

UPORABA ČRTNIH KOD DNA ZA IDENTIFIKACIJO RAZLIČNIH BAKTERIJSKIH VRST IZ RODU *Pantoea*

Aleksander BENČIČ¹, Manca PIRC², Primož PAJK³, Tanja DREO⁴

^{1,2,4}Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

¹Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Ljubljana

³Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, Ljubljana

IZVLEČEK

Bakterija *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* povzroča bakterijsko uvelost koruze. Je avtohtona na ameriškem kontinentu. Beležimo tudi nekaj najdb v Evropi. Bakterijo smo v omejenem obsegu v okviru letnih programov preiskav, ki jih financira in koordinira UVHVVR, nekajkrat zaznali tudi v pridelavi koruze v Sloveniji. Pri listih koruze z madeži smo ob tem pogosto naleteli tudi na druge bakterije rodu *Pantoea*, katerih pomen še ni popolnoma razjasnjen. Za identifikacijo različnih bakterij iz rodu *Pantoea* smo preizkusili določanje DNA črtnih kod. Uporabili in primerjali smo dva para oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje in določane zaporedja dela gena *recA* (Wensing in sod., 2010; Cesbron in Manceau, 2010). Uspelo nam je pridobiti zaporedja *recA*, ki so omogočila identifikacijo vrst za veliko večino izolatov bakterij iz rodu *Pantoea*. Pri tem smo ugotovili, da sta za uspešno karakterizacijo potrebna oba para oligonukleotidnih začetnikov, saj se razlikujeta v specifičnosti. V listih koruze smo identificirali bakterije *P. stewartii* subsp. *stewartii*, *P. agglomerans* in *P. ananatis*, ki je eden od pomembnejših povzročiteljev bolezni koruze v južni Ameriki. Uporaba različnih oligonukleotidnih začetnikov je zamudna in oteži interpretacijo rezultatov, zato bi bilo smiselno v prihodnje razviti test, s katerim bi lahko identificirali večji nabor bakterijskih vrst iz rodu *Pantoea*. Program preiskave se predvidoma nadaljuje tudi v naslednjih letih.

Ključne besede: črtne kode DNA, *Pantoea*, Slovenija

ABSTRACT

THE USE OF DNA BARCODING FOR THE DETECTION OF DIFFERENT BACTERIAL SPECIES OF THE GENUS *Pantoea*

The bacterium *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* is the causal agent of bacterial leaf blight of maize and is native to America. However, some findings have also been made

¹ Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana; Jamova 39, SI-1000 Ljubljana; aleksander.bencic@nib.si

² Dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

³ Dunajska 22, SI-1000 Ljubljana

⁴ Dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

in Europe. The bacterium has been detected during the regular annual surveys of maize plants which is financed and coordinated by the UVHVVR. Other bacteria from genus *Pantoea* have also been encountered on leaves of symptomatic maize, the effects of which are not yet fully understood. We used DNA barcoding to identify bacteria of the genus *Pantoea*. Two pairs of oligonucleotide primers, which amplify sequence of the *recA* gene were used (Wensing *et al.* 2010; Cesbron and Manceau 2010). We were able to obtain sequences of the *recA* gene that allowed the identification of most isolates of the genus *Pantoea*. It was found that both pairs of oligonucleotide primers are required for successful identification, as they differ in specificity. Among the isolates from maize leaves, we identified *P. stewartii* subsp. *stewartii*, *P. agglomerans* and *P. ananatis*, which is an important pathogen of maize diseases in South America. The use of two different primer pairs is time consuming and complicates the interpretation of the results. This suggests the need for a new assay that allows simultaneous detection of a greater number of bacterial species. It is planned to continue the survey in the following years.

