

**METAGENOMSKA ANALIZA BAKTERIJSKE ZDRUŽBE ORHIDEJ
Phalaenopsis Z BOLEZENSKIMI ZNAMENJI MEHKIH GNILOB**

Špela ALIČ¹, Nataša TOPLAK², Simon KOREN³, Tanja DREO⁴

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

^{2,3}Omega d.o.o, Ljubljana

IZVLEČEK

Bolezni mehkih gnilob povzročajo občutno gospodarsko škodo pri vzgoji in pridelavi številnih gospodarsko pomembnih poljščin in okrasnih rastlin, kot so npr. krompir in orhideje. V razvoj bolezni je navadno vključena populacija patogena ali pa celo mešana populacija, ki lahko vključuje različne vrste iz rodov *Dickeya* in *Pectobacterium*. Diagnostične metode, ki temeljijo na sposobnosti gojenja bakterij na gojiščih ali detekciji tarčnega organizma, zaradi visoke selektivnosti ne omogočijo realnega vpogleda v prisotno bakterijsko združbo. Zato potrebujemo pristop, ki omogoča celosten pogled v bakterijsko združbo povezano z razvojem bolezni in odnose znotraj nje (sinergija, antagonizem). Tak pristop nam omogočajo metode okoljske genomike, kot je npr. metagenomika, ki temeljijo na sekvenciranju nukleinskih kislin. Metagenomika omogoča raziskovanje mikrobnih združb neposredno iz naravnega okolja, brez predhodnega gojenja v laboratoriju. Cilj naše raziskave je bil ovrednotenje širše bakterijske združbe orhidej *Phalaenopsis* z bolezenskimi znaki mehkih gnilob s pomočjo komercialnega kita za metagenomsko analizo na osnovi 16S rDNA.

400

Ključne besede: metagenomika, bakterijska združba, mehke gnilobe

ABSTRACT

**METAGENOMICS ANALYSIS OF BACTERIAL COMMUNITY IN *Phalaenopsis*
ORCHIDS WITH SOFT ROT**

Soft rots remain an important economical liability in production of various economically important crops and ornamental plants e.g. potato and orchids. Frequently, a population of the pathogen or even mixed populations including various strains of *Dickeya* and *Pectobacterium* spp. can contribute to the development of the soft rot disease. Diagnostic methods, based on the cultivation of the bacteria on artificial media or detection of specific target organisms, are extremely selective and do not provide realistic insight into bacterial community. A holistic approach is required to

¹ asist. dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: spela.alic@nib.si

² dr., univ. dipl. biol., Dolinškova ulica 8, SI-1000 Ljubljana

³ dr., univ. dipl. biokem., prav tam

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

understand bacterial community involved in the disease development, especially their inter-bacterial relationships acting synergistically and antagonistically. This can be explored through sequenced-based environmental genomics. Metagenomics provides a cultivation-independent approach to study microbial communities directly in their natural environments. The aim of our study was to gain a wider insight in bacterial communities involved soft rot disease of *Phalaenopsis* using commercial 16S rDNA based metagenomics kit.

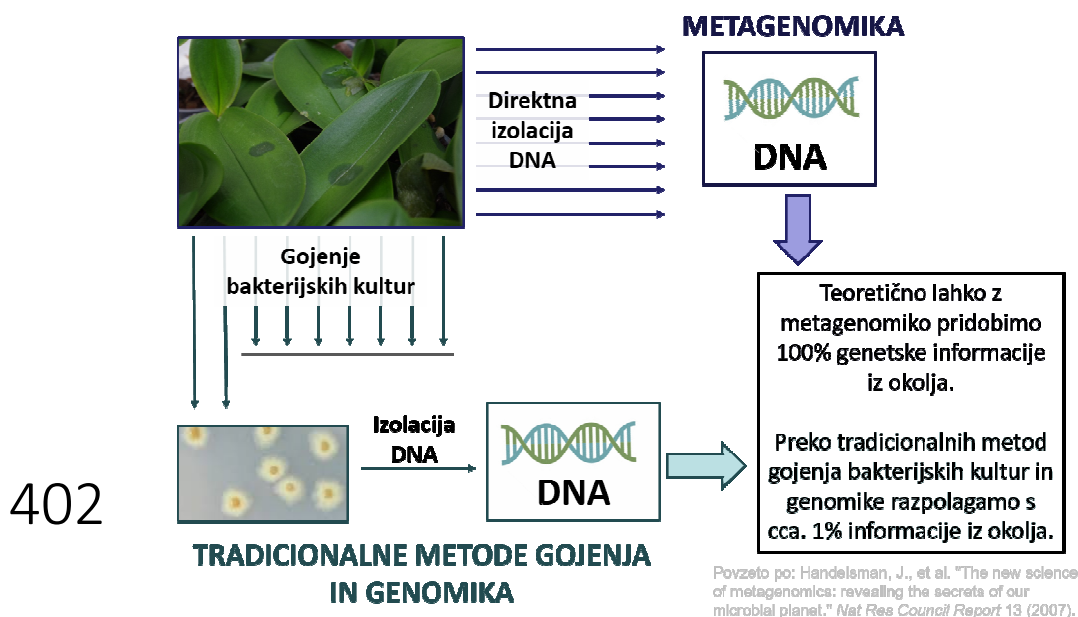
Key words: metagenomics, bacterial community, soft rot

