

Institut für Garten-, Obst- und Weinbau (IGOW)
Universität für Bodenkultur
Peter Jordan Straße 82
A-1190 Wien

**Untersuchungen zur Verbesserung des Nachweises von
Clavibacter michiganensis ssp. *michiganensis* an Tomaten-
Jungpflanzen**

Masterarbeit

durchgeführt an der
Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH

eingereicht von

Ljubica PETRINA, Bakk. techn.

Betreuer: **Univ.-Doz. Dr. Gerhard BEDLAN**

Wien, Jänner 2011

Danksagung

Die vorliegende Masterarbeit entstand unter Anleitung von Herrn Univ.-Doz. Dr. Gerhard Bedlan an der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES), Institut für Pflanzengesundheit, in Wien. Ich möchte ihm für die fachliche Betreuung und die Möglichkeit, meine Arbeit an internationalen Tagungen zu präsentieren, danken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pflanzengesundheit, Frau Mag. Astrid Plenk, Frau Mag. Helga Reisenzein, Frau Dr. Sabine Grausgruber-Gröger, Herrn Dr. Richard Gottsberger und Herrn Ing. Martin Plank, ebenso bei den Mitarbeitern der Forschungsstation der AGES für die Betreuung der Versuche.

Dipl.-Ing. Andreas Ziegler und Ing. Erich Göttfried (beide Austroaat AG) gilt mein Dank für die Hilfe bei Fragestellungen zu Tomatensaatgut.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern Ruža und Ljubo, die mein Studium erst ermöglicht haben, mich alle die Jahre hinweg tatkräftig unterstützt haben und meinen Plänen und Wünschen gegenüber immer offen waren, meiner Schwester Višnja, die mich inspirierte und bei Problemen immer zur Seite stand.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Freunden Senada, Katharina, Agata und Dora für gemeinsames Lernen, für die spannende und entspannende Zeit.

Meinem Freund Miloš danke ich für Ausdauer und Geduld.

*„Es ist nicht genug zu wissen, man muss es auch anwenden;
es ist nicht genug zu wollen, man muss es auch tun.“
(Johann Wolfgang v. Goethe)*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung.....	5
2	Wirt – Parasit - System	7
2.1	Die Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	7
2.1.1	Systematik.....	7
2.1.2	Geschichte und Anbau	7
2.1.3	Botanische Grundlagen	8
2.2	Das Pathogen	9
2.2.1	Systematik	9
2.2.2	Synonyme.....	9
2.2.3	Morphologie.....	10
2.2.4	Infektionsmöglichkeiten.....	11
2.2.5	Ausbreitung im Wirt	11
2.2.6	Resistenz	12
2.2.7	Wirtspflanzen	12
2.2.8	Geografische Verbreitung	13
2.2.9	Übertragung	13
2.2.10	Überdauerung.....	13
2.2.11	Symptome	14
2.2.12	Symptombilder:.....	15
3	Material und Methoden.....	17
3.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
3.2	Enzyme, Kits, Medien und Puffer	18
3.2.1	Enzyme und Kits	18
3.2.2	Nährmedien und Nährlösungen.....	18
3.2.3	Puffer.....	19
3.3	Anzucht der Jungpflanzen für die künstliche Inokulation.....	21
3.4	<i>Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis</i>	22
3.4.1	Stamm und Herkunft.....	22
3.4.2	Ermittlung der Wachstumsrate / Wachstumskurve.....	22
3.4.3	Bestimmung der Keimzahl.....	23
3.4.4	Herstellung der Inokulations-Suspension	24
3.4.5	Inokulation der Pflanzen	25
3.4.6	Das ELISA- Test Verfahren.....	27

3.5	Molekularbiologische Methode.....	29
3.5.1	DNA- Extraktion.....	30
3.5.2	PCR.....	30
3.5.3	Auswertung.....	31
4	Ergebnisse.....	32
4.1	Allgemeines.....	32
4.2	Ergebnisse der ELISA-Tests.....	32
4.3	Ergebnisse der PCR-Untersuchungen.....	44
5	Diskussion.....	45
6	Zusammenfassung.....	48
7	Literaturverzeichnis.....	49
8	Abkürzungsverzeichnis.....	53

1 Einleitung und Problemstellung

In wärmeren und trockeneren Tomatenanbaugebieten sowie in Gewächshäusern sind an Tomaten bakterielle Erkrankungen von großer Bedeutung, so zum Beispiel die Bakterienfruchtflückenkrankheit (*Xanthomonas vesicatoria*), die Tüpfelschwärze (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), die Stängelmarkbräune (*Pseudomonas corrugata*) und die Bakterienwelke, deren Krankheitsursache das Bakterium *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (Smith) Davies et al. ist. Gerade die Bakterienwelke der Tomaten führt weltweit zu erheblichen Ertragsverlusten. Da eine direkte Bekämpfung der Krankheit bisher nicht möglich ist und auch keine resistenten Tomatensorten verfügbar sind, gelten in der EU und in vielen anderen Staaten Quarantänebestimmungen, die eine Ausbreitung beziehungsweise Verschleppung der Erkrankung verhindern sollen. Die gesetzliche Regelung in Österreich bezüglich *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* ist im Anhang II A II (b) 2. des Pflanzenschutzgesetzes 1995, BGBl. Nr. 532/1995, zuletzt geändert durch BGBl. I Nr. 87/2005, geregelt. Dieser listet alle Schadorganismen auf, deren Einschleppung und Ausbreitung bei Befall bestimmter Pflanzen in die EU bzw. in den Mitgliedstaaten verboten ist. Diese Bakteriose unterliegt daher der Meldepflicht gemäß § 40 Pflanzenschutzgesetz 1995 und ist bei Auftreten, bestätigt durch einen Laborbefund, dem Amtlichen Pflanzenschutzdienst des betreffenden Bundeslandes zu melden, welcher dann die erforderlichen Maßnahmen zur Tilgung, oder, falls dies nicht möglich ist, zur Eindämmung der Krankheit anordnet.

Nachweise erfolgen nach EPPO-Standard PM 7/42(1), vor allem an Saatgut und adulten Pflanzen. In diesem EPPO-Standard ist jedoch vermerkt, dass ein Nachweis an jungen Pflanzen nicht immer gelingt, da das Pathogen je nach Kulturbedingungen während der Jungpflanzenanzucht in verschiedenen Pflanzenteilen lokalisiert sein kann. Daher wird ein möglicher positiver Nachweis stark von den Probennahmen beeinflusst. Für kommerzielle ELISA-Kits liegt die Nachweisgrenze für *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* derzeit bei 8×10^4 cfu.

Die Nachweise in dieser Arbeit erfolgten neben ELISA- Tests auch mittels PCR direkt aus den Pflanzen. Bei dieser Methode ist die Nachweisgrenze deutlich niedriger als im Vergleich zum ELISA (8×10^4 cfu/ml) Die PCR-Untersuchungen erfolgten jedoch hauptsächlich zur Überprüfung der ELISA- Tests.

Um die Verbreitung des Pathogens zu verhindern, beziehungsweise einzudämmen, ist es von großer Bedeutung bereits die Tomaten-Jungpflanzen knapp vor ihrer Auslieferung von Jungpflanzenbetrieben an die Erwerbsbetriebe auf Befall zu testen. Dies bedingt eine Testung in einem sehr schmalen Zeitfenster - optimale Pflanzenentwicklung zum Auslieferungszeitpunkt und kurze Untersuchungszeiten. Zeitaufwendige Isolationsverfahren liefern zwar genaue Ergebnisse, sind aber wegen ihrer längeren Untersuchungsdauer nicht praxistauglich.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein einfaches, rasches und kostengünstiges Nachweisverfahren für *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* an Tomaten-Jungpflanzen auf bestehenden Verfahren zu entwickeln.

2 Wirt – Parasit - System

2.1 Die Tomate (*Solanum lycopersicum*)

2.1.1 Systematik

Ordnung:	<i>Solanales</i> (Nachtschattenartige)
Familie:	<i>Solanaceae</i> (Nachtschattengewächse)
Gattung:	<i>Solanum</i> (Nachtschatten)
Art:	<i>Solanum lycopersicum</i> (syn. <i>Lycopersicon esculentum</i>)

(FISCHER et al., 2008)

2.1.2 Geschichte und Anbau

Die Tomate stammt aus Südamerika, Mexico und dem Gebiet der peruanischen Anden. In den peruanischen Anden bzw. Peru, Ecuador und Bolivien kommen auch viele Wildarten vor (LEHMANN 1953). Die Kulturform entwickelte sich vermutlich im Raum zwischen Peru und Ecuador. Neben diesem wird aber auch Mexico als Ursprungsgebiet der Tomate angesehen (TIWARI UND CHOUDHURI 1986). Nach der Entdeckung Amerikas kam die Tomate relativ rasch, bereits 1498 durch Christoph Kolumbus, nach Europa. Bekannt ist, dass sie in Spanien bereits im 16. Jahrhundert als Salat verzehrt wurde. Im übrigen Europa galt sie lange Zeit als giftig und wird erst seit dem 18. Jahrhundert als Gemüse angebaut (KRUG, LIEBIG und STÜTZEL 2002). Seitdem nimmt der Anbau von Tomaten jährlich zu (FAOSTAT 2009, siehe Tabelle 1). Heute ist die Tomate eine weltweit verbreitete Kulturpflanze mit vielseitigen Nutzungsmöglichkeiten. Die Sortenvielfalt ist sehr groß und hat sich in den letzten Jahren deutlich erweitert. Tomaten sind sehr beliebt und gehören zu den in geschmacklicher und ernährungsphysiologischer Hinsicht wertvollsten Gemüsearten. Ihr erfrischender Geschmack, die leuchtende Farbe und der Reichtum an Vitaminen (Vitamine C und E), Mineralstoffen und bioaktiven Substanzen (Karotinoide, Flavonoide, Phenolsäuren und Terpenen) machen Tomaten zu einem wertvollen, gesundheitsförderndem Gemüse (KRUG, LIEBIG und STÜTZEL 2002). Vielseitige Verarbeitungsmöglichkeiten wie zum Beispiel Tomatenmark, Ketchup, Tomatensaft oder geschälte Tomaten, sowie ihre Produktion über das ganze Jahr machen diese Gemüseart zu einer der wichtigsten.

Seit den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts bis heute hat sich die Weltjahreserzeugung um mehr als 60 Millionen Tonnen erhöht.