Key words: DNA barcoding, *Pantoea*, Slovenia

1 UVOD

260
Bakterija *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (*Erwinia stewartii* [Smith 1898] Mergaert in sod., 1993, comb. nov.), v nadaljevanju se uporablja uradna EPPO šifra ERWIST, je povzročiteljica bakterijske uvelosti koruze. Poleg ERWIST poznamo tudi *P. s.* subsp. *indologenes*, v nadaljevanju se uporablja uradna EPPO šifra PNTAIN, ki pa ne povzroča bolezenskih znamenj na koruzi. Bakterije vrste *P. stewartii* so gram-negativne, paličaste oblike, ne tvorijo spor in niso gibljive. Velikost bakterij je 0,5-1,3 × 1,0-3,0 μm. So oksidaza negativne in fakultativno anaerobne (Mergaert in sod., 1993). Najpomembnejša gostiteljska rastlina ERWIST je koruza (*Zea mays*). Občutljiva je zlasti sladka koruza (*Zea mays* convar. *saccharata* var. *rugosa*). Okužijo se lahko tudi druge rastline, med katerimi so okrasne rastline in trave (*Spartina pallidifusca*, *Zea mexicana*, *Tripsacum dactyloides*, *Dracaena sanderiana*). Bakterijska vrsta *P. stewartii* je avtohtona na ameriškem kontinentu, kjer tudi povzroča ekonomsko škodo. Tam bakterijo učinkovito prenaša ameriška vrsta bolhačev, koruzni bolhač (*Chaetocnema pulicaria*, Coleoptera, Crysomelidae, Alicine) (Roper, 2011; Walteson in Stavrinos, 2015). Ta po do sedaj znanih podatkih v Evropi ni zastopan, vendar so zastopane nekatere druge vrste iz rodu *Chaetocnema* (Dreo in sod., 2017).

V Evropi beležimo le posamične najdbe ERWIST in ni znano, da bi bila bakterija ustaljena. Zato jo Evropska unija (priloga II/A Izvedbene uredbe komisije (EU) 2019/2072) in Evropska in mediteranska organizacija za varstvo rastlin (EPPO, seznam A2) uvrščata med karantenske organizme. Program preiskav za odkrivanje ERWIST poteka tudi v Sloveniji pod okriljem Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) in Javne službe za varstvo rastlin. V letih 2018 in 2021 je bila bakterija ERWIST ugotovljena tudi na vzorcih koruze v Sloveniji. Poleg ERWIST so bile tekom preiskav med izolati iz koruze potrjene tudi druge bakterije iz rodu *Pantoea*. Med temi je tudi *P. ananatis*, v nadaljevanju se uporablja uradna EPPO šifra ERWIAN. Ta je znan rastlinski patogen, ki med drugim povzroča okužbe koruze v Južni Ameriki.

Boleznska znamenja, ki jih povzročajo okužbe z različnimi bakterijami iz rodu *Pantoea*, so lahko zelo podobna. Zato obstaja potreba po molekularnih testih, ki bi omogočali razločevanje med različnimi vrstami. Primer tovrstnega testa je določanje črtnih kod DNA. V raziskavi, ki smo jo izvedli na Nacionalnem inštitutu za biologijo, smo preverili ustreznost dveh različnih protokolov in začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje in za določanje črtnih kod DNA na podlagi odseka gena *recA*.

2 MATERIALI IN METODE

V raziskavi smo analizirali 31 sevov iz mednarodnih zbirk bakterij in 35 sevov, ki smo jih v sklopu programa preiskav izoliranih iz listov koruze z bolezenskimi znamenji in identificirali kot *Pantoea* spp. z metodo masne spektrometrije (MALDI-TOF MS). Sevi, pridobljeni iz bakterijskih zbirk, so pripadali bakterijskim vrstam in podvrstam ERWIST, PNT0IN, ERWIAN in *P. agglomerans* (v nadaljevanju se uporablja uradna EPPO šifra ERWIHE) ter so navedeni v preglednici 1.

