

**Untersuchungen zur Überwachung und Minderung des
Infektionsdruckes durch die Vergilbungskrankheit der Rebe**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Darimont Harald

Saarbrücken

Tag des Kolloquiums:

Dekan:

Berichterstatter:

Inhalt

Inhalt

Inhalt	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Zum Begriff der Schwarzholzkrankheit der Weinrebe	1
1.2 Zur Entdeckung und Verbreitung von Phytoplasmen und Weinreben	2
1.3 Phytoplasmen und Phytoplasmosen	3
1.3.1 Klassifizierung von Phytoplasmen	3
1.3.2 Entstehung und Epidemiologie der Phytoplasmen	8
1.3.3 Nachweisverfahren von Phytoplasmen durch Anwendung der PCR	10
1.4 Vektoren von Phytoplasmen	11
1.4.1 <i>Scaphoideus titanus</i> Ball	11
1.4.2 <i>Oncopsis alni</i> Schrank	12
1.4.3 <i>Hyalesthes obsoletus</i> Signoret	13
1.4.4 Andere Zikadenarten	15
1.5 Rückschau: Chronologischer Überblick bedeutsamer Ereignisse	16
1.6 Ausgangspunkt und Zielsetzung	17
1.6.1 Feststellung der Befallssituation in den deutschen Weinanbaugebieten	17
1.6.2 Nachweis von Phytoplasmen in Zikaden, Weinreben, Nahrungs- und Wirtspflanzen	17
1.6.3 Feststellung des Durchseuchungsgrades verschiedener Populationen von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	18
1.6.4 Untersuchungen zur Biologie von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	19
1.6.5 Untersuchung anderer Zikadenarten im Hinblick auf mögliche Vektoreigenschaften	20
1.6.6 Entwicklung von Gegenmaßnahmen zur Verminderung des Gefahrenpotentials	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Versuchsflächen	22
2.1.1 Versuchsflächen zur Erfassung der Flugaktivität und der Infektionshäufigkeit in verschiedenen Populationen von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	22
2.1.2 Versuchsflächen zur Erfassung der Vektoreigenschaften von <i>Hyalesthes obsoletus</i> und anderer phloemsaugender Zikaden	23
2.1.3 Versuchsflächen zur Untersuchung der Migrationsaktivität von <i>Hyalesthes obsoletus</i> und dem daraus resultierenden Infektionsdruck auf benachbarte Ertragsreblflächen	23

Inhalt

2.2	Zikadenfang	34
2.2.1	Lebend- und Gelbfallenfang von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	34
2.2.2	Untersuchungen zur Flugaktivität von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	35
2.2.3	Untersuchung zur Migrationsaktivität von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	36
2-2-4	Lebend- und Gelbfallenfang anderer phloemsaugender Zikadenarten	38
2.3	Untersuchungen zur Biologie von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	38
2.3.1	Prognose des Flugbeginns adulter <i>Hyalesthes obsoletus</i>	40
2.3.2	Einfluss trophischer Faktoren auf die Überlebensdauer von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	40
2.3.3	Überlebenszeitanalyse	40
2.4	Untersuchungen zu Übertragungseigenschaften von <i>Hyalesthes obsoletus</i> und anderer Zikadenarten	41
2.5	Nachweis und Differenzierung reopathogener Phytoplasmen	46
2.5.1	Nachweis der Phytoplasmose bei Rebstöcken mittels visueller Erfassung der typischen Krankheitssymptome	46
2.5.2	PCR-Nachweis von Phytoplasmen in Zikaden und Versuchspflanzen	48
2.6	Untersuchungen zum Durchseuchungsgrad von Ertragsreblflächen	67
2.7	Verbreitung und Bekämpfung alternativer Wirtspflanzen von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	67
2.7.1	Identifikation weiterer Wirts- und Nahrungspflanzen von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	70
2.7.2	Maßnahmen zur Bekämpfung von Wirts- und Nahrungspflanzen von <i>Hyalesthes obsoletus</i> am Beispiel der Ackerwinde <i>Convolvulus arvensis</i>	71
2.7.3	Verdrängung der Ackerwinde <i>Convolvulus arvensis</i> durch Bodenbewirtschaftungsmaßnahmen	72
3	Ergebnisse	76
3.1	Fang phloemsaugender Zikaden	76
3.1.1	Der Fang von <i>Hyalesthes obsoletus</i> und seine geographische Verbreitung in den deutschen Weinanbaugebieten	88
3.1.2	Untersuchungen zur Flugaktivität von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	88
3.1.3	Untersuchung zur Migrationsaktivität von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	94
3.1.4	Der Fang anderer phloemsaugender Zikadenarten	96
3.2	Untersuchungen zur Biologie von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	96
3.2.1	Prognose des Flugbeginns adulter <i>Hyalesthes obsoletus</i>	97
3.2.2	Einfluss trophischer Faktoren auf die Überlebensdauer von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	103
3.3	Untersuchungen zu Übertragungseigenschaften von Vektoren	105
3.3.1	Untersuchungen zu den Übertragungseigenschaften von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	106
3.3.2	Untersuchungen zu den Übertragungseigenschaften von <i>Oncopsis alni</i> als Vektor der Phytoplasmose vom FD-Pfalz-Typ	108

Inhalt

3.4	Nachweis und Differenzierung reopathogener Phytoplasmen durch die PCR	109
3.4.1	Detektion des Schwarzholzphytoplasmas in <i>Hyalesthes obsoletus</i>	110
3.4.2	Detektion des Schwarzholz-Phytoplasmas anderer Zikadenarten	123
3.4.3	Charakterisierung und Differenzierung der in deutschen Weinanbaugebieten vorkommenden Phytoplasma-Isolate	124
3.5	Untersuchungen zur Befallsstärke von Rebflächen	125
3.5.1	Zur Verbreitung der Schwarzholzkrankheit in deutschen Weinanbaugebieten	129
3.5.2	Analyse der zeitlichen Dynamik der Schwarzholzkrankheit	129
3.5.3	Zum Infektionsdruck durch <i>Hyalesthes obsoletus</i>	130
3.5.4	Räumliche Verteilungsmuster symptomatischer Rebstöcke	131
3.6	Bedeutung der Wirtspflanzen von <i>Hyalesthes obsoletus</i> und Methoden zur Bekämpfung ihrer Verbreitung	136
3.6.1	Erfassung des pflanzlichen Artenspektrums der Weinbergflora und ihre Bedeutung für <i>Hyalesthes obsoletus</i>	136
3.6.2	Die Verbreitung der Ackerwinde <i>Convolvulus arvensis</i> als Wirts- und Nahrungspflanze für <i>Hyalesthes obsoletus</i> und Methoden zur Begrenzung ihrer Verbreitung	138
3.6.3	Einfluss der Wirtspflanzen auf den Infektionsdruck der Schwarzholzkrankheit	148
4	Diskussion	151
4.1	Der Fang des Vektors <i>Hyalesthes obsoletus</i>	151
4.2	Untersuchungen zur Biologie von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	152
4.2.1	Prognose des Flugbeginns von <i>Hyalesthes obsoletus</i> und Untersuchungen zu seiner Nahrungsspezifikation	152
4.2.2	Übertragungsversuche von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	155
4.3	Nachweis und Identifizierung reopathogener Phytoplasmen durch die PCR	157
4.3.1	Detektion des Schwarzholzphytoplasmas in <i>Hyalesthes obsoletus</i>	159
4.3.2	Differenzierung verschiedener Phytoplasma-Isolate	161
4.3.3	Untersuchung anderer Zikadenarten	162
4.4	Untersuchungen zum Infektionsdruck von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	163
4.4.1	Erfassung der Migrationsaktivität	163
4.4.2	Erfassung des Bedeckungsgrades der Ackerwinde <i>Convolvulus arvensis</i>	165
4.4.3	Bekämpfung der Ackerwinde <i>Convolvulus arvensis</i> durch Bodenbewirtschaftungsmaßnahmen	167
4.4.4	Bewertung des Infektionsdruck durch den Vektor <i>Hyalesthes obsoletus</i> und die Feststellung des Befallgrades von Rebflächen	168
4.5	Ausblick	170

Inhalt

5	Zusammenfassung / Summary	172
6	Literatur	174
7	Anhang	i
7.1	Anstieg der Jahresmitteltemperatur in Deutschland 1901-2007	i
7.2	Aus dem Forschungsprojekt hervorgegangene Veröffentlichungen	ii

Abkürzungen

VERZEICHNIS DER WICHTIGSTEN ABKÜRZUNGEN

Zikaden:

H. obsoletus	Hyalesthes obsoletus
M. fuscula	Macropsis fuscula
N. fenestratus	Neoaliturus fenestratus
O. alni	Oncopsis alni
S. titanus	Scaphoideus titanus

Symptomatik :

BN	Bois noir
EY	Elm yellows
FD	Flavescence dorée
FD-Pfalz	Flavescence dorée-Pfalz
MLO	Mycoplasma-like organisms
PGY	Palatinate grapevine yellows (FD-Pfalz)
STOL	Stolbur
VK	Vergilbungskrankheit (Schwarzholzkrankheit)

Pflanzen :

A. glutinosa	Alnus glutinosa (Schwarzerle)
A. retroflexus	Amaranthus retroflexus (Zurückgebogener Fuchsschwanz)
C. arvensis	Convolvulus arvensis (Ackerwinde)
C. roseus	Catharanthus roseus
C. sepium	Calystegia sepium (Zaunwinde)
cv.	Rebsorte (cultivar)
H. pilosella	Hieracium pilosella (Kleines Habichtskraut)
L. autumnalis	Leontodon autumnalis (Herbst-Lattich)
R. repens	Ranunculus repens (Kriechender Hahnenfuß)
S. nigrum	Solanum nigrum (Schwarzer Nachtschatten)
T. officinale	Taraxacum officinale (Gemeiner Löwenzahn)
U. dioica	Urtica dioica (Große Brennnessel)
V. faba	Vicia faba (Saubohne)
V. vinifera	Vitis vinifera (Weinrebe)

Andere Abkürzungen:

CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid (Mazerationspuffer; vgl. Tab. 2.11)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (vgl. Tab. 2.11)
IR	Infection rate
MFIR	Minimum field infection rate
PCR	Polymerase chain reaction
TE-Puffer	Tris (10mM), EDTA (1mM), ph 7,6 (vgl. Tab. 2.11)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (vgl. Tab. 2.11)

1 EINLEITUNG

1.1 ZUM BEGRIFF DER SCHWARZHOLZKRANKHEIT DER WEINREBE

Die *Schwarzholzkrankheit* ist die in Deutschland bedeutsamste Vergilbungskrankheit der Weinrebe *Vitis vinifera* und erhielt ihren Namen aufgrund einer Schwarzfärbung der Zweige, die nach der Erkrankung absterben. Wesentlich bekannter ist die Schwarzholzerkrankung allerdings unter dem in der Vergangenheit und in der Literatur häufig verwendeten Begriff der *Vergilbungskrankheit* (VK), da sich bei Weißweinsorten die auffälligsten Symptome oftmals in einer sehr gut zu erkennenden Blattvergilbung äußern. In dieser Untersuchung werden daher beide Bezeichnungen synonym verwendet. Das die Schwarzholzkrankheit auslösende Pathogen wird von der Glasflügelzikade *Hyalesthes obsoletus* übertragen.

Alle bisher bekannten Rebphytoplasmosen rufen bei der Weinrebe ähnliche Symptome hervor¹. Am auffälligsten können sich die obengenannten Blattvergilbungen² entwickeln, nach denen die Vergilbungskrankheit in Deutschland und die Flavescence dorée (FD) in Frankreich benannt ist. Ein weiteres Merkmal ist eine mangelhafte bzw. eine ausbleibende Verholzung einjähriger Triebe, die im Winter absterben und sich dabei schwarz verfärben. Darüber hinaus kommt es häufig zu einem Entwicklungsstopp der Beeren, die verdorren und bei Berührung abfallen. Wenn sich die Beeren trotzdem weiterentwickeln sollten, dann bleiben sie hart, sauer und entwickeln zudem einen unangenehmen und bitteren Geschmack.

Die Ursache solcher Phytoplasmosen ist ein mikrobieller Befall, bei der das Pathogen von solchen Insekten übertragen werden kann, die das Phloem der Pflanze besaugen (vgl. Abb. 3.1b). Diese Erkrankung war zunächst ausschließlich bei Angiospermen beobachtet worden (NIENHAUS, 1985). Spätere Untersuchungen zeigten allerdings, dass auch Gymnospermen von Phytoplasmen infiziert sein und eine entsprechende Symptomatik aufweisen können (SCHNEIDER et al., 2005). Die ersten Pflanzen, bei denen eine Phytoplasmaose nachgewiesen werden konnten, waren Maulbeerbäume, Asten und Kartoffeln (DOI et al., 1976). Mittlerweile konnte diese Gruppe der Pathogene auch in Wald- und Obstbäumen, krautigen Pflanzen und Gräsern gefunden werden. Durch eine Literaturre-

¹ Vergilbungskrankheiten werden in Deutschland auch als Vergrünung, Verzwegung oder Triebsucht bezeichnet. Diese unterschiedliche Benennung basiert auf auffälligen Merkmalen in der Symptomausprägung.

² Bei Rotweinsorten dagegen äußert sich die Phytoplasmaose nicht in einer Blattvergilbung, sondern in einer Rotfärbung der Blätter.

Einleitung

cherche fand MARWITZ bereits 1990 etwa sechshundert Pflanzenarten, deren Symptome auf eine Phytoplasnose schließen ließen (MARWITZ, 1990). Die Anzahl bekannter, auf Phytoplasmen zurückzuführende Erkrankungen wird gegenwärtig auf etwa siebenhundert geschätzt, wobei oftmals letale Folgen zu beobachten sind (WEINTRAUB & BEANLAND, 2006)

1.2 ZUR ENTDECKUNG UND VERBREITUNG VON PHYTOPLASMOSEN AN WEINREBEN

Flavescence dorée (FD), Schwarzholz- bzw. Vergilbungskrankheit (VK) und Bois noir (BN)

Bereits 1937 beschrieb HERSCHLER die Symptome einer Phytoplasnose an der Weinrebe *Vitis vinifera* L. ssp. *sativa* (Vitaceae, Rhamnales) in den Weinlagen von Bernkastel-Kues an der Mosel, die er als Ernährungsstörung interpretierte. Basierend auf Untersuchungen von CAUDWELL (1957) vermutete GÄRTEL (1959) dagegen einen Virus als Erreger. Auch in Frankreich waren seit 1947 gleichartige Symptome im Armagnac-Gebiet an der Rebstock-Hybride *Baco 22A* beobachtet worden. LEVADOUX (1955) benannte die Krankheit nach dem auffälligsten Leitsymptom dieser Krankheit und führte damit den Begriff der *Flavescence dorée* (FD) ein. Erst 1969 rückten dann alternativ zur Virus-Hypothese auch mikrobielle Erreger der neuentdeckten *Mycoplasma-like organisms*-Gruppe (MLOs-Gruppe) in den Mittelpunkt der Vermutungen von CAUDWELL (in: GIANOTTI *et al.*, 1969).

Der Begriff der *Vergilbungskrankheit* (VK) wurde im weiteren von MENDGEN (1970) zur Beschreibung spezifischer Symptome der mittlerweile auch am Rhein, an der Saar und in Franken sich verbreitenden Krankheitssymptome verwendet und erreichte damit gleichzeitig eine Abgrenzung zur FD. In den 1960er Jahren stellten beide Begriffe eher eine sprachenspezifische Formulierung dar und wurden weitgehend, wie bei GÄRTEL (1965), synonym verwendet. Auch in Frankreich wurde mit dem Begriff *Bois noir* (BN) (CAUDWELL, 1961) schon frühzeitig eine der FD sich ähnelnde Reberkrankung anerkannt und gleichzeitig zur FD abgegrenzt. Gemeinsames Kennzeichen von FD, VK und BN war zunächst einmal die Übertragbarkeit der Erreger durch Pfropfung, wobei sich darüber hinaus ausschließlich die FD durch den bis zu diesem Zeitpunkt einzig bekannten Vektor *Scaphoideus titanus* Ball übertragen ließ (CAUDWELL, 1961). Aufgrund der Tatsache, dass seit den 1990er Jahren auch in Deutschland Erreger bekannt sind,³ die der FD zugehörigen Gruppe zugeordnet werden können, bezieht sich die Bezeichnung VK und damit auch der Begriff der

³ Diese neu entdeckten Pathogene wurden zunächst als *Alnus associated yellows of grapevine* (AYG) bezeichnet und erst später aufgrund seines hauptsächlichen Vorkommens im Weinanbaugebiet Pfalz in *Palatinate grapevine yellows* (PGY) umbenannt (vgl. MAIXNER *et al.*, 1995).

Einleitung

Schwarzholzkrankheit nur noch auf solche Erreger, die anhand ihrer 16S rDNA-Sequenzen eindeutig der *Stolbur*-Gruppe (vgl. dazu: SCHNEIDER *et al.*, 1997a) zugeordnet werden können.

Verbreitung von Phytoplasmosen in weltweiten Weinanbaugebieten

Mittlerweile sind weltweit aus vielen Weinanbaugebieten Phytoplasmosen bekannt: Italien (BELLI *et al.*, 1973; GRANATA, 1985), Schweiz (CAZELLES & KUSZALA, 1993), Griechenland (RUMBOS, 1993), Spanien (LAVINA *et al.*, 1995), Ungarn (KÖLBER *et al.*, 1997), Slowenien und Kroatien (SARIC *et al.*, 1997), Ukraine (MILKUS *et al.*, (2005); zitiert in MAIXNER, 2006), Israel (DAIRE *et al.*, 1993), USA (UYEMOTO, 1976; PEARSON *et al.*, 1985; WOLF *et al.*, 1994), Hawaii (BORTH *et al.*, 1995), Chile (GÄRTEL, 1971) und Australien (MAGAREY & WACHTEL, 1986).

1.3 PHYTOPLASMEN UND PHYTOPLASMOSEN

Durch den Einsatz der Elektronenmikroskopie gelang DOI *et al.* (1967) erstmalig der Nachweis, dass im Phloem symptomtragender Pflanzen tatsächlich polymorphe Partikel festgestellt werden konnten. Durch den Einsatz von Tetracyclinen gelang derselben Arbeitsgruppe zudem der Nachweis, dass es sich bei diesen Strukturen tatsächlich um lebende Zellen handelt (ISHIIE *et al.*, 1967). Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die Zellen eine Größe zwischen 200-1000 nm aufweisen können, in deren Innerem Ribosomen und elektronendichte Fibrillen entdeckt wurden (McCOY, 1979).

1.3.1 Klassifizierung von Phytoplasmen

Die Zuordnung der Phytoplasmen zur Klasse der Mollicutes

Der Trivialname *Phytoplasmen* ersetzt den älteren Begriff MLOs (Mycoplasma-like organisms) auf Grundlage des Beschlusses *des Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes* des *International Committee on Systematic Bacteriology* auf dem Interim Meeting in Ames 1992 (Iowa, USA) (ICSB/M, 1993). Dieser Trivialname fasst die nichtkultivierbaren Organismen in der Klasse der Mollicutes unter folgenden Eigenschaften zusammen:

- Phylogenetische Verwandtschaft zu anderen *Mollicutes* aufgrund der Sequenzanalyse ribosomaler DNA
- Pleomorphe, nicht kultivierbare und zellwandlose Zellen
- Resistenz gegen Penicillin bzw. hohe Sensibilität gegenüber Tetracyclinen
- Übertragung durch phloemsaugende Homopteren

Einleitung

- Vorkommen in den Siebröhren des pflanzlichen Phloems
- Kleines Genom (600-1200 kbp) mit niedrigen G/C-Gehalten

1995 wurden dann die Minimalstandards für Mitglieder der Klasse der Mollicutes festgelegt (ICSB/M, 1995). Ein wesentlicher Faktor zur Aufnahme ist, dass ihr Genom untereinander eine mindestens 70%ige Übereinstimmung aufweisen muss. Für die frühe Einteilung der Phytoplasmen innerhalb dieser Klasse zur Gattung *Mycoplasma* war zunächst ihre Ähnlichkeit bezüglich der pleomorphen, zellwandlosen Gestalt verantwortlich. Doch darauf folgende Untersuchungen zeigten dagegen, dass ihr G+C-Gehalt (KOLLAR & SEEMÜLLER, 1989, SEARS *et al.*, 1989), die Größe ihres Genoms (LIM & SEARS, 1991; NEIMARK & KIRKPATRICK, 1993) und ihre Sequenz der 16S rDNA (KUSKE & KIRKPATRICK, 1992; LIM & SEARS, 1992) lediglich auf eine entferntere Verwandtschaftsbeziehung schließen ließen, so dass im folgenden der Trivialname MLOs durch den Phytoplasma-Begriff ersetzt wurde. Gleichwohl bestätigten die Untersuchungen die Einordnung der Phytoplasmen in die Klasse Mollicutes. Innerhalb dieser Klasse besitzen sie die größte verwandtschaftliche Beziehung zu *Acholeplasma laidlawii* (SEEMÜLLER *et al.*, 1994), *Acholeplasma palmae* (DAVIS *et al.*, 1997) und zu *Acholeplasma modicum* (LEE *et al.*, 1998).

Die 16S rDNA-Sequenzierung als Basis zur Klassifizierung der Phytoplasmen

Mit dem Beschluss, die Phytoplasmen allein auf dem Sequenzvergleich ihrer 16s rDNA künftig zu klassifizieren, reagierte das „Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes“ (ICSB/M, 1997) auf die Fortschritte hinsichtlich der erfolgreichen Klassifikationsmöglichkeiten anhand des DNA-Abschnitts, der für die RNA der 16S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms codiert. Andere Autoren verweisen zwar darauf, dass der Sequenzvergleich der 16S rDNA als alleiniges Klassifikationskriterium nicht in allen Fällen ausreichend sei (MURRAY *et al.*, 1990; STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994; STACKEBRANDT, 1997). Der Vorteil des 16S rDNA-Gens allerdings ist unbestritten, da seine Länge nur etwa 1500 bp groß und damit einfach zu sequenzieren ist und neben hochkonservierten auch weniger hoch konservierte Abschnitte besitzt. Damit kann eine relativ spezifische Klassifikation durchgeführt werden, wobei gleichzeitig die Zuordnung zu höheren taxonomischen Ebenen überprüfbar bleibt (Schneider *et al.*, 1993). In einer umfassenden Untersuchung sequenzierte GUNDERSON *et al.* (1994) das gesamte 16S rRNA Gen von 19 MLOs, 46 Vertreter der Mollicutes und verschiedenen repräsentativen Vertretern von Bakterien mit Zellwand. Er fand dabei heraus, dass sich alle Vertreter der MLOs tatsächlich als geschlossene Gruppe repräsentieren, die untereinander eine engere Verwandtschaft aufweisen als zu allen anderen Bakterienstämmen. Alle MLOs zeigten dabei die engste verwandtschaftliche Beziehung zu den ausgewählten Vertre-

Einleitung

tern der Gattung *Acheoplasma*, nämlich zu *Acholeplasma sp.* str. J-233 bzw. zu *Acholeplasma modicum*.

Eine umfangreiche Darstellung der Klassifizierung gelang SEEMÜLLER *et al.* (1998) durch Sequenzierung von 75 verschiedenen Phytoplasmaisolaten, die in 20, teilweise stark heterogene Gruppen eingeteilt werden konnten. Diese Systematik bildet damit grundlegend eine Basis zur Zuordnung künftiger Phytoplasma-Sequenzierungen. LEE *et al.* (1998) konnten anhand von 34 sequenzierten Phytoplasmenisolaten diese Ergebnisse weitgehend bestätigen.

Zusätzliche Aspekte zur Bestimmung der Taxonomie werden entweder aufgrund einer weiteren Differenzierung vorgeschlagen bzw. werden als Ergänzung für solche Isolate notwendig, deren 16S-rDNA noch nicht vollständig sequenziert wurde. CHIIYKOWSKI & SINHA (1990), aber auch MARWITZ (1990) forderten daher auch eine Einteilung nach den auftretenden Symptomen an Primär- bzw. Sekundärwirten unter Einbeziehung der Vektoren. Aufgrund der Unsicherheit in der spezifischen Symptomausprägung ist die Detektion zwar eine gute Möglichkeit zum allgemeinen Erkennen einer Phytoplasmaose, aber nicht zum Rückschluss auf das übertragene Pathogen.

Eine alleinige Einteilung aufgrund serologischer Merkmale durch Einsatz geeigneter monoklonaler Antikörper hat sich ebenfalls bewährt, doch ist ihre Herstellung aufwendiger als die Isolierung und Sequenzierung der Phytoplasmen-DNA. Zur Einordnung von Phytoplasmaisolaten und zur Bestätigung könnte darüber hinaus auch Plasmid-DNA untersucht werden (KUSKE *et al.*, 1991). Gleichzeitig bietet auch die Sequenzanalyse anderer Genabschnitte die Möglichkeit einer Überprüfung bzw. einer Revision der durch die Sequenzanalyse der 16S rDNA ermittelten taxonomischen Beziehungen. Eine weitere Möglichkeit bietet die Sequenzanalyse der zwischen der 16S und der 23S rDNA gelegenen Spacer-Region (SMART *et al.*, 1996), die weniger konserviert ist als die sie flankierenden Abschnitte. Trotz des Fortschritts, mithilfe der Sequenzierung der 16S-rDNA erstmalig eine solide Basis zur Klassifizierung von Phytoplasmen erreicht zu haben, sei an dieser Stelle auch auf die Problematik einer noch weitergehenden Klassifizierung hinzuweisen. Diese Methodik kann allerdings dort an ihre Grenzen stoßen, wo eine noch weitergehende Klassifizierung wünschenswert erscheint. Es stellte sich nämlich heraus, dass Vektoren unterschiedliche Isolate einer spezifischen Phytoplasma-Gruppe⁴ übertragen können, die nicht mehr unbedingt auf der Grundlage der 16S-rDNA-Sequenzierung weitergehend differenziert werden können. Eine Alternative dazu stellt die Sequenzanalyse des *tuf*-Gens dar, dessen Aufgabe die Kodierung des für die Eiweißsynthese essentiellen Elongationsfaktors EF-Tu ist. SCHNEIDER *et al.* (1997b) konnten zeigen, dass der Anteil

⁴ Beispielsweise können durch RFLP Analyse vom *Alnus associated yellows of grapevine* (AYG) insgesamt 3 verschiedene Typen (AYG1-3) bestimmt werden.

Einleitung

homologer Gensequenzen bei den tuf-Genen geringer als die der entsprechenden 16S rDNA ist. Damit ist auch die Möglichkeit gegeben, Phytoplasmen-Isolate⁵, die auf der 16S-rDNA Ebene keine Unterschiede mehr zeigen, spezifischer zu klassifizieren und Subgruppen zu bilden.

Übersicht der wichtigsten reopathogenen Phytoplasmosen

Die durch SEEMÜLLER *et al.* (1998) erfolgte Kartierung der verwandtschaftlichen Verhältnisse offenbarte insgesamt 4 Gruppen, denen Phytoplasmen zugeordnet wurden, die bei der Weinrebe eine Vergilbungskrankheit auslösen können:

- Die Flavescence dorée (FD), übertragen von *Scaphoideus titanus* Ball, zeigt eine enge verwandtschaftliche Beziehung zur *Elm Yellows* Gruppe (EY). Sie konnte bisher nachgewiesen werden in: Frankreich (DAIRE *et al.*, 1993), Italien (BERTACCINI *et al.*, 1995; BIANCO *et al.*, 1993) und Spanien (BATTLE *et al.*, 1997). Drei mit der FD engverwandte Isolate sind aus Deutschland bekannt (MAIXNER *et al.*, 1995) und werden von *Oncopsis alni* Schrank übertragen. Sie wurden zunächst mit der provisorischen Bezeichnung *Alnus associated yellows of grapevine* (AYG) versehen und später aufgrund seines hauptsächlichlichen Vorkommens im Weinanbaugebiet Pfalz in Palatinate grapevine yellows (PGY) umbenannt. In Deutschland sind drei verschiedene Isolate nachgewiesen (*PGY-A*, *PGY-B* und *PGY-C*), die eine genetische Variabilität und keinen monophyletischen Ursprung aufweisen (ARNAUD *et al.*, 2007). Das Ausmaß der Schäden, die auf Erreger dieser Gruppe zurückzuführen sind, ist im Gegensatz zu denen in den französischen Weinanbaugebieten bisher sehr gering.
- Die Schwarzholz- bzw. Vergilbungskrankheit (VK) sowie das Bois noir sind Angehörige der *Stolbur*-Gruppe. Die Phytoplasmen werden von *Hyaletes obsoletus* Signoret übertragen. Nach dem neusten Forschungsstand sind in Deutschland drei verschiedene Isolate der Schwarzholzkrankheit bekannt, so dass im Rahmen nachfolgender Untersuchungen (LANGER, M & MAIXNER, M.; 2004) eine Umbenennung der bisher bekannten Bezeichnungen nötig wurde. Durch die Verwendung der Primer fSTOL/rSTOL konnten die beiden bisher bekannten Stolbur-Muster *VK-A* und *VK-B* nachgewiesen werden. Eine Differenzierung der beiden Muster konnte durch Verwendung des Primers fSTOL4/rSTOL4 mit anschließendem

⁵ Der Begriff *Isolat* bezeichnet die kleinste Einheit, die auf Klassifizierung eines Pathogens aus einem Wirt beruht. Die Zusammenfassung genetisch eng verwandter Isolate zu Gruppen bzw. Untergruppen erfolgt zur Durchführung vergleichender Studien, die zum Ziel haben, Zusammenschlüsse zu erreichen, die nach MURRAY & SCHLEIFER (1994) als *Candidatus spec.* erfasst werden können und sie damit gemäß den Nomenklaturregeln eine Art darstellen könnten. Die Nomenklaturregeln des *International Code of Nomenclature of Bacteria* setzen enge Grenzen für die taxonomische Einteilung von Organismen, die nur in Wirtspflanzen und nicht in Reinkultur zu kultivieren sind. Damit werden auch gleichzeitig die Kochschen Postulate nicht erfüllt, so dass die Verwendung der Begrifflichkeiten wie Infektion, Pathogen bzw. Krankheitserreger aus dem Sprachgebrauch her zu erklären ist und basiert auf der logischen Einsicht, dass die Phytoplasmen mit den festgestellten Krankheitssymptomen ihrer Wirte assoziiert sind.

Einleitung

Verdau durch *DRA* I durchgeführt werden. Während das weitverbreitete Isolat *VK-B* in Weinreben, Vektoren und in einer der wichtigsten Wirtspflanzen von *H. obsoletus*, nämlich der Ackerwinde *Convolvulus arvensis* detektiert und mittlerweile in allen zehn deutschen Weinanbaugebieten nachgewiesen werden konnte, trat das Isolat *VK-A* ausschließlich in Populationen des Vektors im Weinanbaugebiet Pfalz auf, die auf die Große Brennessel *Urtica dioica* als Wirtspflanze spezifiziert sind. Dieses Isolat konnte in Nachfolgeuntersuchungen auch in den Weinanbaugebieten Baden und Württembergs, der Mosel, des Mittelrheins, der Nahe und der Bergstraße nachgewiesen werden. Die Entdeckung, dass auch die Zaunwinde *Calystegia sepium* als Hauptnährpflanze dient, führte unter Verwendung des Primers *tufAY* mit dem anschließenden Verdau durch *HpaII* zu einer weiteren Differenzierung des Isolats *VK-B* in die phylogenetisch eng zusammenhängenden Typen *b* und *c*. Während der Typ *b* diejenigen Isolate bezeichnet, die bisher dem *VK-B* Typ entsprachen, repräsentiert der Typ *c* das neuentdeckte Isolat, das *H. obsoletus* durch Besaugen von *C. sepium* aufnimmt und auf Weinreben überträgt. Nach LANGER und MAIXNER (2004) ergibt sich nun folgende neue Differenzierung von Isolaten der Stolbur-Gruppe, die die Schwarzholzkrankheit der Weinrebe auslösen:

VK-Typ I:

Dieser Typ entspricht der bisherigen Bezeichnung *VK-A* (Typ *a* nach *tufAY* / *HpaII*-Analyse).

VK-Typ II bzw. III: Diese beiden Typen entsprechen der bisherigen Bezeichnung *VK-B* (weiter differenziert in Typ *b* bzw. Typ *c* nach *tufAY* / *HpaII*-Analyse).

Stolbur-Isolate wurden bisher für Deutschland (MAIXNER *et al.*, 1995a), Frankreich (DAIRE *et al.*, 1993), Israel (DAIRE *et al.*, 1993), Italien (BIANCO *et al.*, 1993) mit Sizilien (GRANATA, 1985), Spanien (LAVINA *et al.*, 1995), Ungarn (KÖLBER *et al.*, 1997), Griechenland (DAVIS *et al.*, 1997a) und für Slowenien und Kroatien (SARIC *et al.*, 1997) nachgewiesen. In Deutschland konnte man außerdem eine enge Verwandtschaft des Pathogens des Australien grapevine yellows (AUSGY) zur Stolburgruppe nachweisen (PADOVAN *et al.* 1996). Innerhalb der vergangenen zehn Jahre avancierte die Schwarzholzerkrankung zu eine der bedeutsamsten Rebkrankheiten in Europa (JOHANNESSEN *et al.*, 2007).

- Die Phytoplasmen der heterogenen Aster Yellows (AY)-Gruppe wurden in Rebstöcken aus Italien (ALMA *et al.*, 1996) und Nordamerika (DAVIS *et al.*, 1998) detektiert.

Einleitung

- In Israel, Italien und Virginia (USA) konnten auch Phytoplasmen aus der X-disease-Gruppe nachgewiesen werden (DAIRE *et al.*, 1993; PRINCE *et al.*, 1993; MARCONE *et al.*, 1996).

1.3.2 Entstehung und Epidemiologie der Phytoplasmosen

Wirtspflanzen können auf drei unterschiedlichen und nachgewiesenen Wegen durch Phytoplasmen infiziert werden. Zum einen kann eine Verbreitung durch eine vegetative Fortpflanzung bzw. durch Pfropfung geschehen. Eine zweite Möglichkeit besteht in der Transmission durch parasitäre Pflanzen, wie sie beispielsweise bei *Cuscuta spp.* beobachtet werden kann. Diese Pflanzenart wird daher auch als experimentelle Wirtspflanze in Testverfahren verwendet. Der Übertragungsweg über einen Vektor ist die dritte Möglichkeit einer Infektion (WEINTRAUB & BEANLAND, 2006).