Tabelle 1: Produktion und Anbaufläche von Tomaten

<i>Jahr</i>	<i>Anbaufläche in 1000 ha</i>			<i>Produktion in 1000 t</i>		
	<i>1969</i>	<i>1999</i>	<i>2009</i>	<i>1969</i>	<i>1999</i>	<i>2009</i>
WELT	1830	3989	4980	34562	109119	141400
EUROPA	720	712	554	14348	22217	22838
ÖSTERREICH	0,44	0,16	0,17	20,56	19,79	41,53

Quelle: FAOSTAT 2009

2.1.3 Botanische Grundlagen

Die Tomate ist eine krautartige Pflanze, die unter günstigen Klimabedingungen mehrjährig ist. Bei uns wird sie jedoch nur einjährig kultiviert. Obwohl die Tomate eigentlich eine Pfahlwurzel ausbildet, wird durch Jungpflanzenanzucht diese Pfahlwurzel in ein fasrig verzweigtes Wurzelsystem umgewandelt. Dadurch werden zuerst nur die obersten Bodenschichten (5 – 8 cm) von den Adventivwurzeln zunächst ziemlich waagrecht durchzogen. Erst später dringen die Wurzeln in tiefere Bodenschichten vor (VOGL 1996).

Der Haupttrieb der Tomate ist sympodial aufgebaut, das heißt, er stellt sein Wachstum nach der Ausbildung einer sorten-, licht- und temperaturabhängigen Zahl von Blättern mit der Bildung einer endständigen Infloreszenz ein und wird von dem Seitentrieb aus der jeweils obersten Achselknospe fortgesetzt (KRUG, LIEBIG und STÜTZEL 2002). Die Blätter haben einen kurzen Blattstiel. Die Blattspreite ist verbreitert und durch tiefe Einschnitte in einzelne Fiederteile gegliedert. Die Blätter am unteren Stängelteil haben weniger gegliederte Blattspreiten als die am oberen Teil. Diese am wenigsten geteilten Blätter bezeichnet man als Primärblätter. Die Keimblätter sind ganzrandig, gestielt und haben eine lineare Form. Triebe und Blätter der Tomate sind mehr oder weniger behaart. Die Blüten sind in einem Blütenstand vereinigt, so genannte Wickel und entstehen aus einer lateralen Verzweigung der Infloreszenzachse. Die Anzahl der Einzelblü-

ten im Blütenstand ist unterschiedlich. Abhängig von Sorte und Umweltbedingungen können es zwischen 3 und 25 sein. Die Blütenstände unterscheiden sich in Bezug auf Struktur der Wickel, können einfach, mehrfach oder zusammengesetzt sein. Die Frucht ist eine fleischige Beere, die durch die Verwachsung der Fruchtblätter entsteht. Das Innere der Tomatenfrucht besteht aus dem Perikarp (Fruchtfleisch), dem Plazentagewebe und den Hohlräumen mit den Samen. Die Samen sind mit gelatinösem Parenchym umgeben (HERRMANN 1979).

2.2 Das Pathogen

2.2.1 Systematik

Das Bakterium wurde erstmals von E. F. Smith im Jahre 1909 entdeckt und von ihm als *Bacterium michiganense* benannt (SMITH 1910).

Reich: *Bacteria*

Stamm: *Actinobacteria*

Ordnung: *Actinomycetales*

Unterordnung: *Micrococccineae*

Familie: *Microbacteriaceae*

Gattung: *Clavibacter*

Art: *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis*

2.2.2 Synonyme

Das Bakterium *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* (Smith) Davis et. al. hat mehrere Synonyme:

„*Bacterium michiganense*“ SMITH 1910 (Basionym)

„*Pseudomonas michiganensis*“ (SMITH1910) STEVENS1913

„*Aplanobacter michiganense*“ (SMITH 1910) SMITH1914

„*Phytomonas michiganensis*“ (SMITH 1910) BERGEY et al. 1923

„*Mycobacterium flavum ssp. michiganense*“ (SMITH 1910) KRASIL`NIKOV 1941

„*Corynebacterium michiganense*“ (SMITH 1910) JENSEN 1934

„*Clavibacter michiganense*“ (SMITH 1910) ZGURSKAYA et at. 1993

2.2.3 Morphologie

Das Bakterium ist ein nicht frei bewegliches, gebogenes Stäbchen, 0,4 – 0,75 x 0,8 – 2,5 µm klein und bildet keine Sporen (HOLT et al. 1994). Es ist grampositiv, obligat aerob und kommt einzeln sowie paarweise vor. Die Zellwand enthält Rhamnose und Fucose (DAVIS et al. 1984). Das Temperaturoptimum liegt zwischen 20 und 29 °C und nur selten wachsen sie bei Temperaturen über 35 °C (BERGEY 1994). Selbst auf nährstoffreichen Medien wie YPGA wachsen die Kolonien nur langsam. Auf den Agarplatten entstehen kleine blaßgelbe, glatte, feuchtglänzende, runde Kolonien, die mit dem Alter deutlicher gelb werden (Abb.1).



Abbildung 1: *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* auf YPGA (Lj. Petrina)

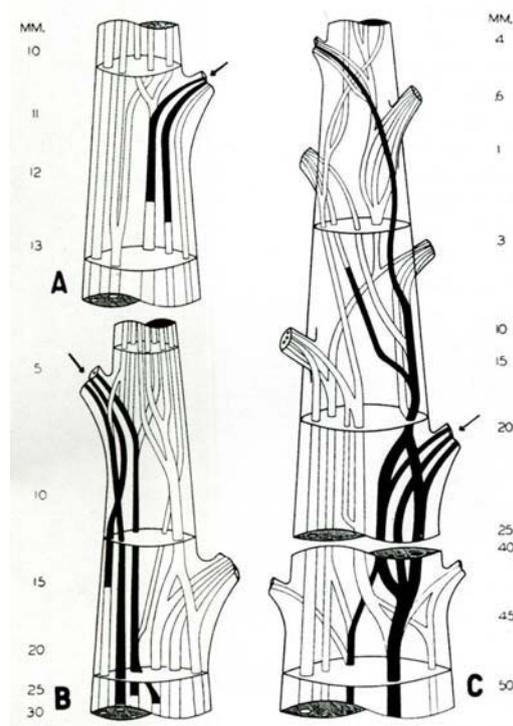
Im Jahre 1929 beobachtete BRYAN (1930) das Auftreten einer weißen Variante und 2 Jahre später gelang der gleichen Autorin die Isolierung einer hellrosa Variante aus einer unreifen Tomatenfrucht. Die Varianten differieren vom gelben Stamm schwach in ihrer Reaktion auf Zuckerarten in Kulturmedien (ARK 1944).

2.2.4 Infektionsmöglichkeiten

In die Tomatenpflanzen dringen die Bakterien über die Stomata oder sonstige natürliche Öffnungen (z. B. Hydathoden) der Pflanze, aber auch über Haarfollikel, Wunden und Wurzeln ein. An den Früchten kann eine Infektion auch durch direkte Penetration geschehen (BEDLAN 1999). Die Tomatenpflanzen sind während ihrer gesamten Lebensdauer hoch anfällig gegenüber dieser Krankheit. In der Regel sind Jungpflanzen jedoch etwas anfälliger als ältere Pflanzen (VAN VAERENBERGH und CHAUVEAU 1985).

2.2.5 Ausbreitung im Wirt

Die Bakterien befinden sich im Xylem der Pflanzen und verstopfen so die Leitbündel. Da *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* sich nicht aktiv oder nur sehr selten bewegt, gehört es zur den Wunderregern. Bei dieser Krankheit handelt sich um eine echte Tracheobakteriose (STAPP 1958). In welcher Weise und in welcher Geschwindigkeit die Ausbreitung des Erregers innerhalb einer Wirtspflanze erfolgt, darüber haben PINNE, GROGAN und HEWITT (1955) berichtet (Abb. 2).



Quelle: Stapp 1958

Abbildung 2: Weg und Ausbreitungsgeschwindigkeit von *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* in jungen Tomatenpflanzen, künstlich infiziert am Blattstielgrund

In Abbildung 2 ist die Ausbreitung der Bakterien im Stängel zu sehen. Nach 15 Minuten waren die Bakterien in den Spiralgefäßen bereits etwa 2,33 mm unterhalb der Inokulationsstelle (Abb. 2 A). Nach 24 Stunden betrug die Entfernung schon 24,5 mm. Die Bakterien fanden sich nur innerhalb der Gefäße (Abb. 2 B). Fünf Tage nach der Inokulation (Abb. 2 C) wurden die Bakterien mehr als 32,5 mm unterhalb und 13,2 mm oberhalb der Inokulationsstelle festgestellt. Gleichzeitig hatte inzwischen auch eine Ausbreitung der Bakterien seitwärts stattgefunden (PINE, GROGAN und HEWWIT 1955).

2.2.6 Resistenz

Alle Kultursorten von Tomaten zeigten sich bisher als anfällig. Viele Untersuchungen wurden seit den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts wie zum Beispiel von FENNER (1931), WENZL (1937) und ORTH (1937) durchgeführt, doch ist bis heute keine einzige resistente Tomatensorte bekannt. Da auch eine chemische Kontrolle der Krankheit in ausreichendem Maße bisher nicht möglich ist, stellt der Erreger eine weltweite Bedrohung für den Tomatenanbau dar. Die neusten Untersuchungen zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen anfälligen und partiell resistenten Sorten. Die weniger anfälligen Sorten reagieren schneller auf einen Befall der Bakterien, zum Beispiel mit Thyllenbildung, dadurch wird deren rasche Ausbreitung in den Pflanzen verhindert (STÜWE und VON TIEDEMANN 2010).

2.2.7 Wirtspflanzen

Der Hauptwirt ist die Tomate (*Solanum lycopersicum*), doch es können auch Melanzani (*Solanum melongena*) und Paprika (*Capsicum annuum*) befallen werden (BEDLAN und PLENK 2009).

Nebenwirte sind: Wildpflanzen aus der Familie der *Solanaceae*, wie zum Beispiel *Solanum nigrum*, *Solanum triflorum* oder *Solanum douglasii*.

Die Bakterien können auch epiphytisch auf Unkräutern und Pflanzen, die nicht zu den Nachtschattengewächsen gehören, überleben, wie zum Beispiel auf *Cynodon dactylon* und *Saccharum officinarum* (DAVIS et al. 1984).

2.2.8 Geografische Verbreitung

Nach der Entdeckung des Bakteriums durch E. F. Smith ist es heute in allen wichtigen Tomatenanbaugebieten verbreitet. In Europa kommt diese Pflanzenkrankheit, neben Österreich, noch in folgenden Staaten vor: Belgien, Bulgarien, Deutschland, Finnland, Griechenland, Großbritannien, Holland, Irland, Italien, Kroatien, Litauen, Norwegen, Polen, Portugal, Rumänien, Russland, Slowenien, Schweiz, Serbien, Spanien, Ungarn, Ukraine und Weißrussland. Laut EPPO (ANONYM 2009) in folgenden Ländern weltweit: Ägypten, Israel, Libanon, Marokko, Tunis, Türkei, Armenien, Aserbaidschan, China, Indien, Iran, Japan, Kenia, Madagaskar, Südafrika, Togo, Uganda, Sambia, Zimbabwe, Kanada, USA, Mexico, Costa Rica, Kuba, Dominikanische Republik, Grenada, Guadalupe, Martinique, Panama, Argentinien, Brasilien, Chile, Kolumbien, Ecuador, Peru, Uruguay, Australien, Neuseeland und Tonga.

