



Janja MATIČIČ^{1#}, Tanja DREO²

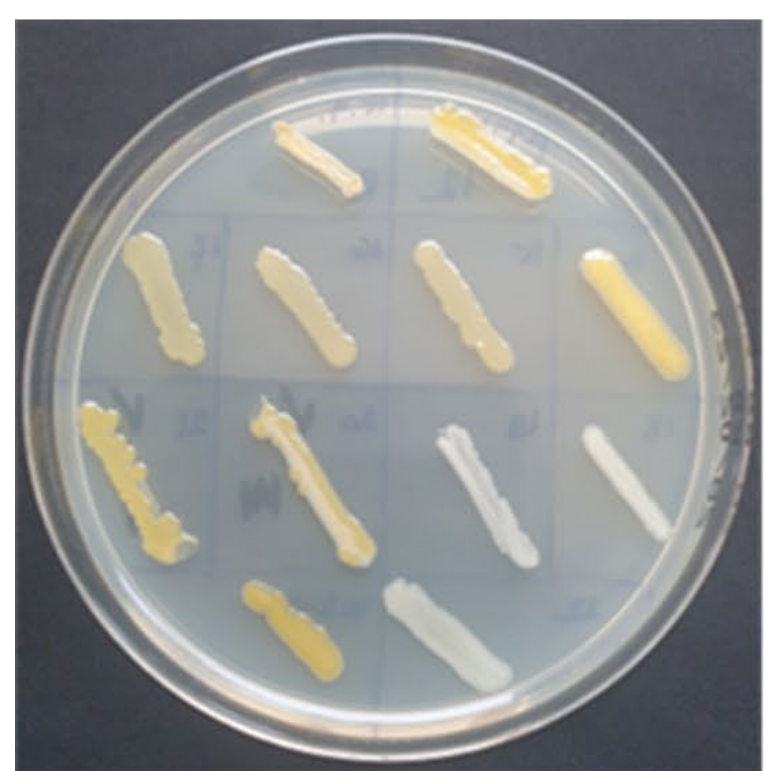
¹⁻²Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 121, SI-1000 Ljubljana (#janja.maticic@nib.si)

Uvod

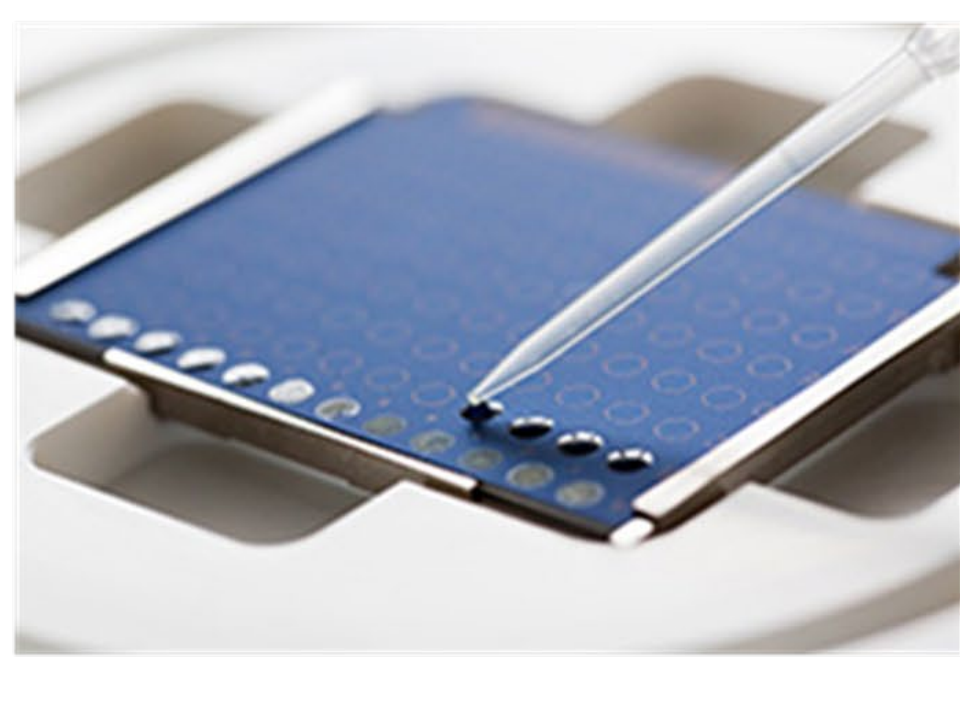
V današnjem času se vse več raziskovalcev in strokovnjakov na področju rastlinskih bolezni sooča z izzivi, ki jih predstavljajo karantenski in drugi pomembni bakterijski povzročitelji bolezni rastlin. Natančna identifikacija rastlinskih patogenih bakterij ima pomembne posledice za obvladovanje bolezni rastlin in kmetijsko pridelavo. V zadnjih letih se je identifikacija z uporabo masne spektrometrije, pojavila kot močno orodje za hitro in natančno identifikacijo bakterijskih patogenov. 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 čistih kultur bakterijskih izolatov, ki jih posname, primerja z referenčnimi spektri v svoji knjižnici in jih glede na podobnost identificira. V okviru uvedbe metode na Nacionalnem inštitut za biologijo je bil namen te študije ugotoviti koliko od bakterij glede na zahtevan taksonomski nivo seznama za Slovenijo relevantnih karantenskih in nadzorovanih nekarantenskih bakterij, ki povzročajo bolezni rastlin, MALDI s svojo knjižnico dejansko zazna in razlikuje, oziroma ugotoviti za katere od teh bakterij je knjižnica že ustrezna, za katere pa jo je potrebno dopolniti (npr. z lastnimi knjižničnimi vnosi).

