

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Vorbemerkung	1
1.2. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>graminis</i>, Erreger der bakteriellen Welke der Futtergräser	2
1.3. Taxonomie der Xanthomonaden	5
1.4. Der Nachweis bakterieller Phytopathogene	6
1.4.1 Enzymimmunoassay (EIA)	7
2. Aufgabenstellung	9
3. Material und Methoden	12
3.1. Bakterien-Stammsammlung - Dauerhafte Konservierung der Isolate	12
3.2. In vitro Kultivierung der Bakterien	13
3.2.1. Routinevermehrung auf Festmedium	13
3.2.2. Massenvermehrung in Flüssigmedium	13
3.2.2.1. Wachstumskurven in Flüssigmedium	13
3.2.2.2. Bestimmung der Zahl der colony-forming-units	14
3.3. Charakterisierung der Isolate	14
3.3.1. Beurteilung des Wachstums bei verschiedenen Zusätzen im Nährmedium	14
3.3.1.1 Nachweis der Esterase-Aktivität	14
3.3.1.2 Fähigkeit zur Gelatine-Verflüssigung	15
3.3.1.3 Fähigkeit zur Esculin-Hydrolyse	15
3.3.1.4 Fähigkeit zur Schwefel-Wasserstoff-Bildung aus Cystein	15
3.3.1.5 Fähigkeit zur Urease-Bildung	15
3.3.1.6 Nachweis einer Amino-Peptidase-Aktivität	16
3.3.1.7 Nachweis einer Lecithinase-Aktivität	16
3.3.1.8 Wachstum bei verschiedenen Glucose-Konzentrationen	16
3.3.1.9 Wachstum bei verschiedenen Temperaturen	16
3.3.1.10 Säurebildung bei verschiedenen C-Quellen	16
3.3.1.11 Wachstum in Anwesenheit verschiedener Schwermetalle	16
3.4. Pflanzenversuche	17
3.4.1. Liste der verwendeten Gräserarten und Sorten	17
3.4.2. Bonitur des Befalls	18
3.4.3. Gewächshaus- und Klimakammerversuche	18
3.4.3.1. Kultivierung des Pflanzenmaterials	18
3.4.3.2. Künstliche Infektion der Pflanzen	19
3.4.3.3. Reisolation von <i>X.c.pv.graminis</i> aus Gräsern	19
3.4.3.4. Klimakammerversuche	20
3.4.4. Feldversuch	20
3.4.4.1 Versuchsanlage	20

3.4.4.2. Beerntung des Versuchs	21
3.4.4.3. Künstliche Infektion des Feldversuchs	21

3.5. Biochemische Untersuchungen	22
3.5.1. Analyse der Fettsäuremuster	22
3.5.2. Produktion des Antiserums	23
3.5.2.1 Immunisierung der Kaninchen	23
3.5.2.2 Abnahme und Aufarbeitung des Serums	23
3.5.3. Elektrophoretische Trennung der Bakterienproteine	23
3.5.3.1 Probenaufbereitung	24
3.5.3.2. Stammlösungen für Polyacrylamid-Gele	25
3.5.3.3 Gießen der Gele	26
3.5.3.4 Elektrophoretische Trennung der Proteine	27
3.5.3.5 Färbung der Gele	27
3.5.4. Western-Blotting	27
3.5.4.1. Aufbau des Blot-Sandwichs	27
3.5.4.2 Blocken der Nitrocellulosemembran	28
3.5.4.3 Inkubation der Antikörper und Waschen der Nitrocellulosemembran	28
3.5.4.4 Färbung der Nitrocellulosemembran mit FastRed	29
3.5.4.5 Färbung der Nitrocellulosemembran mit NBT / BCIP	30
3.5.5. Dot-ELISA	30
3.5.6. Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)	31
3.5.6.1. Testdurchführung	31
3.5.6.2. Auswahl des Plattentyps	32
3.5.6.3. Optimierung der eingesetzten Antikörper-Konzentrationen	32
3.5.6.4. Untersuchungen zur Sensitivität des ELISA-Tests	32
3.5.6.5. Untersuchungen zur Spezifität des ELISA-Tests	32
3.5.6.6. Vorbereitung des Pflanzenmaterials	33
3.5.7. Nachweis mit Hilfe von Immuno-Sticks	33
3.5.7.1. Durchführung der qualitativen Tests	33
3.5.7.2 Entwicklung eines quantitativen Tests	34
3.6. Mikroskopische Untersuchungen	34
3.6.1. Fixierung und Einbettung der Pflanzenproben	34
3.6.2. Anfertigung von Dünnschnitten	35
3.6.3. Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Wachstum in Flüssigmedium	36
4.1.2. Zahl der colony-forming-units	37
4.2 Charakterisierung der Isolate	39
4.2.1 Wachstum auf Nährböden mit verschiedenen Zusätzen	39
4.2.2 Enzymatische Reaktionen	40
4.2.3. Säurebildung bei verschiedenen Substraten	41
4.2.4. Wachstum in Anwesenheit verschiedener Schwermetalle	42
4.2.5 Anmerkungen zur statistischen Analyse	43