2.2.9 Übertragung

Die Bakterien können mit dem Saatgut übertragen werden (AGARWAL und SINCLAIR 1997), wo sie sich im Embryo des Samenkorns befinden oder den Samen äußerlich anhaften können. Untersuchungen ergaben, dass die Übertragung mit dem Saatgut nicht mehr als 1% beträgt (GROGAN UND KENDRICK 1953). Verseuchte Samen haben als primäre Infektionsquellen die größte Bedeutung (GLEASON 1991). Aus infizierten Tomatensamen wachsen kranke Sämlinge, von denen die Krankheit bei Kultur im geschützten Bereich wie auch im Freiland weiter verbreitet werden kann. Tritt aus den Pflanzen Bakterien Schleim aus, wird die Krankheit in einem Pflanzenbestand hauptsächlich durch Wassertropfen (Regenfälle, Über-Kopf-Bewässerung) und Kulturarbeiten (Ausgeizen, Aufbinden und -wickeln, Pflanzenschutzbehandlungen, Erntemaßnahmen,...) und Aneinanderreiben von Pflanzen verbreitet.

2.2.10 Überdauerung

Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis kann zwar längere Zeit in befallenem Pflanzenmaterial im Boden, an Gegenständen und an der Gewächshauskonstruktion überdauern, jedoch nur sehr kurze Zeit im Boden. Je höher die Temperatur, desto kürzer ist die Überlebensfähigkeit der Bakterien im Boden. Wurzelreste infizierter Tomaten-

pflanzen ermöglichen den Bakterien eine längere Überdauerung im Boden, bei Austrocknung des Bodens sterben die Bakterien in der Regel jedoch sehr schnell ab (FTAVEH, MAVRIDIS und RUDOLPH 2004). Weitere Überdauerungsmöglichkeiten bieten Unkräuter, wie *Solanum nigrum* oder *Solanum triflorum*, aber auch Nährlösungen hydroponischer Kulturen, in denen die Bakterien mehrere Monate am Leben bleiben können. An Saatgut überdauern die Bakterien in der Regel bis zu 8 Monaten.

2.2.11 Symptome

Nach erfolgter Infektion folgt eine längere Latenzzeit. Erste Symptome sind in der Regel erst zur Zeit der ersten Fruchtbildung zu sehen. Da die Bakterienwelke eine gefäßparasitäre Welkekrankheit ist, welkt oft nur eine Hälfte des Blattes oder der Pflanze (STAPP 1958). Die Gefäße kranker Pflanzen sind gelbbraun verfärbt. Aus ihnen lässt sich Bakterien Schleim drücken. Bemerkenswert sind jedoch braune Nekrosen zwischen den Blattadern auf den Blättern. Diese braunen Flecken sehen aus, als wären auf den Blättern Wassertropfen verblieben und bei Sonneneinstrahlung durch Brennglaswirkung der Wassertropfen das darunter liegende Blattgewebe verbrannt (BEDLAN 2009). Diese Nekrosen sind ebenfalls erste Anzeichen auf einen Befall durch die Bakterienwelke, ohne dass noch eine Welkeerscheinung an den Pflanzen beobachtet werden muss. Neben diesen Nekrosen sind zunächst reversible Welkeerscheinungen von Pflanzen bei höheren Temperaturen zu bemerken. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium kommt es schließlich zu einer irreversiblen Welke und die Pflanzen ver-



Abbildung 3 Bakterienwelke Pflanze und Darstellung verfärbter Gefäßbündel (Aquarell: P. P. Kohlhaas, AGES/Wien)

dorren. An den Früchten entstehen die so genannten „Vogelaugenflecken“. Es sind dies 2 bis 4 mm große Flecken mit braunem, kraterartig aufgerissenem Zentrum, das von einem deutlichen weißen Hof umgeben ist. Gehäuft treten diese Vogelaugenflecken nach dem Entspitzen und bei feuchter Witterung auf. Im Inneren der Früchte können braune, hohle Stellen entstehen, es werden oft keine Samen ausgebildet (BEDLAN 2009). Geringfügige Sortenunterschiede in der Anfälligkeit sind bekannt (STÜWE und VON TIEDEMANN 2010).

2.2.12 Symptombilder



Abbildung 4: Infizierte Jungpflanze (G. Bedlan/AGES, Wien)



Abbildung 5: Beginnende Toxinfleckenbildung an Blatt (G. Bedlan/AGES, Wien)



Abbildung 6: Toxinflecken an Blatt (G. Bedlan/AGES, Wien)

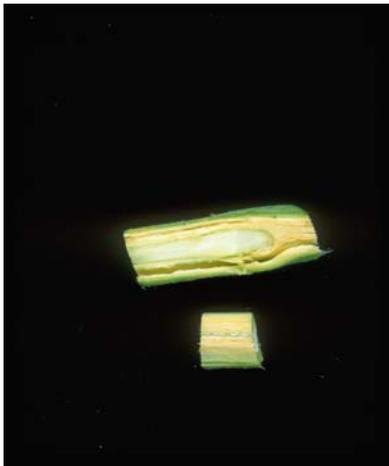


Abbildung 7: Die verfärbten Gefäße einer kranken Pflanze (G. Bedlan/AGES, Wien)



Abbildung 8: Befall an Frucht, Vogelaugenflecken (G. Bedlan/AGES, Wien)



Abbildung 9: Symptome an Pflanzen im Bestand, irreversible Welke
(G. Bedlan/AGES, Wien)

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Agar	Merck
Borsäure	Merck
Calciumchlorid	Merck
D (+) – Glucose	Merck
EDTA	Fluka
Ethanol, 96% vergällt	Brenntag
Ethidiumbromid	Fluka
Hefe Extrakt	Becton, Dickinson and Company
Kaliumbromid	Merck
Nutrient broth extract	Difco
Peptone	Becton, Dickinson and Company
Tween® 20	Agdia
Filter 2,7µm Porengröße	Whatman
Soritzennadel 0,4x20mm	Terumo
Petrischalen 92mm	Greiner bio-one
Reaktionsgefäße 0,2ml	Axygen
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf
Spritze 2ml	Becton - Dickinson

3.2 Enzyme, Kits, Medien und Puffer

3.2.1 Enzyme und Kits

Agdia –Kit zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis*

3.2.2 Nährmedien und Nährlösungen

Nutrient broth agar

Nutrient broth extract	8 g
Dextrose	10 g
Agar	17 g
Aqua dest.	1000 ml

Yeast Peptone Agar (YPG-Agar)

Hefe Extrakt	5 g
Bacto Pepton	5 g
D(+)- Glucose	10 g
Agar	15 g
Aqua dest.	1000 ml

pH-Wert mit 0,1M NaOH auf 7,2 einstellen

Kings B flüssig

Peptone aus Casein	8 g
Peptone aus Fleisch	8 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,2 g
K ₂ HPO ₄	1,2 g
Glycerol	8 ml
Aqua dest.	800 ml

pH-Wert mit 0,1M NaOH auf 7,0 bis 7,2 einstellen

3.2.3 Puffer

Karbonat Beschichtungspuffer

Natriumkarbonat	1,59 g
Natriumbikarbonat	2,93 g
Natriumazid	0,2 g
Aqua dest.	1000 ml
pH-Wert mit 0,1M NaOH auf 9,6 einstellen	

PBST- Puffer (Wasch-Puffer)

Natriumchlorid	8 g
Natriumphosphat, dibasisch (getrocknet)	1,15 g
Kaliumphosphate, monobasisch (getrocknet)	0,2 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Tween-20	0,5 g
Aqua dest.	1000 ml

pH-Wert mit 0,1M NaOH auf 7,4 einstellen

ECM- Puffer

Bovine serum albumin (BSA)	2 g
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	20 g
Natriumazid	0,2 g
PBST	1000 ml

pH-Wert mit 0,1M NaOH auf 7,4 einstellen

PNP- Puffer

Magnesiumchlorid- hexahydrat	0,1 g
Natriumazid	0,2 g
Diethanolamin	97 ml
Aqua dest.	800 ml

pH-Wert mit 0,1M NaOH auf 9,8 einstellen

General Extrakt- Puffer (GEB)

Natriumsulfit (getrocknet)	1,3 g
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	20 g
Natriumazid	0,2 g
Albumin (Huhn)	2 g
Tween-20	20g
Aqua dest.	1000 ml
pH-Wert mit 0,1M NaOH auf 7,4 einstellen	

TEA- Puffer (Tris- Acetat- EDTA)

10x Puffer	g
Tris	48,5 g
Na ₂ EDTA	7,5 g
100% Essigsäure	11 ml
Aqua dest. Steril	700 ml

5x Beladungspuffer

Bromphenolblau	0,25 g
Xylencyanol	0,25 g
Glycerin	30 ml
Aqua dest. Steril	1000 ml

Gebrauchsfertiger DNA- Marker

TAE	550 ml
Marker (1µg DNA/ µl)	50 µl
5x Beladungspuffer	150 µl

Ethidiumbromidlösung	
Stocklösung:	
Aqua dest. (1 Talette/10ml destilliertes Wasser)	10 mg/ml
Gebrauchslösung:	
Stocklösung/500ml TAE- Puffer	5 µl

3.3 Anzucht der Jungpflanzen für die künstliche Inokulation

Für die Infektionsversuche wurde ungebeiztes Tomatensaatgut der handelsüblichen Sorte 'Mercedes' der Firma AUSTROSAAT (Österreichische Samenzucht- und Handels-Aktiengesellschaft), unter Praxisbedingungen in einer Glashauskabine an der Forschungsstation der AGES herangezogen. Die Sämlinge wurden sieben Tage nach dem jeweiligen Anbautermin pikiert und in Kunststofftöpfe (Ø 9 cm) mit Torfsubstrat verpflanzt. Während dieser Anzuchtzeit betrug die Tagestemperatur ca. 25 °C, die Nachttemperatur ca. 20 °C. Die Bewässerung erfolgte händisch durch Gießen. Nach etwa 4 Wochen wurden die Jungpflanzen in eine vektorsichere Kabine transferiert und dort dann mit *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* in unterschiedlichen Konzentrationen infiziert.

