

**Untersuchungen zur Interaktion von *Clavibacter michiganensis* subsp.  
*michiganensis* mit unterschiedlichen Tomatensorten und zur  
phytosanitären Saatgutbehandlung mittels Plasma unter  
Atmosphärendruck**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Agrarwissenschaften  
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von  
Brit Stüwe  
geboren in Hoyerswerda

Göttingen, September 2010

D7

1. Referent: Prof. Dr. Andreas von Tiedemann

2. Referent: Prof. Dr. Petr Karlovsky

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2010

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	1
1.2. Einsatz von Plasma unter Atmosphärendruck zur Desinfektion.....	4
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>8</b>
2.1. Verwendete Chemikalien, Geräte und Materialien.....	8
2.2. Verwendete Medien und Lösungen.....	11
2.3. Pflanzenmaterial.....	14
2.4. Bakterienisolate und Bakterienanzucht.....	14
2.5. Pflanzenanzucht und Inokulation.....	15
2.6. Krankheitsbonitur.....	15
2.7. Bioassay mit Kulturfiltraten.....	15
2.8. Histochemische Färbe- und Nachweismethoden an Frischmaterial.....	16
2.8.1. Toluidinblau-Färbung (Thyllenbildung).....	16
2.8.2. Phloroglucinol-Test (Lignin).....	16
2.8.3. Eigenfluoreszenz (Phenole).....	17
2.9. Paraffinverfahren.....	17
2.9.1. Fixierung.....	17
2.9.2. Entwässerung und Einbettung in Paraffin.....	17
2.9.3. Schneiden und Aufbringen auf gelatinisierte Objektträger.....	18
2.9.4. Herstellung gelatinierter Objektträger.....	18
2.9.5. Entparaffinisierung.....	19
2.10. Histochemische Färbe- und Nachweismethoden an Paraffinschnitten.....	19
2.10.1. Sudanschwarz (Lipide).....	19
2.10.2. Perjod-Schiff Reaktion (Polysaccharide).....	19
2.10.3. Anilinblau (Kallose).....	20
2.10.4. Sudan III (Suberin).....	20
2.10.5. Coomassie brilliant blue (Proteine).....	20
2.10.6. Rutheniumrot (Pektin).....	20
2.10.7. Immunofluoreszenzfärbung für Untersuchungen am konfokalen Laser- Scanning-Mikroskop (CLSM).....	20
2.10.8. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen (REM).....	21
2.11. Nachweis der Pathogenausbreitung.....	21
2.11.1. Ausplattierung auf den Selektivmedien R und mSCM.....	22
2.11.2. DNA-Extraktion.....	23
2.11.3. PCR.....	23
2.11.4. Gelelektrophorese.....	24
2.12. Plasmabehandlungen.....	24
2.12.1. Plasmabehandlung von Objektträgern mit <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	24
2.12.2. Plasmabehandlung von infizierten Tomatensamen.....	25

2.12.3. Keimtests .....	26
2.13. Statistische Auswertung .....	26
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1. Anfälligkeit der Tomatensorten .....	27
3.2. Mikroskopische Untersuchungen der Befallsreaktionen .....	29
3.3. Pathogenausbreitung in unterschiedlich anfälligen Tomatensorten .....	42
3.4. Schadwirkung von Kulturfiltraten .....	44
3.5. Lokalisation von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> an Tomatensamen .....	46
3.6. Lokalisation von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> bei Keimlingen .....	47
3.7. Abtötung von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> auf Objektträgern mittels Plasmabehandlung .....	49
3.8. Saatgutdesinfektion mittels Plasmabehandlung .....	51
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>54</b>
4.1. Histologische Befalls- und Resistenzreaktionen in Tomaten gegenüber <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .....	54
4.2. Befallsstärke in Abhängigkeit von Pathogenausbreitung und Phytotoxinproduktion .....	60
4.3. Lokalisation von <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> am Samen und Keimling .....	63
4.4. Wirkung von Plasma <i>invitro</i> und am Samen .....	66
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>
Summary .....	73
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>84</b>
7.1. Abkürzungen und Symbole .....	84
7.2. Schwefelmessungen .....	86
7.3. Temperaturkurven zur Plasmabehandlung .....	89
7.4. Plasmabehandlung von anderen Samen .....	90
7.5. Einfluss der Plasmabehandlung auf Pilze .....	93
7.6. Untersuchungen zur Abbaubarkeit von Mykotoxinen .....	95

## Danksagung

## Lebenslauf

## 1. Einleitung

### 1.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ist ein Gram-positives Bakterium und gehört zur Familie der *Microbacteriaceae*. Die Gattung *Clavibacter* besteht nur aus der einen phytopathogenen Spezies *Clavibacter michiganensis*, welche anhand ihrer Wirtsspezifität in fünf Subspezies unterteilt wird. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ist der Verursacher von Ringfäule an Kartoffeln (*Solanum tuberosum*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* verursacht eine Beeinträchtigung des Wachstums und Welke an Alfalfa (*Medicago sativa*), *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* kommt an Mais (*Zea mays*) vor und ruft dort eine Welke, sowie Fäule hervor, *Clavibacter michiganensis* subsp. *tesselarius* verursacht Blattflecken an Weizen (*Triticum aestivum*) und *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ist der Verursacher der bakteriellen Welke an Tomaten (*Solanum lycopersicum*) (Gartemann et al. 2003, Eichenlaub et al. 2006).

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) ist ein aerobes, unbegeißeltes, kommaförmiges Bakterium, welches keine Sporen bildet. Auf verschiedensten Medien entwickelt es langsam wachsende, gelbe, glatte, runde Kolonien, aber auch pink, weiß oder orange farbene Mutanten sind bekannt (EPPO 2005). Es ist weltweit verbreitet und verursacht große ökonomische Verluste im Tomatenanbau, da es ganze Tomatenbestände durch die verursachte Welke vernichtet und Früchte durch die Ausbildung der typischen „bird’s eyes“ vermarktungsunfähig macht. Ist der Boden kontaminiert, dringen die Bakterien über Wunden im Wurzelbereich oder am Stängel in die Pflanze ein und besiedeln die Xylemgefäße. Erste Symptome der systemischen, vaskulären Krankheit ist das halbseitige Welken der Blätter, was sich später auf alle Blätter ausbreitet. Desweiteren werden Läsionen am Stängel und eine Verbräunung der Leitgefäße sichtbar und die Pflanze stirbt schließlich ab. Findet die Infektion in einer späten Phase der Pflanzenentwicklung statt, können auch die Früchte infiziert werden, die dann die typischen Augenflecken („bird’s eyes“) aufweisen und kontaminierte Samen hervorbringen. Diese Samen sind der Hauptverbreitungsfaktor der Krankheit (ISF 2008).

Warum es zur Ausbildung der typischen Welke durch *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kommt war lange unklar. Es wurde vermutet, dass das Bakterium aufgrund seines primären Befalls der Xylemgefäße der Tomatenpflanzen zu einer physikalischen Beeinträchtigung des Wassertransports führt, was eine mit Wasserstress verbundene Welke zur Folge hat. Aber auch die Bildung von Exopolysacchariden, die Gefäßverstopfungen verursachen, könnte eine Rolle spielen. Cmm bildet saure Exopolysaccharide mit einem

Molekulargewicht von 1 bis 10MDa, bestehend aus Fruktose, Galaktose und Glukose in einem Verhältnis von 2:1:1 mit Acetat- und Pyruvat-Seitengruppen. Neben ihrer Aufgabe als Schutz vor Austrocknung, durch die Bildung einer wassergesättigten Matrix um das Bakterium, dienen sie auch als Ionenaustauscher sowie zur Anreicherung von Mineralien und Nährstoffen im näheren Umfeld des Bakteriums und schützen es vor toxischen Substanzen. Bei der Interaktion von Bakterium und Pflanze ist es denkbar, dass durch die Bildung von Exopolysacchariden die Erkennung des Bakteriums durch das pflanzliche Abwehrsystem erschwert wird und es durch das Blocken von Agglutininen oder Lectinen, sowie das Entgiften von Phytoalexinen oder reaktiven Sauerstoffspezies vor deren Abwehrstoffen schützt. Somit wird durch die Exopolysaccharid-Produktion in den Gefäßen Wasserstress verursacht, was wiederum zur Ausbildung der typischen Welke führt. Desweiteren dienen die Exopolysaccharide dem Bakterium zur Anhaftung auf abiotischen und biotischen Oberflächen, was für die Infektion und Besiedlung der Wirtspflanze förderlich ist (Gartemann et al. 2003, Jahr et al. 1999).

Neben Exopolysacchariden bildet *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* auch eine Vielzahl von extrazellulären Enzymen, die für den Abbau verschiedener Komponenten der pflanzlichen Zellwand nötig sind. Es konnte eine Aktivität von Endocellulase, Polygalacturonase, Pektinmethylesterase und Xylanase nachgewiesen werden, was dem Bakterium ermöglicht, Xylemgefäße und umliegende parenchymatischen Zelle enzymatisch anzugreifen und sich damit in der Pflanze auszubreiten (Gartemann et al. 2003).

Molekulare Untersuchungen haben ergeben, dass die meisten Stämme von Cmm (wie NCPPB382) die beiden Plasmide pCM1 (27,5 kb) und pCM2 (72 kb) enthalten. Durch diverse erfolgreiche Transformationen konnten Mutanten erstellt werden, die eine genauere Charakterisierung von Cmm ermöglichten. Das Plasmid-freie Derivat CMM100 war nicht mehr in der Lage, eine Krankheitssymptome auszulösen, aber es zeigte immer noch die Fähigkeit, wie sein Eltern-Stamm NCPPB382, die Tomatenpflanzen in einer hohen Anzahl zu kolonisieren und Exopolysaccharide (EPS) zu produzieren. Stämme, die nur eines der beiden Plasmide enthielten (CMM101 mit pCM1 und CMM102 mit pCM2), verursachten zwar auch die typischen Welke-Symptome, aber ihre Virulenz war geringer. Das ließ darauf schließen, dass beide Plasmide Gene enthalten, die für die Pathogenität verantwortlich sind. Weitere Studien zeigten auch, dass die Welke-Symptome nicht durch die Verstopfungen der Xylem-Gefäße aufgrund der hohen Bakterienanzahl und deren EPS-Bildung und dem damit verbundenen Wasserstress verursacht wurden, sondern durch auf dem Plasmid verschlüsselte Pathogenitätsfaktoren (Gartemann et al. 2003). Plasmid pCM1 enthält das Gen *celA*, welches

eine Cellulase mit Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase-Aktivität kodiert. Plasmid pCM2 enthält den zweiten Pathogenitätsfaktor *pat-1*. Dieser kodiert für eine zellwand-gebundene Protease (Balaji et al. 2008).

Cmm wird in der EU (Europäische Union) und in vielen anderen Tomaten produzierenden Ländern als Quarantäneschaderreger eingestuft, da es momentan noch keine resistenten Tomatensorten gibt und die chemische Kontrolle der Krankheit beispielsweise durch Antibiotika oder Kupfer nicht sehr effektiv und eher umweltschädlich ist. Daher ist es wichtig, die Verbreitung von Cmm und die damit verbundenen ökonomischen Verluste durch bestimmte Strategien zu verhindern. Demzufolge sollte der Bestand regelmäßig kontrolliert werden, um die Krankheit schnell zu erkennen und infizierte Pflanzen unverzüglich zu entfernen und zu vernichten. Prophylaktisch sollten Pflanzenreste entfernt und Arbeitsmaterialien regelmäßig desinfiziert werden, um eine schnelle Ausbreitung zu verhindern. Außerdem ist es wichtig qualifizierte Samen und Stecklingen zu verwenden, die frei von Cmm sind. (Gartemann et al. 2003, Jahr et al. 1999, EPPO 2005).

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kann mit Hilfe verschiedenster Tests nachgewiesen werden. Zum einen gibt es die Möglichkeit des Ausplattierens auf semiselektiven Medien, wie D<sub>2</sub>ANX, SCM oder mSCM (ISF 2008). Der Erfolg ist jedoch von dem Grad der Besiedlung der Probe durch andere Mikroorganismen abhängig und kann schnell zu Fehlinterpretationen aufgrund einer ähnlichen Koloniemorphologie anderer Bakterien führen. Eine weiterer Möglichkeit zum Nachweis sind immunologische Tests, wie ELISA, Immunofluoreszenzfärbung oder Agglutinationstests (EPPO 2005). Diese können schnell durchgeführt werden, bürden aber die Gefahr von falschen Ergebnissen durch Kreuzreaktionen und gelegentlich ungenügender Spezifität der erhältlichen Antikörper (Jahr et al. 1999). Spezifischer, aber Zeitaufwendiger sind molekulare Nachweismethoden, wie diverse PCR's oder die BIO-PCR (Hadas et al. 2005). Aber auch diese können zu falschen negativen oder positiven Ergebnissen führen, wodurch in der Praxis meist mehrere Nachweismethoden zur eindeutigen Identifikation von Cmm genutzt werden (EPPO 2005).

Trotz weltweiter Bemühungen gibt es momentan noch keine resistenten Tomatensorten gegenüber Cmm. Es können jedoch Unterschiede in der Anfälligkeit beobachtet werden (Van den Bulk et al. 1991, Poysa 1993, Francis et al. 2001). Molekulare Untersuchungen in Bezug auf die Resistenzgene an *Lycopersicon peruvianum* haben gezeigt, dass es fünf Regionen auf den Chromosomen 1, 6, 7, 8 und 10 gibt, die vermutlich in die Resistenz gegenüber Cmm involviert sind (Sandbrink et al. 1995). Andere Analysen dieser Wildtomate hingegen sprechen von entsprechenden QTLs auf den Chromosomen 5, 7 und 9 (Van Heusden et al.

1999). Untersuchungen an *Lycopersicon hirsutum* lassen wiederum QTLs auf den Chromosomen 2 und 5 vermuten (Kabelka et al. 2002). Aufgrund des fehlenden Wissens über den genauen Resistenzmechanismen und die vermutete Polygenetik ist es schwierig, kommerziell nutzbare Tomatensorten mit einer Resistenz gegenüber Cmm zu züchten. Versuche zur induzierten Resistenz durch die Präinokulation eines avirulenten Cmm-Isolates waren zwar erfolgreich, sind jedoch aufgrund diverser Einflussfaktoren, wie die Kultivierung des avirulenten Isolates, die Inokulationsmethode und das Wetter, für eine wirtschaftliche Anwendung nicht praktikabel (Griesbach und Sotirova 2002).

In der folgenden Arbeit soll nun die Interaktion zwischen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in unterschiedlich anfälligen Tomatensorten untersucht werden und somit ein weiterer Beitrag zum Verständnis der Resistenz erfolgen.

## **1.2. Einsatz von Plasma unter Atmosphärendruck zur Desinfektion**

Plasma ist ein ionisiertes Gas und repräsentiert den vierten Aggregatzustand. Es besteht aus Elektronen, Ionen und Neutronen in ihrem elementaren und angeregten Zustand. Plasma ist in seiner Gesamtheit betrachtet neutral und wird durch das Übertragen von Energie auf ein Gas erzeugt. Die Erzeugungenergie kann thermische Energie, elektrischer Strom oder elektromagnetische Strahlung sein. Dabei wird die elektronische Struktur der Atome und Moleküle verändert und geladene Teilchen und Ionen erzeugt. Je nach Elektronendichte und Temperatur klassifiziert man das Plasma in unterschiedliche Kategorien (Tendero et al. 2006). Durch seine Vielfalt ist es in vielen Bereichen der Industrie nicht mehr wegzudenken. So wird es z.B. zum Schweißen, zur Oberflächenreinigung und –aktivierung, sowie zum Desinfizieren und Ätzen von verschiedenen Werkstoffen verwendet. Natürliche Plasmen sind beispielsweise Blitze, das Polarleuchten in der Ionosphäre, sowie die Sonne und andere Sterne.

Atmosphärendruckplasma bezeichnet eine Plasmaform, welche bei Normaldruck generiert wird. Es kann durch verschiedene Methoden erzeugt werden, wie z.B. die Dielektrische Barrierentladung (Dielectric Barrier Discharge DBD), die Resistive Barrierentladung (Resistive Barrier Discharge RBD), den Plasmajet bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Plasma Jet APPJ) oder die Koronaentladung (Corona Discharge CD). Als Prozessgase können Luft oder andere Gasgemische verwendet werden (Laroussi 2004). Wird ein Plasma bei Umgebungstemperatur erzeugt, so spricht man von einem „kalten“ Plasma oder Niedertemperaturplasma. Die Erzeugungenergie wird dabei nur auf die elektrisch geladenen Teilchen im Gas übertragen, welche somit beschleunigt werden und dann mit



weiteren Gasmolekülen kollidieren. Bei diesen Zusammenstößen entstehen neue Ladungsträger, in dessen Folge das Plasma entsteht. Da das Gas aufgrund des Gasstroms nur eine kurze Verweildauer in der Entladungszone hat, wodurch die mittlere Temperatur im Bereich der Umgebungstemperatur bleibt und nur die Elektronen eine Temperatur von mehreren Tausend Kelvin erreichen, kann ein sogenanntes Niedertemperaturplasma generiert werden (Holzer et al. 1999).

Besonders im Bereich der Sterilisation bietet Plasma im Gegensatz zu den herkömmlichen Sterilisationsmethoden viele Vorteile. Es stellt eine ungiftige, umweltfreundliche Methode dar und erlaubt eine Sterilisation von Stoffen, welche durch Hitze zerstört oder durch chemische Desinfektionsmittel angegriffen werden. Die potentiellen Inaktivierungsmechanismen von Plasma sind die Temperatur, die UV-Strahlung, die reaktiven Spezies und die geladenen Teilchen. Je nach verwendetem Plasma können Temperaturen von mehreren Hundert Grad Celsius erreicht werden. Jedoch werden zur Sterilisation oft Niedertemperaturplasmen verwendet, wodurch die Temperatur besonders in Bezug auf hitzelabile Stoffe als Inaktivierungsfaktor von Mikroorganismen vernachlässigt werden kann. UV-Strahlung ist dafür bekannt, dass es eine Schädigung der DNA verursacht. Je nach verwendetem Plasma ist die in den meisten Fällen erzeugte Strahlungsenergie jedoch sehr gering und hat daher nur einen sehr geringen Sterilisationseffekt. Der Hauptfaktor, der zur Inaktivierung von Mikroorganismen beiträgt sind die reaktiven Spezies und geladenen Teilchen. Die reaktiven Spezies der Gasphase reagieren mit der Oberfläche des Mikroorganismus, sodass leicht flüchtige Verbindungen entstehen. Dieser Erosionsmechanismus ist in der Plasmatechnik als Etching oder Plasmaätzen bekannt und wird in der Mikroelektronik bei Chips angewandt. Die vom Plasma generierten geladenen Teilchen spielen anscheinend ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Zerstörung der äußeren Bakterienmembran. Die elektrostatische Energie, die durch die Ladungsakkumulation an der äußeren Oberfläche der Zellmembran entsteht, überschreitet die Zug- bzw. Reißfestigkeit der Membran, wodurch es zu deren Zerstörung kommt (Larussi 2004, Moisan et al. 2001).

Bei einem Plasma gibt es viele Faktoren, die den Sterilisationserfolg bestimmen können. So sind einige Gasgemische, die zur Plasmaerzeugung genutzt werden, effektiver als andere. Besonders ein erhöhter Sauerstoffanteil wirkt sich positiv aus. Auch eine Erhöhung der Energie, mit der das Plasma generiert wird, kann einen verbesserten Erfolg erzielen, jedoch ist dies auch mit einer Erhöhung der Temperatur verbunden. Natürlich spielt auch der Mikroorganismus selbst eine Rolle. Es gibt Unterschiede zwischen den Arten, aber auch zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. So sind Gram-negative Bakterien

aufgrund von bestimmten Proteinen und ihrer äußeren Lipopolysaccharid-Zellwand resistenter in Bezug auf die Plasmasterilisation als Gram-positive Bakterien (Moisan et al. 2001). Auch die Expositionszeit ist entscheidend. So kann durch eine längere Einwirkzeit des Plasmas auf die Mikroorganismen eine bessere Sterilisation erzielt werden.

Ein weiterer Faktor, der den Sterilisationserfolg beeinflusst, ist die Lage des zu behandelnden Materials zum Plasma. Die Sterilisation kann direkt im Plasma oder etwas entfernt im Luftstrom direkt hinter dem Plasma erfolgen. Viele der reaktiven Spezies und geladenen Teilchen haben nur eine kurze Lebensdauer und reagieren beim Austreten aus dem Plasma sofort mit anderen Molekülen. Dadurch erreichen im Plasma mehr geladene Partikel die Probe, was es effektiver macht (Yu et al. 2006).

Auf dem Weltmarkt gibt es bereits einige Sterilisatoren, die mit der Plasmatechnik arbeiten (Sterrad<sup>®</sup>, Plazlyte<sup>®</sup>), jedoch handelt es sich dabei meist um Niederdruckplasma-Anwendungen. Da diese Geräte für die Druckreduzierung eine spezielle Vakuumkammer benötigen, sind sie sehr teuer und beschränken damit die Menge an zu sterilisierendem Material (Moisan et al. 2001). Atmosphärendruckplasma bietet nun die Möglichkeit die Kosten solcher Anlagen durch beispielweise den Verzicht einer Vakuumkammer zu reduzieren und die Durchsatzmenge für die Sterilisation zu erhöhen. Desweiteren können solche Anlagen problemlos in laufende Produktionsanlagen eingebaut werden und so gegebenenfalls Arbeitsprozesse beschleunigen.

In der Medizin hat sich die Sterilisation mittels Plasma aufgrund der Mannigfaltigkeit der verwendeten Produkte und Materialien als Alternative zu den herkömmlichen Methoden bereits durchgesetzt. Dabei stehen vor allem die geringe Prozesszeit, die geringe Gefahr für den Anwender und die Schonung des Werkstoffes im Vordergrund (Awakowicz und Halfmann 2007, Von Keudell et al. 2007). Auch der Einsatz zur Saatgutdesinfektion scheint daher eine denkbare Möglichkeit zu sein. Andere Forschergruppen konnten bereits zeigen, dass die physikalische Behandlung von diversem Saatgut wie Weizen und Mais mit niederenergetischen Elektronen durch das sogenannte e-Ventus<sup>®</sup> – Verfahren zu einer Desinfektion der Samen führt und das genetische Material unbeeinflusst bleibt (Tigges et al. 2002, Cutrubinis et al. 2005). Trotz vieler Möglichkeiten der Saatgutdesinfektion, wie die chemische Beizung oder die Heißwasserbehandlung, gibt es immer noch Probleme in der vollständigen Bekämpfung einiger samenbürtiger Pathogene. Eine Dekontamination von Saatgut mittels Plasma wäre nicht nur eine innovative Alternative zur oft verwendeten chemischen Beizung, sondern auch eine neue Methode für den Ökolandbau, sofern die Technik dort akzeptiert wird. Sie könnte eine entscheidende Rolle in der vollständigen

Desinfektion von Saatgut und der damit verbundenen Verhinderung einer Ausbreitung von Pathogenen sein, die mit den bisherigen Methoden nur schwer zu unterbinden sind und enorme ökonomische Verluste verursachen. In dieser Arbeit soll nun der phytosanitäre Effekt der Plasmabehandlung unter Atmosphärendruck in Bezug auf *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* an Tomatensaatgut untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Chemikalien, Geräte und Materialien

Agar	Roth, Karlsruhe
Potato Dextrose Agar	Fluka, Neu-Ulm
Nutrient Broth (Nährbouillon)	Roth, Karlsruhe
Glukose	AppliChem, Darmstadt
Hefextrakt	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Roth, Karlsruhe
Rifampicin	Merk, Darmstadt
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ )	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	Merk, Darmstadt
Magnesiumsulfat ( $MgSO_4 \times 7H_2O$ )	Merk, Darmstadt
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
Mannose	Fluka, Neu-Ulm
Nalidixinsäure	AppliChem, Darmstadt
Nikotinsäure	Merk, Darmstadt
Cycloheximid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merk, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ )	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ )	Merk, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merk, Darmstadt
Glycerol	Scharlau Chemie
EDTA	Amresco, Solon
Tris	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth, Karlsruhe
Agarose	AppliChem, Darmstadt
TBE-Puffer (10x)	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Toluidinblau	Merk, Darmstadt
Phloroglucin	Serva, Heidelberg

Glutaraldehyd	Merk, Darmstadt
Roti-Histol	Roth, Karlsruhe
Roti-Plast	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96%)	Chemie Vertrieb Hannover
KaliumchromIII-sulfat	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Merk, Darmstadt
Sudanschwarz B	Merk, Darmstadt
Perjodsäure	Serva, Heidelberg
Schiff's Reagenz	Roth, Karlsruhe
Anilinblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sudan III	Serva, Heidelberg
Coomassie brilliant blue	Serva, Heidelberg
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Rutheniumrot	Merk, Darmstadt
Antikörperlösungen	Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach
Sterilfilter (0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Primer (Cmm5, Cmm6)	Invitrogen, Karlsruhe
10x Puffer (PCR)	Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Blue Juice (Loading Dye Solutions)	Fermentas, St. Leon-Rot
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt
Phenol	Fluka, Neu-Ulm
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
Isoamylalkohol	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat (CH <sub>3</sub> COONa)	Merk, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Kaliumdisulfit (K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Merck, Darmstadt

Autoklaven	laboratory autoclave A 275, Zirbus technology, Bad Grund Fedegari AutoklaviSpa, Tecnomara AG Zürich
Wärmeschranke (Bakterienanzucht)	Mytron, Heiligenstadt
Wärmeschrank (Paraffin)	Memmert, Schwabach
Klimaschrank (Bioassay)	Mytron, Heiligenstadt
Rasterelektronenmikroskop	Leo 1550
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Leica DM 5000 CS
Lichtmikroskop	Leitz DM RB
Mikrotom	Mikrotom HM 335 E
Heizplatte	Omnilab AB PST 100
Cycler (PCR)	Eppendorf Mastercycler gradient
Geldokumentator	Gel Doc 1000, Bio Rad
Schüttler (Bioassay)	Clim-O-Shake IR C-1-U System Kühner
Zentrifuge (Bioassay)	Sigma 4 K 10
Zentrifuge (DNA-Extraktion)	Hettich Zentrifugen Universal 30 RF
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Vakuumzentrifuge	Eppendorf Concentrator 5301
Sputteranlage	BALTEC SCD 005 Sputtercoater
Einbettform	Plano
Rasierklängen	Wilkinson Sword
Parafilm	Parafilm „M“, Laboratoy Film, Pechiney Plastic Packaging, Chicago
Falkonröhrchen	Sarstädt, Nümbrecht
Objektträger	Menzel-Gläser
Spritzenaufsatzfilter Minisart, 0,2 µm	Sartorius, Göttingen

## 2.2. Verwendete Medien und Lösungen

Alle Medien wurden im Autoklaven bei 121°C für 15 min sterilisiert. Zuvor wurde der pH-Wert entsprechend mit NaOH bzw. HCl eingestellt und die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach dem autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf mindestens 60°C. Alle Antibiotika wurden zuvor sterilfiltriert (Filterporengröße 0,2 µm).

### Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dextrose Agar	39 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

### Nutrient Glucose Broth (NGB), pH 7,2

Nutrient Broth	8,0 g
Glukose	10,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

### Nutrient Glucose Agar (NGA), pH 7,2

Nutrient Broth	8,0 g
Glukose	10,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Agar	15,0g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

### Nutrient Glucose Agar mit Streptomycin und Rifampicin (NGA+SR), pH 7,2

Nutrient Broth	8,0 g
Glukose	10,0 g
Hefeextrakt	3,0 g
Agar	15,0 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml
Streptomycin	100 ppm
Rifampicin	25 ppm

R (Ftayeh 2009)

Das Medium wurde von Herrn R. Ftayeh zur Verfügung gestellt. Die Rezeptur und der Originalname können aufgrund einer derzeitigen Patentanmeldung noch nicht offengelegt werden.

Wasseragar

Agar	15,0g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

mSCM (nach Waters und Bolkan 1992)

<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ )	2,62 g
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	0,50 g
Magnesiumsulfat ( $MgSO_4 \times 7H_2O$ )	0,25 g
Borsäure	1,50 g
Mannose	10,00 g
Hefeextrakt	0,10 g
Agar	12,00 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml
Nalidixinsäure	0,03 g
Nikotinsäure	0,10 g
Cycloheximid	0,20 g

Für die Immunofluoreszenz wurden folgende Lösungen verwendet:

PBS pH 7,2; 0,01 M

Natriumchlorid (NaCl)	8,00 g
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ )	1,07 g
Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ )	0,40 g
Kaliumchlorid (KCl)	0,20 g



Phosphat-gepuffertes Glycerol

<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,26 g
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,15 g
Glycerol	50 ml
Aqua bidest.	100 ml

Für die molekularen Arbeiten wurden folgende Lösungen verwendet:

TE-Puffer A, pH 8,0

EDTA	1 mM
Tris-HCl	10 mM

TE-Puffer B, pH 8,0

EDTA	100 mM
Tris-HCl	200 mM

Extraktionspuffer

EDTA	100 mM
Tris-HCl	200 mM
SDS (Natriumdodecylsulfat) 10%ig	25 µl
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) 10%ig	60 µl

TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) 10x, pH 8,3

Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA (0,5 M)	40 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Agarosegel 2%ig

Agarose	2 g
TBE-Puffer (0,5x)	100 ml
Ethidiumbromid	6 µl

### 2.3. Pflanzenmaterial

Die Herkunft der im Rahmen der Arbeit verwendeten Tomatensorten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Um genügend Samenmaterial für die entsprechenden Versuche zur Verfügung zu haben, wurden im Gewächshaus entsprechend Pflanzen angezogen und deren Samen geerntet.

Tab. 1: Herkunft der verwendeten Tomatensorten

	MoneyMaker	Lyconorma	Irat L3	Hawaii 7998
IPK Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben	x	x		
TGRC Tomato Genetics Resource Centre, University of California, USA	x			x
PGRC Plant Gene Resources of Canada, Saskatoon	x	x	x	x
Dr. S. van Heusden, Wageningen UR Plant Breeding	x		x	

Die mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kontaminierten Samen wurden freundlicher Weise von Herrn Dr. R. Ftayeh zur Verfügung gestellt, der diese im Rahmen seiner Doktorarbeit an der Georg-August-Universität in Göttingen produzierte (Ftayeh 2009). Es handelte sich dabei einerseits um Tomatensamen die stark mit dem Pathogen kontaminiert waren und desweiteren um Samen, welche einen Bakterienstamm mit einer Streptomycin und Rifampicin-Resistenz besitzen.

### 2.4. Bakterienisolate und Bakterienanzucht

In der Arbeit wurden die *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Isolate Cmm+SR, MO-1 (Code 21), OS-1 (Code52) und GSPB 34 (41/79) verwendet. Die Isolate Cmm+SR, MO-1 und OS-1 wurden freundlicher Weise von Herrn Dr. R. Ftayeh zur Verfügung gestellt. Bei Cmm+SR handelt es sich um ein Isolat mit einer Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin und Rifampicin. MO-1 wurde von befallenen Tomatenpflanzen in Deutschland isoliert und OS-1 von befallenen Pflanzen in Österreich. Das Isolat GSPB 34 wurde von Herrn Dr. A. Mavridis (PlantProtect) bereitgestellt und in Griechenland von infizierten Tomatenfrüchten isoliert. Alle Isolate wurden auf NGA-Medium kultiviert und bei 25°C inkubiert. Für das Isolat Cmm+SR wurde dem Medium zusätzlich die Antibiotika Streptomycin und Rifampicin zugesetzt. Um jederzeit frische Bakterienkulturen zur Verfügung zu haben, wurden diese wöchentlich überimpft.

## 2.5. Pflanzenanzucht und Inokulation

Die für die Versuche benötigten Tomatenpflanzen wurden im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen ( $25 \pm 10^\circ\text{C}$ , Luftfeuchte 40-70%) herangezogen. Die Aussaat der einzelnen Samen erfolgte in Multitopfplatten in einem Erdgemisch aus 50% ungedämpfter Komposterde, 25% Sand und 25% gedämpfter Erde. Drei Wochen nach der Aussaat wurden die Tomatenpflanzen inokuliert. Dazu wurde das erste Laubblatt mit einer Rasierklinge horizontal in der Nähe des Stängels abgeschnitten und die Schnittstelle umgehend mit  $3 \mu\text{l}$  einer Bakteriensuspension versehen. Die Bakterienmischsuspension setzte sich aus den *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Isolaten MO-1, OS-1 und GSPB 34 zusammen und wurde in 0,85%iger NaCl-Lösung auf eine Konzentration von jeweils  $10^8$  CFU/ml gebracht. Die Kontrollpflanzen wurden mit  $3 \mu\text{l}$  der 0,85%igen NaCl-Lösung versehen.

## 2.9. Krankheitsbonitur

Die Bonitur zur Beurteilung der Symptomausprägung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* an verschiedenen Tomatensorten erfolgt nach einem eigenen Boniturschlüssel (Tab. 4).

Tab. 4: Boniturschlüssel für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bei Tomate

Boniturnote	
0	Keine Welke
1	1-20% der Blätter einer Pflanzen zeigen Welke
2	21-50% der Blätter zeigen Welke
3	51-80% der Blätter zeigen Welke
4	81-100% der Blätter zeigen Welke

Die Bonitur der unterschiedlichen Tomatensorten erfolgte jeweils 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi und 28 dpi.

## 2.7. Bioassay mit Kulturfiltraten

Um den Einfluss der Stoffwechselprodukte des Bakteriums *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* auf die verschiedenen Tomatensorten (Moneymaker, Lyconorma, Irat L3, Hawaii 7998) zu testen, wurde ein Bioassay durchgeführt. Dazu wurden Kolben mit je 500 ml NGB-Medium mit je 1 ml der Bakteriensuspensionen der Isolate MO-1, OS-1 und GSPB 34 mit einer Konzentration von  $10^7$  CFU/ml versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen bei  $20^\circ\text{C}$  auf dem Schüttler mit 100 rpm, wurde die Lösung 2x für 30 min und anschließend für 1

h bei 5500 rpm zentrifugiert. Bei jeder Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Falcon-Gefäß überführt, um wirklich alle Bakterienrückstände durch die Pelletbildung aus der Lösung zu entfernen. Die zentrifugierte Lösung wurde dann mit Hilfe eines Filters mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert, um wirklich alle Bakterien zu entfernen. Die Kontrolllösung wurde nicht mit den Bakterienisolaten versetzt, sondern bestand aus reinem NGB-Medium und wurde ebenfalls wie zuvor beschrieben bearbeitet. Nun erfolgte eine Portionierung von je 20 ml der Lösungen NGB, NGB / NGB+Cmm (50:50) und NGB+Cmm in Falkonröhrchen, in die anschließend die 5 Wochen alten Tomatenpflanzen für den Bioassay gegeben wurde. Die Pflanzen wurden 5 Wochen in Gewächshaus in einem Erdgemisch aus 50% ungedämpfter Komposterde, 25% Sand und 25% gedämpfter Erde bei 20°C angezogen. Zur Bestimmung des Gewichtsverlustes, wurden diese im Bereich der Keimblätter mit einer scharfen Rasierklinge abgeschnitten und unmittelbar auf der Feinwaage gewogen. Anschließend wurden die Pflanzen in die entsprechenden Gefäße mit den Lösungen gegeben und mit Parafilm weitgehend verschlossen. Für den Versuch wurden die Proben nun für 24 h bei 20°C und 65% relativer Luftfeuchte in einem Wärmeschrank aufbewahrt und dann erneut gewogen. Danach wurde aufgrund des Gewichtsunterschiedes vor und nach der Inkubation im Kulturfiltrat der Gewichtsverlust in % bestimmt.