Induktion der Symptome

Phytoplasmen kommen als obligate zellparasitäre Pathogene hauptsächlich in den Siebröhren des pflanzlichen Phloems vor und sind nur ausnahmsweise wie bei der Schmarotzerpflanze *Cuscuta adorata* im Parenchym (COUSIN *et al.*, 1970; SILLER *et al.*, 1987) oder in den Geleitzellen (LOMBARDO *et al.*, 1970) aufzuspüren. In den Siebröhren sind sie vor allem auf der dem Assimilatstrom zugewandten Seite anzutreffen (HIRUMI & MARAMOROSCH, 1972; CREDI, 1994; SCHLAG & GAL, 1996). Ein Durchtritt durch die Siebporen, die oftmals durch Kalloseanlagerungen verkleinert sind, ist nur durch eine Gestaltveränderung möglich, so dass sich dort Pathogene anhäufen und den Assimilatstrom behindern bzw. gänzlich unterbrechen können (Carle, 1965). Diesen Störungen sind für die sichtbare Bildung der sogenannten Leitsymptome verantwortlich. Sie äußern sich in Blattvergilbungen, Wuchsanomalien, Störungen in der Fruchtreifung, Blütenverkleinerungen bzw. Blütenvergrünungen und Winterhärtungen, wie sie beispielsweise bei der Schwarzholzkrankheit durch Schwarzfärbung befallener Triebe aufgrund der ausbleibenden Verholzung auftreten. Diese Leitsymptome treten nicht in ihrer Gesamtheit auf, sondern in Kombination, die jeweilig vom Pathogen und der betroffenen Pflanze abhängig ist (McCOY *et al.*, 1989; MARWITZ, 1990; KUNZE, 1979). Der Stau der Assimilate bewirkt darüber hinaus nicht nur einen Versorgungsrückgang der darüber liegenden Pflanzenteile, sondern aufgrund der auftretenden Schäden auch eine Mangelernährung auf der Sinkseite (KARATTE, 1989). Die beobachtbaren Symptome ähneln jenen, die bei einer künstlichen Unterbrechung des Leitbündelsystems von ge-

Einleitung

sunden Pflanzen auftreten können,⁶ so dass die hauptsächliche Auswirkung des Pathogens sich tatsächlich aus seiner Akkumulation an den Siebporen herleitet.

Darüber hinaus werden von GABRIDGE *et al.* (1985) auch schädigende Einflüsse einer Toxinwirkung vermutet, die direkt auf das Pathogen zurückzuführen seien. SAMADDAR *et al.* (1996) vermuten darüber hinaus auch zusätzliche Störungen im Proteinhaushalt und im Chlorophyllgehalt der Blätter.

Übertragung von Phytoplasmen

Insekten

Für die Verbreitung der Phytoplasmosen bilden die Insekten den wichtigsten Faktor. Es handelt sich dabei phloemsaugende Arten aus der Ordnung der *Homoptera* (TSAI, 1979). Den Schwerpunkt als Vektor bilden dabei die *Zikaden* (Auchenorrhyncha). Dabei werden mehr als 75 Prozent der Vektoren der Unterfamilie Deltocephalinae zugeordnet (WEINTRAUB & BEANLAND, 2006). *Psylliden* (Stenorrhyncha) nehmen als Vektoren eine nur untergeordnete Rolle ein. Für andere Insektengruppen konnten bisher keine gesicherten Nachweise einer Übertragung erbracht werden. Bei dieser Übertragung handelt es sich um einen hochspezifischen Vorgang, der vor allem solche Pflanzen betrifft, die Vektoren als Hauptnahrungsquelle dienen.⁷ Beim Saugvorgang werden von einer infizierten Pflanze Phytoplasmen aufgenommen, die die Darmwand des Insekts durchdringen und in die Leibeshöhle einwandern können, wo sie sich bereits vermehren können (Akquisitionsphase).⁸ Mit dem Hämolympfstrom werden die Pathogene im gesamten Körper verteilt und gelangen in die sekretorischen Zellen der Speicheldrüsen, in denen sie sich wesentlich stärker vermehren können (Latenzphase). Sobald ein bestimmter Titer erreicht wird, können sie mit dem Speichel sezerniert und durch den Saugakt in die Pflanze übertragen werden (SINHA, 1984; TSAI, 1979). Damit gleicht dieser Zyklus jenem, der von THOTTAPPILLY *et al.* (1990) auch für die Übertragung pflanzenpathogener Viren beschrieben wurde. Eine transovariolen Akquisition vom Muttertier auf die Nachkommen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (PURCELL, 1990).

Pflanzen

⁶ Vom Autor selbst wurden Symptome wie sie der Vergilbungskrankheit (VK) offenbart an gesunden Riesling-Stöcken beobachtet durch ein Abknicken der Zweige über die Drahtanlage beobachtet.

⁷ Pflanzen, die den Vektoren nicht als Nahrungsquelle dienen, werden i.d.R. zwar nur gelegentlich durch einen Probesaugakt infiziert. Trotzdem können, wie der Autor diesen Aspekt für die Schwarzholzkrankheit zeigen wird, große Verseuchungen in der Gruppe dieser Pflanzen entstehen.

⁸ Nach PURCELL (1990) lässt sich die Transmission in die Akquisitions-, Latenz- und Inokulationsphase einteilen. Als Akquisitionsphase wird der Zeitabschnitt verstanden, in der ein nicht infizierter Vektor infektiös wird.

Einleitung

Eine vertikale Übertragung des Pathogens auf den Samen findet nicht statt (ESAU, 1969). In Laborversuchen wurde allerdings für *Cuscuta* L. (Cuscutaceae) eine Übertragung auf andere Pflanzen nachgewiesen. Diese Pflanze wird im Rahmen von Übertragungsversuchen zur Erhaltung des Erregers verwendet, indem sie eine Brücke zwischen der kranken und einer gesunden Pflanze bildet und das Pathogen damit auch die gesunde Pflanze erreicht. Die Phytoplasmen können Wirtspflanzen schon durch eine einmalige Inokulation dauerhaft und systemisch infizieren („One-hit-diseases“; VAN DER PLANK, 1975). An zwei Wirtspflanzen konnte der Verlauf einer Infektion systematisch untersucht werden. Es zeigte sich, dass das hauptsächliche Vermehrungszentrum der Phytoplasmen nicht der Ort der Inokulation ist, sondern im Bereich der Wurzel liegt (LHERMINIER *et al.*, 1994; KUSKE & KIRKPATRICK, 1992)

1.3.3 Nachweisverfahren von Phytoplasmen durch Anwendung der PCR

Seitdem erstmalig Bakterien als Auslöser der Krankheit erkannt wurden, wurden verschiedene Techniken zum Nachweis des Pathogens in Pflanzen- und Tiermaterial angewendet:⁹ Die PCR stellt dabei das Nachweisverfahren mit der höchsten Sensibilität dar (MAIXNER *et al.*, 1997). Diese Methode mit dem größten Multiplikationsfaktor entwickelte sich zum wichtigsten Nachweisverfahren bezüglich der Detektion des Pathogens und seiner Klassifizierung. Dabei liegt die Zielsequenz der Primerpaare entweder ausschließlich im Bereich der 16S rDNA (MAIXNER *et al.*, 1995) oder aber der Reverse-Primer besitzt seine Zielsequenz in der Spacer-Region zwischen der 16S und 23S (SMART *et al.*, 1996). MAIXNER *et al.* (1995) konnten zudem zeigen, dass Primer mit einer Zielsequenz in anderen Regionen der DNA ebenfalls zum Nachweis der Phytoplasmen geeignet sind. Eine Steigerung erfährt diese Nachweismethode durch Anwendung der „Nested-PCR“, indem eine zweite PCR angeschlossen wird, die auf dem Ausgangsprodukt der ersten PCR basiert. Dieser immense Verstärkungsfaktor kann einen Nachweis in solchen Fällen bringen, in denen zunächst kein Nachweis sichtbar war (ALMA *et al.*, 1996). In einer grundlegenden Untersuchung konnte REINERT (1999) zeigen, dass sowohl breit detektierende Primer (z.B. P1/P7) als auch gruppenspezifischer Primer (z.B. fSTOL/rSTOL (Stolbur-Gruppe), fAY/rEY (EY-Gruppe)) eine hervorragende Grundlage zum Nachweis des Pathogens bilden können. Darüber hinaus können anhand der PCR-

⁹ Andere Nachweisverfahren sind beispielsweise die Transmissionselektronenmikroskopie. Sie bietet die Möglichkeit, Phytoplasmen in Siebröhren infizierter Reben aufzuspüren (CREDI, 1994) und visuell darzustellen. Der Nachteil ist die fehlende Möglichkeit einer Klassifizierung des Pathogens. Das ELISA-Testverfahren auf der Basis monoklonaler Antikörper (CAUDWELL & KUSZALA, 1992) ist eine weitere Möglichkeit, doch besitzt sie mangelnde Zuverlässigkeit für den Nachweis von Phytoplasmen in Material, das von Rebstöcken stammt (MAIXNER *et al.*, 1997). Auch in Zikaden war die Detektionsrate gegenüber der PCR wesentlich geringer: Nur etwa 60% der durch die PCR positiv getesteten Tierproben konnten mittels der ELISA verifiziert werden (WEBER & MAIXNER, 1998). DAIRE *et al.* (1992) konnten zeigen, dass auch eine DNA-DNA-Hybridisierungstechnik die Möglichkeit bietet, Phytoplasmen nachzuweisen.

Einleitung

Ergebnisse gezielte RFLP-Analysen zur genauen Klassifizierung des Pathogens angeschlossen werden. Gerade aufgrund sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe ist die PCR die beste Methode, Phytoplasmen in Pflanzenmaterialien detektieren zu können, obwohl auch sie durch Pflanzeninhaltsstoffe gehemmt werden kann (DEMEKE & ADAMS, 1992). Allerdings zeigte die PCR bei REINERT (1999) ihre Grenzen auch dort, wo eine nicht genügende Ausgangsmenge an Phytoplasmen-DNA gewonnen werden konnte, selbst wenn die Symptomatik eindeutig auf eine Phytoplasmaose hinwies.

1.4 VEKTOREN VON PHYTOPLASMEN

Vektoren, in ihrer Mehrheit Arthropoden, spielen bei der Verbreitung von Pflanzenkrankheiten, unabhängig davon, ob es sich um Viren- oder Bakterienerkrankungen handelt, eine herausragende Rolle, wobei allerdings auch beachtet werden muss, dass der Hauptanteil der Prokaryonten keinen aktiven Vektor benötigt. Die größte Zahl von Vektoren findet man unter den Insekten, wobei die Ordnung der Homoptera die bedeutsamste und zahlenmäßig stärkste Gruppe darstellt. In einer Übersicht stellte HARRIS (1980) fest, dass vor allem Cicadellidae mit bis dahin etwa 130 bekannten Vektorarten den Hauptanteil von Überträgern der Auchenorrhyncha bilden, während der Anteil bei den Delphacidae mit ca. 21 Vektorarten wesentlich geringer ausfiel. Diese Anzahl dürfte sich angesichts der Tatsache, dass zunehmend Phytoplasmosen in den Blickpunkt der Forschung gelangen, noch wesentlich erhöhen.

Vektorspezifität als zentrales Paradigma

Es handelt sich vor allem um Pathogene aus der Klasse der Mollicutes, für die ein Überträger obligatorisch scheint und das Verhältnis zwischen Pathogen und seinem Vektor ein entscheidendes Kriterium der Virulenz darstellt. Darüber hinaus ist dieses Verhältnis oft der einzige Faktor, das Pathogen, vor allem solche, die nicht *in vitro* zu kultivieren sind, zu charakterisieren. Selbst bei kultivierbaren Mollicutes wie beispielsweise *Spiroplasma citri*, den Erreger der *corn stunt disease*, bleibt der Überträger zur Charakterisierung unausweichlich, da kultivierte Pathogene oftmals ihre Vektor-Übertragbarkeit verlieren (PURCELL, 1982). Die Spezifität des Pathogens bedingt, dass nur ein Vektor, höchstens aber nur einige wenige Überträger für ein solches Pathogen geeignet sind. Nach PURCELL (1990) stellt das Faktum der Vektorspezifität ein zentrales Paradigma dar. Eine Folge dieser Spezifizierung zeigt sich dabei in der Transmissionsrate verschiedener Vektorenarten. Während in einem Laborexperiment eine 50%ige Transmission schon 33 Tage nach der Akquisition bei der *Aster Yellow*s-Erkrankung auftrat, wurde diese Rate bei der *X-disease*-Krankheit erst nach etwa

Einleitung

51 Tagen erreicht (PURCELL, 1990). Im Gegensatz dazu ist diese Spezifität nicht unbedingt bei den Vektoren gegeben. Untersuchungen zeigten, dass ein Vektor sogar unterschiedliche Pathogene wie Viren und Mycoplasmen gleichzeitig übertragen kann (SYLVESTER, 1985).

1.4.1 Scaphoideus titanus Ball

Scaphoideus titanus ist als Vektor der Flavescence dorée der gegenwärtig erfolgreichste natürliche Überträger von Phytoplasmen von Weinreben und wurde erstmalig 1960 in Südfrankreich (BONFILS & SCHVESTER, 1960) nachgewiesen. VIDANO (1964) konnte diesen Vektor anschließend auch für Italien nachweisen und entdeckte, dass dessen gesamter Lebenszyklus vom Ei bis zum adulten Tier eng mit der Weinrebe verbunden ist. ALMA *et al.* (1997) konnte für Tiere, die an infizierten Pflanzen aufgezogen wurden, mittels der PCR-Analyse für alle Stadien im Lebenszyklus des Insekts Phytoplasmen nachweisen, wobei mit 65 % die höchste Durchseuchungsrate bei Imagines festgestellt werden konnte, während der Nachweis von Phytoplasmen in Eiern bei lediglich 9 Prozent lag. Mit fortschreitendem Larvenstadium erhöhte sich gleichzeitig auch die Durchseuchungsrate. Mit diesem Vektor verbreitete sich die FD als wichtigstem Phytoplasma der EY-Gruppe vor allem im Süden Frankreichs, Korsika, Norditalien und Nordspanien, wobei eine Wanderungsbewegung in nördlicher Richtung detektiert werden konnte (BOUDON-PADIEU, 1999), so dass ein erstes Auftreten der Krankheit auch in der Bourgogne und in der Champagne detektiert werden konnte. Ein Auftreten des Vektors in den elsässischen und lothringischen Weinanbaugebieten konnte allerdings wider den Erwartungen bisher noch nicht beobachtet werden (ENTAV, 2006), so dass eine unmittelbare Gefährdung angrenzender deutscher Weinanbaugebiete noch nicht besteht. Im Jahre 2006 wurde in insgesamt 58 französischen Kommunen eine Bekämpfung mittels Insektiziden angeordnet (ENTAV, 2006). Mittlerweile konnte diese Rebzikade, und mit ihr gleichfalls verbunden auch die FD, in der Schweiz festgestellt werden (AGES, 2006). In Österreich konnten dagegen zwar die Vektoren, bisher aber noch keine symptomtragenden Rebstöcke festgestellt werden. Die Ausbreitungsbewegung von *S. titanus* erreichte mittlerweile auch weitere europäische Länder. Im Jahr 2001 berichtete bereits QUATAU *et al.* (zitiert in MAIXNER, 2006) vom Auftreten des Vektors in Portugal. LESSIO *et al.* berichteten 2004 (zitiert in MAIXNER, 2006) von Nachweisen in Serbien und Kroatien und im Jahr 2006 konnte SELJAK (zitiert in MAIXNER, 2006) den Vektor auch in Slowenien nachweisen. Das bisherige Auftreten der FD bleibt dabei ausschließlich mit dem Vektor *S. titanus* verbunden (BOUDON-PADIEU, 2003).

Einleitung

1.4.2 *Oncopsis alni* Schrank

O. alni ist der bisher einzig bekannte Vektor von PGY (*Palatinate grapevine yellows*)-Phytoplasmen in Deutschland, die als Erreger mit der, vor allem unter der älteren Bezeichnung *FD-Pfalz* bekannten Rebphytoplasma assoziiert sind. Der auch unter der Bezeichnung *alder yellows phytoplasma* bekannte Erreger wurde in Deutschland erstmalig in der Schwarzerle *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. nachgewiesen (MAIXNER et al., 1995) und tritt in der Rheinpfalz, in Rheinhessen und an der Mosel auf. Die mit der Krankheit assoziierten Phytoplasmen gehören wie die in Frankreich vorkommende FD der Elm-Yellows-Gruppe an. Der Vektor *O. alni* ist eine auf *A. glutinosa* monophag lebende Zikade und tritt nur dann als Überträger der PGY auf Rebstöcke in Erscheinung, wenn Schwarzerlenbestände in der Nähe zu Rebflächen liegen. In Deutschland tritt die FD-Pfalz in ihrer Bedeutung für den Weinbau aber gegenüber der Schwarzholzkrankheit weitgehend in den Hintergrund und ist von nur geringer wirtschaftlicher Bedeutung. In Deutschland wurde *O. alni* als bisher einziger Vektor dieser Erreger identifiziert, in dem nicht nur das Pathogen nachgewiesen werden konnte, sondern der auch fähig war, diesen zu übertragen (MAIXNER & REINERT, 1999).

1.4.3 *Hyalesthes obsoletus* Signoret

In dieser Untersuchung ist diese Zikadenart ein zentraler Bestandteil der Untersuchungen. Im Jahre 1994 konnte MAIXNER anhand von Übertragungsversuchen¹⁰ im Labor zeigen, dass die Glasflügelzikade *H. obsoletus*, den Erreger der VK und der BN tatsächlich auf Weinreben übertragen kann. Bisher war lediglich eine Übertragung von Phytoplasmen des Stolburtyps auf Nachtschattengewächse bekannt. BLATTNY et al. (1954) erkannte die Bedeutung dieser Zikade als Vektor der Stolburerkrankung an Solanaceae wie z. B. Tomaten und Kartoffeln in Süd- und Südosteuropa, welche zu beträchtlichen wirtschaftlichen Einbußen führte. *H. obsoletus* ist mittlerweile eine in deutschen Weinanbaugebieten als auch in denen der europäischen Nachbarländern weit verbreitete polyphage und xerotherme Zikadenart, die hauptsächlich die Ackerwinde (*Convolvulus arvensis* L.) als Hauptnährpflanze nutzt (ALMA et al. (1988); MAIXNER et al. (1995); SFORZA et al (1998)). Im Rahmen dieses Forschungsprojektes konnte erstmalig in Deutschland auch eine sehr große Po-

¹⁰ Als Übertragungs- bzw. Transmissionsversuche werden solche Tests bezeichnet, bei denen experimentell untersucht wird, ob ein infizierter Organismus den Erreger auf einen gesunden Organismus übertragen kann. Zur Untersuchung dieser Vektoreigenschaften werden die zu untersuchenden Tiere entweder im Labor in Aufzuchtgefäßen auf ihren infizierten Nahrungspflanzen gehalten oder direkt von symptomtragenden Nahrungspflanzen im Freiland abgesammelt und danach auf die gesunde Zielpflanze übersetzt. Im Anschluss daran kann der Nachweis einer erfolgreichen Übertragung entweder visuell erfolgen, indem das Auftreten einer spezifischen Symptomatik beobachtet wird. Eine zusätzliche gesicherte Aussage kann aber vor allem durch den PCR-Nachweis erbracht werden.

Einleitung

pulation an *Urtica dioica* detektiert werden. Mittlerweile gilt nicht nur *U. dioica*, sondern auch *Calystegia sepium* als Hauptnährpflanze (LANGER, M. & MAIXNER, M., 2004).

In Deutschland berichtete schon HAUPT (1935) von Fundstätten in Halle und Freiburg. 1939 berichtete WAGNER (zitiert in SERGEL, 1986) von einem Fund dieser Art im Rheinland. In Frankreich konnte ein zahlreiches Vorkommen auch an *Lavendula angustifolia* Mill, *Lavendula hybrida* Reverchon und *Cardaria draba* L. beobachtet werden (SFORZA, 1999). Als natürliches Reservoir des Stolbur-Agens gilt dabei vor allem *C. arvensis*. Da der gesamte univoltine Entwicklungszyklus an den Nahrungspflanzen beginnt, erfolgt die Infektion der Tiere bereits im Larvenstadium. Die Imagines erscheinen im Juni, wobei ein Teil der Populationen auch auf andere Nährpflanzen abwandern und sich gleichzeitig mit dieser Migration auch die Krankheit verbreiten kann. Diese Migrationen der adulten Tiere scheinen dann zu unterbleiben, wenn kühlere Sommermonate die Wasserversorgung der Ackerwinde nicht stark einschränken, so dass ihr Wachstum nicht behindert wird und ihre Triebe saftführend bleiben (HOCH & REMANE, 1985). SFORZA *et al.* (1999) untersuchten den Lebenszyklus von *H. obsoletus* in ausgedehnten Labor- und Feldstudien. Sie stellten wie auch bei allen untersuchten Cixiidae-Arten fest, dass adulte Weibchen ihre Eier in den Boden in direkter Nähe der Basis ihrer Nährpflanzen ablegen, so dass die geschlüpften Larven direkt die Wurzeln dieser Pflanzen besaugen können. Dabei konnten Larvenvorkommen bis zu einer Bodentiefe von 20cm beobachtet werden. Die Aufenthaltstiefe scheint sowohl von der Jahreszeit als auch von den klimatischen Bedingungen abhängig zu sein. Am tiefsten wurden Larven des zweiten und dritten Larvenstadiums in der Überwinterungsphase zwischen November und dem März des darauffolgenden Jahres gefunden. Zwischen Mai und Juni traten dann nur noch Larven des vierten und fünften Stadiums auf. Die Anzahl der Eier, die von den weiblichen Imagines abgelegt werden, ist außerdem stark höhenabhängig. Während in einer Höhenlage von etwa 300m durchschnittlich 50,6 (+/-17) Eier abgelegt wurden, verringerte sich die Anzahl bei etwa 900m schon auf 22,8 (+/- 6,2) Eier pro Gelege. In Laborversuchen konnte zudem festgestellt werden, dass die Larven von *H. obsoletus* auch Perioden mit niedrigen Temperaturen so gut überstehen können, dass Tiere im 3. Larvenstadium sogar einen dreitägigen Aufenthalt bei 4°C im Kühlschrank überlebten (SFORZA *et al.*, 1999).

Als *H. obsoletus* in den deutschen Weinbergen nachgewiesen werden konnte (vgl. MAIXNER, 1994), erkannte man in ihm den herausragenden Vektor der Schwarzholzkrankheit in Deutschland. Die Hauptverbreitungsgebiete der Schwarzholzkrankheit als bedeutsamste Rebphytoplasnose sind vor allem in den warmen Steilhängen des Mittelrheins und der Mittelmosel zu finden. Gleichfalls wurde auch in Frankreich *H. obsoletus* als der herausragende Vektor der BN identifiziert (SFORZA *et al.*, 1995 & 1998).

Einleitung

Der Name *Hyalesthes* wurde bereits 1847 von AMYOT für ein Cixiiden-Taxon in Artrang (Frankreich) vergeben und später von SIGNORET (1865) zum Gattungsnamen erhoben worden (HOCH & REMANE, 1985). Die von diesen Autoren im Rahmen von Untersuchungen zur Taxonomie und Verbreitung erzielten Ergebnisse ergaben, dass gerade *H. obsoletus* als Kulturfolger ein Verbreitungsgebiet aufweist, dass sich im Norden von der Mainlinie in Deutschland bis nach Süd-Marokko im Süden und von der iberischen Halbinsel im Westen bis nach Kirghistan¹¹ im Osten erstreckt. Im Iran konnte *H. obsoletus* sogar bis in eine Höhe von 3000-4000m angetroffen werden, sofern allerdings die Sichtungen tatsächlich dieses Taxon betreffen. Während dieser Untersuchungen konnte diese Zikade auch auf diversen Laubholzarten und steppenheideartigen Kalkkarstfluren abgesammelt werden. Es zeigte sich zudem, dass das Gesamtverbreitungsgebiet der Gattung *Hyalesthes* zwei Zentren höchster Artendichte aufweist, nämlich die mittelatlantischen Inseln (Kanaren und Madeira) mit 7 Arten und der ostmediterrane Raum (Anatolien (Türkei) und Irak) mit zehn Arten. Das rezente Verbreitungsgebilde der zur *H. obsoletus*-Gruppe¹² gehörenden sechs Taxa¹³ kann allerdings nur gedeutet werden. HOCH und REMANE favorisieren dabei eine Einwanderungsbewegung von *H. obsoletus* aus östlicher Richtung in das heutige Verbreitungsgebiet, in dem sich die anderen fünf Taxa bereits zu selbständigen Arten differenziert hatten. Ein Kennzeichen dafür könnte die Feststellung sein, dass die übrigen fünf Taxa untereinander weitgehend allopatrisch verbreitet sind, während sie gemeinsam mit *H. obsoletus* eine eher sympatrische Verbreitung aufweisen (HOCH & REMANE, 1985).

JOHANNESSEN *et al.* (2008) untersuchten Proben des Vektors aus Deutschland, Spanien, Italien, Slowenien, Österreich und Ungarn. Sie stellten eine circum-alpine Verbreitung zweier europäischer Hauptgruppen (West-Südeuropa und Ungarn) mit weiteren Aufsplitterungen fest, die sich aber geschlossen von einer dritten, biogeographisch weiter entfernten Gruppe in Israel durch herausgefundene Mutationen am stärksten unterscheiden. Die genetisch geschlossenste Gruppe zeigten dabei Vektoren aus Deutschland.

¹¹ Unsicherheiten bestehen hinsichtlich des Verlaufs der östlichen Arealgrenze, da Meldungen aus Afghanistan, Iran bzw. Kirghistan sich eventuell auch auf andere Taxa beziehen könnten (HOCH & REMANE, 1895).

¹² Nach dem aktualisierten taxonomischen Stand der Gattung *Hyalesthes* Sign., 1865 ergeben sich insgesamt 6 Gruppen (HOCH & REMANE, 1985):

1. *Hyalesthes obsoletus* Sign.-Gruppe mit 6 Arten
2. *Hyalesthes productus* Leth.-Gruppe mit 5 Arten
3. *Hyalesthes mlokosiewiczzi* Sign.-Gruppe mit 2 Arten
4. *Hyalesthes luteipes* Fieb.-Gruppe mit 6 Arten
5. *Hyalesthes angustulus* Horv.-Gruppe mit 5 Arten
6. Differente Gruppe mit 4 nicht eindeutig zuzuordnenden *Hyalesthes*-Arten

¹³ Zur *Hyalesthes obsoletus* Sign.-Gruppe gehören *H. obsoletus* Signoret, *H. flavovarius* Kusnezov, *H. lacotei* Dlabola, *H. thracicus* Hoch, *H. yozgaticus* Hoch und *H. hani* Hoch.

Einleitung

1.4.4 Andere Zikadenarten

Im Zusammenhang mit dem Auftreten und der Verbreitung von Phytoplasmaerkrankungen der Weinrebe geraten auch andere Zikadenarten in den Blickpunkt von Untersuchungen als potentielle Vektoren. Es handelt sich dabei vor allem um solche Arten, die häufig auf Rebflächen und in den angrenzenden Flächen angetroffen werden können. Die größte Zahl der in den Weinbergen gefundenen Arten stammt dabei aus den beiden Unterordnungen Fulgoromorpha und Cicadomorpha¹⁴. So konnten in Frankreich SFORZA *et al.* (1995 & 1998) bei einzelnen Individuen von *Euscelis lineolatus* (Cicadellidae) das Stolbur-Phytoplasma nachweisen. In Israel konnten TANNE *et al.* (2001) nicht nur bei *H. obsoletus*, sondern auch bei den Zikadenarten *Neoliturus spp.*, *Circulifer sp.*, *Macrosteles quadripunctatus* und *Oncopsis orientalis* (= *O. albicinctus*) anhand von PCR-Analysen eine Infizierung durch Phytoplasmen nachweisen. Nachweise einer Infektion mit dem Stolbur-Phytoplasma erbrachten GARAU *et al.* (2004; zitiert in Maixner, 2006) für *Goniagnathus guttulinervis* auf Sardinien und PALERMO *et al.* (2004; zitiert in Maixner, 2006) für *Reptalus panzeri* in Ungarn bzw. BOTTI *et al.* (2005; zitiert in Maixner, 2006) für Italien.

Untersuchungen nach alternativen Vektoren sind vor allem dann erforderlich, wo *H. obsoletus* nicht mit dem Auftreten der Schwarzholzkrankheit korreliert erscheint. Dies gilt bisher für einige Regionen Spaniens (SABATÉ *et al.*, 2003; zitiert in MAIXNER, 2006) und Österreichs (RIEDLEBAUER *et al.*, 2006; zitiert in MAIXNER, 2006).

1.5 RÜCKSCHAU: CHRONOLOGISCHER ÜBERBLICK BEDEUTSAMER EREIGNISSE

Seitdem im 19. Jahrhundert Pilze und tierische Schadorganismen durch Verschleppung aus Nordamerika die europäischen Weinanbaugebiete befallen haben, ist die Europäerrebe *Vitis vinifera* L. fortlaufend in ihrem Bestand durch Einwanderung gebietsfremder Arten bedroht. Oftmals erfolgte diese Einwanderung durch Verschleppung der Schadorganismen aus ihren ursprünglichen Lebensräumen. Die Einschleppung des Echten Mehltaus *Uncinula necator* hatte enorme Verluste in den französischen Anbaugebieten zur Folge¹⁵. Auch die um 1864 erfolgte Einschleppung der Reblaus *Dactylosphaera vitifolii* nach Frankreich zerstörte riesige Anbauareale (STELLWAAG, 1928). In Deutschland wurden daraufhin erstmalig phytosanitäre Regelungen getroffen. Ein weiterer bedeutender Schädling ist der Falsche Mehltau *Plasmopara viticola*, der 1878 ebenfalls nach Europa ein-

¹⁴ Vektoren von Phytoplasmen findet man hauptsächlich bei den Cicadomorpha und Fulgoromorpha (Hemiptera) sowie bei den Psyllidae (Stenorrhyncha)

¹⁵ Durch die Verbreitung von *U. necator* sank die französische Weinproduktion von ehemals 45 Mio. hl auf etwa 10000 hl (STELLWAAG, 1928).

Einleitung

geschleppt wurde (Müller, 1925) und sich zu einem noch heute bedrohlichen Schädling entwickelte. Auch die Schwarzfäule, die durch den Pilz *Guignardia bidwellii* hervorgerufen wird, hat seinen Ursprung in Nordamerika und wurde im 19. Jahrhundert nach Europa eingeschleppt. Sein Hauptverbreitungsgebiet waren in der Vergangenheit vor allem die französischen, italienischen und schweizerischen Anbauregionen. Eine großflächige Ausbreitung in Deutschland wurde erstmalig in den feuchtwarmen Jahren 2002 und 2003 beobachtet.

Die Ausbreitung der Favescence dorée in Europa und die Etablierung der Schwarzholzkrankheit in Deutschland gehören als gegenwärtig letztes Glied zu diesen bedeutsamen Ereignissen aus phytosanitärer Sicht und machen daher Bekämpfungsmaßnahmen zwingend erforderlich.

1.6 AUSGANGSPUNKT UND ZIELSETZUNG

Das vorliegende Forschungsvorhaben wurde 1999-2001 durchgeführt. Der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Schwarzholzkrankheit. Das Ziel der Untersuchungen war:

- Feststellung der Befallssituation in den deutschen Weinanbaugebieten
- Nachweis von Phytoplasmen in Zikaden, Weinreben, Nahrungs- und Wirtspflanzen
- Feststellung des Durchseuchungsgrades verschiedener Populationen von *H. obsoletus*
- Untersuchungen zur Biologie von *H. obsoletus*: Flugphase - Populationsentwicklung – Nahrungspflanzen - Migration
- Untersuchung anderer Zikadenarten im Hinblick auf mögliche Vektoreigenschaften
- Entwicklung geeigneter Gegenmaßnahmen zur Verminderung des Gefahrenpotentials

1.6.1 Feststellung der Befallssituation in den deutschen Weinanbaugebieten

Zur Feststellung der Befallssituation wurden an ausgewählten Untersuchungsstandorten in den Weinanbaugebieten *Mosel Saar Ruwer, Mittelrhein, Pfalz* und *Nahe*, in denen in der Vergangenheit der Schwerpunkt in der Verbreitung der Schwarzholzkrankheit lag, jährliche Bonituren ausgeführt. Aufgrund des sehr geringen Auftretens der Schwarzholzkrankheit in den Weinanbaugebieten *Baden* und *Hessische Bergstraße* wurden dortige Untersuchungsflächen nur in einem sehr geringen Umfang in die jährliche Untersuchung miteinbezogen. Die Ergebnisse sollten einerseits dazu dienen, das Ausmaß der Schäden durch Bildung eines räumlichen Befallsgradienten zu protokollieren und andererseits den Krankheitsverlauf lückenlos dokumentieren zu können.

Einleitung

1.6.2 Nachweis von Phytoplasmen in Zikaden, Weinreben, Nahrungs- und Wirtspflanzen

Als sensibelste Methode zum Nachweis des Erregers wurde die PCR als Standardmittel verwendet. Sie erlaubt durch eine *in vitro*-Amplifikation von Pathogen-DNA nicht nur den eigentlichen Nachweis eines Erregers, sondern kann auch zur Differenzierung verschiedener Phytoplasmenisolate eingesetzt werden und diene damit gleichzeitig auch zur weiteren Aufklärung der Epidemiologie rebsubpathogener Phytoplasmen in den deutschen Weinanbaugebieten. Besonders solche Zikadenarten waren Gegenstand der Untersuchungen, die neben den schon bekannten Vektoren *H. obsoletus* und *O. alni* häufig in befallenen Weinbergsarealen anzutreffen sind und damit auch als mögliche Überträger in Betracht gezogen werden können. Die Tiere wurden während ihres Auftretens entweder mit dem Streifnetz von ihren jeweiligen Nahrungs- und Wirtspflanzen abgesammelt oder von den auf den Untersuchungsflächen ausgebrachten Klebefallen entnommen. Aufgrund der Tatsache, dass man keinen Unterschied im Aussehen und Verhalten zwischen gesunden und infizierten Tieren erkennen kann, ist eine optische Beurteilung nicht möglich. Daher wurde bei Tierproben die PCR als Standardnachweisverfahren für Phytoplasmen verwendet.

Bei infizierten Rebstöcken sind im Gegensatz dazu die optisch wahrnehmbaren Veränderungen wie Blattverfärbungen und Wuchsstörungen ausreichend genug, um sie als infiziert klassifizieren zu können. Daher kann die PCR zur Überprüfung einer Infektion in weitaus geringerem Maße als beim Nachweis infizierter Tiere eingesetzt werden. Ihr regelmäßiger Einsatz erfolgte vor allem zur Absicherung der Befunde.

Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen lag vor allem auf der mit der Schwarzholzkrankheit assoziierten Zikade *H. obsoletus*. Damit lag auch das Spektrum ihrer Nahrungs- und Wirtspflanzen im Mittelpunkt der Untersuchungen mit dem Ziel, mögliche Infektionsquellen auf den Flächen ausfindig zu machen und gleichzeitig auch eine Aufklärung darüber zu erhalten, ob durch einen Wechsel im Nahrungsspektrum der Zikaden Auswirkungen auf die Tiere selbst beobachtet werden können und damit eine Wirtsspezifikation der Populationen an den verschiedenen Standorten vorliegt. Der Hauptgrund dieser Tests war die bereits bekannte Tatsache, dass regional entfernte Populationen von *H. obsoletus* entweder die Ackerwinde *C. arvensis*, die Große Brennessel *U. dioica* oder den Kriechenden Hahnenfuß *R. arvensis* hauptsächlich als Wirtspflanze nutzen. Dafür wurden lebend gefangene Tiere verschiedener Populationen in Haltungsversuchen auf unterschiedliche Wirts- und Nahrungspflanzen gesetzt um damit mögliche Auswirkungen trophischer Faktoren auf die Überlebensfähigkeit der Tiere zu testen. Die Untersuchungen zum Wirtsspektrum der Tiere sollten darüber hinaus einen Beitrag dazu leisten, Risiken bei geplanten Begrünungsversuchen offe-

Einleitung

ner Flächen als eine mögliche Bekämpfungsstrategie dadurch auszuschließen, dass keine möglichen Wirtspflanzen mit ausgebracht werden.

1.6.3 Feststellung des Durchseuchungsgrades verschiedener Populationen von *Hyalesthes obsoletus*

Die Feststellung des Durchseuchungsgrades unterschiedlicher Populationen von *H. obsoletus* wurde mit dem Ziel einer großangelegten Übersicht über das Infektionspotential an verschiedenen Standorten durchgeführt und stellte damit einen Schwerpunkt des Forschungsvorhabens dar. Im Rahmen dieser Untersuchung sollte offenbart werden, an welchen Standorten überhaupt infizierte Populationen vorkommen, in welcher Stärke diese auftreten, wie sich der Infektionsgrad innerhalb des Forschungszeitraumes entwickelt und ob ein direkter Zusammenhang besteht zwischen stark von der Schwarzholzkrankheit betroffenen Ertragsreblflächen und dem Durchseuchungsgrad innerhalb der dort vorkommenden Populationen. Ein weiterer wichtiger Aspekt war, Aufklärung darüber zu erhalten, ob geschlechtsspezifische Faktoren bei der Weitergabe der Infektion eine Rolle spielen können. Zu diesem Zweck wurden alle Ergebnisse der PCR-Tests geschlechtsspezifisch ausgewertet. Für diese Untersuchungen kamen hauptsächlich Populationen mit einer hohen Individuenzahl in Betracht.

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte auch herausgefunden werden, ob Begrünungsversuche einen Einfluss auf den Infektionsverlauf einer Population und damit auf den Infektionsdruck innerhalb des Forschungszeitraumes nehmen können, indem mit der Reduktion der Anzahl infizierter Wirtspflanzen als Infektionsquellen auch der Infektionsdruck auf benachbarte Flächen abnimmt.

1.6.4 Untersuchungen zur Biologie von *Hyalesthes obsoletus*

Der zweite Schwerpunkt dieses Forschungsvorhabens ist die genaue Erfassung der Flugphase von *H. obsoletus*, die Stärke der unterschiedlichen Populationen, das Spektrum seiner Wirts- und Nahrungspflanzen und die Erfassung von Migrationsaktivitäten.

Zur genauen Terminierung der Flugphasen von Populationen unterschiedlicher Standorte wurden auf nahegelegenen Untersuchungsflächen des Mosel Saar Ruwer Gebiets tägliche Beprobungen mit dem Streifnetz durchgeführt und gleichzeitig auch die auf den verschiedenen Untersuchungsflächen ausgebrachten Gelbfallen (Klebefallen) auf Fangfolge kontrolliert. Die exakte Terminierung der Flugphasen ist deshalb wichtig, damit exakte Vorhersagen getroffen und die Fangaktivität geplant werden kann. Von der Fangstärke kann auch indirekt der Erfolg der durchgeführten Begrünungsversuche abgeleitet werden. Außerdem war eine exakte Terminierung der Flugphasen auch deshalb

Einleitung

notwendig, um eine ausreichende Anzahl tierischen Materials für die PCR-Tests zu erhalten. Die Woche, indem die ersten Imagines auftraten, wurde als Beginn der Flugphase definiert. Auf entfernten Untersuchungsflächen, die nicht täglich kontrolliert werden konnten, wurden einmal wöchentlich Streifnetzfänge als auch Gelbfallenkontrollen durchgeführt. Das Ende der Flugphase wurde durch diejenige Woche gekennzeichnet, in der die letzten Individuen gefangen wurden. Das Ziel der Fänge war neben der exakten Terminierung die Aufklärung darüber, ob und wie stark sich die Flugphasen von Populationen in den verschiedenen Weinanbauregionen unterscheiden. Die Fänge gestatteten außerdem, die Stärke einzelner Populationen anhand der Fangzahlen zu bestimmen und damit Aussagen über einen möglichen Infektionsdruck treffen zu können.

Die im Untersuchungszeitraum gewonnenen Flugdaten wurden auch dazu verwendet, ein Prognosemodell des wahrscheinlichen Flugbeginns zu entwickeln. Als Basis für die Terminierung des Flugbeginns dienten die vom Institut gewonnenen Fangdaten der Jahre 1993 bis 1996, die mit Gelbfallen gewonnen wurden. Die Flugdaten wurden mit meteorologischen Messdaten verglichen. Zwei Parameter, nämlich der Tagesmittelwert der Lufttemperatur und das tägliche Minimum der Erdbodentemperatur dienten dabei als Grundlage zur Berechnung des optimalen Startermins der Flugphase.

Mit dem Beginn der Flugphase wurden auch solche Pflanzenarten beprobt, die entweder häufig in den Arealen anzutreffen sind oder bei denen bereits eine Phytoplasmaose nachgewiesen werden konnte. Das Ziel war eine genaue Erfassung des als Wirts- bzw. Nahrungspflanze in Betracht kommende Artenspektrum. Solche Pflanzenarten, auf denen *H. obsoletus* gefangen werden konnte, wurden zum Nachweis eventueller Erreger einer PCR-Analyse unterzogen.

Das starke Auftreten der Schwarzholzkrankheit bestimmter Untersuchungsgebiete war der Anlass zur Fragestellung, ob von individuenreichen Populationen auch eine Gefahr für entferntere Areale besteht, in deren direkter Nachbarschaft zwar keine Vorkommen, dafür aber infizierte Rebstöcke festgestellt werden konnten. Zur Überprüfung des Sachverhalts wurden ausgewählte Standorte umfassend mit Gelbfallen ausgestattet, wobei die Gelbfallenanlagen so konstruiert und angeordnet wurden, dass Migrationsbewegungen sowohl in der Kraut als auch in der Laubzone der Rebstöcke erfasst werden konnten. An einem besonderen Standort wurden Gelbfallen zusätzlich oberhalb dieser Laubzone in einer Höhe von etwa 3,80m angebracht.

1.6.5 Untersuchung anderer Zikadenarten im Hinblick auf mögliche Vektoreigenschaften

Bisher sind als Überträger von Vergilbungskrankheiten in Deutschland ausschließlich *H. obsoletus* als Vektor der Schwarzholzkrankheit und *O. alni* als Überträger der FD-Pfalz bekannt. Daher war

Einleitung

ein Ziel festzustellen, ob auch andere Zikadenarten als Vektor in Frage kommen. Aus diesem Grund wurden auch solche Zikadenarten in die Untersuchung mitaufgenommen, die auf Untersuchungsflächen in den Hauptverbreitungsgebieten der Schwarzholzkrankheit auftreten. Zu ihnen gehörten auch jene Arten, bei denen aus der Literatur bereits ein Nachweis bekannt war (vgl. Kap. 1.4.4). Das Probematerial stammte meist aus Beifängen der ausgebrachten Gelbfallen. Für solche Zikadenarten, die selten auf den Untersuchungsflächen vorkommenden, wurden auch gelegentliche Streifnetzfänge in die Untersuchung miteinbezogen. Im Anschluss daran wurde mittels der PCR getestet, ob ein Tier tatsächlich mit dem Erreger der Schwarzholzkrankheit infiziert war. Lebendgefangene Zikaden wurden vor dem PCR-Test zunächst für Transmissionsversuche eingesetzt, um eine mögliche Inokulation feststellen zu können. Als Standardpflanze für die Übertragungsversuche diente *Vicia faba*, eine krautige Pflanze, die in Laborversuchen erfolgreich von *H. obsoletus* inokuliert wurde.

1.6.6 Entwicklung von Gegenmaßnahmen zur Verminderung des Gefahrenpotentials

Ein letzter Schwerpunkt lag auf der Entwicklung geeigneter Gegenmaßnahmen gegen die Verbreitung bzw. zur Reduzierung der Schwarzholzkrankheit. Dazu wurde in Freilanduntersuchungen überprüft, inwieweit für die Steillagen geeignete Begrünungspflanzen, die nicht als Wirts- und Nahrungspflanzen für *H. obsoletus* dienen, zur Verdrängung seiner Hauptwirtspflanzen angesiedelt werden können und wie erfolgreich sich diese Begrünungsmaßnahmen auswirken. Dazu wurden die ausgewählten Untersuchungsflächen kartiert, der Bedeckungsgrad der Wirtspflanze vor und nach der Begrünung aufgenommen. Gleichzeitig wurden Lebend- und Gelbfallenfänge von *H. obsoletus* durchgeführt, um den Effekt der Begrünung nicht nur im Rückgang seiner Wirtspflanzen, sondern auch in einem prognostizierten Rückgang der Populationsstärke zu erkennen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 VERSUCHSFLÄCHEN

Die Untersuchungen zu diesem dreijährigen Forschungsprojekt wurden zwischen 1999-2002 auf Versuchsflächen in den Weinbaugebieten *Mosel Saar Ruwer*, *Mittelrhein*, *Nahe* und *Pfalz* regelmäßig durchgeführt. Darüber hinaus wurden in den Weinbaugebieten *Hessische Bergstrasse*, *Baden* (Ortenau) und *Franken* in unregelmäßigen Abständen phloemsaugende Zikaden gesammelt. Auf den Versuchsflächen wurde sowohl der bisher bekannte Vektor für Rebphytoplasmosen, die Zikade *H. obsoletus* als auch andere phloemsaugende Zikaden gefangen, um entweder eine Phytoplasrose bei den Tieren überhaupt oder die Höhe der Infektionshäufigkeit in der jeweiligen lokalen Population festzustellen (vgl. Kap. 3.4). Weiterhin diente der Zikadenfang zur Durchführung von Übertragungsversuchen (vgl. Kap. 3.3). Zur Bekämpfung der Schwarzholzkrankheit wurden solche Versuchsflächen eingerichtet, die sich vor allem in den Befallslagen befanden und sich meist durch eine große Populationsdichte von *H. obsoletus* und durch einen hohen Bedeckungsgrad seiner Hauptnahrungs- und Wirtspflanzen auszeichneten (vgl. Kap. 3.6). Zur Erfassung der durch die Schwarzholzkrankheit verursachten Schäden wurden Ertragsreblflächen aus allen Regionen, in denen die Schwarzholzkrankheit bisher beobachtet wurde, ausgewählt und der Durchseuchungsgrad festgestellt (vgl. Kap. 3.5).

Nach den gewonnenen Erkenntnissen des ersten Versuchsjahres wurden im Anschluss geeignete Versuchsflächen für die Untersuchung besonderer Aspekte wie die Beobachtung der Migrationsaktivität von *H. obsoletus*, dem daraus resultierenden Infektionsdruck auf benachbarte Ertragsreblflächen (vgl. Kap. 3.5.3) und der Einfluss trophischer Faktoren auf den Zeitpunkt des Auftretens der Imagines (vgl. Kap.3.2.2) ausgewählt und eingerichtet. Die Auswahl der Versuchsflächen und die auf ihnen durchgeführten Untersuchungen ist in den Tabellen 2.1–2.3 aufgelistet.

2.1.1 Versuchsflächen zur Erfassung der Flugaktivität und der Infektionshäufigkeit in verschiedenen Populationen von *Hyalesthes obsoletus*

In allen oben genannten Weinbaugebieten wurden Ertragsreblflächen bzw. Brachflächen ausgewählt, auf denen entweder schon zu Beginn des Forschungsprojektes das Vorkommen von *H. obsoletus* bekannt war oder Symptome der Vergilbungskrankheit beobachtet wurden, ohne

Material und Methoden

das *H. obsoletus* oder ein bisher noch unbekannter Überträger nachgewiesen werden konnte. Diese Flächen zeichneten sich außerdem durch das Vorhandensein von bisher bekannten Nahrungs- und Wirtspflanzen von *H. obsoletus* aus. Zur Erfassung der Infektionshäufigkeit wurden die Tiere während der Flugphase der Imagines mittels Streifnetz lebend und/oder mittels ausgehängten Gelbfallen gefangen und bis zur Aufbereitung für die PCR-Analyse zum Nachweis einer Infektion durch Phytoplasmen bei -22°C eingefroren. Zur Erfassung der Flugphase der Imagines wurden sowohl die Gelbfallen- als auch die Lebendfangzahlen quantitativ auf allen Versuchsflächen während der gesamten Flugperiode erfasst (vgl. Kap. 3.1)

2.1.2 Versuchsflächen zur Erfassung der Vektoreigenschaften von *Hyalesthes obsoletus* und anderer phloemsaugenden Zikaden

Zur Durchführung sogenannter Transmissionsversuche, mit denen die Möglichkeit einer Weitergabe der Infektion und die Übertragungseffizienz phloemsaugender Zikaden getestet werden sollte, wurden solche Flächen verwendet, die sich einerseits in ausgeprägten Befallslagen befanden und andererseits zahlenmäßig starke Populationen von *H. obsoletus* aufwiesen, die sich ihrerseits durch eine hohe Infektionshäufigkeit auszeichneten (vgl. Kap. 3.4.1).

2.1.3 Versuchsflächen zur Untersuchung der Migrationsaktivität von *Hyalesthes obsoletus* und dem daraus resultierenden Infektionsdruck auf benachbarte Ertragsreblächen

Geeignete Versuchsflächen, die im ersten Versuchsjahr die höchsten Populationszahlen von *H. obsoletus* aufwiesen, wurden ab dem 2. Versuchsjahr zur Erfassung der Migrationsaktivität mit Gelbfallen ausgestattet, die dem passiven Fang von *H. obsoletus* dienen. Die ausgewählten Versuchsflächen mussten als Voraussetzung folgende Kriterien erfüllen:

Die Versuchsfläche, von der eine Migrationsaktivität untersucht werden sollte, sollte einerseits eine hohe Populationsdichte von *H. obsoletus* mit einem entsprechend sichtbaren Bedeckungsgrad seiner Wirts- und Nahrungspflanzen aufzeigen und andererseits keinem Einfluss von sich auf die Population negativ auswirkender Faktoren unterliegen, wie sie beispielsweise regelmäßige Bodenbearbeitungsmaßnahmen, andauernde Arbeitsaktivität im Weinberg oder Pflanzenschutzmaßnahmen darstellen. Angrenzende und umliegende Versuchsflächen sollten dagegen keine Wirts- und Nahrungspflanzen von *H. obsoletus* aufweisen, damit eine Migration überhaupt als eine solche erkannt werden kann. Die Versuchsflächen mussten sich außerdem in den Befallslagen befinden, um einen durch die Migration hervorgerufenen Infektionsdruck auf die Ertragsreblächen erfassen und beurteilen zu können. Aus diesem Grund wurden

Material und Methoden

auf allen umliegenden Ertragsreblflächen Pflanzenbonituren durchgeführt mit dem Ziel, den Anteil vergilbungs kranker Reben festzustellen.

Zur Untersuchung der Migrationsaktivität wurden 2 Standorte an der Mittelmosel (Versuchsflächen BKS-1, und MEHR-2) und ein Standort am Mittelrhein (Versuchsflächen BOPP-1 – BOPP-2) ausgewählt. Ein weiterer Standort (Versuchsfläche BKS-3), der als neu angelegte Junganlage zuvor rigolt und ge grubbert worden und frei von krautigen Pflanzenbewuchs war, diente der Fragestellung, ob und in welchem Ausmaß Wirts- und Nahrungspflanzen von *H. obsoletus* diese Fläche besiedeln und damit eine Grundlage zur Ansiedlung einer neuen Population bilden kann, die sich durch Einwanderung von Tieren umliegender Flächen entwickeln könnte.

Material und Methoden

Tabelle 2.1: Übersicht über die Versuchsflächen und Versuchspartellen

Untersuchungsflächen: Aufteilung der Versuchsflächen in unterschiedliche Versuchspartellen (Buchstaben) eingeteilt; Die Versuchsflächen und die dazugehörigen Untersuchungen sind in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgeführt;

Gemarkung	Lagenbezeichnung	Nutzungsart	Rebsorte	Untersuchungsflächen
Weinanbaugebiet Mosel Saar Ruwer				
Bernkastel	Johannisbrünchen	Brache	-	BKS-1.1A bis BKS-1.1D
Bernkastel	Johannisbrünchen	Ertragsanlagen	Riesling	BKS-1.2A bis BKS-1.2D
Bernkastel	Bratenhöfchen	Ertragsanlagen	Riesling	BKS-2.1A bis BKS-2.2F
Bernkastel	Bratenhöfchen	Ertragsanlagen	Riesling	BKS-2.2A bis BKS2.2F
Bernkastel	Graben	Junganlage	Riesling	BKS-3.1
Bernkastel	Graben	Ertragsanlagen	Riesling	BKS-3.2A bis BKS-3.2B
Bernkastel	Pfalzgraben	Ertragsanlage	Riesling	BKS-4
Kues	Kardinalsberg	Ertragsanlage	Riesling	BKS-5
Kues	Kardinalsberg	Ertragsanlage	Riesling	BKS-6.1
Kues	Kardinalsberg	Ertragsanlage	Riesling	BKS-6.2
Maring	Honigberg	Brache	-	MAR-1.1 bis MAR-1.9
Mehring	Blattenberg	Ertragsanlage	Riesling	MEHR-1A bis MEHR-1B
Mehring	Blattenberg	Brache	-	MEHR-2.1
Mehring	Blattenberg	Ertragsanlagen	Riesling	MEHR-2.2A bis MEHR-2.2D
Platten	Klosterberg	Brache	-	PLAT-1.1
Platten	Klosterberg	Ertragsanlage	Riesling	PLAT-1.2
Platten	Klosterberg	Ertragsanlage	Riesling	PLAT-2
Platten	Klosterberg	Ertragsanlage	Riesling	PLAT-3
Platten	Klosterberg	Brache	-	PLAT-4A bis PLAT-4D
Kröv	Letterlay	Ertragsanlage	Riesling	KRÖV-1A bis KRÖV-1C
Zeltingen	Zeltinger Himmelreich	Ertragsanlagen	Riesling	ZELT-1A bis ZELT-1I
Weinanbaugebiet Nahe				
Kreuznach	Forst	Ertragsanlage	Weißburgunder	KF-1
Kreuznach	Kronenberg	Ertragsanlage	Riesling	KK-1
Norheim	Karfels	Ertragsanlage	Weißburgunder	NK-1A bis NK-1H
Monzingen	Frühlingsplätzchen	Brache	-	MONZ-1.1
Monzingen	Frühlingsplätzchen	Ertragsflächen	Riesling	MONZ-1.2A bis MONZ-1.2E
Weinanbaugebiet Mittelrhein				
Boppard	Hamm	Junganlage	Riesling	BOPP-1.1
			Spätburg.	BOPP-1.2
Boppard	Hamm	Ertragsanlage	Riesling	BOPP-2
Boppard	Hamm	Ertragsanlage	Riesling	BOPP-3
Boppard	Hamm	Ertragsanlage	Riesling	BOPP-4
Boppard	Hamm	Ertragsanlage	Riesling	BOPP-5
Boppard	Hamm	Ertragsanlage	Riesling	BOPP-6
Boppard	Hamm	Junganlage	Riesling	BOPP-H
Weinanbaugebiet Hessische Bergstrasse				
Heppenheim	Stemmler	Ertragsanlage	Riesling	HEPP-1
Heppenheim	Stemmler	Ertragsanlage	Traminer	HEPP-2
Weinanbaugebiet Pfalz				
Ungstein	Herrenberg	Ertragsanlage	Riesling	UNG-1
Ruppertsberg	Hoheburg	Ertragsanlage	Riesling	RUPP-1
Maikammer	Heiligenberg	Ertragsanlage	Scheurebe	MAI-1
Böchingen	Rosenkranz	Ertragsanlage	Scheurebe Dornfelder	BÖCH-1
Weinanbaugebiet Baden				
Neuweier	Mauerburg	Ertragsanlage	Riesling	NEU-1A bis NEU-1B

Material und Methoden

Tabelle 2.2: Übersicht über die Versuchsfelder und den darauf eingerichteten Versuchspartellen

Die unterschiedlichen Forschungsaspekte führten zur Einrichtung verschiedenartiger Versuchsfelder- und Untersuchungsfelder (Ertrags- Jung- oder Brachfelder). Diese Versuchsfelder wurden entweder als Gesamtfelder in die Untersuchungen miteinbezogen oder aber in unterschiedliche Versuchspartellen aufgeteilt.

Untersuchungsstandort	Flächencharakteristik
Untersuchungszeitraum	
Untersuchungsfelder	
Weinanbaugebiet Mosel Saar Ruwer	
BKS-1.1: 1999 - 2001 BKS-1.1A – BKS-1.1D	Ehemalige Ertragsrebläche im Steilhang; Seit 1990 Brachfläche mit geringer Sukzession; Großflächige Verbreitung der Ackerwinde <i>Convolvulus arvensis</i> ; Große Population von <i>H. obsoletus</i> ; Einteilung in die Versuchspartellen BKS-1.1A-D;
BKS-1.2: 2000 – 2001 BKS-1.2A – BKS-1.2D	Die Versuchspartellen BKS-1.2C begrenzen als Ertragsreblächen im Steilhangsbereich seitlich bzw. unterhalb die Brachfläche BKS-1.1 und wurden zur Feststellung von Migrationsbewegungen von <i>H. obsoletus</i> ausgewählt; Ebenso die oberhalb der Brachfläche angrenzende Waldfläche BKS-1.2D; Bisher: geringe Durchseuchung bekannt;
BKS-2.1: 1999 – 2001	Ertragsrebläche im Steilhangsbereich; Auf den eingerichteten Partellen wurden hauptsächlich Versuche zur Windenbekämpfung angelegt; Vorkommen von <i>H. obsoletus</i> bekannt;
BKS-2.2: 1999 – 2001	Ertragsrebläche im Steilhangsbereich; Auf den eingerichteten Partellen wurden hauptsächlich Versuche zur Windenbekämpfung angelegt;
BKS-3.1: 1999 – 2001	Die 1999 mit Jungreben bepflanzte Anlage im Steilhangsbereich wurde bei der Neubepflanzung durch Rigolen und Grubbern von krautigen Pflanzen befreit; Im Anschluss daran wurde die Einwanderung von <i>H. obsoletus</i> überwacht und die sich entwickelnde Weinbergflora beobachtet;
BKS-3.2: 1999 – 2001	Die Versuchspartellen BKS-3.2A-B begrenzen als Ertragsreblächen die Junganlage BKS-3.1 und wurden zur Feststellung von Migrationsbewegungen von <i>H. obsoletus</i> ausgewählt;
BKS-4: 1999 – 2001	Ertragsrebläche im Steilhangsbereich; Vor allem zur Feststellung des Durchseuchungsgrades genutzt;
BKS-5: 1999 – 2001	Ertragsrebläche mit bekanntem Vorkommen von <i>H. obsoletus</i> ; Die gefangenen Zikaden wurden vor allem für Transmissionsversuche eingesetzt;
BKS-6.1: 1999 - 2001	Diese Versuchsfelder wurden bis 2001 als Ertragsrebläche genutzt; Ab 2001 entstand dann im Anschluss eine Brachfläche; Die gefangenen Zikaden wurden ebenfalls hauptsächlich für Transmissionsversuche eingesetzt;
BKS-6.2: 1999 - 2001	Ertragsrebläche im Steilhangsbereich; Vor allem zur Feststellung des Durchseuchungsgrades genutzt;
MAR-1: 2000 – 2001 MAR-1.1 – MAR-1.9	Ab 2000 wurde diese ehemalige Ertragsrebläche zur Brachfläche umgewandelt; Die einzelnen Versuchspartellen wurden angelegt, um das Anwachsen verschiedener, zur Verdrängung der Ackerwinde dienender Begrünpflanzen zu testen;
MEH-1: 1999 – 2001 MEH-1A – MEH-1B	Ertragsrebläche, die ausgewählt wurde, um den Herbizideinsatz zur Verdrängung der Ackerwinde zu untersuchen;

Material und Methoden

Fortsetzung Tab. 2.2

Untersuchungsstandort Untersuchungszeitraum Untersuchungsflächen	Flächencharakteristik
MEH-2.1: 1999 - 2001	Ehemalige Ertragsrebfläche, die ab 1999 zur Brachfläche umgewandelt wurde; Diese Fläche diente vor allem dem Fang phloemsaugender Zikaden und der Untersuchung der Migration von <i>H. obsoletus</i> ;
MEH-2.2: 2000 - 2001	Die um die Brachfläche MEH-2.1 gelegenen Ertrags, Brach- und Waldflächen wurden dienen als Versuchspartellen vor allem der Untersuchung der Migrationsbewegung von <i>H. obsoletus</i> ;
PLAT-1: 1999 – 2001 PLAT-1A – PLAT-1B	Mehrjährige, durch natürliche Sukzession stark verbuschte Brachfläche (PLAT-1A) mit Vorkommen von(Kriechender Hahnenfuss) als Wirts- und Nahrungspflanze von <i>H. obsoletus</i> ; Die Fläche diente vor allem dem Fang von <i>H. obsoletus</i> unter dem Aspekt des Einflusses verschiedener Nahrungspflanzen auf die Infektionshäufigkeit verschiedener Populationen; Die Ertragsfläche PLAT-1B liegt in direkter Nachbarschaft zur Versuchspartelle PLAT-1A und diente ebenfalls dem Zikadenfang;
PLAT-2; PLAT-3: 1999 - 2001	Ertragsflächen, die ebenfalls dem Fang von <i>H. obsoletus</i> dienen;
PLAT-4: 2000 – 2001 PLAT-4A – PLAT-4D	Ehemalige Ertragsrebfläche im Steillagenbereich, die 2000 zur Brachfläche umgewandelt wurde; Die einzelnen Versuchspartellen wurden angelegt, um das Anwachsen verschiedener, zur Verdrängung der Ackerwinde dienender Begrünpflanzen zu testen;
KRÖV-1: 1999 – 2001 KRÖV-1A – KRÖV-1C	Ertragsrebfläche im Steillagenbereich mit bekanntem Vorkommen von <i>H. obsoletus</i> , die in 3 Versuchspartellen unterteilt wurde: Während auf der ersten Versuchspartelle nur Bodenbearbeitungsmaßnahmen durchgeführt wurden, diente die zweite Parzelle der Ausbringung des <i>Kleinen Habichtskrauts</i> (<i>H. pilosella</i>) zur Bekämpfung der Ackerwinde; Die dritte Parzelle wurde durch Herbizideinsatz unkrautfrei gehalten;
ZELT-1: 2000 – 2001 ZELT-1A – ZELT-1I	Ertragsrebflächen im Steillagenbereich; Die einzelnen Versuchspartellen wurden eingerichtet, um den Durchseuchungsgrad festzustellen und darüber hinaus die Auswirkungen von Herbizideinsatz auf die Ausbreitung der Ackerwinde zu untersuchen;
Weinanbaugebiet Nahe	
KF-1; KK-1: 1999	Ertragsflächen, auf denen die Schwarzholzkrankheit vereinzelt auftrat; Diese Flächen dienen dem Nachweis auf <i>H. obsoletus</i> als Vektor der Phytoplasmen; Aufgrund der geringen Effektivität bezüglich des Versuchsaufwands wurden diese Flächen nach dem 1. Versuchsjahr nur noch gelegentlich zum Zikadenfang aufgesucht;
NK-1: 1999 – 2001 NK-1a – NK-1D	Ertragsfläche im Steillagenbereich, Die einzelnen Partellen dienen dem Nachweis von <i>H. obsoletus</i> als Vektor der dort auftretenden Schwarzholzerkrankung;
MONZ-1: 1999 – 2001	Ehemalige Ertragsrebfläche im Steillagenbereich, die 1999 zur Brachfläche umgewandelt wurde; Diese Versuchsfläche diente vor allem dem Zikadenfang und dem Nachweis von <i>H. obsoletus</i> als dem Vektor der dort detektierten Schwarzholzkrankheit;
MONZ-2: 1999 – 2001 MONZ-2A – MONZ-2E	Ertragsflächen, die in angrenzender Nachbarschaft zur Versuchsfläche MONZ-1 lagen und ebenfalls dem Zikadenfang dienen;

Material und Methoden

Fortsetzung Tab. 2.2

Untersuchungsstandort	Flächencharakteristik
Untersuchungszeitraum	
Untersuchungsflächen	
Weinanbaugebiet Mittelrhein	
BOPP-1 bis 6; BOPP-H: 1999 – 2001	Ertragsreblächen im Steillagenbereich, auf denen mit Ausnahme der Versuchsflächen BOPP-1 und 6 bzw. BOPP-H schon seit 1993 der Verlauf der Schwarzholzkrankheit beobachtet und erfasst wurde; Die einzelnen Versuchsflächen dienten darüber hinaus dem Zikadenfang und der Untersuchung der Migrationsaktivität von <i>H. obsoletus</i> ; Die Versuchsfläche BOPP-6 diente zudem der Feststellung der Infektionshäufigkeit innerhalb der dort vorkommenden Population von <i>H. obsoletus</i> und dem Fang von Imagines für Versuche, die der Untersuchung des Einflusses verschiedener Wirts- und Nahrungspflanzen auf die Überlebensrate der Tiere und den Verlauf ihrer Flugphase ausüben;
Weinanbaugebiet Pfalz	
UNG-1: 1999 – 2001	Im Gegensatz zu allen anderen Weinbauregionen, in denen die Schwarzholzkrankheit auftritt, wird die Erkrankung in dieser Region von einem zweiten Isolat (Stolbur A-Typ) hervorgerufen. Die Hauptnahrungs- und Wirtspflanze von <i>H. obsoletus</i> ist die Brennessel <i>Urtica dioica</i> , während sie in allen anderen Weinbauregionen Deutschlands vor allem die Ackerwinde <i>C. arvensis</i> besaugt; Die Lebendfänge dienten ebenfalls der Untersuchung des Einflusses verschiedener Wirts- und Nahrungspflanzen auf die Überlebensrate der Tiere und den Verlauf ihrer Flugphase;
RUPP-1; MAI-1: 1999 – 2001	Ein zweiter auftretender Typus der in Deutschland auftretenden Vergilbungs-krankheiten der Weinrebe ist die als FD-Pfalz (Palatinate grapevine yellows (PGY)) bezeichnete Phytoplasmose und wird von der Zikade <i>Oncopsis alni</i> übertragen; Die als Versuchsflächen betreuten Ertragsflächen dienten neben dem Fang der Imagines auch der Feststellung des Durchseuchungsgrades; um diesen mit solchen Flächen zu vergleichen, auf denen die Schwarzholzkrankheit auftritt;
BÖCH-1: 1999 – 2001 BÖCH-1A – BÖCH-1E	Ertragsflächen, auf denen Die FD-Pfalz detektiert wurde; Neben dem Fang von <i>O. alni</i> wurden auch speziell nach Imagines von <i>H. obsoletus</i> gesucht;
Weinanbaugebiet Baden	
NEU-1: 1999 – 2001 NEU-1A – NEU-1B	Die Ertragsflächen dienten der Suche des Vektors des dort vorkommenden Schwarzholzphytoplasmas;
Weinanbaugebiet Hessische Bergstraße	
HEPP-1 bis 2: 1999 - 2001	Die Ertragsflächen dienten der Suche des Vektors des dort vorkommenden Schwarzholzphytoplasmas; Nachdem auf den Versuchsflächen im ersten Versuchsjahr regelmäßig Zikaden zur Untersuchung des Vektors gefangen wurden, erfolgte danach nur noch ein gelegentlicher Zikadenfang;

Material und Methoden

Tabelle 2.3: Übersicht über die auf den Untersuchungsflächen durchgeführten Untersuchungen

Zu den durchgeführten Untersuchungen zählten der Fang von *H. obsoletus* und anderer Zikaden (Zikadenfang) zur Erfassung der Populationsstärke, der Nachweis infizierter Tiere und die Feststellung des Durchsechungsgrades von Rebflächen (Phytoplasmen), die Erstellung eines Prognoseverfahrens zur Vorhersage der Flugphase von *H. obsoletus* (Flugprognose), die Durchführung von Tests bezüglich seiner Vektoreigenschaften, möglicher Wirtspflanzen (Tests) und die Feststellungen geeigneter Bekämpfungsmaßnahmen zur Eindämmung der Schwarzholzkrankheit (Bekämpfungsmaßnahmen). Flächencharakteristik: B: Brachfläche; E: Ertragsrebfläche; W: Wald; Thematik: C: Test auf mögliche Vektoreigenschaften von phloemsaugenden Zikaden; D: Test auf mögliche Wirtspflanzen für Phytoplasmen; 1: Abdeckung mittels Ölleinstroh;

Durchgeführte Untersuchungen																			
Standort Fläche	Zikadenfang				Phyto- plasmen	Flug- prognose	Tests: C; D	Bekämpfungsmaßnahmen											
Nutzung	Lebendfang	Gelbfallenfang		Anzahl der Gelbfallen pro Aushang	Exposition einzelner Gelbfallen (Wochen)	Untersuchungen zur Migration	PCR-Tests	Bonitur der Ertragsrebflächen	Untersuchungen trophischer Faktoren	Transmissionsversuche	Untersuchung potentieller Nahrungspflanzen von <i>H. obsoletus</i>	Erfassung der Weinbergflora	Bedeckungsgrad von <i>C. arvensis</i>	Begrünungsanlagen	Spontanbegrünung	Herbizideinsatz	Bodenbearbeitungsmaßnahmen (während des 3-jährigen Versuchszeitraums)		
Weinanbaugebiet Mosel Saar Ruwer																			
BKS-1.1																			
BKS-1.1A	B	x	1	x	4	1	x	x	-	x	-	x	x	x	-	x	-	x	-
BKS-1.1B					4												x	-	-
BKS-1.1C					4												- ¹	x	-
BKS-1.1D					4												-	x	x
BKS-1.2																			
BKS-1.2A	E	-	1	x	18	1	x	-	x	-	-	-	-	x	-	x	-	x	-
BKS-1.2B	E	-			18												-	x	-
BKS-1.2C	E	-			20												-	x	-
BKS-1.2D	E/W	x			14												x	-	-
BKS-2.1																			
BKS-2.1A	E	x	1	x	4	1	-	x	x	-	-	x	x	x	-	x	-	-	
BKS-2.1B					4							-	x		x	x	-	-	