Nach der Inokulation wurden die Pflanzen 14 Tage unter praxisüblichen Bedingungen weiter kultiviert.

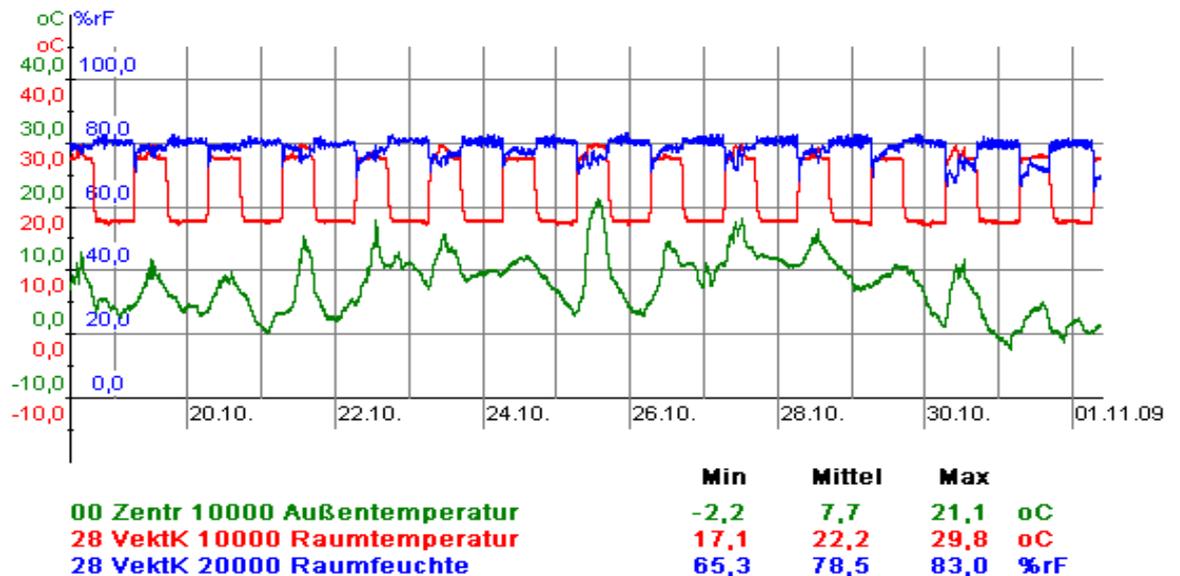


Abbildung 10 : Temperaturverlauf in der Vektorkabine, AGES 2009

3.4 *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*

3.4.1 Stamm und Herkunft

Für die Infektion der Jungpflanzen wurde der Typus-Stamm als gefriergetrocknete Kultur (Code Nr. 46364) von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSZM) verwendet.

3.4.2 Ermittlung der Wachstumsrate / Wachstumskurve

Das Wachstum von Bakterien ist durch 4 Phasen gekennzeichnet. Die klassischen Phasen sind:

- a) die Induktionsphase, in der die Zellzahl gleich bleibt und in der die Anpassung an das neue Medium erfolgt.
- b) Die Übergangsphase, in der die Zellteilung beginnt und die Generationsdauer abnimmt.
- c) Die Exponentielle Phase, in der die Generationszeit am kürzesten und konstant ist
- d) Die Stationäre Phase, in der die Zellzahl konstant bleibt, da die Nährstoffe aufgebraucht oder zuviel toxische Stoffwechselprodukte ausgeschieden worden sind.
- e) Die Absterbephase, die die letzte Phase der Wachstumskurve darstellt. Hier nimmt die Biomassekonzentration aufgrund von autolytischen Prozessen wieder ab (SCHLEGEL 1985).

Zur Herstellung einer Inokulationssuspension ist es wichtig diese Phasen für den jeweiligen Organismus zu kennen. Hierfür wurden 3 unterschiedliche Nährlösungen (NB, YPG und Kings B) verglichen. In je 2 ml dieser Nährlösungen wurden die Bakterienkulturen über Nacht bei 26 °C bebrütet und dabei geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte die Messung der optischen Dichte (OD) mittels Photometer bei 600 nm. Hierfür wurden die „Übernachtkulturen“ (Over Night Culture - ONC) 1:10 mit der jeweiligen Nährlösung verdünnt und gegen das reine Nährmedium als Eichlösung gemessen.

Zur Ermittlung der Wachstumskurven wurden je 30 ml der jeweiligen Nährlösung in 100 ml Erlenmeyer-Anzuchtkolben abgefüllt und autoklaviert. Nach dem Erkalten wurden die Medien mit *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* aus den ONC-Kulturen inokuliert, sodass die optische Dichte zu Beginn 0,05 betrug.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\text{OD der ONC} \times \text{Volumen der ONC} = \text{Anfangs- OD} \times \text{Volumen des Kulturmediums}$$

Die Kolben wurden bei 26 °C geschüttelt. Zur Ermittlung der Wachstumskurve wurden stündlich 100 µl der Bakteriensuspensionen entnommen und die optische Dichte bei 600 nm gemessen. An einem Tag erfolgten 12 Messungen, dann wurden die Kolben über Nacht in den Kühlschrank gestellt und am nächsten Tag weiter bebrütet. Die Messung erfolgte bis zur Absterbephase. Aus diesen Werten wurde Generationszeit und Teilungsrate berechnet.

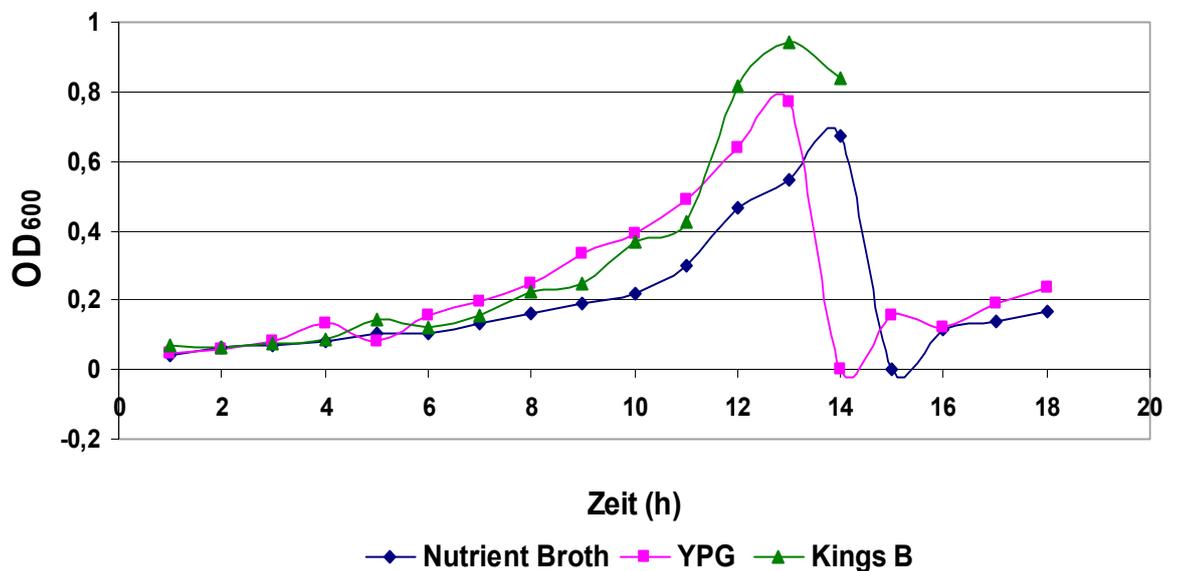


Abbildung 11: Wachstumskurven von *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* (Lj. Petrina)

3.4.3 Bestimmung der Keimzahl

Parallel zu den Messungen für die Bestimmung der Wachstumskurven wurden jeweils weitere 100 µl der Bakteriensuspension entnommen und mit 900 µl PBS- Puffer verdünnt. Anschließend wurden 100 µl dieser Lösung auf YPG-Agar ausplattiert und über Nacht bei 26 °C bebrütet. Dies wurde solange wiederholt bis eine optische Dichte von 0,2 erreicht war. Am nächsten Morgen wurden dann die Kolonien ausgezählt.

Keimzahlbestimmung:

*t= 0; YPG- Platten, auflattieren von 10^{-3} und 10^{-4}

*t= 1; YPG- Platten, auflattieren von 10^{-3} und 10^{-4}

*t= 2; YPG- Platten, auflattieren von 10^{-3} und 10^{-4}

*t= 3; YPG- Platten, auflattieren von 10^{-4} und 10^{-5}

*t= 4; YPG- Platten, auflattieren von 10^{-4} und 10^{-5}

*t= 5; YPG- Platten, auflattieren von 10^{-4} und 10^{-5}

*t= 6; YPG- Platten, auflattieren von 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6}

*t= 7; YPG- Platten, auflattieren von 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7}

*t= 8; YPG- Platten, auflattieren von 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7}

*t= 9; YPG- Platten, auflattieren von 10^{-6} , 10^{-7} und 10^{-8}

*t= 10; YPG- Platten, auflattieren von 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9}

Die Platten waren inkubiert auf 26 °C und nur jene ausgezählt, die zwischen 10 und 300 Kolonien lagen (BROCK, MADIGAN und MARTINKO 1994).

Berechnung der cfu/ml (kolonienbildende Einheit):

Zahl der Kolonien pro Platte x 10 x Verdünnungsfaktor = cfu/ml

3.4.4 Herstellung der Inokulations-Suspension

Zur Herstellung der Suspension wurden die Kolonien verwendet, die auf YPG-Agar gewachsen sind. In ein steriles Röhrchen wurden 2ml flüssiges Nährmedium einpipetiert, mit einer einzelnen Kolonie der Reinkultur beimpft und bei 26 °C über Nacht geschüttelt. Diese Stammlösung wurde am nächsten Tag 1:10 verdünnt und die optische Dichte gemessen. 3ml steriles Kulturmedium wurde mit so viel Stammlösung beimpft, damit eine Anfangs-OD von 0,5 erreicht wurde. *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* erreichte eine Konzentration von 8×10^8 cfu/ml bei der OD_{600} von 0,5.

Berechnung:

$[\text{OD der ONC}] \times [\text{Volumen der ONC}] = \text{Anfangs- OD} \times \text{Volumen des Kulturmediums}$

Ausgehend wurden dann die weiteren Konzentrationen 8×10^4 , 8×10^2 , 4×10^2 , 2×10^2 , 1×10^2 , 5×10 , $2,5 \times 10$ und $1,2 \times 10$ cfu/ml. für die Inokulation der Jungpflanzen hergestellt.

3.4.5 Inokulation der Pflanzen

Die Inokulation der Jungpflanzen erfolgte im DC-Stadium 23, die Tomatempflanzen waren zu diesem Zeitpunkt ca. 22 cm groß. Vor der Inokulation wurden die Jungpflanzen in eine vektorsichere Glashauskabine gebracht.