## **2.8. Histochemische Färbe- und Nachweismethoden an Frischmaterial**

### **2.8.1. Toluidinblau-Färbung (Thyllenbildung)**

Die Toluidinblau-Färbung dient dem Nachweis von verholztem und unverholztem Pflanzenmaterial. Dazu wurden dünne Handschnitte von frischem Stängelmaterial der Tomatenpflanzen angefertigt und diese für ca. 0,5 – 1 min in die Färbelösung (0,1% Toluidinblau in destilliertem Wasser) getaucht. Die Schnitte wurden anschließend in Wasser gespült, auf einem Objektträger platziert und unter dem Mikroskop angeschaut. Verholzte Zellenwände erscheinen blau bis grün, unverholzte Zellenwände sowie Thyllen werden pink gefärbt (O'Brien et al. 1964, Parker et al. 1982).

### **2.8.2. Phloroglucinol-Test (Lignin)**

Der Phloroglucinol-Test wird auch Wiesner-Test genannt und dient dem Nachweis von Lignin. Dazu wurden dünne Handschnitte der frischen Tomatenstängel angefertigt und für ca. 1 min in eine Phloroglucin-Ethanol-Lösung (0,4 g Phloroglucin in 10 ml 96%igem Ethanol) gegeben. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 1 min in eine 32%ige HCl-Lösung

überführt und in HCl mikroskopiert. Lignin ist durch seine Rot-Färbung zu erkennen (Gerlach 1984).

### **2.8.3. Eigenfluoreszenz (Phenole)**

Die Eigenfluoreszenz dient dem Nachweis von Phenolen. Dazu wurden vom frischen Stängelmaterial der Tomatenpflanzen dünne Handschnitte angefertigt und unter dem Mikroskop bei UV-Licht untersucht. Phenole zeigen dabei eine starke Autofluoreszenz (Eynck 2007).

## **2.9. Paraffinverfahren**

### **2.9.1. Fixierung**

Zur Fixierung des Pflanzenmaterials wurde eine 5%ige Glutaraldehydlösung verwendet, da diese die Antigene des Bakteriums *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* für die spätere Immunofluoreszenzfärbung nicht schädigt. Kleine Probenstücke, wie die Tomatensamen, wurden mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe kurz infiltriert und dann für 1 h unter Eiskühlung fixiert. Größere Probenstücke, wie Stängelteile und Fruchtstücke, wurden über Nacht bei 4°C in der Fixierlösung aufbewahrt.

### **2.9.2. Entwässerung und Einbettung in Paraffin**

Die fixierten Proben wurden aus der Fixierlösung entnommen und für einen kurzen Waschschrift in PBS überführt. Zur Entwässerung wurde eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 90%, 96% Ethanol) verwendet. Anschließend erfolgt die Überführung mit Zwischenschritten ins Paraffin. Dazu wurden die entwässerten Proben über Ethanol (96%)/Roti-Histol-Gemische (3:1, 1:1, 1:3) in reines Roti-Histol überführt. Dann erfolgte die Inkubation aus kalt- und warmgesättigten Roti-Histol/Paraffin-Gemischen, bis die Proben schließlich in reinem, geschmolzenem Paraffin (60°C) verweilten. Nun konnten die Proben in entsprechende Förmchen in reinem Paraffin eingebettet werden. Dazu wurde reines, geschmolzenes Paraffin in die Förmchen gegeben und die Probe mit einer vorgewärmten Pinzette im abkühlenden Paraffin ausgerichtet. Um das Erstarren der Blöckchen zu beschleunigen, wurde die Form in Eiswasser getaucht. Danach konnten die eingebetteten Proben aus der Form entnommen werden und wurden bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Je nach Größe der Proben wurden unterschiedliche Einwirkzeiten für die entsprechenden Lösungen verwendet (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Entwässerung und Einbettung unterschiedlicher Proben in Paraffin (Roti-Plast)

Lösung	Temperatur	Kleine Probe	Große Probe
PBS	Raumtemperatur	5 min	1 h
50% Ethanol	Raumtemperatur	30 min	2 h
70% Ethanol	Raumtemperatur	30 min	2 h
90% Ethanol	Raumtemperatur	30 min	3 h
96% Ethanol	Raumtemperatur	30 min	über Nacht
Ethanol/Roti-Histol 3:1	Raumtemperatur	30 min	3 h
Ethanol/Roti-Histol 1:1	Raumtemperatur	30 min	3 h
Ethanol/Roti-Histol 1:3	Raumtemperatur	30 min	3 h
Roti-Histol	Raumtemperatur	45 min	über Nacht
Roti-Histol	Raumtemperatur	45 min	-
Kaltgesättigtes Roti-Histol/Roti-Plast	Raumtemperatur	60 min	4,5 h
Warmgesättigtes Roti-Histol/Roti-Plast	40°C	60 min	4,5 h
Reines, geschmolzenes Roti-Plast	60°C	über Nacht	über Nacht

### 2.9.3. Schneiden und Aufbringen auf gelatinierte Objektträger

Um die eingebetteten Proben mit dem Mikrotom (Mikrotom HM 335 E) schneiden zu können, mussten diese zuerst mit flüssigem Paraffin an einem Holzblöckchen befestigt werden. Dann wurde die Probe vorsichtig getrimmt, das heißt es wurde überschüssiges Paraffin mit einem Skalpell oder einer Rasierklinge entfernt. Anschließend wurde das Holzblöckchen in das Mikrotom gespannt und 20 µm bis 30 µm dicke Schnitte der Probe angefertigt. Diese Schnitte wurden mit einer Pinzette vorsichtig auf einen Wassertropfen auf einem gelatinierten Objektträger überführt. Nachdem sich ausreichend Schnitte auf dem Objektträger befanden, wurden diese durch Auflegen des Objektträgers auf eine Heizplatte (ca. 40°C) auf den Objektträger fixiert.

### 2.9.4. Herstellung gelatinierter Objektträger

Neue Objektträger wurden zur Entfernung von Fettschlieren kurz mit Aceton gereinigt und dann mit Leitungswasser abgespült. Anschließend wurden sie in einem Ultraschallbad mit etwas Reinigungsmittel (Mucosol) für 15 min behandelt und erneut gründlich mit demineralisiertem Wasser gespült. Danach konnten die Objektträger in eine spezielle Gelatinelösung getaucht werden. Diese setzte sich aus 0,125 KaliumchromIII-sulfat, 1,25 g Gelatine und 250 ml bidestilliertem Wasser zusammen und wurde zuvor für 1 h zum Lösen in den Wärmeschrank bei ca. 60°C unter gelegentlichem schwenken gestellt. Die gereinigten Objektträger wurden in die Lösung getaucht und auf Filterpapier schräg gegen einen ca. 4 cm

hohen Gegenstand gestellt. Nach dem Trocknen der gelatinierten Objektträger, würden diese in einen Präparatekasten eingeordnet und bis zum Gebrauch im Kühlraum bei 4°C gelagert.

### 2.9.5. Entparaffinisierung

Um die Mikrotomschnitte der in Paraffin eingebetteten Proben weiter färben zu können, müssen diese zunächst vom Paraffin befreit werden. Dazu wurden die auf den gelatinierten Objektträgern befestigten Schnitte in Roti-Histol von Paraffin befreit und in einer umgekehrten Alkoholreihe wieder bewässert (Tab. 3).

Tab. 3: Entparaffinisierung

Lösung	Zeit
Roti-Histol	15 min
Roti-Histol	15 min
96% Ethanol	5 min
90% Ethanol	5 min
70% Ethanol	5 min
50% Ethanol	5 min
Wasser	5 min

## 2.10. Histologische Färbe- und Nachweismethoden an Paraffinschnitten

### 2.10.1. Sudanschwarz (Lipide)

Sudanschwarz B ist ein Nachweismittel für Lipide. Dazu wurden die Proben für ca. 1 min in eine 0,3%ige Sudanschwarz B - Lösung in 70% Ethanol getaucht und anschließend mikroskopiert. Die Lipide färben sich dabei dunkelblau bis schwarz (Rickard und Gahan 1983).

### 2.10.2. Perjod-Schiff Reaktion (Polysaccharide)

Die Perjod-Schiff-Reaktion dient dem Nachweis von Polysacchariden. Dazu wurden die Proben für 5-10 min in 0,5%ige Perjodsäure (0,5 g Perjodsäure in 100 ml Aqua bidest.) überführt. Anschließend wurden diese mit Wasser gewaschen und für 10-30 min mit Schiff's Reagenz behandelt. Danach erfolgte das Spülen der Proben mit SO<sub>2</sub>-Wasser (100 ml 10%iger wässriger K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Lösung werden mit 200 ml Leitungswasser und 10 ml 1 n HCl versetzt). Die Polysaccharide erscheinen rot (Gerlach 1984).

### **2.10.3. Anilinblau (Kallose)**

Anilinblau dient dem Nachweis von Kallose. Dazu wurden die Proben in einer Lösung aus 0,001% Anilinblau in 2,5%  $K_2HPO_4$ -Puffer (pH 9,3) versetzt und anschließend unter UV-Licht mikroskopiert. Kallose zeigt dabei eine starke Fluoreszenz (Klement et al. 1990).

### **2.10.4. Sudan III (Suberin)**

Sudan III ist ein Nachweismittel für Suberin. Zum Nachweis wurden die Proben auf dem Objektträger mit der Färbelösung aus 2 g Sudan III in 100 ml 96%igem Ethanol und 5 ml Glycerin versetzt und über einer Flamme kurz erhitzt. Anschließend wurden die Proben mit verdünntem Glycerin gewaschen und darin mikroskopiert. Suberin zeigt dabei eine rot-gelbe Färbung (Gerlach 1984).

### **2.10.5. Coomassie brilliant blue (Proteine)**

Coomassie brilliant blue dient dem Nachweis von Proteinen. Dazu wurden die Proben für einige Minuten mit einer wässrigen Lösung aus 0,1% Coomassie brilliant blue, 20% Methanol und 7% Essigsäure versetzt. Anschließend wurden sie in destilliertem Wasser gewaschen und in eine Lösung aus 50% Methanol und 7% Essigsäure gegeben. Proteine zeigen dabei eine Blau-Färbung (Taylor et al. 1993).

### **2.10.6. Rutheniumrot (Pektin)**

Rutheniumrot wird zum Nachweis von Pektin eingesetzt. Dazu wurden die Proben für 5 min mit einer 0,05%igen Rutheniumrot-Lösung versetzt, mit Wasser gewaschen und anschließend mikroskopiert. Pektin zeigt dabei eine Rot-Färbung (Gerlach 1984).

### **2.10.7. Immunofluoreszenzfärbung für Untersuchungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM)**

Zur Visualisierung von *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* am Pflanzenmaterial erfolgte durch eine spezifische Antikörperfärbung in Verbindung mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Dazu wurden die auf den gelatinierten Objektträger fixierten, entparaffinisierten Mikrotomschnitte mit der ersten Antikörperlösung (LOEWE, C.m.m.-antiserum from goat, 1:2000 in PBS pH 7,2) versehen und für 2 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in eine PBS-Lösung mit Tween R20 (0,1%) getaucht, für 5 min in reiner PBS-Lösung gewaschen und in Wasser getaucht. Die überflüssige Feuchtigkeit auf dem Objektträger wurde vorsichtig mit Filterpapier entfernt. Danach wurde die zweite Antikörperlösung (LOEWE, Rabbit-anti-goat-(H+L)FITC, 1:400 in



PBS pH 7,2) aufgebracht und die Proben für 1 h in einer feuchten Kammer bei Dunkelheit inkubiert, da dieser Antikörper das lichtinstabile Fluorochrom Cy3 enthält. Anschließend wurden die Schnitte erneut in eine PBS-Lösung mit Tween R20 (0,1%) getaucht, für 5 min in reiner PBS-Lösung gewaschen und in Wasser getaucht. Dann konnten die Schnitte in Phosphat-gepuffertem Glycerol unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica DM 5000 CS, DNPW Georg-August Universität Göttingen; Absorption 488 nm, Emission Cy3 540-590 nm, Emission Trypanblau 620-720 nm) angeschaut werden.

#### **2.10.8. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen (REM)**

Zur Untersuchung der mit Atmosphärendruck-Plasma behandelten *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Bakterien, wurden mit NGA-Medium beschichtete Objektträger verwendet und mit einer Suspension versetzt. Anschließend erfolgt die Plasmabehandlung (siehe 2.11.1 Plasmabehandlung von Objektträgern mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). Als Kontrolle dienten unbehandelte Proben. Aus den jeweiligen Proben wurde ein kleines Stück Medium mit den darauf befindlichen Bakterien in Größe des Objekthalters für das Rasterelektronenmikroskop herausgeschnitten und auf diese aufgebracht. Anschließend erfolgte eine Trocknung im Exsikkator für 2 Tage. Danach wurden die Proben für 60 s in einer Sputteranlage mit einer 20-25 nm dicken Goldschicht überzogen. Zur Untersuchung der Gefäßverstopfungen wurden Mikrotomschnitte von in Paraffin eingebetteten Proben verwendet (siehe 2.7. Paraffinverfahren). Diese wurden auf kleine, gelatinierte Deckgläschen (siehe 2.7.4 Herstellung gelatinierter Objektträger) der Größe der Objekthalter aufgebracht und entparaffinisiert (siehe 2.6.5. Entparaffinisierung). Anschließend erfolgte, wie oben beschrieben, die Trocknung und Besputterung der Proben, sodass diese dann unter dem Rasterelektronenmikroskop (LEO, I. Physikalisches Institut, Georg-August Universität Göttingen) begutachtet werden konnten.

#### **2.11. Nachweis der Pathogenausbreitung**

Um zu untersuchen, wie schnell sich *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in den unterschiedlich anfälligen Tomatensorten ausbreitet, wurden 7 Wochen alte Pflanzen im Gewächshaus durch das horizontale Abschneiden des ersten Laubblattes im Bereich des Stängels und anschließendem Beimpfen mit 3 µl Bakteriensuspension ( $10^8$  CFU/ml, Gemisch der Isolate MO-1, OS-1, GSPB 34) auf der Schnittstelle inokuliert. Nach einer Woche erfolgte die Untersuchung. Dazu wurde der Stängel der Pflanze in 2 cm lange Segmente unterteilt. Das erste Segment, in deren Mitte sich die Inokulationsstelle befand, wurde als Segment 0

bezeichnet, das darüber liegende Segment wurde nicht analysiert und das darüber befindliche Segment ist Segment 1. So wurde jedes zweite Segment fortlaufend beziffert und analysiert (siehe Abb. 1).

Die einzelnen Stängelsegmente wurden gewogen und pro g Frischmasse mit 1 ml TE-Puffer A versetzt. Anschließend wurde daraus im Mörser ein Homogenat angefertigt, von dem 400 mg für die DNA-Analyse in separate Eppendorfgefäße überführt wurden und der Rest zum Ausplattieren auf R- und mSCM-Medium verwendet wurde.



Abb. 1: Unterteilung der Tomatenpflanze in 2 cm lange Segmentstücke für die Untersuchungen zur Pathogenausbreitung; beginnend mit dem Segment 0 an der Inokulationsstelle.

### **2.11.1. Ausplattierung auf den Selektivmedien R und mSCM**

Das portionierte Homogenat der einzelnen Stängelstücke wurde für das leichtere Ausplattieren erneut mit der gleichen Menge an sterilem Wasser verdünnt. Suspensionen aus dem Bereich der Inokulationsstelle, von der eine sehr hohe Bakterienzahl zu erwarten war, wurden entsprechend weiter verdünnt. Von jedem Stängelhomogenat wurden nun 100 µl der entsprechenden Verdünnung auf den R- und mSCM-Medium ausplattiert und die Platten bei 25°C inkubiert. Die Proben wurden in regelmäßigen Abständen begutachtet und die Anzahl der Kolonien von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bestimmt.

### 2.11.2. DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* wurden 400 mg des Pflanzenhomogenates für 10 min bei 6000 rpm (Hettich Zentrifugen Universal 30 RF) zentrifugiert und das Pellet in 1 ml TE-Puffer A resuspendiert. Anschließend wurde der Prozess mit TE-Puffer B wiederholt. Das nun daraus resultierende Pellet wurde mit 400 µl Extraktionspuffer versehen und bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt, für 1 min gevortext und 5 min bei 4°C zentrifugiert (15 000 rpm, Hettich Zentrifugen Universal 30 RF). Die wässrige Phase konnte nun von der organischen, sowie Interphase abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Danach erfolgte auf gleiche Weise eine zweimalige Behandlung mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1). Zur Fällung der DNA aus der flüssigen Phase wurde diese mit 0,1 Vol. Natriumacetat (3 M) und 1 Vol. Isopropanol versehen und vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung für 15 min bei 15 000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde zwei Mal mit kaltem Ethanol (70%) gewaschen und für 3 min bei 15 000 rpm zentrifugiert (Hettich Zentrifugen Universal 30 RF). Das daraus resultierende Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) für 30 min getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer A gelöst.

### 2.11.3. PCR

Zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* wurden die spezifischen Primer CMM 5 (5'-GCGAATAAGCCCATATCAA-3') und CMM 6 (5'-CGTCAGGAGGTCGCTAATA-3') verwendet. Diese Oligonukleotid-Primer sind vom Pathogenitätsgen *pat-1* abgeleitet und bilden ein 614 bp langes Amplifikationsprodukt (Dreier et al. 1995). Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsmix und das PCR-Programm sind den Tab. 5 und Tab. 6 zu entnehmen.

Tab. 5: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsmix zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ( Gesamtvolumen pro Reaktion 25 µl)

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	µl/Reaktion
H <sub>2</sub> O			16,8
10x Puffer	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 mM	1,5
dNTP	10 mM	200 µM	0,5
Forward Primer CMM5	10 µM	0,3 µM	0,75
Reverse Primer CMM6	10 µM	0,3 µM	0,75
Taq Polymerase	5 U/µl	1U/µl	0,2
Probe (DNA)			2

Tab. 6: PCR-Programm zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (30 Zyklen)

Phase	Zeit	Temperatur (°C)
Initiale Denaturierung	5 min	94
Denaturierung	1 min	94
Annealing	1,5 min	55
Elongation	1 min	72
Finale Elongation	5 min	72

#### 2.11.4. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 2 µl Blue Juice vermischt und auf ein 2%iges Agarosegel in einer Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer (0,5x) geladen. Zusätzlich wurde ein DNA-Größenstandard (100 bp Ladder) aufgetragen, um die Größe des PCR-Amplifikates zu bestimmen. Das Agarosegel wurde anschließend unter UV-Licht dokumentiert und ausgewertet.

#### 2.12. Plasmabehandlungen

##### 2.12.1. Plasmabehandlung von Objektträgern mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Um zu testen, ob eine Inaktivierung des Phytopathogens *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* durch die Behandlung mit Atmosphärendruck-Plasma möglich ist, wurden zuerst Versuche an der Bakteriensuspension vorgenommen. Dazu wurden sterile Objektträger in sterilen Petrischalen mit NGA-Medium übergossen und nach dem Erstarren in Form des Objektträgers ausgeschnitten. Diese mit NGA-Medium beschichteten Objektträger wurden

vor der Plasmabehandlung an beiden Enden mit jeweils 5 µl einer frischen Suspension des *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stammes (Cmm+SR) mit einer Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin und Rifampicin versehen ( $10^7$  CFU/ml) und leicht antrocknen gelassen. Anschließend erfolgte die Plasmabehandlung für 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 und 30 sec. Diese erfolgte in einer Plasmaanlage (Wascher 2010) mit einem Elektrodenabstand von 5 mm, einem Luftstrom mit einem Luftdruck von 2 bar, einer Behandlungstemperatur von ca. 35 °C und einer Pulsung des Frequenzgenerators von je 30 s (an bzw. aus). Die Frequenz des Netzgerätes des Frequenzgenerators betrug 17 KHz.

Danach wurden die Objektträger an den beimpften Stellen mit jeweils 1 ml sterilem Wasser abgespült und die Lösungen entsprechend für das Ausplattieren verdünnt. Von jeder Probe wurden 100 µl auf NGA+SR-Medium ausplattiert und die Platten bei 25°C im Wärmeschrank inkubiert. Nach ca. 7 Tagen wurden die Platten durch das Zählen der Kolonien ausgewertet.

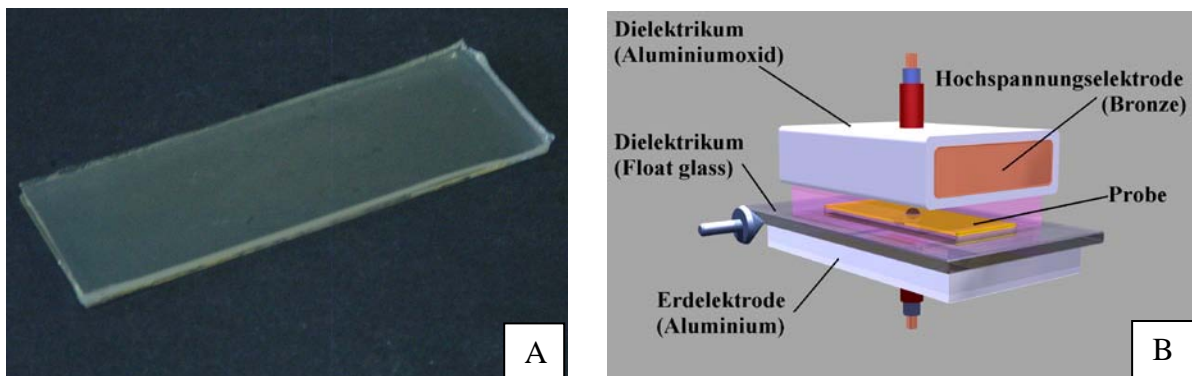


Abb. 2: (A) mit NGA-Medium beschichteter Objektträger, (B) schematische Darstellung der Plasmabehandlung.

### 2.12.2. Plasmabehandlung von infizierten Tomatensamen

Um die Wirkung von Atmosphärendruck-Plasma zur Dekontamination von Tomatensamen bezüglich des Pathogens *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* beurteilen zu können, wurden infizierte Tomatensamen von Herrn R. Ftayeh verwendet (Ftayeh 2009). Diese enthielten einen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stamm (Cmm+SR) mit einer Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin und Rifampicin, was das Wiedererkennen der Zielbakterien auch bei starkem Saprophytenbefall am Samen erleichtert. Die Samen wurden in einer Schüttgutanlage mit Plasma behandelt. Diese hatte einen Elektrodenabstand von 6 mm, einen Luftstrom mit einem Druck von 2 bar, eine Behandlungstemperatur von ca. 35°C und eine Pulsung des Frequenzgenerators von je 30 s (an bzw. aus). Die Frequenz des Netzgerätes des Frequenzgenerators betrug 15 KHz. Zur

Behandlung wurden die Elektrodenspannungen 15,3 KV und 19,6 KV gewählt (Bellmann, 2007). Um den Effekt der Behandlungszeit zu untersuchen, wurden die Samen 6 und 18 Mal durch die Anlage gerüttelt. Nach der Plasmabehandlung wurden die einzelnen Samen in 1 ml sterilem Wasser gemörsert und 100 µl dieses Suspensats auf NGA+SR-Medium ausplattiert. Nach einer Inkubation von ca. 7 Tagen bei 25°C wurden die einzelnen Platten durch das Auszählen der Kolonien ausgewertet.

### **2.12.3. Keimtest**

Um zu beurteilen, ob die Plasmabehandlung einen Einfluss auf die Keimfähigkeit oder die Entwicklung des Keimlings hat, wurden die mit Plasma behandelten Samen (siehe 2.12.2.) zusätzlich auf Keimfilterpapier ausgelegt. Dieses befand sich in einer verschließbaren Plastikbox, welche am Boden eine Schicht mit Wasser aufwies, um eine 100%ige Luftfeuchte zu erhalten. Nach einer Inkubation im Wärmeschrank bei 20°C für 14 Tage wurde die Keimfähigkeit bestimmt und die Keimlinge auf eventuelle Fehlbildungen untersucht.

### **2.13. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Statistica 9 (StatSoft). Bei normalverteilten Daten erfolgte ausgehend von einer ANOVA ein Fisher Least Significant Difference (LSD) Test. Nicht parametrische Daten wurden über den Kruskal-Wallis Test ausgewertet. Alle Tests wurden bei  $p \leq 0,05$  durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Anfälligkeit der Tomatensorten

Bei der Bonitur der charakteristischen Welkesymptome von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) an den verschiedenen Tomatensorten zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Anfälligkeit (Abb. 3). Bereits eine Woche nach der Inokulation konnten an den Sorten Moneymaker und Lyconorma vereinzelt eine Welke der Blätter beobachtet werden. Zwei Wochen nach der Inokulation konnten die für das Bakterium typischen Symptome der Welke und eine Läsionsbildung im Bereich der Inokulationsstelle bei allen vier getesteten Sorten (Moneymaker, Lyconorma, Irat L3, Hawaii 7998) beobachtet werden (Abb. 4). Die Welke war jedoch bei den Sorten Moneymaker und Lyconorma stärker ausgeprägt. Zu den Zeitpunkten von 3 bzw. 4 Wochen nach der Inokulation waren diese Welkesymptome ebenfalls in den Sorten Moneymaker und Lyconorma stärker, sodass sich 4 Wochen nach der Inokulation signifikante Unterschiede zu den Sorten Irat L3 und Hawaii 7998 zeigten. Die Sorten Moneymaker und Lyconorma zeigten damit eine stärkere Anfälligkeit gegenüber Cmm als die Sorten Irat L3 und Hawaii 7998.

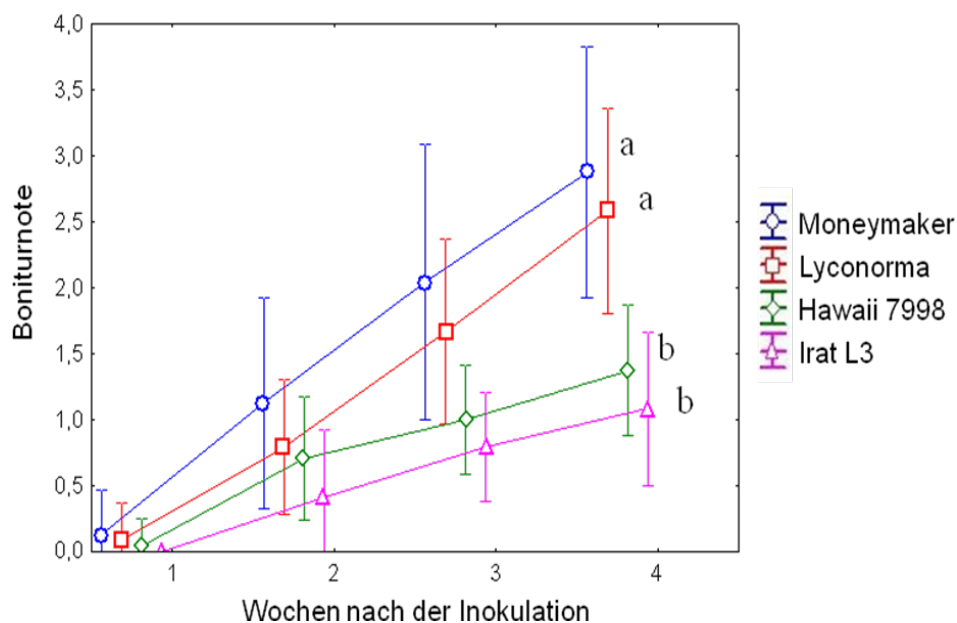


Abb. 3: Durchschnittliche Boniturnoten mit Standardabweichung (Stdabw.) der Tomatensorten Moneymaker, Lyconorma, Irat L3 und Hawaii 7998 jeweils 1, 2, 3 und 4 Wochen nach der Inokulation mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.



Abb. 4: Ausbildung der typischen Symptome von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* an den bonitierten Tomatensorten, (A) Verbräunung der Gefäßbereiche im Stängelquerschnitt einer infizierten Pflanze der anfälligen Sorte Lyconorma 4 Wochen nach der Inokulation, (B) Welkesymptome an einer Pflanze der anfälligen Sorte Moneymaker 4 Wochen nach der Inokulation, (C) Läsionsbildung im Bereich der Inokulationsstelle einer infizierten Pflanze der gering anfälligen Sorte Hawaii 7998 4 Wochen nach der Inokulation und Welkesymptomen an den Blättern, (D) Kontrollpflanze der gering anfälligen Sorte Hawaii 7998 ohne Ausbildung einer Läsion im Bereich der Inokulationsstelle.

Auch in Bezug auf den Größenunterschied zwischen infizierter Pflanze und Kontrollpflanze der entsprechenden Sorten zeigten sich klare Differenzen (Abb. 5). So waren die infizierten Pflanzen der anfälligen Sorten Moneymaker und Lyconorma oft sehr klein mit starken Welkesymptomen. Die infizierten Pflanzen der weniger anfälligen Sorten Irat L3 und Hawaii 7998 hingegen zeigten zwar auch ein geringeres Wachstum bezüglich der Kontrollpflanze, aber sie waren aufgrund der milderen Welkesymptome geringer in ihrem Wachstum eingeschränkt. Die Kontrollpflanzen zeigten zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung Welkesymptome.



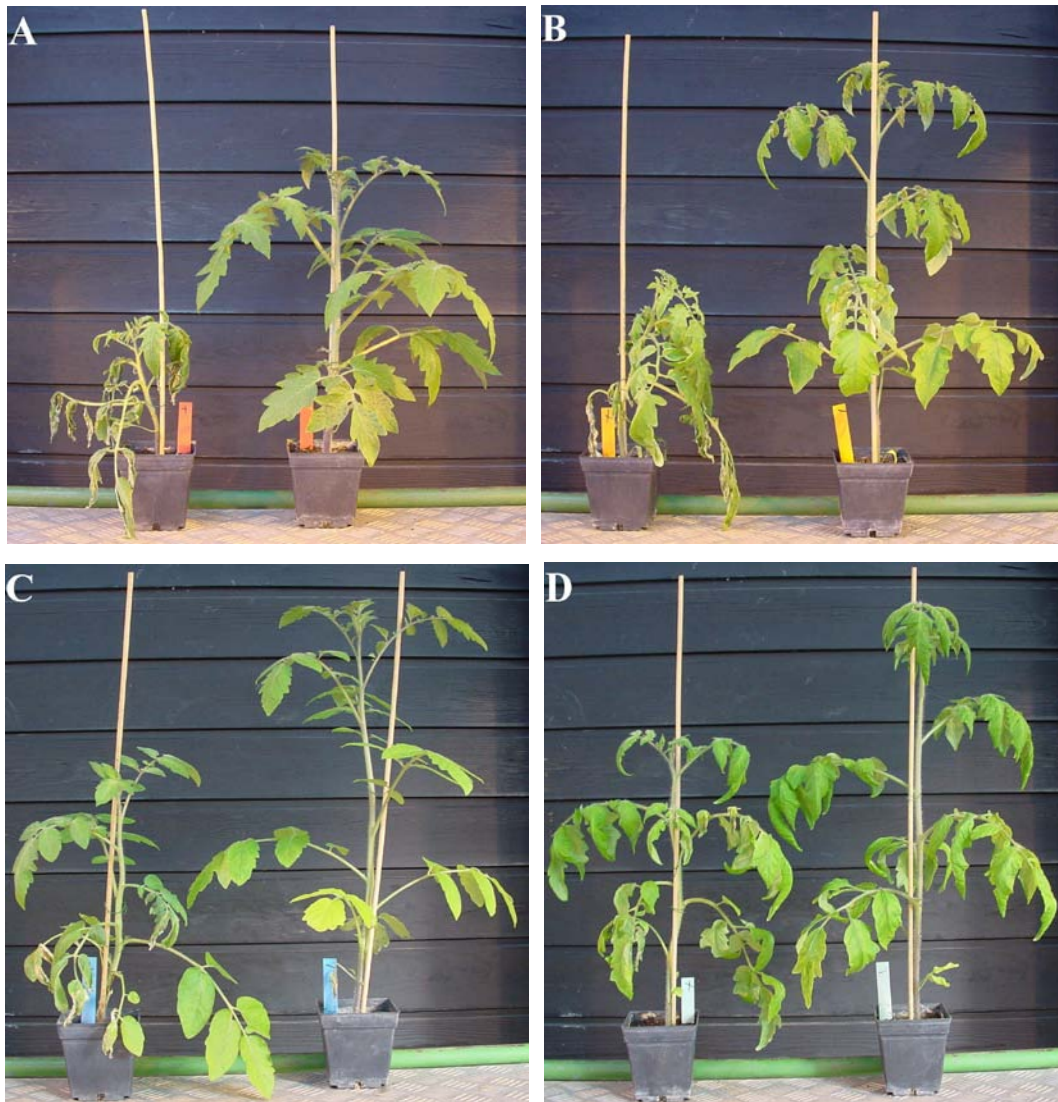


Abb. 5: Darstellung der mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infizierten Tomatenpflanzen (links) und der Kontrollpflanzen (rechts) 4 Wochen nach der Inokulation, (A) anfällige Sorte Moneymaker, (B) anfällige Sorte Lyconorma, (C) gering anfällige Sorte Hawaii 7998, (D) gering anfällige Sorte Irat L3.

### 3.2. Mikroskopische Untersuchungen zur Befallsreaktion

Die mikroskopische Untersuchung der Leitgefäße in Stängelquerschnitten der verschiedenen Tomatensorten zeigte, dass bei den anfälligen Sorten Moneymaker und Lyconorma mehr Gefäßverstopfungen zu finden sind (Abb. 7). Desweiteren wurden die Schnitte mit Hilfe von UV-Licht auf das Vorhandensein von phenolischen Verbindungen untersucht. Hierbei zeigte sich in den infizierten Proben eine deutlich stärkere Fluoreszenz als in den Kontrollen (Abb. 6 und Abb. 7). Diese konnte vor allem in den Zellwänden der parenchymatischen Zellen im Bereich der erst kurzzeitig infizierten Xylemgefäße beobachtet werden. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den untersuchten Sorten.

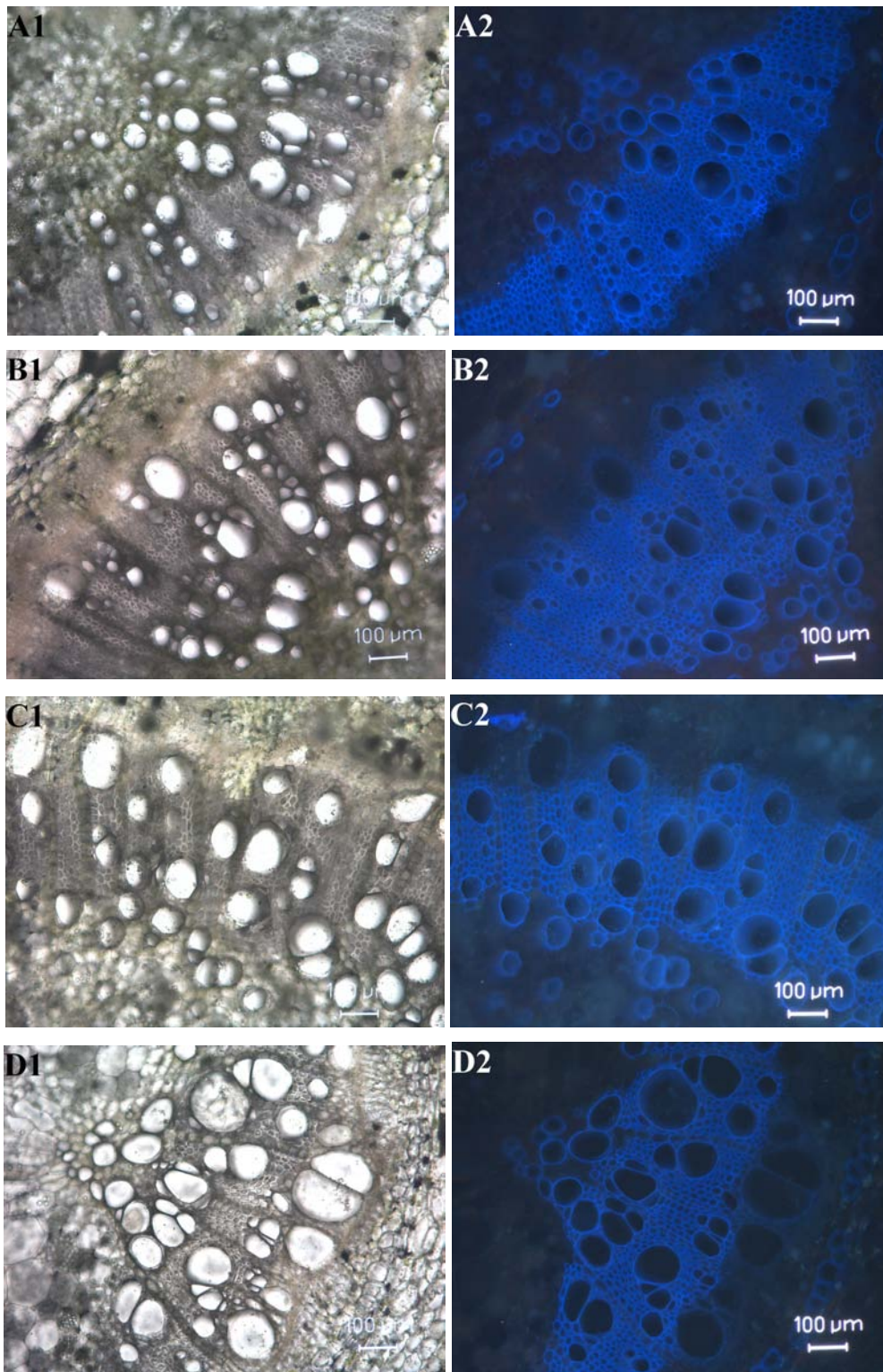


Abb. 6: Mikroskopische Aufnahmen von Handschnitten der Kontrollpflanzen 4 Wochen nach der Inokulation im Bereich der Inokulationsstelle, (A) anfällige Sorte Moneymaker, (B) anfällige Sorte Lyconorma, (C) gering anfällige Sorte Hawaii 7998, (D) gering anfällige Sorte Irat L3. (1) Lichtmikroskopische Aufnahme, (2) Aufnahme unter UV-Licht zum Nachweis von Phenolen (bei positiver Reaktion: verstärkte Fluoreszenz).