DNA je bila izolirana z metodo Chelex (Dreo *in sod.*, 2013). Za izolacijo je bila uporabljena ena polna 1 µl cepilna zanka bakterij, ki smo jih predhodno namnožili na trdnem gojišču iz hranilnega agarja (goveji ekstrakt, pepton, agar). Pomnoževanje odseka gena *recA* smo izvedli z dvema različnima paroma začetnih oligonukleotidov. Prvi protokol so objavili Wensing *in sod.* leta 2010 (smerni oligonukleotid CATGCGCTGGGTGAAGACC, protismerni oligonukleotid TCAGCCTGCTTGAACGGCGC). Dolžina produkta je pri referenčnem genomu ERWIST DC283 699 bp. Za pomnoževanje je bil uporabljen komplet reagentov FastStart Taq DNA Polymerase (Roche, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Švica). Sestava reakcijske mešanice (25 µL) je bila: 2,5 µL 10 × PCR reakcijski pufer (z 20 mM MgCl₂), 0,5 µL mešanica dNTP-jev (vsak 10 mM), 0,25 µL vsakega od začetnih oligonukleotidov (100 µM), 0,125 µL DNA polimeraza Taq (5U/µL), preostanek molekularna voda. Pomnoževanje je potekalo po programu: 4 min 95 °C, 30 ciklov (20 s 95 °C, 20 s 52 °C, 60 s 72 °C) in 7 min 72 °C (Wensing *in sod.*, 2010). Drugi protokol, ki smo ga uporabili, sta objavila Cesbron in Manceau leta 2010 (smerni oligonukleotid ATCTGGAATTCAGCCTG, protismerni oligonukleotid TCCATCATGCGCCTGGGTGAAGA). Dolžina produkta je pri referenčnem genomu ERWIST DC283 713 bp. Sestava reakcijske mešanice je bila enaka kot pri zgoraj opisanem protokolu. Pomnoževanje je potekalo po programu: 4 min 95 °C, 30 ciklov (45 s 95 °C, 45 s 54 °C, 90 s 72 °C) in 7 min 72 °C (Cesbron in Manceau, 2010).

Preglednica 1: Bakterijski sevi pridobljeni iz bakterijskih zbirk. Navedeni so vrsta in podvrsta bakterije, oznaka v zbirki, gostiteljska rastlina iz katere je bil bakterijski sev izoliran, država v kateri je bil sev odkrit in leto izolacije.

Vrsta	Oznaka seva v zbirki	Gostiteljski organizem	Država porekla	Leto
ERWIST	CFBP 3168	<i>Zea mays</i>	ZDA	1957
ERWIST	NCPPB 2295	<i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i>	ZDA	1970
ERWIST	NCPPB 3253	<i>Zea mays</i>	Italija	1982
ERWIST	CFBP 1719	<i>Zea mays</i>	ZDA	neznano

ERWIST	CFBP 2502	<i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i>	ZDA	1957
ERWIST	CFBP 3157	<i>Zea mays</i>	ZDA	1963
ERWIST	CFBP 3165	<i>Zea mays</i>	ZDA	1932
ERWIST	CFBP 3166	<i>Zea mays</i>	ZDA	1975
ERWIST	CFBP 3167	<i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i>	ZDA	1970
ERWIST	CFBP 3169	<i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i>	ZDA	1962
ERWIST	CFBP 3393	neznani	neznana	neznano
ERWIST	CFBP 3394	hrošč	ZDA	1954
ERWIST	CFBP 3395	neznani	ZDA	neznano
ERWIST	CFBP 3396	<i>Chaetocnema pulicaria</i>	ZDA	1975
ERWIST	CFBP 3445	<i>Zea mays</i>	ZDA	1985
ERWIST	CFBP 3517	<i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i>	ZDA	1970
PNTAIN	CFBP 3614	<i>Setaria italica</i>	Indija	neznano
PNTAIN	NCPPB 1562	<i>Pennisetum glaucum</i>	Indija	1961
PNTAIN	NCPPB 1845	<i>Ananas comosus</i>	Havaji	1948
PNTAIN	NCPPB 1877	<i>Cyamopsis psoralioides</i>	neznana	1966
PNTAIN	NCPPB 2275	<i>Pennisetum glaucum</i>	Indija	1963
PNTAIN	NCPPB 2281	<i>Setaria italica</i>	Indija	1960
PNTAIN	NCPPB 2282	<i>Pennisetum glaucum</i>	Indija	1956
PNTAIN	NCPPB 4624	<i>Zea mays</i>	Avstralija	2018
PNTAIN	LMG 2630	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>	neznana	1966
PNTAIN	LMG 2671	<i>Ananas comosus</i>	Havaji	1966
ERWIHE	CFBP 2240	<i>Homo sapiens</i>	Zimbabve	1983
ERWIHE	CFBP 3174	<i>Zea mays</i>	Francija	1989
ERWIHE	CFBP 3845	<i>Homo sapiens</i>	Zimbabve	1956
ERWIAN	CFBP 3612	<i>Ananas comosus</i>	Brazilija	1965
ERWIAN	CFBP 3171	<i>Puccinia graminis</i>	ZDA	1954