1 UVOD

Bakterijska bolezen mehkih gnilob je uničujoča rastlinska bolezen, ki prizadene številne vrste okrasnih rastlin in poljščin, npr. krompir in orhideje. Družina Orchidaceae predstavlja eno največjih in najbolj priljubljenih družin okrasnih rastlin v hortikulturnem svetu. Bolezen mehkih gnilob predstavlja hudo omejitev pri tržni vzgoji orhidej in posledično povzroča hudo gospodarsko škodo številnim pridelovalcem po celem svetu. Na razvoj bolezni poleg okoljskih dejavnikov močno vpliva tudi samo mikrookolje rastline. Mikroflora rastline lahko vpliva na virulenco in agresivnost povzročiteljev ter posledično na sam razvoj bolezni. Kot pogoste povzročitelje bolezni mehkih gnilob v literaturi najpogosteje zasledimo različne vrste iz rodov *Dickeya* in *Pectobacterium*. V Sloveniji je bila kot povzročitelj mehkih gnilob na orhidejah identificirana novo opisana vrsta *Dickeya fangzhongdai*, ki predstavlja zelo agresivnega patogena z izredno širokim naborom gostiteljev vključno s številnimi gospodarsko pomembnimi rastlinami (Alič in sod., 2017; Alič in sod., 2018; Alič in sod., 2019). Vendar pa je navadno v razvoj bolezni vključena populacija patogena ali pa celo mešana populacija, ki lahko vključuje predstavnike različnih vrst iz rodov *Dickeya* in *Pectobacterium*. To se sklada tudi z opisi zastopanosti mešanih populacij rodu *Dickeya* v orhidejah s simptomi mehkih gnilob (Alič in sod. 2017).

Člani mikrobne združbe rastline tvorijo interakcije tako med seboj in tudi z rastlino ter tako posredno vplivajo na samo zdravje rastline (Turner in sod., 2013; Berendsen in sod., 2012). Na primer mikroflora rastline lahko vpliva na virulenco in agresivnost povzročiteljev ter posledično na sam razvoj bolezni. Diagnostične metode, ki temeljijo na sposobnosti gojenja bakterij na gojiščih ali detekciji tarčnega organizma, zaradi visoke selektivnosti ne omogočijo realnega pogleda v prisotno bakterijsko združbo. S pomočjo tradicionalnih metod gojenja bakterijskih kultur in genomike dobimo vpogled v približno 1 % informacije iz okolja, ki ni zadostna za širše razumevanje mikrobnih združb in njihovih vplivov na rastline (Doonan in sod., 2017; Handelsman, 2004). Metode okoljske genomike, kot je na primer metagenomika, ki temeljijo na sekvenciranju nukleinskih kislin in zajemajo dedno informacijo neposredno iz naravnega okolja, brez predhodnega gojenja v laboratoriju, pa nam omogočajo celosten pogled v bakterijsko združbo in odnose znotraj nje (sinergija, antagonizem). Metagenomske raziskave bakterijskih združb so pogosto osnovane na analizi hipervariabilnih regij 16S rRNA gena, splošno uporabljene filogenetskega markerja, ker ta omogočajo hiter vpogled v osnovno sestavo posamezne združbe.

