

**USTREZNOST REFERENČNE KNJIŽNICE MASNIH SPEKTROV  
NAPRAVE BRUKER MALDI BIOTYPER® ZA IDENTIFIKACIJO  
NAJPOMEMBNEJŠIH ZA RASTLINE PATOGENIH BAKTERIJ**

Janja MATIČIČ<sup>1</sup>, Tanja DREO<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

**IZVLEČEK**

Namizni masni spektrometer MALDI Biotyper® sirius RUO, proizvajalca Bruker, omogoča masno spektrometrijo z ionizacijo z lasersko desorpcijo in masnim analizatorjem na čas preleta ionov. Spektre, ki jih posname po laserskem obstreljevanju ustrezno tretiranih čistih kultur bakterijskih izolatov, primerja z referenčnimi spektri v svoji knjižnici in glede na podobnost identificira bakterijske izolate. Identifikacija je mogoča le za bakterije, ki so v knjižnici zastopane, zanesljivost in taksonomski nivo identifikacije posameznih bakterij pa je odvisen od njihove raznolikosti in kakovosti referenčnih spektrov. V okviru uvedbe metode na Nacionalnem inštitut za biologijo smo v prvem koraku izvedli pregled zastopanosti karantenskih in drugih za Slovenijo pomembnih bakterijskih povzročiteljev bolezni rastlin v referenčni knjižnici našega instrumenta, MBT Compass Library Revision K (2022). Analiza rezultatov je pokazala, da referenčna knjižnica pokriva 12 od 14 preverjenih rodov in 15 od 32 vrst za rastline patogenih bakterij. Knjižnica se je izkazala za ustrezno za identifikacijo do nivoja vrst za organizme rodu *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* in *Xylella*, ter kot pogojno ustrezna za posamezne vrste rodov *Clavibacter*, *Ralstonia* in *Xanthomonas*. Na nivoju rodu lahko z obstoječo knjižnico identificiramo bakterije rodov *Agrobacterium*, *Dickeya* in *Pectobacterium*. Za identifikacijo bakterij rodu *Liberibacter* in *Xylophilus* vključena knjižnica ni primerna, saj zanje ne vsebuje spektrov. V teku je eksperimentalno preverjanje zanesljivosti identifikacije za izbrane bakterijske vrste ter dopolnjevanje knjižnice s kreiranjem lastnih knjižničnih vnosov. Tako smo po praktičnem preizkušanju do sedaj obstoječo knjižnico že dopolnili z vnosi za bakterije *Pantoea stewarti* subsp. *indologenes*, *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia pseudosolanacearum* in *Xylophilus ampelinus*.

**Gljučne besede:** Bruker MALDI Biotyper®, rastlinske patogene bakterije, referenčna knjižnica, identifikacija

**ABSTRACT**

**EVALUATING THE BRUKER MALDI BIOTYPER® FOR PLANT PATHOGENIC  
BACTERIA IDENTIFICATION: A STUDY ON ITS REFERENCE LIBRARY'S  
SUITABILITY**

<sup>1</sup> univ. dipl. biol., Večna pot 121, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: janja.maticic@nib.si

<sup>2</sup> dr. biotehn. zn., prav tam

The MALDI Biotyper® sirius RUO, a bench-top mass spectrometer from Bruker, utilizes laser desorption ionization mass spectrometry coupled with a time-of-flight ion mass analyzer. This instrument identifies bacterial isolates by comparing their mass spectra, obtained post-laser bombardment of treated pure cultures, with reference spectra in its database. The effectiveness of identification is contingent on the diversity of bacteria in the library and the accuracy of the reference spectra. In an initial phase, the National Institute of Biology assessed the comprehensiveness of the MBT Compass Library Revision K (2022) in representing quarantine and significant plant pathogenic bacterial pathogens relevant to Slovenia. Our analysis revealed that the library covers 12 of 14 genera and 15 of 32 species of the plant pathogenic bacteria examined. For species-level identification, the library adequately supports genera such as *Curtobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* and *Xylella*. For *Clavibacter*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* species-level identification is conditionally feasible, depending on specific species. At the genus level *Agrobacterium*, *Dickeya* and *Pectobacterium* are identifiable with the current library. However, spectra for *Liberibacter* and *Xylophilus* are absent, rendering the library unsuitable for their identification. Ongoing experimental validation is assessing the reliability of identifications for selected bacterial species. Concurrently, efforts are being made to augment the library with our own entries. We have already expanded the database to include *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes*, *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia pseudosolanacearum*, and *Xylophilus ampelinus*. This ongoing work underlines the library's potential and limitations in identifying plant pathogenic bacteria, providing valuable insights for its practical application and enhancement.

