* strains isolated from terrestrial and aquatic habitats in Antarctica. *FEMS Microbiology Letters*, 321(2), 130–140.
- Peter, J., Young, W., & Haukka, K. E. (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist*, 133(1), 87–94.
- Sayers, E. W., Beck, J., Bolton, E. E., Bourexis, D., Brister, J. R., Canese, K., Comeau, D. C., Funk, K., Kim, S., & Klimke, W. (2021). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D10.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Wang, J. C. (1985). DNA topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), 665–697.
- Wardell, G. E., Hynes, M. F., Young, P. J., & Harrison, E. (2022). Why are rhizobial symbiosis genes mobile? *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377(1842), 20200471.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221–271.
- Yamamoto, S., & Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1104–1109.
- Zuckermandl, E., & Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, 8(2), 357–366.