Cilj naše raziskave je bil ovrednotenje širše bakterijske združbe orhidej *Phalaenopsis* z bolezenskimi znaki mehkih gnilob s pomočjo komercialnega kita za metagenomsko analizo na osnovi 16S rDNA.



Slika 1: Primerjava tradicionalnih tehnik proučevanja mikrobnih združb in sodobnega pristopa metagenomike.

2 MATERIALI IN METODE

Vzorci smo pridobili iz različnih vrst tkiv orhidej *Phalaenopsis* v različnih fazah razvoja boleznih mehkih gnilob. Bakterijskega povzročitelja boleznih smo identificirali s pomočjo izolacij bakterij na gojiščih in analize qPCR testi specifičnimi za *Dickeya* spp. in *Pectobacterium* spp.. Vzorci za metagenomsko analizo smo izbrali na podlagi rezultatov analize qPCR in vrste rastlinskega tkiva ter faze boleznih. Iz izbranih vzorcev smo izolirali DNA z uporabo QuickPick Plant Mini Kit (BioNobile) in z uporabo 16S™ Metagenomics Kit pomnožili 7 variabilnih regij 16S rDNA. Kit vsebuje dva seta PCR začetnikov s katerimi pomnoži hipervariabilne regije V2, V3, V4, V6, V7, V8 in V9 bakterijske 16S rDNA. Ker vzorci vsebujejo relativno visok delež gostiteljske DNA, smo protokol priprave knjižnice prilagodili vzorcem z nizko koncentracijo mikrobnega DNA in visoko koncentracijo ozadja, skladno s priporočili proizvajalca (MAN0006846_RevA_UB_3March2014_Amplicon Libraries). Amplikonom pomnoženih variabilnih regij smo popravili konce (Ion Plus Fragment Library Kit) in jih označili z ustreznimi nukleotidnimi kodami (IonXpress Barcode Adapters 1-16 Kit) (MAN0010799_RevA_Ion_16S_Metagenomics_UG_27Aug2014). Iz vseh očiščenih amplikonov smo pripravili združeno knjižnico s končno koncentracijo 26 pM. Tako

pripravljeno knjižnico smo sekvencirali na Ion 316v2 čipu na Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) sistemu in ob uporabi Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit (Ion Torrent, ThermoFisher Scientific).

Kvaliteta sekvenčnih podatkov je bila najprej pregledana v programu Torrent Suite 4.4. Podatke smo analizirali z dvema različnima programskima platformama, in sicer Ion Reporter (Life Technologies) in MG-RAST (Meyer in sod., 2008). Analiza podatkov v Ion Reporterju je bila izvedena tako po posameznih vzorcih kot tudi posameznih variabilnih regijah z uporabo sledečih parametrov analize: (i) podatkovni bazi za analizo - Greengenes in Ion Torrent 16S Reference library, (ii) potrebno število kopij – 10, (iii) detekcija primerjev – na enem koncu in (iv) omejitev dolžine – 150 bp. Vzporedno je bila izvedena primerjalna analiza posameznih vzorcev s programom MG Rast v kateri so bili uporabljeni sledeči parametri: (i) podatkovna baza – Greengenes, (ii) maksimalna omejitev e-vrednosti – 10^{-5} , (iii) minimalna omejitev ujemanja – 95%, minimalna omejitev v dolžini prileganja -150 bp.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

S pomočjo metagenomske analize tkiva orhidej smo pridobili osnovni vpogled v bakterijsko združbo orhidej in razlike v strukturi združbe simptomatičnega in asimptomatičnega tkiva.