**Key words:** Bruker MALDI Biotyper®, plant pathogenic bacteria, reference library, identification

## 1 UVOD

V današnjem času se vse več raziskovalcev in strokovnjakov na področju rastlinskih bolezni sooča z izzivi, ki jih predstavljajo karantenski in drugi pomembni bakterijski povzročitelji bolezni rastlin. Natančna identifikacija rastlinskih patogenih bakterij ima pomembne posledice za obvladovanje bolezni rastlin in kmetijsko pridelavo. Tradicionalne metode identifikacije bakterij, ki temeljijo na gojenju bakterij v akseničnih kulturah, seroloških in biokemičnih pristopih, so pogosto omejene z vidika časa, natančnosti in stroškov.

V zadnjih letih se je identifikacija z uporabo masne spektrometrije pojavila kot močno orodje za hitro in natančno identifikacijo bakterijskih patogenov. Z namiznimi masnimi spektrometri s tehnologijo MALDI-TOF, masno spektrometrijo z ionizacijo z lasersko desorpcijo in masnim analizatorjem na čas preleta ionov, posnamemo proteinski prstni odtis (spekter) čistih kultur bakterij. S primerjavo dobljenih spektrov z referenčnimi spektri v obsežni knjižnici, lahko naprava Bruker MALDI Biotyper® hitro in natančno identificira mnoge bakterije.

Namen te študije je bil oceniti ustreznost referenčne knjižnice spektrov MBT Compass Library Revision K (2022) glede na zahtevan taksonomski nivo seznama za Slovenijo relevantnih karantenskih in nadzorovanih nekarantenskih bakterij. To pomeni ugotoviti

koliko od teh bakterij, ki povzročajo boleznirastlin, MALDI s svojo knjižnico dejansko zazna in razlikuje, oziroma ugotoviti za katere bakterije, ki povzročajo boleznirastlin, je knjižnica že ustrezna, za katere pa jo je potrebno dopolniti (npr. z lastnimi knjižničnimi vnosi).

## 2 MATERIAL IN METODE DELA

S pomočjo programa Excel smo primerjali seznam vnosov za identifikacijo mikroorganizmov referenčne knjižnice MBT Compass Library Revision K (2022) v razširjeni obliki BDAL (NCBI), ki vključuje tudi podatke o bakterijskih izolatih, ki so bili uporabljeni za oblikovanje knjižničnih spektrov, s seznamom za Slovenijo relevantnih karantenskih in nadzorovanih nekarantenskih bakterij (Izvedbena uredba komisije (EU) 2019/2072). Glede na zastopanost in število vnosov teh bakterij v knjižnici, vrste znotraj relevantnih rodov (baza LPSN; Parte *in sod.*, 2020) in poznavanje raznolikosti posameznih taksonomskih enot, smo za škodljive organizme ocenili verjetnost pravilne identifikacije do rodu, vrste in/ali drugih relevantnih taksonomskih enot. Dodatno smo za izbran škodljivi organizem, *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, upoštevali tudi filogenetsko sorodnost za nas pomembnih vrst in drugih veljavno opisanih vrst znotraj teh rodov (Parte *in sod.*, 2020). Izbrana javno dostopna zaporedja 16S rDNA bakterijskih vrst tega rodu (N = 31) smo poravnali v programu MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (verzija 11.0.13; Tamura *in sod.*, 2021) in evolucijsko zgodovino med njimi ugotavljali z uporabo metode največjega verjetja. Na Sliki 1 je prikazano drevo z največjo logaritemsko verjetnostjo (-3137,84). Začetna drevesa za hevristično iskanje so bila pridobljena samodejno z uporabo algoritmov Neighbor-Join in BioNJ na matriko parnih razdalj, ocenjenih s 3-parametrskim modelom Tamura (Tamura, 1992) in nato z izbiro topologije z najvišjo vrednostjo logaritemske verjetnosti. Za modeliranje razlik v stopnji evolucije med spletnimi mesti (5 kategorij (+G, parameter = 0,1000)) je bila uporabljena diskretna porazdelitev Gamma. Model razlik v hitrosti je omogočal, da so bila nekatera mesta evolucijsko nespremenljiva ([+I], 45,68 % mest). Drevo je narisano v merilu, dolžina vej pa je merjena s številom substitucij na mesto. Izločeni so bili vsi položaji z manj kot 95-odstotno pokritostjo mest, tj. na katerem koli položaju je bilo dovoljenih manj kot 5 % vrzeli v poravnavi, manjkajočih podatkov in dvoumnih baz (možnost delnega izbrisa). V končnem naboru podatkov je bilo skupaj 1262 položajev. Za vizualizacijo drevesa in dodatnih podatkov zastopanosti posameznih vrst v knjižnici masnih spektrov smo uporabili iTool (v6.9; Ciccarelli *in sod.*, 2006; Letunic in Bork, 2021) in Adobe Illustrator 2023 (27.9).