Inokuliert wurde mittels Injektionsnadel in den Pflanzenstängel 1 bis 2 cm über den Keimblättern, Der Stängel wurde mit der Injektionsnadel durchstoßen und beim Herausziehen der Nadel ein Tropfen in das Gewebe eingelassen. Die Tropfengröße betrug $20\mu\text{l}$.



Abbildung 12: Inokulation einer Jungpflanze mittels Injektionsnadel (Lj. Petrina)

Anschließend wurden die Pflanzen unter Praxisbedingungen weiter kultiviert. Nach 3, 5, und 7 Tagen wurden von jeder Variante jeweils 5 Pflanzen für die Untersuchungen mittels ELISA und PCR entnommen.

3.4.5.1 Aufbereitung für den PCR-Nachweis

Für den PCR-Nachweis wurden die Pflanzenstängel ca. 1cm oberhalb der Inokulationsstelle abgeschnitten und ein 3 mm langer Stängelteil in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Dann folgte die DNA- Extraktion wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben.

3.4.5.2 Aufbereitung für den ELISA- Nachweis

Für den ELISA- Nachweis wurde aus jeweils 5 Pflanzenstängeln mit Hilfe einer Kugel- presse (Homex 6 Fa. Bioreba) der Presssaft hergestellt und nach folgendem Proben- schema (s. Tabelle 2) aufgearbeitet.

Tabelle 2: Probenschema

Nr.	Für jede Konzentration	3 dpi	5 dpi	7 dpi
1	Presssaft	✓	✓	✓
2	Presssaft 20°C	✓	✓	✓
3	Presssaft 26°C	✓	✓	✓
4	Filtrat	✓	✓	✓
5	Filtrat 20°C	✓	✓	✓
6	Filtrat 26°C	✓	✓	✓
7	Filtrieren + Zentrifugieren	✓	✓	✓
8	Filtrieren + Zentrifugieren + NL 20°C	✓	✓	✓
9	Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26°C	✓	✓	✓
10	Filtrieren + Zentrifugieren Überstand	✓	✓	✓
11	Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20°C	✓	✓	✓
12	Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26°C	✓	✓	✓
13	Zentrifugat + Puffer	✓	✓	✓
14	Zentrifugat + NL 20°C	✓	✓	✓
15	Zentrifugat + NL 26°C	✓	✓	✓
16	Zentrifugat Überstand	✓	✓	✓
17	Zentrifugat Überstand + NL 20°C	✓	✓	✓
18	Zentrifugat Überstand + NL 26°C	✓	✓	✓

Ungefähr 1ml des Presssaftes wurde ohne weitere Bearbeitung gleich tief gefroren. Je 1ml wurde über Nacht bei 20 °C und 26 °C zur Anreicherung der Bakterien bebrütet. Die bebrüteten Varianten würden am nächsten Tag nach ca. 16 Stunden eingefroren. Ca 1 ml des Presssaftes wurde mittels sterilen Spritzen und Filter (Porengröße 2,7µm) filtriert. Auch die Filtrate wurden wie die Presssäfte gleich tiefgefroren und bei 20 und 26 °C bebrütet. Die Zentrifugate wurden mittels einer Laborzentrifuge (Heraeus Sepatech) gewonnen – 10 Minuten bei 9 °C und 147 000 rzb. Die Zentrifugate wurden in Puffer bzw. Nährlösung (YPG) resuspendiert und nach dem obigen Schema weiter bearbeitet. Auch der Überstand der Zentrifugate wurde eingefroren beziehungsweise mit Nährlösung (NL) versetzt und über Nacht bei 20 °C und 26 °C bebrütet. Die letzte Variante war eine Kombination aus filtrieren und zentrifugieren und die Proben wurden wie oben angeführt aufgearbeitet.

3.4.6 Das ELISA- Test Verfahren

Zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* wurde ein kommerzielles ELISA-Kit der Firma AGDIA verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß der beigelegten Arbeitsanleitung.

ELISA ist die Abkürzung für Enzyme-linked immunosorbent assay. Das Test-Verfahren beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Es ist also ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit Hilfe dieses Testes können beispielsweise Proteine oder Viren, aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine oder auch Pestizide aus Blutserum, Pflanzenpresssäften oder anderen Flüssigkeiten nachgewiesen werden. Die Signalstärke ist im Allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration, so dass ELISA-Tests auch für quantitative Nachweise verwendet werden können.

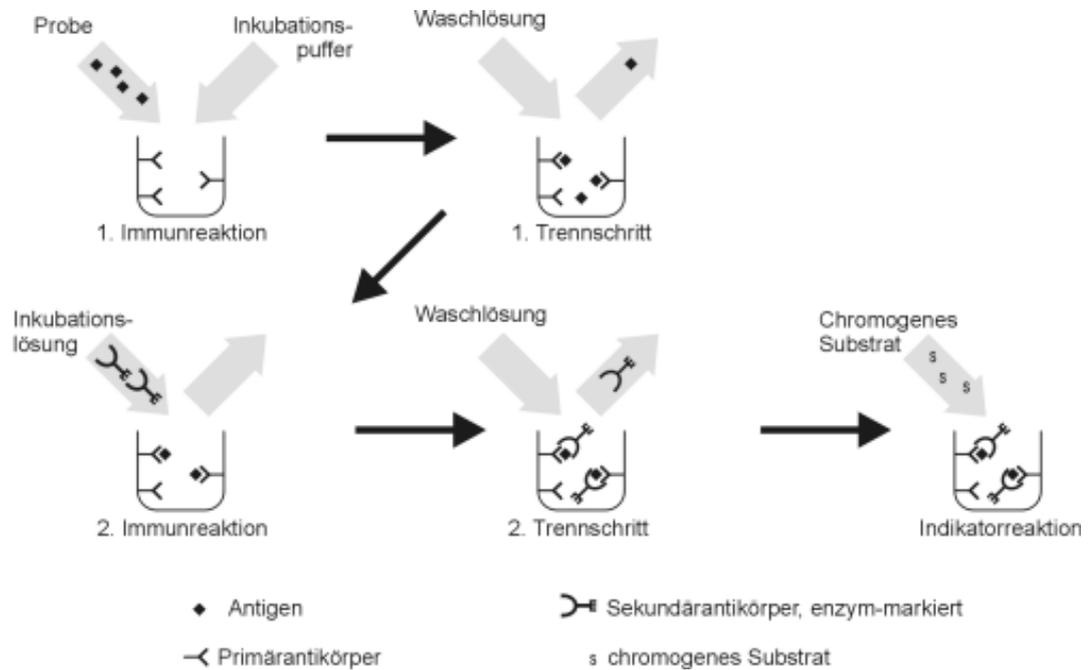


Abbildung 13: ELISA mit Sandwichprinzip (nach Roche Diagnostics GmbH)

(Quelle <http://www.uni-giessen.de/~gi38/publica/labor/kapitel4.html>)

3.4.6.1 Vorbereitung einer Feuchten Kammer

Ein Kunststoffbehälter wurde mit Filterpapier ausgelegt und mit Leitungswasser befeuchtet.

3.4.6.2 Beschichtung der ELISA-Platten

Da die Platten nicht vorbeschichtet waren, mussten die Mikrotiterplatten zuvor mit dem coating-Antikörper beschichtet werden. Hierfür wurde das coating-Antikörper-Konzentrat mit Carbonatpuffer 1:200 verdünnt. Für eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 10 ml benötigt, da in jedes Nöpfchen 100 µl der coating-Antikörper-Lösung einpipettiert wurden. Die Mikrotiterplatte wurden in einer Feuchten Kammer im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht inkubiert.

3.4.6.3 Verdünnung der Proben für den ELISA

Der Pflanzenpresssaft wurde im Verhältnis 1:10 mit dem Probenpuffer (General Extraction Buffer – GEB) verdünnt. Hierfür wurde eine Mikrotiterplatte mit Probenröhrchen bestückt und jedes dieser Röhrchen wurde mit 900 µl Probenpuffer befüllt. Nach dreimaligem Waschen der ELISA-Platten mit Waschpuffer (PBST) wurden 100 µl des

Pflanzenpresssaftes der Proben nach dem Probenschema einpipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden im Anschluss 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchten Kammer inkubiert.

3.4.6.4 Konjugatzugabe

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Platten 8-mal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen und getrocknet. Das Konjugat-Konzentrat wurde ebenfalls 1:200 mit ECM-Puffer verdünnt und pro Well wurden wieder 100 µl einpipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden dann erneut 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchten Kammer inkubiert.

3.4.6.5 Vorbereitung der Enzysubstrat-Lösung

Ungefähr 15min vor Ende der Inkubationszeit wurde eine p-Nitrophenylphosphat- Lösung hergestellt. Hiefür löste man eine PNP-Tablette in p-Nitrophenylphosphat-Puffer auf. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Microtiterplatte erneut gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde in jedes Well 100 µl der Enzysubstratlösung einpipettiert und die Platte 60 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert.

3.4.6.6 Auswertungen mittels Photometer

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Platten im Mikrotiterplatten-Photometer bei 405 nm gemessen. Wells, in denen sich das Enzysubstrat gelb verfärbt hat sind Cmm-positiv, Wells in denen keine Verfärbung festgestellt werden konnte Cmm-negativ. Der ELISA-Test ist jedoch nur dann korrekt, wenn die Positivkontrolle eine deutliche Färbung aufweist, während die Negativkontrolle klar bleibt.

3.5 Molekularbiologische Methode

Die PCR-Untersuchungen erfolgten mit einigen Änderungen im Wesentlichen nach der Methode von STÖGER und RUPPITSCH (2004) und dem EPPO Diagnostic Standard PM 7/42 (ANONYM 2005).

Für die DNA-Extraktion und die PCR wurde der REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR-Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verwendet.

3.5.1 DNA- Extraktion

Die kleinen Stücke der Pflanzenstängel wurden wie im Kapitel 3.2.4.1 beschrieben in jeweils ein Eppendorf- Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben. Nach der Zugabe von 100 µl Extraktionslösung wurden die Proben in einem Thermomixer Compact (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) 15 min bei 95 °C einer thermischen Zytolyse unterzogen und danach abgekühlt. Zu den abgekühlten Proben wurde das gleiche Volumen Dilution (Verdünnungs-) -Puffer dazugegeben. Diese Lösung wurde anschließend mit Wasser im Verhältnis 1:30 verdünnt und für den PCR Ansatz herangezogen.