Materiali in metode

S pomočjo programa Excel smo primerjali seznam vnosov za identifikacijo mikroorganizmov referenčne knjižnice [1] (knjižnice MBT) s seznamom za Slovenijo relevantnih karantenskih in nadzorovanih nekarantenskih bakterij [2]. Glede na zastopanost teh bakterij v knjižnici, opisane vrste znotraj relevantnih rodov (baza LPSN; [3]) in poznavanje raznolikosti posameznih taksonomskih enot, smo za izbrane skupine ocenili verjetnost pravilne identifikacije do rodu, vrste in/ali drugih relevantnih taksonomskih enot.



izolat



prenos vzorca na tarčno ploščico in prekrivanje z matriksom



vstavitve ploščice v sistem



priprava in zagon procesa identifikacije

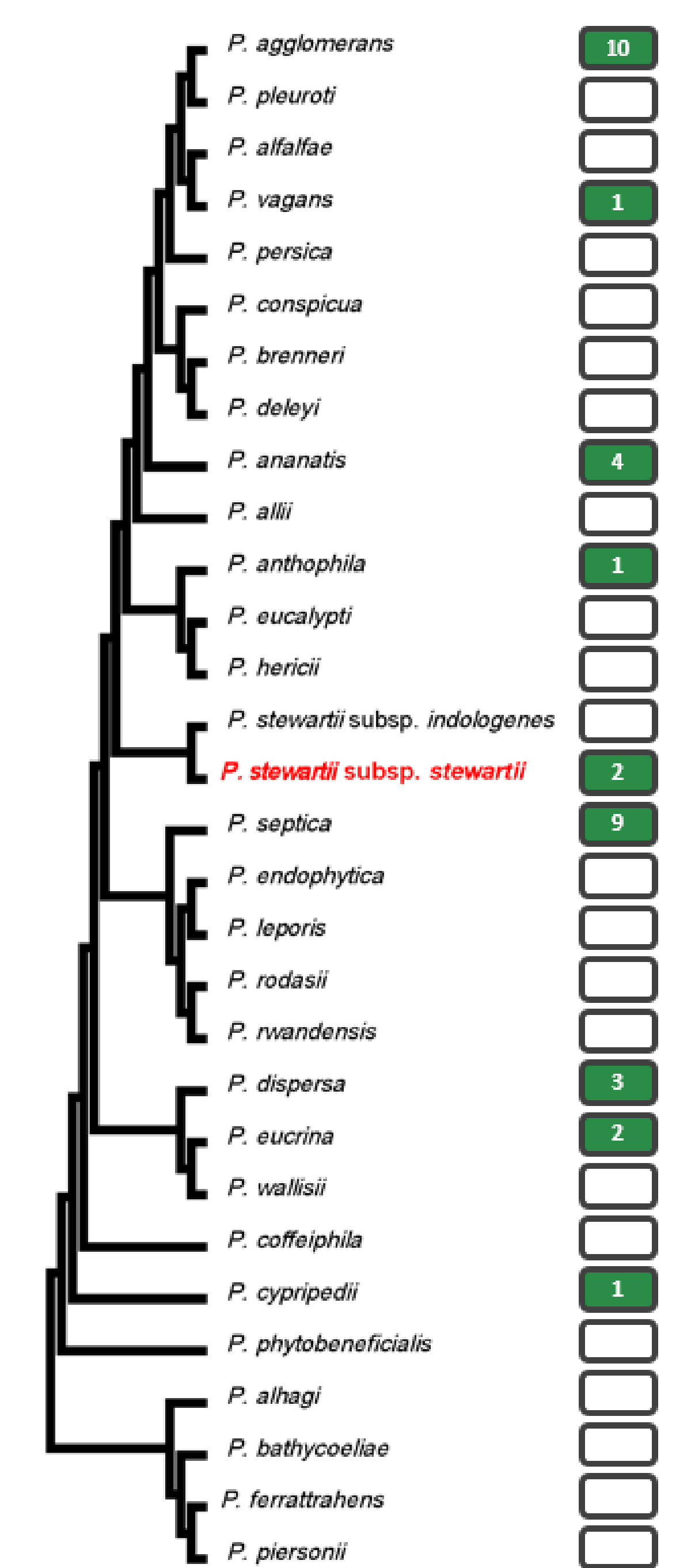
Slika 1: Shema postopka identifikacije vzorca. (Slike: Arhiv NIB; Bruker.com).