526

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 3.1 Seznam škodljivih organizmov

Karantenski in nadzorovani nekarantenski škodljivi organizmi, pomembni za Evropsko Unijo, so navedeni v Izvedbeni uredbi komisije (EU) 2019/2072 (v nadaljevanju Uredba). Skupno je navedenih 44 škodljivih organizmov. Navedeni so trije (3) rodovi, *Agrobacterium*, *Dickeya* in *Pectobacterium*, pri katerih se zahteve za rod nato lahko prenesejo na večje število za rastline patogenih vrst znotraj teh rodov. Skupno je v teh rodovih opisanih enainštirideset (41) vrst. Poleg njih je v Uredbi navedeno še

enaindvajset (21) posameznih vrst bakterij, pet (5) podvrst in petnajst (15) patovarjev (Preglednica 1). Patovarji so netaksonomske enote, ki se od drugih patovarjev znotraj vrste pogosto razlikujejo le v (domnevnem) krogu gostiteljev. Pet (5) navedenih vrst ima status '*Candidatus*', ki se uporablja za dobro opredeljene organizme, ki pa jih še ne zmoremo gojiti; gre za fitopatogene bakterije, ki povzročajo bolezní agrumov, korenja, krompirja in jagod. V Uredbi so škodljivi organizmi navedeni v posameznih prilogah in njihovih razdelkih, ki dodatno opredeljujejo njihov status in v nekaterih primerih navajajo specifične pogoje v katerih je dotični škodljivi organizem nadzorovan in posebne zahteve zanj. V nadaljevanju so relevantne oznake prilog in njihovih razdelkov navedene v oklepaju ob posameznem škodljivem organizmu.

### 3.2 Zastopanost spektrov za Slovenijo relevantnih bakterij v referenčni bazi

V knjižnici MBT Compass Library Revision K (2022) je več kot 11800 spektrov posameznih izolatov, ki predstavljajo več kot 700 rodov in 4200 vrst bakterij. Velika večina teh vnosov se nanaša na bakterije, ki ne povzročajo bolezní rastlin, še posebej na klinično pomembne bakterije in bakterije, ki se pogosto pojavljajo kot kontaminante v različnih industrijskih okoljih. Rodovi v katerih so tudi nadzorovani povzročitelji bolezní rastlin so v knjižnici zastopani s 485 vnosi, kar je manj kot 4 % vseh vnosov. Tudi znotraj teh rodov se le manjši delež vnosov nanaša na vrste, ki povzročajo bolezní rastlin in so nadzorovane (65/585, 11 %; Preglednica 1).

527

Najbolje zastopani so rodovi, ki vključujejo večje število vrst in/ali se pojavljajo tudi v okolju ali so pomembni v industriji npr. *Pseudomonas* (187 vnosov), *Erwinia* (46 vnosov) in *Xanthomonas* (36 vnosov). Rodovi bakterijskih povzročiteljev bolezní rastlin, ki jih ni mogoče gojiti v aksenični kulturi, pričakovano niso zastopani v knjižnici spektrov. Med njimi so vrste rodu '*Candidatus Liberibacter*', ki vključuje za Slovenijo neposredno manj pomembne povzročitelje bolezní huanglongbing na agrumih ('*C. L. africanus*' (II-A), '*C. L. americanus*' (II-A) in '*C. L. asiaticus*' (II-A)) ter '*C. L. solanacearum*', ki okužuje korenje in krompir. V knjižnici spektrov ravno tako nista zastopana rodova *Spiroplasma* in *Xylophilus*, ki vključujeta škodljivi vrsti *Spiroplasma citri* (IV-D, IV-J, V-C), povzročitelja bolezní agrumov in *Xylophilus ampelinus* (IV-C), povzročitelja bakterijskega ožiga vinske trte.