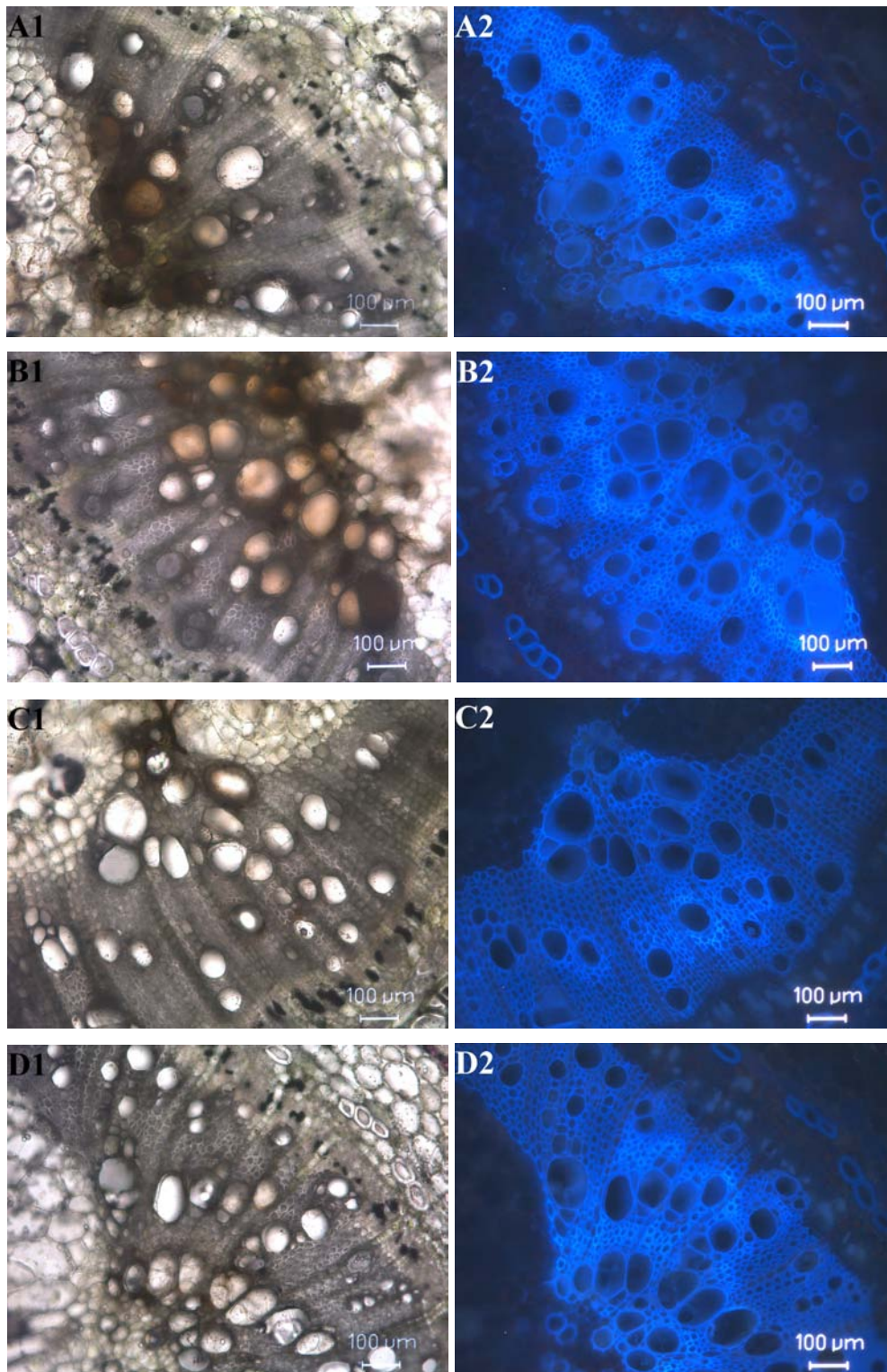


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahmen von Handschnitten von Stängelproben der infizierten Tomatenpflanzen 4 Wochen nach der Inokulation im Bereich der Inokulationsstelle, (A) anfällige Sorte Moneymaker, (B) anfällige Sorte Lyconorma, (C) gering anfällige Sorte Hawaii 7998, (D) gering anfällige Sorte Irat L3. (1) Lichtmikroskopische Aufnahme, (2) Aufnahme unter UV-Licht zum Nachweis von Phenolen (bei positiver Reaktion: verstärkte Fluoreszenz).

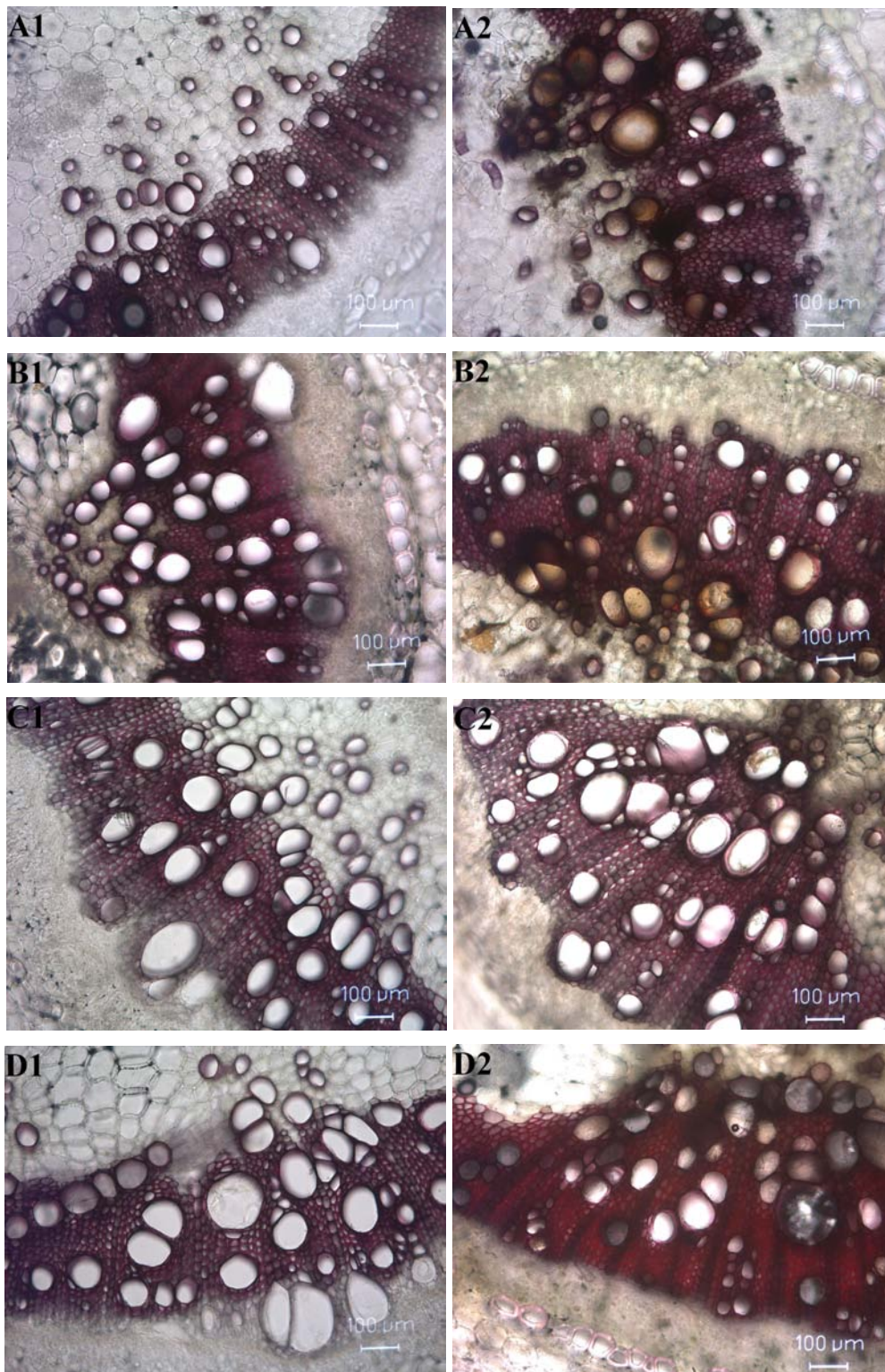


Abb. 8: Mikroskopische Aufnahmen von Handschnitten von Stängelproben der infizierten Tomatenpflanzen 4 Wochen nach der Inokulation im Bereich der Inokulationsstelle nach einer Färbung mit Phloroglucinol zum Nachweis von Lignin (Rot-Färbung), (A) anfällige Sorte MoneyMaker, (B) anfällige Sorte Lyconorma, (C) gering anfällige Sorte Hawaii 7998, (D) gering anfällige Sorte Irat L3. (1) Kontrolle, (2) mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infiziert.

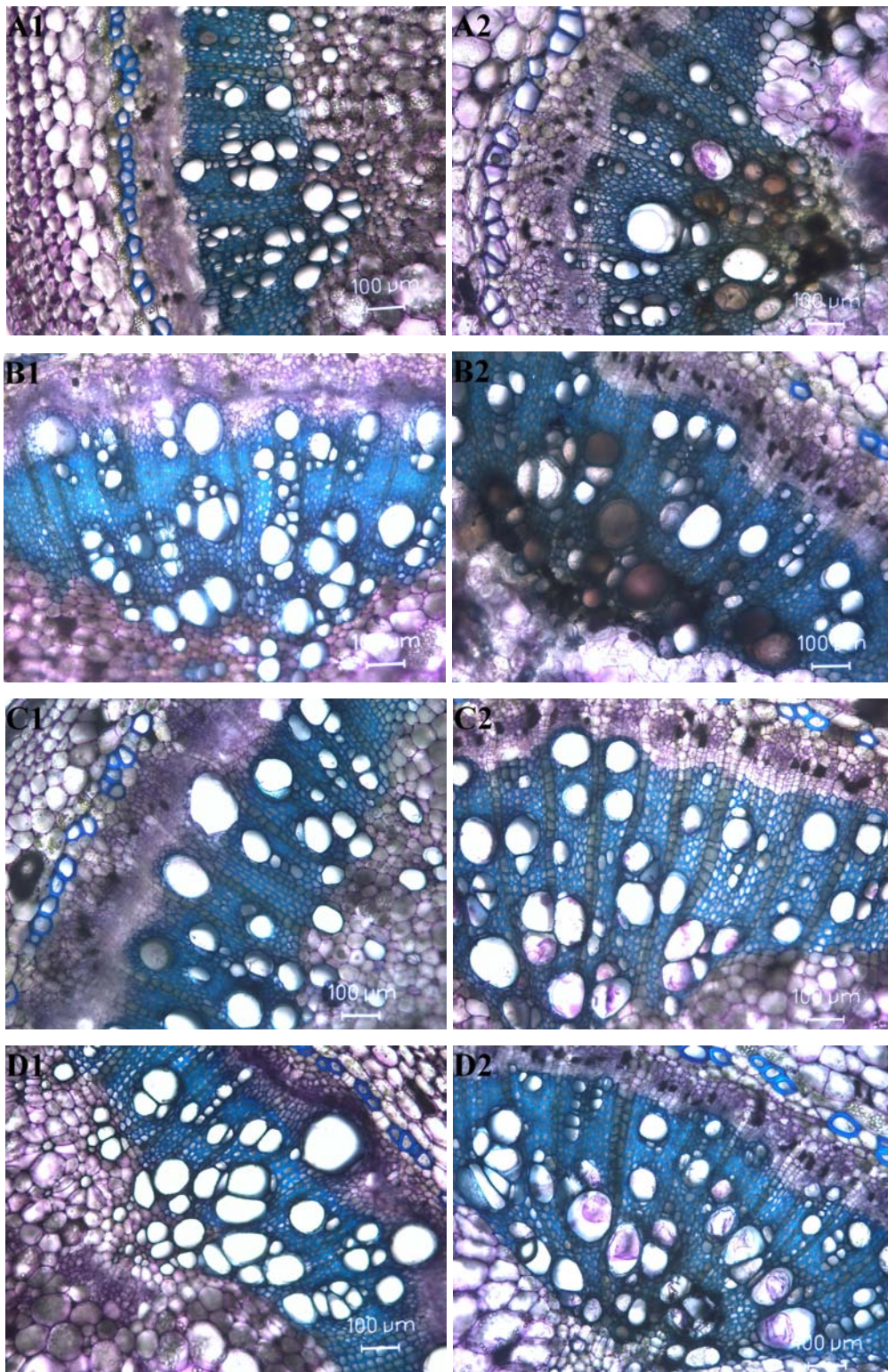


Abb. 9: Mikroskopische Aufnahmen von Handschnitten von Stängelproben der infizierten Tomatenpflanzen 4 Wochen nach der Inokulation im Bereich der Inokulationsstelle nach einer Färbung mit Toluidinblau, verholzte Zellen erscheinen blau, unverholzte Zellen werden pink gefärbt, (A) anfällige Sorte Moneymaker, (B) anfällige Sorte Lyconorma, (C) gering anfällige Sorte Hawaii 7998, (D) gering anfällige Sorte Irat L3. (1) Kontrolle, (2) mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infiziert.

Um Unterschiede in der Lignifizierung zu sehen, wurden die Schnitte mit Phloroglucinol gefärbt, was zu einer Rot-Färbung von lignifiziertem Gewebe führt. Da neben den Xylemgefäßen auch die umgebenden parenchymatischen Zellen verholzt sind und die Gefäßverstopfungen eine bräunliche Farbe aufweisen, war es nicht möglich, Unterschiede in der Lignifizierung in Bezug auf die untersuchten Sorten zu erkennen. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die umliegenden Zellen im Bereich des primären Xylems der infizierten Pflanzen vermehrt Verholzungen der Zellwände aufwiesen (Abb. 8).

Die Färbung der Schnitte mit Toluidinblau, welche unverholzte Zellewände pink färbt und verholzte blau, wurde genutzt, um die Thyllenbildung in den Xylemgefäßen zu beobachten. Dabei wurden in den anfälligen Sorten Moneymaker und Lyconorma kaum Thyllen beobachtet. Bei den weniger anfälligen Sorten Hawaii 7998 und Irat L3 konnten hingegen in vielen Gefäßen Thyllen beobachtet werden. Sie zeigten je nach Alter des Xylemgefäßes verschiedene Entwicklungsstadien. Gefäße des primären Xylems waren oft vollständig von Thyllen ausgefüllt. Gefäße des sekundären Xylems enthielten meist kleinere Thyllen die noch nicht das komplette Lumen des Gefäßes ausfüllten (Abb. 9).

Um die Kallosebildung in Bezug auf den Befall von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* zu beobachten, wurden Mikrotomschnitte von in Paraffin fixierten Proben mit alkalischem Anilinblau angefärbt und unter UV-Licht angeschaut. Dabei zeigte sich in allen Sorten eine Kallosedeposition in den Zellwänden der parenchymatischen Zellen und der Xylemgefäße, sowie in den Gefäßen selbst (Abb. 10).

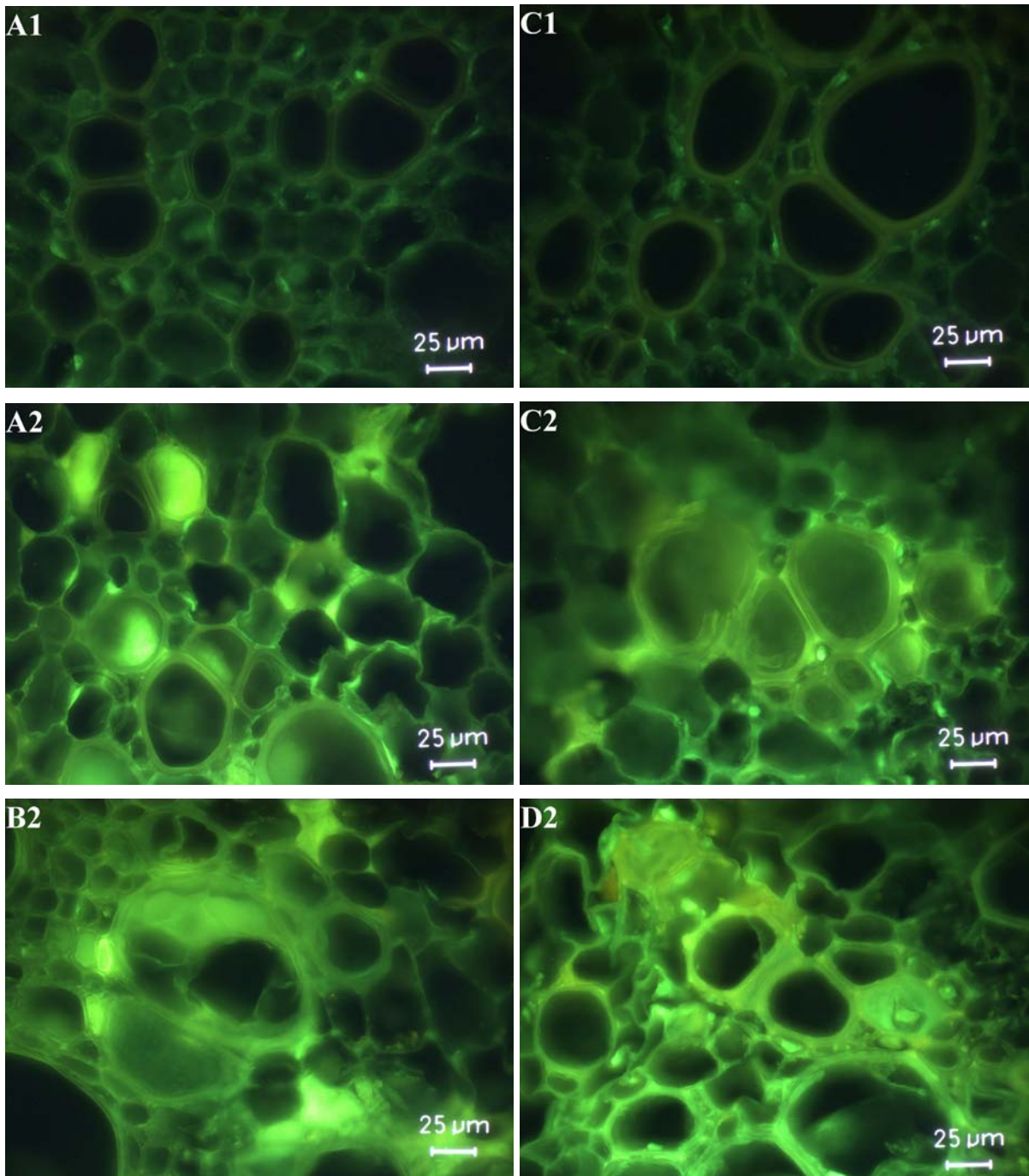


Abb. 10: Mikroskopische Aufnahmen von in Paraffin eingebetteten Stängelproben (4 Wochen nach der Inokulation im Bereich der Inokulationsstelle) mit einer Dicke von 30 µm nach der Färbung mit Anilinblau unter UV-Licht zum Nachweis von Kallose (bei positiver Reaktion: verstärkte Fluoreszenz), (A) anfällige Sorte Moneymaker, (B) anfällige Sorte Lyconorma, (C) gering anfällige Sorte Hawaii 7998. (D) gering anfällige Sorte Irat L3, (1) Kontrollpflanze, (2) infizierte Pflanze.

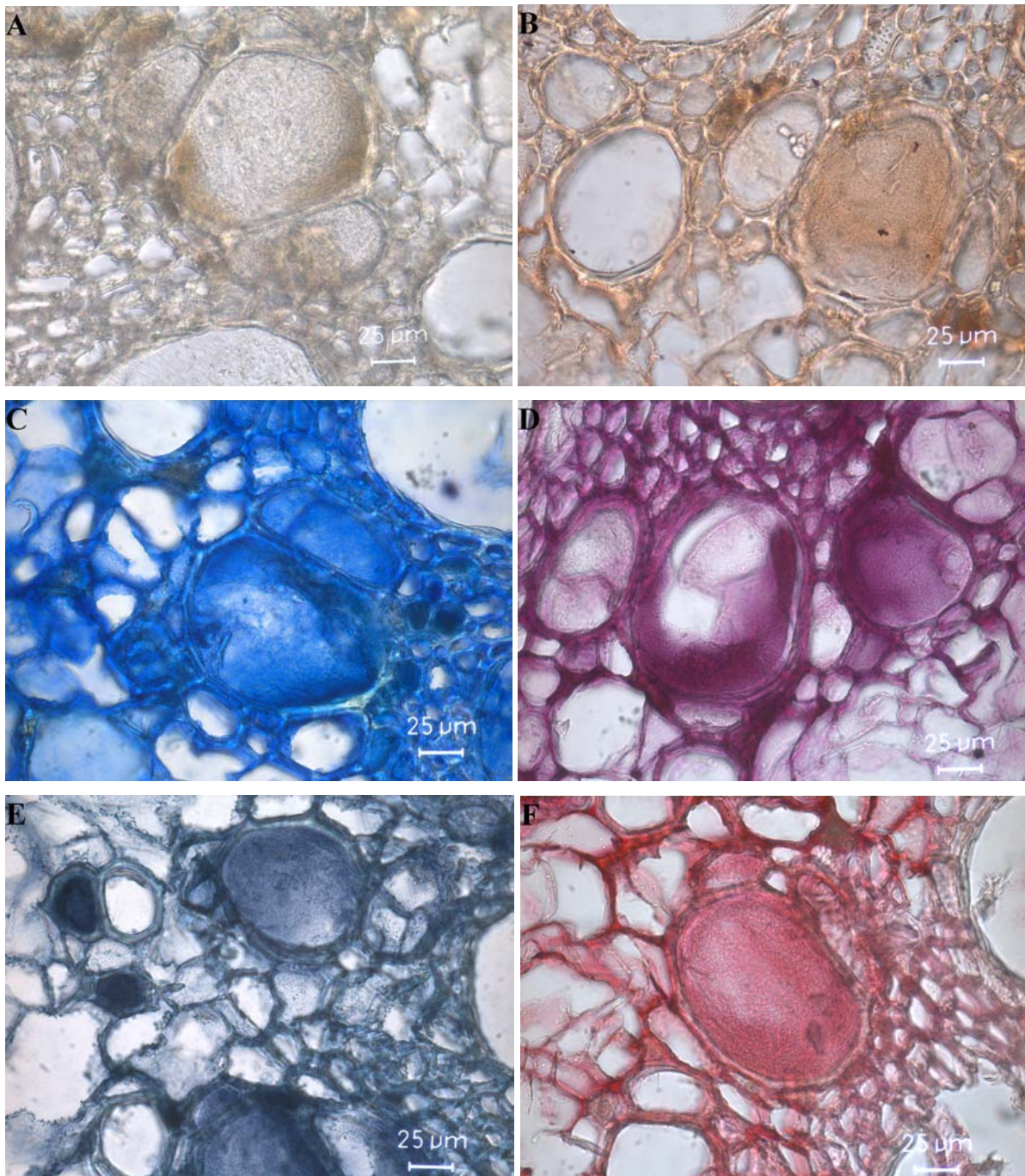


Abb. 11: Mikroskopische Aufnahmen von in Paraffin eingebetteten Stängelproben (4 Wochen nach der Inokulation mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) im Bereich der Inokulationsstelle der anfälligen Tomatensorte Lyconorma mit einer Dicke von 30 µm nach verschiedenen Färbungen in Bezug auf die Gefäßverschlüsse, (A) ungefärbte Kontrolle, (B) Färbung mit Sudan III zum Nachweis von Suberin (Orange-Färbung), (C) Färbung mit Coomassie brilliant blue zum Nachweis von Proteinen (Blau-Färbung), (D) Färbung mit Perjod-Schiff Reagenz zum Nachweis von Polysacchariden (Pink-Färbung), (E) Färbung mit Sudanschwarz B zum Nachweis von Lipiden (Dunkelblau-Färbung), (F) Färbung mit Rutheniumrot zum Nachweis von Pektin (Rot-Färbung).



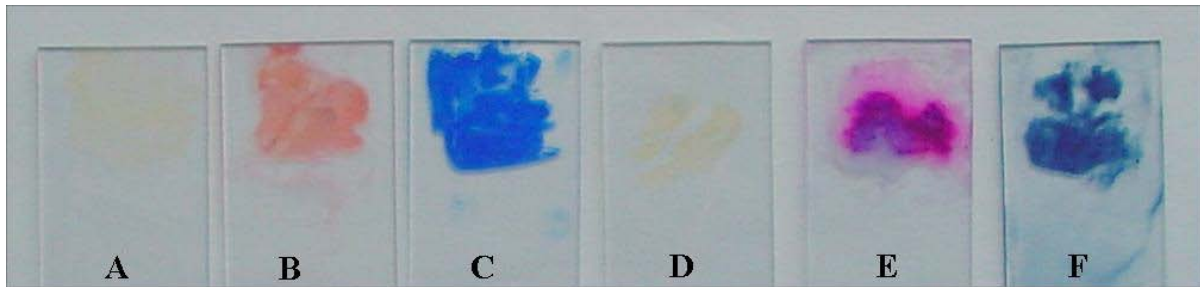


Abb. 12: Färbung der Bakterienausstriche von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, (A) ungefärbte Kontrolle, (B) Färbung mit Sudan III zum Nachweis von Suberin (Orange-Färbung), (C) Färbung mit Coomassie brilliant blue zum Nachweis von Proteinen (Blau-Färbung), (D) Färbung mit Rutheniumrot zum Nachweis von Pektin (Rot-Färbung-hier nicht der Fall), (E) Färbung mit Perjod-Schiff Reaktion zum Nachweis von Polysacchariden (Pink-Färbung), (F) Färbung mit Sudanschwarz B zum Nachweis von Lipiden (Dunkelblau-Färbung).

Die histochemische Färbung der Gefäßverstopfungen mittels Sudan III (Nachweis Suberin), Coomassie Brilliant Blue (Nachweis Proteine), Perjod-Schiff Reaktion (Nachweis Polysaccharide), Sudanschwarz (Nachweis Lipide) und Rutheniumrot (Nachweis Pektin) ergab in allen Fällen eine positive Reaktion (Abb. 11). Auch die Färbung der Bakterienausstriche zeigte eine positive Reaktion auf die Färbungen. Nur der Nachweis von Pektin mittels Rutheniumrot fiel negativ aus (Abb. 12). Auch die Färbung zum Nachweis von Kallose zeigte bei den Bakterienausstrichen keine positive Reaktion.

Tab. 7: Zusammenfassende Tabelle der unterschiedlichen Färbungen an den getesteten Tomatensorten und dem Bakterienausstrich von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) (+ positive Reaktion, - negative Reaktion)

	Moneymaker	Lyconorma	Hawaii 7889	Irat L3	Cmm
Kallose					
Anilinblau	+	+	+	+	-
Suberin					
Sudan III	+	+	+	+	+
Pektin					
Rutheniumrot	+	+	+	+	-
Polysaccharide					
Perjod-Schiff Reaktion	+	+	+	+	+
Lipide					
Sudanschwarz	+	+	+	+	+
Proteine					
Coomassie brilliant blue	+	+	+	+	+

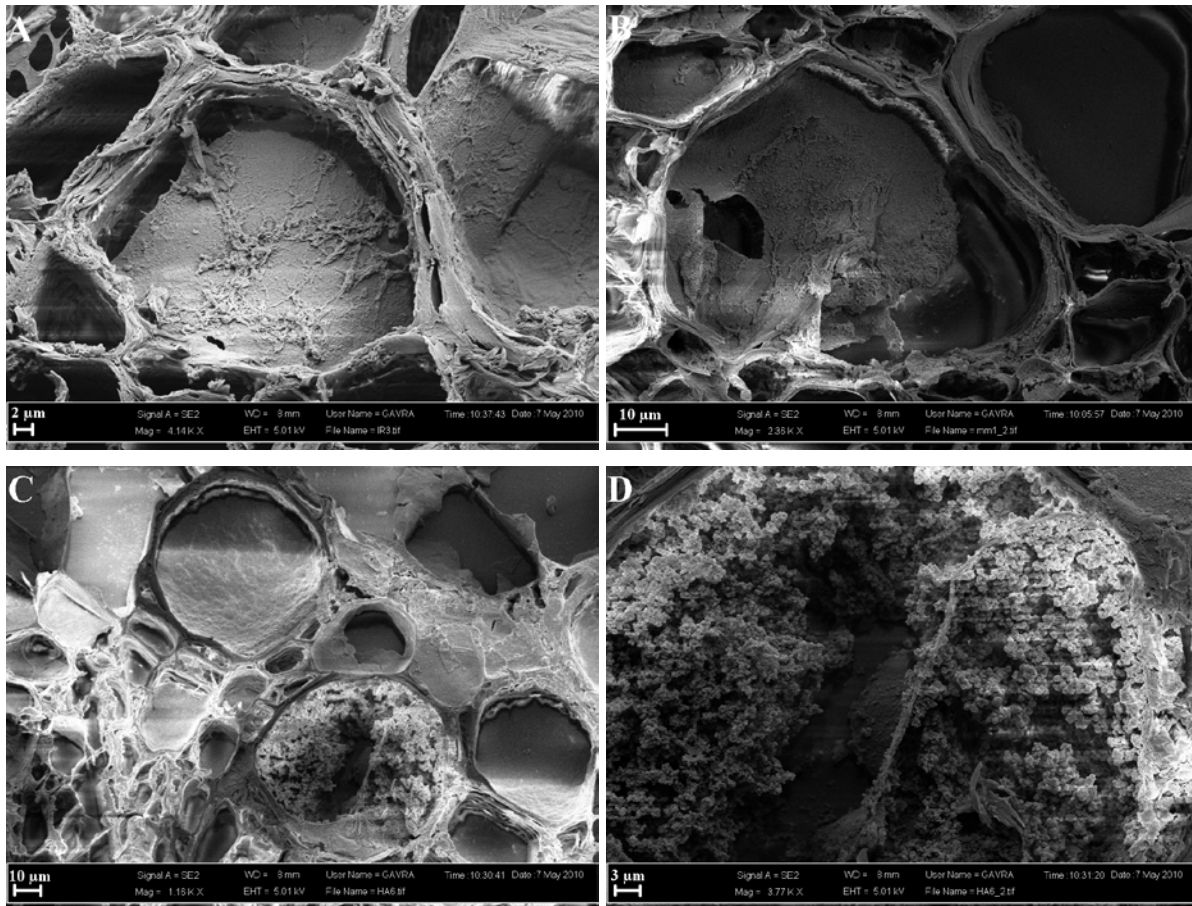


Abb. 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) der verschiedenen Gefäßverschlüsse von in Paraffin eingebetteten Stängelproben der Tomatenpflanzen (4 Wochen nach der Inokulation mit *Clavibacter michiagnensis* subsp. *michiagnensis*) im Bereich der Inokulationsstelle mit einer Dicke von 30 µm, (A) gelartiger Gefäßverschluss mit faserartiger Struktur in der Sorte Irat L3, (B) verstopftes Gefäß neben freiem Gefäß in der Sorte Moneymaker, (C) gelartige Gefäßverstopfung neben Gefäß mit granulatartiger Verstopfung in der Sorte Lyconorma, (D) Detailaufnahme der granulatartigen Gefäßverstopfung von C.

Unter dem Rasterelektronenmikroskop kann man deutlich die gelartigen Gefäßverstopfungen gut erkennen. Sie füllen das Gefäß meist komplett aus und zeigen manchmal faserartige Strukturen. Gelegentlich findet man auch Gefäße, die einen granulatartigen Inhalt haben, der vermutlich auf die Bakterien zurückzuführen ist (Abb. 13).

Die Immunfluoreszenzfärbung der Schnitte zeigt deutlich, dass die granulatartigen Gefäßverstopfungen eine Besiedlung des Xylemgefäßes durch *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ist. Die gelartigen Gefäßverstopfungen zeigen zwar auch eine Fluoreszenz, es sind aber keine Bakterien zu erkennen (Abb. 14). Die Masse wirkt undefiniert. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch Gefäße auftreten, in denen sich die Bakterien befinden, die scheinbar von einer gelartigen Masse umgeben sind (Abb. 15).