Prisotnost produktov po pomnoževanju smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (1 % agaroz). DNA produkti pomnoževanja so bili iz gela izolirani s kompletom za izolacijo Montage DNA gel extraction kit (Merck Millipore, Burlington, ZDA). Določanje nukleotidnega zaporedja DNA je bilo izvedeno z metodo po Sangerju pri izvajalcu GATC Service (Eurofins Genomics, Ebersberg, Nemčija). Za obdelavo podatkov po sekvenciranju smo uporabili CLC Main Workbench 20 (Qiagen, Hilden, Nemčija). Začetki in konci zaporedij s slabšo kvaliteto so bili odstranjeni. Na podlagi smernega in protismernega nukleotidnega zaporedja smo določili konsenzno zaporedje. Filogenetsko drevo je bilo sestavljeno po metodi najbližjih sosedov na podlagi

Mahalaboisovih razdalj izračunanih iz *k*-merov dolžine 15 bp. Za določitev bakterijske vrste na podlagi zaporedja je bilo uporabljeno spletno orodje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in pripadajoča baza nukleotidnih zaporedij. Izbrana je bila bakterijska vrsta z najvišjim odstotkom ujemanja nukleotidnega zaporedja.

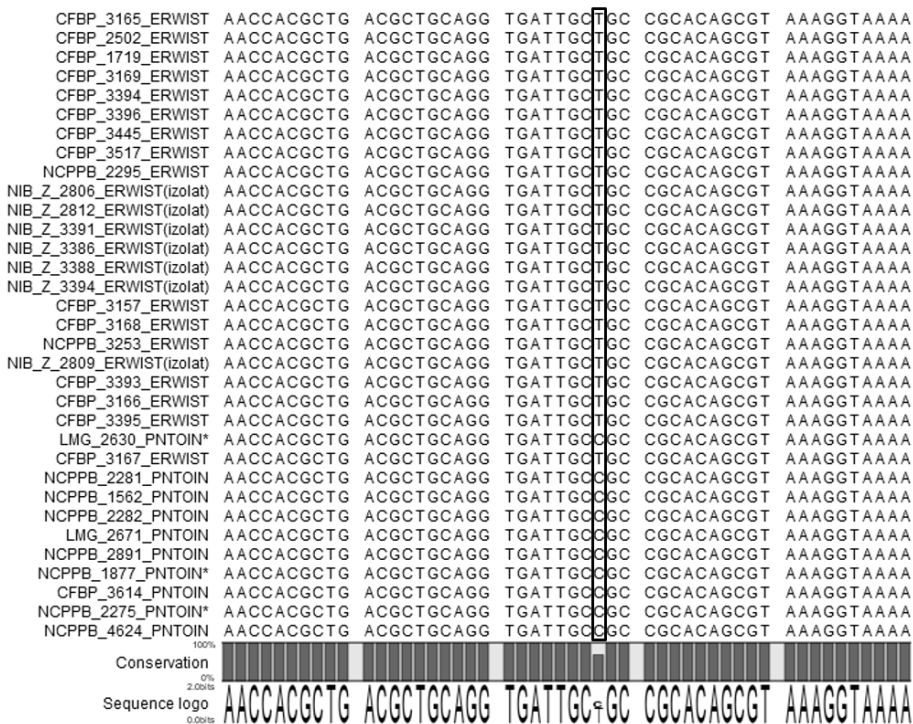
3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Analiza pomnoževanja

S protokolom, povzetem po Wensing in sod., smo uspešno pomnožili odsek gena *recA* pri ERWIST, PNT0IN in ERWIHE. S protokolom, povzetem po Cesbron in Manceau, smo uspešno pomnožili odsek gena *recA* pri PNT0IN, ERWIHE in ERWIAN. Tako je za pomnoževanje odseka gena *recA* pri ERWIST ustrezen protokol po Wensing in sod., pri ERWIAN je ustrezen protokol Cesbron in Manceau. Oba protokola pa sta ustrezna za bakteriji PNT0IN in ERWIHE. Do pomnoževanja in vidnega PCR produkta sicer pride z obema paroma začetnih oligonukleotidov pri vseh preučenih vrstah in podvrstah, vendar s protokolom Wensing in sod. ne dobimo zanesljivo zadostne količine produkta za uspešno določitev nukleotidnega zaporedja pri sevih ERWIAN. Enako velja tudi za protokol Cesbron in Manceau ter seve ERWIST. Za referenčne seve iz zbirke smo uspeli določiti vrsto na podlagi črtnih kod DNA pri vseh 31 sevih. Za izolate, pridobljene v sklopu programa preiskav, nismo uspeli pridobiti nukleotidnega zaporedja pri dveh izolatih. V obeh primerih gre za izolate ERWIAN. V enem od primerov je prišlo do pomnoževanja, vendar ni bilo mogoče pridobiti zaporedja. V drugem primeru pa ni prišlo niti do pomnoževanja. Pomnoževanje je bilo pri ERWIAN v splošnem manj učinkovito kot pri ostalih vrstah.