Ob pregledu smo opazili, da se nekatera imena škodljivih organizmov v Uredbi razlikujejo od priporočenih imen, ki sledijo taksonomskim spremembam; kjer so različna, so priporočena imena v Preglednici 1 navedena v oklepaju. Za rod *Pseudomonas* so spektri v knjižnici poimenovani po podvrstah, ki ne ustrezajo nujno patovarjem, ki jih navaja Uredba. V knjižnici spektrov je vnešen spekter izolata *R. pseudosolanacearum* iz vrtnice (*Rosa* sp.), izoliran na Niozemskem, kot *Ralstonia* sp. Glede na zastopanost v knjižnici MBT lahko identifikacijo na nivoju kot je naveden v Uredbi, pričakujemo za 9/44 (20 %) škodljivih organizmov in sicer za rod *Agrobacterium*, rod *Dickeya*, vrsto *Erwinia amylovora*, rod *Pectobacterium*, vrste *Pseudomonas avellanae*, *P. viridiflava*, *Rhodococcus fascians*, *Ralstonia pseudosolanacearum* in *Xylella fastidiosa*. Pri tem velja omeniti, da je pri bakterijah, ki so v Uredbi navedene kot rodovi, pogosto pomembno razlikovanje vrst, kar pomeni,

da je tudi za te rodove uporabnost knjižnice v tem hipu vprašljiva. Za te in tudi vse preostale v Uredbi navedene škodljive organizme, ki so zastopani v knjižnici, lahko pričakujemo identifikacijo le na nivoju rodu (Preglednica 1), čeprav so v Uredbi navedeni kot vrste, podvrste ali patovarji. Za te škodljive organizme je metoda MALDI-TOF v tej fazi primerna in uporabna kot presejalni test, hitri test s katerim lahko na cenovno ugoden način analiziramo in za nadaljnje analize izberemo izolate oz. kolonije zrasle iz vzorcev na neselektivnih gojiščih.

Preglednica 1: Zastopanost za Slovenijo relevantnih nadzorovanih škodljivih bakterijskih povzročiteljev boleznih rastlin v knjižnici masnih spektrov proizvajalca Bruker (MBT Compass Library Revision K (2022)). Rodovi, ki v knjižnici niso zastopani, niso prikazani (glej besedilo). V krepkem tisku so prikazani rodovi in vrste za katere lahko pričakujemo identifikacijo z obstoječo knjižnico.

528

Škodljivi organizem (kategorizacija)	Število spektrov			
	Rod	Vrsta	Podvrsta	Patovar
<b>Agrobacterium (IV-J)</b>	<b>19</b>	-	-	-
<i>A. tumefaciens</i> (IV-J)	0	0	-	-
<i>C. insidiosus</i> (IV-A, V-A)	1	0	-	-
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (IV-F, IV-I, V-E, V-H)	1	1	0	-
<i>C. sepedonicus</i> (II-B, VIII)	1	0	-	-
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> (II-A)	4	4	-	1
<b>Dickeya (IV-G, V-F)</b>	<b>6</b>	-	-	-
<i>E. amylovora</i> (III, IV-D, IV-J, V-C, IX-R)	<b>46</b>	<b>5</b>	-	-
<i>P. stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> (II-A)	35	2	2	-
<b>Pectobacterium (IV-G, V-F)</b>	<b>14</b>	-	-	-
<i>P. avellanae</i> (IV-J)	<b>1</b>	<b>1</b>	-	<b>0</b>
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (IV-J)	2	2	2	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> (IV-D, IV-M)	2	2	0	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> (IV-J)	2	2	0	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>persicae</i> (IV-D, IV-J, V-C)	2	2	0	-
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (IV-J)	2	2	2	-
<b>P. viridiflava (IV-J)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	-	-
<b>R. fuscans (IV-J)</b>	<b>96</b>	<b>6</b>	-	-
<b>R. pseudosolanacearum (II-A, VIII)</b>	<b>26</b>	<b>1</b>	-	-
<i>R. syzygii</i> subsp. <i>celebesensis</i> (II-A, VIII)	26	1	0	-
<i>R. syzygii</i> subsp. <i>indonesiensis</i> (II-A, VIII)	26	1	0	-
<i>R. solanacearum</i> (II-A, VIII)	26	0	-	-
<i>X. arboricola</i> pv. <i>corylina</i> (IV-J)	36	2	-	0
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> (IV-J)	36	2	-	0
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> (IV-J)	36	2	-	0
<i>X. campestris</i> pv. <i>fici</i> (IV-J)	36	9	-	0
<i>X. citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> (II-A)	36	2	-	0
<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> (II-A)	36	2	-	0
<i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> ( <i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i> ) (IV-F, V-E)	36	2	-	0
<i>X. euvesicatoria</i> ( <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>euvesicatoria</i> ) (IV-D, IV-F, IV-I, V-C, V-E, V-H)	36	0	-	0
<i>X. perforans</i> ( <i>X. euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> ) (IV-D, IV-F, IV-I, V-C, V-E, V-H)	36	0	-	0
<i>X. fragariae</i> (IV-J)	36	0	-	-
<i>X. gardneri</i> ( <i>X. hortorum</i> pv. <i>gardneri</i> ) (IV-D, IV-F, IV-I, V-C, V-E, V-H)	36	3	-	0
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> (II-A)	36	0	-	0
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> (II-A)	36	0	-	0
<i>X. phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i> (as <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> ) (IV-F, V-E)	36	2	-	0
<i>X. vesicatoria</i> (IV-D, IV-F, IV-I, V-C, V-E, V-H)	36	0	-	-
<b>X. fastidiosa (II-A)</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	-