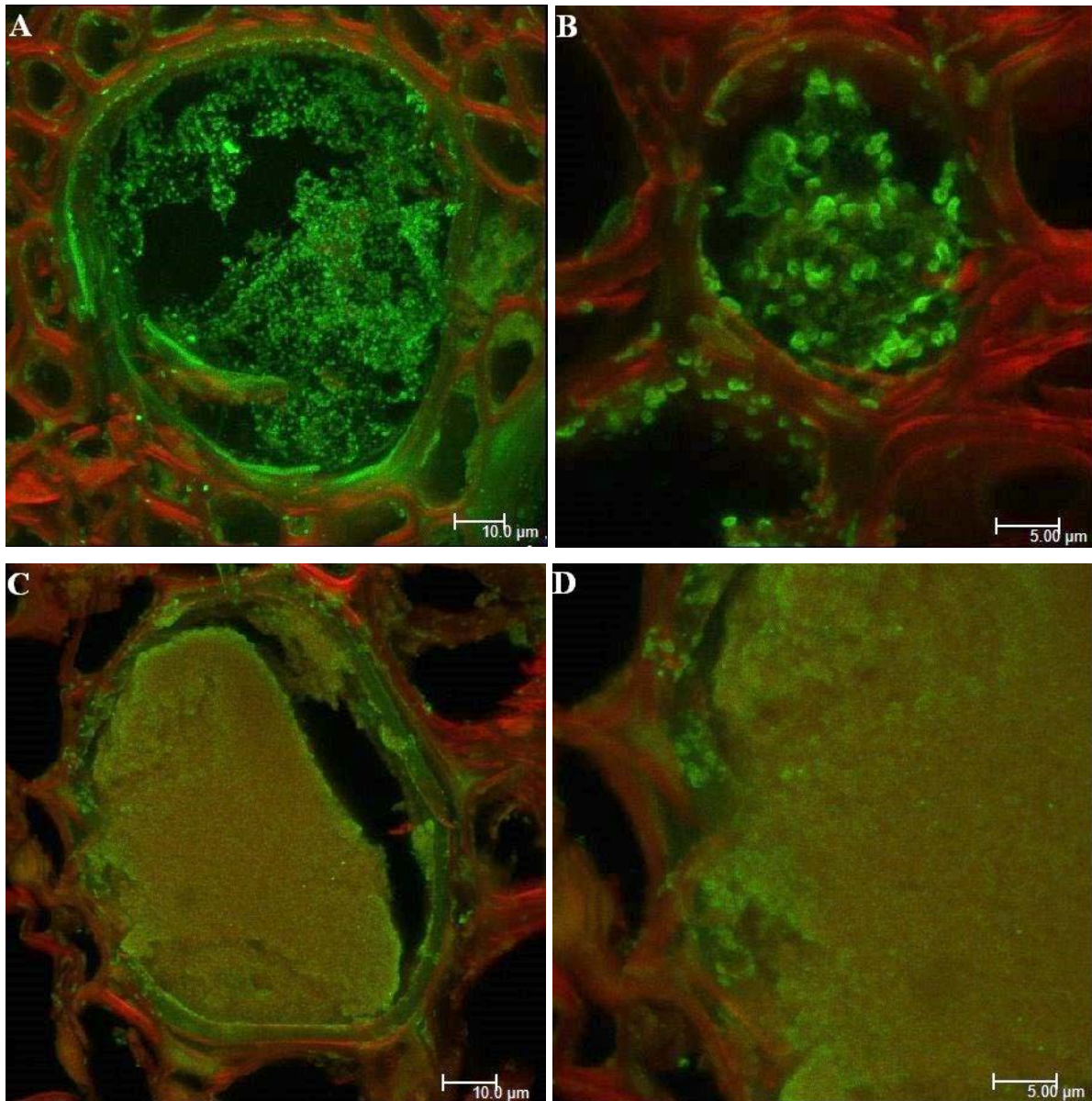


Abb. 14: Aufnahmen der verschiedenen Gefäßverschlüsse im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) von in Paraffin eingebetteten Stängelproben der Tomatenpflanzen (4 Wochen nach der Inokulation mit *Clavibacter michiagnensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)) im Bereich der Inokulationsstelle mit einer Dicke von 30 µm nach der Gewebeanfärbung mit Trypanblau und der Anfärbung von Cmm mit Hilfe der Immunfluoreszenz, (A) Lyconorma mit Bakterien im Xylemgefäß, (B) Irat L3 mit Bakterien im Gefäß, (C) Irat L3 mit einer gelartigen Verstopfung im Gefäß, (D) Detailaufnahme von C.

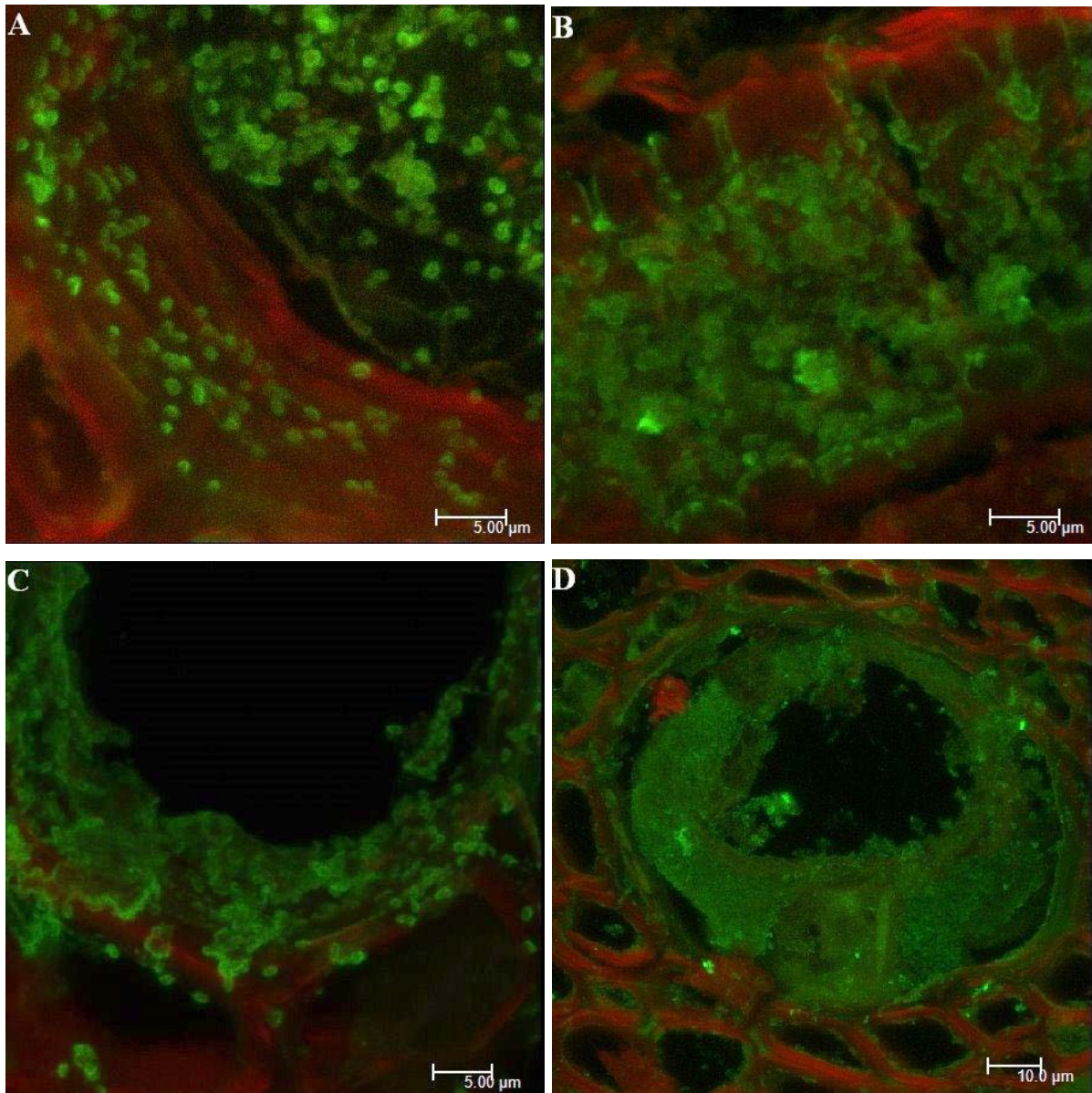


Abb. 15: Aufnahmen der verschiedenen Gefäßveränderungen im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) von in Paraffin eingebetteten Stängelproben der Tomatenpflanzen (4 Wochen nach der Inokulation mit *Clavibacter michiagnensis* subsp. *michiganensis*(Cmm)) im Bereich der Inokulationsstelle mit einer Dicke von 30 µm nach der Gewebeanfärbung mit Trypanblau und der Anfärbung von Cmm mit Hilfe der Immunofluoreszenz, (A) Xylemgefäß der gering anfälligen Tomatensorte Irat L3 mit gut erkennbaren Bakterien im Gefäßinneren, (B) Längsschnitt eines Xylemgefäßes der anfälligen Sorte Lyconorma, welches stark mit Cmm besiedelt ist, (C) Querschnitt des Xylemgefäßes der anfälligen Sorte Moneymaker, in dem die Bakterien von einer Substanz überzogen scheinen und dadurch nicht mehr deutlich zu erkennen sind, (D) Gefäßverstopfung bei der anfälligen Sorte Moneymaker mit nicht eindeutig erkennbaren Bakterien.

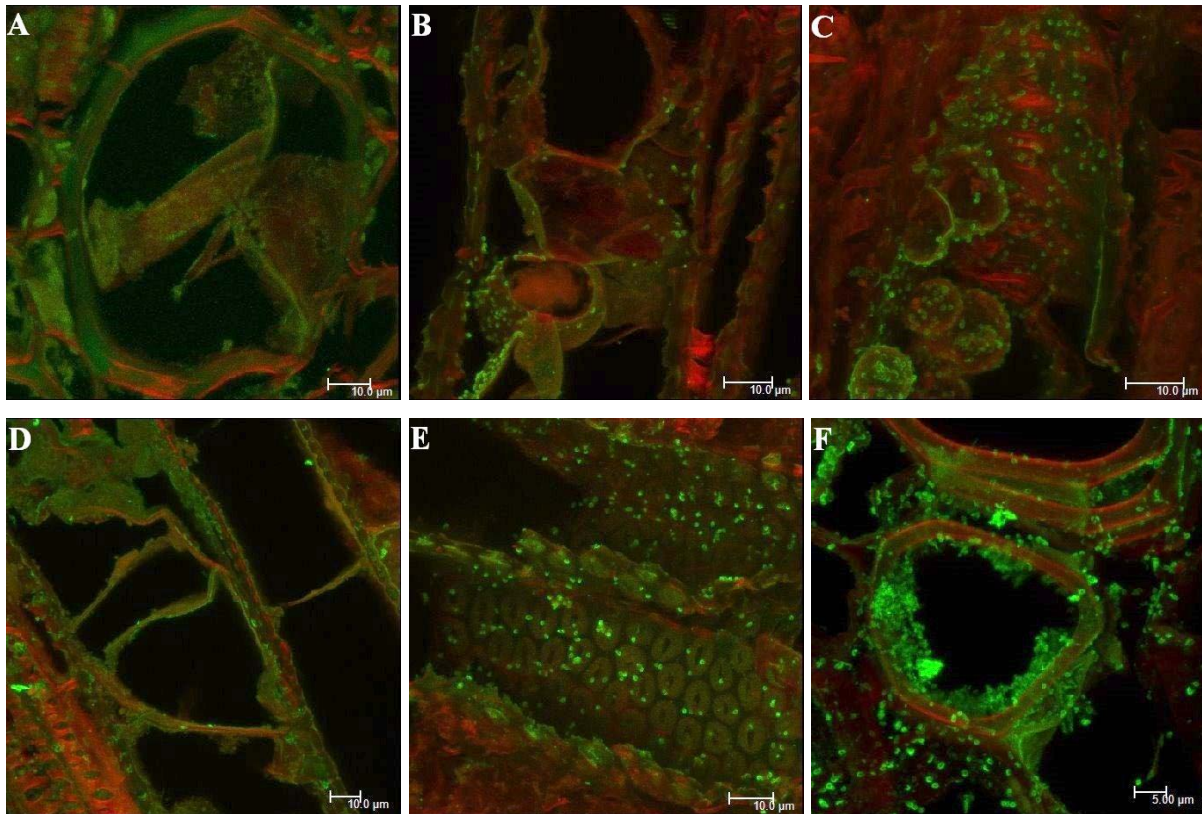


Abb. 16: Aufnahmen der verschiedenen Xylemgefäße im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) von in Paraffin eingebetteten Stängelproben (4 Wochen nach der Inokulation) im Bereich der Inokulationsstelle mit einer Dicke von 30 µm nach der Gewebeanfärbung mit Trypanblau und der Anfärbung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) mit Hilfe der Immunofluoreszenz, (A) Querschnitt eines Xylemgefäßes der Sorte Hawaii 7998, welches vollständig von Thyllen ausgefüllt ist und in dem keine Bakterien nachweisbar waren, (B) Längsschnitt eines Xylemgefäßes der Sorte Irat L3, welches Thyllen enthält, die das Gefäß noch nicht vollständig ausfüllen und von Cmm, (C) Längsschnitt eines Xylemgefäßes der Sorte Irat L3 mit kleinen Thyllen und einem starken Befall an Cmm, (D) Längsschnitt zweier nebeneinander liegender Xylemgefäße der Sorte Moneymaker, von dem ein Gefäß vollständig mit Thyllen ausgefüllt ist und das andere Gefäß keine Thyllen beinhaltet, (E) Längsschnitt zweier Xylemgefäße der Sorte Irat L3, die keine Thyllen enthalten, aber von Cmm besiedelt sind, (F) Querschnitt eines Xylemgefäßes der Tomatensorte Moneymaker, welches stark von Cmm befallen ist und wo das Bakterium sich bereits in die umliegenden parenchymatischen Zellen ausgebreitet hat.

Desweiteren konnten in allen untersuchten Tomatensorten mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* befallene Xylemgefäße in unterschiedlichen Stadien der Pathogenabwehr beobachtet werden (Abb. 16). Es zeigten sich befallene Gefäße, die von dem Bakterium befallen waren, aber keine Thyllen enthielten. Besonders bei stark befallenen primären Xylemgefäßen, konnte eine Ausbreitung der Bakterien in die umliegenden parenchymatischen Zellen und die Markzellen beobachtet werden. Außerdem zeigten sich befallene Xylemgefäße mit unterschiedlichen Stadien der Thyllenbildung. Gefäße mit kleinen Thyllen enthielten meist viele Bakterien, die auch die Oberfläche der Thyllen besiedelten. In Gefäßen mit Thyllen, die das ganze Gefäß ausfüllten, konnten meist keine Bakterien mehr nachgewiesen werden.

### 3.3. Pathogenausbreitung in unterschiedlich anfälligen Tomatensorten

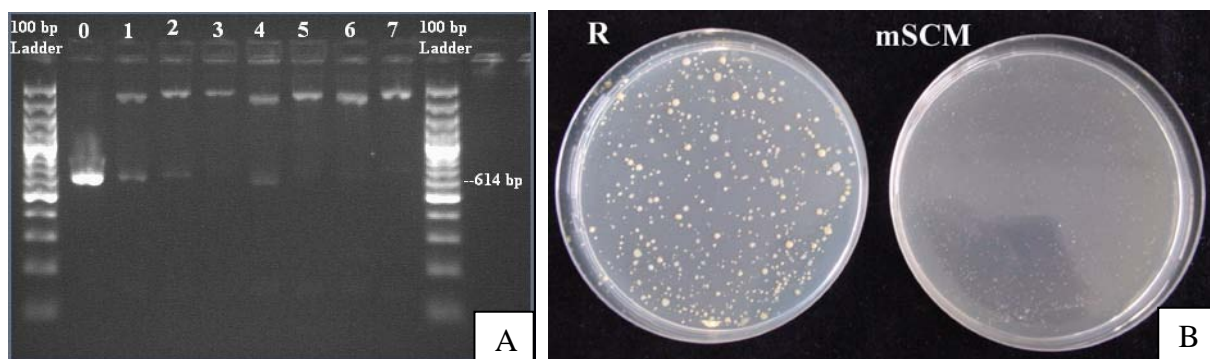


Abb. 17: Nachweis von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, (A) Gelfoto des PCR-Produktes von 614 bp in den Stängelsegmenten der Sorte MoneyMaker (PCR nach Dreier et al.1995), (B) Kolonien auf dem semiselektiven Nachweismedium R nach 6 Tagen und mSCM-Medium nach 14 Tagen bei einer Inkubationstemperatur von 25°C.

Um die Ausbreitung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in der anfälligen Tomatensorte MoneyMaker und der gering anfälligen Sorte Irat L3 zu untersuchen, wurden 7 Wochen alte Pflanze mit einer definierten Suspension inokuliert und nach einer Woche in verschiedenen Segmentabschnitten untersucht.

Der Nachweis von Cmm mittels PCR zeigte ein deutliches Amplifikationsprodukt mit einer Größe von 614 bp (Abb. 17 A). Besonders im Segment 0, in dem sich die Inokulationsstelle befand, war die Bande sehr deutlich ausgeprägt. Es konnte jedoch oft beobachtet werden, dass die Segmente nicht kontinuierlich in aufsteigender Folge ein positives Amplifikationsprodukt zeigten, sondern gelegentlich zwischen positiven Segmenten negative Segmente auftauchten.

Alle drei eingesetzten Isolate von Cmm (MO-1, OS-1, GSPB 34) konnten durch die angewendete PCR Methode einzeln nachgewiesen werden.

Auf dem Nachweismedium R zeigten sich die ersten Kolonien bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C schon nach 4 Tagen. Auf dem mSCM-Medium konnten die ersten Kolonien frühestens nach 10 Tagen beobachtet werden. Desweiteren waren diese auf dem R-Medium deutlich zu erkennen, wogegen auf dem mSCM-Medium nur sehr kleine Kolonien ausgebildet wurden (Abb. 17 B). Dies machte das genaue Erfassen der Kolonienanzahl schwierig.

Tab. 8: Anzahl der auf *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* positiv getesteten Segmentabschnitte der anfälligen Sorte Moneymaker und der gering anfälligen Sorte Irat L3 eine Woche noch der Inokulation durch die PCR nach Dreier et al. 1995 und die semiselektiven Medien R und mSCM (n=9)

	Moneymaker			Irat L3		
	PCR	R	mSCM	PCR	R	mSCM
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
1	67%	89%	55%	67%	78%	56%
2	33%	67%	67%	11%	33%	44%
3	56%	89%	67%	33%	67%	76%
4	44%	56%	67%	33%	67%	44%
5	11%	78%	56%	11%	33%	33%
6	0%	89%	56%	22%	56%	44%
7	0%	33%	22%	33%	33%	33%

Tab. 9: Durchschnittliche Anzahl der CFU (colony forming unit) pro g Frischmasse der einzelnen Segmentabschnitte der anfälligen Sorte Moneymaker und der gering anfälligen Sorte Irat L3 ermittelt durch Ausplattieren auf den selektiven Nachweismedien R und mSCM (n=9)

	Moneymaker		Irat L3	
	R	mSCM	R	mSCM
0	$1,3 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^8$
1	$1,5 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^5$	$9,9 \cdot 10^4$
2	$7,6 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^3$	$8,8 \cdot 10^2$
3	$2,3 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$	$8,3 \cdot 10^3$	$6,8 \cdot 10^3$
4	$8,4 \cdot 10^2$	$6,8 \cdot 10^3$	$4,8 \cdot 10^3$	$4,4 \cdot 10^3$
5	$2,4 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^3$
6	$1,5 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^2$	$4,8 \cdot 10^2$
7	$1,2 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^1$	$4,8 \cdot 10^3$	$4,4 \cdot 10^3$

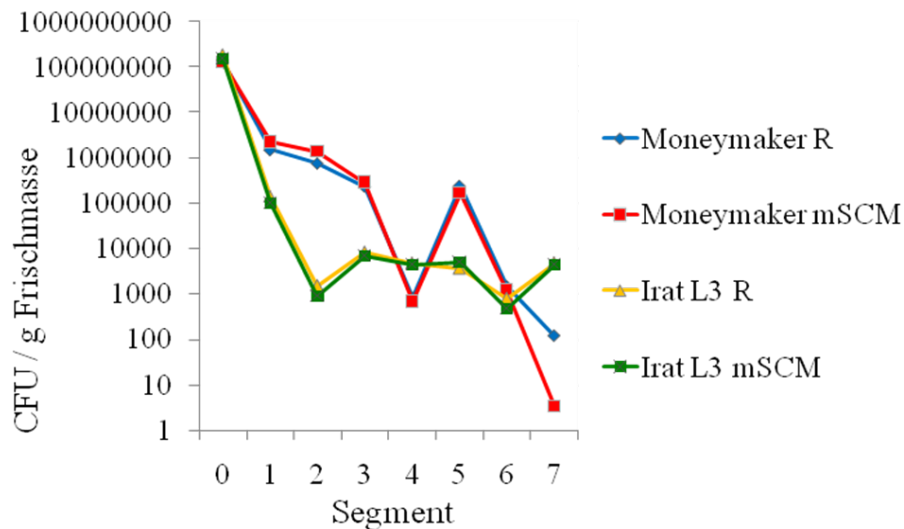


Abb. 18: Graphische Darstellung der durchschnittlichen Anzahl der CFU (colony forming units) pro g Frischmasse der einzelnen Segmentabschnitte der anfälligen Sorte Moneymaker und der gering anfälligen Sorte Irat L3 ermittelt durch Ausplattieren auf den semiselektiven Nachweismedien R und mSCM.

Es zeigte sich, dass durch die Ausplattierung mehr Segmentstücke positiv auf *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* getestet wurden als durch den Nachweis mit Hilfe der PCR (Tab. 8). Zudem konnte festgestellt werden, dass die anfällige Tomatensorte Moneymaker mehr Bakterien enthielt als die gering anfällige Sorte Irat L3 (Tab. 9). Es konnte jedoch auch beobachtet werden, dass es in beiden Sorten Pflanzen gab, bei denen sich die Bakterien bis in die obersten Segmente ausgebreitet hatten.

### 3.4. Schadwirkung von Kulturfiltraten

Der Bioassay zeigte, dass alle vier getesteten Sorten in gleichem Maße mit Welke und dem damit verbundenen Gewichtsverlust durch das Inkubieren in einem Kulturfiltrat mit den Stoffwechselprodukten von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) reagieren.

Bei Verwendung von 100% NGA-Lösungs-Filtrat, welches mit den Bakterien versetzt wurde, konnten durchschnittliche Gewichtsverluste von 9,0-10,4% ermittelt werden. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den anfälligen Sorten Moneymaker und Lyconorma, gegenüber den wenig anfälligen Sorten Irat L3 und Hawaii 7998. Die Pflanzen zeigten nach der 24-stündigen Inkubation deutliche Welkesymptome und waren nichtmehr in der Lage aufrecht zu stehen. Bei der Verwendung eines 50% igen NGA-Lösungs-Filtrats, konnte ein durchschnittlicher Gewichtsverlust von 7,1-8,3% beobachtet werden. Dabei waren



wieder deutliche Welkesymptome zu erkennen. Die Pflanzen konnten zwar meist noch aufrecht stehen, aber alle Blätter hingen schlaff nach unten (Abb. 19). Es wurden wieder keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sorten beobachtet (Abb. 20).

Um den Effekt der Filtratlösung auf die Ausbildung der Welkesymptome zu ermitteln, wurde ein reines NGA-Lösungs-Filtrat verwendet, welches nicht mit Cmm versetzt wurde. Dabei konnte ein Gewichtsverlust von durchschnittlich 2,1-3,7% ermittelt werden, der in den Berechnungen mit berücksichtigt wurde. Außerdem konnte eine leichte Welke an den Blattspitzen beobachtet werden, die aber im Vergleich zu dem getesteten NGA-Lösungs-Filtrat(100%, 50%) sehr gering war.

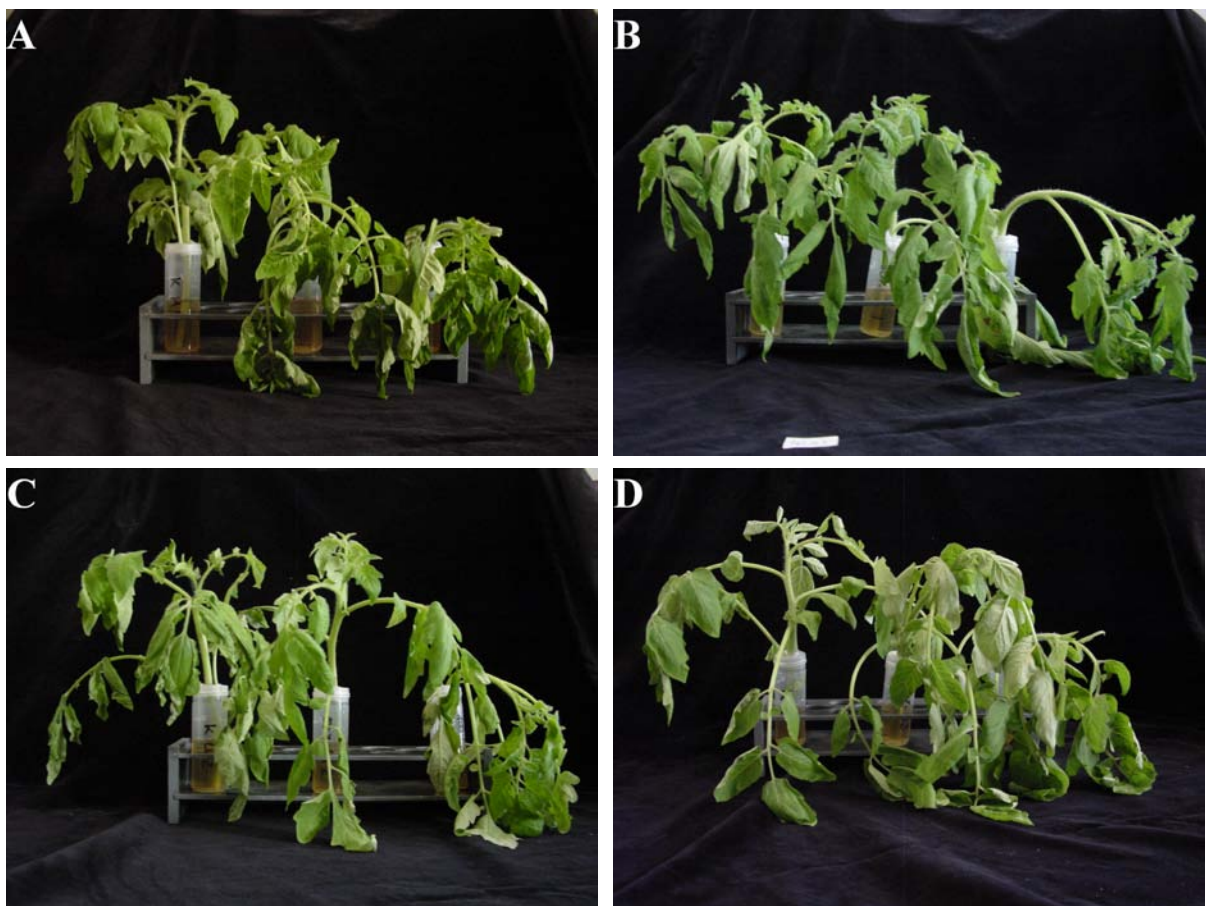


Abb. 19: Ausbildung der Welkesymptome von 5 Wochen alten Tomatenpflanzen nach 24-stündiger Inkubation in filtriertem, reinem NGA-Medium (links) und in 50% (Mitte) bzw. 100% (rechts) filtriertem NGA-Medium, in dem zuvor für 7 d *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bei 20°C und 100 rpm kultiviert wurde, (A) die anfällige Sorte Moneymaker, (B) die anfällige Sorte Lyconorma, (C) die gering anfällige Sorte Irat L3, (D) die gering anfällig Sorte Hawaii 7998.

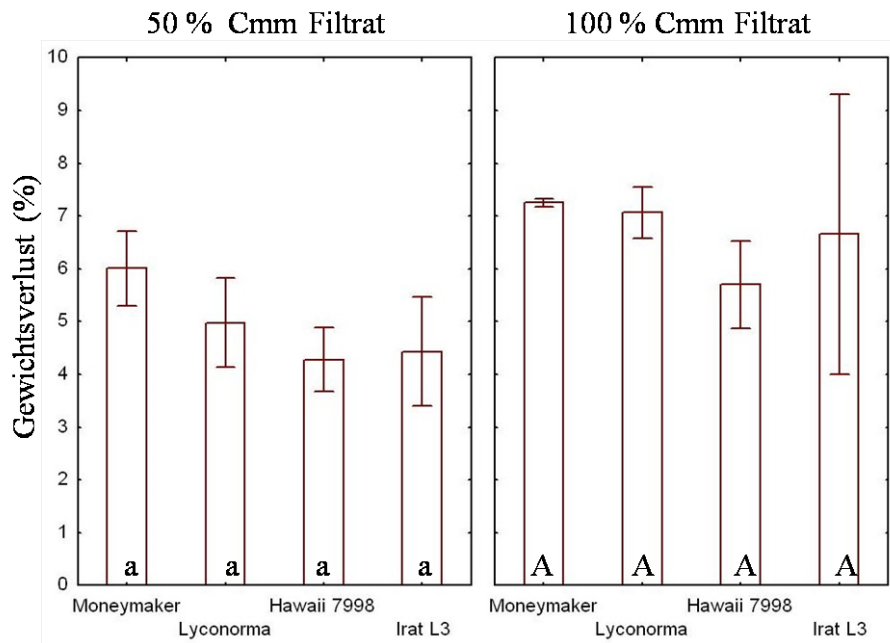


Abb. 20: Durchschnittlicher Gewichtsverlust von 5 Wochen alten Tomatenpflanzen der anfälligen Sorten MoneyMaker und Lyconorma, sowie der gering anfälligen Sorten Irat L3 und Hawaii 7998 nach 24-stündiger Inkubation in 50% (links) bzw. 100% (rechts) filtriertem NGA-Medium, in dem zuvor für 7 d *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bei 20°C und 100 rpm kultiviert wurde. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=15); unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Sorten ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.5. Lokalisation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* an Tomatensamen

Die Untersuchungen zur Lokalisation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) bei infizierten Tomatensamen mit Hilfe der Immunofluoreszenz zeigte deutlich, dass diese in großer Anzahl die Samenschale und deren Haare kolonisieren (Abb. 21 A und B). Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass sie sich nicht in Zellschichten der Samenschale oder im Inneren des Samens befanden. So zeigte die Untersuchung vom Endospermgewebes und des Embryos keinen Befall an Cmm (Abb. 21 C und D).

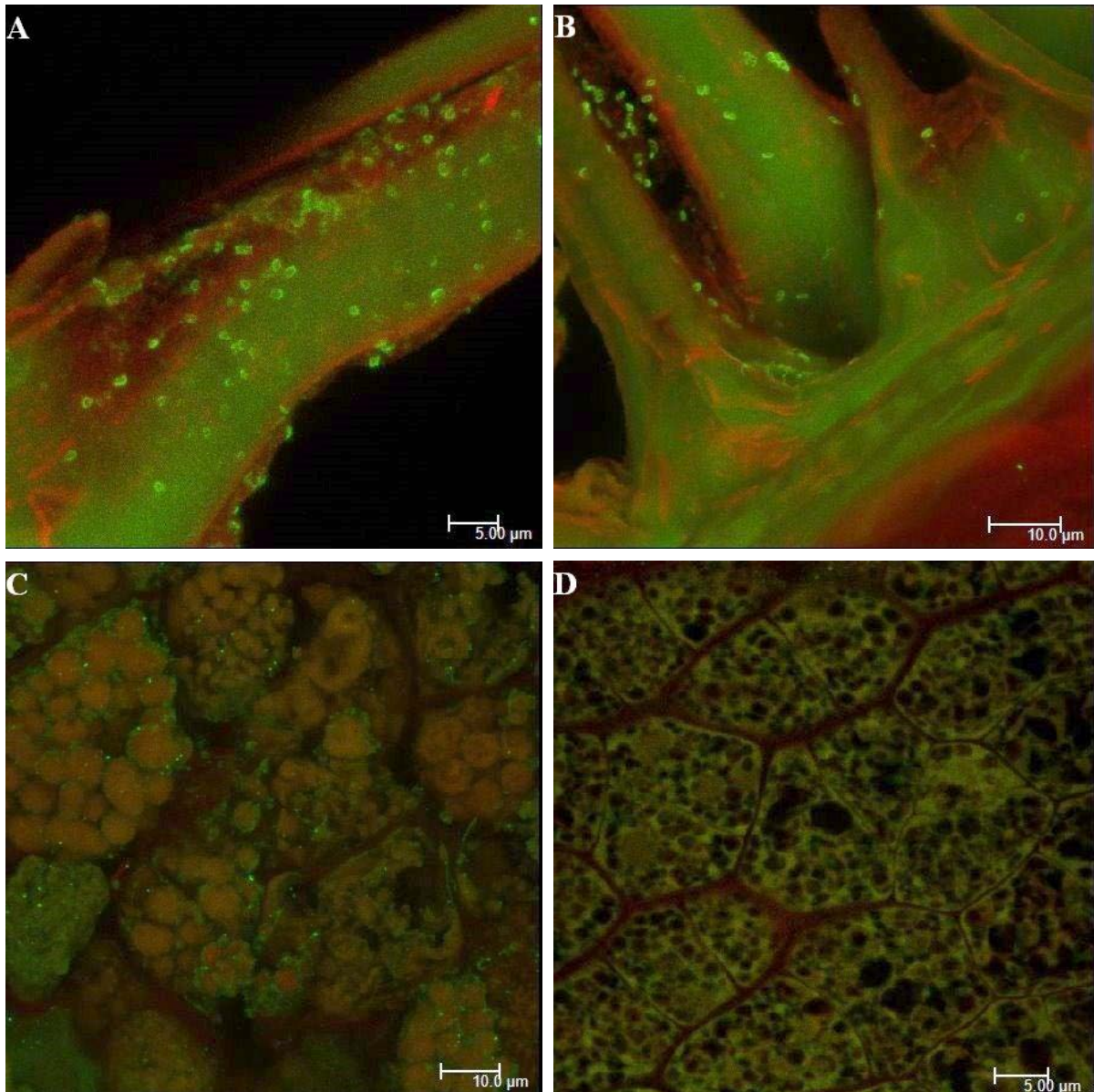


Abb. 21: Aufnahmen der verschiedenen Abschnitte eines mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) infizierten Tomatensamens im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) von in Paraffin eingebetteten Proben mit einer Dicke von 30 µm nach Anfärbung vom Cmm mit Hilfe der Immunofluoreszenz, (A) Haar der Samenschale mit einem starken Befall an Cmm, (B) Samenschale mit Bakterien nur auf den Haaren, (C) Endosperm ohne Bakterien, (D) Embryogewebe ohne Bakterien.

### 3.6. Lokalisation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* bei Keimlingen

Die Untersuchung von 7 Tage alten Keimlingen ergab, dass diese in den Bereichen der Keimwurzel, des Hypokotyls und der Keimblätter von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* befallen waren (Abb. 22). Außerdem konnten die Bakterien weiterhin auf der Samenoberfläche detektiert werden. Sie befanden sich jedoch weiterhin nicht in Zellschichten

der Samenschale, sodass eine aktive Durchdringung der Bakterien durch die Keimung des Samens ausgeschlossen werden kann.

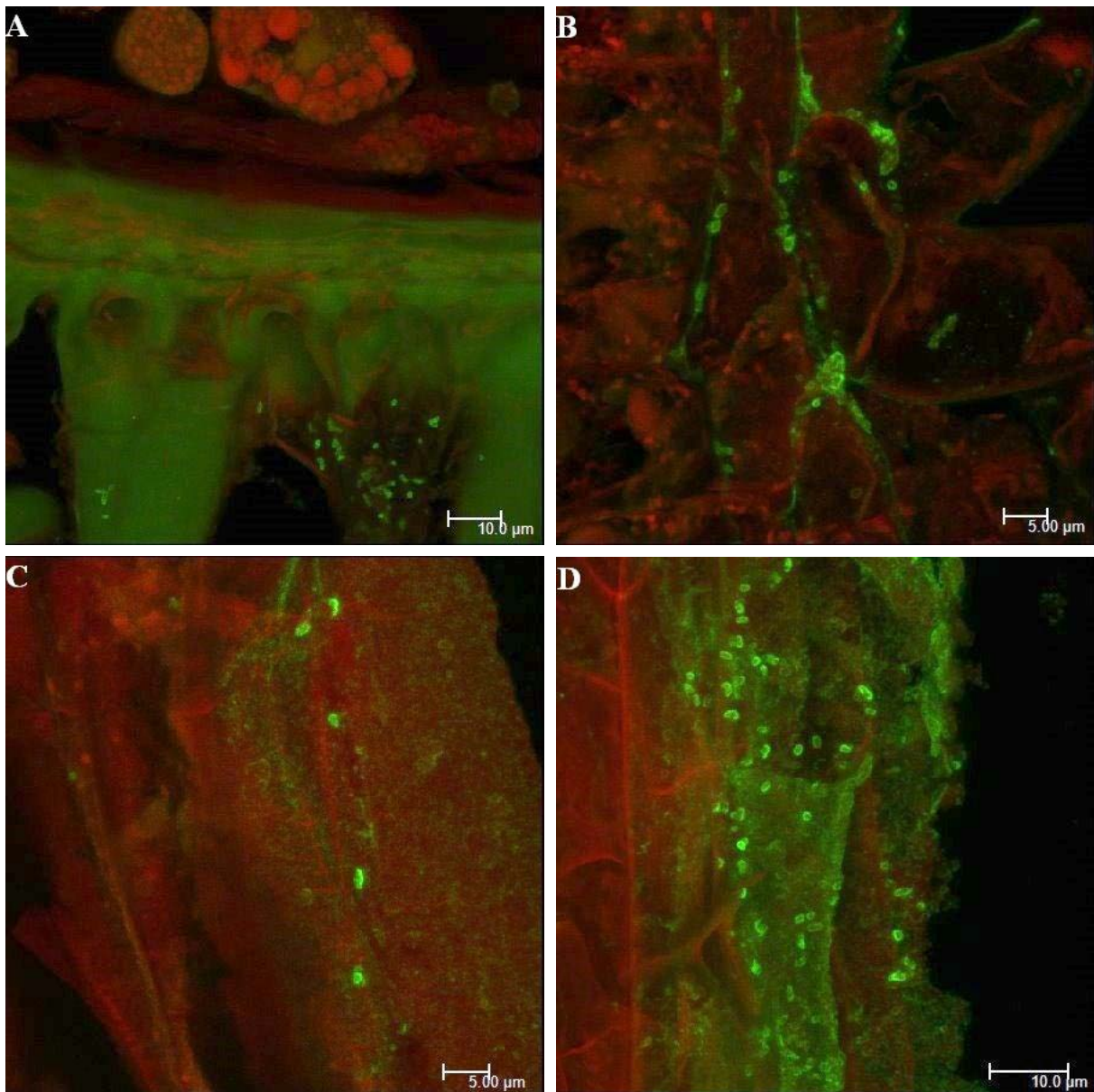


Abb. 22: Aufnahmen der verschiedenen Abschnitte eines mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) infizierten Tomatensamens, der 7 d auf Wasseragar keimte, im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) von in Paraffin eingebetteten Proben mit einer Dicke von 30 µm nachspezifischer Anfärbung vom Cmm mit Hilfe der Immunofluoreszenz, (A) Samenschale mit Bakterien an den Haaren, (B) Bakterien auf der Oberfläche des Keimblattes, (C) Bakterien auf der Oberfläche des Hypokotyls, (D) Bakterien auf der Oberfläche der Keimwurzel.