3.5.2 PCR

Für die PCR wurde ein Mastermix (Tabelle 3) mit dem Primerpaar Cmm5 (5' - GCCAATAAGCCCATATCAA - 3') und Cmm6 (5' - CGTCAGGAGGTCGCTAATA - 3') nach DREIER et al. (1995) hergestellt.

Die Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Jeweils 16 µl Mastermix wurden mit 4 µl Proben-DNA in PCR-Tubes pipettiert.

Tabelle 3 : Mastermix

Reagenz	Menge [µl]
Aqua bidest.	4
REDExtract-N-Amp PCR Ready Mix	10
Cmm5 (10µM)	1
Cmm6 (10µM)	1

Als Positivkontrolle wurde DNA eines Referenzstammes der DSMZ. verwendet. Als Negativkontrolle diente PCR Wasser. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte in einem Biometra T3000 (Biometra, Göttingen, Deutschland) Thermocycler. Das Temperaturprogramm für *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* ist in der Tabelle 4 beschrieben.

Tabelle 4 : Temperaturprogramm

PCR-Ablauf		Temperatur (°C)	Zeit
Aufheizphase		96 °C	2min.
Denaturierung	30 Zyklen	96 °C	30sec.
Primer- Hybridisierung		55 °C	90sec.
Strangsynthese		72 °C	60sec.
Strangverlängerung		72 °C	10min.
Abkühlung		15 °C	∞

3.5.3 Auswertung

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Das erwartete Amplifikationsprodukt von 614 bp wurde auf einem 2% Agarose-Gel nach der Färbung mit Ethidiumbromid unter UV Licht visualisiert. Ein 100-bp DNA Marker (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) wurde als Größenmarker eingesetzt.

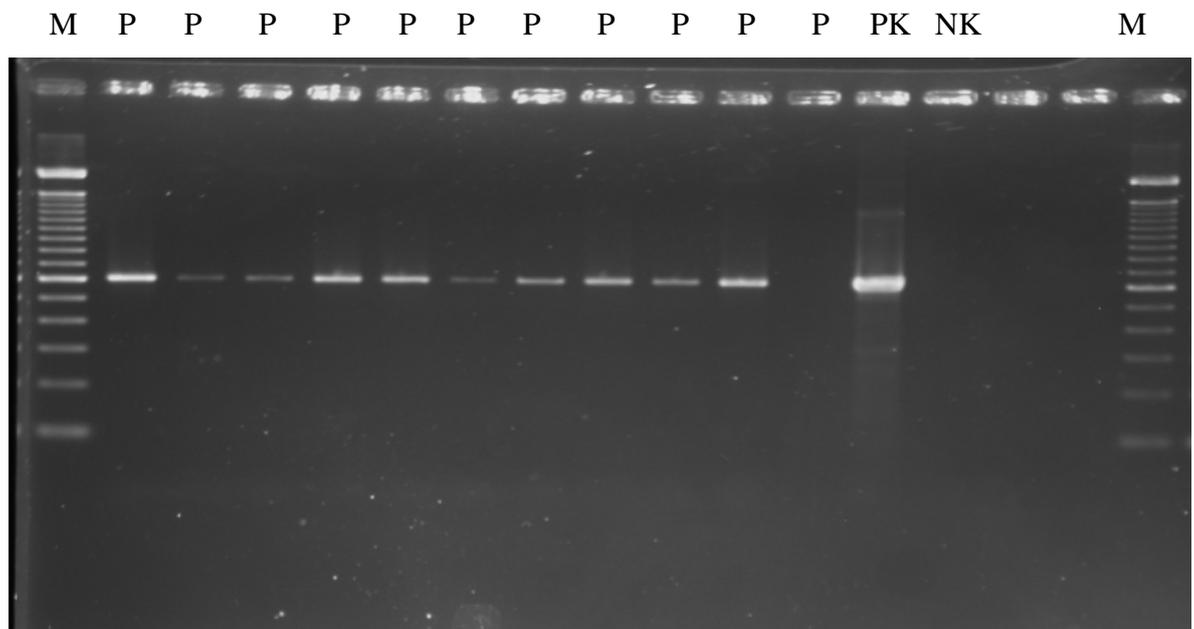


Abbildung 14: Agarose-Gel bei der Konzentration 8×10^8 cfu/ml nach 7 Tagen (Lj.Petrina)
M (Marker), P (Probe), PK (Positivkontrolle) und NK (Negativkontrolle)

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeines

Die Tomatenjungpflanzen wurden mit neun verschiedenen konzentrierten Bakterienlösungen künstlich inokuliert. Danach erfolgten die Untersuchungen mittels ELISA-Tests und PCR.

In einer ersten Versuchsanstellung wurden Inokulationen mit folgenden Konzentrationen durchgeführt: 8×10^8 cfu/ml, 8×10^4 cfu/ml und 8×10^2 cfu/ml. Von den Jungpflanzen wurden für die Untersuchungen jeweils Blätter und Stängel getrennt gepresst.

Nachdem alle Proben mit Presssäften aus Blättern ein negatives Ergebnis zeigten, wurden in den nachfolgenden Untersuchungen die Konzentrationen der Bakterienlösungen bis auf $1,2 \times 10$ cfu/ml (s. Tabellen 4-13) gesenkt und nur Pflanzenstängel gepresst. Alle Versuche wurden zweifach durchgeführt.

4.2 Ergebnisse der ELISA-Tests

Die Tabellen sind wie folgt bezeichnet:

Erste Versuchsanstellung mit drei Konzentrationen:

Tabelle 4: Konzentration 8×10^8 cfu/ml

Tabelle 5: Konzentration 8×10^4 cfu/ml

Tabelle 6: Konzentration 8×10^2 cfu/ml

Zweite Versuchsanstellung mit sieben Konzentrationen:

Tabelle 7: Konzentration 8×10^2 cfu/ml

Tabelle 8: Konzentration 4×10^2 cfu/ml

Tabelle 9: Konzentration 2×10^2 cfu/ml

Tabelle 10: Konzentration 1×10^2 cfu/ml

Tabelle 11: Konzentration 5×10 cfu/ml

Tabelle 12: Konzentration $2,5 \times 10$ cfu/ml

Tabelle 13: Konzentration $1,2 \times 10$ cfu/ml

Die Probennahmen für die ELISA-Tests erfolgten 3, 5 und 7 Tage nach den Inokulationen.

Tabelle 4: Konzentration 8×10^8 cfu/ml

	3 dpi	5 dpi	7 dpi
Presssaft	+	+	+
Presssaft 26°C	+	+	+
Presssaft 20°C	+	+	+
Filtrat	+	+	+
Filtrat 20°C	+	+	+
Filtrat 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26°C	+	+	+
Zentrifugat + Puffer	+	+	+
Zentrifugat + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat + NL 26°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand	+	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 26°C	+	+	+

In dieser Tabelle stehen die Ergebnisse des ersten Versuches bei höchster Konzentration von 8×10^8 cfu/ml, die in allen Varianten bereits bei 3 dpi positiv waren. Diese Konzentration diente als Kontrolle im Versuch.

Tabelle 5: Konzentration 8×10^4 cfu/ml

	3 dpi	5 dpi	7 dpi
Presssaft	+	+	+
Presssaft 26°C	+	+	+
Presssaft 20°C	+	+	+
Filtrat	+	+	+
Filtrat 20°C	+	+	+
Filtrat 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26°C	+	+	+
Zentrifugat + Puffer	+	+	+
Zentrifugat + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat + NL 26°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand	+	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 26°C	-	+	+

Die Konzentration von 8×10^4 cfu/ml ist die Nachweisgrenze für die derzeit praxisüblichen ELISA-Tests.

Tabelle 6: Konzentration 8×10^2 cfu/ml

	3 dpi	5 dpi	7 dpi
Presssaft	+	+	+
Presssaft 26°C	+	+	+
Presssaft 20°C	+	+	+
Filtrat	+	+	+
Filtrat 20°C	+	+	+
Filtrat 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand	-	-	-
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20°C	-	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26°C	-	+	+
Zentrifugat + Puffer	-	+	+
Zentrifugat + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat + NL 26°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand	-	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 20°C	-	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 26°C	-	+	+

Fast alle Varianten waren bereits bei 3 dpi positiv, ausgenommen die Varianten Überstände (Filtrieren + Zentrifugieren) und Zentrifugat mit Puffer, die erst bei 5 dpi ein positives Ergebnis zeigten.

2. Versuchsreihe

Versuche mit weiter verminderten Infektionsdichten

Tabelle 7: Konzentration 8×10^2 cfu/ml

	3 dpi	5 dpi	7 dpi
Presssaft	+	+	+
Presssaft 26°C	+	+	+
Presssaft 20°C	+	+	+
Filtrat	+	+	+
Filtrat 20°C	+	+	+
Filtrat 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand	-	-	-
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20°C	-	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26°C	+	+	+
Zentrifugat + Puffer	-	+	+
Zentrifugat + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat + NL 26°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand	-	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 20°C	-	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 26°C	+	+	+

Die Ergebnisse dieser Varianten sind ident mit jenen der Tabelle 6.

Tabelle 8: Konzentration 4×10^2 cfu/ml

	3 dpi	5 dpi	7 dpi
Presssaft	+	+	+
Presssaft 26°C	+	+	+
Presssaft 20°C	+	+	+
Filtrat	+	+	+
Filtrat 20°C	+	+	+
Filtrat 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand	-	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26°C	+	+	+
Zentrifugat + Puffer	+	+	+
Zentrifugat + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat + NL 26°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand	+	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 20°C	-	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 26°C	-	+	+

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Tabelle 7 sind bei der Konzentration von 4×10^2 cfu/ml die 3 Varianten mit den Überständen bereits bei 3 dpi positiv.

Tabelle 9: Konzentration 2×10^2 cfu/ml

	3 dpi	5 dpi	7 dpi
Presssaft	+	+	+
Presssaft 26°C	+	+	+
Presssaft 20°C	+	+	+
Filtrat	+	+	+
Filtrat 20°C	+	+	+
Filtrat 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26°C	-	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand	-	-	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20°C	-	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26°C	-	+	+
Zentrifugat + Puffer	+	+	+
Zentrifugat + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat + NL 26°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand	-	-	+
Zentrifugat Überstand + NL 20°C	-	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 26°C	+	+	+

Im Gegensatz z. B. zu den Ergebnissen der Tabelle 7 sind hier bei geringerer Infektionsdichte die Ergebnisse der ELISA-Tests bei der Variante Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20 °C bei 5 dpi und 7 dpi positiv.