4.3 Fettsäuremuster verschiedener <i>Xanthomonas</i>-Isolate	43
4.4 Pflanzenversuche	49
4.4.1 Virulenz von <i>X.c.pv.graminis</i> an <i>L.multiflorum</i>	49
4.5 Feldversuch	53
4.5.1 Frischmasseerträge	53
4.5.2. Trockenmasseerträge	56
4.5.3. Bonitur des Feldbestandes	58
4.6 Sortenversuche in Zusammenarbeit mit dem Bundessortenamt	60
4.6.1 Sortenversuche mit <i>L. multiflorum</i>	60
4.6.2 Sortenversuche mit <i>Arrhenatherum elatius</i> und <i>Trisetum flavescens</i>	65
4.7. Immunologischer Nachweis von Xanthomonaden mit Hilfe eines Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)	66
4.7.1. Vergleich zweier handelsüblicher Mikrotiterplatten	66
4.7.2. Optimale Konzentration der primären Antikörper	67
4.7.3. Abhängigkeit der Extinktion bei 405 nm von der Bakterienkonzentration	69
4.7.4 Aufbau des Antikörper-Sandwichs - Vergleich zweier Methoden	70
4.7.5 Einfluß der Lagerung von Bakteriensuspension	71
4.7.6 Intraserielle und interserielle Präzision des Testes	72
4.7.7. Zeitlicher Verlauf des Substratumsatzes	73
4.7.8. Substratumsatz bei verschiedenen Substratkonzentrationen	74
4.7.9. Vergleich der verschiedenen Blutabnahmen	76
4.8. Immunologischer Nachweis von <i>X.c.pv. graminis</i> in Pflanzenmaterial	77
4.8.1. Einfluß des Extraktionspuffers auf die Meßergebnisse	77
4.8.2. Nachweis von <i>X.c.pv.graminis</i> in <i>L. multiflorum</i> nach künstlicher Infektion ...	78
4.8.3. Differenzierte Untersuchung des Befalls von Haupt- und Nebentrieben	79
4.9. Immunologischer Nachweis von Xanthomonaden in Feldproben	82
4.10. Immunologischer Nachweis von <i>Xanthomonas</i> mit Immuno-Sticks	86
4.10.1. Entwicklung eines qualitativen Nachweisverfahrens	86
4.10.2 Erste Ergebnisse zur Entwicklung eines quantitativen Testverfahrens mit Immuno-Sticks	88
4.11. Dot-Immuno-Binding-Assay	89
4.11.1. Konzentrationsabhängigkeit der Nachweisreaktion	89
4.11.2. Nachweis von <i>X.c.pv.graminis</i> in Pflanzenproben	90
4.12. Elektrophoretische Trennung der bakteriellen Proteine	91
4.12.1. SDS-PAGE	91
4.12.2. Western-Blotting	92
4.12.2.1 Kontrolle auf unspezifische Reaktionen	92
4.12.3 Vergleich der Blutabnahmen	93

4.12.4 Western-Blot verschiedener Isolate der Bakterien-Stammsammlung	93
4.13. Nachweis von <i>X. c.pv.graminis</i> in Pflanzen mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie	94
5. Diskussion	96
5.1 Charakterisierung der Isolate der Stammsammlung und Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse der untersuchten Isolate	96
5.2 Virulenz von <i>X. c. pv. graminis</i>	102
5.3 Fettsäuremusteranalyse	103
5.4 Sortenversuche mit <i>L. multiflorum</i>, <i>A. elatius</i> und <i>T. flavescens</i>	104
5.5 Feldversuch mit künstlicher Infektion von <i>Lolium multiflorum</i> mit verschiedenen <i>Xanthomonas</i>-Pathovaren	105
5.5.1 Auswirkungen der Infektion auf den Ertrag	105
5.5.2 Nachweis des Befalls mit einem ELISA-Test	106
5.5.2.1 Bewertung der Kontrollen	106
5.5.2.2 Festlegung eines Cut-Off-Wertes für Feldproben	107
5.5.2.3 <i>Xanthomonas</i> -Nachweis im Feldversuch 1993	108
5.6 Entwicklung von Nachweistechiken für Xanthomonaden in Gramineen	110
5.6.1 Elektrophoretische Trennung und Western-Blot bakterieller Proteine	110
5.6.2 Dot-Immuno-Binding-Assay (Dot-Blot-Verfahren)	111
5.6.3 Nachweis des <i>Xanthomonas</i> -Befalls mit Immuno-Sticks	112
5.6.4 Entwicklung eines ELISA-Tests für gräserpathogene Xanthomonaden	112
5.7 Erste Anwendung des ELISA-Tests und der Immunfluoreszenzfärbung zum Frühnachweis der Bakteriellen Gräserwelke	113
6. Zusammenfassung	115
7. Ausblick	116
Danksagung	121
Literaturverzeichnis	123
Anhang	135