403

Čeprav 16STM Metagenomics Kit ni specializiran za metagenomiko rastlin, je omogočil ustrezno analizo bakterijske združbe tkiva orhidej z in brez bolezenskih znamenj. Prisotnost kloroplastne rDNA v rastlinskih vzorcih je vplivala na občutljivost metagenomske analize. Delež odčitkov, ki so pripadali kloroplastni DNA je bil občutno višji v zdravem (71,8 %) kot v nekrotičnem (do 18,4 %) tkivu, kar sovпада pričakovani razgradnji kloroplastov v gnijočem tkivu. Kljub variabilnim deležem bakterijskih sekvenc sta bila število in kakovost odčitkov ustrezna za določitev profila bakterijske združbe testiranem rastlinskem tkivu, vendar je pri enaki globini sekvenciranja resolucija rezultatov bakterijske združbe v asimptomatičnem tkivu občutno nižja. Za boljši vpogled v bakterijsko združbo zdravega, asimptomatičnega tkiva bi morali povečati globino sekvenciranja ali pa v vzorcih obogatiti delež mikrobne 16S rDNA. Prevalentni predstavnik bakterijske združbe v simptomatičnega tkiva orhidej so bile bakterije iz rodu *Dickeya*, kar potrjuje rezultate predhodnih analiz določanja bakterijskega povzročitelja bolezni s pomočjo izolacije na gojiščih in specifičnimi testi qPCR. V okuženih rastlinah je bil prisoten velik delež bakterij *Dickeya* spp. tudi v delih rastline brez simptomov bolezni.

Analiza sekvencnih podatkov je bila izvedena z dvema različnima programoma, in sicer Ion Reporter in MG-RAST. Ion Reporter je namenski program za obdelavo sekvenc pridobljenih pri sekvenciranju s tehnologijo Ion Torrent, zato ima razširjenje funkcije kot npr. ločena analiza sekvenc po posameznih variabilnih regijah. Splošni programi za metagenomiko kot je MG-RAST te opcije nimajo, ker sekvenčni markerji, ki omogočajo ločevanje med variabilnimi regijami niso javno dostopni. Posledično rezultati analizirani s programom MG-RAST predstavljajo povprečno sliko vseh variabilnih regij. Sekvenčni podatki posameznih variabilnih regij 16S DNA podajo drugačno sestavo bakterijske združbe istega vzorca in tudi ločljivost določanja

združbe se med variabilnimi regijami razlikuje. Profili bakterijskih združb tako na nivoju rodov kot družin so bili najbolj primerljivi med variabilnimi regijami V2, V3, V4, V8 (Preglednica 1). Medtem ko je regija V9 je imela na nivoju družin najnižjo resolucijo. Število pridobljenih odčitkov za regiji V2 simptomatičnem tkivu in V4 v asimptomatičnem tkivu je bilo občutno nižje od ostalih regij, česar ni bilo mogoče razložiti s samim potekom eksperimentalnega dela (Preglednica 1).

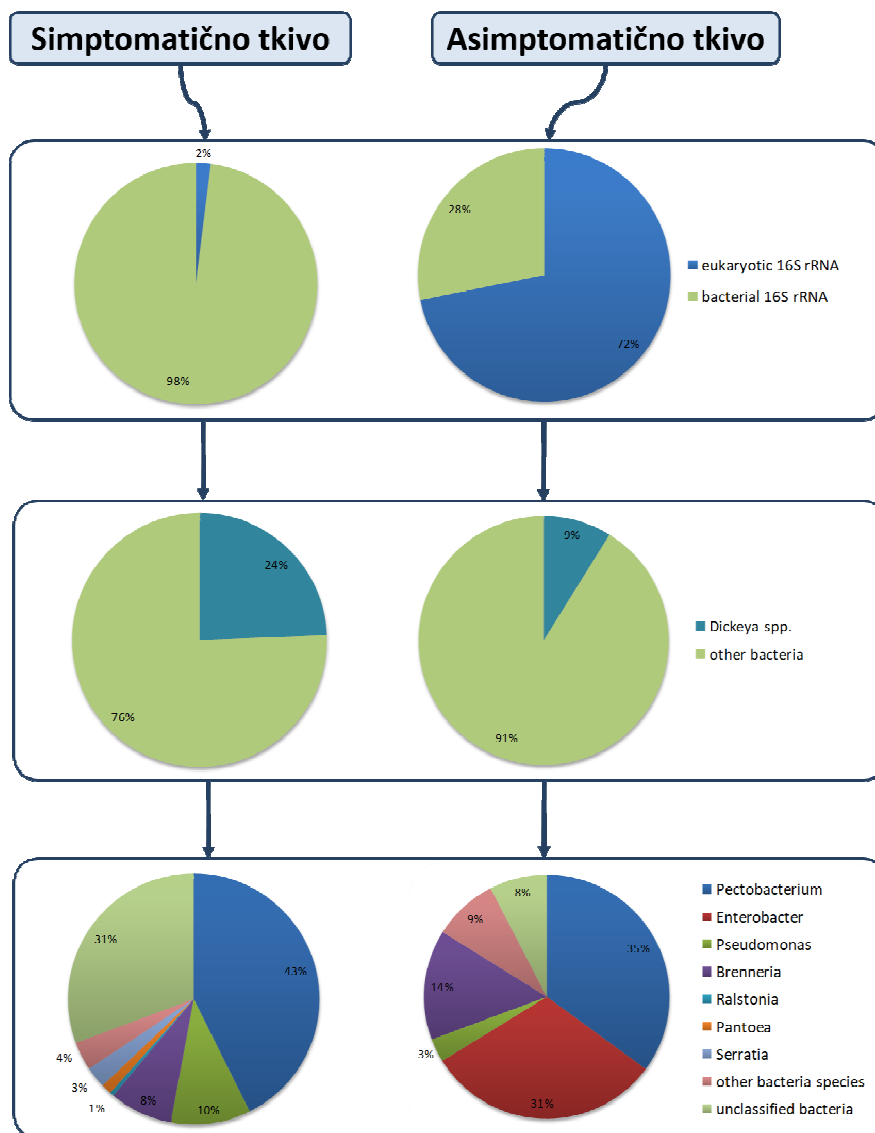
Preglednica 1: Profil bakterijske združbe simptomatičnega in asimptomatičnega tkiva na nivoju družin bakterij.

