

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	14
2.1 Nährmedien, Puffer und Lösungen	14
2.1.1 Nährmedien	14
2.1.2 Pufferlösungen	16
2.2 Herkunft, Isolierung, Konservierung und Kultivierung von Bakterienisolaten	16
2.2.1 Herkunft	16
2.2.2 Isolierung	18
2.2.3 Konservierung und Kultivierung der Bakterienisolate	19
2.2.4 Herstellung einer <i>X. fragariae</i> -Suspension mit bekanntem Zelltiter	20
2.3 Infektionsversuche und Gewinnung von infiziertem Pflanzenmaterial	20
2.3.1 Pflanzenanzucht	20
2.3.2 Inokulation	21
2.3.2.1 Infiltration	21
2.3.2.2 Tauchinokulation	22
2.3.2.3 Schnitt- und Tauchinokulation an Stolonen	23
2.3.3 Versuchssysteme	23
2.3.3.1 Symptomentwicklung an verschiedenen Sorten	23
2.3.3.2 Einfluss der Inokulum-Konzentration auf die Symptomentwicklung	23
2.3.3.3 Untersuchungen zur systemischen Ausbreitung von <i>X. fragariae</i> im Blatt	24
2.3.3.4 Untersuchung zur systemischen Ausbreitung an Ausläuferpflanzen	25
2.3.4 Auswertung	25
2.4 Nachweisverfahren: Durchführung, Prüfung, Entwicklung und Optimierung	27
2.4.1 Probenaufarbeitung und Prüfung verschiedener Nachweisverfahren	27
2.4.1.1 Herstellung von Schüttelextrakt und Homogenat	27
2.4.1.2 Künstlich kontaminierte Proben zur Prüfung von Nachweisverfahren	28
2.4.1.3 Prüfung der Eignung von Mischproben	29

2.4.2 Bio-Test	30
2.4.3 Immunofluoreszenztest (IF-Test)	30
2.4.4 Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....	31
2.4.4.1 DNA-Extraktion	31
2.4.4.1.1 Extraktion von Bakterien-DNA	31
2.4.4.1.2 Extraktion von DNA aus Pflanzenproben	33
2.4.4.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	34
2.4.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	34
2.4.4.3.1 Primer.....	34
2.4.4.3.2 Amplifikation	37
2.4.4.3.3 Gelelektrophorese und Dokumentation	39
2.4.4.4 Bio-PCR	39
2.4.4.5 Immunocapture-PCR (IC-PCR).....	40
2.4.4.6 Immunocapture-Bio-PCR (IC-Bio-PCR)	42
2.4.5 Primer-Design.....	43
2.5 Herkunft, Probenahme und Untersuchung von Praxisproben	44
2.5.1 Untersuchungen an Jungpflanzen und Pflanzen aus Feldbeständen	44
2.5.1.1 Probenahme in Feldbeständen	44
2.5.1.2 Beprobung von Jungpflanzen.....	45
2.5.1.3 Nachweis von <i>X. fragariae</i>	46
2.5.2 Untersuchung von Pflanzen aus der Gewebekultur	46
2.5.3 Deutschlandweite Erhebung zum Vorkommen von <i>X. fragariae</i>	46
2.6 Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie	47
3 Ergebnisse	48
3.1 <i>in-vitro</i> Kultivierung von <i>X. fragariae</i>	48
3.2 Untersuchungen zur Pathogenese von <i>X. fragariae</i>	49
3.2.1 Anfälligkeit verschiedener Sorten	49
3.2.2 Symptomentwicklung in Abhängigkeit von der Inokulum-Konzentration ...	53
3.2.3 Histologische Untersuchungen zur Besiedlung des Pflanzengewebes.....	56
3.3 Entwicklung einer PCR-Methode zum Nachweis von <i>X. fragariae</i>	59
3.3.1 Prüfung und Auswahl von PCR-Primern.....	59
3.3.1.1 Eignung der Primer zur Amplifikation von <i>X. fragariae</i> -DNA	59
3.3.1.2 Sensitivität der PCR.....	60

3.3.1.3	Spezifität der Primer	63
3.3.1.4	Optimierung der PCR-Bedingungen	63
3.3.2	Kombination der PCR mit serologischer Isolierung und biologischer Anreicherung.....	65
3.3.2.1	Immunocapture-PCR (IC-PCR)	66
3.3.2.2	Immunocapture-Bio-PCR (IC-Bio-PCR).....	67
3.3.2.3	Bio-PCR.....	69
3.3.3	Erhöhung der Sensitivität mittels nested PCR.....	72
3.3.4	Spezifische Primer für die PCR-Amplifikation im Bereich des rDNA Operons	80
3.3.5	Probenaufarbeitung.....	88
3.3.5.1	Probenumfang von Mischproben	88
3.3.5.2	Desinfektion	89
3.4	Nachweis von <i>X. fragariae</i> in natürlich infizierten Erdbeerpflanzen	90
3.4.1	Nachweis und Verteilung von <i>X. fragariae</i> in natürlich infizierten Erdbeerpflanzen	91
3.4.2	Nachweis von <i>X. fragariae</i> in symptomlosen Jungpflanzen	96
3.4.3	Erhebung zum Vorkommen von <i>X. fragariae</i>	98
3.5	Infektionsversuche zur systemischen Ausbreitung von <i>X. fragariae</i>	99
4	Diskussion	103
4.1	Methodenentwicklung	103
4.2	Anwendung der geprüften Nachweisverfahren	121
5	Zusammenfassung	134
6	Summary	138
7	Literaturverzeichnis	142
Anhang	157