### 3.7. Abtötung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* auf Objektträgern mittels Plasmabehandlung

Um zu prüfen, ob eine Dekontamination von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) mittels Atmosphärendruck-Plasma möglich ist, wurden die zwei Behandlungsmöglichkeiten der direkten Exposition im Plasma und der Remote-Exposition hinter dem Plasma im Luftstrom getestet. Dabei zeigte sich in beiden Fällen bereits nach einer Behandlungszeit von wenigen Sekunden eine deutliche Reduktion der CFU (colony forming units) (Abb. 23). Die Behandlung mit dem direkten Plasma zeigte bereits nach zwei Sekunden eine fast vollständige Eliminierung der CFU und war signifikant besser als die indirekte Behandlung hinter dem Plasma.

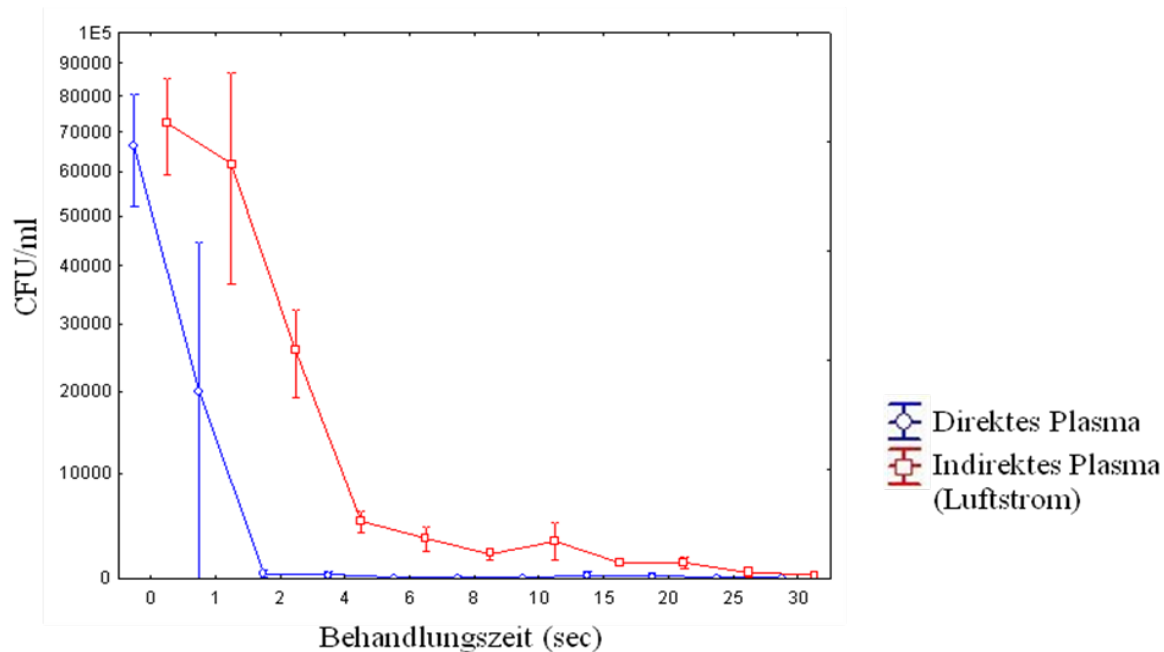


Abb. 23: Durchschnittliche Anzahl an CFU (colony forming units) pro ml der aufgetragenen Suspension von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* auf mit NGA-Medium beschichteten Objektträgern nach verschiedenen Behandlungszeiten mit Atmosphärendruck-Plasma bei einer direkten bzw. indirekten Exposition (im Luftstrom hinter der Plasmaentladung).

Um einen Einfluss des Mediums auf Cmm während der Behandlung ausschließen zu können, wurden zusätzlich mit Medium beschichtete Objektträger mit dem Plasma behandelt und anschließend mit der Bakteriensuspension versetzt. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung des Mediums ebenfalls zu einer Reduktion der CFU führt, diese war jedoch signifikant

geringer als die durch die direkte Behandlung der Bakterien mit dem Plasma erzielte Reduktion (Abb. 24).

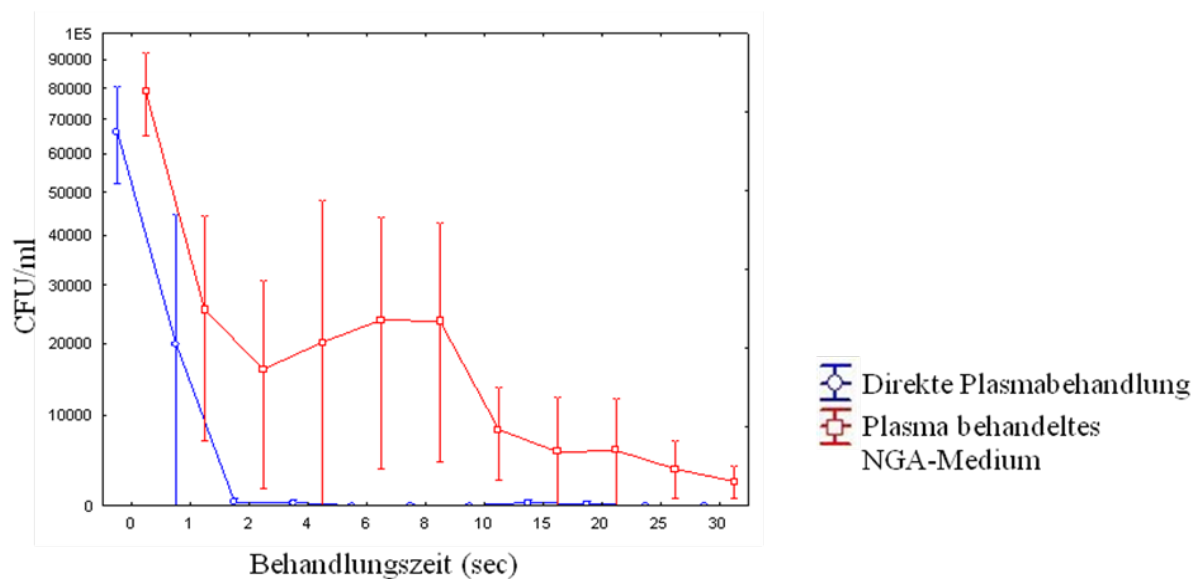


Abb. 24: Durchschnittliche Anzahl an CFU (colony forming units) pro ml der aufgetragenen Suspension von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* auf mit NGA-Medium beschichteten Objektträgern nach verschiedenen Behandlungszeiten mit Atmosphärendruck-Plasma bei einer direkten Exposition bzw. von beschichteten Objektträgern, die erst nach der Plasmabehandlung mit der Bakteriensuspension beimpft wurden.

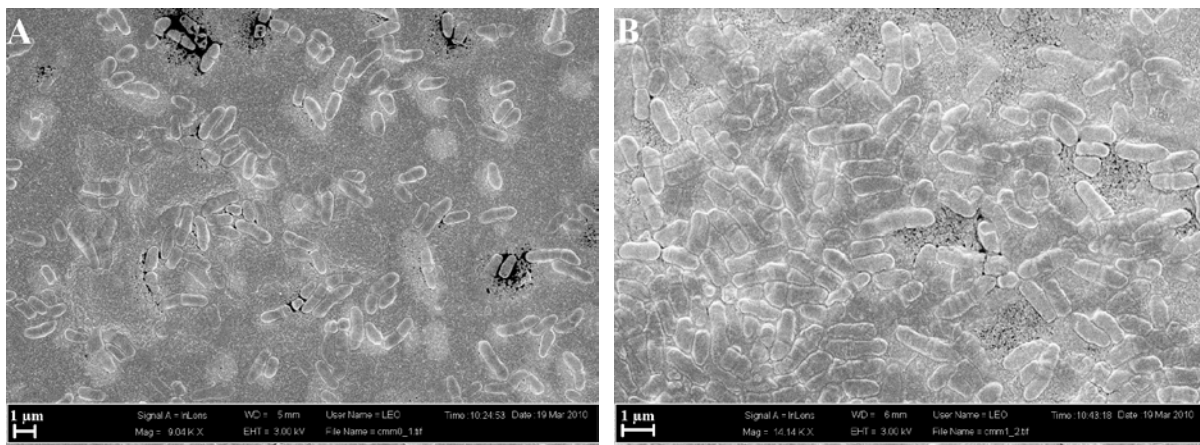


Abb. 25: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* von mit NGA-Medium beschichteten Objektträgern, (A) unbehandelte Kontrolle, (B) 15 Sekunden mit Plasma behandelte Probe.

REM-Aufnahmen von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* zeigten, dass durch eine 15 sekündige Plasmabehandlung die Membran der Bakterien nicht zerstört wurde (Abb. 25), obwohl zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Reduktion der CFU erreicht wird.

### 3.8. Saatgutdesinfektion mittels Plasmabehandlung

Die Behandlung von mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) infizierten Tomatensaatgut zeigte trotz der Auswahl verschiedener Behandlungszeiten (6x, 18x) und Behandlungsleistungen (15,3 KV; 19,6 KV) keine nennenswerte Reduktion der Anzahl an infizierten Samen (Abb. 27) sowie der Bakterienzahl (CFU) pro Samen (Abb. 26). Durchschnittlich waren 85-97% der Samen mit jeweils 266-473 CFU an Cmm befallen.

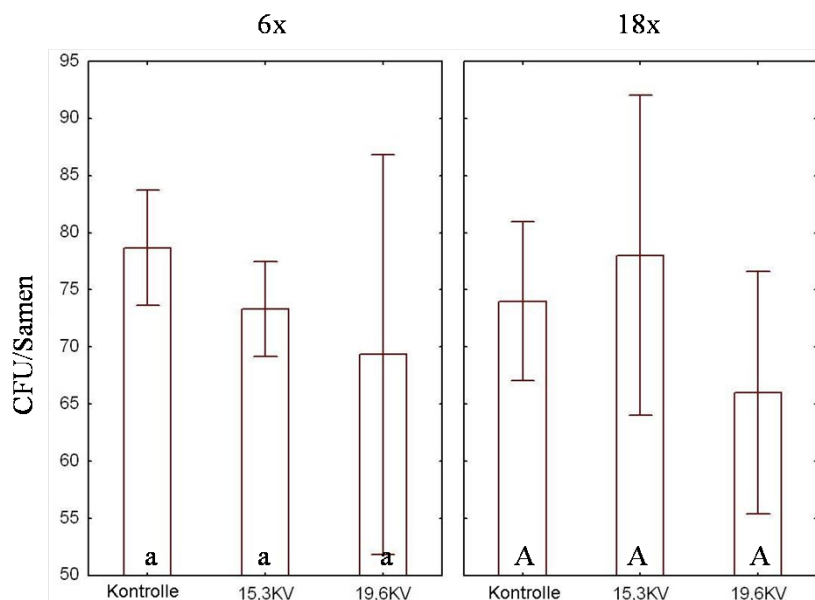


Abb. 26: Durchschnittliche Anzahl an CFU (colony forming units) pro Samen, welche mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infiziert sind, nach unterschiedlicher Behandlungszeit (6x, 18x) mit Plasma, welches bei verschiedenen Leistungen (15,3 KV, 19,6 KV) generiert wurde. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=15); unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ).

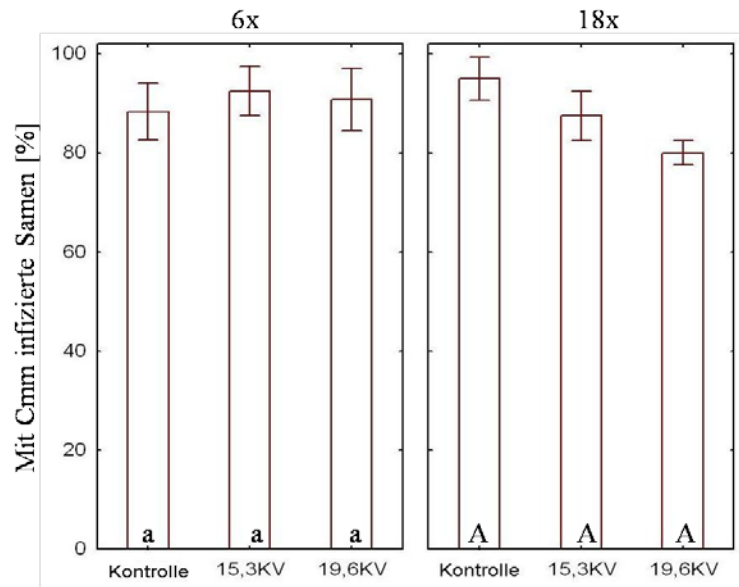


Abb. 27: Durchschnittliche Anzahl von mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infizierten Tomatensamen nach Behandlung mit Plasma, welches bei verschiedenen Leistungen (15,3 KV, 19,6 KV) generiert wurde und unterschiedlichen Behandlungszeiten (6x, 18x). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=15); unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ).

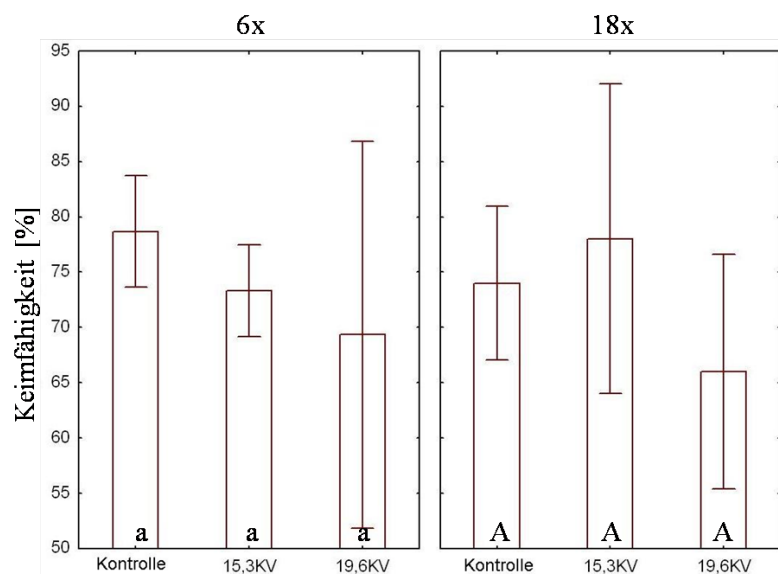


Abb. 28: Durchschnittliche Keimfähigkeit von mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infizierten Tomatensamen nach einer Behandlung mit Plasma, welches bei verschiedenen Leistungen (15,3 KV, 19,6 KV) generiert wurde und unterschiedlichen Behandlungszeiten (6x, 18x). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=15); unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ).



Die Keimfähigkeit der Tomatensamen wurde ebenfalls kaum beeinträchtigt (Abb. 28), jedoch zeigten sich gelegentlich morphologische Veränderungen der Keimlinge (Abb. 29). So entwickelten Samen, die mit einer Leistung von 15,3 KV behandelt wurden nach 7 Tagen violett gefärbte Keimwurzeln mit gelegentlichen Einschnürungen. Die Wurzelspitze schien sich dann aber wieder normal zu entwickeln. Auch bei einer Behandlungsleistung von 19,6 KV konnte diese Verfärbung der Keimwurzel beobachtet werden, jedoch kam es zusätzlich zu einer Verbräunung der Wurzelspitze, die abgestorben schien. Im weiteren Verlauf der Entwicklung zeigten die Keimlinge der mit 15,3 KV behandelten Samen stärker verzweigte Wurzeln als die Kontrolle. Die Keimlinge der mit 19,6 KV behandelten Samen entwickelten eine buschige Wurzel und waren im Wachstum kleiner als die Keimlinge der Kontrolle.

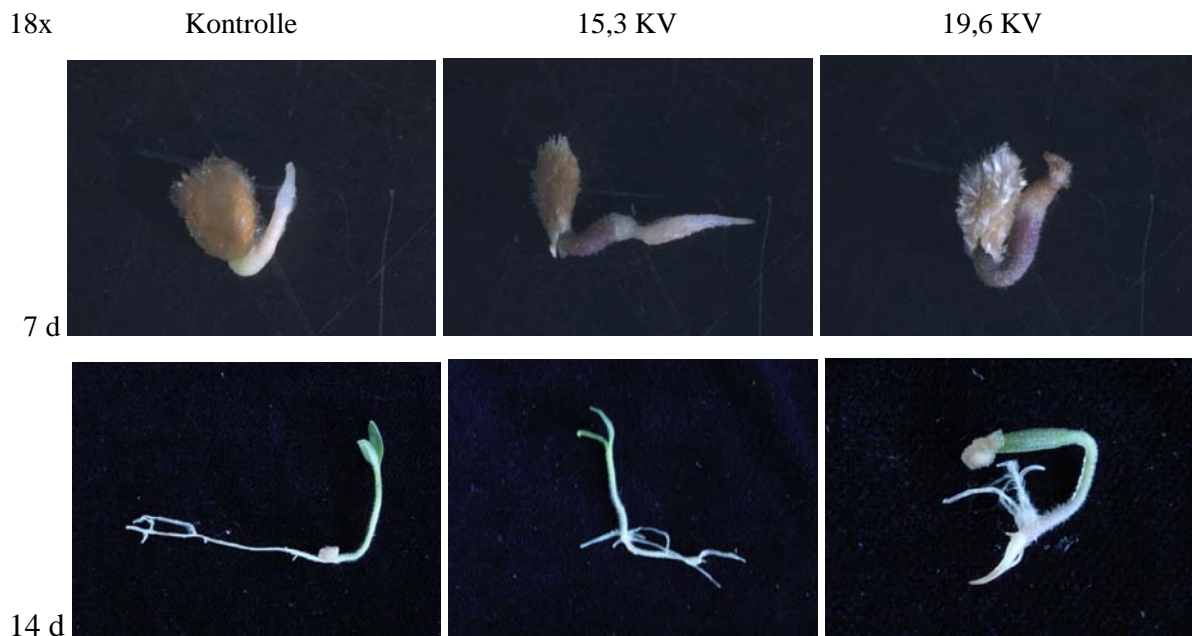


Abb. 29: Keimlingsentwicklung der Kontrolle und mit Plasma behandelten (15,3 KV bzw. 19,6 KV 18x in der Rüttelanlage) Tomatensamen 7 d bzw. 14 d nach dem Auslegen auf Keimfilterpapier bei 20°C.

## 4. Diskussion

### 4.1. Histologische Befalls- und Resistenzreaktionen in Tomaten gegenüber *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) ist eine weltweit verbreitete Pflanzenkrankheit, die mit den bisherigen Mitteln nur schwer zu bekämpfen ist. Daher stehen die Bemühungen, resistente Sorten zu züchten, schon seit Jahren im Fokus von diversen Züchtungsmaßnahmen, die bisher jedoch ohne nennenswerte Erfolge blieben (Van den Bulk et al. 1991, Poysa 1993, Francis et al. 2001).

Die Einteilung der Tomatensorten Moneymaker, Lyconorma, Irat L3 und Hawaii 7998 bezüglich ihrer Anfälligkeit gegenüber Cmm durch das Screening ergab, dass die Sorten Moneymaker und Lyconorma als anfällig einzustufen sind und die Sorten Irat L3 und Hawaii 7998 als gering anfällig. Diese Bewertung geht auch aus anderen Literaturquellen hervor (Poysa 1993, Van Steekelenburg 1985, Van den Bulk et al. 1991), sodass durch diesen unabhängigen Versuch gezeigt werden konnte, dass die Einstufung der Sorten gegenüber ihrer Anfälligkeit eindeutig und reproduzierbar ist.

Pflanzen haben verschiedene Strategien, einen Befall von Mikroorganismen zu verhindern. Die erste Verteidigungsstrategie, um das Eindringen des Mikroorganismus zu verhindern, sind physikalische Barrieren, wie z.B. die Epidermis. Diese verhindern den Befall jedoch nur bedingt, sodass Viren, Bakterien und Pilze schnell durch Wunden oder natürliche Öffnungen, wie Stomata, in die Pflanze eindringen können. Die Mikroorganismen breiten sich nun in der Pflanze aus und werden von dieser über Elicitoren wahrgenommen. Dadurch kommt es zur Aktivierung von spezifischen Abwehrmechanismen der Pflanze, wie die Bildung von antimikrobiellen Substanzen und mechanischen Barrieren. Diese sollen die Ausbreitung und Vermehrung des Pathogens verhindern, welches wiederum versucht sich davor zu schützen und die Barrieren zu überwinden (Campbell und Reece 2003). In anfälligen und resistenten Pflanzen unterscheidet sich diese Pathogenabwehr entscheidend, sodass ein und dasselbe Pathogen in einer anfälligen Sorte der Wirtspflanze eine Krankheit auslösen kann und in einer resistenten Sorte jedoch nicht (Hock und Elstner 1995).

Um Unterschiede in der Pathogenabwehr zwischen den für *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* anfälligen Tomatensorten Moneymaker und Lyconorma, sowie den gering anfälligen Sorten Hawaii 7998 und Irat L3 zu klären, wurden verschiedene mikroskopische und histochemische Methoden angewandt.

Die Untersuchungen der Stängelquerschnitte von mit Cmm befallenen Tomatenpflanzen haben gezeigt, dass es sowohl in den anfälligen Sorten Moneymaker und Lyconorma sowie den gering anfälligen Sorten Hawaii 7998 und Irat L3 durch den Befall zu einer vermehrten Bildung von phenolischen Substanzen und Kallose im Bereich der befallenen Gefäße kommt. Desweiteren konnte beobachtet werden, dass sich in den Xylemgefäßen Thyllen bildeten, die vermehrt in den gering anfälligen Sorten zu finden waren und dass die aufgrund der Infektion gebildeten Gefäßverstopfungen, welche vermehrt in den anfälligen Sorten zu finden waren, Polysaccharide, Proteine, Lipide, Suberin und Pektin enthielten.

Bei pflanzlichen Phenolen unterscheidet man Phenole, die während der normalen Pflanzenentwicklung im Gewebe gebildet werden und jene, die als Folge von Stress synthetisiert werden. Die unter normalen Bedingungen in der Pflanze vorkommenden Phenole haben eine große Vielfalt und unterscheiden sich von Spezies zu Spezies sowie von Gewebe zu Gewebe. Zellen, die Phenole enthalten, sind meist über das Gewebe verteilt, können aber auch an strategisch wichtigen Orten für einen Pathogenbefall vermehrt vorkommen, wo sie eine wichtige Rolle in der Abwehr spielen. Die Phenole werden über die Polyphenoloxidase (PPO) der Thylakoide von Plastiden synthetisiert und in die Zellvakuole transportiert, wo sie in einem reduzierten Zustand gelagert werden. Bei einer Infektion durch Mikroorganismen kommt es nun zu einer Dekompartimentierung und schnellen Oxidation der Phenole, was eine Reihe von Abwehrmechanismen auslöst (Beckmann 2000). Die Stängelquerschnitte der mit Cmm infizierten Tomaten zeigten deutlich, dass es im Bereich der infizierten Xylemgefäße aufgrund des Pathogenbefalls zu einer verstärkten Bildung von phenolischen Substanzen kam. Die vermehrte Bildung von Phenolen ist eine typische Abwehrreaktion der Tomatenpflanze und kann auch bei einem Befall mit Viren (Balogun und Teraoka 2004) oder Pilzen (Mandal und Mitra 2007) beobachtet werden. Mikroskopisch zeigten sich diesbezüglich keine Unterschiede zwischen den anfälligen Sorten Moneymaker und Lyconorma sowie den gering anfälligen Sorten Hawaii 7998 und Irat L3. Phenolische Substanzen können in resistenten Pflanzen schneller gebildet und akkumuliert werden als in anfälligen Pflanzen (Agrios 1978). Es ist denkbar, dass es möglicherweise ebenfalls geringe Unterschiede in der Phenolkonzentration zwischen den getesteten, mit Cmm infizierten Tomatensorten gibt, was dazu führen würde, dass durch eine höhere Konzentration der phenolischen Substanzen in den gering anfälligen Sorten eine bessere Pathogenabwehr möglich ist. Dies müsste jedoch durch entsprechende Messungen bestätigt werden.

Die durch den Pathogenbefall aus der Vakuole entlassenen Phenole werden in der Pflanzenzelle oxidiert und polymerisieren mit Zellbestandteilen, wie zellulären Proteinen und

Zellwand-Karbohydraten, zu Ligninstrukturen (Beckmann 2000). Die verstärkte Lignifizierung der Zellwände im Bereich des Pathogenbefalls macht diese widerstandsfähiger gegenüber dem mechanischen Druck bei der Penetration von Pilzen und weniger anfällig gegenüber Zellwand-abbauenden Enzymen diverser Mikroorganismen (Bhuiyan et al. 2009). Untersuchungen der mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infizierten Stängelquerschnitte der Tomatensorten Moneymaker, Lyconorma, Hawaii 7998 und Irat L3 zeigten jedoch durch den histochemischen Nachweis mit Phloroglucinol nur im Bereich des primären Xylems eine verstärkte Lignifizierung. Da die die Xylemgefäße umgebenden Parenchymzellen im Laufe ihrer normalen Entwicklung bereits stark lignifizieren, konnte in Bereichen des sekundären Xylems kein Unterschied zu den Kontrollen festgestellt werden. Es ist aber nicht auszuschließen, dass es bei der Wirt-Pathogen-Interaktion zwischen der Tomate und Cmm zu einer Lignifizierung kommt, da es im Bereich des primären Xylems ansatzweise sichtbar war und bekannt ist, dass phenolische Substanzen, welche wie gezeigt vermehrt im infizierten Gewebe gebildet werden, als Baustein für Lignin dienen.

Durch die Oxidation diverser Phenole kann es ebenfalls zu einer Umwandlung von Tryptophan zu Indol-3-Essigsäure (IAA) kommen. Auch die Freigabe von Flavonolen im Bereich der Infektionsstelle kann zu einer Akkumulation von IAA führen. Durch IAA wird die Ethylenbildung gefördert, was zu einer drastischen Verschiebung des Hormongleichgewichtes führt, wodurch es zu einem verstärkten lateralen Wachstum der Zellen in der betroffenen Region kommt. Betrachtet man nun die Parenchymzellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den infizierten Gefäßen, so führt dies zur Thyllenbildung (Beckmann 2000, Balaji et al. 2007). Die Bildung von Thyllen in den mit Cmm infizierten Xylemgefäßen konnte in allen getesteten Tomatensorten beobachtet werden. Vor allem in den gering anfälligen Sorten Hawaii 7998 und Irat L3 konnten vermehrt großvolumige Thyllen in den Xylemgefäßen beobachtet werden. Es ist bekannt, dass es in resistenten Sorten schneller zu deren Ausbildung kommt und diese in einer größeren Anzahl vorhanden sind als in den anfälligen Sorten (Hock und Elstner 1995). Dies bestätigt die beobachtete Korrelation zwischen Anfälligkeit und Thyllenbildung. Auch der Einfluss von Cmm auf die Ethylensynthese in Tomaten konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden (Lund et al. 1998, Balaji et al. 2008).

Neben der Thyllenbildung in mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infizierten Xylemgefäßen der Tomate konnte auch die Bildung von Gefäßverstopfungen beobachtet werden. Diese gelartigen Substanzen werden ebenfalls von den umliegenden parenchymatischen Zellen gebildet. Ob eine Parenchymzelle eher Thyllen oder gelartige

Substanzen bildet, hängt dabei von der Größe der Tüpfel ab. Ist der Tüpfel groß genug, sodass der Zellkern bei der Ausbildung einer Thylle durch diesen hindurch kann, so kommt es zur Gefäßverstopfung durch Thyllen. Ist der Tüpfel jedoch zu klein, so kommt es zu einer Gefäßverstopfung hauptsächlich durch eine gelartige Substanz. Diese Parenchymzellen synthetisieren Zellwandmaterial, welches dann zur Gelbildung in den Gefäßen führt (Beckmann 2000). Somit kann in kürzester Zeit das Lumen der Leitgefäße ausfüllen werden und wird sowohl in anfälligen als auch in resistenten Arten beobachtet. Es besteht aus pektinartigem Material, Hemicellulose und anderen Kohlenhydraten (Hock und Elstner 1995). Die Untersuchungen der mit Cmm infizierten Tomatenstängelquerschnitte zeigten, dass in allen Sorten gelartige Verstopfungen der Xylemgefäße gebildet wurden. Diese konnten jedoch vermehrt in den anfälligen Sorten Moneymaker und Lyconorma beobachtet werden. Ob die Größe der Tüpfel dabei eine entscheidende Rolle spielte, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es ist aber denkbar, dass in den gering anfälligen Sorten Irat L3 und Hawaii 7998 größere Tüpfel vorliegen als in den anfälligen Sorten Moneymaker und Lyconorma, was zu einer häufigeren Thyllenbildung in den gering anfälligen Sorten und einer vermehrten Gelbildung in den anfälligen Sorten geführt haben könnte. Da aber in den anfälligen Sorten ebenfalls Thyllen beobachtet werden konnten, die in ihrer Entwicklung meist kleiner waren als jene in den gering anfälligen Sorten, lässt dies eher auf eine spätere Entwicklung der Thyllen in den anfälligen Sorten schließen.

Die histochemische Untersuchung dieser Verstopfungen ergab, dass es sich bei allen untersuchten Tomatensorten um eine Substanz aus Polysacchariden, Proteinen, Lipiden, Suberin und Pektin handelte. Geht man davon aus, dass die gelartigen Gefäßverstopfungen durch die Synthese von Zellwandmaterial der umliegenden Parenchymzellen verursacht werden, so handelt es sich dabei hauptsächlich um Pektin, Hemicellulose und Glycoproteine (Hock und Elstner 1995, Rioux et al. 1998). Dies erklärt die positive Nachweisreaktion für Pektin, Polysaccharide und Proteine. Da es als Folge einer Pathogenabwehr zu einer Suberinisierung in Pflanzengewebe kommen kann, ist die positive Nachweisreaktion auf Suberin nicht verwunderlich. Suberin dient der Verstärkung von Zellwänden und ist sehr widerstandsfähig gegenüber Zellwand abbauenden Enzymen, wie sie auch von Cmm gebildet werden. Eine Suberinisierung kann sowohl in anfälligen, als auch in resistenten infizierten Tomaten beobachtet werden. Dabei kommt es in resistenten Wirtspflanzen zu einer schnelleren Suberinisierung als in anfälligen Pflanzen (Vidhyasekaran 2007, Robb et al. 1991).

Da neben den gelartigen Gefäßverstopfungen auch Gefäßverstopfungen durch die Bakterien nachgewiesen werden konnten, wurden die histochemischen Nachweisfärbungen auch an Ausstrichen von Cmm durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Bakterium ebenfalls positiv auf den Nachweis von Polysacchariden, Proteinen, Lipiden und Suberin reagiert. Da *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Exopolysaccharide bildet und die Zellwand sowie die Plasmamembran des Gram-positiven Bakteriums aus Murein (Peptidoglykan), Proteinen und Phospholipiden besteht (Campbell und Reece 2003), ist eine positive Reaktion auf den Nachweis von Polysacchariden, Proteinen und Lipiden nicht verwunderlich. Zum Nachweis von Suberin wurde Sudan III verwendet, das ebenfalls zum allgemeinen Nachweis von Fetten verwendet werden kann (Gerlach 1984). Da Suberin in seinem Aufbau Lipide enthält und auch die Bakterien diese in ihrem Zellaufbau enthalten, ist der positive Nachweis mittels Sudan III zu erklären.

Die histochemischen Untersuchungen der Gefäßverstopfungen lassen darauf schließen, dass es sich in den mit Cmm befallenen Xylemgefäßen der Tomate um Substanzen handelt, die vom Bakterium gebildet wurden, wie Exopolysaccharide, sowie um pflanzeigene Stoffe, wie Pektin, die zur Abwehr des Pathogens dienen. Die Untersuchungen von mit Cmm infizierten Gefäßen der verschiedenen Tomatensorten mittels Immunofluoreszenz im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) haben gezeigt, dass es Gefäße gibt, in denen die Bakterien eindeutig zu erkennen sind, jene bei denen die Bakterien nur noch schemenhaft zu erkennen sind und mit einer Substanz überzogen zu sein scheinen und solche Gefäße, die eine fluoreszierende Masse enthalten, in der keine Bakterien zu erkennen sind. Diese Beobachtungen bestätigen das Zusammenspiel von bakteriellen sowie pflanzlichen Substanzen beim Befall der Xylemgefäße und der damit verbundenen Ausbildung von Verstopfungen.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Gefäßverstopfungen der mit Cmm infizierten Xylemgefäße der Tomaten zeigten deutlich eine gelartige Masse. Wie schon zuvor beschrieben, handelt es sich dabei um bakterielle sowie pflanzliche Substanzen. In welchem Verhältnis diese in den Gefäßverschlüssen vorliegen ist jedoch unklar. Da mehr Gefäßverschlüsse in den anfälligen Sorten MoneyMaker und Lyconorma beobachtet werden konnten und weniger in den gering anfälligen Sorten Hawaii 7998 und Irat L3, kann darauf geschlossen werden, dass es sich vermehrt um Exopolysaccharide handelt. Da in anfälligen Wirtspflanzen meist weniger Abwehrstoffe, wie z.B. Phenole oder Kallose, gebildet werden (Agrios 1978, Beckman et al. 1982), als in resistenten Pflanzen, wodurch eine bessere Ausbreitung des Pathogenes möglich ist und *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

wie viele Bakterien Exopolysaccharide, z.B. als Schutz vor Abwehrstoffen der Pflanze bildet (Jahr et al. 1999), scheint dies durchaus denkbar.

Neben der longitudinalen Abwehr in Gefäßen, gibt es auch die laterale Abwehr. Dabei kommt es durch die Parenchymzellen im Bereich der infizierten Gefäße zu einer hypersensitiven Reaktion (HR) oder der Deposition von Kallose, was mit einer anschließenden Lignifizierung und bzw. oder Suberinisierung verbunden ist (Beckmann 2000). Kallose ist ein Polysaccharid, welches zwischen Zellwand und Plasmalemma eingelagert wird, um das Eindringen von Mikroorganismen zu verhindern (Hock und Elstner 1995). Diese Kallosedeposition konnte in den untersuchten Stängelquerschnitten der infizierten Tomaten deutlich gezeigt werden. Dabei ließ sich visuell wieder kein Unterschied zwischen den anfälligen Sorten Moneymaker und Lyconorma sowie den gering anfälligen Sorten Hawaii 7998 und Irat L3 erkennen. Untersuchungen von Tomatenpflanzen, die mit *Fusarium* infiziert wurden, zeigten, dass es in den resistenten Sorten zu einer schnelleren Kallosedeposition kommt (Beckman et al. 1982, Mueller und Beckman 1988). Desweiteren konnte dabei ebenfalls eine Kallosedeposition in den Xylemgefäßen, wie bei den mit Cmm infizierten Tomaten, festgestellt werden.