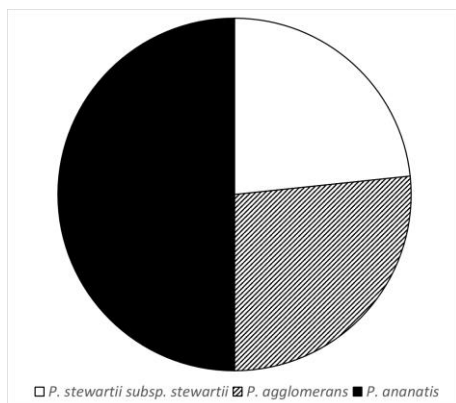
3.2 Določitev bakterijskih vrst

Da bi potrdili ustreznost metode črtnih kod DNA in njene izvedbe v našem laboratoriju, smo s to metodo želeli določiti vrsto 31 sevom iz bakterijskih zbirke (preglednica 1). Med njimi je bilo 19 sevov ERWIST, 7 sevov PNT0IN, 3 sevi ERWIHE in 2 seva ERWIAN. V vseh primerih smo s črtnimi kodami DNA določili enako bakterijsko vrsto in podvrsto kot je sevu pripisana v zbirki. V treh primerih smo z določanjem črtnih kod DNA seve, ki pripadajo podvrsti PNT0IN, sprva določili kot ERWIST. Ti so na filogenetskem drevesu (Slika 3) označeni z *. Podobnost nukleotidnega zaporedja je pri teh dveh podvrstah prek 99 %. S podrobnejšo analizo nukleotidnega zaporedja gena *recA* smo odkrili točkovno mutacijo na poziciji 1099182 (GenBank: CP017581.1). Na tem mestu je pri ERWIST timin in pri PNT0IN citozin (slika 1). Ta točkovna mutacija na podlagi do sedaj znanih zaporedij omogoča ločevanje med ERWIST in PNT0IN. Metoda je bila tako potrjena kot ustrezna za določanje bakterijskih vrst in podvrst rodu *Pantoea*. Za določitev na nivoju podvrste je potrebna analiza točkovnih mutacij.



Slika 1: Poravnava zaporedij odsekov gena *recA* med mesti 1099155 in 1099204 (GenBank: CP017581.1) pri ERWIST in PNTTOIN. Obkroženo je mesto 1099182 na katerem se nahaja točkovna mutacija.

Nadaljevali smo z določitvijo bakterijskih vrst bakterijskim sevom, ki so bili izolirani iz koruze v sklopu letnih programov preiskav. Skupno je bilo analiziranih 35 izolatov. Na osnovi *recA* črtne kode DNA smo 7 izolatov določili kot ERWIST, 8 kot ERWIHE in 16 kot ERWIAN (slika 2). Noben izolat ni bil identificiran kot PNTTOIN. Ti so bili izolirani iz 29 različnih vzorcev. Iz nobenega od vzorcev nismo izolirali dveh različnih vrst rodu *Pantoea*. ERWIST in ERWIHE sta bili identificirani v 6 vzorcih, ERWIAN pa v 15 vzorcih. V dveh primerih se rezultat ni skladal z vrsto, določeno z metodo MALDI-TOF MS. V obeh primerih je šlo za izolata predhodno pripisana vrsti ERWIHE. Eden od sevov je bil identificiran kot *Pantoea eucalypti*, drugi pa je bil umeščen v rod *Erwinia*. To bi lahko bila posledica velike heterogenosti te vrste in pomanjkljivi identifikaciji različnih sevov z masno spektrometrijo. Identifikacija vseh izolatov ERWIST in ERWIAN se je skladala s predhodno pripisano vrsto in podvrsto.