Material und Methoden

Fortsetzung Tab. 2.3

Durchgeführte Untersuchungen																			
Standort Fläche	Zikadenfang						Phyto- plasmen	Flug- prognose	Tests: C; D	Bekämpfungsmaßnahmen									
	Lebendfang	1: wöchentlich; 2: jede 2. Woche un: gelegentliche Beprobung		Gelbfallenfang	Anzahl der Gelbfallen pro Aushang Exposition einzelner Gelbfallen (Wochen) 1 = eine Woche; 2 = 2 Wochen; Untersuchungen zur Migration		PCR-Tests	Bonitur der Ertragsreifeblößen	Untersuchungen tropischer Faktoren	Transmissionsversuche	Untersuchung potentieller Nahrungspflanzen von <i>H. obsoletus</i>		Erfassung der Weinbergflora	Bedeckungsgrad von <i>C. arvensis</i>		Begrünungsanlagen	Spontanbegrünung	Herbizideinsatz	Bodenbearbeitungsmaßnahmen (während des 3-jährigen Versuchszeitraums)
					4						-	-		-	-	-	-	-	
BKS- 2.1D					4						-	-		-	-	-	-	-	
BKS- 2.1E					4						-	-		X	-	-	-	-	
BKS-2.2																			
BKS- 2.2A															X	-			
BKS- 2.2B															-	X			
BKS- 2.2C	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	
BKS- 2.2-D															X	-			
BKS- 2.2E															X	-			
BKS-3.1																			
BKS- 3.1					15				s				X				X		
BKS- 3.2A	E	X	1	X	5	1	X	X	X	-	-	X	-	X	-	X	-	-	
BKS- 3.2B					5				X				-				X		
BKS- 4	E	X	un	X	12	1	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
BKS- 5	E	X	1	X	12	1	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	
BKS-6																			
BKS- 6.1	E	X	1	X	4	1	-	X	X	-	X	X	X	X	-	X	-	-	
BKS- 6.2					4												X		
MAR-1																			
MAR- -1.1	B	X	1	-	-	-	-	X	-	-	-	-	X	X	X	-	-	-	

Material und Methoden

Fortsetzung Tab. 2.3

Durchgeführte Untersuchungen																										
Standort																										
Fläche	Zikadenfang					Phyto- plasmen	Flug- prognose	Tests: C; D	Bekämpfungsmaßnahmen																	
Nutzung	Lebendfang	Gelbfallenfang			Untersuchungen zur Migration	PCR-Tests	Bonitur der Ertragsreife	Untersuchungen trophischer Faktoren	Transmissionsversuche	Untersuchung potentieller Nahrungspflanzen von <i>H. obsoletus</i>	Erfassung der Weinbergflora	Bedeckungsgrad von <i>C. arvensis</i>	Begrünungsanlagen	Spontanbegrünung	Herbizideinsatz	Bodenbearbeitungsmaßnahmen (während des 3-jährigen Versuchszeitraums)										
		1: wöchentlich; 2: jede 2. Woche un: gelegentliche Beprobung	Anzahl der Gelbfallen pro Aushang	Exposition einzelner Gelbfallen (Wochen) 1= eine Woche; 2= 2 Wochen;																						
MAR-1.2	B	X	1									-	X		X	-	-									
MAR-1.3				x	2	1								-	X		-	X	-							
MAR-1.4				x	2	1									-	X		X	X	-						
MAR-1.5															X			-	X	-						
MAR-1.6															-			X	-	-						
MAR-1.7							-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-						
MAR-1.8															-			X	-	-						
MAR-1.9															X			-	X	X						
MEHR-1																										
MEHR-1A	E	x	1	x	4	1	-	x	x	-	-	-	x	x	-	x	-									
MEHR-1B					4												x	-								
MEHR-2																										
MEH-2.1	B	x	1	x	4	1	x	x	-	-	-	x	x	x	-	x	-	-								
MEHR-2.2A	E	x	1	x	12	1	x	x	x	-	-	x	x	x	-	x	(x)	-								
MEHR-2.2B	E	x	1		12				x			x	x			x	-		-	x	x					
MEHR-2.2C	B	x	1		20				-			-	-			-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
MEHR-2.2D	W	-	-		14				-			-	-			-	-		-	-	-	-	-	-	-	-
PLAT-1																										
PLAT-1A	B	x	1	x	8	1	-	x	-	-	-	x	x	x	-	x	-	-								
PLAT-1B	E				4				x										-							

Material und Methoden

Fortsetzung Tab. 2.3

Durchgeführte Untersuchungen																				
Standort Fläche	Zikadenfang						Phyto- plasmen		Flug- prognose	Tests: C; D	Bekämpfungsmaßnahmen									
	Lebendfang					Gelbfallenfang														
		1: wöchentlich; 2: jede 2. Woche un: gelegentliche Beprobung				Anzahl der Gelbfallen pro Aushang		Exposition einzelner Gelbfallen (Wochen) 1= eine Woche; 2= 2 Wochen; Untersuchungen zur Migration		PCR-Tests	Bonitur der Ertragsreblflächen	Untersuchungen trophischer Faktoren	Transmissionsversuche	Untersuchung potentieller Nahrungspflanzen von <i>H. obsoletus</i>	Erfassung der Weinbergflora	Bedeckungsgrad von <i>C. arvensis</i>	Begrünungsanlagen	Spontanbegrünung	Herbizideinsatz	Bodenbearbeitungsmaßnahmen (während des 3-jährigen Versuchszeitraums)
PLAT-2	E	-	-	x	4	1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PLAT-3	E	x	1	x	16	1	-	x	x	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	
PLAT-4																				
PLAT-4A			x	x	4	1											-	X ^S		
PLAT-4B	B	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	x	x	x		-	x	-	
PLAT-4C			x	-	-	-											x	-		
PLAT-4D	B	x	x	-	-	-	-	x	-	-	-	-	x	x	x	x	-	-	-	
KRÖV-1																				
KRÖV-1A	E	x	x	x	4	1	-	x	x	-	-	-	x	x	x	-	-	-	x	
KRÖV-1B		x	x		4												-	x	-	
KRÖV-1C		-	-		4												-	-	x	
ZELT-1 (A-I)	E	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	
Weinanbaugebiet Nahe																				
KF-1	E	x	1/un	x	6	1	-	x	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	
KK-1	E	x	1/un	x	6	1			-					-	-	-	-	x		
NK-1(A-D)	E	x	1/2	x	6	1			x					x	x	-	x	x		
MONZ-1																				
MONZ-1.1	B	x	1/2	-	-	-	-	x	x	-	-	-	x	x	x	-	x	-	-	
MONZ-1.2A	E	x						x					x	-	-	x	-	-	-	
MONZ-1.2B	E	-						-					-	-	-	-	x	x	x	
MONZ-1.2C	E	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	
MONZ-1.2D	E	-															-	x	-	
MONZ-1.2E	E	-															-	x	x	

Material und Methoden

Fortsetzung Tab. 2.3

Durchgeführte Untersuchungen																			
Standort Fläche		Zikadenfang						Phyto- plasmen		Flug- prognose		Tests: C; D		Bekämpfungsmaßnah- men					
		Lebendfang				Gelbfallenfang				PCR-Tests			Transmissionsversuche			Begrünungsanlagen			
		1: wöchentlich; 2: jede 2. Woche un: gelegentliche Beprobung				Anzahl der Gelbfallen pro Aushang				Bonitur der Ertragsreblflächen			Untersuchung auf potentieller Nahrungspflanzen von <i>H. obsoletus</i>			Begrünungsanlagen			
						Exposition einzelner Gelbfallen (Wochen) 1= eine Woche; 2= 2 Wochen;				Untersuchungen zur Migration			Erfassung der Weinbergflora			Spontanbegrünung			
													Bedeckungsgrad von <i>C. arvensis</i>			Herbizideinsatz			
																Bodenbearbeitungsmaßnahmen (während des 3-jährigen Versuchszeitraums)			
MONZ-1.2D	E	-														-	X	-	
MONZ-1.2E	E	-														-	X	X	
Weinbaugebiet Mittelrhein																			
BOPP-1.1/1.2	E	-	-	x	6	1(2)												X	
BOPP-2		-	-	x	6	1(2)												X	
BOPP-3		-	-	x	6	1(2)												X	
BOPP-4		-	-	x	6	1(2)	x	x	x										X
BOPP-5																			
BOPP-6		x	1(2)	x	4	1(2)													X
BOPP-H		x	1(2)	-	-	-									H				-
Weinanbaugebiet Pfalz																			
UNG-1	E	x	1(2)	x	10(8)	1(2)	-	x	x									X	
RUPP-1	E	(x)	(2)	(x)	8	2	-	-	-									-	
MAI-1	E	x	2/un	(x)	6	2	-	-	x									-	
BÖCH-1(A-E)	E	x	2/un	(x)	4	2	-	x	x									-	
Weinanbaugebiet Baden																			
NEU-1(A-B)	E	x	un	-	-	-	-	x	x									-	
Weinanbaugebiet Hessische Bergstrasse																			
HEPP-1	E	x	un	x	(8)	2	-	x	x									-	
HEPP-2	E	x	un	x	(2)	2	-	x	-									-	

Material und Methoden

2.2 ZIKADENFANG

Die Zikade *H. obsoletus* war als Vektor der Schwarzholzkrankheit das vorrangige Hauptziel der mittels Gelbfallen bzw. Streifnetz durchgeführten Zikadenfänge. Zur gezielten Beprobung einzelner Pflanzen wurde auch ein motorisierter Laubsauger eingesetzt, der im Gegensatz zum Streifnetz auch den Vorteil bot, an unzugänglichen Stellen der Versuchsflächen Probenahmen durchführen zu können.

Der Fang von *H. obsoletus* diene einerseits der Feststellung der Infektionshäufigkeit in den lokalen Populationen dieser Zikade und andererseits dem Nachweis des Vektors an von der Schwarzholzkrankheit befallenen Standorten in den verschiedenen Weinbaugebieten. Gleichzeitig wurden durch gezielte Beprobung die bevorzugten Nahrungs- und Wirtspflanzen identifiziert. Während die mit den Gelbfallen gefangenen Tiere vor allem zur Erfassung der Flug- u. Migrationsaktivität dienten, wurden die Lebendfänge hauptsächlich für PCR-Tests, Übertragungsversuche und die Untersuchungen trophischer Faktoren verwendet. Auch für die Weiterentwicklung und Evaluierung des Batch-Testverfahrens zum Monitoring des Infektionsdruckes wurden lebend gefangene Tiere benötigt.

Zusätzlich wurden auch andere in den Weinanbaugebieten vorkommende phloemsaugende Zikaden in die Arbeit mit eingeschlossen (vgl. Kap. 3.4.2). Die Untersuchung weiterer Arten sollte Hinweise geben, ob neben *H. obsoletus* auch weitere Zikaden als Vektoren der Schwarzholzkrankheit in Betracht zu ziehen sind. Von besonderer Bedeutung war dabei der Fang von *Oncopsis alni*, nachdem schon in einem bereits abgeschlossenen Forschungsvorhaben die Erreger der FD-Pfalz Krankheit in der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) gefunden und als Überträger *O. alni* als Vektor dieses Phytoplasmas auf Erlen identifiziert wurde. Neben dem Fang der Tiere konzentrierten sich die Versuche auf Übertragungsversuche zum Nachweis der Übertragung des Erregers durch die gleiche Zikade auf Weinreben. Diese Tiere wurden gezielt an solchen Standorten gesucht, an denen diese Krankheit nachgewiesen werden konnte.

2.2.1 Lebend- und Gelbfallenfang von *Hyalesthes obsoletus*

Die Kontrolle der Versuchsflächen mittels Streifnetz und Gelbfallen wurde begonnen, bevor die Flugphase der Imagines einsetzte. Die lebend gefangenen Tiere wurden, sofern sie unmittelbar für PCR-Tests verwendet werden sollten, bei -22°C eingefroren. Dagegen wurden die für Übertragungs- und andere Laborversuche vorgesehenen Tiere in einem Kühlbehälter

Material und Methoden

transportiert, im Labor sortiert, gruppiert und auf die Wirtspflanzen überführt. Im Anschluss an diese Versuche wurden sie ebenfalls für nachfolgende PCR-Tests bei -22°C aufbewahrt.

Der Aushang der Gelbfallen (ca. 12cm x 25cm) erfolgte vor dem erwarteten und prognostizierten Flugbeginn von *H. obsoletus*. In einer Untersuchung zeigte TIEFENBRUNNER (2006), dass zwar die Attraktivität der Fallenfarbe auf Zikaden auch von der Art der Exposition abhängig war, die Fallenfarbe gelb aber immer attraktiv war. Auf den für den Gelbfallenfang vorgesehenen Versuchsflächen wurden in Abhängigkeit der Versuche eine unterschiedliche Anzahl von Gelbfallenstandorten eingerichtet, die in der Regel mit jeweils 2 Gelbfallen ausgehängt versehen wurden. Jeweils eine Gelbfalle wurde dabei in der Krautschicht (Höhe bis etwa 30 cm) und in der Laubwand der Reben (Höhe zwischen 100-120cm) angebracht. Auf den Versuchsflächen BKS-3.2, BKS-6.1, BKS-6.2, PLAT-2 und BOPP-3 wurden Gelbfallenstandorte eingerichtet, deren Gelbfallen sich ausschließlich in der Krautschicht befanden, da diese Fallen ausschließlich zum Nachweis der Vektoren verwendet wurden. Die Kontrolle der Gelbfallen erfolgte wöchentlich bzw. zweiwöchentlich. Dabei wurden die Tiere auf der gesamten Fangfläche gezählt, mit Reinigungsbenzin sorgsam von den Fallen gelöst, in destilliertem Wasser gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und für nachfolgende PCR-Tests bei -22°C eingefroren.

2.2.2 Untersuchungen zur Flugaktivität von *Hyalesthes obsoletus*

Zur Untersuchung der Flugaktivität der Imagines wurden die Gelbfallen- und Lebendfänge ausgewertet. Während die Lebendfänge unmittelbar an den Standorten der Populationen durchgeführt wurden und die Fangzahlen die Größe der jeweiligen Population widerspiegeln, lässt ein Vergleich der Fangzahlen mit den Gelbfallen, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft der Population befanden, eine Aussage über die Flugaktivität der Imagines zu: Große Gelbfallenfangzahlen belegen eine große, niedrige Fangzahlen eine geringe Flugaktivität. Ein zweiter Aspekt der Untersuchung ist, Aufklärung darüber zu erhalten, ob weibliche und männliche Imagines gleichrangig an der Verbreitung der Phytoplasmaose beteiligt sind. Bei den Lebendfängen wurden nur solche Fänge ausgewertet, die nicht für Übertragungsversuche und Versuche zum Einfluss trophischer Faktoren verwendet wurden, da diese Tiere so schnell wie möglich nach dem Fang ohne vorhergehende Geschlechtsunterscheidung auf die Versuchspflanzen gesetzt wurden. Da einige Tiere sich während des Versuchs in der Topferde eingegraben hatten, konnten nach Versuchende nicht alle Tiere wiedergefunden und bestimmt

Material und Methoden

werden. Daher wurden vor allem die für die PCR-Analyse vorgesehenen Fänge diesbezüglich untersucht, da vor jedem PCR-Test eine Geschlechtsbestimmung durchgeführt wurde.

Zur Überprüfung der Thesen, ob die Fangmethode einen Einfluss auf das Geschlechterverhältnis ausübt und ob die Fangergebnisse auf eine bevorzugte Bewegungszone der Tiere schließen lassen (vgl. Tab. 3.2), wird die Pearsons Test-Statistik angewendet. Sie dient der Überprüfung des Unterschieds zwischen erwarteten und beobachteten Werten. Das χ^2 -Maß drückt dabei das Ausmaß der Abweichung zwischen der beobachteten und der erwarteten Häufigkeitsverteilung aus.

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i} \quad \begin{array}{l} \chi^2: \text{Chi}^2\text{-Prüfgröße; } O_i: \text{beobachtete Häufigkeit} \\ E_i: \text{erwartete Häufigkeit; } n: \text{Anzahl aller beobachtbaren Ereignisse} \end{array}$$

2.2.3 Untersuchung der Migrationsaktivität von *Hyalesthes obsoletus*

Zur Untersuchung der Migrationsaktivität von *H. obsoletus* wurden schon im ersten Versuchsjahr zwei Standorte in den Befallslagen am Mittelrhein (Versuchsstandorte BOPP-1 und BOPP-2) und an der Mittelmosel (Versuchsfläche BKS-3) eingerichtet. Ab dem 2. Versuchsjahr wurden an der Mittelmosel noch zwei weitere Standorte (Versuchsflächen BKS-1 und MEHR-2) in die Untersuchung miteinbezogen. Als Voraussetzung zur Feststellung einer möglichen Migrationbewegung wurden hauptsächlich solche Flächen ausgewählt, auf denen im ersten Versuchsjahr durch Gelbfallen- und/oder Lebendfang eine sehr hohe Populationsdichte von *H. obsoletus* nachgewiesen werden konnte. Als weitere unabdingbare Voraussetzung sollten dagegen in den angrenzenden Brach- und Ertragsreblflächen keine Populationen und möglichst auch keine Wirts- und Nahrungspflanzen von *H. obsoletus* auftreten, um zu gewährleisten, dass die in diesen Flächen gefangenen Tiere tatsächlich auch durch Migrationsaktivität eingewandert sind. Eine Ausnahme stellt die Versuchsfläche BKS-3.1 dar. Da diese Fläche 1999 als Junganlage neu angelegt und durch Grubbern und Rigolen von krautigen Pflanzen befreit wurde, diente dieser Standort der Beobachtung, welche Pflanzenarten sich im Hinblick auf mögliche Nahrungspflanzen von *H. obsoletus* auf solch intensiv bewirtschafteten Flächen primär ansiedeln können und ob eine Migration von Tieren aus umliegenden Bereichen stattfindet.

Material und Methoden

Methode zur Feststellung der Migrationsaktivität

Zur Feststellung der Migration von *H. obsoletus* wurden die unten aufgeführten Versuchsflächen, auf denen Populationen festgestellt wurden sowie die in direkter Nachbarschaft liegenden Flächen mit Gelbfallenstandorten ausgerüstet. Die Absicht war, eine Migration der Tiere dadurch nachweisen zu können, indem mit zunehmender Distanz des Gelbfallenstandortes von der Versuchsfläche die Anzahl der gefangenen Individuen abnimmt. Ein weiteres Ziel war die Erprobung der Möglichkeit, mit dieser Methode eine bevorzugte Migrationsrichtung, beispielsweise durch Windverdriftung anhand erhöhter Fangzahlen nachweisen zu können.

Aufbau der Versuchsflächen zur Feststellung der Migrationsaktivität

Versuchsanlage BKS-1 (vgl. Abb. 3.2.2, 3.2.3 und Anhang: Abb. 3.27;):

Auf der langjährigen Brachfläche (BKS-1.1) wurde im ersten Versuchsjahr eine starke Population von *H. obsoletus* festgestellt. Begrenzt wird diese Fläche seitlich bzw. unterhalb von Ertragsreblflächen (BKS-1.2A - BKS-1.2C) und oberhalb von einer Mischzone, bestehend aus einer Ertragsreblfläche und Wald (BKS-1.2D). Die Brachfläche BKS-1.1 war ihrerseits in vier unterschiedliche Versuchspartellen aufgeteilt, um die Auswirkung von Maßnahmen zur Bekämpfung der Wirts- und Nahrungspflanzen von *H. obsoletus* zu untersuchen (Parzelle A: natürliche Sukzession durch Spontanbegrünung mit hoher Populationsdichte der Tiere (.....m²); Parzelle B: Begrünungsversuch mit *Hieracium pilosella*; Parzelle C: Fläche ausschließlich einmal zu Beginn des Forschungsprojektes gegrubbert und im Anschluss der natürlichen Sukzession überlassen; Parzelle 4: Abdeckung mittels Ölleinstroh). Jede Parzelle wurde mit jeweils zwei Gelbfallenstandorten ausgerüstet. In den beiden seitlich angrenzenden Ertragsflächen wurden jeweils entlang dreier Höhenlinien jeweils drei Fallenstandorte im Abstand von ca. 2m eingerichtet. In den oberhalb bzw. unterhalb gelegenen Versuchsflächen, die durch einen Wirtschaftsweg von der Versuchsfläche getrennt waren, wurden sieben bzw. 10 Fallenstandorte eingerichtet.

Versuchsanlage BKS-3:

Auf der ca. 1 ha großen, 1999 eingerichteten Junganlage BKS-3.1 wurden fünf Fallenstandorte auf unterschiedlichen Höhenlinien aufgebaut. An jedem Standort wurde jeweils eine Falle in Bodennähe (ca. 30cm) sowie in 180 cm und 380cm Höhe aufgestellt. In den beiden flankierenden Ertragsflächen BKS-3.2A/B wurden auf denselben Höhenlinien fünf Fallen in Bodennähe montiert.

Material und Methoden

Versuchsanlage MEHR-2 (vgl. Abb. 3.2.4):

Auf der 1999 entstandenen Brachfläche wurden auf zwei unterschiedlichen Höhenlinien zwei Gelbfallenstandorte eingerichtet. In den beiden seitlich angrenzenden, teilweise stark verbuschten Ertragsflächen (MEHR-2.2A-B) wurden auf denselben Höhenlinien beiderseits jeweils drei Fallenstandorte angebracht. In einer unterhalb angrenzenden Brach- bzw. oberhalb gelegenen Waldfläche (MEH-2.2C-D), die jeweils durch einen Wirtschaftsweg getrennt waren, wurden 10 bzw. 7 Gelbfallenstandorte angebracht.

Versuchsflächen BOPP-1.1 (vgl. 3.2.1):

Die Versuchsflächen BOPP-1.1. bis 1.4 befinden sich in den stärksten Befallslagen des Mittelrheins und stehen mit Ausnahme der Versuchsfläche BKS-2 schon unter langjähriger Beobachtung, um die Entwicklung des Durchseuchungsgrades feststellen und den Vektor mittels Gelbfallen nachweisen zu können. Während diese Ertragsflächen durch phytosanitäre Maßnahmen völlig unkrautfrei gehalten wurden, konnte im ersten Versuchsjahr auf der oberhalb gelegenen Ertragsfläche BOPP-2 sowohl eine große Population von *H. obsoletus* als auch ein hoher Bedeckungsgrad von *C. arvensis* festgestellt werden. Zur Beurteilung einer von dieser Fläche ausgehenden Migrationsaktivität wurden die langjährige Versuchsanordnung (3 Gelbfallenstandorte auf unterschiedlichen Höhenlinien pro Versuchsfläche) beibehalten.

2.2.4 Lebend- und Gelbfallenfang anderer phloemsaugender Zikadenarten

Der Fang weiterer, in den untersuchten Weinanbaugebieten vorkommender phloemsaugender Zikadenarten hatte zum Ziel, die Frage zu beantworten, ob neben den bereits bekannten Vektoren *H. obsoletus* und *O. alni* auch noch andere Zikadenarten sich infizieren können und als Vektor für Phytoplasmen in Frage kommen. Dazu wurden die als Beifänge auf den Gelbfallen vorgefundenen Zikadenarten, sofern es sich um Phloemsauger handelte, für darauffolgende PCR-Tests bei -22°C eingefroren. Die lebend gefangenen Tiere wurden zunächst für Übertragungstests verwendet und nach Abschluss des Versuchs ebenfalls bei -22°C eingefroren.

2.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOLOGIE VON *HYALESTHES OBSOLETUS*

Die Untersuchungen zur Biologie von *H. obsoletus* hatte zwei Schwerpunkte. Zum einen sollte der Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung und damit den Beginn der Flugaktivität der Imagines untersucht werden. Ziel war es, daraus ein Prognosemodell zur Bestimmung des Flugbeginns der adulten Zikaden zu entwickeln, das für die bessere Terminierung eventueller

Material und Methoden

Monitoring- und Bekämpfungsmaßnahmen eingesetzt werden sollte. Der zweite Schwerpunkt lag auf den Untersuchungen zum Einfluss trophischer Faktoren auf die adulten Vektoren. Hintergrund dieser Arbeiten war die im Verlauf der Untersuchungen gemachte Beobachtung, dass bei Imagines aus der Pfalz im Vergleich zu anderen Weinbaugebieten nicht nur ein deutlicher Unterschied auf die Wirtspräferenz, sondern auch in Hinblick auf den Flugbeginn existierte.

2.3.1 Prognose des Flugbeginns adulter *Hyalesthes obsoletus*

Als Basis für eine genaue Terminierung des Flugbeginns dienten sowohl die Fangdaten des Forschungsprojektes für den Untersuchungszeitraum 1999-2001 an der Mittelmosel und der Pfalz als auch die Fangdaten des Instituts aus den Jahren 1993 bis 1996 und 1998, die mit Gelbfallen gewonnen wurden (ebenfalls Mittelmosel). Da diese Fallen jeweils für eine Woche exponiert worden waren, konnte die Terminierung des Flugbeginns eine Unschärfe von bis zu einer Woche aufweisen. Als geschätztes Datum des Flugbeginns wurde daher jeweils die Mitte der Expositionswoche gewählt, in denen die Imagines erstmals gefangen wurden. Das jährliche Auftreten der Imagines wurde mit der mittleren täglichen Lufttemperatur und mit der minimalen gemessenen Bodentemperatur in Beziehung gesetzt, die für jedes Jahr ab dem 1. Januar von der meteorologischen Station des Instituts aufgezeichnet wurde. Für die Jahre 2000 und 2001 wurden außerdem von der SLFA Neustadt (Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt Neustadt) Temperaturwerte der Station Dackenheim zur Verfügung gestellt, die zur Berechnung des Flugbeginns für die Population von *H. obsoletus* in Ungstein (Pfalz) verwendet wurden, da an diesem Standort für diesen Zeitraum eine erhebliche Verzögerung des Flugbeginns festgestellt worden war.

2.3.2 Einfluss trophischer Faktoren auf die Überlebensdauer von *Hyalesthes obsoletus*

Zur Untersuchung des Einflusses trophischer Faktoren wurden im Gewächshaus Sämlinge der Wirtspflanzen *C. arvensis* (Ackerwinde) und *A. dioica* (Brennnessel) aus Samen gezogen. Adulte Tiere wurden im Freiland entweder von der Ackerwinde („Ackerwindegruppe; Mittelrhein und Mosel) oder von Brennnessel („Brennnesselgruppe“; Pfalz) gefangen und in einer Klimakammer bei 28 °C auf jeweils eine der beiden Pflanzenarten gesetzt (vgl. Abb. 2.1). Um einen möglicherweise schädigenden Einfluss des Transports auszuschließen, wurden Tiere, die am folgenden Morgen gestorben waren, aus dem Versuch entfernt und nicht berücksichtigt. Im Anschluss daran wurden täglich die toten Tiere aus den Käfigen entfernt und ihre Überlebenszeit in Tagen protokolliert. Für nachfolgende PCR-Tests wurden sie bei -22°C

Material und Methoden

eingefroren. Nach Abschluss des Versuches wurde für jede Pflanzenart die mittlere Lebensdauer der Tiere errechnet und durch Vergleich dieser Werte der Einfluss trophischer Faktoren auf die Überlebenswahrscheinlichkeit abgeschätzt.

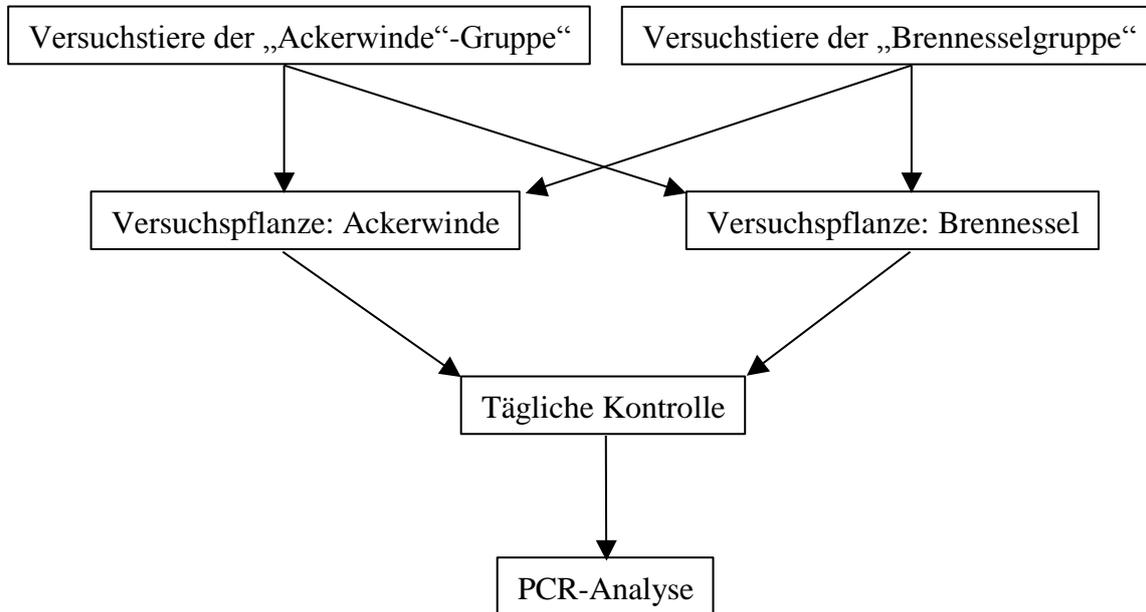


Abb. 2.1: Versuchsschema der Untersuchungen zum Einfluss trophischer Faktoren auf die Überlebensdauer von *H. obsoletus*

2.3.3 Überlebenszeitanalyse

Zur Überlebenszeitanalyse von *H. obsoletus* wurde der Log-Rang-Test durchgeführt (ZIEGLER *et al.*, 2004). Der Log-Rang-Test ist als χ^2 -Test das Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche. Die Grundidee des Tests liegt darin, dass sich die Nullhypothese dann als richtig erweist, falls die Todesfälle der Tiere in zufälliger Reihenfolge auftreten, unabhängig ihrer Gruppenzugehörigkeit. Wenn eine der beiden Gruppen in ihrer Überlebenszeit allerdings der anderen überlegen ist, so wird zwischen den tatsächlich beobachteten und den erwarteten Todesfällen eine Abweichung entstehen.

Zunächst wird die erwartete Anzahl gestorbener Tiere (E_{Ai}) zum Zeitpunkt t_i (Überlebenszeit) berechnet:

$$(1) E_{Ai} = d_i * r_{Ai} / r_i$$

d_i = Anzahl der toten Tiere beider Gruppen A und B am Zeitpunkt t_i ;

(Gruppe A: gleiche Pflanze als Original- und Experimentalwirt;

Gruppe B: unterschiedliche Pflanzen als Original- und Experimentalwirt;)

Material und Methoden

r_{Ai} = Anzahl noch lebender Tiere der Gruppe A unmittelbar vor dem Zeitpunkt t_i ;

r_i = Anzahl der noch lebenden Tiere aus beiden Gruppen zum Zeitpunkt t_i ;

Zum Abschluss wird dann der Unterschied zwischen den beobachteten und der erwarteten Anzahl entsprechend der unten aufgeführten Log-Rang-Statistik (LR) verglichen:

$$(2) \text{ LR} = ((O_A - E_A)^2) / E_A + ((O_B - E_B)^2) / E_B$$

E_A = Summe E_{Ai} ;

O_A = Todesfälle in Gruppe A (Gesamtanzahl der Testtiere der Gruppe A);

O_B = Todesfälle in Gruppe B (Gesamtanzahl der Testtiere der Gruppe B);

$E_B = O_A + O_B - E_A$

Der errechnete Wert der Log-Rang-Statistik erlaubt nun durch den Vergleich mit den Prüfgrößen der χ^2 -Verteilung (mit einem Freiheitsgrad) die Überprüfung auf Signifikanz. Die Überlebenszeit der Testtiere verkürzt sich bei unterschiedlichen Original- und Experimentalwirten dann signifikant, wenn: $\text{LR} > \chi^2$ -Prüfgröße.

2.4 UNTERSUCHUNGEN ZU ÜBERTRAGUNGSEIGENSCHAFTEN VON *HYALESTHES OBSOLETUS* UND ANDERER ZIKADENARTEN

Transmissionsversuche dienen hauptsächlich dazu, die Übertragungsfähigkeit des untersuchten Tieres und damit seine Qualität als Vektor für mikrobielle Erreger festzustellen. Durch sensitive Detektionsverfahren wie die PCR-Technik können beispielsweise auch im Darm von Zikaden Phytoplasmen nachgewiesen werden, obwohl erst eine erfolgreiche Darm-Hämolymphepassage mit anschließender Besiedlung der Speicheldrüse ein infiziertes Tier zu einem potentiellen Vektor qualifizieren. Gleichzeitig lassen sich Pflanzen, die zur Begrünung bzw. zur Bekämpfung von Nahrungspflanzen der Vektoren eingesetzt werden, auf die Möglichkeit, selbst als Reservoirpflanze für die Erreger dienen zu können, überprüfen, indem bekannte Vektoren in Zuchtgefäßen auf die Pflanzen gesetzt werden. Durch Ausprägung von typischen Krankheitssymptomen bzw. durch Anwendung der PCR-Technik kann im Anschluss daran bei den untersuchten Pflanzen eine mögliche Phytoplasmose detektiert werden. Für den Fall, dass bei den untersuchten Pflanzen keine Infektion nachgewiesen werden konnte, ist eine Überprüfung der im Versuch eingesetzten Vektoren unerlässlich, um die Infektionshäufigkeit in der Gesamtheit der untersuchten Versuchstierart festzustellen. Eine Pflanzenart kann dann als Reservoirpflanze für die untersuchten Erreger ausgeschlossen werden,

Material und Methoden

wenn trotz positiv getesteter Versuchstiere keine der Versuchspflanzen nachweislich infiziert wurde. Darüber hinaus können auf diese Weise auch Versuchspflanzen mit ausgewählten Phytoplasmen durch infizierte Vektoren infiziert werden um beispielsweise Symptomausprägungen bestimmter Pflanzenarten beurteilen zu können.