Tabelle 10: Konzentration 1×10^2 cfu/ml

	3 dpi	5 dpi	7 dpi
Presssaft	+	+	+
Presssaft 26°C	+	+	+
Presssaft 20°C	+	+	+
Filtrat	-	+	+
Filtrat 20°C	+	+	+
Filtrat 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand	-	-	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20°C	-	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26°C	+	+	+
Zentrifugat + Puffer	+	+	+
Zentrifugat + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat + NL 26°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand	-	-	+
Zentrifugat Überstand + NL 20°C	-	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 26°C	+	+	+

Bei dieser Konzentration konnte im Filtrat bei 3 dpi kein positives Ergebnis erzielt werden, abweichend von den Ergebnissen in Tabelle 9 jedoch bei den Varianten Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26 °C und Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26 °C

Tabelle 11: Konzentration **5 x 10** cfu/ml

	3 dpi	5 dpi	7 dpi
Presssaft	+	+	+
Presssaft 26°C	+	+	+
Presssaft 20°C	+	+	+
Filtrat	+	+	+
Filtrat 20°C	+	+	+
Filtrat 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26°C	-	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand	-	-	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20°C	-	-	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26°C	-	+	+
Zentrifugat + Puffer	+	+	+
Zentrifugat + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat + NL 26°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand	-	-	+
Zentrifugat Überstand + NL 20°C	-	-	+
Zentrifugat Überstand + NL 26°C	-	+	+

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus Tabelle 10 ist der ELISA-Test beim Filtrat bei 3 dpi wieder positiv.

Tabelle 12: Konzentration **2,5 x 10** cfu/ml

	3 dpi	5 dpi	7 dpi
Presssaft	+	+	+
Presssaft 26°C	+	+	+
Presssaft 20°C	+	+	+
Filtrat	-	+	+
Filtrat 20°C	+	+	+
Filtrat 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren	-	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand	-	-	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20°C	-	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26°C	-	+	+
Zentrifugat + Puffer	-	+	+
Zentrifugat + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat + NL 26°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand	-	-	+
Zentrifugat Überstand + NL 20°C	-	-	+
Zentrifugat Überstand + NL 26°C	-	+	+

Bei dieser Konzentration zeigten die Varianten Filtrat, Filtrieren + Zentrifugieren, Zentrifugat + Puffer bei 3 dpi negative Ergebnisse des ELISA-Tests, abweichend jedoch das Ergebnis Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26 °C hinsichtlich des Ergebnisses zu Tabelle 11.

Tabelle 13: Konzentration **1,2 x 10** cfu/ml

	3 dpi	5 dpi	7 dpi
Presssaft	-	-	+
Presssaft 26°C	-	+	+
Presssaft 20°C	+	+	+
Filtrat	-	+	+
Filtrat 20°C	+	+	+
Filtrat 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren	-	-	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 20°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren + NL 26°C	+	+	+
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand	-	-	-
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 20°C	-	-	-
Filtrieren + Zentrifugieren Überstand 26°C	+	+	+
Zentrifugat + Puffer	-	-	+
Zentrifugat + NL 20°C	+	+	+
Zentrifugat + NL 26°C	+	+	+
Zentrifugat Überstand	-	+	+
Zentrifugat Überstand + NL 20°C	-	-	-
Zentrifugat Überstand + NL 26°C	-	+	+

Bereits bei 3 dpi sind 8 Varianten von 18 positiv. Bei den Varianten Presssaft allein, Filtrieren + Zentrifugieren und Zentrifugat + Puffer ist zu sehen, dass sich die Bakterien erst bei 7 dpi mittels ELISA nachweisen ließen. Bei den Varianten Presssaft 26 °C und Filtrat alleine waren die Proben bei 5 dpi bereits positiv.



Abbildung 14: ELISA-Platte, Konzentration $1,2 \times 10^8$ cfu/ml (Lj. Petrina)

4.3 Ergebnisse der PCR-Untersuchungen

Für die PCR-Tests wurde je ein kleines Stück des Stängels einen Zentimeter oberhalb der Inokulationsstelle entnommen. Die PCR Untersuchungen erfolgten als Kontrolle für die ELISA-Tests. So waren z. B. die Proben bei der höchsten Konzentration (8×10^8 cfu/ml) bereits bei 3 dpi alle deutlich positiv sowie auch bei den Konzentrationen 8×10^4 und 8×10^2 cfu/ml (s. Abb.15).

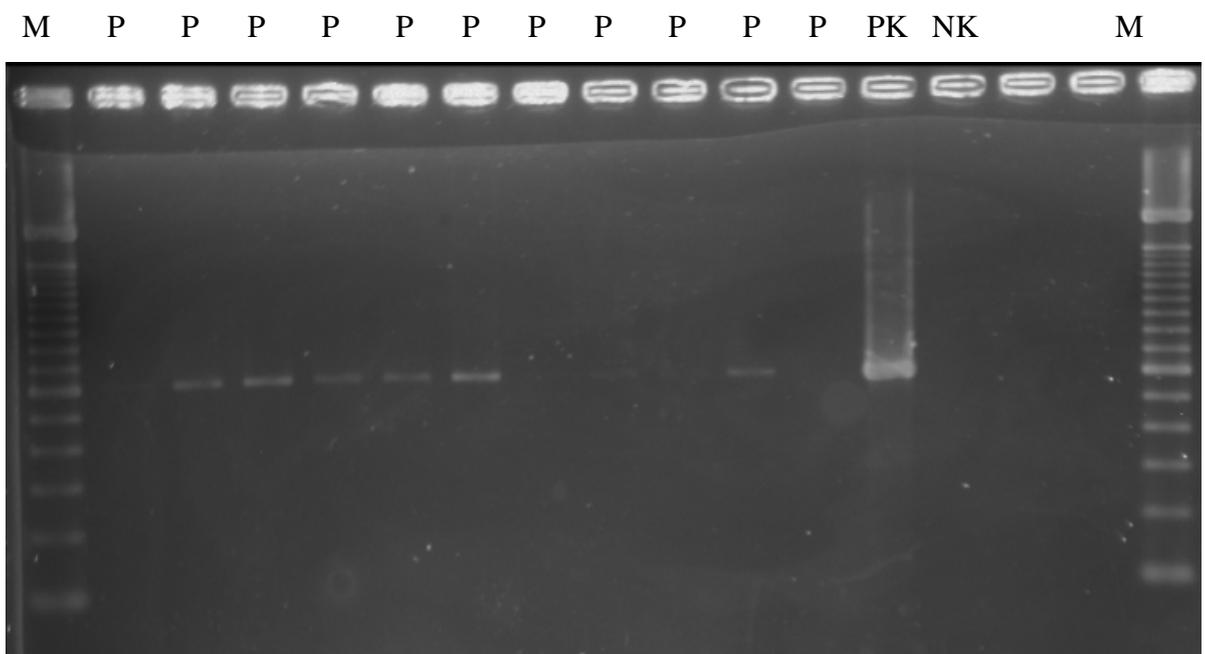


Abbildung 15: Agarose-Gel bei der Konzentration 8×10^2 cfu/ml nach 3Tage (Lj.Petrina)
M (Marker), P (Probe), PK (Positivkontrolle) und NK (Negativkontrolle)

5 Diskussion

Die Nachweisgrenze der praxisüblichen ELISA-Tests liegt derzeit bei 8×10^4 cfu/ml (DE LEON L., SIVERIO F. und RODRIGUEZ A. 2006). Mit z. B. einer Multiplex-PCR lässt sich die Nachweisgrenze auf 5×10^2 cfu/ml (DREIER et al. 1995) und mittels Bio-PCR auf 4×10^2 cfu/ml (BUROKIENE 2006) senken.

Wie Untersuchungen an Saatgut und bei der Saatgutübertragung ergaben, sind die Nachweise dieses Pathogens an diesen Matrices nicht immer erfolgreich und sehr aufwendig. Nach ISTA (1996) sind 10.000 Samen als Standardgröße und als Minimum 2.000 Samen zur Testung vorgeschlagen. Hierzu vergleichen MILIJASEVIC et al. (2009) für den Nachweis von Cmm an Saatgut vier verschiedene Methoden: Isolation und Kultivierung der Bakterien auf Selektivmedien, eine Bio-PCR, eine Anreicherungs-PCR und eine PCR direkt aus dem Saatgut. Hierfür verwendeten sie 2.000 bzw. 5.000 Samenkörner. Diese Saatgutproben wurden jeweils mit einem, mit fünf und mit 10 infizierten Samenkörnern vermengt. In der Variante mit 2.000 Samenkörnern konnte mit allen Methoden ein positiver Nachweis erbracht werden, in der Variante mit 5.000 Samenkörnern wurde kein einziger positiver Nachweis erzielt. In einer ähnlichen Versuchsanstellung konnte HADAS et al. (2005) mit Hilfe eines zusätzlichen Anreicherungsschrittes einmal bei einem infizierten Samenkorn in 10.000 Samenkörnern Cmm nachweisen. Dies war jedoch nicht reproduzierbar. Saatgutpartien, die mit weniger als mit 58 cfu/g infiziert wurden, verursachten an den daraus erwachsenen Jungpflanzen keinerlei Krankheit, aber bei einer Konzentration von etwa 1.000 cfu/g erkrankten von 2.000 Jungpflanzen 78.

An Tomatenjungpflanzen konnte BUROKIENE (2006) *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* mittels BIO-PCR Methoden relativ schnell nachweisen. Seine Untersuchungen haben die Sensitivität von BIO-PCR mit den verwendeten Primer-Sets CMM5 und CMM6 verbessert. Die Untersuchungen folgten an fünf Wochen alten Jungpflanzen, die ca. 40 cm groß waren. Die Stängelteile wurden 8 cm oberhalb der Inokulationsstelle genommen. Die Proben waren bereits nach 3 Tagen positiv, die Konzentration betrug 4×10^2 cfu/ml.

Eine Jungpflanzengröße für die Kultivation im geschützten Anbau von 40 cm entspricht jedoch nicht der mitteleuropäischen Praxis.

In diesen Zusammenhang erschien es wichtig, Tomatenjungpflanzen mit niedrigeren Bakterienkonzentrationen zu inokulieren, die Bakterien in den gepressten Pflanzensäften anschließend anzureichern und mittels ELISA und PCR nachzuweisen. In Untersuchungen von PINE, GROGAN und HEWITT (1955) hat sich gezeigt, dass die Bakterien erst von der Infektionsstelle im Stängel nach unten wandern (etwa 2 Millimeter) und nach 24 Stunden auch weiter unterhalb der Infektionsstelle und nur innerhalb der Gefäße. Nach fünf Tagen wurden die Bakterien auch oberhalb der Inokulationsstelle festgestellt. Dadurch, dass sich die Bakterien langsam vermehren und sich unmittelbar nach der Inokulation nur noch im Xylem befinden, entschied ich mich die Stängelteile für die PCR ca. 1 cm oberhalb der Inokulationsstelle zu testen. Eine erste Probennahme erfolgte 3 Tage nach erfolgter Inokulation.