REZULTATI

Preglednica 1: Za Slovenijo relevantne za rastline škodljive bakterije in njihova zastopanost v knjižnici masnih spektrov [1]. Rodovi, ki v knjižnici niso zastopani, niso prikazani. Zastopanost spektra posameznega škodljivega organizma v knjižnici še ne zagotavlja njegove pravilne identifikacije.

Škodljivi organizem (kategorizacija)*	Število spektrov posameznih izolatov			
	Rod	Vrsta	Podvrsta	Patovar
Agrobacterium				
Agrobacterium (IV-J)	19	-	-	-
A. tumefaciens (IV-J)	19	0	-	-
Clavibacter				
C. insidiosus (IV-A, V-A)	1	0	-	-
C. michiganensis subsp. michiganensis (IV-F, IV-I, V-E, V-H)	1	1	0	-
C. sepedonicus (II-B, VIII)	1	0	-	-
Curtobacterium				
C. flaccumfaciens pv. flaccumfaciens (II-A)	12	4	-	1
Dickeya				
Dickeya (IV-G, V-F)	6	-	-	-
Erwinia				
E. amylovora (III, IV-D, IV-J, V-C, IX-R)	46	5	-	-
Pectobacterium				
Pectobacterium (IV-G, V-F)	14	-	-	-
Pantoea				
P. stewartii subsp. stewartii (II-A)	35	2	2	-
Pseudomonas**				
P. avellanae (IV-J)	187	1	-	-
P. savastanoi pv. savastanoi (IV-J)	187	2	-	-
P. syringae pv. actinidiae (IV-D, IV-M)	187	2	0	-
P. syringae pv. morsprunorum (IV-J)	187	2	0	-
P. syringae pv. persicae (IV-D, IV-J, V-C)	187	2	0	-
P. syringae pv. syringae (IV-J)	187	2	2	-
P. viridiflava (IV-J)	187	1	-	-
Rhodococcus				
R. fascians (IV-J)	96	6	-	-
Ralstonia				
R. pseudosolanacearum (II-A, VIII)	26	1***	-	-
R. syzygii subsp. celebensis (II-A, VIII)	26	1	0	-
R. syzygii subsp. indonesiensis (II-A, VIII)	26	1	0	-
R. solanacearum (II-A, VIII)	26	0	-	-
Xanthomonas				
X. arboricola pv. corylina (IV-J)	36	2	-	0
X. arboricola pv. juglandis (IV-J)	36	2	-	0
X. arboricola pv. pruni (IV-J)	36	2	-	0
X. campestris pv. fici (IV-J)	36	9	-	0
X. citri pv. aurantifolii (II-A)	36	2	-	0
X. citri pv. citri (II-A)	36	2	-	0
X. fuscans subsp. fuscans (X. citri pv. fuscans) (IV-F, V-E)	36	2	-	0
X. euvesicatoria (X. e. pv. euvesicatoria) (IV-D, IV-F, IV-I, V-C, V-E, V-H)	36	0	-	0
X. perforans (X. euvesicatoria pv. perforans) (IV-D, IV-F, IV-I, V-C, V-E, V-H)	36	0	-	0
X. fragariae (IV-J)	36	0	-	0
X. gardneri (X. hortorum pv. gardneri) (IV-D, IV-F, IV-I, V-C, V-E, V-H)	36	3	-	0
X. oryzae pv. oryzae (II-A)	36	0	-	0
X. oryzae pv. oryzaicola (II-A)	36	0	-	0
X. phaseoli pv. phaseoli (X. axonopodis pv. phaseoli) (IV-F, V-E)	36	2	-	0
X. vesicatoria (IV-D, IV-F, IV-I, V-C, V-E, V-H)	36	0	-	-
Xylella				
X. fastidiosa (II-A)	7	6	0	-