### 3.3 Poglobljena ocena zanesljivosti identifikacije za vrsto *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*

Za oceno zanesljivosti identifikacije moramo poleg zastopanosti izbranega tarčnega organizma v knjižnici upoštevati tudi njegovo raznolikost, raznolikost vrste in rodu v katera spada, ter verjetnost pojavljanja njemu podobnih organizmov v vzorcih, ki jih analiziramo. Kot primer poglobljene analize smo uporabili karantensko bakterijo *P. stewartii* subsp. *stewartii*. Število opisanih vrst in podvrst znotraj posameznega rodu, ki vsaj deloma odraža raznolikost rodu, smo določili z analizo baze LPSN (Parte *in sod.*, 2020), pri čemer smo upoštevali le tiste vrste in podvrste, ki so veljavno objavljene (nomenklaturni status) in imajo taksonomsko pravilno ime. Skupno je takšnih vrst in podvrst trideset (30). Pri tem velja omeniti, da so vse baze in knjižnice pričakovano v zaostanku s posodabljanjem opisanih vrst in da mnogi zgoraj navedeni rodovi vključujejo vrste, ki so škodljive za rastline in niso navedene v Prilogah ter tudi druge, za rastline neškodljive vrste, ki pa so kljub temu lahko prisotne v vzorcih, ki jih analiziramo.

Podatke o zastopanosti posameznih vrst rodu *Pantoea* v knjižnici MBT masnih spektrov smo povezali s podatki o njihovi filogenetski sorodnosti (Slika 1). Od tridesetih (30) veljavno opisanih in pravilno poimenovanih vrst in dveh (2) podvrst znotraj rodu, jih je devet (9; 30 %) zastopanih v knjižnici, vsaka z od 1 do 10 izolati (skupno 33 spektrov).