Vzorec:		Simptomatično tkivo						Nesimptomatično tkivo					
Variabilna regija 16S:		V2	V3	V4	V67	V8	V9	V2	V3	V4	V67	V8	V9
Število dobljenih odčitkov:		3245	26825	10988	23832	29158	17937	16282	118473	8682	44109	43335	15165
Družina bakterij	<i>Enterobacteriaceae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Pseudomonadaceae</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	<i>Burkholderiaceae</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Alcaligenaceae</i>	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
	<i>Xanthomonadaceae</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
	<i>Brucellaceae</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
	<i>Rhizobiaceae</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Rhizobiaceae</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Oxalobacteraceae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillaceae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Vibrionaceae</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ferrimonadaceae</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Peptococcaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Thermodesulfobiaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Alteromonadaceae</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Syntrophaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Št. detektiranih družin bakterij		3	8	7	6	7	1	3	5	5	3	4	1

404

Večji delež identificirane bakterijske združbe, tako tarčnega patogena (*Dickeya* spp.) kot tudi spremljajoče mikroflore, predstavljajo enterobakterije. Resolucija 16S rDNA ima svoje omejitve. Čeprav je uporaba variabilnih regij 16S rDNA učinkovit pripomoček pri identifikaciji bakterij oz. bakterijskih združb, ki vsebujejo predstavnike različnih taksonomskih skupin, je na drugi strani uspešnost rekonstrukcije bakterijskih združb sorodnih skupin bakterij precej omejena (Naum in sod., 2008). Omejitve ločljivosti 16S rDNA za določanje sorodnih skupin bakterij smo opazili tudi v naših eksperimentalnih podatkih, kar nakazuje na potrebo po uporabi dodatnih genetskih markerjih za natančnejše določanje prisotne bakterijske združbe.

405



Slika 2: Primerjava bakterijske združbe simptomatičnega in asimptomatičnega rastlinskega tkiva glede na razmerje odčitkov. Analiza je bila izvedena z orodjem MG-RAST. Zastopanost prikazanih bakterijskih vrst je bila več kot 1000 odčitkov.