Übertragungsversuche wurden mit den in Tabelle 2.4 aufgeführten Pflanzen- u. Zikadenarten durchgeführt. Der Schwerpunkt lag dabei auf der experimentellen Inokulation (Übertragung der Infektion durch Besaugen) von potentiellen Begrünungspflanzen durch *H. obsoletus* und auf Versuchen zur Identifikation von *O. alni* als Vektor der FD-Pfalz. Zusätzlich wurden 20 weitere, häufig in Weinbergen anzutreffende, phloemsaugende Zikadenarten in Übertragungsversuchen als mögliche Überträger der Vergilbungskrankheit getestet. Als Standardversuchspflanzen wurden *Vicia faba*, die bei einer Phytoplasnose schnell Symptome entwickelt als Vertreter krautiger Pflanzen und Rebstecklinge verwendet. Die Stecklinge wurden aus Schnittholz gewonnen, das zuvor einer Heißwasserbehandlung zur Eliminierung eventueller Phytoplasmainfektionen unterzogen worden war. Alle krautigen Pflanzen und die im Versuch verwendeten Erlen wurden aus Samen gezogen. Bei den Übertragungsversuchen wurden die Versuchstiere in der Regel für sieben Tage, sofern sie nicht vorher gestorben waren, auf Einzelpflanzen gehalten. Alle Versuchstiere wurden danach eingefroren und in PCR-Tests auf eine Phytoplasmainfektion überprüft. Alle krautigen Versuchspflanzen wurden nach Beendigung des Versuchs mit Insektizid behandelt, unter kontrollierten Bedingungen gehalten und beim Auftreten von Krankheitssymptomen, spätestens jedoch nach sechs Monaten für nachfolgende PCR-Tests bei -22°C eingefroren. Die Versuchsreben wurden dagegen zunächst in einem Kalthaus zur Überwinterung gehalten, da sie die Symptome einer Phytoplasnose erst im darauffolgenden Jahr ausprägen. Nach dem Neuaustrieb wurde frisches Blattmaterial durch PCR- Tests auf eine Infektion überprüft. In den Übertragungsversuchen mit *H. obsoletus* wurden neben den Standardübertragungspflanzen auch solche getestet, die als natürliche Wirtspflanzen des Vektors bekannt sind oder zur Begrünung von Weinbergsarealen vorgesehen wurden bzw. häufig dort anzutreffen sind. Für die Pflanzenarten, die erfolgreich inokuliert werden konnten, wurde die Übertragungswahrscheinlichkeit und die Übertragungseffizienz von *H. obsoletus* im Versuch ermittelt (IRWIN & RUESINK, 1986). Aus der Zahl N der Vektoren pro Pflanze und dem Anteil RIO infizierter Versuchspflanzen lässt sich eine Übertragungswahrscheinlichkeit PIO nach (1) abschätzen:

$$PIO = 1 - (1 - RIO)^{1/N} \quad (1)$$

Material und Methoden

Durch Einbeziehung der Infektionshäufigkeit P_{FL} der jeweiligen Vektorpopulation ergibt sich die Übertragungseffizienz PE_{FF} (2):

$$PE_{FF} = P_{IO}/P_{FL} \quad (2)$$

Während die Übertragungswahrscheinlichkeit ein Maß für die Wahrscheinlichkeit der Inokulation einer Pflanze durch Besaugung eines Vektors darstellt, stellt die Übertragungseffizienz, bezogen auf die infizierten Vektoren, den Anteil erfolgreicher Inokulationen pro infiziertem Vektor dar.

Material und Methoden

Tab. 2.4: Zusammenfassung der Übertragungsversuche von 1999 bis 2001

Mit Ausnahme von *I. stigmaticus* und *O. alni*, die im Anschluss an die Übertragungsversuche mittels der PCR-Analyse auf den Erreger der FD-Pfalz getestet wurden, wurden alle anderen Zikadenarten auf den Erreger der Schwarzholzkrankheit getestet; P: Anzahl der Pflanzen; T: Anzahl der Tiere; V(E): Vertreter der Gattung bzw. Art als Vektor in Europa (E) bzw. Israel (I) bekannt (WEINTRAUB & BEANLAND, 2006)

Versuchspflanze	Anzahl Versuchspflanzen (P) bzw. Versuchstiere (T)	Versuchstier (Zikadenart)																						
		Agallia sp.	Allygus mixtus	Allygus sp.	Aphrodes sp. ^{V(E)}	Cicadella sp.	Cixius sp. ^{V(E)}	Doratura sp.	Euseelis sp. ^{V(E)}	Evacanthus sp.	Hyalesthes obsoletus ^{VK}	Ideocerus stigmaticus	Issus coleoptratus	Macropsis sp. ^{V(E)}	Macropsis fuscula	Neolitorus fenestratus ^{V(I)}	Oliarus panzeri	Oncopsis alni ^{FD-Pfalz}	Penthimia nigra	Phileanus spumarius	Psylla sp.	Tachycixius sp.	Verschiedene Larven	
Alnus glutinosa (Schwarze Erle; Betulaceae)	P										6						1							
	T										24						23							
Artemisia vulgaris (Gemeiner Beifuß; Asteraceae)	P									12														
	T									48														
Cirsium arvense (Ackerkratzdistel; Asteraceae)	P									11														
	T									44														
Clematis vitalba (Gem. Waldrebe; Ranunculaceae)	P									6														
	T									24														
Daucus carota (Wilde Möhre; Apiaceae)	P									27														
	T									108														
Dianthus deltoides (Heide-Nelke; Caryophyllaceae)	P									12														
	T									60														
Trifolium campestre (Gelber Acker-Klee; Fabaceae)	P									17														
	T									80														
Hieracium pilosella (Kl. Habichtskraut; Asteraceae)	P				1				1	42					1	1								
	T				6				3	188					12	2								
Lótus corniculatus (Hornklee; Fabaceae)	P									3														
	T									12														
Lamium purpureum (Rote Taubnessel; Lamiaceae)	P									5														
	T									20														

Material und Methoden

Fortsetzung Tab. 2.4

Versuchspflanze	Anzahl Versuchspflanzen (P) bzw. Versuchstiere (T)	Versuchstier (Zikadenart)																							
		Agallia sp.	Allygus mixtus	Allygus sp.	Aphrodes sp. ^{V(E)}	Cicadella sp.	Cixius sp. ^{V(E)}	Doratura sp.	Euscelis sp. ^{V(E)}	Evacanthus sp.	Hyalesthes obsoletus ^{VK}	Ideocerus stigmaticalis	Issus coleoptrannus	Macropsis sp. ^{V(E)}	Macropsis fuscula	Neolitorus fenestratus ^{V(O)}	Oliarus panzeri	Oncopsis alni ^{FD-Prälz}	Penthimia nigra	Phileanus spumarius	Psylla sp.	Tachycixius sp.	Verschiedene Larven		
Leontodon autumnalis (Herbst-Löwenzahn; Asteraceae)	P									23															
	T									102															
Malva neglecta (Weg-Malve; Malvaceae)	P									6															
	T									24															
Ranunculus bulbosus (Knolliger Hahnenfuß; Ranunculaceae)	P									32															
	T									125															
Silene vulgaris (Taubenkropf-Leimkraut ; Caryophyllaceae)	P									12															
	T									60															
Taraxacum officinale (Gem. Löwenzahn; Asteraceae)	P									24															
	T									110															
Urtica dioica (Große Brennessel; Urticaceae)	P									16															
	T									64															
Vicia faba (Saubohne; Fabaceae)	P	29	1	3	34	1	6	1	4	96	5	2	4	1	14	6	34	16		1	1	2			
	T	26	4	6	17	1	14	3	11	20	19	10	19	1	14	22	106	102		20	2	20			
Vicia villosa (Zottige Wicke; Fabaceae)	P									10							31								
	T									40							167								
Vitis vinifera „Scheurebe“ (Weinrebe; Vitaceae)	P	4			5		2		1		2		3		1	95			1						
	T	40			43		5		9		3		10		16	803			4						
Vitis vinifera „Riesling“ (Weinrebe; Vitaceae)	P									10						3									
	T									100						13									

2.5 NACHWEIS UND DIFFERENZIERUNG REBPATHOGENER PHYTOPLASMEN

Während bei den untersuchten Tieren die PCR-Technik als Nachweisverfahren für eine Phytoplasmose eingesetzt wurde, konnte bei Weinreben im Freiland bzw. im Gewächshaus eine sichere Detektion der Krankheit auch mittels der visuellen Bonitur erfolgen, da infizierte Rebstöcke, sofern es sich nicht um neuangepflanzte Jungpflanzen handelt, eine für eine Vergilbungskrankheit typische und oftmals leicht erkennbare Symptomausprägung (vgl. Abb. 3.2.A ff) aufweisen. Obwohl regionale und jahreszeitliche Stärken in der Ausprägung der Symptome variieren können, ist die visuelle Beurteilung bei Rebstöcken ein sehr geeigneter Parameter, den Durchseuchungsgrad von Ertragsflächen und damit die Bedeutung der Schäden insgesamt festzustellen.

2.5.1 Nachweis der Phytoplasmose bei Rebstöcken mittels visueller Erfassung der typischen Krankheitssymptome

Zur visuellen Erfassung der Phytoplasmose eines Rebstockes, wie sie beispielsweise bei der Feststellung des Durchseuchungsgrades von Ertragsreblflächen angewendet werden konnte, wurde auf die Ausprägung von mindestens einem, meist aber mehrerer sogenannter Leitsymptome geachtet.

Differenzierung von Krankheitssymptomen der Schwarzholzkrankheit

Die Anzahl und die Stärke Symptomausprägungen eines Rebstockes können in verschiedenen Jahren stark variieren. Zusammenfassend wurden folgende Symptome zum Nachweis einer Infektion erfasst:

- Blätter:
- *Blattrollen*: An den Trieben vergilbungsranker Weinreben kann es zu einem starken Einrollen der Blätter kommen, indem sich die seitlichen Blattränder zur Unterseite wölben. Da dieses Merkmal auch mit anderen, sich ähnlich ausprägenden Rebrkrankheiten verwechselt werden kann, ist ein alleiniges Auftreten dieses Merkmals kein Kriterium zur abschließenden Beurteilung einer Phytoplasmose.
 - *Blattverfärbungen*: Anhand von Blattverfärbungen ist eine Infektion am besten zuerkennen. Dabei ist die Ausprägung in Farbton und Stärke sortenabhängig. Während rote Rebsorten eine Rotfärbung zeigen, treten bei weißen Sorten zitronen- bis goldgelbe Verfärbungen auf. Ebenso treten Unterschiede in der Art

Material und Methode

der Verfärbung auf: Bei weißen Rebsorten tritt die Vergilbung zunächst an den Blatthauptadern auf, die sich anschließend über die gesamte Blattfläche ausbreiten kann. Rotweinsorten zeigen dagegen sektoriell scharf abgegrenzte Bereiche einer Rotverfärbung, die sich allerdings ebenfalls über die gesamte Blattfläche ausbreiten kann.

Trauben: - *Traubenverlust*: Bei einer starken Ausprägung der Krankheit ist die Mehrzahl der Trauben verdorrt bzw. abgefallen. Ein mäßigerer Befallsgrad eines Rebstockes äußert sich in der Verrieselung einer variablen Anzahl von Trauben. Dabei weisen die am Stock verbleibenden Trauben oftmals nur ein geringes Mostgewicht mit einem gleichzeitig hohen Säuregehalt auf, wobei bei der geschmacklichen Beurteilung ein dominanter Bittergeschmack registriert werden kann.

Triebe: - *Pusteln*: An den Trieben befallener Rebstöcke können sich ab dem Spätsommer auf den Internodien leicht erhabene Pusteln bilden, die sich schnell schwarz verfärben und oftmals in parallel zueinander liegenden Reihen angeordnet sind.

- *Stauchung*: Seitentriebe können oftmals gestauchte Internodien aufweisen.
- *Andere Symtome*: An den Trieben, an denen die Symtome einer Phytoplasnose auftritt, kann man im Herbst eine ausbleibende Verholzung feststellen. Dabei erscheinen solche Triebe wie von einem lilafarbenen Raureif überzogen.

Auf den in die Erfassung des Durchseuchungsgrades einbezogenen Ertragsflächen wurden die Rebsorten Riesling, Scheurebe, Spätburgunder und Weißburgunder angebaut. Diese Rebsorten weisen im Gegensatz zu anderen Rebsorten wie z.B. Müller-Thurgau ein spezifisches Symtombild auf, was eine sichere Ansprache infizierter Stöcke im Freiland ermöglichte.

Visuelle Erfassung des Durchseuchungsgrades von Ertragsreblflächen

Der Durchseuchungsgrad wurde im Rahmen von Befallsbonituren ermittelt. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag in den stark befallenen Steilhängen der Mosel und des Mittelrheins. Die Ertragsflächen des Mittelrheins (Versuchsflächen: BOPP-1-4) sind vor allem aufgrund der seit mehreren Jahren durchgeführten Beobachtungen über den Verlauf des Durchseuchungsgrades und der damit verbundenen Frage, über welchen Zeitraum eine Pflanze Symtome ausprägen kann, interessant. Zusätzlich wurden solche Ertragsflächen in die Untersuchung miteinbezogen, die an Versuchsflächen grenzten. Im letzten Versuchsjahr wurden abschließend Standorte, an denen Populationen von *H. obsoletus* nachgewiesen wurden, in die

Material und Methode

Bonitur mit einbezogen und der Durchseuchungsgrad dokumentiert. Dabei handelte es sich um Versuchsflächen an der Nahe (Monzingen, Norheim) und in der Ortenau (Neuweier).

Tabelle 2.5: Auftreten typischer Symptome einer Phytoplasmainfektion und die Stärke ihrer Ausprägung

Rebsorte	Symptome			
	Blattrollen	Verfärbung	Pusteln	Trauben
Riesling	ja	gesamtes Blatt; von Hauptblattadern ausgehend;	stark	betroffen
Scheurebe (Stol-Typ)	ja	gesamtes Blatt; von Hauptblattadern ausgehend;	stark	betroffen
Scheurebe (FD-Typ)	ja	gesamtes Blatt; von Hauptblattadern ausgehend;	stark	betroffen
Spätburgunder	selten	rote, sektorielle Blattverfärbung; seltener gesamte Blattfläche;		betroffen

Grundsätzlich wurden alle Reben der Untersuchungsflächen auf Symptome der Vergilbungs-krankheit bonitiert, ohne dass nach der Symptomstärke oder dem Anteil symptomatischer Triebe differenziert wurde. Alle Bonituren wurden aufgrund der in diesem Zeitraum am stärksten ausgebildeten Symptome zwischen Anfang September und Mitte Oktober durchgeführt und vor Beginn der Traubenlese zum Abschluss gebracht. Die Erfassung einer großen Anzahl von Rebstöcken diente auch dazu, anhand von Befallsgradienten auf eine Migrationsaktivität von *H. obsoletus* rückschließen zu können und zusätzlich wurde bei solchen Flächen, die schon unter mehrjähriger Beobachtung standen, die Anzahl der Jahre erfasst, in denen sich aufeinanderfolgend eine Symptomausprägung einstellte.

2.5.2 PCR-Nachweis von Phytoplasmen in Zikaden und Versuchspflanzen

Die PCR ist unter der Voraussetzung, dass die entsprechenden Primer für den Beginn und dem Ende der Zielsequenz zur Verfügung stehen, die sensibelste Nachweismethode für Phytoplasmen. Durch den Einsatz thermostabiler, aus thermophilen Bakterien gewonnenen Polymerasen kann durch eine in vitro-Amplifikation beliebige DNA vermehrt und nachgewiesen werden.

Zur Detektion von Phytoplasmen in Reben, krautigen Wirtspflanzen und Zikaden wurde die Gesamt-DNA nach vorhergehender Phytoplasmaanreicherung isoliert. Zur Aufklärung der Stärke der Infektionshäufigkeit und zu ihrem Verlauf wurde während der Flugzeit der Imagines bei einer genügenden Anzahl gefangener Individuen eine Anzahl von mindestens 50 Tiere pro Flugwoche und Feld als aussagekräftige Mindestanzahl betrachtet und einzeln getestet. Darüber hinaus wurden bei einer genügend großen Probenmenge Gruppentests (*Batch-*

Material und Methode

Tests) durchgeführt, um ein vereinfachtes Verfahren zur Aufklärung von Infektionshäufigkeiten zu entwickeln. Pflanzenproben wurden vor allem von Standorten, an denen die Krankheit erstmals detektiert werden konnte getestet.

Um Fehlinterpretationen aufgrund eventueller Kontaminationen durch Phytoplasma-DNA auszuschließen, wurde sowohl der während der Aufarbeitung der Proben verwendete Homogenisationspuffer als auch nicht infizierte Zikaden (*Fiebiella flori*, Deltocephalinae)¹ aus eigener Laborzucht als Kontrolle getestet.

Materialien, Reagenzien und Bezugsquellen zur Durchführung der PCR-Analyse

Der Hauptanteil der für die PCR verwendeten Chemikalien wurden (wenn möglich in *pro analysis*-Qualität) von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich-Fluka (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) bezogen. Andere Bezugsquellen werden entsprechend aufgeführt.

DNA-Polymerase: Die PCR wurde mit der *Tfl*-Polymerase (Hersteller: Biozym Diagnostic GmbH; Hess. Oldendorf) durchgeführt. Als Reaktionspuffer wurden die jeweils mitgelieferten Puffer verwendet.

Restriktionsenzyme: Die Restriktionsenzyme wurden von folgenden Herstellern bezogen:

MBI Fermentas (Vilnius, Litauen): Alu I ; Tru1 I

BRL life technologies, Eggenstein: Dra I

Die Anwendung erfolgte nach den von den Herstellern empfohlenen Richtlinien und unter Verwendung der mitgelieferten Reaktionspuffer.

DNA-Polymerisationsmix: Hersteller: Eppendorf (Hamburg);

Primer:

Primer zum unspezifischen, universellen Nachweis von Phytoplasmen

Primerpaar	Bezeichnung	Literatur	Hersteller
P1/P7:	P1	DENG and HIRUKI (1991)	MWG-Biotech AG; Ebersberg
	P7	Schneider et al. (1995)	
U5/U3:			MWG-Biotech AG; Ebersberg

Primer zum spezifischen Nachweis für Phytoplasmen der Stolbur-Gruppe (Schwarzholzkrankheit)

verwendetes Primerpaar	Bezeichnung	Literatur	Hersteller
TUF AY	fTUF AY		MWG-Biotech AG; Ebersberg
	rTUF AY		
STOL	fSTOL	AHRENS (1994)	MWG-Biotech AG; Ebersberg
	rSTOL		
STOL 4	STOL 4f	DAIRE <i>et al.</i> (1994)	MWG-Biotech AG; Ebersberg
	STOL 4r		

¹ Die systematische Einteilung der Zikaden richtete sich nach HAUPT (1935).

Material und Methode

Primer zum spezifischen Nachweis für Phytoplasmen der Elm yellows-Gruppe (FD-Pfalz-Krankheit)

Verwendetes Primerpaar	Bezeichnung	Literatur	Hersteller
FD9	FD9 f1 bzw.f2	DAIRE <i>et al.</i> (1997)	MWG-Biotech AG; Ebersberg
	FD9 r1 bzw.r2		
fAY/rEY	fAY	AHRENS (1994)	MWG-Biotech AG; Ebersberg
	rEY		

Sonstige Reagenzien:

Acrylamid (40%): Roth (Karlsruhe);

Agarose: Biozym DNA-Agarose (Biozym Diagnostic GmbH; Hess. Oldendorf);

Deionisiertes Wasser: hergestellt über Ionenaustauschsäulen Seradest (Seradest Reinstwassersysteme; E. Althäuser (Ransbach-Baumbach);

Ethidiumbromid: Roth (Karlsruhe);

HPLC-Wasser Roth (Karlsruhe);

Verbrauchsmaterial:

Dichtfilm: Nescofilm (Nippon Shoji Kaishu (Osaka, Japan);

Pipettenspitzen von Biozym Diagnostic GmbH (Hess. Oldendorf) und Eppendorf (Hamburg);

Rasierklingen: handelsübliche Klingen von Gillette;

Reaktionsgefäße von Eppendorf (Hamburg);

Sofortbildkassetten ISO 3.000/36° DIN von Polaroid (St. Alban, GB);

Geräte:

Gelkammer (horizontal): DNA Sub Cell von BioRad Laboratories (Hercules, USA);

Gelkammer (vertikal): Protean II xi Cell von BioRad Laboratories (Hercules, USA);

Kühlzentrifuge: Centrifugeb5415 C (Eppendorf, Hamburg);

Photoeinrichtung: Polaroid MP 4⁺ von Polaroid mit UV-Schutzfilter Wratten von Eastman Kodak Company (Rochester, USA);

Pipetten: Eppendorf (Hamburg), Lab-systems (Helsinki, Finnland);

Thermocycler: OmniGene TR 3 CM 220 von Hybaid (Teddington, GB);

Thermocycler: Master Cycler Gradient von Eppendorf (Hamburg);

Tischzentrifuge: Biofuge 13 von Heraeus Sepatech (Osterode);

Tischzentrifuge: Centrifuge 5403 von Eppendorf (Hamburg);

Transilluminator TFX-20 M von MWG-Biotech (Münchenstein, Schweiz);

Ultrazentrifuge: Spinco L 50 von Beckman Instruments (München);

Vakuumkonzentrator: Speed Vac SC 110 von Savant Instruments (Holbrook, USA);

Vakuumpumpe: Vacumat 100 von Bachhofer Laboratoriumsgeräte (Reutlingen);

Auswahl von pflanzlichem und tierischem Untersuchungsmaterial

Zum Nachweis einer Phytoplasmaose in Wirts- und Nahrungspflanzen, Rebstöcken, Versuchspflanzen (von den im Gewächshaus durchgeführten Transmissions- und Ernährungsversuchen) und von künstlich infizierten *Catharanthus roseus* wurden hauptsächlich Blattproben der Pflanzen verwendet (Proben des Sprosses können zwar ebenfalls für die PCR aufgearbeitet werden, aber aufgrund des immer in ausreichender Menge vorhandenen Blattmaterials wurde das mit wesentlich geringerem Aufwand aufzuarbeitende Blattphloem verwendet). Die

Material und Methode

großen, bei Rebstöcken meist deutlich hervorgehobene Blattadern wurden mit einer Rasierklinge möglichst ohne umgebendes Blattgewebe von der Blattspreite getrennt. Es wurden vor allem solche Blätter für die Aufarbeitung bevorzugt, an denen sich der vergilbte Blattanteil noch nicht über das ganze Blatt ausgebreitet hat und die Blätter daher noch nicht abgestorben waren. Nekrotische Blattbereiche wurden ausgespart.

Für den Nachweis von Phytoplasmen in tierischem Untersuchungsmaterial wurden, wenn genügend Individuen gefangen werden konnten, lebendgefangene und anschließend bei – 22°C eingefrorene Zikaden bevorzugt, da Tiere, die den Gelbfallen entnommen wurden, teilweise schon bis zu einer Woche sich auf diesen befinden konnten, was zu einer Schädigung des Tiermaterials führen konnte. Für die PCR wurden die Tiere einzeln oder in Gruppen aufgearbeitet. Da von den Zikadenarten, die auf ihre Vektoreigenschaften für Phytoplasmen in die Untersuchung miteinbezogen wurden, keine zweifelsfrei phytoplasmenfreie Laborzuchten existierten, wurde als Negativkontrolle die Zikadenart *Fibriella flori* (Deltocephalinae) aus eigener Laborzucht verwendet.

Erhalt von Phytoplasma-Isolaten zur Kontrolle der PCR- und RFLP -Testergebnisse

Zur Überprüfung positiver PCR-Testergebnisse und zum systematischen Vergleich des RFLP-Musters eines Phytoplasmaisolates mit bekannten Erregertypen werden taxonomisch bedeutsame Phytoplasmaisolate in Kultur gehalten. Da die Phytoplasmen sich nicht außerhalb lebender Wirtszellen kultivieren lassen, wurde eine Alternativwirtspflanze gesucht, in der die Mikroorganismen überleben und sich vermehren können. Ein solcher Alternativwirt ist die im Gewächshaus leicht zu kultivierende Pflanze *Catharanthus roseus*. Die Technik einer künstlichen Phytoplasmaübertragung wurde von KUNKEL (1952) für die Übertragung und Speicherung von Phytoplasmen mittels der „*Cuscuta*-Brücke“ entwickelt. Im ersten Schritt wird dafür ein gesunder Sämling von *C. roseus* in direkter Nachbarschaft zu einer parasitären Pflanze (*Cuscuta campestris* Yunk.) platziert. Nach dem Anwachsen von *C. campestris* wurde im zweiten Schritt eine mit dem zu übertragenden Phytoplasmaisolat infizierte Rebe so angeordnet, dass die auswachsenden Triebe der *Cuscuta* zur Rebe geführt werden konnten. Nach Ausbildung der Haustorien am Rebstock wurden diese Triebe abermals zurück zu *C. roseus* geführt, um durch abermalige Parasitierung die Phytoplasmen der Rebe nun übertragen zu können. Im Falle einer gelungenen Übertragung auf *C. roseus* können die ersten Symptome nach etwa 3-6 Monaten beobachtet werden, die sich zunehmend über die ganze Pflanze ausbreiten. Eine Vermehrung der Phytoplasma-Isolate kann im Anschluss durch Pfropfung auf andere *Catharanthus roseus*-Pflanzen durchgeführt werden.

Material und Methode

Von Vorteil für die molekularbiologische Arbeit ist die hemmstoffarme Phloemflüssigkeit der Pflanzen und die Beobachtung, dass der Titergehalt des Erregers oftmals in wesentlich höheren Konzentrationen als im Originalwirt vorkommt. Bei einer Infektion zeigen diese Pflanzen leicht zu erkennende Blattvergilbungen, Blütenvergrünungen und Wachstumsstörungen. Von den Blättern werden nach Erscheinen der sichtbaren Infektionsmerkmale Blattproben für die PCR aufgearbeitet und die DNA nach einem positiven Nachweis des gewünschten Phytoplasmaisolats in einem Vorratsgefäß bei -22°C als positive Vergleichsprobe aufbewahrt. Mit jedem PCR-Ansatz wurde auch mindestens eine aus *C. roseus* hergestellte Vergleichsprobe als „positiv- Kontrolle“ mitgetestet. Im Falle einer nicht sichtbaren Bande dieser „positiv-Kontrolle“ wurde das PCR-Ergebnis verworfen und der PCR-Test wiederholt.

Tabelle 2.6: Phytoplasmaisolats als positiv-Kontrolle bei der PCR

Zum Vergleich mit Phytoplasmen der Schwarzholzkrankheit (VK; Phytoplasmengruppe: STOL) und der FD-Pfalz (Phytoplasmengruppe: EY)

- +: International verwendete Abkürzung;
- ++: Die deutsche Bezeichnung „Vergilbungskrankheit“ für die in Deutschland vorkommenden Phytoplasmosen der Rebe wurde nach der Detektion eines zweiten Typs einer Vergilbungskrankheit in Deutschland vom „Favescence dorée-Typ“ differenziert. Die in den deutschen Weinbaugebieten wichtigste Vergilbungskrankheit wird daher als *Schwarzholzkrankheit* der Rebe bezeichnet, während die zweite, in Deutschland nur in der Pfalz auftretende Vergilbungskrankheit als *FD-Pfalz* (neuerdings auch als *Palatinate grapevine yellows*) bezeichnet wird.
- +++: Bestimmung der Gruppenzugehörigkeit nach SEEMÜLLER *et al.* (1998)
- 1: R. Credi, Università degli Studi, Bologna Italien; CREDI (1994)
- 2: M. Maixner, BBA Bernkastel-Kues; MAIXNER (1995)
- 3: E. Seemüller, BBA Dossenheim;
- 4: E. Boudon Padieu, INRA Dijon, Frankreich; BOUDON-PADIEU (1996)

Phytoplasma-isolat ⁺	Originalwirt	Land	Name der Krankheit	Phytoplasma-gruppe ⁺⁺⁺	Quelle
CA-1	<i>Vitis vinifera</i> L., cv. Cavecchia	Italien	Giallume della vite	STOL	1
CH-1	<i>Vitis vinifera</i> L., cv. Chardonnay	Italien	Giallume della vite	STOL	
GGY	<i>Vitis vinifera</i> L.	Deutschland	German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit der Rebe ⁺⁺)	STOL	2
SA-1	<i>Vitis vinifera</i> L., cv. Sangiovese	Italien	Giallume della vite	STOL	1
SA-2	<i>Vitis vinifera</i> L., cv. Sangiovese	Italien	Giallume della vite	STOL	
ALY	<i>Alnus glutinosa</i> Gaertn.	Italien	Alder yellows	EY	3
FD 70	<i>Vitis vinifera</i> L.	Frankreich	Flavescence dorée	EY	4

Untersuchte Tier- und Pflanzenarten

Die PCR-Tests zum Phytoplasmennachweis in Pflanzen und Insekten und RFLP-Analysen zur Charakterisierung der Isolate wurden nach bereits beschriebenen Methoden durchgeführt. Um Phytoplasmen unterschiedlicher Gruppen zu detektieren, wurden die unspezifischen Primerpaare fP1/rP7 und fU5/rU3 verwendet. Zum Nachweis der Schwarzholzkrankheit wur-

Material und Methode

den standardmäßig die Primer fStol/rStol und zur Detektion der FD-Pfalz wurden die Primer fAY/rEY eingesetzt.

Für die Differenzierung verschiedener Isolate der einzelnen Erreger sind nicht-ribosomale DNA-Sequenzen hoher Variabilität besonders geeignet. Ein Teil der Amplifikate wurde danach durch RFLP-Analysen charakterisiert. Zur Überprüfung eventueller falsch-positiver Nachweise des Stolbur-Phytoplasmas wurde das Primerpaar f/r-tufAY verwendet, das die Aster-Yellows/Stolbur- gruppenspezifische Amplifikation eines nicht-ribosomalen DNA-Sequenz ermöglicht.

Für die Auswahl der neben den bekannten Vektorarten in die Untersuchung miteinbezogenen Zikadenarten war ihr Vorkommen in den von der Vergilbungskrankheit betroffenen Weinbaugebieten und ihre Zugehörigkeit zu der Gruppe der phloemsaugenden Zikaden ausschlaggebend.

Die Auswahl der getesteten Pflanzenarten erfolgte, um das Testvolumen sinnvoll zu begrenzen, aufgrund ihrer Bedeutung im Nahrungsspektrum von *H. obsoletus*: Nur solche Pflanzen, auf denen diese Tiere gefangen wurden und damit zumindest als Nahrungspflanzen in Betracht zu ziehen sind, wurden gezielt getestet. Darüber hinaus wurden zusätzlich Pflanzen, die in Weinbergsarealen häufig anzutreffen sind und die gleichzeitig aufgrund ihres äußeren Erscheinungsbildes wie Blattverfärbungen, Zwergwuchs Symptome einer Phytoplasmaose aufwiesen, getestet.

In Weinbaugebieten, in denen die Symptome der Vergilbungskrankheit erstmalig oder in nur geringem Ausmaß auftrat, wurden symptomatisch erscheinende Rebstöcke ebenfalls getestet.

Aufarbeitung von tierischem und pflanzlichen Untersuchungsmaterial

1. Detektion von Phytoplasmen der Schwarzholzkrankheit (vgl. REINERT, 1999)

Zum Nachweis der Schwarzholzkrankheit wurde für die größte Anzahl der Proben der gruppenspezifische Primer fSTOL/rSTOL verwendet, während zum Nachweis der FD-Pfalz der gruppenspezifische Primer fAY/rEY zum Einsatz kam (vgl. Tab. 2.7). Von den in Weinreben bekannten Phytoplasmen der Stolburgruppe existierten bisher zwei bekannte Isolate in Deutschland, die die Schwarzholzerkrankung der Weinrebe verursachen. Während das am meisten verbreitete Isolat in den deutschen Weinbaugebieten als Stolbur Muster VK-B bezeichnet wurde, wurde das bisher nur in der Pfalz detektierte zweite Isolat als Stolbur Muster VK-A bezeichnet. Neuere Untersuchungen hatten eine Umbenennung zur Folge (LANGER, M & MAIXNER, M.; 2004). Während die Primer fSTOL / rSTOL für den Nachweis beider Isolattypen verwendet wurden, konnten mit den Primern fSTOL4 / rSTOL4 speziell

Material und Methode

Phytoplasmen des seltenen Stolburisolats Muster A nachgewiesen werden. Durch nachfolgende RFLP-Analysen, bei denen die PCR-Produkte mit *DRA* I verdaut wurden, konnten beide Muster voneinander unterschieden werden (vgl. Abb. 3.17). Durch die Verwendung des gruppenspezifischen Primers *tufAY* und dem anschließenden Verdau mit *HpaII* gelang es, das Stolbur Muster VK-B weiter zu differenzieren in die Gruppen *b* und *c*. Diese neue Gruppe *c* konnte aus *H. obsoletus*, aus *V. vinifera* und *C. sepium* isoliert werden. Es ergibt sich nun folgende neue Differenzierung:

VK-Typ I: Dieser Typ entspricht der *VK-A* (Typ *a* nach *tufAY* / *HpaII*-Analyse)

VK-Typ II bzw. III: Dieser Typ entspricht der *VK-B* (weiter differenziert in Typ *b* bzw. Typ *c* nach *tufAY* / *HpaII*-Analyse)

2. Detektion von Phytoplasmen der FD-Pfalz (vgl. REINERT, 1999)

Von den in Weinreben bekannten Phytoplasmen der FD- Pfalz-Krankheit sind bisher drei unterschiedliche RFLP-Muster unter den Bezeichnungen *FD-Pfalz Muster A – C* bekannt. Die Detektion dieser Phytoplasmen erfolgte mit den gruppenspezifischen Primern *fAY* / *rEY*. Im Falle einer RFLP-Analyse zur Unterscheidung der unterschiedlichen Muster wurde mit ausgewählten Proben eine zweite PCR mit den Primern *fFD9* / *rFD9* durchgeführt, da die Amplifikationsprodukte der *fAY* / *rEY*-Primer für einen Restriktionsverdau zu klein waren. Zur Verbesserung der Ergebnisse wurde von dem Amplifikationsprodukt zusätzlich noch eine „nested-PCR“ mit dem Primern *FD9 F2* / *FD9 R1* angeschlossen und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Tru I* die RFLP-Analyse durchgeführt. Das Restriktionsenzym *Alu I* wurde zur Unterscheidung zwischen Phytoplasmen der FD-Pfalz und Phytoplasmen der *Rubus Stunt* – Erkrankung der Brombeere verwendet.