*Navedeni so rod, ime škodljivega organizma in njegova kategorizacija v Izvedbeni uredbi Komisije (EU) 2019/2072 ter v oklepaju priporočena imena (EPPO Global Database), kadar se ta razlikujejo od imen uporabljenih v Uredbi; **Za rod Pseudomonas so spektri v knjižnici poimenovani po podvrstah, ki ne ustrezajo nujno patovarjem; ***V knjižnici spektrov je vnesen spekter izolata R. pseudosolanacearum iz vrtnice (Rosa sp.), izoliran na Nizozemskem (kot Ralstonia sp.).



Slika 2: Filogenetsko drevo (16S rDNA), ki prikazuje sorodnost vrst znotraj rodu Pantoea ter njihovo zastopanost v knjižnici MBT [1]. Zelen okvirček označuje zastopanost vrste, številka pomeni število posameznih izolatov. V rdečem tisku je prikazan podvrsta, ki ima v EU karantenski status.

- ✓ Zakonodaja [2] navaja **44 karantenskih in nadzorovanih nekarantenskih za rastline škodljivih bakterij** (3 rodove, 21 vrst, 5 podvrst in 15 patovarjev).
- ✓ V knjižnici MBT so **za rastline patogene bakterije slabše zastopane**.
- ✓ Rodovi bakterij '*Candidatus Liberibacter*', *Spiroplasma* in *Xylophilus* v knjižnici MBT niso zastopani.
- ✓ za organizme kot so navedeni v zakonodaji **glede na zastopanost v knjižnici MBT pričakujemo identifikacijo za 9/44 (20 %) vnosov** (Preglednica 1).
- ✓ Preostale škodljive organizme, zastopane v knjižnici MBT, lahko pričakovano identificiramo do rodu. Zanje je **metoda MALDI-TOF** primerna kot presejalni test, **hiter in cenovno ugoden način analize in izbora izolatov za nadaljnje analize izolatov oz. kolonij zraslih iz vzorcev na neselektivnih gojiščih**.
- ✓ Poleg zastopanosti izbranega tarčnega organizma v knjižnici MBT moramo upoštevati tudi njegovo raznolikost, raznolikost vrste in rodu v katerega spada ter verjetnost pojavljanja njemu podobnih organizmov v vzorcih, ki jih analiziramo (Slika 2).
- ✓ **Za večjo uporabnost v smislu identifikacije rastlinskih patogenih bakterij je knjižnico MBT potrebno dopolniti z lastnimi knjižničnimi masnimi spektri**. Za to so nujne naše **delovne zbirke bakterij**.
- ✓ V prihodnosti bomo nadaljevali z nadgradnjo knjižničnih vnosov z lastnimi vnosi in **izmenjavo takšnih vnosov** z drugimi laboratoriji tudi v okviru projekta Euphresco 2023-A-459.

Viri

[1] Bruker MALDI Biotyper (MBT) Compass Library Revision K (2022); [2] 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 razveljaviti Uredbo Komisije (ES) št. 690/2008 in spremembi Izvedbene uredbe Komisije (EU) 2018/2019 (s spremembami), UL L 319, 10.12.2019, str. 1-279, http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2019/2072/oj; [3] Parte in sod. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 70, 5607-5612. <https://doi.org/10.1099/jsem.0.004332>.

Zahvala

Predstavljeni rezultati so bili delno pridobljeni v okviru raziskovalnega programa Biotehnologija in sistemsko 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 uničenje ter s klasičnimi terorističnimi sredstvi, ki ga financira Ministrstvo za obrambo Republike Slovenije. Zahvaljujemo se tudi Matildi Ivović, podjetje BioSpectra, za podporo in koristne diskusije tekom uvajanja metodologije MALDI-TOF.