Slika 2: Tortni diagram bakterijskih vrst rodu *Pantoea* določenih v izolatih pridobljenih tekom rednih letnih preiskav na NIB-u.

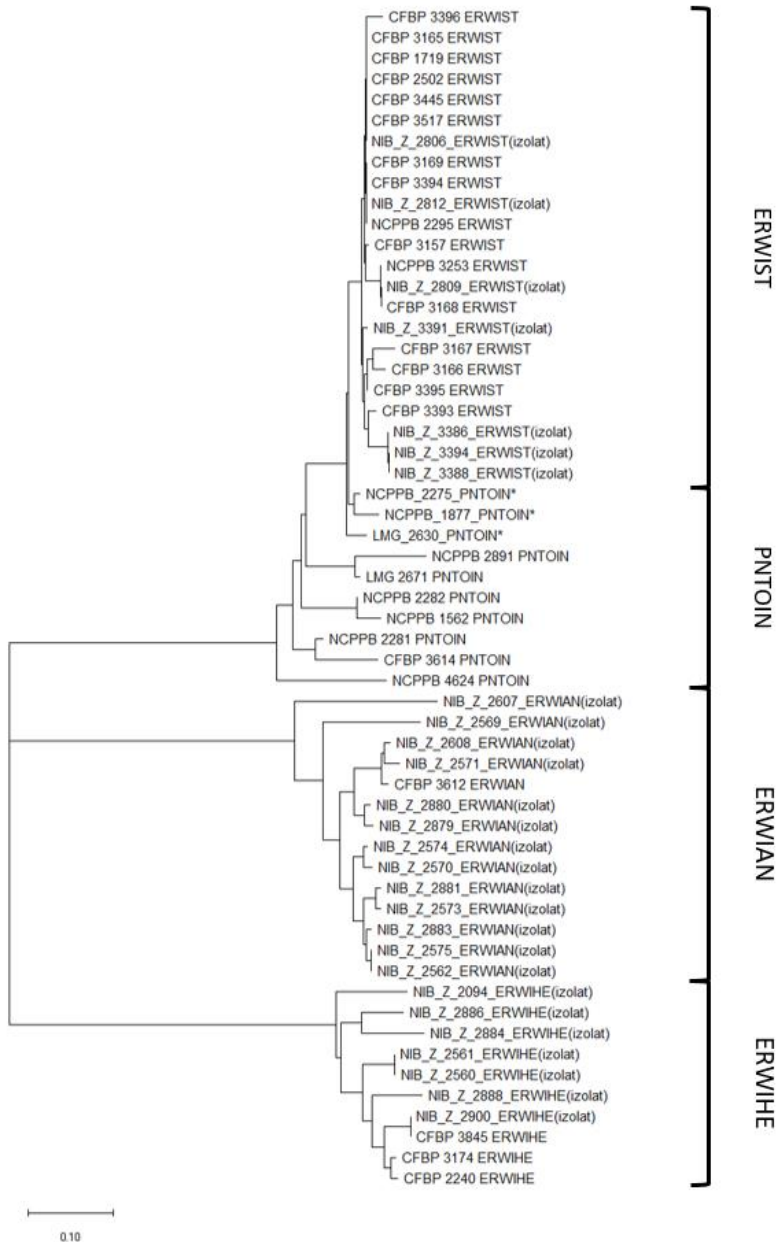
Iz rezultatov določanja vrst bakterij iz rodu *Pantoea* lahko zaključimo, da smo za veliko večino izolatov uspeli pridobiti nukleotidno zaporedje odseka na genu *recA*, ki je omogočilo določitev bakterijske vrste. Na podlagi nukleotidnih zaporedij smo pripravili tudi filogenetsko drevo. Na temu se jasno vidi razdelitev v tri ločene veje, ki vsebujejo vrste *P. stewartii*, ERWIAN in ERWIHE (slika 3).