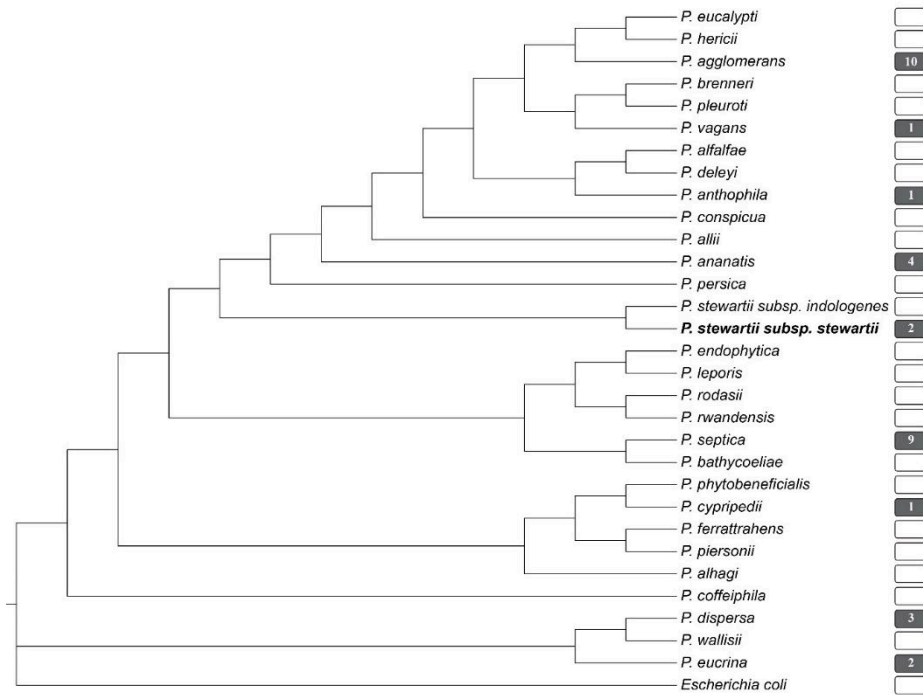
Za nas najbolj relevantna podvrsta *P. stewartii* subsp. *stewartii* je filogenetsko najbližja podvrsti *indologenes*, ki pa v knjižnici ni zastopana. Pričakujemo lahko, da knjižnica razlikovanja na nivoju podvrste ne omogoča. To pomeni, da bi za morebitno natančnejše razlikovanje morali sami eksperimentalno oblikovati knjižnične vnose obeh podvrst in identificirati potencialne razlike v masnih spektrih, če le-te obstajajo.

### 3.4 Oblikovanje dodatnih referenčnih masnih spektrov

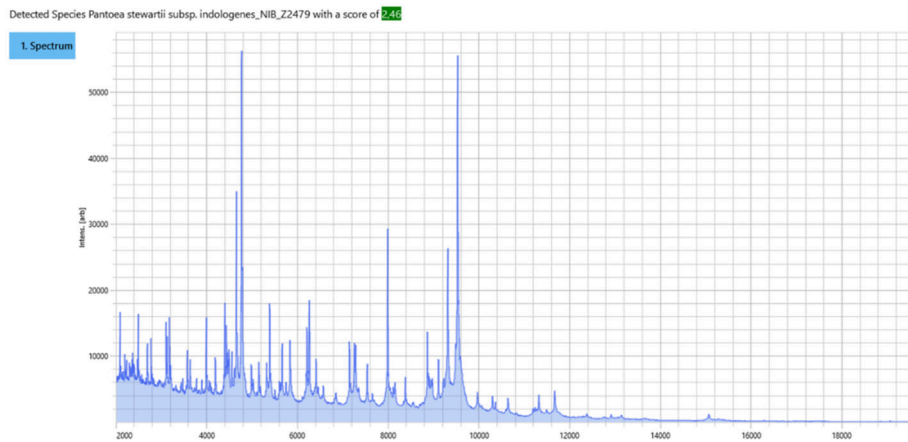
Sistem MALDI-TOF omogoča tudi kreiranje lastnih knjižnic uporabnika. Oblikovanje lastnih knjižničnih vnosov masnih spektrov bo potrebno za večino škodljivih bakterij navedenih v Uredbi, saj so trenutno bodisi slabo zastopane, bodisi niso zastopane na ustreznem nivoju; posebej problematični so škodljivi organizmi za katere bi identifikacijo želeli na nivoju podvrst in patovarjev.

V okviru te študije smo eksperimentalno oblikovali lastni knjižnični vnos za podvrsto *P. stewartii* subsp. *indologenes*. Spektar (Slika 2), ki smo ga dobili z večkratnim snemanjem spektra kontrolnega izolata bakterije (CFBP 3614), je osnova za generiranje lastnega knjižničnega vnosa s katerim smo dopolnili komercialno knjižnico MBT Compass Library Revision K (2022). V nadaljevanju bomo zanesljivost identifikacije podvrste *stewartii* in posebej njeno razlikovanje od podvrste *indologenes* in drugih vrst rodu *Pantoea* preverili z eksperimentalnimi analizami večjega števila izolatov.

530



Slika 1: Vizualni prikaz evolijski povezav med vrstami *Pantoea* in njihove zastopanosti v knjižnici masnih spektrov (v kvadratih je prikazano število posameznih izolatov; prazni kvadrati označujejo vrste, ki v knjižnici spektrov niso zastopane).



Slika 2: Posnetek spektra za identifikacijo bakterije *P. stewartii* subsp. *indologenes*.