Najobčutnejša zaznana razlika v mikrobnih združbi med zdravim tkivom in tkivom z bolezenskimi znaki je bila v zastopanosti bakterij iz rodov *Serratia* in *Enterobacter*. V simptomatičnem tkivu je bil zaznan višji delež bakterij iz rodu *Serratia*, v

asimptomatičnem pa so občuten delež bakterijske združbe sestavljale bakterije *Enterobacter*, ki jih v simptomatičnem tkivu skoraj ni bilo moč zaznati (Slika 2). Bakterije iz rodu *Serratia* so identificirane kot povzročitelji bolezni mehkih gnilob paprik (Gills in sod., 2014), prav tako je so bili izolati *Serratia* spp. najdeni v povezavi s simptomi mehkih gnilob na krompirju (Balabel, 2014) in tudi orhidejah (Joko in sod., 2014). Na drugi strani pa več objav poroča o antagonističnem delovanju vrste *Serratia plymuthica* proti bakterijskim povzročiteljem mehkih gnilob (Czajkowski in sod., 2012; Hadizadeh in sod., 2019). Glede na poročila lahko predstavniki *Serratia* spp. zasedejo širok nabor bioloških niš, od bakterijskih endofitov do saprofitov. Modelni sistem mehkih gnilob orhidej, ki smo ga uporabili v tej raziskavi, nakazuje, da v tem rastlinskem sistemu bakterije *Serratia* spp. sodelujejo v bakterijski združbi kot saprofitske bakterije ali pa celo sodelujejo s patogenom pri razvoju bolezni.

Podobno tudi bakterije iz rodu *Enterobacter* sodelujejo pri različnih vlogah v mikrobiomu rastline, od rastlinskih patogenov (Zhu in sod., 2010; Garcia-González in sod., 2018) do simbiotov in endofitov (Taghavi in sod., 2010; Naveed in sod., 2014; Macedo-Raygoza in sod., 2019), ki spodbujajo rast rastlin. Do sedaj še ni bilo nobene objave, ki bi povezala vpliv bakterij *Enterobacter* in razvoj bolezni mehkih gnilob.

V nekrotičnem tkivu je prisoten občutno višji delež bakterij, ki jim ni bilo mogoče klasificirati, kar nakazuje na kompleksnost bakterijske združbe, ki sodeluje oz. prispeva k končnemu propadu rastlinskega tkiva (slika 2). Pri pregledu raznolikosti bakterijske združbe v zdravem rastlinskem tkivu je potrebno upoštevati, da je bila globina sekvenciranja nižja, zaradi prisotne kloroplastne DNA, kar posledično vpliva na zaznavo skupin bakterij, ki so v združbi v manjšem deležu.

4 SKLEPI

Metagenomika, tehnologija proučevanja bakterijskih združb, ki temelji na sekvenciranju genetske informacije organizmov neposredno iz naravnega okolja nam omogoča celosten pogled v bakterijsko združbo povezano z razvojem bolezni in v odnose znotraj združbe. Eden najenostavnejših in najhitrejših načinov za vpogled v osnovno sestavo posamezne združbe predstavlja analiza hipervariabilnih regij 16S rDNA.

V sklopu naše raziskave smo pokazali, da je komercialni kit 16STM Metagenomics Kit, ki ni specializiran za metagenomiko rastlin, omogočil ustrezno analizo bakterijske združbe tkiva orhidej, vendar je zaradi prisotnosti kloroplastne DNA v zdravem rastlinskem tkivu z ohranjenimi kloroplasti resolucija metagenomske analize slabša.

Potrdili smo, da *Dickeya* spp. predstavlja dominantno vrsto v nekrotičnem tkivu, kar potrjuje rezultate dobljene z drugimi metodami. Analiza rezultatov po posameznih variabilnih regijah je pokazala, da različne variabilne regije 16S DNA podajo drugačno sestavo bakterijske združbe istega vzorca. Profili bakterijskih združb tako na nivoju rodov kot družin so bili najbolj primerljivi med variabilnimi regijami V2, V3, V4, V8.

Z analizo sestave bakterijske družbe na nivoju rodov bakterij smo pokazali, da se v nekrotičnem tkivu orhidej poveča delež bakterij iz rodu *Serratia*, medtem ko je bila v asimptomatičnem tkivu pa so bile pogostejše bakterije iz rodu *Enterobacter*, kar predstavlja novo informacijo o bakterijski združbi orhidej in potrjuje generičnost orodja.

5 ZAHVALA

Delo je bilo sofinancirano s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost RS (pogodbe P4-0165, L7-5534 and 1000-15-0105) in Eupresco Phytosanitary ERA-NET projekta na temo *Dickeya* in *Pectobacterium* sp.. Avtorji se zahvaljujejo Tomažu Jevšniku, Ocean Orchids, za rastlinski material.