265

4 SKLEPI

Dokazali smo, da je z uporabo metode črtnih kod DNA na podlagi odseka gena *recA* moč določiti vrsto in podvrsto bakterijam rodu *Pantoea*. Vendar je uporaba dveh različnih protokolov in parov začetnih oligonukleotidov zamudna in oteži interpretacijo rezultatov. Prav tako je potrebo za zanesljivo razlikovanje med podvrstama ERWIST in PNTOIN izvesti analizo točkovnih mutacij. Zato je tak pristop manj uporaben v diagnostiki. Protokol, ki bi omogočal zanesljivejšo pomnoževanje za določanje črtnih kod DNA pri vseh vrstah rodu *Pantoea*, bi povečal uporabnost te metode, saj bi lahko identificirali več različnih sevov iz rodu *Pantoea*, za katere tarčne in specifične metode niso na voljo. V diagnostiki je zato v uporabi predvsem PCR v realnem času (Tambong *in sod.*, 2008, Pal *in sod.*, 2019). Trenutno so v teku analize celotnih genomov za izbrane seve rodu *Pantoea*, ki so bili izolirani v letnih programih preiskav. S tem bomo pridobili boljše podatke, ki bodo omogočili popolnejšo karakterizacijo sevov in razvoj novih diagnostičnih testov. Identifikacija sevov na podlagi primerjalne genomike pa lahko olajša sledenje izbruhom okužb. Glede na to, da je od preučenihi bakterij le ERWIST na evropskem seznamu karantenskih organizmov, nam bodo nadaljnje študije prav tako pripomogle k razvoju novih specifičnih in hitrihi molekularnih diagnostičnih metod, saj jih je zelo malo (Pal *in sod.*, 2019, Gehring *in sod.*, 2014) s katerimi lahko ločimo bakteriji ERWIST in PNTOIN.

266



Slika 3: Filogenetsko drevo sestavljeno na podlagi nukleotidnih zaporedij odseka gena *recA*, pridobljenih za določanje črtnih kod DNA. Sevi so poimenovani z imenom v zbirke, ob izolatih iz programa preiskav je v oklepaju dopisano izolat. Na desnem rodu je označeno katera vrsta je bila določena sevom.

5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Upravi Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, Javni službi za varstvo rastlin in vsem vzorčevalcem na terenu, ki sodelujejo v programu preiskav. Tehničnim sodelavcem na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo. Javni agenciji Republike Slovenije za raziskovalno dejavnost za financiranje raziskovalnih programov ARRS P4-0165 in ARRS MR Aleksander Benčič.

6 LITERATURA

- Cesbron, S., Manceau, C., Primers for recA amplification for *Erwinia* strains. 2010.
- Dreo, T., Naglič, T., Peterka, M., Ravnikar, M. (2013) Karakterizacija slovenskih izolatov *Pectobacterium* in *Dickeya* spp. iz krompirja. Zbornik predavanj in referatov 11. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo. Bled, 5.-6., str. 125–131
- Dreo, T., Pajk, P., Pirc, M., Ravnikar M. (2017). Program preiskav preverjanja zastopanosti bakterije *Pantoea stewartii* v rastlinah in semenu koruze (*Zea mays* L.). Zbornik predavanj in referatov 13. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo. Rimske Toplice, 7.-8. marec 2017, str. 392–398
- Gehring, I., Wensing, A., Gernold, M., Wiedemann, W., Coplin, D.L., Geider, K. (2014). Molecular differentiation of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* from subspecies *stewartii* and identification of new isolates from maize seeds. *Journal of Applied Microbiology*, 116(6), str. 1553-1562
- Mergaert, J., Verdonck, L., Kersters, K. (1993). Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(1), str. 162–173
- Pal, N., Block, C. C., Gardner, Candice A.C. (2019). A real-time PCR differentiating *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* from *P. stewartii* subsp. *indologenes* in corn seed. *Plant Disease*, 103(7), str. 1474–1486
- Roper, M. C. (2011). *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: Lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. *Molecular Plant Pathology*, 12(7), str. 628–637
- Tambong, J. T., Mwange, K. N., Bergeron, M., Ding, T., Mandy, F., Reid, L. M., Zhu, X. (2008) Rapid detection and identification of the bacterium *Pantoea stewartii* in maize by TaqMan® real-time PCR assay targeting the *cpsD* gene, *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), str. 1525–1537
- Walterson, A. M., Stavrinides, J. (2015) *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), str. 968–984
- Wensing, A., Zimmermann, S., Geider, K. (2010). Identification of the corn pathogen *Pantoea stewartii* by mass spectrometry of whole-cell extracts and its detection with novel PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), str. 6248–6256