Material und Methode

Tabelle 2.7: Übersicht über die getesteten Zikadenarten und die dafür verwendeten Primer und Restriktionsenzyme

Primerpaare und Restriktionsenzyme	Zikadenart																			
	Agallia spp.	Allygus sp.	Aphrodes spp.	Cicadella sp.	Cixius sp.	Doratura sp.	Euscelis spp.	Evacanthus spp.	Hyalesthes obsoletus	Idiocerus stigmatalis	Issus coleoptratus	Iassus lanio	Macropsis sp.	Macrosteles sp.	Neolalitorus fenestratus	Oliarus panzeri	Oncopsis alni	Penthimia nigra	Psylla spp.	Verschied. Larven
PCR																				
Verwendung unspezifischer, breit detektierender Primer zur Detektion einer Phytoplasmainfektion																				
fP1 / rP7	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
fU5 / rU3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Verwendung gruppenspezifischer Primer zum Nachweis von Phytoplasmen der Schwarzhholzkrankheit ^A																				
fSTOL / rSTOL	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
ftuf AY / rtuf AY	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
fSTOL4 / rSTOL4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Verwendung gruppenspezifischer Primer zum Nachweis von Phytoplasmen der FD-Pfalz-Krankheit ^B																				
fAY / rEY	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
FD9F2 / FD9R1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
RFLP – Analyse																				
Restriktionsenzym zur Unterscheidung der beiden Stolburtypen <i>VK-A</i> und <i>VK-B</i> von Phytoplasmen der Schwarzhholzkrankheit																				
Dra I	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Restriktionsenzym zur Unterscheidung der vier FD-Pfalztypen Muster A – D von Phytoplasmen der FD-Pfalz																				
Tru II (MSE I)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Alu I	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-

Material und Methode

Tabelle 2.8: Übersicht über die getesteten Pflanzenarten

Herkunft der Versuchspflanzen: A: Franken; B: Nahe: Versuchsfläche MONZ-1.2; C: Mosel Saar Ruwer: Versuchsfläche BKS-6.1; D: Mosel Saar Ruwer: Versuchsfläche BKS-3.1; E: Versuchsfläche Pfalz: UNG-1; F: Spanien;

Primerpaare	Untersuchte Pflanzenarten															
	Alnus glutinosa ^A	Amaranthus retroflexus ^B	Chrysanthemum vulgare ^C	Cirsium arvense	Convolvulus arvensis	Daucus carota	Genista spec	Malva neglecta	Ranunculus repens	Ranunculus bulbosus	Rubus fruticosus	Sambucus spec	Solanum nigrum ^D	Urtica dioica ^E	Vinca minor ^F	Vitis vinifera
FD9F2 / FD9R1	+															
fSTOL / rSTOL		+	+	+	+	+		+	+	+			+	+	+	+
fAY / rEY							+				+	+				+

Aufarbeitung von Phytoplasmen - DNA aus tierischem Gewebe:

Die Gewinnung von Phytoplasmen – DNA aus tierischem Material erfolgte nach der von Doyle & Doyle (1990) entwickelten und benannten *CTAB* – Methode. Die Benennung dieser Methode erfolgte aufgrund des Cethyltrimethylammoniumbromids (CTAB) als charakteristischer Bestandteil des Mazerationspuffers (CTAB – Puffer; vgl. Tab. 2.11), der in der Untersuchung für die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials verwendet wurde. Für die Homogenisation der Zikaden wurde dagegen der von Daire (1994) modifizierte Homogenisationspuffer verwendet. Im Gegensatz zu pflanzlichem Homogenisat fällt der pH – Wert bei tierischem Ausgangsmaterial nicht stark ab, so dass die Tris-HCl – Konzentration reduziert werden konnte. Ebenso konnte aufgrund der in tierischen Geweben niedrigen Calciumgehalte der EDTA – Gehalt verringert werden. Die Inkubationszeit des Homogenisats im Thermomixer konnte von 30 min (vgl. Daire, 1994) bei gleichen Ergebnissen auf 12 min verkürzt werden.

1. Einzeltierests

Die Einzeltierests wurden mit dem Ziel durchgeführt, die in den verschiedenen Populationen vorkommenden Infektionshäufigkeiten zu testen um diese in Bezug mit den Durchseuchungsgraden der angrenzenden Ertragsreblächen setzen zu können. Die der Untersuchung zu Grunde liegende Frage war, ob sich die Infektionsgröße in einer Population direkt auf den

Material und Methode

Durchseuchungsgrad angrenzender Weinfelder auswirkt. Durch die Zusammenfassung der einzelnen Infektionshäufigkeiten konnte zudem erstmalig für die verschiedenen, von der Schwarzholz-Krankheit betroffenen Weinanbauregionen ein Überblick über die aktuelle Durchseuchung der Vektorpopulationen und der Ertragsreblflächen erreicht werden.

Jeweils eine Zikade wurde in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß mit 300 µl Homogenisationspuffer überführt und mit einem Kunststoffhomogenisator zerrieben. Im Anschluss daran wurde das Homogenisat zur Lyse der Membranen und zur Freisetzung der DNA 12 min im Thermomixer bei 65° C geschüttelt. Danach wurde zur Reinigung von Proteinen 300 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1 v/v) zugegeben und geschüttelt. Nach 5 min Zentrifugation bei 3200 g wurde die obere, wässrige und DNA-haltige Phase (etwa 250 - 300 µl) in ein Reaktionsgefäß überführt und ein zweiter Reinigungsschritt durch abermalige Zugabe von 300 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1 v/v) angeschlossen. Das Gemisch wurde ebenfalls geschüttelt und 5 min bei 3200 g zentrifugiert. Danach wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 300 µl eiskaltem Isopropanol versetzt, sofort geschüttelt und über Nacht (Mindesteinwirkzeit: 20 min) bei -22° C inkubiert. Zur Weiterverarbeitung wurde die Probe 6 min bei 10° C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (15000g). Der Überstand wurde entfernt und das DNA-haltige Pellet mit 300 µl Ethanol (70% v/v) gewaschen. Die Probe wurde danach noch mal 6 min bei 10° C und 15000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem Vakuumkonzentrator getrocknet. Im letzten Schritt wurde das getrocknete Pellet mit 50 µl TE – Puffer (vgl. Tab. 2.11) versetzt und mittels einer Pipette durch mehrfaches, vorsichtiges Ansaugen und Ausdrücken der Flüssigkeit, gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die einzelnen Proben bei -22° C eingefroren. Nach Abschluss der PCR – Tests erfolgte eine langfristige Konservierung bei -80° C. Für die Aufarbeitung größerer Zikadenarten der Gattungen *Aphrodes*, *Cixius*, *Macropsis*, *Oliarus* und *Penthimia* wurden jeweils 500 µl Homogenisationspuffer, Isopropanol und Ethanol verwendet. Die Aufbewahrung der isolierten DNA erfolgte anschließend in 80 µl TE-Puffer.

2. Gruppentests (*Batch-Tests*)

Die Untersuchung einer großen Anzahl einzelner Tiere mittels der PCR ist sehr aufwendig. Zu diesem Zweck wurden, soweit die gefangene Tieranzahl dies erlaubte, Gruppentests mit dem Ziel der Entwicklung einer einfach durchführbaren Methodik zur Feststellung der Infektionshäufigkeit in die Untersuchung miteinbezogen. Im Vergleich zu den Einzeltier-Tests tritt

Material und Methode

allerdings bei Gruppentests aufgrund der beiden Entscheidungsmöglichkeiten „keines der Tiere war infiziert“ oder „ein oder mehrere Tiere der Gruppe waren infiziert“ eine Unpräzision auf. Da sowohl die Häufigkeit infizierter Tiere in einer Population als auch der Anteil positiver PCR-Tests binomial verteilte Größen darstellen, entwickelten BHATTACHARYYA *et al.* (1979) mit dem „infinite population model“ eine Berechnungsgrundlage zur Abschätzung des Werts für die Infektionshäufigkeit („population infection rate“ (IR)) in Populationen, die wesentlich größer sind als die Anzahl der getesteten Tiere. Ausgangspunkt ihrer Berechnung war die vom *Department of Statistics and Department of Entomology* der Universität von Wisconsin entwickelte „minimum field infection rate“-Schätzmethode (MFIR). Diese Methode ist nur für sehr geringe Infektionshäufigkeiten geeignet, während für höhere Infektionshäufigkeiten, bei der mehr als ein Tier in einer Testgruppe positiv sein kann, eine Unterschätzung der wirklichen Höhe auftreten kann

$$\text{MFIR} = \frac{(1-R/n) * 100}{m}$$
$$\text{IR} = (1-(R/n)^{1/m}) * 100$$

MFIR; IR: Prozentualer Anteil infizierter Tiere;
n: Anzahl der Testgruppen;
m: Anzahl der Insekten pro Gruppe (Gruppengröße);
R: Anzahl negativ getesteter Gruppen;

Voruntersuchungen zur Sensibilität der PCR-Technik bei Batch-Tests

Vorangegangene, institutsinterne Voruntersuchungen zur Sensibilität der PCR bezüglich Gruppentests von *H. obsoletus* zeigten die Tendenz, dass ein positives Tier in einer Gruppe von 25 Tieren detektiert werden konnte. Diese Testergebnisse wurden anhand halbiertes Tiere gewonnen, indem die erste Körperhälfte durch Einzeltests überprüft wurde. Im Anschluss wurden Gruppen mit der jeweiligen zweiten Körperhälfte so zusammengestellt, dass genau ein infiziertes Exemplare in einer Gruppe vorhanden sein sollte. Zur Überprüfung dieser Genauigkeit und zur Klärung der Frage, ob die jeweils als „nicht infiziert“ eingestuftes zweiten Körperhälften tatsächlich ebenfalls ein negatives Ergebnis zeigten, wurden daher beide Körperhälften jeweils einzeln getestet und das Gesamtergebnis miteinander verglichen. Mit diesem Verfahren sollte gleichzeitig die in den Voruntersuchungen ermittelte Sensibilität überprüft werden. Insgesamt wurden 489 Tiere entlang der Körperlängsachse auf einer gefrorenen Platte mit Parafilm fixiert, mit einer Rasierklinge halbiert und gemäß der Anleitung von Einzeltier-Tests aufgearbeitet.

Material und Methode

Durchführung der Batch-Tests

Die Gruppentests wurden anhand ungeschnittener und lebendgefangener Tiere durchgeführt. Insgesamt wurden 668 *H. obsoletus* von den Versuchsflächen BOPP-2 (Mittelrhein), MONZ-1.1 (Nahe) und UNG-1 (Pfalz) für die Gruppentests verwendet (vgl. Tab. 2.9). Anhand der Einzeltier-Tests wurden zur Vermeidung unnötiger Gruppentests die Gruppengrößen so ausgewählt, dass möglichst positive und negative Ergebnisse gleichzeitig auftreten konnten, da eine hohe Infektionshäufigkeit in einer Population bei großen Testgruppen zu fast ausschließlich positiven Ergebnissen, niedrige Infektionshäufigkeiten bei kleinen Testgruppen zu fast ausschließlich negativen Testergebnissen geführt hätte.

Tabelle 2.9: Zusammenstellung der Gruppengrößen (m) für die Batch-Tests von *H. obsoletus*
N: Gesamtanzahl der Versuchstiere pro Beprobungsfläche; n_m: Anzahl der Testgruppen; m: Anzahl der Tiere pro Testgruppe;

Beprobungsfläche	Jahr	Fangwoche (Jahreswoche)	n _m	m	N
BOPP-2	1999	24	24	2	138
			10	5	
			4	10	
MONZ-1.1	1999	26	25	2	150
			10	5	
			5	10	
UNG-1	2000	27	4	20	380
		28	10	20	
		31	5	20	

Neben *H. obsoletus* wurden auch andere phloemsaugende Zikadenarten einzeln oder in Gruppen getestet (vgl. Tab 2.10). Diese Testserien dienten dazu, durch Nachweis der Pathogene einen weiteren möglichen Vektor zu identifizieren.

Die Homogenisierung der Tiere, die für die Gruppentests vorgesehen waren, erfolgte bis zu einer Gruppengröße von 3 Tieren in Reaktionsgefäßen (2,0 ml Gefäßvolumen). Tiere, die für größere Gruppentests vorgesehen waren, wurden entsprechend ihrer Gruppengröße (zwischen 4 und 20 Tieren) in einer zuvor mit kochender 0,1 mol HCL-Lösung und sterilisiertem Wasser ausgewaschenen Reibeschale homogenisiert. Die Menge des verwendeten Zikadenpuffers wurde bei allen Gruppentests entsprechend der Gruppengröße angepasst, so dass für jedes Tier einer Gruppe dieselbe Menge Zikadenpuffer eingesetzt wurde, wie sie auch bei den Einzeltier-Tests zur Verfügung stand. Aus dem in den Reibeschalen vorliegenden Homogenisat wurden dann 300 µl in ein Reaktionsgefäß überführt und für 12 min bei 65° C im Thermomi-

Material und Methode

er inkubiert. Anschließend wurde die Aufarbeitung nach der oben beschriebenen Anleitung fortgeführt.

Die Proben, die bis zu einer Gruppengröße von 3 Tieren im Reaktionsgefäß homogenisiert wurden, verblieben dort bis zur ersten Entnahme von 300 µl aus der oberen, wässrigen und DNA-haltigen Schicht. Im Anschluss daran erfolgte die weitere Aufarbeitung ebenfalls nach der oben beschriebenen Anleitung.

Tabelle 2.10: Einzeltier- und Gruppentests zum PCR-Nachweis von Phytoplasmen in phloemsaugenden Zikadenarten

N: Gesamtzahl getesteter Tiere einer Zikadenart; n_m: Anzahl der Testgruppen; m: Anzahl der Tiere pro Testgruppe;

Gelbfallenfänge							
Zikadenart	Primerpaare	Einzeltiertests Anzahl	Gruppentests				N
			m				
			2	3	4	5	
Agallia sp.	f / r Stol	27	3	3	6	3	54
Aphrodes sp.	f / rSTOL; U3 / U5	1					
Cixius sp.	f / r Stol	48					
Fiberiella sp.	fAY / rEY	2					
Idiocerus sp.	fAY / rEY U3 / U5	24					
Jassus sp.	fAY / rEY; U3 / U5	1					
Macropsis sp.	fAY / rEY	143					
Macrosteles sp.	U3 / U5; P1 / P7	16					
Neoalit. fenestratus	f / r Stol	2	5	4	14	101	583
Oliarus panzeri	f / rSTOL;	55					
Ophiola sp.	U3 / U5;	2					
Penthimia nigra	f / r Stol	98					
Streifnetzfänge							
Zikadenart	Primerpaare	Einzeltiertests Anzahl	Gruppentests				N
			m				
			2	3	4	5	
Agallia sp.	f/r Stol	21	6	2	3	4	50
Allygus sp.	AY / EY	2					
Aphrodes sp.	f / rSTOL; U3 / U5	28					
Cixius sp.	f/r Stol	15					
Evacanthus	P1 / P/	1					
Idiocerus sp.	fAY / rEY U3 / U5	1					
Macropsis sp.	fAY / rEY	1					
Neoalit. fenestratus	f / r Stol	29	9	4	1	2	44
Oliarus panzeri	f/r Stol	7					
Oncopsis alni	fAY / rEY	35					

Aufarbeitung von Phytoplasmen-DNA aus pflanzlichem Gewebe

Die Aufarbeitung des Pflanzenmaterials erfolgte unter Verwendung des CTAB – Puffers entsprechend der von Doyle & Doyle publizierten Methode.

Jeweils 0,12 g Pflanzenmaterial wurden in 1,6 ml CTAB – Puffer (vgl. Tab. 2.11) in der Reibeschale homogenisiert und in ein Reaktionsgefäß (2,0 ml Gefäßvolumen) überführt. Das

Material und Methode

Homogenisat wurde anschließend 30 min bei 60° C im Thermomixer inkubiert und geschüttelt. Nach der Zentrifugation bei 2200 g (1 min) wurden 800 µl vom wässrigen und DNA-haltigen Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zusatz von 800 µl Chloroform / Isoamylalkohol (24:1 v/v) ausgeschüttelt und 5 min bei 3200 g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden im Anschluss daran etwa 750 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zwischenschicht zur Vermeidung einer Kontamination nicht mitüberführt wurde. Nach der Zugabe von 800 µl Chloroform / Isopropanol (24:1 v/v) wurden die Proben abermals geschüttelt, 5 min bei 3200 g zentrifugiert und der Überstand (500 – 600 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss daran wurden 800 µl eiskaltes Isopropanol hinzugegeben und über Nacht (Mindestinkubationszeit 20 min) bei –22° C aufbewahrt. Zur Weiterverarbeitung wurde die Probe 5 min bei 10° C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (15000g). Der Überstand wurde entfernt und das DNA-haltige Pellet mit 500 µl Ethanol (70% v/v) gewaschen. Nachdem die Proben noch einmal für 5 min bei 10° C und 15000g zentrifugiert wurden, konnte der Überstand verworfen und das Pellet in einem Vakuumkonzentrator getrocknet werden. Im Anschluss daran erfolgte die Lösung des Pellets durch Zugabe von 80 µl TE – Puffer und die anschließende Aufbewahrung der Proben bis zum Gebrauch erfolgte ebenfalls bei –22° C.

Tabelle 2.11: Zusammenstellung der für PCR und Gelelektrophoresen verwendeten Puffer

1: Pufferzusammensetzung nach Doyle & Doyle (Doyle -Puffer); 2: Pufferzusammensetzung nach Daire;

Chemikalien	PUFFER					
	CTAB ¹	Zikadenaufschlußpuffer ²	TE	Beladungspuffer	TAE	TBE
Tris-Acetat					40 mM	
Tris-Borat						90 mM
Tris - HCl	0,5 M	0,1 M	10 mM			
NaCl	1,4 M	1,4 M				
EDTA	20 mM	10 mM	1 mM		1 mM	2 mM
CTAB	2% (w/v)	2% (w/v)				
2 - Mercaptoethanol	0,2%					
H ₂ O bidest.				10 ml		
Sucrose				4 g		
Bromphenolblau				25 mg		
pH	8,0	8,0	8,0			
Sterilisation (Autoklavierung)	+	+	+	-	-	-

Durchführung der PCR-Tests

Jeder PCR-Test tierischen Materials bestand in der Regel aus 25 Proben: Eine Reinstwasserprobe zum Nachweis eventueller Kontaminationen von Geräten und Chemikalien während der Vorbereitung der PCR - Proben durch Fremd-DNA, einer Positiv – Kontrolle aus Pflan-

Material und Methode

zenproben, die aus Pflanzen hergestellt wurden, die zur Kultivierung verschiedener Phytoplasmenisolate oder durch Übertragungsversuche im Labor künstlich infiziert wurden und den zu testenden Tierproben. Um eine eventuelle Kontamination durch Phytoplasma-DNA während der Aufarbeitungsprozedur ausschließen zu können, wurden in regelmäßigen Abständen sowohl der Zikadenaufschlusspuffer als auch phytoplasmafreie Zikaden aus eigener Laborzucht (*Fibriella flori*, *Deltocephalinae*) gleichzeitig mit den anderen Proben aufgearbeitet und getestet. Zur Absicherung der PCR – Ergebnisse wurde in unregelmäßigen Abständen außerdem die Anzahl der Reinstwasserproben erhöht und vormals positiv getestete Proben zur Reproduzierbarkeit des Testergebnisses wiederholt getestet.

Zunächst wurde das Reaktionsgemisch mit einem Gesamtvolumen von 250 µl hergestellt (vgl. Tab. 2.12). Zur Vereinfachung der Konzentrationsberechnungen wurde das Volumen der Polymerase vernachlässigt). Der Inhalt des Reaktionsgemisches bestand aus 50 µl der 4 dNTPs (2mM), je 50 µl der beiden Primer (je 5 µM), 100 µl „polymerase reaction buffer“ mit einer 2,5 mM Mg²⁺ - Konzentration und 5 µl Polymerase (1U/µl). Bei einem 25er-Ansatz wurde in jedes der 25 PCR – Reaktionsgefäße 10 µl des Reaktionsgemisches, 8 µl Reinstwasser und 2 µl Template der zu testenden Proben bzw. der Kontrollproben pipettiert.

Die Endkonzentration an Mg²⁺-Ionen im PCR-Ansatz war bei ribosomalen Primern für die DNA – Isolation aus Pflanzen mit 2,0 mM höher gegenüber des Ansatzes für tierisches Material. Dieselbe Mg²⁺-Konzentration wurde, unabhängig vom Ausgangsmaterial bei den nicht-ribosomalen Primerpaaren FD9 und STOL4 eingesetzt. Das Reaktionsvolumen wurde dabei auf 25 µl bzw. auf 30 µl pro Probe erhöht (vgl. Tab. 2.12). Höhere Reaktionsvolumina einer Probe waren vor allem dann notwendig, wenn die PCR – Produkte für eine sich anschließende RFLP – Analyse benötigt wurden. Damit die Konzentrationsverhältnisse bei den unterschiedlichen Ansätzen gewahrt wurden, wurde immer auf ein gleiches Volumenverhältnis des Reaktionsgemisches einerseits und des Wassers und Templates andererseits geachtet.

In Vorversuchen wurden die Reaktionsbedingungen der PCR, wie sie von der Arbeitsgruppe des Instituts etabliert waren (REINERT, 1999) überprüft und die Idealbedingungen für die beiden verwendeten Thermocycler getestet. Dabei ergaben sich keine Änderungen der angewendeten Standards. Lediglich die Anzahl der Zyklen wurde beim fSTOL / rSTOL – Primer von 35 Zyklen auf 30 begrenzt, um der Gefahr von Fehlamplifikationen vorzubeugen (vgl. Tab. 2.13). Bei der Verwendung des Thermocyclers „OmniGene TR 3 CM 20“ (Hybaid) wurden die Reaktionsansätze mit 2 Tropfen (ca. 5 µl) Mineralöl beschichtet, während beim Thermocycler „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf) aufgrund der Deckelheizung für das

Material und Methode

Reaktionsgefäß (105°C) darauf verzichtet werden konnte. Im Anschluss an die PCR wurden die Proben zur Visualisierung des Testergebnisses auf Agarosegele aufgetragen.

Tabelle 2.12: Zusammenstellung der Mengen- und Konzentrationsverhältnisse für die PCR

1: Volumen der Polymerase wurde für die Berechnung der einzelnen Stoffkonzentrationen vernachlässigt; a: ribosomale Primer; b: nicht ribosomale Primerpaare: FD9 und STOL4;

Konzentrationsverhältnisse des Reaktionsgemisches (250 µl)¹						
	Reaktionsgemisch				H₂O	Template
	dNTP	je Primer	Polymerase reaction buffer	Polymerase ¹		
Stoffmengen im hergestellten Reaktionsgemisch (250 µl)	50 µl	2*50 µl	100 µl	5 µl	-	
Stoffkonzentrationen des Reaktionsgemisches	0,4 mM	1 µM	a: 2,5 mM Mg ²⁺ b: 4,0 mM Mg ²⁺	5 U bei 250 µl		
Konzentrationsverhältnisse des Gesamtansatzes (500 µl)¹						
	Reaktionsgemisch				H₂O	Template
Stoffmengen im gesamten PCR – Ansatz	50 µl	2*50 µl	100 µl	5 µl	200 µl	25*2 µl
Stoffkonzentrationen im gesamten PCR - Ansatz	0,2 mM	0,5 µM	a: 1,25 mM b: 2,0 mM	5 U bei 500 µl	-	
Mengenverhältnisse pro PCR - Probe						
	Anzahl der Proben	Reaktionsgemisch	H₂O	Template		
Mengenverhältnis eines Ansatzes mit 20 µl Reaktionsvolumen pro Probe	25	10 µl	8 µl	2 µl		
Mengenverhältnis eines Ansatzes mit 25 µl Reaktionsvolumen pro Probe	20	12,5 µl	10,5 µl	2 µl		
Mengenverhältnis eines Ansatzes mit 30 µl Reaktionsvolumen pro Probe	16	15,0 µl	13,0 µl	2 µl		
Verhältnis im Reaktionsgemisch: H ₂ O u. Template		1	1			

Tabelle 2.13: PCR – Bedingungen in Abhängigkeit der verwendeten Primerpaare

Stage: Nr. des PCR – Zyklusses (Programmschritt); Step: PCR – Status, bestehend aus Schmelzen der DNA (m = melting:), Primeranlagerung (a = annealing), DNA – Synthese (e = elongation) und Abkühlphase (c = cooling down);

Primer	Stage	Step	Temperatur (°C)	Dauer (min : s)	Anzahl der Zyklen
Unspezifische Primer					
fP1 / rP7	1	m	94	1 : 00	1
		m	94	1 : 00	
	2	a	55	1 : 00	35
		e	72	1 : 30	
	3	c	25	1 : 00	1
fFU3 / rU5	1	m	94	1 : 00	1
	2	m	94	1 : 00	30
		a	55	1 : 00	

Material und Methode

Fortsetzung Tab. 2.13

Primer	Stage	Step	Temperatur (°C)	Dauer (min : s)	Anzahl der Zyklen
		e	72	0 : 45	
	3	c	25	1 : 00	1

Gruppenspezifische Primer zum Nachweis von Phytoplasmen der Stolbur –Gruppe

fSTOL / rSTOL	1	m	94	1 : 00	1
		m	94	1 : 00	
	2	a	59	0 : 45	30
		e	72	0 : 30	
	3	c	25	1 : 00	1
fTuf AY / rTuf AY	1	m	95	1 : 00	1
		m	95	0 : 30	
	2	a	53	0 : 30	35
		e	72	1 : 00	
		3	c	25	1 : 00
fSTOL 4 / rSTOL 4	1	m	94	1 : 15	1
		m	94	1 : 00	
	2	a	48	1 : 00	35
		e	72	1 : 00	
		3	c	25	2 : 00

Gruppenspezifische Primer zum Nachweis von Phytoplasmen der EY -Gruppe

fAY / rEY	1	m	94	1 : 00	1
	2	m	94	1 : 00	3
	2	a	65	1 : 00	
		e	72	0 : 30	
	3	m	94	1 : 00	
		a	64	1 : 00	3
	4	e	72	0 : 30	
		m	94	1 : 00	1
	5	a	63	1 : 00	
		e	72	0 : 30	
m		94	1 : 00		
a		62	1 : 00	1	
6	e	72	0 : 30		
	m	94	1 : 00		
	a	61	1 : 00	1	
7	e	72	0 : 30		
	m	94	1 : 00		
	a	60	1 : 00	1	
8	e	72	0 : 30		
	m	94	1 : 00		
	a	59	1 : 00	1	
9	e	72	0 : 30		
	m	94	1 : 00		
	a	58	1 : 00	23	
	10	c	25	1 : 00	1
FD9F2 / FD9R1	1	m	94	1 : 30	1
		m	94	0 : 45	
	2	a	48	0 : 30	40
		e	72	1 : 00	
	3	c	25	2 : 00	1

Material und Methode

Restriktionsanalyse nicht-ribosomaler DNA (RFLP-Analysen)

Die RFLP-Analyse wurde zur Detektion verschiedener Isolate (Muster) von reopathogenen Phytoplasmen der *Stolbur*- und der *FD-Pfalz*-Gruppe angewendet. Dazu wurde im Anschluss an die PCR meist eine zusätzliche *nested-PCR* angeschlossen, um die Menge der amplifizierten DNA-Fragmente zu erhöhen. Dieses Verfahren erlaubte auch bei einer im Agarosegel schwachbandig erscheinenden Probe eine genügende Menge von Amplifikationsprodukten zum Restriktionsverdau zur Verfügung zu stellen. Die Auswertung der Restriktionspolymorphismen erfolgte durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die im Gegensatz zur Agarose-Gelelektrophorese eine höhere Trennschärfe zwischen 10 bp und 2000 bp erlaubt.

1. Restriktionsanalyse von Phytoplasmen der Schwarzholzkrankheit (vgl. Abb. 3.17-A)

Zunächst erfolgte der Nachweis von Phytoplasmen der Schwarzholzkrankheit (*Stolbur*-Gruppe) mittels des Primerpaars *STOL*. Mit diesem Primerpaar lassen sich zwar beide Isolate (VK-A und VK-B) der Schwarzholzkrankheit nachweisen, aber aufgrund der ähnlichen Größe beider Fragmente können im grobauflösenden Agarosegel keine Unterschiede festgestellt werden. Zum gesicherten Nachweis des wesentlich seltener, bisher nur in der Pfalz auftretenden *Stolbur* VK-A-Musters wurden PCR-Tests mit dem Primerpaar *STOLA* durchgeführt. Die Absicherung des Ergebnisses erfolgte durch eine anschließende RFLP-Analyse mit dem Restriktionsenzym *DRA I* (vgl. Bilder Tafel 5 und 6). Der Inhalt einer Probe bestand aus 20 µl PCR-Produkt und 6 µl angesetzttem Reaktionsgemisch. Der Ansatz des Reaktionsgemisches bestand aus 0,7 µl Restriktionsenzym *DRAI* (10 U/µl), 2,6 µl mitgeliefertem BSA-Puffer und 2,7µl Reinstwasser und wurde, mit Mineralöl beschichtet, für mindestens 2 Std. im Thermo-mixer inkubiert.

2. Restriktionsanalyse von Phytoplasmen der FD-Pfalz-Krankheit (vgl. Abb. 3.17-B)

Zur Restriktionsanalyse von Phytoplasmen der FD-Pfalz wurden solche Proben verwendet, die beim Primerpaar fAY/rEY ein positives PCR-Ergebnis zeigten. Da für die Restriktionsanalyse größere DNA-Sequenzen zum Verdau notwendig sind, als sie durch das Primerpaar fAY/rEY (ca.300bp) amplifiziert werden, wurde zunächst eine zweite PCR mit dem Primerpaar fFD9/rFD9 angeschlossen, das ein mit ca. 1300bp wesentlich größeres Fragment amplifiziert. Zur Verbesserung der, aufgrund der geringeren Sensibilität dieses Primerpaares meist schwachbandig erscheinenden Agarosegelmuster, wurde noch eine „*nested PCR*“ angeschlossen, um die Menge verfügbaren DNA-Materials zur Restriktionsanalyse zu erhöhen. Dazu wurde das PCR-Produkt mittels TE-Puffer im Verhältnis 1:100 verdünnt und eine wei-

Material und Methode

tere PCR mit dem Primerpaar FD9F2/FD9R1 durchgeführt. Der anschließende Restriktionsverdau wurde unter den obengenannten Bedingungen mit dem Restriktionsenzym *Tru II* durchgeführt.

Gelelektrophorese

Die fertigen Produkte der PCR-Tests und Restriktionsanalysen wurden mittels der Gelelektrophoresetechnik visualisiert, die eine Auftrennung geladener Moleküle erlaubt, wie sie in diesem Falle die DNA darstellt.

1. Agarose-Gelelektrophorese

Die unverdaute DNA der PCR-Produkte wurde auf Agarosegele aufgetragen. Die Agarosekonzentration betrug 1,5% im TAE-Puffer, der gleichzeitig auch als Elektrodenpuffer während der Elektrophorese bei diente. Vor der Polymerisation des Gels wurde der Lösung (60 ml) zur Sichtbarmachung der DNA im Fluoreszenzlicht 2 µl Ethidiumbromid (1%ige wässrige Lösung) hinzugefügt. 6 µl Probe wurden mit 1,5 µl Beladungspuffer gemischt und auf die fertigen Agarosegele aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese erfolgte für etwa 30 min bei 110 V ohne Kühlung.

2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der einzelnen Restriktionsfragmente erfolgte durch die vertikal ausgerichtete Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Konzentration des eingesetzten Acrylamids (40%) im TBE-Puffer, der auch als Elektrodenpuffer diente, war für Amplifikationsprodukte des Primerpaars STOL4 10 %, während für die Amplifikationsprodukte des Primerpaars FD9 5% verwendet wurden. Während der etwa 1-stündigen Polymerisationszeit wurde die Gelkammer zur gleichmäßigen Polymerisation mit einem feuchten Tuch umwickelt. Nach dem Einsetzen der Gelkammer in die Elektrophoreseapparatur und dem Auftragen der Proben (10 µl DNA-Lösung und 2 µl Beladungspuffer) wurde bis zum Einwandern der Proben ins Gel eine 90 V Spannung angelegt und danach auf 140 V erhöht, wobei das Gesamtsystem auf 12°C gekühlt wurde. Nach einer von der Gelkonzentration und der Fragmentgröße abhängigen Laufzeit von 4-6 h wurde die Elektrophorese beendet und das Gel in einem Färbebad (10 µl Ethidiumbromid-Lösung auf 100 µl Wasser) etwa 30 min gefärbt.

Material und Methode

Geldokumentation

Die mittels Ethidiumbromidbindung im UV-Licht sichtbaren DNA-Fragmente im Gel wurden auf dem Transilluminator als typische Bandenmuster bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht und mit dem Sofortbildkamerasystem von Polaroid (MP 4⁺) und der Instantkassette 667 aufgenommen. Aufgrund der UV-Empfindlichkeit wurden den Aufnahmen Wratten 2A und 22 Gelatinefilter vorgeschaltet.

2.6 UNTERSUCHUNGEN ZUM DURCHSEUCHUNGSGRAD VON REBFLÄCHEN

Seit der Erstbeschreibung einer Rebphytoplasnose durch HERSCHLER (1937) hat sich diese Art der Erkrankung sowohl in den nationalen als auch in den Weinanbaugebieten anderer Länder ausgebreitet. Daher war ein Ziel der Untersuchung, den Durchseuchungsgrad ausgesuchter Ertragsflächen festzustellen, den Verlauf einer Durchseuchung im Verlauf mehrerer Jahre zu dokumentieren und festzustellen, ob die Zikade *H. obsoletus* als bereits bekannter Vektor der Schwarzholzkrankheit als alleiniger Überträger für die Übertragung und Verbreitung der Krankheit verantwortlich ist, oder ob auch andere Vektoren eine aktive Rolle bei der Verbreitung einnehmen können. Dazu wurde auf allen Flächen, auf denen der Anteil erkrankter Reben bonitiert bzw. eine Rebphytoplasnose erstmalig festgestellt wurde, gezielt nach dem Vektor *H. obsoletus* und anderen phloemsaugenden Zikaden gesucht. Gleichzeitig wurde der Einfluss bekannter lokaler Populationen von *H. obsoletus* auf den Durchseuchungsgrad untersucht, um Aussagen über einen von den Vektoren ausgehenden Infektionsdruck treffen und somit die Gefährdung angrenzender Ertragsflächen beurteilen zu können.