Da die Pathogenabwehr in Pflanzen ein komplexes System darstellt, können natürlich weitere Faktoren, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden, eine entscheidende Rolle in der Bekämpfung von Cmm in den untersuchten Tomatensorten spielen. Pathogen relevante (PR) Proteine sind säurestabile Proteine, die empfindlich gegenüber Proteinasen reagieren und durch einen Mikroorganismenbefall in Wirtspflanzen induziert werden (Hammerschmidt 1999). Sie dienen ebenfalls der Abwehr von Pathogenen und werden in einer hohen Diversität in Pflanzenzellen gebildet. Das zeitlich aufeinander abgestimmte Zusammenspiel der verschiedenen PR-Proteine ist somit entscheidend, ob eine Wirtspflanze resistent oder anfällig auf das Pathogen reagiert. Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Pathogenabwehr von Pflanzen ist die Bildung hydroxyprolinreicher Glycoproteine (HPRG). Sie dienen dem Aufbau einer zusätzlichen mechanischen und chemischen Barriere in der Zellwand und werden schneller sowie in höheren Konzentrationen in resistenten Pflanzen akkumuliert als in anfälligen. Auch bei der Interaktion zwischen Tomate und *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* konnten diese Glycoproteine nachgewiesen werden (Deepak et al. 2010). Beim Befall der Tomate mit dem Bakterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* kommt es ebenfalls zu einer Bildung von HPRG (Benhamou 1991), jedoch wurde in diesem Fall noch nicht geklärt, wie es sich in anfälligen und partiell resistenten Sorten verhält. Desweiteren kann es in einer mit Mikroorganismen befallenen Wirtspflanze zur Bildung von Phytoalexinen kommen. Dies sind antimikrobiell wirkende Verbindungen, die für jede

Pflanzenfamilie charakteristisch sind. In Tomaten sind die Phytoalexine Lubimin, Phytuberin (Sesquiterpene) und Falcariniol (Polyacetylene) bekannt. Sie werden in der Pflanze erst durch einen Pathogenbefall über Elicitoren, wie Glucane, Proteine und Glycoproteine der Pathogenzellwand synthetisiert und zerstören deren Funktion (Hock und Elstner 1995). Es ist jedoch fraglich, ob diese sesquiterpenoiden Phytoalexine in den untersuchten Tomatensorten bei der Interaktion mit Cmm gebildet werden, da bereits erfolgte Untersuchungen zum Befall der Tomaten mit diesem Bakterium keine dieser Phytoalexine nachweisen konnten (Beimen et al. 1992). Auch andere antimikrobielle Substanzen, wie  $\alpha$ -Tomatin (Hock und Elstner 1995), können bei der Pathogenabwehr der Tomate eine Rolle spielen. Cmm ist in der Lage durch das Enzym TomA  $\alpha$ -Tomatin zu glykosylieren und damit unschädlich zu machen. Versuche mit einer knock-out-Mutante an der Wildtomate *Lycopersicon pimpinellifolium* zeigten einen signifikant reduzierten Bakterientiter in der Pflanze im Vergleich zum Ausgangsisolat von Cmm (Kaup 2009). Jedoch ist noch unklar, wie sich  $\alpha$ -Tomatin in den hier untersuchten Tomatensorten mit unterschiedlicher Anfälligkeit verhält.

#### **4.2. Befallsstärke in Abhängigkeit von Pathogenausbreitung und Phytotoxinproduktion**

Bakterien können sich bei optimalen Bedingungen in ihren Wirtspflanzen und der Umgebung schnell ausbreiten. Dabei ist die Anfälligkeit einer Sorte entscheidend. Um zu untersuchen, welche Unterschiede in der Ausbreitung und dem Befall in den Tomatensorten Moneymaker und Irat L3 in Bezug auf *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) bestehen, wurden 7 Wochen alte Pflanzen mit einer definierten Bakteriensuspension inokuliert und nach einer Woche untersucht.

Da die bakterielle Tomatenwelke ein weltweites Problem darstellt und die Verwendung von gesundem Saatgut und Pflanzen sehr wichtig ist, wurden in den letzten Jahren viele verschiedene Methoden zum Nachweis von Cmm entwickelt. Dies lässt sich mittels semiselektiver Medien, einem Agglutinationstest, der Immunofluoreszenz, dem ELISA und PCR nachweisen (EPPO 2005, ISF 2008). Um die Ausbreitung und den Befall zu untersuchen, wurden der Nachweis mittels PCR und die Ausplattierung auf selektivem Medium gewählt. Aus der Vielzahl an PCR-Methoden (Pastrik und Rainey 1999; Schaad und Frederick 2002, Zhao et al. 2007, Luo et al. 2008, Zhang et al. 2009) wurde die PCR nach Dreier et al. (1994) mit den Primern Cmm5 und Cmm6 ausgewählt, da es sich hier um eine von der EPPO empfohlene Nachweismethode handelt, die oft angewandt wird (Dreier et al. 1995, Ozdemir 2005, Burokiene 2006). Als Nachweismedien wurde das mSCM-Medium gewählt, da es von der ISF (International Seed Federation) empfohlen wird und ebenfalls oft



Anwendung findet (Hadas et al. 2005, De Leon et al. 2007). Desweiteren wurde zusätzlich das neu entwickelte, vielversprechende R Medium von Herrn R. Ftayeh verwendet (Ftayeh 2009).

Die Untersuchung zeigte, dass sich die Bakterien in der anfälligen Sorte Moneymaker etwas schneller und stärker ausbreiten konnten als in der gering anfälligen Sorte Irat L3. Desweiteren konnte Cmm mittels semiselektiver Medien besser nachgewiesen werden als durch die PCR. Beim Vergleich der verwendeten semiselektiven Medien zeigte sich, dass das R-Medium für den Nachweis besser geeignet war, da die entsprechenden Kolonien schneller und deutlicher detektierbar waren als beim mSCM-Medium.

Schon in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Detektion von Cmm auf semiselektivem Medium sensitiver ist als durch PCR (Hadas et al. 2005, De Leon 2007). Dies liegt vermutlich daran, dass die Infektion des biologischen Materials sehr variabel ist. Befindet sich in einer Probe nur eine sehr geringe Menge an Bakterienzellen, so kann diese gut über das Ausplattieren auf entsprechenden Medien nachgewiesen werden. Bei der PCR hingegen kann es passieren, dass die Ausgangsmenge an DNA zu gering ist, sodass letztendlich keine positive Bande erscheint. Desweiteren kann es sein, dass die Pflanzen Stoffe enthalten, die die PCR stören, was ebenfalls zu einem falschen negativen Ergebnis führt (De Leon 2007). Die leicht variierenden Ergebnisse der Nachweismedien für Cmm lassen sich durch ihre unterschiedliche Zusammensetzung erklären. Dabei konnte klar gezeigt werden, dass das R-Medium im Vergleich zum mSCM-Medium unter gleichen Bedingungen für den Nachweis besser geeignet ist, da die Kolonien dort schneller wachsen und besser identifizierbar sind. Auch andere Wissenschaftler sehen einen Nachteil in der langen Wachstumszeit auf mSCM-Medium und der unterschiedlichen Nachweisbarkeit der Medien, sodass es meist üblich ist, mehrere Test-Medien parallel zu verwenden (Hadas et al. 2005, De Leon 2007).

Die ermittelte Anzahl infizierter Segmente und die Bakterienzahl der entsprechenden Stängelsegmente in der anfälligen Tomatensorte Moneymaker und der gering anfälligen Sorte Irat L3 korreliert mit den Ergebnissen der Bonitur. Die unterschiedliche Vermehrung und Ausbreitung von Cmm ist dabei auf die unterschiedliche Effektivität der Abwehrmechanismen der Pflanzen zurückzuführen. So gelingt es der Sorte Irat L3 das Pathogen vermutlich schneller zu erkennen und gezielter zu bekämpfen als der Sorte Moneymaker. Dies führt dementsprechend zu einer geringeren Ausbildung der Welkesymptome in der Sorte Irat L3 als in der Sorte Moneymaker.

Es ist bekannt, dass *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* phytotoxische Substanzen mit einem hohen Molekulargewicht bildet, welche die Welke als Hauptsymptom der Krankheit an Tomaten verursacht (Jahr et al. 1999, Gartemann et al. 2003). Um zu klären, ob es Unterschiede in der Reaktion auf die Stoffwechselprodukte von Cmm bei den anfälligen bzw. gering anfälligen Tomatensorten gibt, wurden junge Tomatenpflanzen der anfälligen Sorten Moneymaker und Lyconorma, sowie der gering anfälligen Sorten Irat L3 und Hawaii 7998 für 24 h in Kulturfiltraten inkubiert. Um genauere Aussagen in Bezug auf die Ausbildung der Welkesymptome zu machen, wurde der Gewichtsverlust der einzelnen Pflanzen erfasst. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Sorten.

Um den Einfluss des verwendeten NGA-Mediums auf die Ausbildung der Welkesymptome zu bestimmen, wurde reines NGA-Medium, auf gleiche Weise wie die Kulturfiltrate behandelt. Es zeigte sich dabei ein Gewichtsverlust der Testpflanzen von durchschnittlich 2,1-3,7%, welcher in den Berechnungen der Gewichtsverluste in der 50%igen bzw. 100%igen Lösung des Kulturfiltrates berücksichtigt wurde. Die durch das NGA-Medium verursachten Gewichtsverluste sind auf dessen Zusammensetzung zurückzuführen. Die Bildung von Embolien, welche ebenfalls Welkesymptome verursachen, wurde durch das zügige Schneiden der Pflanzen mit einer scharfen Rasierklinge und das unmittelbare Überführen in die entsprechende Lösung verhindert. Desweiteren konnte eine Aufkonzentrierung der Lösung durch das Verschließen der Probenröhrchen weitgehend verhindert werden, was eine gleichbleibende Konzentration der Lösungen in allen Proben sicherstellte. Außerdem kann die Kontamination der Lösungen mit anderen Mikroorganismen ausgeschlossen werden, da diese sterilisiert und in allen Schritten unter sterilen Bedingungen bearbeitet wurden. Desweiteren erfolgte eine Filtrierung der Lösungen mit einem Filter (0,2 µm) der auch zur Sterilfiltrierung genutzt wird, wodurch gleichzeitig sichergestellt werden konnte, dass keine Bakterienzellen in den Lösungen enthalten waren und gegebenenfalls die Konzentration an Stoffwechselprodukten während der Inkubation der Pflanzen erhöhen.

Um die Ergebnisse vergleichbar mit den zu vorherigen Ergebnissen der Bonitur, Mikroskopie sowie Ausbreitung zu machen, wurden wieder die drei Cmm-Isolate MO-1, OS-1 und GSPB 34 verwendet.

Ein Nachweis des von Cmm gebildeten Phytotoxins in den Kulturfiltraten wurde nicht durchgeführt, da aber aus vielen verschiedenen Literaturquellen die Bildung einer Verbindung mit einem hohen Molekulargewicht, welche die Ausbildung der Welkesymptome an Tomatenpflanzen hervorruft, beschrieben ist (Van den Bulk et al. 1989, Jahr et al. 1999, Ueno

et al. 1994), kann davon ausgegangen werden, dass in diesen Versuchen diese Stoffe gebildet wurden.

Da in dem durchgeführten Versuch gezeigt werden konnte, dass sowohl die anfälligen als auch die gering anfälligen Tomatensorten in gleichem Maße auf die verschiedenen Konzentrationen der Stoffwechselprodukte von Cmm mit einem Gewichtsverlust reagierten, kann davon ausgegangen werden, dass die unterschiedliche Ausbildung der Welkesymptome von Cmm auf unterschiedliche Konzentrationen der Stoffwechselprodukte in der infizierten Pflanze zurückzuführen ist. Es konnte dementsprechend gezeigt werden, dass an den untersuchten Tomatensorten in unterschiedlich konzentrierten Filtraten der NGA-Medien, die mit Cmm inokuliert waren, es zu unterschiedlich stark ausgebildeten Welkesymptomen kam. Je höher die Konzentration der Stoffwechselprodukte im Filtrat, desto größer der Gewichtsverlust der getesteten Pflanzen und die damit verbundene Ausbildung der Welkesymptome.

Auch die Untersuchung der gegenüber *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* anfälligen Tomatensorte Moneymaker und der gering anfälligen Sorte Okitsu sozai 1-20 zeigte keine Unterschiede im Gewichtsverlust nach 24 stündiger Inkubation in Kulturfiltraten sowie eine konzentrationsabhängige Ausbildung des Gewichtsverlustes. Dies konnte auf die phytotoxische Substanz mit einem hohen Molekulargewicht zurückgeführt werden (Van den Bulken et al. 1989).

#### **4.3. Lokalisation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* am Samen und Keimling**

Mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) infizierte Samen sind der Hauptverbreitungsfaktor der bakteriellen Tomatenwelke, doch die genaue Lokalisation des Bakteriums am Samen und die damit verbundene Ausbreitung auf dem Keimling ist noch immer weitgehend ungeklärt. Daher war es wichtig diese Frage genauer zu untersuchen und ein besseres Verständnis über die Ausbreitung von Cmm zu bekommen.

In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben zur Lokalisation des Bakteriums am Samen. Zum einen wird beschrieben, dass sich Cmm meist außen am Samen befindet und selten im Inneren (Agrios 1978) oder es werden ungenaue Angaben über die Lokalisation des Bakteriums durch die Beschreibung „im oder am Samen“ gemacht (Crüger 1991). Andere Literaturquellen beschreiben, dass sich Cmm auf der Samenoberfläche und im Inneren der Samenschale befindet (Walker 1952). Zur Klärung dieser Frage wurden infizierte Tomatensamen fixiert, in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom dünne Schnitte

angefertigt. Um Cmm von anderen auf dem Samen befindlichen Bakterien und Pilzen zu unterscheiden, wurde eine spezifische, immunohistologische Färbung vorgenommen. Diese Detektion mittels Antikörpern kann bei vielen Mikroorganismen angewandt werden (Veena und van Vuurde 2002) und ist eine anerkannte Nachweismethode für Cmm (EPPO 2005, Kaneshiro et al. 2006, Franken et al. 1993). Es ließ sich deutlich erkennen, dass das Bakterium nur auf der Oberfläche der Tomatensamen zu finden war. Speziell an den Haaren konnte bei stark infizierten Samen eine große Anzahl der Bakterien identifiziert werden. Diese waren in geringem Maße auch direkt an der Samenschale lokalisiert, aber nie innerhalb der Samenschale. Auch im Nährgewebe oder dem Embryonalgewebe konnten keine Bakterien detektiert werden. Die Untersuchung zeigte eindeutig, dass *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* nur die Samenoberfläche infiziert und sich entgegen der Literatur keine Bakterien in der Samenschale oder dem Inneren des Samen befinden. Natürlich ist es möglich, dass es im Rahmen der Samengewinnung zu kleineren Zerstörungen der Samenoberfläche kommt, wodurch dem Bakterium das Eindringen in den Samen ermöglicht wird. Dies ist aber meist nicht der Fall, sodass die Lokalisation von Cmm auf die Samenoberfläche beschränkt bleibt.

Cmm verursacht eine vaskuläre Krankheit, die sich durch die Xylemgefäße über die ganze Pflanze ausbreitet und somit auch die Früchte infiziert. Da die Gefäße nur bis zu den Samenanlagen reichen, erfolgt keine direkte Infektion des Sameninneren. Die verschiedenen Zellschichten des sich entwickelnden Samens werden dabei vermutlich nicht von dem Bakterium durch enzymatische Aktivität durchdrungen und die äußere Infektion der Samen scheint dabei hauptsächlich durch die Gewinnung aus den infizierten Früchten herzuführen. Durch die industrielle Massengewinnung der Tomatensamen, kann es dann schnell zu einer Übertragung der Bakterien auf gesundes Saatgut kommen (Chang et al. 1991). Da schon ein einzelner infizierter Samen starke ökonomische Verluste verursachen kann, ist es äußerst wichtig, entsprechend behandeltes sowie zertifiziertes Saatgut zu verwenden, um den Hauptverursachungsfaktor der bakteriellen Tomatenwelke zu umgehen (EPPO 2005).

Da die Lokalisation von Cmm im Tomatensamen bisher noch ungeklärt bzw. widersprüchlich war, konnten noch keine genauen Aussagen zur Infektion der Keimlinge über das infizierte Saatgut gemacht werden. Die Untersuchung von 7 Tage alten Keimlingen zeigte deutlich, dass sich die Bakterien von der Oberfläche der Samenschale auf die Keimwurzel, das Hypokotyl und die Keimblätter ausgebreitet haben. Dabei haben sie die Samenschale selbst nie durchdrungen, was darauf schließen lässt, dass der Keimling durch das Durchbrechen der Keimwurzel durch die Samenschale in Kontakt mit der infizierten Samenoberfläche kommt

und sich die ersten Bakterien darauf ansiedeln können. Im weiteren Verlauf der Keimung kommt es zu einer Streckung des Hypokotyls, was sich aus dem Samen herauschiebt und wiederum mit Cmm infiziert wird. Die Keimblätter sind zu Beginn der Keimung von der Samenschale umgeben und werfen diese erst nach der Keimung ab. Dadurch sind sie auch in einem engen Kontakt mit der Samenschale, was ebenfalls zu einer Besiedlung mit dem Bakterium führt.

Auch durch die künstliche Inokulation von Tomatensamen mit dem biolumineszenten *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stamm BL-Cmm6 konnte eine rasche Besiedlung der Bakterien von der Samenschale auf das Hypokotyl und die Kotyledonen beim Keimen beobachtet werden. Da die Samen auf Wasseragar auskeimten und die Wurzel dabei in den Agar wuchs, konnte vermutlich aufgrund der aeroben Eigenschaften von Cmm keine Besiedlung der Keimwurzel festgestellt werden (Xu et al. 2008). Genauere Beobachtungen konnten mit künstlich inokulierten Samen mit dem biolumineszenten *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Stamm BL-Cmm17 gemacht werden. Bereits drei Tage nach dem Auslegen der Samen auf Wasseragar, kam es zum Durchbrechen der Keimwurzel und die Lumineszenz wurde nun nicht nur auf der Samenschale, sondern auch auf der Keimwurzel beobachtet. Am vierten und fünften Tag entwickelten sich die Keimblätter aus der Samenschale hervor und das Hypokotyl sowie die Keimwurzel befanden sich im Streckungswachstum. Dabei konnte eine Lumineszenz auf den Keimblättern, dem Hypokotyl, der Keimwurzel und der Samenschale beobachtet werden, die im Bereich der Keimwurzel am geringsten war (Xu et al. 2010)

Alle Ergebnisse zeigen eindeutig, dass mit Cmm infizierte Samen nur auf der Oberfläche vom Bakterium besiedelt sind und dieses sich durch das Auskeimen des Samens von der Keimwurzel über das Hypokotyl bis hin zu den Keimblättern ausbreitet. Aufgrund des zu Beginn der Keimung starken Streckungswachstums und der damit verbundenen Oberflächenvergrößerung des Keimlings ist die Besiedlung mit Cmm nur schwach. Da es sich bei *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* um ein langsam wachsendes Bakterium handelt, können an den jungen Keimlingen meist kaum Krankheitssymptome festgestellt werden. Auch das Detektieren des Bakteriums in latent infizierten Keimlingen stößt dabei mit manchen Nachweismethoden an seine Grenzen. Auch bei gering infiziertem Saatgut kann es Nachweisprobleme geben, wodurch die starke Verbreitung der Krankheit in der heutigen Zeit trotz strengster Zertifizierungsmaßnahmen zu erklären ist. Durch die weitere Verarbeitung von infizierten Keimlingen, kann es nun zur Übertagung der Krankheit auf gesunde Pflanzen kommen, sodass schnell ein ganzer Bestand infiziert sein kann. Die Bakterien können sich

dann unter optimalen Bedingungen im Gewächshaus oder dem Freiland auf der Pflanze vermehren und diese über Wunden, Stomata oder Hydathoden infizieren (EPPO 2005, Carlton et al. 1998). Anschließend erfolgt eine Ausbreitung durch die Xylemgefäße über die gesamte Pflanze, was letztendlich zu enormen ökonomischen Verlusten durch das Absterben der Pflanze oder das Ausbilden der sogenannte „birds eye spots“ auf den Früchten führt.

#### **4.4. Wirkung von Plasma *in vitro* und am Samen**

In den letzten Jahren wurden viele neue Methoden zur Plasmabehandlung entwickelt und immer mehr Anwendungsgebiete erschlossen. Es eignet sich besonders gut zur Sterilisation da es im Vergleich zu den konventionellen Sterilisationsmethoden sicher, schnell und kosteneffizient ist und die behandelten Materialien nicht zerstört. Immer mehr Studien beschäftigten sich dabei mit der Behandlung von Mikroorganismen (Kelly-Wintenberg et al. 1999, Laroussi et al. 2003, Yu et al. 2006, Morris et al. 2009). Dabei konnte immer wieder gezeigt werden, dass abhängig von Mikroorganismus und Oberfläche in kürzester Zeit eine Reduktion der Bakterien, Hefen oder Viren stattfindet.

Auch *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) kann durch Plasma inaktiviert werden. Die Plasmabehandlung einer reinen Bakterienkultur auf mit NGA (Nutrient Glucose Agar)-Medium beschichteten Objektträgern unter Atmosphärendruck zeigte eine deutliche Reduktion der Kolonien bildenden Einheiten (CFU, Colony forming units) innerhalb weniger Sekunden. Dies entspricht den in der Literatur aufgeführten Zeiten anderer Bakterienzellen, wie beispielsweise *Escherichia coli* oder *Staphylococcus aureus* (Kelly-Wintenberg et al. 1999). Außerdem wurden signifikante Unterschiede in der Reduktion von Cmm in Bezug auf die Exposition zum Plasma festgestellt. Eine Exposition der Proben direkt im Plasma führte zu einer besseren Reduktion der CFU als die Exposition im Luftstrom hinter der Plasmaentladung. Dies ist darin begründet, dass alle vom Plasma generierten Stoffe und speziell die effektiv wirkenden reaktiven Spezies und geladenen Teilchen, die hauptsächlich für die Inaktivierung der Bakterien verantwortlich sind, in direkten Kontakt mit der Probe kommen. Bei einer etwas entfernten Position von der Plasmaquelle findet man nicht mehr alle vom Plasma generierten Stoffe, da manche nur eine kurze Lebensdauer haben und außerhalb des Plasmas sofort mit anderen Teilchen reagieren. Daher hat eine sogenannte „remote“-Exposition eine geringere Wirkung auf die Probe und einen damit verbundenen geringeren Dekontaminationseffekt (Yu et al. 2006, Laroussi 2005).

Schaut man sich die Reduktion der CFU in Abhängigkeit von der Zeit an, so erkennt man, dass der Graph kontinuierlich abnimmt, bis kaum noch Bakterien nachgewiesen werden

können. Dieser monophasische Verlauf deutet darauf hin, dass es nur einen Wirkungsmechanismus gibt, der mit zunehmender Zeit eine stärkere Reduktion von Cmm verursacht. Bei anderen Plasmaversuchen mit Mikroorganismen konnten auch schon diphasische oder triphasische Graphen im Verlauf der CFU-Kurven beobachtet werden. Dabei wird davon ausgegangen, dass in jeder Phase ein anderer Wirkungsmechanismus, wie z.B. die Schädigung des genetischen Materials durch UV-Strahlung oder die Zerstörung der Zelloberfläche durch geladene Teilchen und reaktive Spezies, für die Inaktivierung verantwortlich ist (Kelly-Wintenberg et al. 1999, Laroussi 2005). Da es sich bei diesen Untersuchungen um andere Plasmaanlagen und Mikroorganismen handelt und dies zwei Faktoren sind, die den Erfolg einer Plasmabehandlung beeinflussen, ist der monophasische Verlauf der Kurve von Cmm durchaus realistisch. In vielen Veröffentlichungen wird angeführt, dass die vom Plasma erzeugte UV-Strahlung so gering ist, dass sie nahezu keinen sterilisierenden Effekt auf die Mikroorganismen ausübt (Laroussi und Leipold 2004). Dies könnte auch bei unserem verwendeten Plasma der Fall sein. Leider liegen dazu keine Spektren vor, aber es liegt nahe, dass der monophasische Verlauf der CFU von Cmm in Bezug auf die Zeit der Plasmabehandlung allein durch die negative Wirkung der reaktiven Spezies und geladenen Teilchen zurückzuführen ist.

Eine weitere Information über die Wirkung des Atmosphärendruckplasmas auf die Zellen von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ergaben rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zellen durch eine 15 sekündige Plasmabehandlung optisch nicht beeinträchtigt wurden, obwohl festgestellt wurde, dass zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Reduktion der CFU erfolgt. Untersuchungen diverser Bakterien und Bakteriensporen, wie *Escherichia coli* und *Bacillus cereus*, zeigten immer wieder, dass die Zellen aufgrund einer Plasmabehandlung zerstört werden (Laroussi et al. 1999, Lee et al. 2005, Kuo et al. 2006, Yu et al. 2006). Dabei kommt es zu einer Anlagerung von elektrisch geladenen Teilchen an die Zellwand, sodass diese aufgrund der Ladungsakkumulation zerreißt. Zusätzlich reagieren die vom Plasma generierten reaktiven Spezies mit der Oberfläche der Mikroorganismen, sodass flüchtige Verbindungen entstehen, die zu einer Erosion führen (Mendis et al. 2000, Moisan et al. 2001). Untersuchungen verschiedenster Mikroorganismen (Bakterien, Hefen, Viren) haben gezeigt, dass es dabei enorme Unterschiede in der Inaktivierungszeit durch eine Plasmabehandlung gibt (Gadri et al. 2000). Dabei konnte festgestellt werden, dass Gram-positive Bakterien meist resistenter gegenüber der Oberflächenzerstörung durch das Plasma sind als Gram-negative Bakterien (Pompl et al. 2009). So könnte es sein, dass durch die Mureinschicht in Gram-positiven

Bakterien die Zellwand dicker und somit widerstandsfähiger gegenüber geladenen Teilchen und reaktiven Spezies ist. Dies führt dann nicht zu der bei Gram-negativen Bakterien beobachteten Zerstörung der Zellwand und dem damit verbundenen Austritt des Zellinhaltes (Laroussi et al. 2003). Dies könnte erklären, warum es bei einer 15-sekündigen Plasmabehandlung von Cmm nicht zu einer Zerstörung der Zelloberfläche gekommen ist. Untersuchungen zwischen *E. coli* und *B. subtilis* haben auch gezeigt, dass das Gram-positive Bakterium *B. subtilis* im Vergleich zu dem Gram-negativen Bakterium *E. coli* eine glattere Oberfläche besitzt und daher vermutlich geringer anfällig für die elektrostatische Zerstörung war (Laroussi et al. 2003). Aber auch die Behandlungszeit könnte bei der Oberflächenveränderung eine entscheidende Rolle gespielt haben. Es konnte gezeigt werden, dass eine Plasmabehandlung des Gram-negativen Bakteriums *E. coli* von 60 s ebenfalls zu einer Inaktivierung führte, jedoch keine morphologischen Veränderungen an dem Bakterium sichtbar waren (Pompl et al. 2009). Viele Studien, in denen die Behandlung von *E. coli* meist mehrere Minuten dauerte, zeigten immer eine Zerstörung des Bakteriums (Laroussi et al. 2003, Lee et al. 2005). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine längere Plasmabehandlung von Cmm zu einer Zerstörung des Bakteriums führen würde. Die Inaktivierung der Bakterien durch das Plasma ohne eine entsprechend sichtbare morphologische Veränderung lässt darauf schließen, dass es neben der Zerstörung der Oberfläche der Mikroorganismen noch weitere Deaktivierungsprozesse durch das Plasma geben muss. Dabei wird vermutet, dass reaktive Spezies die Integrität der Bakterienzelle zerstören, indem diese Membran gebundene Lipide und Proteine oxidieren und deren Funktion als Barriere bzw. Durchgangspassage für viele Stoffe außer Kraft setzen (Laroussi und Leipold 2004). Dies würde erklären, dass es trotz fehlender morphologischer Veränderungen an Cmm zu einer deutlichen Reduktion der CFU aufgrund der Plasmabehandlung gekommen ist.

Bei Untersuchungen zur Dekontamination von mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infizierten Tomatensaatguts mittels Atmosphärendruckplasma, konnte trotz verschiedener Parametereinstellungen, wie Behandlungszeit und Leistung, keine Reduktion der Anzahl an kontaminierten Samen und CFU pro Samen festgestellt werden. Dies stand im Widerspruch zu den guten Reduktionsergebnissen der behandelten Suspension auf mit NGA-Medium beschichteten Objektträgern. Dies könnte daran liegen, dass es sich bei beiden Behandlungen um unterschiedliche Oberflächen handelt, auf denen sich die Bakterien befanden. Das Medium enthielt im Gegensatz zu den Samen mehr Wasser und die Zellen der Cmm-Suspension wurden direkt auf die Oberfläche gegeben, sodass das Plasma direkt auf die



Zellen einwirken konnte. Dass die Oberfläche, auf denen sich die zu behandelnden Mikroorganismen befinden, entscheidend bei der Sterilisation sein kann, konnte bereits in Studien gezeigt werden. Die Exposition von *E. coli* auf einer Glas- oder Polypropylenoberfläche war beispielsweise wesentlich effektiver in der Inaktivierung mit der gleichen Plasmabehandlung als auf Agar (Kelly-Wintenberg et al. 1999). Auch ein Versuch mit *Pseudomonas aeruginosa* auf einem Filterpapier bzw. in einer Lösung zeigte einen besseren Sterilisationseffekt auf dem Filterpapier. Es wird vermutet, dass die durch das Plasma generierten geladenen Teilchen und reaktiven Spezies bei einer Exposition auf dem Filterpapier besser und schneller in Kontakt mit der Zelloberfläche kommen als im Agar (Laroussi et al. 2000). Da aber in dem durchgeführten Versuch die Bakteriensuspension direkt auf die Oberfläche der mit NGA-Medium beschichteten Objektträger gegeben wurde, waren die Bakterien direkt den vom Plasma generierten geladenen Teilchen und reaktiven Spezies ausgesetzt. Aber auch eine Befeuchtung des Prozessgases kann einen verbesserten Sterilisationseffekt erzielen (Bazhenov et al. 2001). Somit ist es denkbar, dass während der Plasmabehandlung Feuchtigkeit aus dem NGA-Medium entweicht und es dann zur Bildung von Radikalen und Säuren kommt, die den Sterilisationseffekt positiv beeinflussen. Durch die Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine Reaktion mit dem NGA-Medium während der Plasmabehandlung stattgefunden hat. Es ist jedoch nicht klar, welche Prozesse abgelaufen sind und welche Stoffe dabei gebildet wurden. Die Behandlung reiner mit NGA-Medium beschichteter Objektträger mit Plasma und das anschließende Aufbringen der Bakteriensuspension zeigte auch, dass sich diese Reaktion negativ auf die Vitalität von *Cmm* auswirkte. So wurde eine Reduktion der CFU ermittelt, die sich jedoch signifikant von der mit Plasma behandelten Bakteriensuspension unterschied. Somit konnte deutlich gezeigt werden, dass die Sterilisation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* durch die Behandlung mit Plasma erfolgte. Die Reaktion zwischen Plasma und entsprechender Umgebung der getesteten Mikroorganismen wird in den meisten Studien nicht berücksichtigt (Sladek und Stoffels 2005, Goree et al. 2006, Kriha und Koller 2007, Pompl et al. 2009) oder nur als Randbemerkung erwähnt (Moreau et al. 2005), wodurch solche Prozesse bisher ungeklärt sind.

Betrachtet man die Oberflächenbeschaffenheit der Samenschale der Tomatensamen, die eine Vielzahl von langen Haaren beherbergt, ist es denkbar, dass die für den Dekontaminationserfolg wichtigen geladenen Teilchen und reaktiven Spezies des Plasmas die Bakterien nicht erreicht haben und bei Kontakt mit den Haaren der Samenoberfläche eine Reaktion eingegangen sind. Dadurch konnten nur Bakterienzellen penetriert werden, die sich

in den oberen Bereichen der Haare befanden, wodurch die geringe Abnahme der CFU pro Samen und der Anzahl an infizierter Samen zu erklären ist. Desweiteren kann davon ausgegangen werden, dass durch die Reaktion der geladenen Teilchen und reaktiven Spezies des Plasmas neue Verbindungen auf der Samenoberfläche entstanden sind, die zu den beobachteten negativen Ergebnissen in der Keimung geführt haben könnten. Bei der Behandlung von Samen mit einem durch Radiowellen induzierten Luft-Plasma konnte gezeigt werden, dass es durch die Anwesenheit der Samen im Plasma zu einem veränderten Emissionsspektrum kommt, was eine Reaktion zwischen Plasma und Samenoberfläche beweist (Filatova et al. 2009).

Trotz Berichten, dass es durch eine Plasmabehandlung zu einer verbesserten Keimung und Keimlingsentwicklung kommt (Dubinov et al. 2000, Filatova et al. 2009), konnte dies bei der Behandlung von Tomatensamen mittels Atmosphärendruck-Plasma nicht bestätigt werden. Die Keimfähigkeit der untersuchten Tomatensamen bei unterschiedlichen Behandlungszeiten und verschiedenen Leistungen des Plasmas blieb weitgehend unverändert. Auch die Plasmabehandlung von Samen des Weißen Gänsefußes (*Chenopodium album* agg.) und der Gerste (*Hordeum vulgare*) zeigten in anderen Untersuchungen keine Veränderung der Keimfähigkeit (Sera et al. 2009, Filatova et al. 2009). Samen von Reis (*Oryza sativa*), Weizen (*Triticum* L.) und der Erbse (*Pisum sativum*) hingegen zeigten durch die Plasmabehandlung eine verbesserte Keimfähigkeit. Je nach Organismus konnte eine andere Behandlungszeit für die maximale Keimfähigkeit beobachtet werden. Eine Behandlung über diesen Zeitpunkt hinaus, führte wieder zu einer geringeren Keimfähigkeit (Filatova et al. 2009). Dies zeigt, dass jeder Samen anders auf die Wirkung von Plasma reagiert und spezielle Einstellungen für die optimale Dekontamination und Verbesserung der Keimfähigkeit benötigt. Die in unserem Versuch untersuchten Parameter des Atmosphärendruck-Plasmas konnten keine optimale Keimlingsentwicklung und Dekontamination der Samen von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* sicherstellen, sodass diese Methode nicht als Alternative zu den bisher angewandten Samenbehandlungen, wie Heißwasserbehandlung (Lewis Ivey & Miller 2005), die Behandlung mit HCl oder die Fermentation der Samen (Dhanvantari 1989), anzusehen ist.

## 5. Zusammenfassung

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ist ein weltweit verbreitetes, Gram-positives Bakterium das die bakterielle Welke an Tomaten (*Solanum lycopersicum*) verursacht und hauptsächlich die Xylemgefäße der Pflanzen befällt. Da es momentan noch keine resistenten Sorten gibt und die Bekämpfung schwierig ist, wird *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in der EU und weiteren Ländern als Quarantänekrankheit behandelt und unterliegt strengen Regularien.