#### 4 SKLEPI

Knjižnica masnih spektrov bakterij MBT Compass Library Revision K (2022) vključuje več kot 11800 spektrov. Za rastline patogene bakterije so v njej slabše zastopane saj vnosi za škodljive organizme, ki so v Evropski Uniji nadzorovani (so navedeni v Uredbi 2019/2072), predstavljajo manj kot 1 % knjižničnih vnosov. Glede na zastopanost v knjižnici MBT lahko identifikacijo na nivoju kot je naveden v Uredbi, pričakujemo za vrste *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas avellanae*, *P. viridiflava*, *Rhodococcus fascians*, *Ralstonia pseudosolanacearum* in *Xylella fastidiosa*. Za ostale bakterijske povzročitelje bolezni rastlin je metoda identifikacije z masno spektrometrijo (MALDI-TOF) trenutno uporabna predvsem kot presejalni test, za izbor kolonij za nadaljnjo identifikacijo. Za večjo uporabnost v smislu identifikacije rastlinskih patogenih bakterij je potrebno knjižnične vnose MBT dopolniti z lastnimi knjižničnimi spektri. Za izbor izolatov, ki jih je smiselno vključiti v validacijo oblikovanega lastnega spektra, je uporaben pristop s filogenetsko analizo opisanih vrst znotraj relevantnih rodov, kot smo ga oblikovali v tej študiji.

Knjižnico bomo skozi delo še naprej dopolnjevali tudi z drugim lastnimi vnosi za kar so izrednega pomena tako referenčni izolati posameznih vrst, kot tudi hišna delovna zbirka bakterij v kateri so zastopani izolati teh vrst, ki smo jih izolirali pri nas.

V prihodnosti bomo v okviru sodelovanja v projektu Euphresco 2023-A-459 nadaljevali z nadgrajevanjem knjižnice z novimi lastnimi vnosi ter preverili uporabnost izmenjave lastnih knjižničnih vnosov med laboratoriji. Izmenjava takšnih vnosov bi pospešila ustvarjanje večje in tudi bolj raznolike baze podatkov, ter s tem pričakovano povečano uporabnost le-te za delo na področju za rastline patogenih bakterij.

#### 5 ZAHVALA

Predstavljeni rezultati so bili pridobljeni v okviru raziskovalnega programa Biotehnologija in sistemska biologija rastlin (št. P4-0165), ki ga sofinancira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARIS) iz državnega proračuna, aktivnosti Strokovne naloge s področja varstva rastlin ki jo financira Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP) iz državnega proračuna ter aktivnosti v okviru Strokovnega svetovanja in ukrepanja v primeru napada z orožji ali sredstvi za množično uničevanje ter s klasičnimi terorističnimi sredstvi, ki ga financira Ministrstvo za obrambo Republike Slovenije. Zahvaljujemo se tudi Matildi Ivović (BioSpectra), za podporo in koristne diskusije tekom uvajanja metodologije MALDI-TOF. Prispevek je bil na konferenci predstavljen v obliki postra, ki je dostopen na spletnem repozitoriju Zenodo.

#### 6 LITERATURA

- Bruker MALDI Biotyper (MBT) Compass Library Revision K (2022).
- Ciccarelli, F.D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C.J., Snel, B., Bork, P., 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* 311, 1283–1287. <https://doi.org/10.1126/science.1123061>.
- Izvedbena uredba Komisije (EU) 2019/2072 z dne 28. novembra 2019 o določitvi enotnih pogojev za izvajanje Uredbe (EU) 2016/2031 Evropskega parlamenta in Sveta, kar zadeva ukrepe varstva pred škodljivimi organizmi rastlin, ter razveljavitvi Uredbe Komisije (ES) št. 690/2008 in spremembi Izvedbene uredbe Komisije (EU) 2018/2019, OJ L 319, 10.12.2019, str. 1–279 (s spremembami), [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2019/2072/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2019/2072/oj).

- Letunic, I. in Bork, P., 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research* 49, W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>.
- Matičič, J. in Dreo, T. Ustreznost referenčne knjižnice masnih spektrov naprave Bruker MALDI Biotyper® za identifikacijo najpomembnejših za rastline patogenih bakterij (Verzija 1). 16. Slovensko posvetovanje o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo v letu 2024 (16. SPVR), Bohinjska Bistrica. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10776212>.
- Parte, A.C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C., Göker, M., 2020. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70, 5607–5612. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10, 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* 38, 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.