6 LITERATURA

- Alič, Š., Naglič, T., Tušek-Žnidarič, M., Peterka, M., Ravnikar, M., & Dreo, T. (2017). Putative new species of the genus *Dickeya* as major soft rot pathogens in *Phalaenopsis* orchid production. *Plant pathology*, 66(8), 1357-1368.
- Alič, Š., Van Gijsegem, F., Pédrón, J., Ravnikar, M., & Dreo, T. (2018). Diversity within the novel *Dickeya fangzhongdai* sp., isolated from infected orchids, water and pears. *Plant pathology*, 67(7), 1612-1620.
- Alič, Š., Pédrón, J., Dreo, T., & Van Gijsegem, F. (2019). Genomic characterisation of the new *Dickeya fangzhongdai* species regrouping plant pathogens and environmental isolates. *BMC genomics*, 20(1), 34.
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome biology*, 14(6), 209.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.
- Doonan, J., Denman, S., McDonald, J. E., & Golyshin, P. N. (2017). Shotgun Metagenomic Sequencing Analysis of Soft-Rot Enterobacteriaceae in Polymicrobial Communities. In *Metagenomics* (pp. 85-97). Humana Press, New York, NY.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669-685.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., ... & Wilkening, J. (2008). The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC bioinformatics*, 9(1), 386.
- Naum, M., Brown, E. W., & Mason-Gamer, R. J. (2008). Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the Enterobacteriaceae?. *Journal of molecular evolution*, 66(6), 630-642.
- Gillis, A., Rodríguez, M., & Santana, M. A. (2014). *Serratia marcescens* associated with bell pepper (*Capsicum annuum* L.) soft-rot disease under greenhouse conditions. *European journal of plant pathology*, 138(1), 1-8.
- Balabel, N. M. (2014). Species Determination of Cross-Reacting Bacteria in Immunofluorescence Diagnosis of Potato Brown Rot. *Plant Pathology Journal*, 13(1), 28-36.
- Joko, T., Subandi, A., Kusumandari, N., Wibowo, A., & Priyatmojo, A. (2014). Activities of plant cell wall-degrading enzymes by bacterial soft rot of orchid. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(10), 1239-1250.
- Czajkowski, R., De Boer, W. J., Van Veen, J. A., & Van der Wolf, J. M. (2012). Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya* sp. biovar 3 in vitro and in planta. *Plant Pathology*, 61(1), 169-182.
- Hadizadeh, I., Peivastegan, B., Hannukkala, A., van der Wolf, J. M., Nissinen, R., & Pirhonen, M. (2019). Biological control of potato soft rot caused by *Dickeya solani* and the survival of bacterial antagonists under cold storage conditions. *Plant pathology*, 68(2), 297-311.

- Zhu, B., Wang, G., Xie, G., Zhou, Q., Zhao, M., Praphat, K., ... & Tian, W. (2010). *Enterobacter* spp.: a new evidence causing bacterial wilt on mulberry. *Science China Life Sciences*, 53(2), 292-300.
- García-González, T., Sáenz-Hidalgo, H. K., Silva-Rojas, H. V., Morales-Nieto, C., Vancheva, T., Koebnik, R., & Ávila-Quezada, G. D. (2018). *Enterobacter cloacae*, an emerging plant-pathogenic bacterium affecting chili pepper seedlings. *The plant pathology journal*, 34(1), 1.
- Taghavi, S., Van Der Lelie, D., Hoffman, A., Zhang, Y. B., Walla, M. D., Vangronsveld, J., ... & Monchy, S. (2010). Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS genetics*, 6(5), e1000943.
- Naveed, M., Mitter, B., Yousaf, S., Pastar, M., Afzal, M., & Sessitsch, A. (2014). The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biology and fertility of soils*, 50(2), 249-262.
- Macedo-Raygoza, G. M., Valdez, B. S., Prado, F. M., Prieto, K. R., Yamaguchi, L. F., Kato, M. J., ... & Beltran-Garcia, M. J. (2019). *Enterobacter cloacae*, an endophyte that establishes a nutrient-transfer symbiosis with banana plants and protects against the black Sigatoka pathogen. *Frontiers in microbiology*, 10, 804.