Um die Interaktion zwischen Pathogen und Wirtspflanze genauer zu untersuchen, wurden die Tomatensorten Moneymaker, Lyconorma, Irat L3 und Hawaii 7998 in einem Screening auf ihre Anfälligkeit gegenüber *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* getestet und in anfällig und gering anfällig eingestuft. Anschließend erfolgte eine histologische Untersuchung des Pflanzenmaterials. Dabei zeigten die anfälligen Sorten Moneymaker und Lyconorma mehr Gefäßverstopfungen als die gering anfälligen Sorten Irat L3 und Hawaii 7998. In den gering anfälligen Sorten konnte desweiteren eine vermehrte Thyllenbildung beobachtet werden. Allgemein konnte gezeigt werden, dass die infizierten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen mehr phenolische Substanzen und Kallose bilden. Eine Ligninanreicherung beim infizierten Gewebe konnte nur geringfügig im Bereich des primären Xylems gezeigt werden. Die histochemische Untersuchung der Gefäßverstopfungen ergab eine positive Reaktion auf Proteine, Polysaccharide, Lipide, Suberin und Pektin. Färbungen von Bakterienausstrichen zeigten bis auf Pektin ebenfalls eine positive Reaktion. Eine genauere Begutachtung mittels Rasterelektronenmikroskop und Immunofluoreszenzfärbung zeigte, dass die Gefäßverstopfungen hauptsächlich aus einer gelartigen Substanz bestanden. Gelegentlich konnten Ansammlungen von Bakterien in den Xylemgefäßen entdeckt werden.

Vergleiche in der Ausbreitung von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* zwischen der anfälligen Sorte Moneymaker und der gering anfälligen Sorte Irat L3 durch den Nachweis mittels PCR (Primer Cmm5/Cmm6) und Ausplattierung auf semiselektivem Medium (mSCM) ergab, dass sich das Bakterium in der anfälligen Sorte etwas besser und schneller ausbreitet.

Bei Untersuchungen zur Reaktion der verschiedenen Tomatensorten auf die Stoffwechselprodukte von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, bei denen junge Pflanzen in Filtrate von Schüttelkulturen inkubiert wurden, zeigte sich nach 24 h in allen Sorten eine gleichmäßige Welke und ein damit verbundener Gewichtsverlust.

Die unterschiedliche Anfälligkeit der Sorten gegenüber *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* scheint somit auf die schnellere Erkennung und der damit verbundene, bessere Pathogenabwehr in den geringer anfälligen Sorten begründet zu sein.

Da die Lokalisation von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* auf infizierten Tomatensamen und die daraus resultierende Infektion des Keimlings noch immer nicht vollständig geklärt ist, wurden Immunofluoreszenzfärbungen infizierter Samen und Keimlinge durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* auf der Samenoberfläche lokalisiert ist und den Keimling durch das Auskeimen aus dem Samen an der Keimwurzel, dem Hypokotyl und den Keimblättern infiziert.

Da Plasma eine neue innovative Methode zur Sterilisation verschiedenster Materialien ist, wurde geprüft, ob diese Technologie sich auch zum Desinfizieren von mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infiziertem Tomatensaatgut eignet. Versuche mit einer reinen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-Suspension zeigten, dass durch Atmosphärendruckplasma die Anzahl der Kolonien bildenden Zellen innerhalb der ersten Sekunden drastisch reduziert werden kann. Die direkte Behandlung war dabei effektiver als die indirekte Behandlung im Luftstrom hinter der Plasmaentladung. Untersuchungen an infiziertem Saatgut zeigten jedoch keine nennenswerte Reduktion. Desweiteren wurden negative Beobachtungen bei der Keimlingsentwicklung gemacht. Es kam bei den mit Plasma behandelten Proben zu einer Verfärbung der Keimwurzel, die gelegentlich sogar abgestorben schien. In der weiteren Entwicklung kam es dann im Vergleich zur Kontrolle zu einer stärkeren Verzweigung der Keimwurzel und einer geringeren Entwicklung der Keimlinge. Damit ist deutlich, dass sich das untersuchte Plasma nicht als neue Desinfektionsmethode von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* an Tomatensamen eignet.

## Summary

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a world wide spread, Gram-positive bacteria that causes the bacterium canker and wilt on tomatoes and mainly infests the xylem vessels of the host plant. Since no resistant cultivars are available and the disease is difficult to control, it is considered as a quarantine disease in the EU and other tomato producing countries.

To investigate the interaction between pathogen and host plant, we screened the tomato cultivars Moneymaker, Lyconorma, Irat L3 and Hawaii 7998 for their susceptibility to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Afterwards plant material was examined histochemically. More occlusions of the xylem vessels had been detected in the susceptible cultivars Moneymaker and Lyconorma than in the less susceptible cultivars Irat L3 and Hawaii 7998. In addition, more tylosis had been formed in the less susceptible cultivars Irat L3 and Hawaii 7998. Generally it had been shown that infected plants accumulate more phenolic substances and callose than the control plants. Lignification of the infected tissue had been found only in region of the primary xylem. The histochemical examination of the occlusions of the xylem vessels indicated a positive reaction for proteins, polysaccharides, lipids, suberin and pectin. The staining of the bacteria also showed a positive reaction apart from pectin. Further observations using scanning electron microscopy and immunofluorescence revealed that occlusions consist out of a gel-like substance. Occasionally, accumulation of the bacteria inside the xylem vessels had been observed.

Comparison in spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* inside the susceptible cultivar Moneymaker and the less susceptible cultivar Irat L3, detected by PCR (Cmm5/Cmm6) and plating on semiselective medium (mSCM) showed that spread of the bacteria is better and faster in the susceptible cultivar.

The reaction of susceptible and less susceptible tomato cultivars to the metabolites of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* after incubation of young plants in a culture filtrate for 24 h, showed that all tested cultivars reacted in the same way by a weight loss and the corresponding wilting symptoms.

The differences in susceptibility of the cultivars to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* may be due to the faster recognition of the pathogen in less susceptible cultivars, resulting in a more effective defense.

As the localization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on infected seeds and the corresponding colonization of the seedlings had not been determined until now, we used

the technique of immunofluorescence on infected seeds and seedlings. Our observations indicated that *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is localized on the surface of the seed coat and colonizes the radicle, the hypocotyl and the cotyledons during seed germination.

Since plasma is a new and innovative method for sterilisation of different materials, we checked whether this technique could be applied also for disinfection of tomato seeds infected with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. The experiment with a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* culture showed, that plasma at atmospheric pressure can reduce the colony forming units (CFU) within seconds. The direct exposure of the samples was more effective than the remote exposure at the air stream behind the plasma. Examinations of infected seeds indicated, however, no reduction of the seedborne bacteria. Furthermore, we observed a negative effect of plasma treatment on seed germination. The plasma treated samples developed discolorations of the radicle, which seemed to be severely damaged. During seedling development, the plasma treated samples developed more branched roots and the seedlings were smaller. These results suggested that plasma is not appropriate as a new disinfection method for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infected tomato seeds.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agrios, G. N., 1978: Plant Pathology. Second Edition, Academic Press ISBN 0-12-044560-3
- Awakowicz, P., H. Halfmann, 2007: Ein sanfter und schneller Weg – Plasma Sterilisation von medizinischen Werkstoffen. SterilTechnik 01: 20-21
- Avramidis, G., B. Stüwe, R. Wascher, M. Bellmann, s. Wieneke, A. von Tiedemann, W. Viöl, 2010: Fungicidal effects of an atmospheric pressure gas discharge and degradation mechanisms. Surface and Coatings Technology 205 (1): S404-S408; doi:10.1016/j.surfcoat.2010.08.141
- Balaji, V., M. Mayrose, O. Sherf, J. Jacob-Hirsch, R. Eichenlaub, N. Iraki, S. Manulis-Sasson, G. Rechavi, I. Barash, G. Sassa, 2008: Tomato Transcriptional Changes in Response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Reveal a Role for Ethylene Disease Development. Plant Physiology 146: 1797-1809
- Balaji, V., G. Sessa, 2008: Activation and manipulation of host responses by a Gram-positive bacterium. Plant Signaling & Behavior 3 (10): 839-841
- Balogun, O. S., T. Teraoka, 2004: Time-course analyses of the accumulation of phenols in tomato seedling infected with *Potato Virus X* and *Tobacco mosaic virus*. Biokemistri 16 (2): 112-120
- Baysal, Ö., E. M. Soylu, S. Soylu, 2003: Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. Plant Pathology 52: 747-753
- Bazhenov, V. Y., A. I. Kuzmichev, I. L. Mihno, A. V. Ryabtsev, I. A. Soloshenko, V. A. Khomich, V. V. Tsioloko, A. I. Shchedrin, 2001: Investigation of the Sterilization of Medical Instruments by Atmospheric Pressure Discharge. Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Symposium on Plasma Chemistry July 9-14, Vol. VII, pp. 3005-3010
- Beckman, C. H., W. C. Mueller, B. J. Tessier, N. A. Harrison, 1982: Recognition and callose deposition in response to vascular infection in fusarium wilt-resistant or susceptible tomato plants. Physiological Plant Physiology 20: 1-10
- Beckmann, C. H., 2000: Phenolic-storing cells: key to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence response in plants. Physiological and Molecular Plant Pathology 57: 101-110
- Beimen, A., A. Bermpohl, D. Meletzus, R. Eichenlaub, W. Barz, 1992: Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* strains differing in virulence. Zeitschrift für Naturforschung, Section C, 47 (11-12): 898-909
- Bellmann, M., 2007: Plasmabehandlung von Schüttgut unter Atmosphärendruck. Diplomarbeit, HAWK Göttingen

- Benhamou, N., 1991: Cell surface interactions between tomato and *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*: localization of some polysaccharides and hydroproline-rich glycoproteins in the infected host leaf tissue. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38: 15-38
- Birmingham, J. G., D. J. Hammerstrom, 2000: Bacterial Decontamination Using Ambient Pressure Nonthermal Discharge. *IEEE Transactions on Plasma Science* 28 (1): 51-55
- Bishop, C. D., R. M. Cooper, 1983: An ultrastructural study of vascular colonization in three vascular wilt diseases I. Colonization of susceptible cultivars. *Physiological Plant Pathology* 23: 323-343
- Bishop, C. D., R. M. Cooper, 1984: Ultrastructure of vascular colonization by fungal wilt pathogens. II. Invasion of resistant cultivars. *Physiological Plant Pathology* 24: 277-289
- Buhiyan, N. H., G. Selvaraj, Y. Wei, J. King, 2009: Role of lignification in plant defense. *Plant Signaling Behavior* 4 (2): 158-159
- Burokiene, D., 2006: Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedling. *Agronomy Research* 4 (Special issue): 151-154
- Campbell, N. A., J. B. Reece, 2003: *Biologie*. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin, ISBN 3-8274-1352-4
- Carlton, W. M., E. J. Braun, M. L. Gleason, 1998: Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into Tomato Leaves Through Hydathodes. *Phytopathology* 88 (6): 525-529
- Chalupowicz, L., M. Cohen-Kandli, O. Dror, R. Eichenberg, K.-H. Gartemann, G. Sessa, I. Barash, S. Manulis-Sasson, 2010: Sequential Expression of Bacterial Virulence and Plant Defense Genes During Infection of Tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 100 (3): 252-261
- Chang, R. J., S. M. Ries, J. K. Pataky, 1991: Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by Practices Used to Produce Tomato Transplants. *Phytopathology* 81 (10): 1276-1281
- Cooper, R. M., J. S. Williams, 2004: Elemental sulphur as an induced antifungal substance in plant defence. *Journal of Experimental Botany* 55 (404): 1947-1953
- Crüger, G. 1991: *Pflanzenschutz im Gemüsebau*. 3. neubearbeitete und erweiterte Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart ISBN 3-8001-5135-9
- Cutrubinis, M., H. Declinee, M. Stahl, O. Röder, H. J. Schaller, 2005: Erste Ergebnisse zum Nachweis einer Elektronenbehandlung von Mais zur Beizung bzw. Entkeimung und Entwesung. *Gesunde Pflanzen* 57:129-136
- De Leon, L., A. Rodriguez, M. M. Lopez, F. Siverio, 2007: Evaluation of the efficacy of immunomagnetic separation for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Journal of Applied Microbiology* 104: 776-786



- Deepak, S., S. Shailasree, R. K. Kini, A. Muck, A. Mithöfer, S. H. Shetty, 2010: Hydroxyproline-rich Glycoproteins and Plant Defence. *Journal of Phytopathology* 25: 1-9
- Dhanvantari, B. N., 1989: Effect of seed extraction methods and seed treatments on control of tomato bacterial canker. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 400-408
- Dreier, J., A. Berrpohl, R. Eichenlaub, 1995: Southern Hybridization and PCR for Specific Detection of Phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85 (4): 462-468
- Dubinov, A. E., E. M. Lazarenko, V. D. Selemir, 2000: Effect of Glow Discharge Air Plasma on Grain Crops Seed. *IEEE Transactions on Plasma Science* 28 (1): 180-183
- Eichenlaub, R., K.-H. Gartemann, A. Burger, 2006: *Clavibacter michiganensis*, a Group of Gram-positive phytopathogenic Bacteria. S.S. Gnanamanickam (ed.) *Plant-Associated Bacteria* 385-421
- Edreva, A., I. D. Georgieva, T. Stoilova, N. Cholakova, S. Daganon, 2004: Biochemical and histological study of the induced resistance in tomato, *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* system. *Comptes rendus de l'académie bulgare des sciences* 57 (9): 61-66
- EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2005: Diagnostic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 35: 271-273
- Eynck, C., 2007: Identification of resistance sources and characterization of resistance factors in *Brassica* species to *Verticillium longisporum*. Dissertation Universität Göttingen
- Filatova, I., V. Azharonok, E. Gorodetskaya, L. Mel'nikova, O. Shedikova, A. Shik, 2009: Plasma-radiowave stimulation of plant seeds germination an inactivation of pathogenic microorganisms. *International Symposium on Plasma Chemistry*
- Francis, D. M., E. Kabelka, J. Bell, B. Franchino, D. S. Clair, 2001: Resistance to Bacterial in Tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA 407) and its Progeny Derived from Crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease* 85 (11): 1171-1176
- Franken, A. A. J. M., G. C. Kamminga, W. Snijders, P. S. Van der Zouwen, Y. E. Birnbaum, 1993: Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds by immunofluorescence microscopy and dilution plating. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 99: 125-137
- Ftayeh, R., 2009: Investigations on the elimination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of bacterial canker, from tomato cultures by highly sensitive detection methods and effective seed treatments. Dissertation, Universität Göttingen
- Gadri, R. B., J. R. Roth, T. C. Montie, K. Kelly-Wintenberg, P. P.-Y. Tsai, D. J. Helfritch, P. Feldman, D. M. Sherman, F. Karakaya, Z. Chen, UTK Plasma Sterilization Team, 2000: Sterilization and plasma processing of room temperature surface with a one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUTGDP). *Surface and Coatings Technology* 131: 528-542

- Gartemann K.-H., O. Kirchner, J. Engemann, I. Gräfen, R. Eichenlaub, A. Burger, 2003: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology* 106: 179-191
- Gartemann, K.-H., B. Abt, T. Bekel, A. Burger, J. Engemann, M. Flügel, L. Gaigalat, A. Goesmann, I. Gräfen, J. Kalinowski, O. Kaup, O. Kirchner, L. Krause, B. Linke, A. McHardy, F. Meyer, S. Pohle, C. Rückert, S. Schneiker, E.-M. Zellermann, A. Pühler, R. Eichenlaub, O. Kaiser, D. Bartels, 2008: The Genome Sequence of the Tomato-Pathogenic Actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 Reveals a Large Island Involved in Pathogenicity. *Journal of Bacteriology* 190: 2138-2149
- Gerlach, D., 1984: *Botanische Mikrotechnik - Eine Einführung*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Goree, J., B. Liu, D. Drake E. Stoffels, 2006: Killing of *S. mutans* Bacteria Using a Plasma Needle at Atmospheric Pressure. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34 (4), 1317-1324
- Griesbach, E., V. Sotirova, 2002: Induction of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by pre-inoculation of young tomato plants under field conditions in Bulgaria. *Journal of Plant Diseases and Protection* 109 (3): 264-278
- Hadas, R., G. Kritzman, F. Kliezman, T. Gefen, S. Manulis, 2005: Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology* 54: 643-649
- Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, A. von Tiedemann, 2007: *Phytomedizin*. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, ISBN 978-3-8001-2849-5 (Ulmer) ISBN 978-3-8252-2863-7 (UTB)
- Hammerschmidt, R., 1999: Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 77-84
- Himmel, D., L. C. Maurin, O. Gros, J.-L. Mansot, 2009: Raman microspectrometry sulfur detection and characterization in the marine endosymbiotic nematode *Eubostriechus diana* (Desmodoridae, Stilbonematidae). *Biology of the Cell* 101(1): 43-54
- Hock, B., E. F. Elstner, 1995: *Schadwirkungen auf Pflanzen*. 3. überarbeitete Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford, ISBN 3-86025-649-1
- Holzer, F., U. Roland, F.-D. Kopinke, 1999: Oxidation von organischen Luftschadstoffen im „kalten“ Plasma. *Jahresbericht 1998-199*, pp. 180-185; ISSN 0948-6925
- ISF International Seed Federation, 2008: Method for Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato seed. Version 3: 1-4
- Jahr, H., R. Bahro, A. Burger, J. Ahlemeyer, R. Eichenlaub, 1999: Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environmental Microbiology* 1 (2): 113-118
- Kabelka, E., B. Franchino, D. M. Francis, 2002: Two Loci from *Lycopersicon hirsutum* LA407 Confer Resistance to Strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 92 (5): 504-510

- Kaneshiro, W. S., C. Y. Mizumoto, A. M. Alvarez, 2006: Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. *European Journal of Plant Pathology* 116: 45-56
- Kaup, O. 2009: Die tomatinase von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Dissertation Universität Bielefeld
- Kelly-Wintenberg, K., A. Hodge, T. C. Montie, 1999: Use of a one atmosphere uniform glow discharge plasma to kill a broad spectrum of microorganisms. *Journal of Vacuum Science & Technology A* 17 (4): 1539-1544
- Klement, Z., K. Rudolph, D. C. Sands, 1990: *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest
- Kriha, V., J. Koller, 2007: Edge-to-gel corona discharge bactericidal effect. 28<sup>th</sup> ICPIG July 15-20, pp. 1418-1420
- Kuo, S. P., O. Tarasenko, S. Nourkbash, A. Bakhtina, K. Levon, 2006: Plasma effects on bacterial spores in a wet environment. *New Journal of Physics* 8 41; doi: 10.1088/1367-2630/8/3/041
- Laroussi, M., G. S. Sayler, B. B. Glascock, B. McCurdy, M. E. Pearce, N. G. Bright, C. M. Malott, 1999: Images of Biological Samples Undergoing Sterilization by a Glow Discharge at Atmospheric Pressure. *IEEE Transaction on Plasma Science* 27 (19): 34-35
- Laroussi, M., I. Alexeff, W. L. Kang, 2000: Biological Decontamination by Nonthermal Plasmas. *IEEE Transaction on Plasma Science* 28 (1): 184-188
- Laroussi, M., D. A. Mendis, M. Rosenberg, 2003: Plasma interaction with microbes. *New Journal of Physics* 5 41.1-41.10; doi: 10.1088/1367-2630/5/1/341
- Laroussi, M., 2004: Plasma-Based Sterilisation. Old Dominion University Norfolk Department of Electrical and Computer Engineering; Conference paper
- Laroussi, M., F. Leipold, 2004: Evaluation of the role of reactive species, heat, UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry* 233: 81-86
- Laroussi, M., 2005: Low temperature plasma-based sterilisation/decontamination of biological matter. In *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on Cold Atmospheric Pressure Plasma*, pp. 18-27
- Lee, K.-Y., B. J. Park, D. H. Lee, I.-S. Lee, S. O. Hyung, K.-H. Chung, J.-C. Park, 2005: Sterilisation of *Escherichia coli* and MRSA using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface and Coatings Technology* 193: 35-38
- Lewis Ivey, M. L., S. A. Miller, 2005: Evaluation of Hot Water Seed Treatment for the Control of Bacterial Leaf Spot and Bacterial Canker on Fresh Market and Processing Tomatoes. *Acta Hort. (ISHS)* 695: 197-204

- Lund, S. T., R. E. Stall, H. J. Klee, 1998: Ethylene Regulates the Susceptible Response to Pathogen Infection in Tomato. *The Plant Cell* 10: 371-382
- Luo, L. X., C. Walters, H. Bolkan, X. L. Liu, J. Q. Li, 2008: Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a real-time PCR assay. *Plant Pathology* 57: 332-337
- Mandal. S., A. Mitra, 2007: Reinforcement of cell wall in the roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 201-209
- Mendis, D. A., M. Rosenberg, F. Azam, 2000: A Note on the Possible Electrostatic Disruption of Bacteria. *IEEE Transaction on Plasma Science* 28 (4): 1304-1306
- Moisan, M., J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tabrizian, L`H. Yahia, 2001: Low-temperature sterilization using gas plasma: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* 226: 1-21
- Moreau, M., M. G. J. Feuilleley, N. Orange, J.-L. Brisset, 2005: Lethal effect of the gliding arc discharge on *Erwinia* spp.. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1039-1046
- Morris, A. D., G. B. McCombs, T. Akan, W. Hynes, M. Laroussi, S. L. Tolle, 2009: Cold plasma technology: bactericidal effects on *Geobacillus stearothermophilus* and *Bacillus cereus* microorganisms. *Journal of Dental Hygiene* 83 (2): 55-61
- Mueller, W. C., C. H. Beckman, 1988: Correlated light and electron microscope studies of callose deposits in vascular parenchyma cells of tomato plants inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33: 201-208
- Nakaho, K., C. Allen, 2009: A Pectinase-deficient *Ralstonia solanacearum* Strain Induces Reduced and Delayed Structural Defences in Tomato Xylem. *Journal of Phytopathology* 157: 228-234
- Nelson, P. E., R. S. Dickey, 1970: Histopathology of plants infected with vascular bacterial pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 8: 259-280
- O'Brien, T. P., N. Feder, M. E. McCully, 1964: Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O. *Protoplasma* 59: 367-373
- Ozdemir, Z., 2005: Development of a Multiplex PCR Assay for Concurrent Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Plant Pathology Journal* 4 (2): 133-137
- Park, B. J., K. Taktori, Y. Sugita-Konishi, I.-H. Kim, M.-H. Lee, D.-W. Han, K.-H. Chung, S. O. Hyun, J.-C. Park, 2007: Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface & Coatings Technology* 201: 5733-5737
- Parker, A. J., E. F. Haskins, I. Deyrup-Olsen, 1982: Toluidine Blue: A Simple, Effective Stain for Plant Tissue. *The American Biology Teacher* 44 (8): 487-489

- Pastrik, K.-H., F. A. Rainey, 1999: Identification and Differentiation of *Clavibacter michiganensis* Subspecies by Polymerase Chain Reaction-based Techniques. *Journal of Phytopathology* 147: 687-693
- Pompl, R., F. Jamitzky, T. Shimizu, B. Steffens, W. Bunk, H.-U. Schmidt, M. Georgi, K. Ramrath, W. Stolz, R. W. Stark, T. Urayama, S. Fujii, G. E. Morfill, 2009: The effect of low-temperature plasma on bacteria as observed by repeated AFM imaging. *New Journal of Physics* 11: 1-11
- Poysa, V., 1993: Evaluation of tomato breeding lines resistant to bacterial canker. *Canadian Journal of Plant Pathology* 15: 301-304
- Quiroga, M., C. Guerrero, M. A. Botella, A. Barcelo, I. Amaya, M. I. Medina, F. J. Alonso, S. M. de Forchotti, H. Tigier, V. Valpuesta, 2000: A Tomato Peroxidase Involved in the Synthesis of Lignin and Suberin. *Plant Physiology* 122: 1119-1127
- Rausch, T., A. Wachter, 2005: Sulfur Metabolismus: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science* 10 (10): 503-509
- Rickard, J. E., P. B. Gahan, 1983: The Development of Occlusions in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Root Xylem Vessels. *Annals of Botany* 52: 811-821
- Rioux, D., M. Nicole, M. Simard, G. B. Ouellette, 1998: Immunocytochemical Evidence that Secretion of Pectin Occurs During Gel (Gum) and Tylosis Formation in Trees. *Phytopathology* 88 (6): 494-505
- Robb, J., S.-W. Lee, R. Mohan, P. E. Kolattukudy, 1991: Chemical Characterization of Stress-Induced Vascular Coating in Tomato, *Plant Physiology* 97: 528-536
- Sandbrink, J. M., J. W. van Ooijen, C. C. Purimahua, M. Vrielink, R. Verkerk, P. Zabel, P. Lindhout, 1995: Localization of genes for bacterial canker resistance in *Lycopersicon peruvianum* using RFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 444-450
- Schaad, N. W., R. D. Frederick, 2002: Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24: 250-258
- Schulz, H., M. Baranska, 2007: Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* 43: 13-25
- Sera, B., M. Sery, V. Stranak, P. Spatenka, M. Tichy, 2009: Does Cold Plasma Affect Breaking Dormancy and Seed Germination? A Study on Seeds of Lamb's Quarters (*Chenopodium album* agg.). *Plasma Science and Technology* 11 (6): 750-754
- Sladek, R. E. J., E. Stoffels, 2005: Deactivation of *Escherichia coli* by the plasma needle. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 38: 1716-1721
- Taylor, R., G. Inamine, J.D. Anderson, 1993: Tissue Printing as a Tool for Observing Immunological and Protein Profiles in Young and Mature Celery Petioles. *Plant Physiology* 102: 1027-1031

- Tendero, C., C. Tixier, P. Tristant, J. D. P. Leprince, 2006: Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochimica Acta Part B* 61: 2-30
- Tigges, J., O. Röder, K. Lindner, 2002: e<sup>®</sup>-ventus<sup>®</sup> - ein praxisreifes, physikalisches Saatgutbehandlungsverfahren gegen samenbürtige Getreideschaderreger. *Gesunde Pflanze* 54 (5): 170-175
- Ueno, B., T. Teraoka, D. Hosokawa, M. Watanabe, 1994: Biological Activities of Toxin Produced by Tomato Canker Bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, against Tomato Plant and Its Callus Cells. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 60: 13-19
- Van den Bulk, R. W., H. J. M. Löffler, J. J. M. Dons, 1989: Effect of phytotoxic compounds produced by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on resistant and susceptible tomato plants. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 95: 107-117
- Van den Bulk, R. W., J. Jansen, W. H. Lindhout, H. J. M. Löffler, 1991: Screening of Tomato Somaclones for Resistance to Bacterial Canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *Plant Breeding* 107: 190-196
- Van Heusden, A. W., M. Koornneef, R. E. Voorrips, W. Brüggemann, G. Pet, R. Vrielink-van Ginkel, X. Chen, P. Lindhout, 1999: Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 1068-1074
- Van Steekelenburg, N. A. M., 1985: Resistance to *Corynebacterium michiganense* in Tomato Genotypes. *Euphytica* 34: 245-250
- Van der Molen, G. E., C. H. Beckman, E. Rodehorst, 1977: Vascular gelation: a general response phenomenon following infection. *Physiological Plant Pathology* 11: 95-100
- Veena, M. S., J. W. L. van Vuurde, 2002: Indirect immunofluorescence colony staining methode for detecting bacterial pathogens of tomato. *Journal of Microbiological Methods* 49: 11-17
- Vidaver, A. K., 1982: The Plant Pathogenic Corynebacteria. *Annual Review Microbiology* 36: 495-517
- Vidhyasekaran, P., 2007: Fungal Pathogenesis in Plants and Crops - Molecular Biology and Host Defense Mechanisms. Second Edition, CRC Press
- Von Keidell, A., P. Awakowicz, O. Kylian, J. Wunderlich, E. Comoy, 2007: BIODECON-Projekt entwickelt Plasmasterilisation - Sicher auf die sanfte Tour. *Naturwissenschaften*. Rubin 8-12
- Walker, J. C. 1952: Disease of vegetable crops. First Edition, McGraw-Hill Book Company, New York-Toronto-London, Library of Congress Catalog Card Number: 51-12826
- Wallis, F. M., 1977: Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. *Physiological Plant Pathology* 11: 333-342

- Wascher, R., 2010: Inaktivierung phytopathogener Mikroorganismen mittels Plasmabehandlung unter Atmosphärendruck. Masterarbeit, HAWK Göttingen
- Waters, C. M., H. A. Bolkan, 1992: An improved semi-selective medium for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seeds. (Abstract) *Phytopathology* 82: 1072
- Williams, J. S., S. A. Hall, M. J. Hawkesford, M. H. Beale, R. M. Cooper, 2002: Elemental Sulfur and Thiol Accumulation in Tomato and Defense against a Fungal Vascular Pathogen. *Plant Physiology* 128: 150-159
- Williams, J. S., R. M. Cooper, 2004: The oldest fungicide and newest phytoalexin – a reappraisal of the fungitoxicity of elemental sulphur. *Plant Pathology* 53: 263-279
- Xu, X., G. Rajashekara, S. A. Miller, 2008: Construction of Bioluminescent *Clavibacter michiganensis* supsp. *michiganensis* Strains. *Phytopathology* 98: 174
- Xu, X., S. A. Miller, F. Baysal-Gurel., K.-H. Gartemann, R. Eichenlaub, G. Rajashekara, 2010: Bioluminescence Imaging of *Clavibacter michiganensis* supsp. *michiganensis* Infection of Tomato Seeds and Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (12): 3978-3998
- Yu, Q. S., C. Huang, F.-H. Hsieh, H. Huff, Y. Duan, 2006: Bacterial Inactivation Using a Low-Temperature Atmospheric Plasma Brush Sustained With Argon Gas. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, pp. 211-219
- Zhang, Y., W. Yang, Y. Li, D. Liu, T. Zhang, 2009: A multiplex PCR method for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with co-amplification of its host DNA. *Frontiers of Agriculture in China* 3 (2): 140-145
- Zhao, W.-J., H.-Y. Chen, S.-F. Zhu, M.-X. Xia, T.-W. Tan, 2007: One-step Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Symptomless Tomato Seeds using a Taqman Probe. *Journal of Plant Pathology* 89 (3): 349-351

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
Abb.	Abbildung
bar	Einheit für den Druck
bp	Basenpaare (base pairs)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CFU	Colony forming units
CLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (confocal laser scanning microscope)
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
Cmm+SR	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> mit Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin und Rifampicin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	Tage nach der Inokulation (days post inoculation)
ELISA	Enzym gekoppelter, Antikörper gebundener Nachweis (enzyme linked immunosorbent assay)
et al.	et alii (und andere)
f. sp.	forma specialis
g	Gramm
h	Stunde(n)
HPRG	hydroxyprolinreiche Glycoproteine (Hydroxyproline-rich Glycoproteins)
IAA	Indol-3-Essigsäure
kb	Kilobasen
KHz	Kiloherz
KV	Kilovolt
M	Molar
MDa	Megadalton
mg	Milligramm



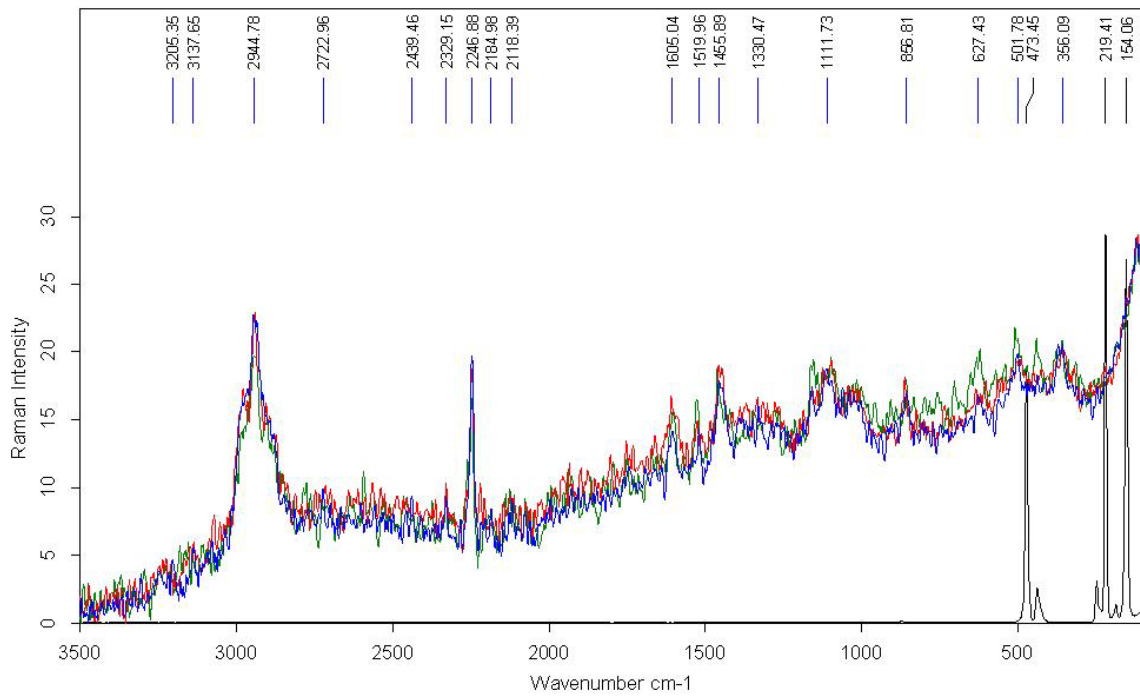
---

min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NGA	Nutrient Glucose Agar
NGA+SR	Nutrient Glucose Agar mit Streptomycin und Rifampicin
NGB	Nutrient Glucose Broth
nm	Nanometer
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
ppm	parts per million
PR	pathogen related
QTL	quantitative trait loci
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
s	Sekunde(n)
spp.	Spezies
subsp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
U	Einheit (Unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
x	...fach/mal
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

## 7.2. Schwefelmessungen

Um die Schwefelbildung in mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infizierten Tomatenpflanzen zu untersuchen, wurde zuerst das Gewebe im Bereich der Xylemgefäße von infizierten Pflanzen heraus präpariert, in Stickstoff gemörsert, bei 60°C im Trockenschrank für eine Stunde getrocknet und anschließend unter Zugabe von Kaliumbromid (2/3 Volumenanteil) zu einem Pellet gepresst. Die anschließenden Schwefelmessungen der entsprechenden Proben ergaben jedoch kein positives Signal. Aus diesem Grund wurden ca. 2 mm dicke Handschnitte des Stängels im Bereich der Inokulationstelle angefertigt und mit Hilfe des Klebers Roti® coll 1 (Cyanacrylat) auf Objektträgern befestigt. Damit sollte das Verrutschen und Verformen der Proben während der Messung verhindert werden. Nach kurzem Antrocknen wurden die Proben mit einer scharfen Rasierklinge erneut plan geschnitten, da durch die Trocknung vor allem das Mark einfällt. Anschließend erfolgte die entsprechende Schwefelmessung mittels Raman-Spektroskopie an individuell ausgewählten Punkten (Abb. 31). Dabei zeigten sich keinerlei für Schwefel typische Spektren (Abb. 30).

Elementarer Schwefel wird in der Literatur immer wieder als Substanz zur Abwehr von Pathogenen in Pflanzen beschrieben (Cooper und Williams 2004, Williams und Cooper 2004, Rausch und Wachter 2005). Auch bei der Interaktion zwischen Tomate und *Verticillium dahliae* (Williams et al. 2002) sowie *Ralstonia solanacearum* (Cooper und Williams 2004) konnte bereits der Einfluss von Schwefel nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass in resistenten Pflanzen mehr Schwefel gebildet wird als in anfälligen. Die maximale Menge an detektierten elementarem Schwefel bei der Interaktion zwischen Tomate und *Verticillium dahliae* lag bei  $10,4 \pm 1,7 \mu\text{g/g}$  und bei der Interaktion zwischen Tomate und *Ralstonia solanacearum* bei  $0,213 \pm 0,037 \mu\text{g/g}$ . Diese Mengen sind so gering, dass man bei der durchgeführten Raman Spektroskopie die im Nachhinein bestimmte Detektionsgrenze erreicht. Daher war es nicht möglich, durch diese Methode elementaren Schwefel in dem infizierten Pflanzengewebe zu bestimmen. Somit wurde eine weitere Messung der Proben mit Hilfe der X-Ray Spektroskopie durchgeführt. Dabei zeigten sich ebenfalls keine auffälligen Schwefelansammlungen im Gewebe (Abb. 32).