Zur Feststellung des Durchseuchungsgrades war es daher notwendig, jeden einzelnen Rebstock bezüglich der bekannten Symptome einer Phytoplasnose zu begutachten. Die Einteilung der Diagnose in „kranke“ und „gesunde“ Pflanzen wurde dabei unabhängig anderer möglicher Erkrankungen der Rebe getroffen. Allerdings konnten Schädigungen am Rebstock, die als Folge anderer Ursachen auftraten, die Begutachtung beeinträchtigen und in seltenen Fällen unmöglich machen.

2.7 VERBREITUNG UND BEKÄMPFUNG ALTERNATIVER WIRTS-PFLANZEN VON *HYALESTHES OBSOLETUS*

Die Lebensbedingungen für *H. obsoletus* in Weinbergsarealen werden hauptsächlich durch das Angebot an Wirtspflanzen, an denen sich die Larven der Zikaden entwickeln, und Nahrungspflanzen für die Imagines bestimmt. Aufgrund der polyphagen Lebensweise mit dem darauffolgend größeren Nahrungsspektrum ist die Möglichkeit zur Etablierung lokaler Popu-

Material und Methode

lationen von *H. obsoletus* wesentlich größer als bei dem sich monophag ernährenden Vektor *O. alni*. Aufgrund der gegenüber der FD-Pfalz wesentlich stärker in Erscheinung tretenden Schwarzholzkrankheit gelten vor allem diesem Typ einer Vergilbungskrankheit die Untersuchung zur Verminderung des Infektionsdrucks.

Aus den bisher bekannten Verbreitungsgebieten wie beispielsweise in Italien (BERTACCINI *et al.*, 1995) ist bekannt, dass vor allem die Brennessel *U. dioica* im Lebenszyklus von *H. obsoletus* als Wirtspflanze dient. Daher wurden alle anderen Pflanzenarten, an denen sich diese Zikade in Deutschland entwickelt, als Alternativwirt angesehen. Für die Epidemiologie der Schwarzholzkrankheit spielen diese krautigen Pflanzen als Alternativwirt – in Hinblick auf den natürlichen Zyklus des Pathogens sind sie eher als Hauptwirte zu bezeichnen – eine herausragende Rolle. Daher wurden auf einigen Untersuchungsflächen die wichtigsten Pflanzenarten der Begleitflora bestimmt. Vor allem zwei- oder mehrjährige Arten waren von besonderem Interesse, da nur sie das Überwintern der Erreger ermöglichen und den Zikadenlarven als Infektionsquelle zur Verfügung stehen können.

Material und Methode

Tabelle 2.14: Zusammenfassende Übersicht der Untersuchungen zum Durchseuchungsgrad

	Untersuchungen zum Durchseuchungsgrad von Ertragsreblflächen															Vektoren					
	Feststellung des Durchseuchungsgrades im Rahmen von kontinuierlichen Untersuchungen			Feststellung des Durchseuchungsgrades im Rahmen von Untersuchungen zur Migrationsaktivität von <i>H. obsoletus</i>			Feststellung des Durchseuchungsgrades zum Abschluss der Untersuchungen 2001	Fortsetzung der 1993 begonnenen Beobachtungen über den Verlauf des Durchseuchungsgrades			Feststellung des Durchseuchungsgrades in Weinanbaugebieten, in denen erstmalig Krankheitssymptome beobachtet wurden			Feststellung des Durchseuchungsgrades in Weinanbaugebieten, in denen der Vektor der Schwarzholzkrankheit <i>Hyalesthes obsoletus</i> erstmalig nachgewiesen werden konnte			Fang von <i>Hyalesthes obsoletus</i>		Fang von <i>Oncopsis alni</i>		
Versuchsjahre	1999	2000	2001	1999	2000	2001	2001	1999	2000	2001	1999	2000	2001	1999	2000	2001	1999	2000	2001		
Versuchsflächen																					
	Weinanbaugebiet Mosel Saar Ruwer															+	+				
BKS-1.2				-	+	+													+		
BKS-2. 1 u. 2.2	+	+	+																+		
BKS-3.1 u. 3.2				-	+	+	3,4													+	
BKS-4.1	+	+	+																+		
BKS-6.1 u. 6.2	+	+	2																+		
MEH-1.1	+	+	+																+		
MEH-2.1				-	+	+													+		
PLA-1.2	+	+	+																+		
KRÖ-1	+	+	+																+		
ZELT-1		+	+																+		
	Weinanbaugebiet Nahe															+	-				
NK-1													-	-	+				+		
MONZ-1													-	-	+				+		
	Mittelrhein															+	-				
BOPP-1 bis 5								+	+	+										+	
BOPP-6							+													+	
	Weinanbaugebiet Pfalz															+	+				
UNG-1				+	+	+													+		
MAI-1				+	+	+														+	
BÖCH-1													-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Weinanbaugebiet Baden															+					
NEU-1										-	-	+							+		
	Weinanbaugebiet Hessische Bergstraße															+					
HEPP-1	+	+	+																+		

Material und Methode

Im Hinblick auf ihre Beziehung zu *H. obsoletus* wurden diese Pflanzenarten gezielt auf den Aufenthalt des Vektors mittels Streifnetz untersucht und in vier Kategorien unterteilt. Pflanzenarten, an denen niemals die Vektoren gefangen werden konnten, werden als *Nicht-Wirtspflanzen* angesehen. Als *Zufallswirte* werden solche Pflanzenarten bezeichnet, bei denen gelegentliche Fänge von *H. obsoletus* beobachtet werden konnten, wie dies beispielsweise bei der Weinrebe der Fall ist. Als *Nahrungspflanzen* gelten solche Arten, an denen adulte Vektoren regelmäßig gefangen wurden, während zum Nachweis *echter Wirtspflanzen* Nester der Larvalstadien an den Wurzeln erforderlich sind.

Bisher bekannte, zum Nahrungsspektrum der Larven und Imagines gehörende Pflanzenarten wie z.B. die Ackerwinde *Convolvulus arvensis*, der knollige bzw. kriechende Hahnenfuß *Ranunculus bulbosus* bzw. *Ranunculus repens* und die Brennessel *Urtica dioica* gehören zu den in Weinbergsarealen häufig anzutreffenden Pflanzenarten. Ein Ziel des Forschungsprojektes war daher, weitere Wirts- und Nahrungspflanzen von *H. obsoletus* zu identifizieren und diese auf Symptome einer Phytoplasmainfektion hin zu untersuchen bzw. zu testen.

Ein weiteres Ziel dieser Forschungsarbeit ist die Entwicklung eines Verfahrens zur Minderung des Infektionsdruckes der Schwarzholzkrankheit auf die Reben. Dabei spielt die Bekämpfung der Ackerwinde *C. arvensis* eine besondere Rolle, da sie vor allem in den von der Schwarzholzkrankheit stark betroffenen Steillagen der Mosel, des Mittelrheins und der Nahe als wichtigste Wirts- und Nahrungspflanze für *H. obsoletus* dient und damit als Reservoirpflanze für das Phytoplasma der Schwarzholzkrankheit den wichtigsten Angriffspunkt für Bekämpfungsmaßnahmen darstellt.

2.7.1 Identifikation weiterer Wirts- und Nahrungspflanzen von *Hyalesthes obsoletus*

Während der Flugzeit der Imagines wurden neben den bekannten Nahrungspflanzen auch andere Weinbergskräuter gezielt besammelt, wobei besonders solche Pflanzenarten berücksichtigt wurden, auf denen in der Vergangenheit vereinzelt Imagines gefangen werden konnten. Dazu gehörte auch die Bestimmung von in Weinbergen häufig vorkommenden Pflanzenarten. Von besonderem Interesse war dabei unter dem Aspekt ihrer Bedeutung als Wirts- und Nahrungspflanze für *H. obsoletus* die Auflistung solcher Pflanzenarten, die sich bevorzugt auf neuentstandenen Brachflächen ansiedeln.

Material und Methode

2.7.2 Maßnahmen zur Bekämpfung von Wirts- und Nahrungspflanzen von *Hyalesthes obsoletus* am Beispiel der Ackerwinde *Convolvulus arvensis*

Aufgrund der hohen Anzahl von Individuen von *H. obsoletus*, die an der Ackerwinde gefangen werden konnten, ist diese Wirts- und Nahrungspflanze prädestiniert dafür, Strategien zur Minderung des Infektionsdruckes zu entwickeln. Folgende Aspekte waren dabei von Bedeutung:

- der Verlauf der Ansiedlung von *C. arvensis* auf neuentstandenen Brachflächen, Jung- und Ertragsanlagen;
- Verdrängungseffekte aufgrund der natürlichen Sukzession von neu entstandenen Brachflächen infolge der staatlich geförderten Reduktion der Weinanbaufläche aufgrund ökonomischer Aspekte einerseits bzw. der Flächenstillegung des Winzers durch Aufgabe;
- Die Entwicklung der Populationsdichte von *H. obsoletus* auf Flächen, in denen sich die Ackerwinde etablieren konnte;
- Der Einfluss des Bedeckungsgrades der Ackerwinde auf die Größe lokaler Populationen von *H. obsoletus*;
- Der Einfluss von Bodenbewirtschaftungsmaßnahmen auf den Bedeckungsgrad der Ackerwinde und den Vektorpopulationen;

Der Bedeckungsgrad gibt den Flächenanteil an, den eine Pflanzenart prozentual auf einer Fläche bestimmter Größe einnimmt. Sie dient als Grundlage zur Beurteilung von Maßnahmen zur Verdrängung der unerwünschten Pflanzenart. Zur Bestimmung des Bedeckungsgrades der Ackerwinde wurde ein Messrahmen verwendet, der eine Fläche von 1 m² umspannt und zur besseren Abschätzung des Bedeckungsgrades ein Gitternetzwerk aus 16 gleich großen, quadratischen Feldern besitzt. Der Bedeckungsgrad ergibt sich aus dem Mittelwert aus 24 bzw. 25 Einzelmessungen. Zum Festlegen der Messpunkte wurden Länge und Breite der entsprechenden Fläche erfasst und die Messpunkte wurden, unabhängig von beobachteten Standorten der Wirtspflanze, so angelegt, dass zwischen jedem der Messpunkte ein gleicher Abstand eingehalten wurde. Diese Ausgestaltung dieses Gitternetzes wurde für jede Fläche in den darauf folgenden Jahren beibehalten. Die Erfassung des Bedeckungsgrads erfolgte daher für jede Fläche unabhängig vom Vorkommen bzw. von Agglomerationen von *C. arvensis*. An jedem Messpunkt wurde der Rahmen abgelegt und der Bedeckungsgrad dieser Teilfläche geschätzt.

Material und Methode

2.7.3 Verdrängung der Ackerwinde *Convolvulus arvensis* durch Bodenbewirtschaftungsmaßnahmen (vgl. Tab. 2.1.6)

Traditionell wird die Bekämpfung von krautigen Pflanzen, darunter auch die Ackerwinde, durch den Einsatz von Herbiziden durchgeführt. Neben der Feststellung der Effektivität von Herbizidanwendungen wurden spezielle Versuchsflächen eingerichtet, auf denen eine Bekämpfung mittels Verdrängungseffekte durch konkurrenzstarke, für Steillagen geeignete Begrünungspflanzen (vgl. Tab. 2.1.6) durchgeführt wurde. Dazu wurden auf den Versuchsflächen verschiedene Saatmischungen ausgebracht oder im Gewächshaus vorgezogene Jungpflanzen (z.B. das Kleine Habichtskraut *H. pilosella*) ausgepflanzt. Auch Bodenbearbeitungsmaßnahmen (Grubbern), wie sie häufig zur Auflockerung des Bodens angewendet werden, wurden in die Beobachtungen miteinbezogen. Als eine weitere Versuchsvariante wurden im 2. Versuchsjahr Abdeckungsmaßnahmen durch die Ausbringung von Ölleinstroh auf verschiedenen Versuchspartellen untersucht. Folgende Versuche wurden zur Verdrängung der Ackerwinde im Einzelnen durchgeführt:

1. Anpflanzung verschiedener Kräuter: Aufgrund der Ergebnisse früherer Transmissionsversuche konnte beim Kleinen Habichtskraut *H. pilosella* bisher keine erfolgreiche Übertragung von Phytoplasmen nachgewiesen werden, so dass vor allem diese Pflanzenart zur Bekämpfung der Ackerwinde eingesetzt wurde. Aber auch andere Pflanzenarten wie z.B. *Silene vulgaris*, *Dianthus deltoides*, *Sedum album* wurden erstmalig, vorzugsweise im Rebunterstockbereich zur Verdrängung der Nahrungs- u. Wirtspflanzen von *H. obsoletus* eingesetzt. Um eine ausreichende Wasserversorgung der Jungpflanzen sicher zu stellen, erfolgte die Auspflanzung der im Gewächshaus vorgezogenen Jungpflanzen im Frühjahr zwischen März und April. Auf Ertragsflächen, auf denen eine Begrünung der Gesamtfläche aufgrund von zu erwartenden Schäden durch den intensiven Einsatz landwirtschaftlicher Nutzfahrzeuge durch Befahren der Gänge zwischen den einzelnen Rebzeilen ausgeschlossen werden musste, wurden Anpflanzungen vor allem im Rebunterstockbereich vorgenommen.² Beobachtungen zeigten, dass auf solchen Flächen der Ackerwinde vor allem zwischen den Rebstöcken und dort vor allem im Bereich des Stammes ein Refugium zum Ansiedeln erhalten bleibt.

² Dazu gehörten auch die in Zusammenarbeit von Herrn Dr. H. Mohr (Biologische Bundesanstalt für Land- u. Forstwirtschaft - Institut für Pflanzenschutz im Weinbau in Bernkastel-Kues) in den Jahren 1997 und 1998 angelegten Versuchsflächen, auf denen vor allem im Rebunterstockbereich verschiedene Kräuter ausgesät wurden (vgl. Tab. 2.15).

Material und Methode

2. Abdeckung mittels Ölleinstroh (vgl. Tab. 2.1.6): Die Ausbringung von Stroh in die Gänge zwischen den Rebzeilen wird im Weinbau gelegentlich zur Bodenverbesserung eingesetzt. Zur Bekämpfung der Ackerwinde wurde Ölleinstroh verwendet, dass durch Ausrollen von anfangs etwa 20cm starken, parallel zueinander liegender Schichten auf die Versuchsflächen ausgebracht wurde. Im ersten Versuchsjahr wurde auch eine Abdeckung einer Fläche mittels lichtundurchlässiger, UV-beständiger Folie durchgeführt.

3. Anpflanzung einer Grasbedeckung: Während des Untersuchungszeitraumes wurden verschiedene, im Weinbau oft verwendete Mulchmischungen (vgl. Tab. 2.1.5) mit dem Ziel ausgesät, geschlossene Grasareale zur Verdrängung der Ackerwinde und zur Verhinderung ihrer Wiederansiedlung zu erhalten. Die zur Aussaat vorgesehenen Versuchsflächen wurden, sofern es sich um stillgelegte Ertragsflächen handelte, zunächst von Rebstöcken, Pflöcken und Drahtseilen befreit (Versuchsflächen MAR-1 und PLAT-4). Im Anschluss erfolgte die Auflockerung des Bodens durch Grubbern. Nach der Aussaat der jeweiligen Mulchmischung wurde der Boden durch Walzen geglättet und der Samen gleichzeitig am Boden angedrückt. Die Aussaat erfolgte jeweils im März, damit eine ausreichende Wasserversorgung zur Keimung und Wachstum der Pflanzen sichergestellt wurde.

Tabelle 2.15: Zusammensetzung der zur Verdrängung der Ackerwinde *C. arvensis* verwendeten Pflanzenarten

a: Um Auswascheffekte durch hohe Niederschlagsmengen in Steilhanglagen nach der Aussaat auszugleichen, wurde eine dreifach höhere Samenmenge, als sie üblicherweise im Flachlagenbereich ausgesät wird, berechnet;

Bezeichnung	Zusammensetzung
Mulchmischung 3:	10 % deutsches Weidelgras 50 % Rotschwengel a und h 40 % Wiesenrispe
Mulchmischung 5:	50 % Härtischer Schwengel 15 % Rotschwengel (8horstb. ALDA) 10 % Rotschwengel (kurzauslfr. SMIRNA) 10 % Feinschwengel
Variation 1 ^a :	Berechnung der Mengenverhältnisse für eine Fläche von 1000 m ² : 0,9 kg Senf (9,68%) 4,2 kg Luzerne (45,16%) 2,4 kg Bokharaklee (25,81%) 1,8 kg Mulchmischung 3 (19,35 %)

Material und Methode

Bezeichnung	Zusammensetzung
Variation 2 ^a :	Berechnung der Mulchmenge für eine Fläche von 1000 m ² : 12 kg Mulchmischung 3
Variation 3 ^a :	Berechnung der Mengenverhältnisse für eine Fläche von 1000 m ² : 3,3 kg Mulchmischung 3 (33%) 6,7 kg Mulchmischung 5 (67%)
Variation 4 ^a :	Berechnung der Mengenverhältnisse für eine Fläche von 1000 m ² : 2,5 kg Mulchmischung 3 (29,41%) 6 kg Mulchmischung 5 (70,59%)

Tabelle 2.16: Übersicht der durchgeführten Begrünungsversuche zur Bekämpfung der Wirts- und Nahrungspflanzen von *H. obsoletus*

Untersuchungsstandort	Untersuchungsfläche	Größe (m ²)	Nutzungsart	Versuchszeitraum	Versuche
BKS-1.1	BKS-1.1A	145	Brache (seit etwa 1990)	1999-2001	Kontrollfläche: Spontanbegrünung
	BKS-1.1B	140		1999-2001	Anpflanzung des Kleinen Habichtskrauts <i>Hieracium pilosella</i>
	BKS-1.1C	145		1999	Abdeckung mittels lichtundurchlässiger Folie (ca. 10m ²)
				2000-2001	Abdeckung mittels Ölleinstroh (etwa 20m ²)
	BKS-1.1D	140		1999-2001	Kontrollfläche: Spontanbegrünung nach einmaliger Bodenbearbeitung (Grubbern)
BKS-2.1 ²³	BKS-2.1A	305	Ertragsrebfläche	1999-2001	Kontrollfläche: Spontanbegrünung nach einmaliger Bodenbearbeitung
	BKS-2.1B	305			Anpflanzung des Kleinen Habichtskrauts <i>Hieracium pilosella</i> im Rebunterstockbereich
	BKS-2.1C	375			Unkrautbekämpfung mittels jährlichem Herbizideinsatz
	BKS-2.1D	270			Jährliche Bodenbearbeitungsmaßnahmen
	BKS-2.1E	325			Anpflanzung einer Grasbedeckung (Mulchmischung 3)
	BKS-2.1F	450			Anpflanzung von Gelbklees

³ Die Versuchsanlage wurde geplant und angelegt in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. H. Mohr (Biologische Bundesanstalt für Land- u. Forstwirtschaft - Institut für Pflanzenschutz im Weinbau in Bernkastel-Kues).

Material und Methode

Fortsetzung Tabelle 2.16

Untersuchungsstandort	Untersuchungsfläche	Größe (m ²)	Nutzungsart	Versuchszeitraum	Versuche
BKS-2.2 ¹	BKS-2.2A	120	Ertragsrebfläche	ab 1997	Anpflanzung einer Grasbedeckung (Mulchmischung 3)
	BKS-2.2B	120		ab 1998	Kontrollfläche: Spontanbegrünung nach einmaliger Bodenbearbeitung
	BKS-2.2C	50 Reben pro Kräuterart			Anpflanzung verschiedener Kräuter (<i>Silene vulgaris</i> ; <i>Hieracium pilosella</i> , <i>Dianthus deltoides</i>) im Rebunterstockbereich
	BKS-2.2D	50 Reben			Anpflanzung von <i>Sedum album</i> im Rebunterstockbereich
	BKS-2.2E	50 Reben			Anpflanzung einer Grasbedeckung (Mulchmischung 3)
	BKS-2.2F	50 Reben			Anpflanzung von Gelbklee im Rebunterstockbereich
MAR-1	MAR-1.1	220	Brachfläche (seit 2000)	2000-2001	Anpflanzung einer Gras- und Kräutermischung (Variation 1)
	MAR-1.2	285			Anpflanzung einer Gras- und Kräutermischung (Variation 3)
	MAR-1.3	180			Abdeckung mittels Ölleinstroh (ca. 25m ²)
	MAR-1.4	100			Spontanbegrünung nach einmaligem Herbizideinsatz
	MAR-1.5	400			Kontrollfläche: Spontanbegrünung
	MAR-1.6	90	Brachfläche (seit 2001)	2001	Anpflanzung einer Gras- und Kräutermischung (Variation 1)
	MAR-1.7	170			Anpflanzung einer Gras- und Kräutermischung (Variation 4)
	MAR-1.8	135			Anpflanzung einer Gras- und Kräutermischung (Variation 2)
	MAR-1.9	30			Kontrollfläche: Spontanbegrünung nach einmaliger Bodenbearbeitung
PLAT-4	PLAT-4A	30	Brachfläche (seit 2000)	2000-2001	Abdeckung mittels Ölleinstroh (ca. 10m ²)
	PLAT-4B	100			Kontrollfläche: Spontanbegrünung
	PLAT-4C	220			Anpflanzung einer Gras- und Kräutermischung (Variation 1)
	PLAT-4D	285	Brachfläche (seit 2000)	2000-2001	Anpflanzung einer Gras- und Kräutermischung (Variation 2)
KRÖV-1	KRÖV-1A	350	Ertragsrebfläche	1999-2001	Anpflanzung von <i>H. pilosella</i>
	KRÖV-1B	350			Kontrollfläche: Spontanbegrünung nach einmaliger Bodenbearbeitung
	KRÖV-1C	350			Unkrautbekämpfung mittels regelmäßigem, jährlichem Herbizideinsatzes durch den Winzer
ZELT-1	ZELT-1A bis ZELT-1I	1050	Ertragsrebfläche	2000-2001	Unkrautbekämpfung mittels unregelmäßigem Herbizideinsatzes des Winzers

3 ERGEBNISSE

3.1 FANG PHLOEMSAUGENDER ZIKADEN

3.1.1 Der Fang von *Hyalesthes obsoletus* und seine geographische Verbreitung in den deutschen Weinanbaugebieten

H. obsoletus (vgl. Abb. 3.1a) wurde in allen von der Schwarzholzkrankheit betroffenen Untersuchungsflächen festgestellt. Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden neue Nachweise für Standorte an der Nahe (Bad Kreuznach, Norheim), in der Pfalz (Böchingen) und in Baden (Neuweier) erbracht. Im Weinanbaugebiet Franken (Randersacker) wurden während der Untersuchungen erstmalig vergilbungsranke Reben gefunden und der Vektor mit wenigen Exemplaren nachgewiesen. Im Rheingau konnten sowohl schwarzholzranke Reben als auch der Vektor *H. obsoletus* festgestellt werden. Bisher blieb die Schwarzholzkrankheit allerdings auf die Steillagen der Gemarkung Lorch beschränkt. Damit umfassen die Nachweise sowohl für das Auftreten der Schwarzholzkrankheit als auch für den Vektor *H. obsoletus* die Weinanbaugebiete Baden (Ortenau und Kaiserstuhl), Franken, Hessische Bergstraße, Mittelrhein, Mosel Saar Ruwer, Nahe, Pfalz, Rheingau und Rheinhessen.

Die Fangergebnisse der Lebend- und Gelbfallenfänge von 1999 - 2001 sind für *H. obsoletus* in den Tabellen 3.1a – 3.1b zusammengefasst. Insgesamt wurden von diesem Vektor in 7 Weinanbaugebieten (vgl. Abb. 3.4a) mehr als 11400 Imagines gefangen, der überwiegende Anteil (9982 Individuen) davon mit Streifnetz oder Motorsauger. Die hohen Fangzahlen belegten schon zu Beginn der Untersuchungen, dass die Hauptverbreitungsgebiete von *H. obsoletus* in den deutschen Weinanbaugebieten vor allem die Steillagen an der Mittelmosel und am Mittelrhein betreffen (vgl. Abb. 3.2C: Bilder 9-10). Obwohl die in der Abbildung 3.4a dargestellten Fangergebnisse durch unterschiedlich intensive Fangaktivitäten gekennzeichnet sind (vgl. Tab.3.4a), belegen sie doch die Beobachtung, dass diese Regionen bisher die stärksten Verbreitungsgebiete des Vektors *H. obsoletus* darstellen. Während in den anderen Weinanbaugebieten geeignete Flächen zum Fang des Vektors meist nur in Verbindung mit symptomatischen Reben gefunden werden konnten (vgl. Abb. 3.2: Bilder 1-16), führte an der Mittelmosel vor allem die Beprobung bekannter Wirts- und Nahrungspflanzen zum Fangerfolg (vgl. Abb. 3.2d: Bilder 15-16), so dass dort die Bedingungen zur Einrichtung von Versuchsflächen (Abb. 3.2c, 3.3a-b) bezüglich der Datenerhebung über Migrationsaktivität, Flugverlauf und Bekämpfungserfolg ideal waren.

Ergebnisse



Abb. 3.1a: Der Vektor der Schwarzholzkrankheit *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae)
(Foto: Dr. M. Maixner)

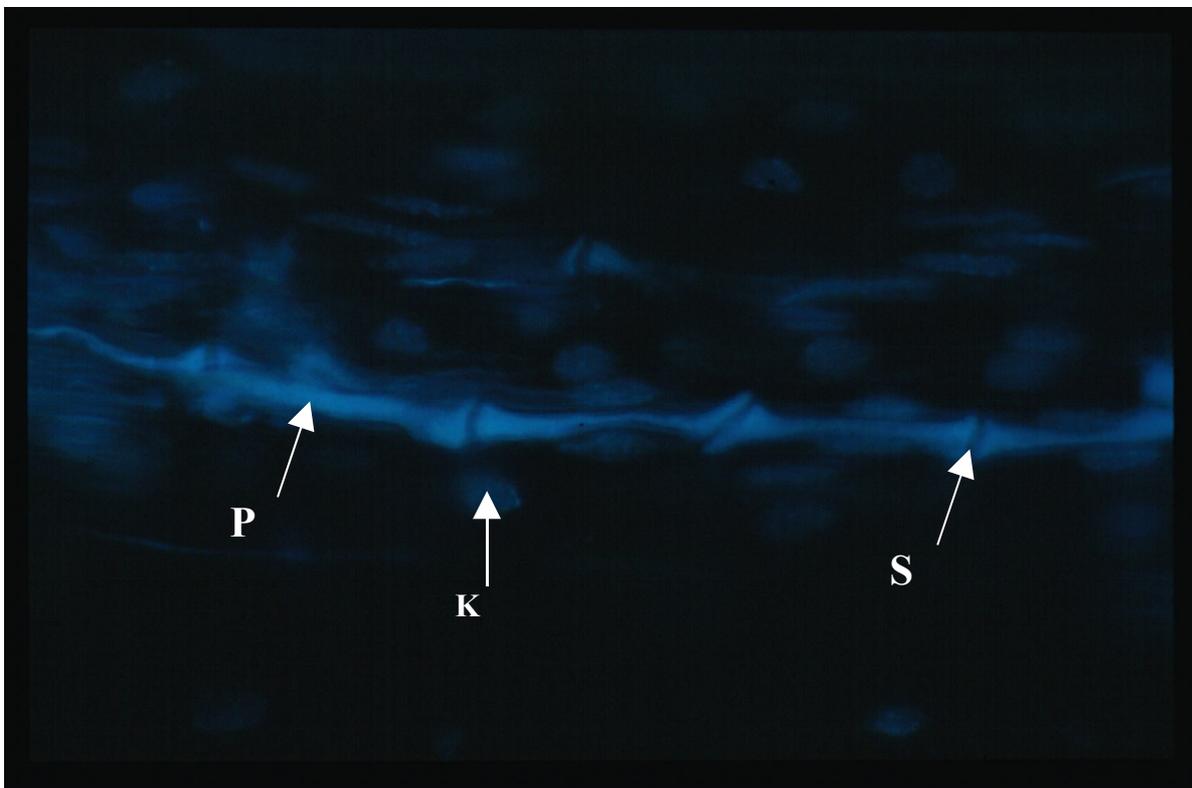


Abb. 3.1b: DAPI-Aufnahme von Phytoplasmen im Phloemgewebe einer Wirtspflanze
(Foto: Dr. M. Maixner)

P: Gefärbte Phytoplasmen-DNA im Leitbündel einer Pflanze; K: Zellkerne des Phloems; S: Siebplatten;

Symptome der Schwarzholzkrankheit - 1

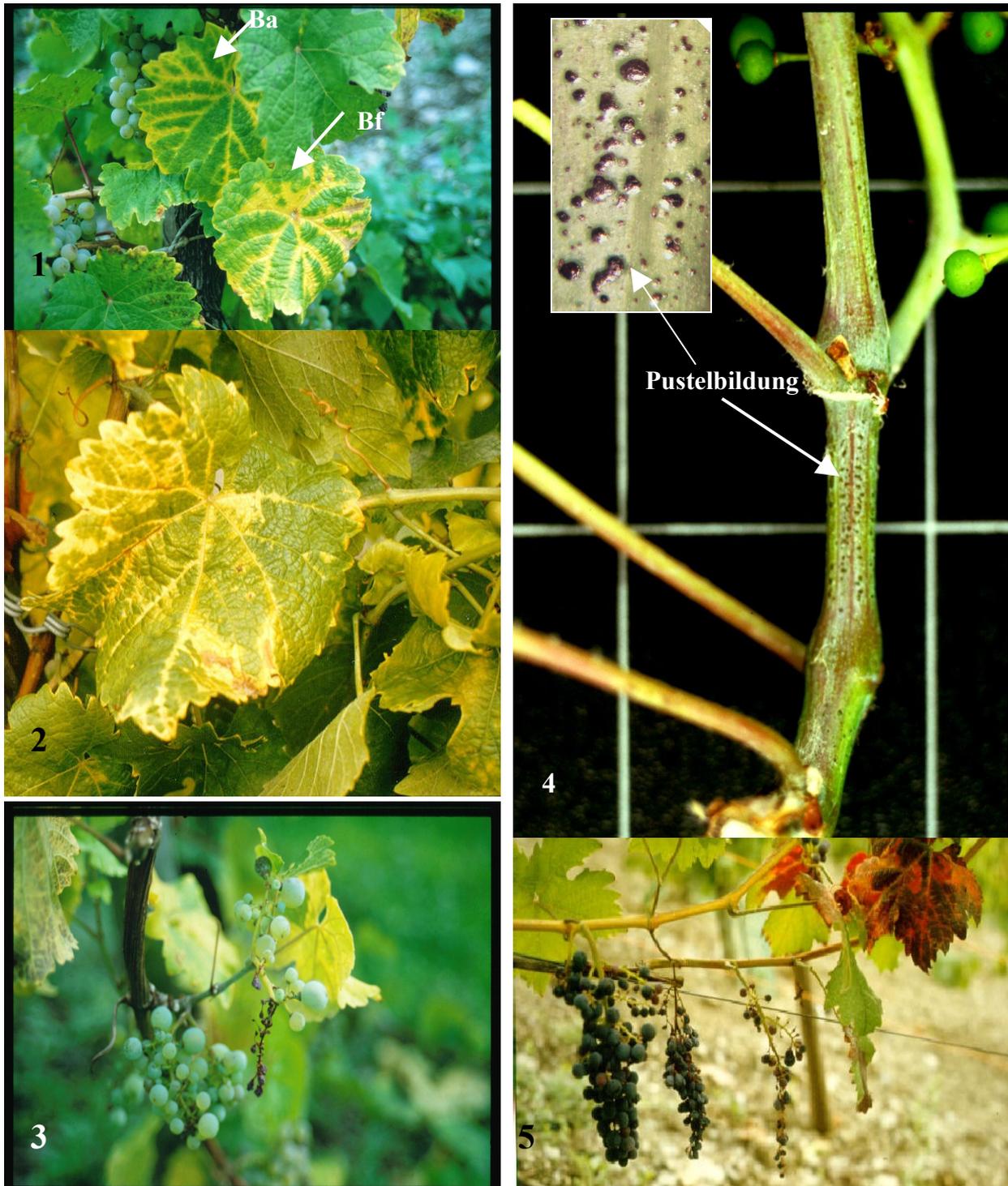


Abb. 3.2a: Symptome der Schwarzholzkrankheit

Bilder 1-2: Blattvergilbungen, von der Blattader ausgehend; Bilder 3-5: Verrieselndes Gescheine; Bild 4: Pustelbildung auf einem unverholztem Trieb;

Während bei Weißweinsorten eine Blattvergilbung auftritt, zeigen Rotweinsorten dagegen eine auffällige Rotfärbung (Bild 5). Die Vergilbung beginnt zunächst im Bereich der Blattadern (Bild 1: Ba) und breitet sich zunehmend über die gesamte Blattfläche aus (Bild 1: Bf).

Symptome der Schwarzholzkrankheit - 2

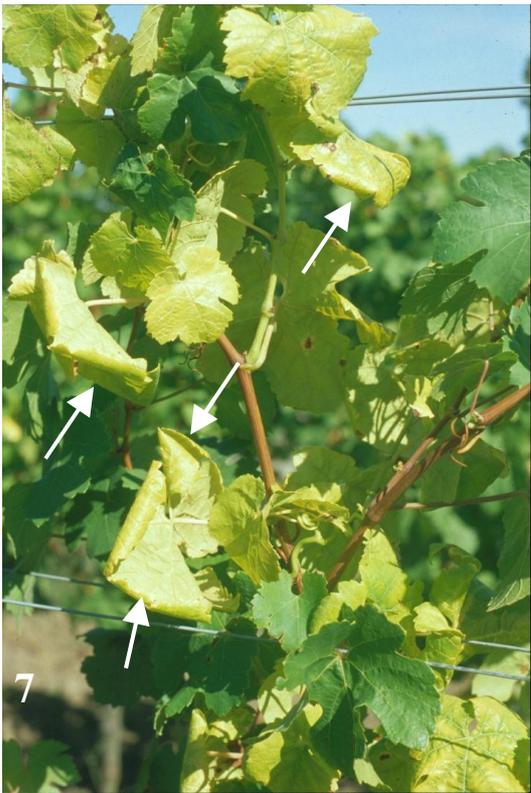


Abb. 3.2b: Symptome der Schwarzholzkrankheit

Bilder 6-7: Blattrollen; Bild 8: Großflächige Blattvergilbung mit leichter Blattrollsymptomatik

Die Symptomatik der Schwarzholzkrankheit kann sich in einem Blattrollen äußern. Dabei neigen sich die Blattränder der Blattrückseite zu (Pfeile). Da das Blattrollen jedoch kein spezifisches Symptom der Schwarzholzkrankheit ist, reicht dieses Krankheitsbild nicht als alleiniges Kriterium zur Beurteilung auf Vorliegen einer Phytoplasma aus.