Um mit den derzeit üblichen ELISA-Tests einen positiven Nachweis führen zu können, sollte mit den angeführten adaptierten Verfahren der Bakteriengehalt in den Pflanzenpresssäften soweit erhöht werden, da Ausstriche von Pflanzensaft auf Nährmedien mit anschließendem ELISA verdächtiger Bakterienkolonien wegen ihrer längeren Untersuchungsdauer nicht zweckmäßig sind.

Laut EPPO-Protokoll PM 7/42(1) (ANONYM 2005) werden für die Nachweise an Pflanzen, die Symptome zeigen, jene Teile zur Testung entnommen, die deutlich befallen sind. Die Nachweise bei symptomlosen Tomatenpflanzen werden an Stängeln durchgeführt. Hierfür wird die äußere Epidermis entfernt und die Gefäßbündel in sterilem Wasser gelegt und weiter getestet (EPPO 2005). In meinen Untersuchungen wurden ganze Stängel, ohne Entfernung der Epidermis, verwendet. Getrennt wurden ganze Blätter getestet. Aus den Blättern konnte in keiner Variante, nicht einmal bei einer Inokulationsmenge von 8×10^8 cfu/ml und nach 14 Tagen, ein positiver Nachweis erbracht werden, daher wurden für die weiteren Untersuchungen nur mehr Stängelproben verwendet.

Auf Grund der Anreicherung der Bakterien mit den verwendeten Verfahren – bebrüten, filtrieren, zentrifugieren – alleine oder in Kombination, konnte der Titer der Bakterien in den Stängeln der Jungpflanzen an die Nachweisgrenze der praxisüblichen ELISA-Tests angehoben werden. Ebenso ist es gelungen, mittels PCR einen Nachweis direkt aus frischem Pflanzenmaterial zu führen. Der für die Praxis kostengünstigere Nachweis ist der mittels ELISA-Test.

Bei den Stängeln lassen sich einige Unterschiede zwischen den 18 untersuchten Varianten der Presssäfte nach der Konzentration der Inokulationslösung erkennen sowie auch in der Zeit der Probenahme (dpi) und in den Varianten selbst.

6 Zusammenfassung

Der Nachweis von *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* ist an Tomatenjungpflanzen nicht immer möglich. Das Pathogen vermehrt sich sehr langsam und Symptome sind in der Regel erst bei der Bildung der ersten Früchte zu sehen. Da offenbar der Gehalt der Bakterien in den Jungpflanzen zu gering ist, um sie mit den derzeit praxisüblichen ELISA-Tests nachzuweisen, galt es, die Bakteriendichte zumindest auf die Nachweisgrenze der ELISA-Tests anzuheben.

Zunächst wurden Tomatenjungpflanzen im DC-Stadium 23 mit verschiedenen konzentrierten Bakterienlösungen künstlich inokuliert. Anschließend wurden Blätter und Stängel getrennt untersucht. Die Ergebnisse aus den Blattproben waren jedoch in den Kontrollvarianten (8×10^8 cfu/ml) stets negativ, jene aus den Stängeln immer positiv. Daher wurden für die weiteren Untersuchungen nur mehr die Stängel der Jungpflanzen verwendet.

Es wurden drei Grundverfahren alleine und in verschiedener Kombination untereinander angewendet, um den Gehalt der Bakterien im Presssaft der Pflanzen anzureichen, z. B. bebrüten bei Temperaturen 20 und 26 °C, filtrieren und zentrifugieren. Als Kontrolle diente der Test direkt aus dem Pflanzensaft einer künstlich inokulierten Pflanze. Proben für den Nachweis mittels ELISA wurden 3, 5 und 7 Tage nach künstlicher Inokulation genommen. Von allen Varianten waren bereits bei einer inokulierten Bakterienkonzentration von $1,2 \times 10$ cfu/ml bei einer Probenahme 3 Tage nach Inokulation und einer Bebrütung des Presssaftes bei 20 °C (16 Stunden), ein Filtrat dieses Presssaftes ebenfalls bei Inkubation bei 20 °C (16 Stunden) sowie Filtrat + Zentrifugat bei 20 °C (16 Stunden) als auch das Zentrifugat alleine bei 20 °C (16 Stunden) im ELISA-Test positiv. Es konnte damit der Bakterientiter von eventuell in Jungpflanzen vorhandener Bakterien auf die Nachweisgrenze des ELISA-Tests erhöht werden.

Darüber hinaus gelang es auch einen Nachweis von *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* aus Jungpflanzen des DC-Stadiums 23 mittels PCR direkt aus Pflanzen zu führen. Die kostengünstigere Variante zur Testung von Tomatenjungpflanzen auf Befall durch *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* stellt der ELISA-Test dar.

7 Literaturverzeichnis

- ARK P. A., 1944: Studies on bacterial canker of tomato. *Phytopathology* 34, 394-400.
- AGARWAL V. K. & SINCLAIR J. B., 1997: Principles of Seed Pathology, Second Edition, Boca Raton, FL: CRC Press. 539 pp.
- ANONYM, 2005: In: EPPO/OEPP PM 7/42(1): *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Bulletin 35, 275-283.
- ANONYM, 2009: EPPO-Data Sheets on Quarantine Pests: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003 (http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_ds.pdf).
- BEDLAN G., 1999: Gemüsekrankheiten, 3. überarbeitete Auflage, 198 pp.
- BEDLAN G., 2009: Die bakterielle Tomatenwelke an Tomate, Paprika und Melanzani; ÖKomenischer Gärtnerbrief 2, 34-36.
- BEDLAN G. & PLENK A., 2009: *Clavibacter*-Welke an Paprika und Aubergine. Gemüse, Heft 2, 10-11.
- BOLKAN H. A., WATERS C. M. & FATMI M., 1996: ISTA Handbook On Seed Health Testing, Working Sheet no 67. Zurich, Switzerland.
- BROCK T. D., MADIGAN M. T. & MARTINKO J. M., 1994: Biology of Microorganisms, sixth edition, 311 pp.
- BRYAN M. K., 1930: Studies on bacterial canker of tomato. *Journal of Agricultural Research* 41, 825-851.
- BUROKIENE D., 2006: Early detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seedlings, *Agronomy Research* 4 (Special issue), 151-154.
- DAVIS M. J., GILLASPIE A. G., VIDAVER A. K. & HARRIS R. W., 1984: *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. & *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 107-117.

DE LEON L., SIVERIO F. & RODRIGUEZ A., 2006: Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation, *Journal of Microbiological Methods* 67, 147.

DREIER J., BERMPOHL A. & EICHENLAUB R., 1995: Southern Hybridization and PCR for Specific Detection of Phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, *Phytopathology* 85, 462-468.

FAOSTAT, 2009: <http://faostat.fao.org>.

FENNER L., 1931: Bacterial canker of tomato and its distribution with the seed from infected fruit. *J. Econ. Ent.* 24, 544-547.

FISCHER M. A., ADLER W. & OSWALD K., 2008: Exkursionsflora von Österreich, Liechtenstein, Südtirol. 3. Auflage, Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, 1392 pp.

FTAYEH R., MAVRIDIS A. & RUDOPHL K., 2004: Überleben des Erregers der bakteriellen Tomatenwelke, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, im Boden bei unterschiedlichen Bedingungen. – *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Fortstwirtschaft.* 396, 348.

GLEASON M. L., BRAUN E. J., CARLTON W. M. & PETERSON R. H., 1991: Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology* 81, 1519–1523.

GROGAN R. G., KENDRICK J. B., 1953: Seed transmission, mode of overwintering and spread of bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathology Abstracts* 43, 473.

HADAS R., KRITZMAN G., KLIETMANN F., GEFEN T. & MANULIS S., 2005: Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds, *Plant Pathology* 54, 643-649.

HERRMANN K., 1979: Übersicht über die Inhaltsstoffe von Tomate. *Z. Lebensmittel Untersuch. Forsch.* 169, 179-200.

HOLT J. G., KRIEG N. R., SNEATH P. H. A., STALEY J. T. & WILLIAMS S. T. (Editors), 1994: Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 787 pp.

KRUG H., LIEBIG H-P. & STÜTZEL H. 2002: Gemüseproduktion, 463 pp.

LEHMANN C., 1953: Die Tomate. Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig, Leipzig, 47 pp.

MILJASEVIC S., TODOROVIC B., POCNIC I. & STEPANOVIC M., 2009: Comparison of Different Methods in Detection of *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* in Tomato Seeds, ISHS Acta Hort.808, 103-110.

ORTH H., 1937: Untersuchungen über die Biologie und Bekämpfung des Erregers der Bakterienwelke der Tomaten. Zentralbl. Bakt. II. 96, 376-402.

PINE T. S., GROGAN R. G. & HEWITT W. B., 1955: Pathological anatomy of bacterial canker of young tomato plants. Phytopathology, 54, 267-271.

TIWARI R. N., CHOUDHURI B., 1986: Solanaceous Crops, in Bose, T. K. & Som, M. G. (eds.): Vegetable Crops in India. Calcutta, Naya Prokash, 248-384.

SCHLEGEL H. G. & ZABOROSCH CH., 1992: Allgemeine Mikrobiologie. 7. überarbeitete Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 266 pp.

SMITH E. F., 1910: A new tomato disease of economic importance. Science (Washington) 31, 794-796.

STAPP C. 1958: Pflanzenpathogene Bakterien. Verlag Paul Parey, 259 pp.

STÖGER A. & RUPPITSCH W., 2004: A rapid and sensitive method for the detection of *Xanthomonas fragariae*, causal agent of angular leafspot disease in strawberry plants. Journal of Microbiological Methods 58, 281-284.

STÜWE B. & VON TIEDEMANN A., 2010: Befall und Ausbreitung von *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* in unterschiedlich anfälligen Tomatensorten. Julius-Kühn-Archiv, 428, 192-193.

VAN VAERENBERGH J. & CHAUVEAU J. F., 1985: Hostplant inoculations for detection of *Corynebacterium michiganense*- Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent, 50, 937-995.

VOGEL G., 1996: Handbuch des speziellen Gemüsebaues. Ulmer Verlag, 1127 pp.

WENZL H., 1937: Die Bakterienwelke der Tomaten in Österreich. Die Landeskultur, 4, 223-230.

8 Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
cfu	colony-forming units
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis</i>
dpi	day past infection
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organisation
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
ISTA	International Seed Testing Association
NB	Nutrient Broth
NL	Nährlösung
ONC	over night culture
PCR	Polymerase Chain Reaction
PM	Phytopathological Measures
rzf	relative Zentrifugalbeschleunigung
YPG	Yeast Peptone Glucose (Nährlösung)
YPGA	Yeast Pepton Glukose Agar (Nährmedium)