D:\MEAS\GG\Experiment\Projekt_Schwefel\20100708\Pr_S#Tomate IR1_Handschnitt_auf_Cyanakrilat.0	Tomate IR1	Handschnitt_auf_Cyana	08.07.2010
D:\MEAS\GG\Experiment\Projekt_Schwefel\20100708\Pr_S#Tomate IR2_Handschnitt_auf_Cyanakrilat.1	Tomate IR2	Handschnitt_auf_Cyana	08.07.2010
D:\MEAS\GG\Experiment\Projekt_Schwefel\20100708\Pr_S#Tomate IR3_Handschnitt_auf_Cyanakrilat.2	Tomate IR3	Handschnitt_auf_Cyana	08.07.2010
D:\MEAS\GG\Experiment\Projekt_Schwefel\Pr_S#20100526_1036_GG#Pulver_Tablette.0	Schwefel_pur	Pulver_Tablette	28.05.2010

Seite 1 von 1

Abb. 30: Spektrum der mittels Raman-Spektroskopie gemessenen Proben (Abb. 31) der mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infizierten Tomatenpflanze der gering anfälligen Sorte Irat L3 im Bereich der Xylemgefäße des Stängels auf Höhe der Inokulationstelle und einer zusätzlichen positiven Schwefelprobe.



Abb. 31: Messpunkte (●) für die Schwefelmessung mittels Raman-Spektroskopie einer mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infizierten Tomatenpflanze der gering anfälligen Sorte Irat L3 im Bereich der Xylemgefäße des Stängels auf Höhe der Inokulationstelle.

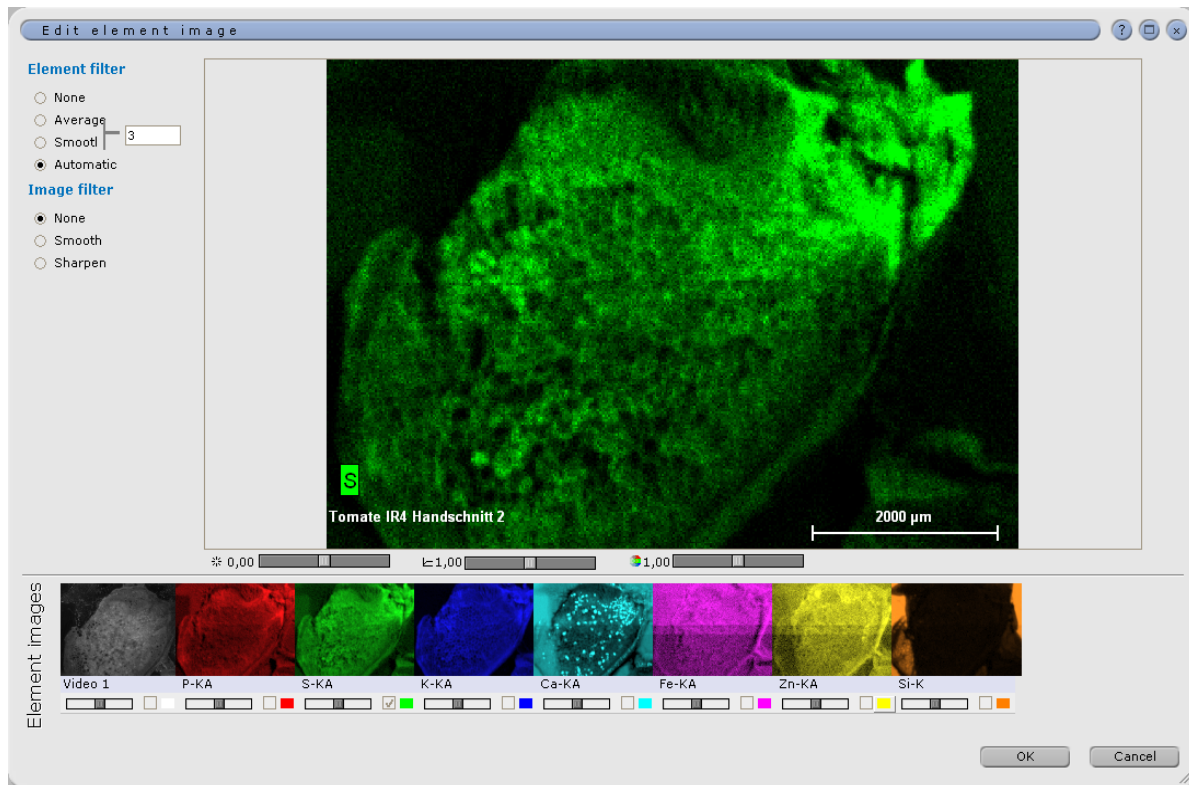


Abb. 32: Elementarverteilung im Querschnitt einer mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infizierten Tomatenpflanze der gering anfälligen Sorte Irat L3 im Bereich der Xylemgefäße des Stängels auf Höhe der Inokulationstelle mittels X-Ray.

Aufgrund der kurzen Projektzeit und der komplizierten Versuchsdurchführung, wurden keine weiteren Untersuchungen in diesem Bereich gemacht.

Es ist aber denkbar, dass auch Schwefelverbindungen bei der Pathogenabwehr eine Rolle spielen. So wird vermutet, dass bei *Allium*-Arten Schwefelverbindungen eine antimikrobielle Aktivität aufweisen und dies zur Resistenz gegenüber Pathogenen führt (Hock und Elstner 1995). Diese konnten mit den durchgeführten Methoden jedoch nicht ermittelt werden, sodass jene Versuche neu durchdacht werden müssten.

### 7.3. Temperaturkurven zur Plasmabehandlung

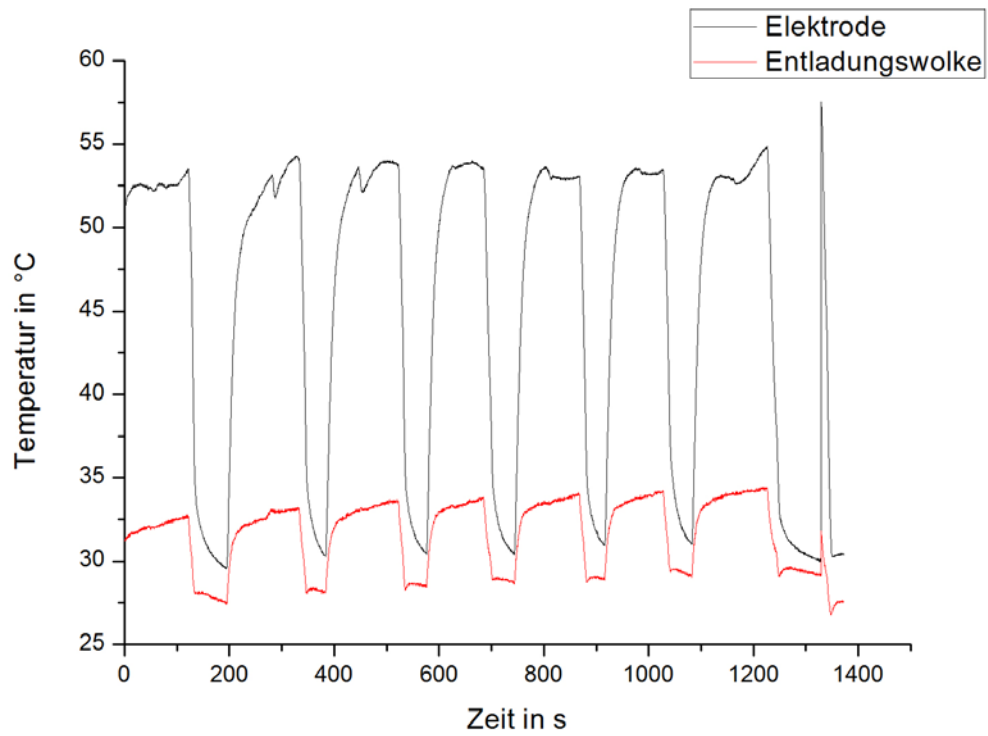


Abb. 33: Temperaturkurven der Elektrode und der Entladungswolke bei 15,3 KV.

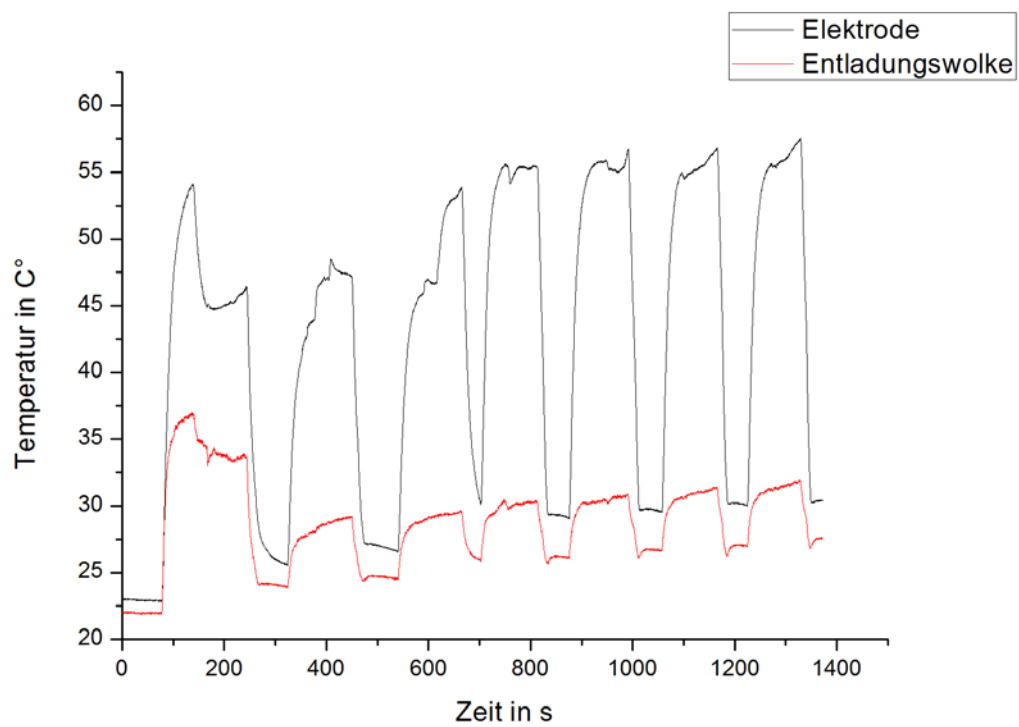


Abb. 34: Temperaturkurven der Elektrode und der Entladungswolke bei 19,6 KV.

#### 7.4. Plasmabehandlung von anderen Samen

Neben den in der Arbeit aufgeführten Untersuchungen zur Dekontamination von Tomatensaatgut mittels Plasma unter Atmosphärendruck bezüglich *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, wurde auch weiteres Saatgut von Zierpflanzen der Firma Benary in auf verschiedene Pathogene untersucht. Dabei konnten zwar Tendenzen in der Pathogenreduktion durch die Plasmabehandlung festgestellt werden, eindeutige Ergebnisse wurden jedoch nicht erzielt.

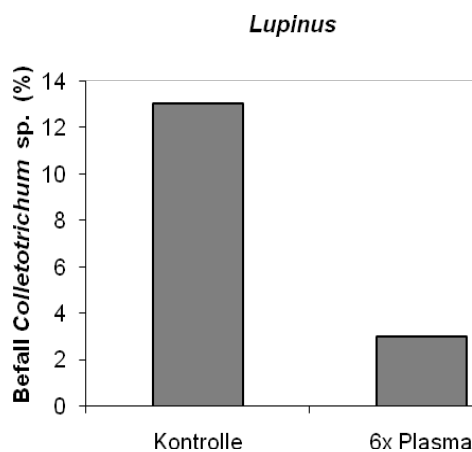


Abb. 35: Befall mit *Colletotrichum* sp. an Plasma behandeltem und unbehandeltem *Lupinus*-Saatgut (R4290/064242, n=100).

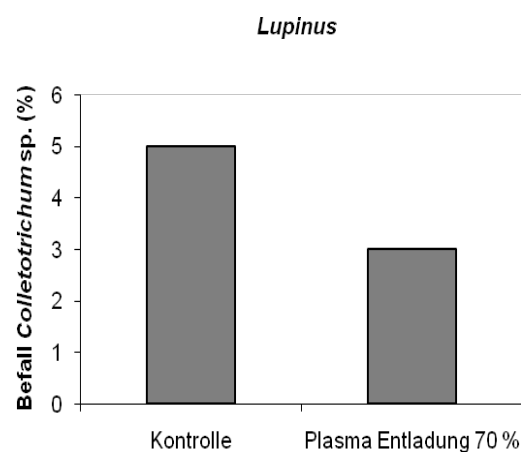


Abb. 36: Befall mit *Colletotrichum* sp. an *Lupinus*-Saatgut (R4743/0786 74) im Vergleich zu einer Plasmabehandlung bei 70% Entladung (n=100).

Die Untersuchung des *Lupinus*-Saatgutes auf den Befall von *Colletotrichum* sp. erfolgte durch das Auslegen der Samen auf PDA mit Streptomycin (200 ppm) und einer Inkubation bei 20°C unter UV-Licht. Nach ca. 7 Tagen erfolgte die mikroskopische Auswertung.

Aufgrund des geringen natürlichen Befalls des Saatguts war eine eindeutige Differenzierung zwischen Kontrolle und Plasma behandelte Probe nicht möglich. Es zeigte sich zwar eine Tendenz zur Pathogenreduktion aufgrund der Plasmabehandlung, jedoch waren die Unterschiede so gering, dass es wahrscheinlich auf eine natürliche Schwankung des Befalls zwischen den Proben zurückzuführen ist (Abb. 35 und 36).

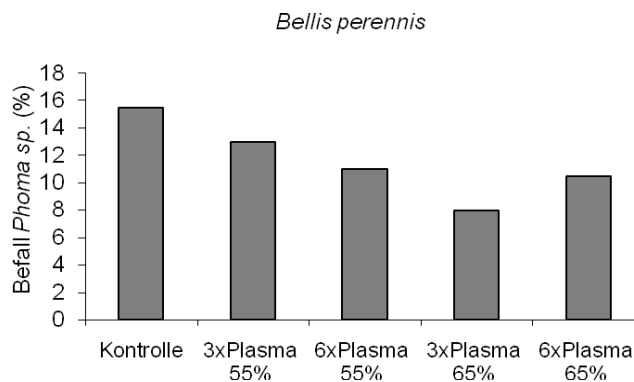


Abb. 37: Behandlung des *Bellis*-Saatgutes (D2650) mit unterschiedlichen Plasmaleistungen und verschiedenen Zeiten in Bezug auf den *Phoma* sp.-Befall (n=200).

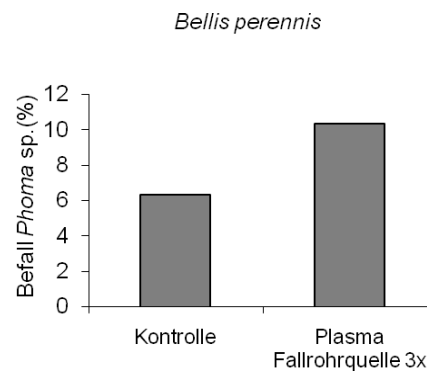


Abb. 38: Behandlung des *Bellis*- Saatgutes (D2650) mit der Fallrohrquelle in Bezug auf den *Phoma* sp.-Befall (n=300).

Für die Untersuchung des *Bellis*-Saatgutes im Bezug auf den Befall mit *Phoma* sp. wurden die Samen auf OA(Hafermehl)-Medium (20 g Haferflocken, 15 g Agar, 1 l Wasser) ausgelegt und bei 20°C unter UV-Licht inkubiert. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte nach ca. einer Woche und zeigte trotz verschiedener Leistungseinstellungen und Zeiteinwirkungen keine eindeutige Reduktion des Pathogenbefalls (Abb. 37 und 38).

Die Untersuchung des *Zinnia*-Saatgutes ergab ebenfalls keine eindeutige Reduktion der Pathogene *Alternaria zinniae* sowie *Xanthomonas* sp. durch die Behandlung mit Atmosphärenplasma unter verschiedenen Bedingungen (Abb. 39-44). Die Untersuchung auf den Befall von *Alternaria zinniae* erfolgte durch das Auslegen der Samen auf PDA mit Streptomycin (200 ppm) und einer Inkubation für ca. 7 Tage bei 20°C und UV-Licht. Die Untersuchung auf den Befall von *Xanthomonas* sp. erfolgte durch das Mörsern der Samen in 1 ml Wasser und der Ausplattierung entsprechender Verdünnungen auf SPA-Medium (Saccharose 2% w/v, Pepton 0,5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,005%, MgSO<sub>4</sub> 0,025%, Agar 1,5%, Wasser 1 l, pH 7,2-7,4). Nach einer Inkubationszeit von mindestens 7 Tagen bei 20 °C wurden auffällige Kolonien auf NGA-Medium ausplattiert und mikroskopisch auf *Xanthomonas* sp. untersucht.

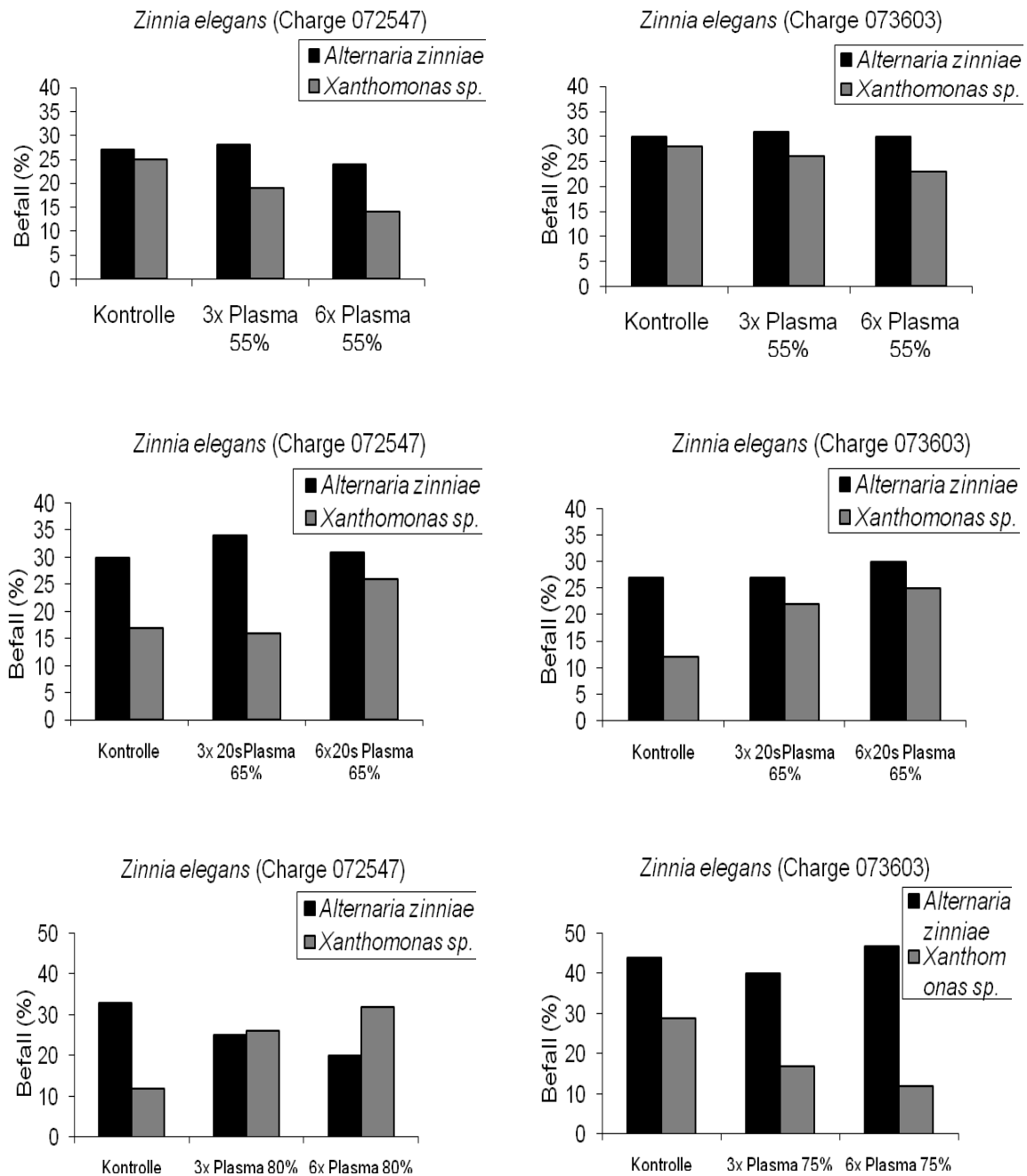


Abb. 39-44: Befall von *Zinnia*-Saatgut unterschiedlicher Chargen in Bezug auf den Pathogenbefall von *Alternaria zinniae* und *Xanthomonas sp.* bei verschiedenen Leistungen der Plasmabehandlung und deren Zeiten (n=100).



## 7.5. Einfluss der Plasmabehandlung auf Pilze

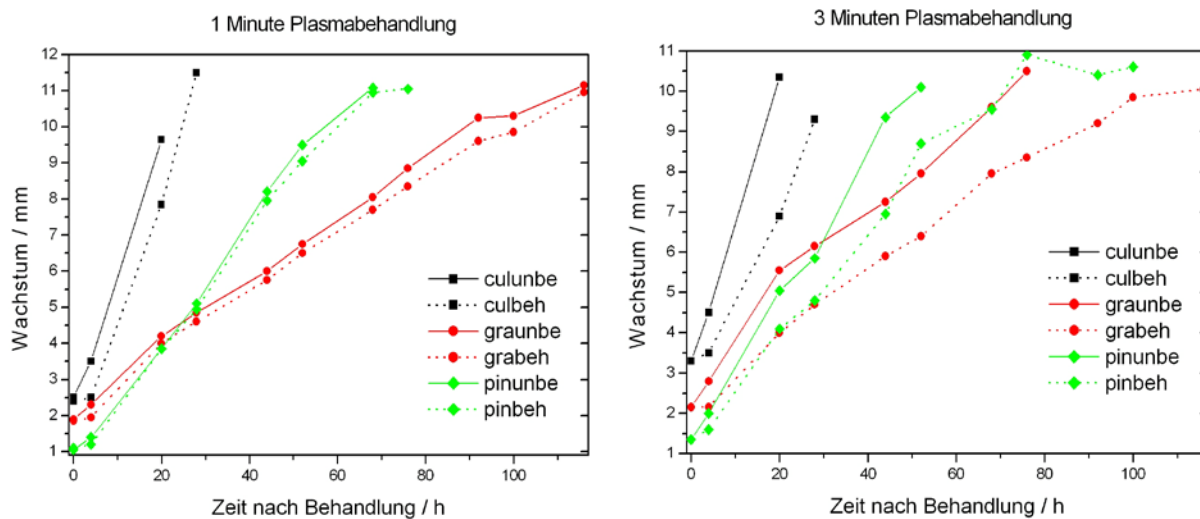


Abb. 45: Wachstum der Pilzkulturen nach 1 min und 3 min Behandlungszeit, gra= *Fusarium graminearum*, cul= *Fusarium culmorum*, pin= *Ascochyta pinodella*, be= behandelt mit Plasma, unbe= unbehandelt.

Um den Einfluss von Atmosphärendruckplasma auf das Pilzwachstum zu untersuchen, wurden mit PDA-Medium beschichtete Objektträger verwendet und mit Plugs (Korkbohrer 4 mm) der jeweiligen Pilzkultur versehen. Diese konnten über Nacht bei 20°C darauf anwachsen, bevor die Plasmabehandlung stattfand. Das radiale Wachstum der Pilze wurde vor und nach der Plasmabehandlung in zeitlichen Abständen gemessen.

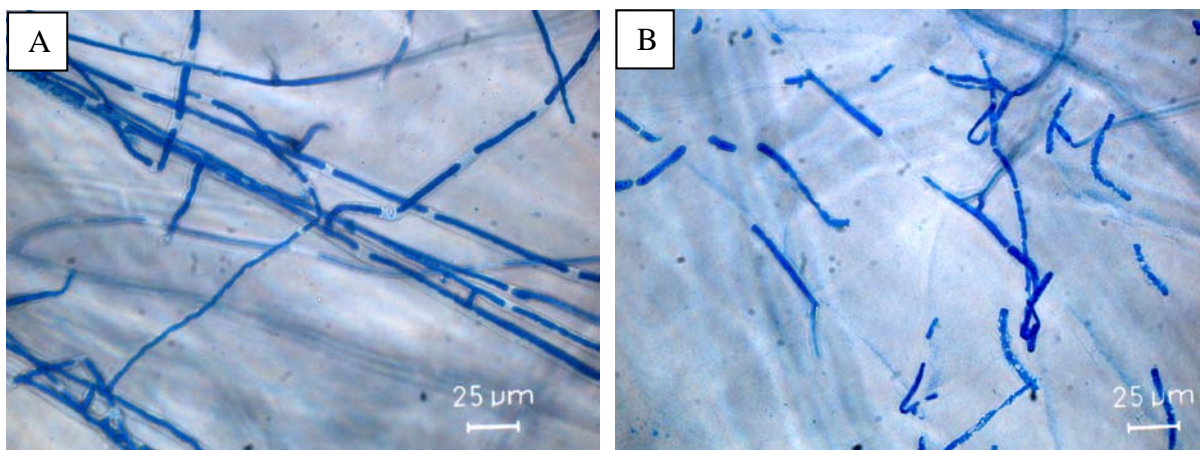


Abb. 46: *Fusarium culmorum* vor der Plasmabehandlung von (A) und 3 min danach (B) auf PDA-Medium (Färbung mit Lactophenolblaulösung).

Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit Atmosphärendruckplasma von 1 min keinen nennenswerten Einfluss auf das Pilzwachstum hat. Bei einer Behandlungszeit von 3 min konnte jedoch ein reduziertes Wachstum im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 45). Eine mikroskopische Untersuchung der Proben nach der Plasmabehandlung zeigte, dass das Mycel, welches sich auf der Agaroberfläche befand, durch das Plasma zerstört wurde. Mycel, welches aufgrund seines dreidimensionalen Wachstums in die Agarschicht eingewachsen war, wurde durch die meist oberflächige Wirkung des Plasmas scheinbar nicht beeinträchtigt (Abb. 46).

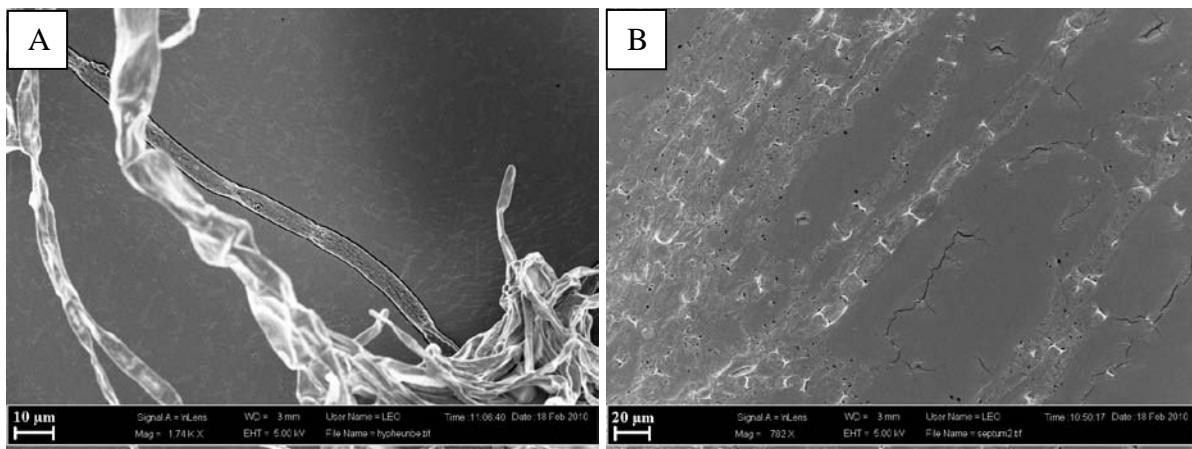


Abb. 47: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Fusarium culmorum* von mit PDA-Medium beschichteten Objektträgern, (A) unbehandelte Kontrolle, (B) Plasma behandelte Probe (5 min).

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mit Plasma behandelten Pilze zeigten deutlich, dass durch die Plasmabehandlung die Zellwand der Pilze degradiert wird und nur noch die Septen sichtbar sind (Abb. 47). Da es momentan kaum Untersuchungen zur Wirkung von Plasma auf Pilzmycel gibt, ist der genaue Mechanismus dieser Degradation noch unbekannt. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass es sich hier um ähnliche Prozesse wie bei der Zerstörung von Bakterien handelt (Avramidis et al. 2010).

Um den Einfluss des Plasmas auf natürlich mit *Fusarium* spp. infiziertem Weizensaatgut zu untersuchen, wurde dieses drei Mal in der Rüttleranlage bei 19,6 KV und einer Behandlungstemperatur von 40°C behandelt. Desweiteren wurde als Prozessgas Luft, Schweißgas und Formiergas jeweils in ihrer Reinform oder mit Wasserdampf angefeuchtet verwendet, um zusätzlich den Einfluss der verschiedenen Prozessgase zu testen.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich das trockene Formiergas tendenziell am besten zur Pathogenreduktion eignet, aber es gab keine signifikanten Unterschiede zu den anderen getesteten Prozessgasen (Abb. 48). Außerdem erfolgt in allen Fällen keine für die Praxis ausreichende Reduktion des Pathogens. Dies könnte auf die geringe Tiefenwirkung der für die Mikroorganismen schädlichen vom Plasma generierten geladenen Teilchen und reaktiven Spezies zurückzuführen sein. Eine nennenswerte Beeinträchtigung der Keimfähigkeit konnte in allen Behandlungen nicht beobachtet werden.

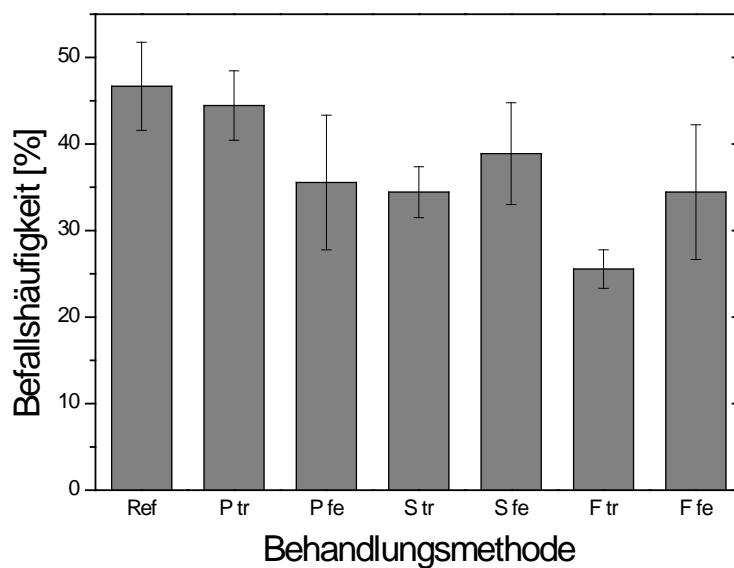


Abb. 48: Befallshäufigkeit von *Fusarium* spp. auf Weizensaatgut bei verschiedenen Plasmagasen (Ref...Kontrolle, P...Luft-Plasma, S...Schweißgas, F...Formiergas, tr...trockenes Gas, fe...feuchtes Gas, Ref...unbehandelte Kontrolle; n=120). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung (n=15).

### 7.6. Untersuchung zur Abbaubarkeit von Mykotoxinen

Um die Abbaubarkeit der Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) zu untersuchen, wurden 10 µl der jeweiligen Standardlösung (DON 100 ng/µl; ZON 50 ng/µl) auf einen Diagnostikobjektträger (Ø 14 mm) mit definierter Fläche gegeben und anschließend mit Plasma behandelt. Danach wurden die Mykotoxine mit einem Methanol-Wasser-Gemisch von (50:50) extrahiert und mit Hilfe der HPLC analysiert. Dabei zeigte sich, dass durch die Behandlung mittels Plasma unter Atmosphärendruck ein Abbau stattfindet, der besonders in der ersten Minute der Behandlung sehr deutlich ist (Tab. 10).

Tab. 10: Konzentrationen der Mykotoxine Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZON) nach unterschiedlichen Behandlungszeiten mit Atmosphärendruckplasma

	0 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
DON (ng/ml)	61,02	0,87	0,37	0,23	0,13	0,18
ZON (ng/ml)	70,35	1,64	1,08	1,45	0,89	0,52

Aufgrund der kurzen Projektlaufzeit und der langen Probenanalysezeit konnten keine weiteren Untersuchungen in diesem Bereich vorgenommen werden. Es ist aber bekannt, dass durch die chemische Reaktion der reaktiven Spezies und geladenen Teilchen des Plasmas Mykotoxine abgebaut werden können (Birmingham und Hammerstrom 2000, Park et al. 2007). Diese Tatsache erschließt ein neues Einsatzgebiet für die Plasmatechnologie. So wäre es denkbar, mit Mykotoxinen verseuchtes Erntegut durch eine Plasmabehandlung wieder nutzbar für den Lebens- und Futtermittelmarkt zu machen. Ob solch eine Behandlung in Form von Körnern oder Schrot erfolgreich wäre ist jedoch fraglich, da die geladenen Teilchen und reaktiven Spezies des Plasmas aufgrund ihrer hohen Relativität mit anderen Ionen und Molekülen nicht weit in die Probe eindringen können und somit nur oberflächlich wirken. Dadurch kann ein Großteil der Mykotoxinmoleküle nicht erreicht und zerstört werden. Außerdem ist ungewiss, welche neuen chemischen Substanzen dabei entstehen, die wiederum ein toxisches Potential haben könnten.

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Andreas von Tiedemann für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung, die anregenden Diskussionen und die ermöglichte Freiheit sowie Unterstützung in der Durchführung meiner Arbeit bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Petr Karlovsky für die Übernahme des Korreferats, die geistigen Anregungen und die Möglichkeit der Mykotoxinanalysen bedanken.

Bei Claudia Nordmann bedanke ich mich für die wichtige technische Hilfe und die zuverlässige Unterstützung im Labor und Gewächshaus.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Marvridis und Radwan Ftayeh für die Bereitstellung von Versuchsmaterial und Isolaten, sowie den hilfreichen Diskussionen und Gesprächen.

Vielen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für die große Hilfsbereitschaft, gute Arbeitsatmosphäre und den Spaß im und außerhalb des Instituts.

Dann möchte ich mich noch bei meinen Kooperationspartnern für die gute und ergebnisreiche Zusammenarbeit bedanken.

Ein Dankeschön geht auch an die EDV- und Gewächshausmitarbeiter für ihre zuverlässige Hilfe.

Zum Schluss gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern und Freunden für ihr Verständnis und ihre zuverlässige, liebevolle Unterstützung.

## Lebenslauf

**Name** Brit Stüwe  
**Geburtsdatum:** 10.03.1984 in Hoyerswerda

### Schulbildung:

1990-1994 Grundschule „Am Park“ Hoyerswerda  
 1994-2002 „Lessing-Gymnasium“ Hoyerswerda

### Hochschulbildung:

2002-2005 Grundstudium der Biologie an der Universität Kassel  
 2005-2007 Hauptstudium der Biologie an der Universität Kassel  
 Schwerpunkt: Ökologie, Spezielle Botanik, Pflanzenphysiologie  
 Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Wirkung von Methylobakterien auf die Prothalliumentwicklung beim Farn *Aglaomorpha meyeniana* (Polypodiaceae)“  
 2007-2010 Anfertigung der Dissertation an der Georg-August-Universität Göttingen zum Thema „Untersuchungen zur Interaktion von *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* mit unterschiedlichen Tomatensorten und zur phytosanitären Saatgutbehandlung mittels Plasma unter Atmosphärendruck“

### Praktika:

17.10-25.11.2005 LMBV Lausitzer und Mitteldeutsche Bergbau-Verwaltungsgesellschaft mbH  
 30.01-10.03.2006 Staatlich anerkanntes Labor für Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen (Kasseler Entwässerungsbetrieb)  
 13.08-31.08.2007 BAUTEST GmbH

### Berufliche Tätigkeit:

11.2007-10.2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Allgemeine Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz an der Georg-August-Universität Göttingen