Symptome der Schwarzholzkrankheit - 3

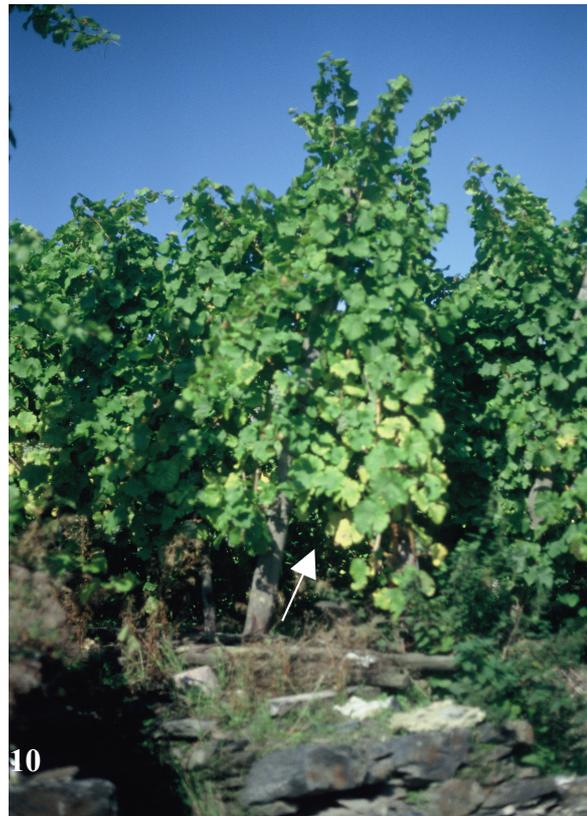
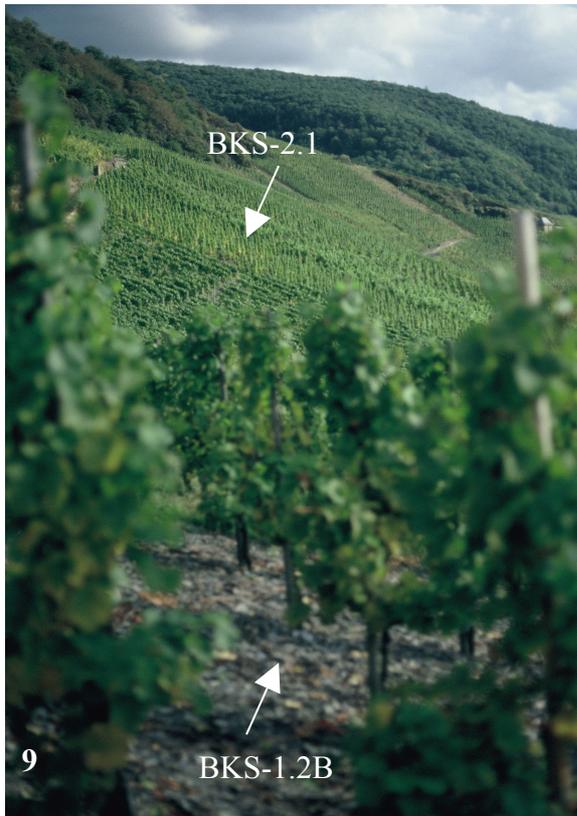


Abb. 3.2c: Erscheinungsbild der Schwarzholzkrankheit im Feld

Bild 9: Panoramaansicht von der Untersuchungsfläche BKS-1.2B (Gemarkung Bernkastel) ausgehend auf umliegende Weinfelder und der Untersuchungsfläche BKS-2.1, auf der eine größere Ansammlung symptomatischer Rebstöcke erkennbar ist; Bild 10: Symptomtragender Rebstock in der Gemarkung Bernkastel; Bild 11: Vereinzelt auftretender symptomatischer Rebstock auf der Untersuchungsfläche BKS-1.2B;

Ergebnisse

Symptome der Schwarzholzkrankheit - 4

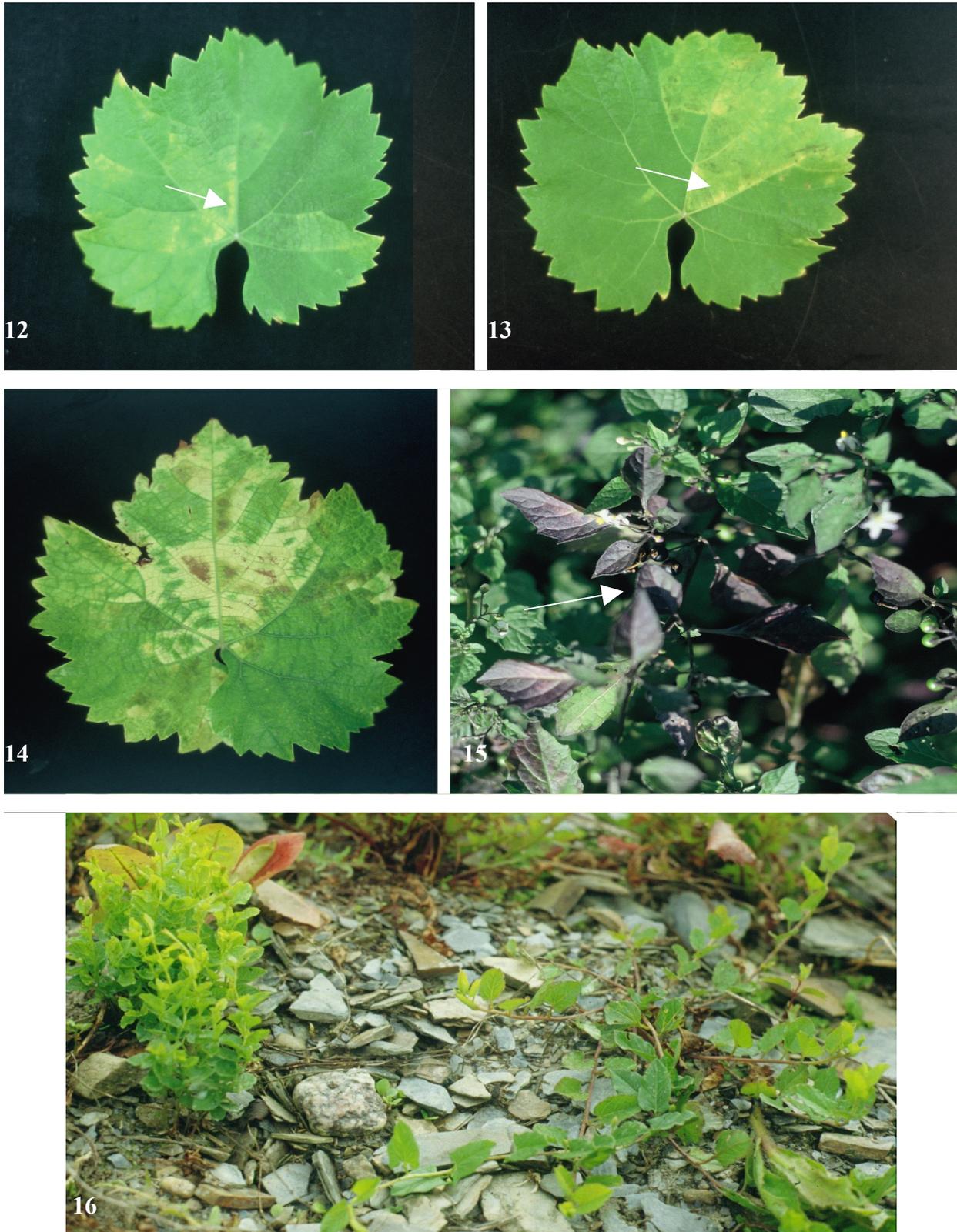


Abb.3.2d: Symptome der Schwarzholzkrankheit

Bilder 12–14: Schwach ausgeprägte Blattsymptomatik (Pfeilmarkierungen); Bilder 15-16: Symptomatische Wirt- bzw. Nahrungspflanzen; Bild 15: Dunkle Blattfärbung als Kennzeichen einer Phytoplasmose bei *S. nigrum* am Untersuchungsstandort BKS-3.1; Bild 16: Symptomatische (links) und gesunde (rechts) Ackerwinde am Untersuchungsstandort BKS-1.1 (Gemarkung Bernkastel);

Untersuchungsflächen-1



Abb. 3.3a: Untersuchungsflächen

Auf der Untersuchungsfläche BKS-1.1 (Bilder 1-2) war die Vektorpopulation auf *die Ackerwinde* spezifiziert, während sie auf der Untersuchungsfläche PLAT-1.1 auf den *Kriechenden Hahnenfuß* spezifiziert war (Bild-3). Unterhalb der Untersuchungsfläche BKS-3.1 konnte sich infolge von Herbizideinsatz *S. nigrum* ausbreiten, der teilweise schon durch Phytosplasmen infiziert worden war (Bild-4).

Untersuchungsflächen-2

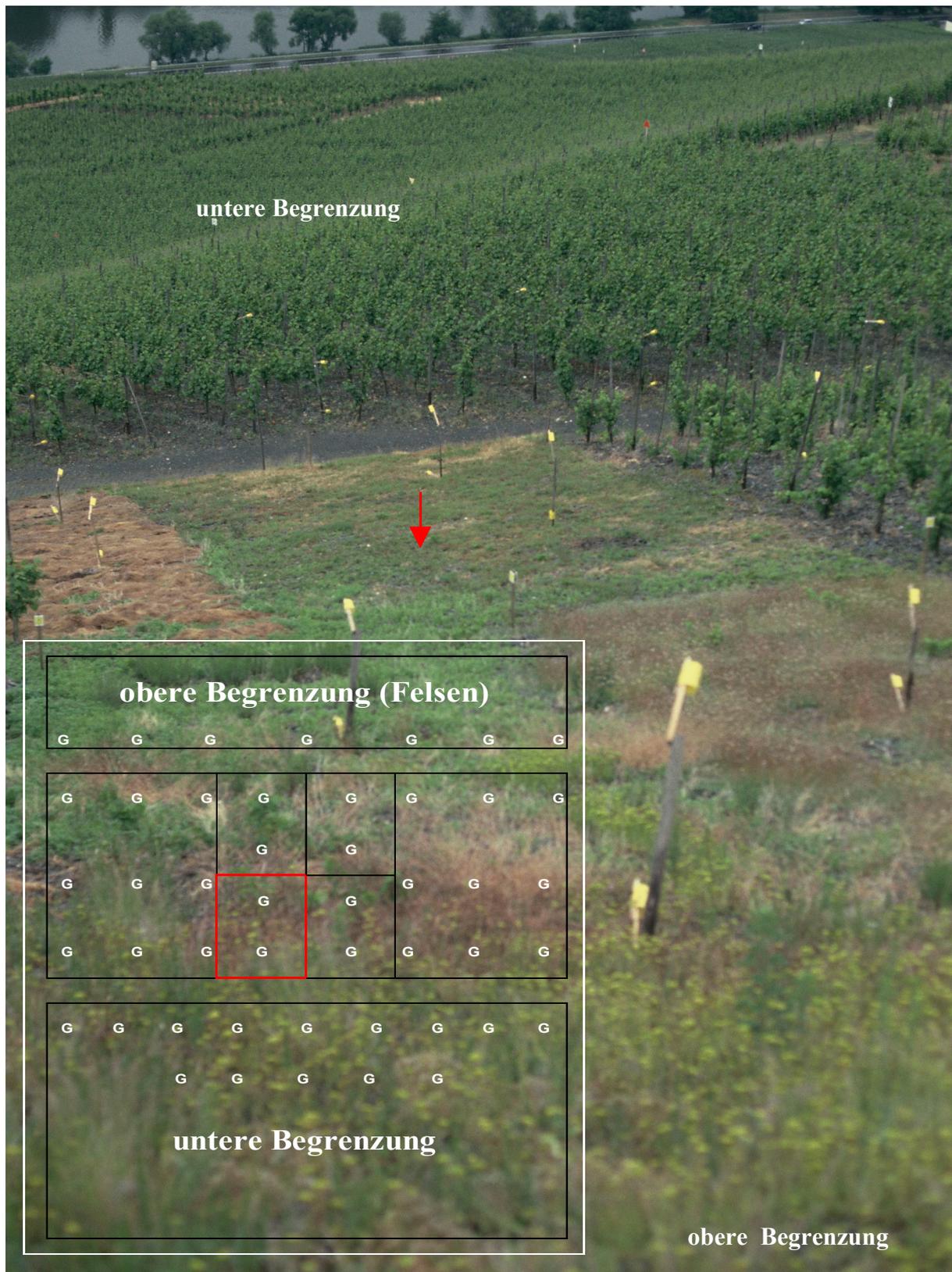


Abb. 3.3b: Anlage zur Untersuchung der Migrationsaktivität von *H. obsolytus*

Zur Feststellung der Migrationsaktivität von *H. obsolytus* wurden um den Populationsstandort (Untersuchungsfläche BKS-1.1A: roter Pfeil) Gelbfallenanlagen aufgebaut. Die integrierte Abbildung zeigt die Anordnung der Gelbfallenanlage um den Populationsstandort (rotes Kästchen) im Überblick.

Ergebnisse

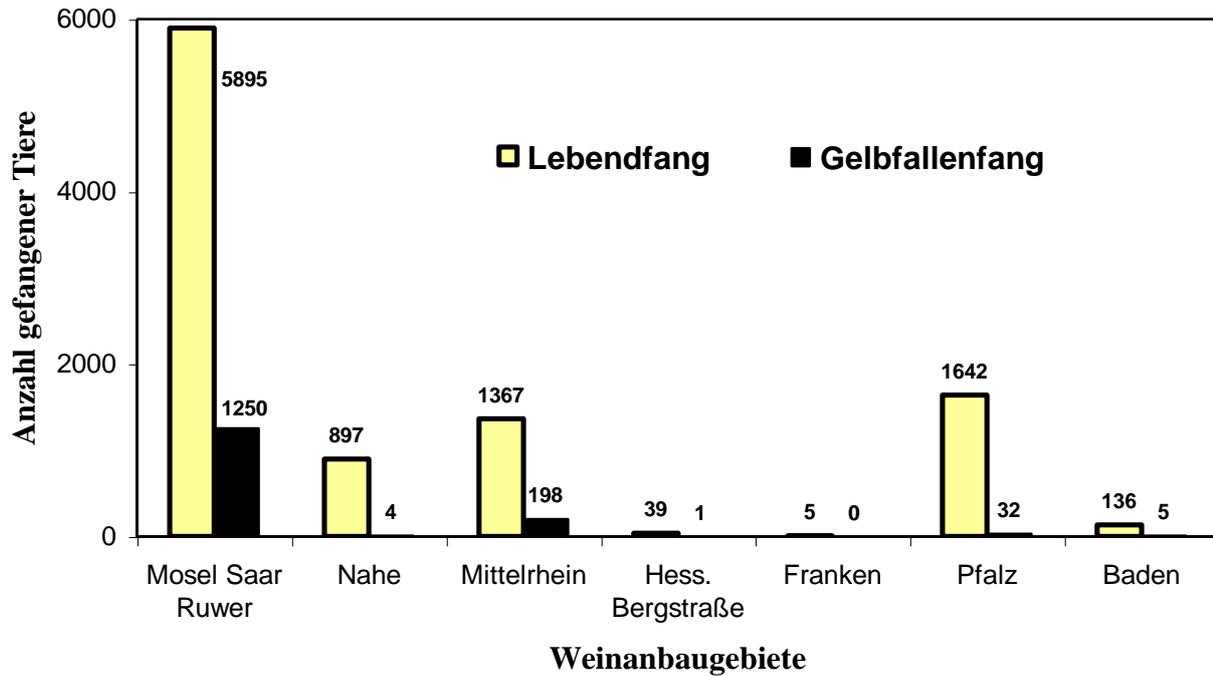


Abb. 3.4a: Übersicht über die Gelb- und Lebendfangzahlen von *H. obsoletus* in den in die Untersuchung einbezogenen Weinanbaugebiete zwischen 1999 bis 2001

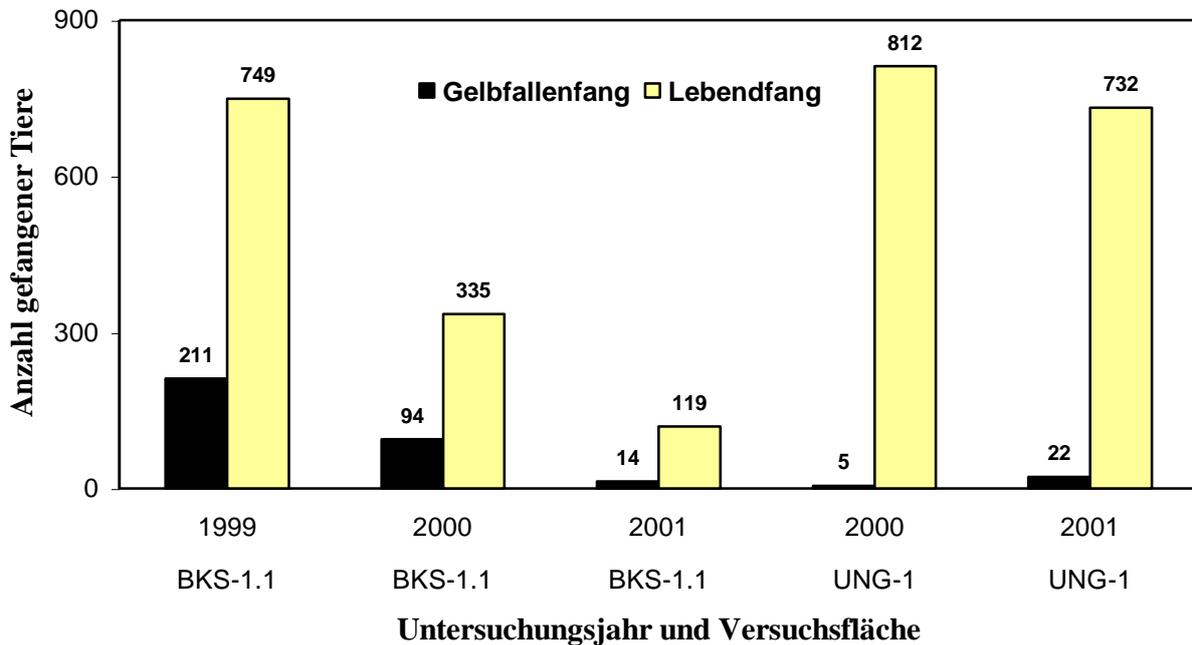


Abb. 3.4b: Einfluss der Fangmethode auf die Fangzahlen von *H. obsoletus*

Der große Unterschied zwischen beiden Fangmethoden offenbart eine geringe Flugaktivität der Imagines. Obwohl die Gelbfallenstandorte im Zentrum von stark besetzten Nahrungsarealen installiert wurden, zeigten vor allem die direkt dort ausgeführten Lebendfänge hohe Fangzahlen und sind somit ein Spiegel der Populationsgröße.

Ab dem 2. Versuchsjahr konnten auch auf den Versuchsflächen in den Weinanbaugebieten Nahe und Pfalz große Fangzahlen von *H. obsoletus* erreicht werden. Im Gegensatz zu den obengenannten Hauptverbreitungsgebieten allerdings beschränkt sich dort die Verbreitung der

Ergebnisse

Vektoren bisher auf lokal eingegrenzte Vorkommen. Besondere Beachtung verdient vor allem die Versuchsfläche UNG-1 (Pfalz), auf der im 2. Versuchsjahr eine sehr starke, auf nur wenige Quadratmeter eingegrenzte Population festgestellt wurde (vgl. Abb. 3.4b). Dieser Standort ist vor allem deshalb interessant, weil die Population trotz des Vorkommens der Ackerwinde fast ausschließlich auf der Brennessel *Urtica dioica* lebte. Im Gegensatz zu allen Populationen, die auf der Ackerwinde bzw. auf dem Kriechenden Hahnenfuß lebten, zeigten diese Populationen eine zu einem späteren Zeitpunkt einsetzende Flugphase (vgl. Abb. 3.6a-c). Auch im 3. Versuchsjahr entwickelte sich in diesem eng eingegrenzten Bereich eine starke Population, ohne Abwanderungsbewegungen in direkt benachbarte Bereiche mit Brennessel zu zeigen. Diese Beobachtung wurde sowohl durch Lebend- als auch durch Gelbfallenfänge bestätigt. Die Beprobung entfernter, nicht in direkter Nachbarschaft liegender Standorte mit Brennessel zeigt außerdem, dass das Vorkommen von *H. obsoletus* auf der Versuchsfläche UNG-1 keine Ausnahme darstellt. Aufgrund desselben, von zwei aufeinander folgenden Generationen genutzten Standortes kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Brennessel *U. dioica* nicht nur als eine bereits bekannte Nahrungspflanze für die Imagines, sondern auch als Wirtspflanze für die Larval- und Imaginalentwicklung von *H. obsoletus* dient.

Im Gegensatz dazu waren die Fangzahlen in den Weinanbaugebieten Hessische Bergstraße, Franken und in Baden während des gesamten Untersuchungszeitraumes sehr gering (vgl. Abb. 3.4a). Die Beprobung dieser Weinanbaugebiete diente aufgrund der in diesen Gebieten erstmaligen Feststellung der Schwarzholzkrankheit vor allem dem Nachweis des Vektors.

Die Lebendfangrate ging auf vielen Untersuchungsflächen kontinuierlich zurück. Allerdings zeigten sich auf solchen Flächen, auf denen sich während des Untersuchungszeitraumes ein hoher Bedeckungsgrad der Wirts- und Nahrungspflanzen erhalten konnte, weiterhin hohe bzw. steigende Populationszahlen (vgl. Tab. 3.19: Fläche (Klasse 5): BOPP-6). Der Rückgang der Lebendfangzahlen wurde entsprechend durch die Gelbfallenfangzahlen bestätigt.

Der Verlauf der Gelbfallen- und Lebendfänge bestätigt damit auch frühere Beobachtungen, dass sich die Flugphase der Imagines, die auf *C. arvensis* als Wirts- und Nahrungspflanze spezifiziert waren, von Anfang Juni bis Ende Juli erstreckt (vgl. Abb. 3.5a und 3.5b). Die hohen Fangzahlen belegen zudem, dass *H. obsoletus* nicht mehr selten ist, sondern in geeigneten Habitaten in hohen Populationen vorkommen kann (vgl. Abb. 3.4a).

Ergebnisse

3.1.1 Untersuchungen zur Flugaktivität von *Hyalesthes obsoletus*

Allgemeine Beobachtungen

Die mittels den Gelbfallen erzielten Fangzahlen sind wesentlich geringer als die mittels Streifnetz bzw. Motorsauger durchgeführten Lebendfänge (vgl. Abb. 3.4a). Zum Teil erklärt sich der große Unterschied dadurch, dass die Tiere bei Lebendfängen direkt von ihren Nahrungspflanzen abgesammelt werden konnten, während sie beim Gelbfallenfang aufgrund ihrer Flugaktivität zufällig auf die Fallenoberfläche gelangen müssen, um daran haften zu bleiben. Dies betrifft vor allem solche Gelbfallenstandorte, die nicht in unmittelbarer Nachbarschaft der Population, sondern beispielsweise in angrenzenden Ertragsflächen installiert wurden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass sogar Fallenstandorte, die direkt in unmittelbarer Nachbarschaft bzw. mitten im Zentrum von stark besetzten Nahrungspflanzenarealen sehr starke Unterschiede im Vergleich zu den an demselben Standpunkt durchgeführten Lebendfängen aufwiesen. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit Beobachtungen, die bei Versuchstieren gemacht wurden, die zur Untersuchung des Einflusses trophischer Faktoren auf die Entwicklung und die Überlebenszeit im Gewächshaus gehalten wurden: Tiere, die in kleinen Gruppen auf eine Pflanze gesetzt wurden, wanderten nur in geringem Maße auf die sich im demselben Topf befindliche Nachbarpflanze. Die meisten Tiere wanderten auf dem Stängel nur soweit, bis sie einen geeigneten Platz (meistens die Hauptblattader auf der Blattunterseite) zum Besaugen gefunden hatten. Daraus lässt sich schließen, dass die Flugaktivität der Imagines gering ist und die Tiere den nächstbesten Standort mit geeigneten Nahrungspflanzen aufsuchen.

Eine weitere interessante Feststellung ergab sich aus der Auswertung derjenigen Gelbfallenstandorte, bei denen die Gelbfallen sowohl in der Krautschicht (Höhe etwa 30 cm) als auch in der Laubzone der Weinreben (Höhe etwa 100-120 cm) montiert waren (vgl. Abb. 3.7). Der überwiegende Anteil der Gelbfallenfänge von *H. obsoletus* wurde im Vergleich zu einer theoretisch erwarteten Gleichverteilung mit einer hohen Signifikanz von $p \lll 0,001$ auf den in Bodennähe montierten Gelbfallen erzielt (vgl. Tab. 3.2), während auf den Gelbfallen der Laubschicht lediglich 12,1 % der Imagines gefangen werden konnten. Daraus ergibt sich, dass sich die Bewegungszone der Tiere vor allem in der Krautschicht befindet und eine aktive Migration daher in den meisten Fällen wahrscheinlicher auftritt als eine passive Windverdriftung.

Ergebnisse

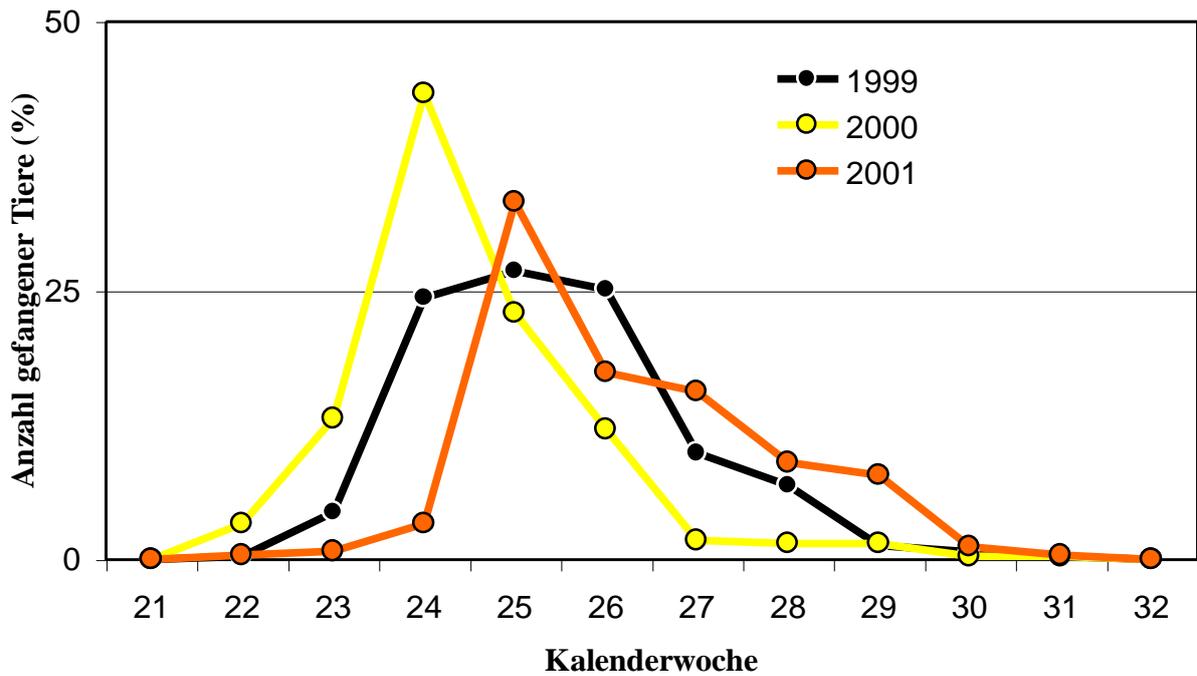


Abb. 3.5a: Flugphasen von *H. obsoletus* im Weinanbaugebiet Mosel-Saar-Ruwer während des Untersuchungszeitraums 1999-2001: Erfassung durch Gelbfallenfänge

Während des Untersuchungszeitraums konnten anhand von Gelbfallenfängen die Flugphasen von *H. obsoletus* zwischen der 21.-32. Kalenderwoche festgestellt werden. Ein Hauptmerkmal der dort vorkommenden Populationen ist die Spezifikation auf *C. arvensis* als Hauptwirts- und Nahrungspflanze.

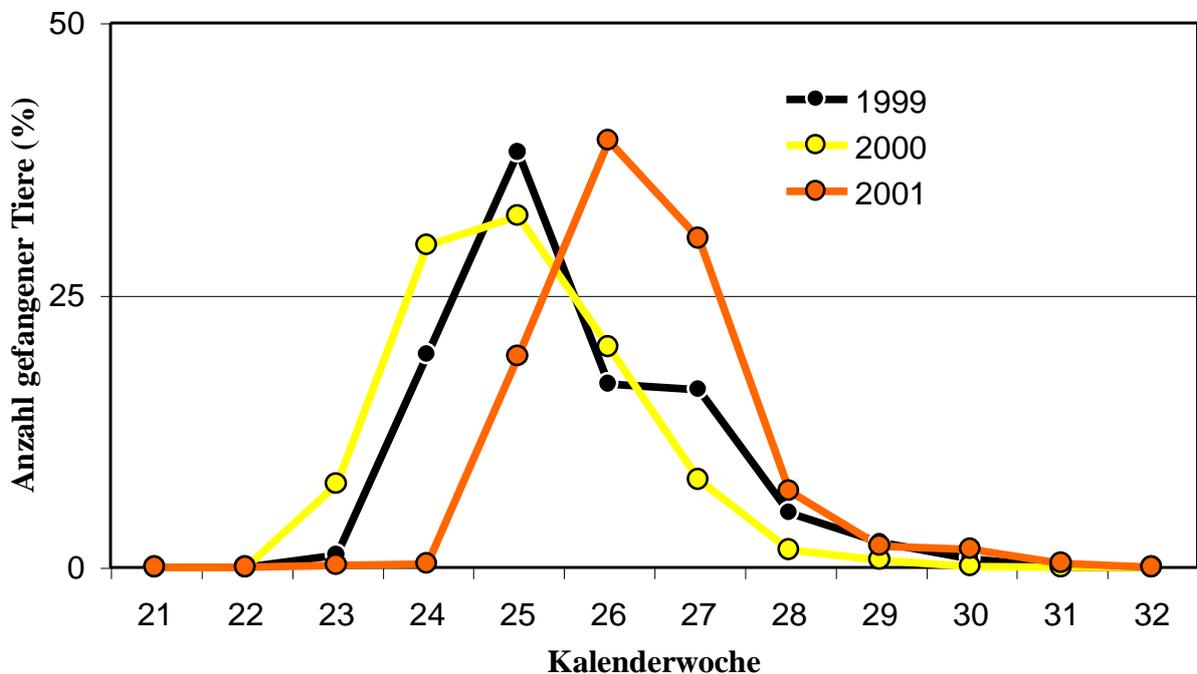


Abb. 3.5b: Flugphasen von *H. obsoletus* im Weinanbaugebiet Mosel-Saar-Ruwer während des Untersuchungszeitraums 1999-2001: Erfassung durch Lebendfänge

Die mittels Streifnetz durchgeführten Lebendfänge bestätigten die mittels Gelbfallenfänge ermittelten Flugphasen von *H. obsoletus*. Geringe Unterschiede bestehen hauptsächlich in den unterschiedlichen Höhepunkten der Flugphasen 1999 und 2001, die bis zu einer Woche differieren.

Ergebnisse

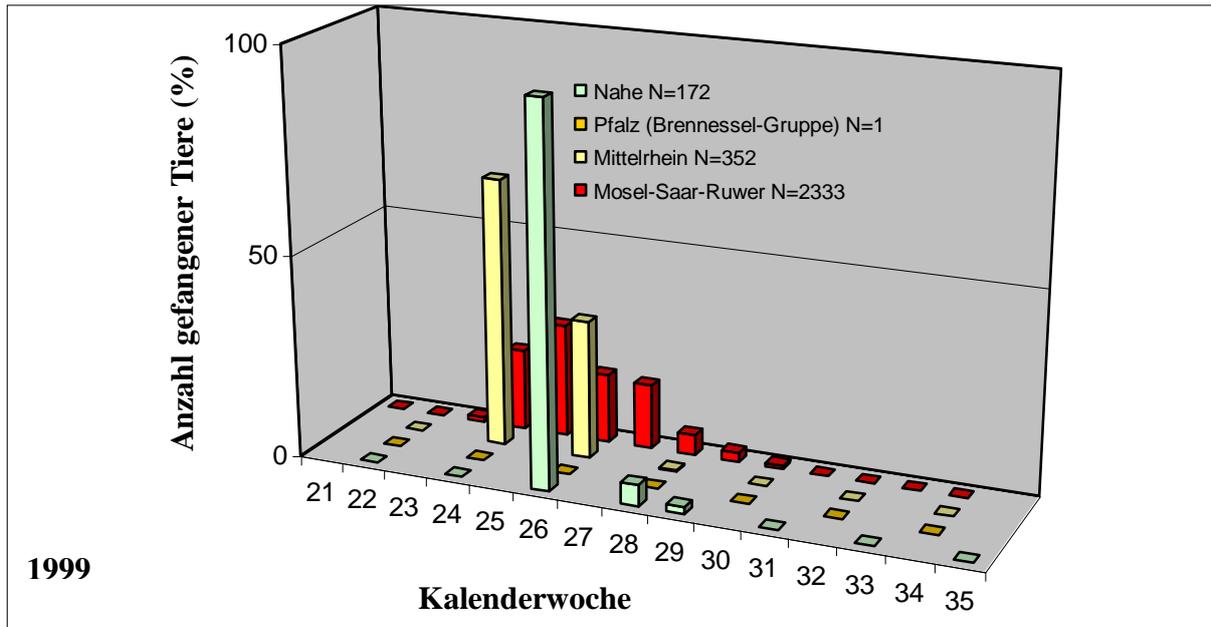


Abb. 3.6a: Übersicht über den durch Lebendfänge ermittelten zeitlichen Verlauf der Flugphasen von *H. obsoletus* in verschiedenen Weinanbaugebieten im Untersuchungsjahr 1999

Im 1. Untersuchungsjahr lagen die Flugphasen von *H. obsoletus* von Standorten der Weinanbaugebiete Nahe und Mittelrhein innerhalb der wöchentlich dokumentierten Flugphase von Populationen aus dem Weinanbaugebiet Mosel-Saar-Ruwer.

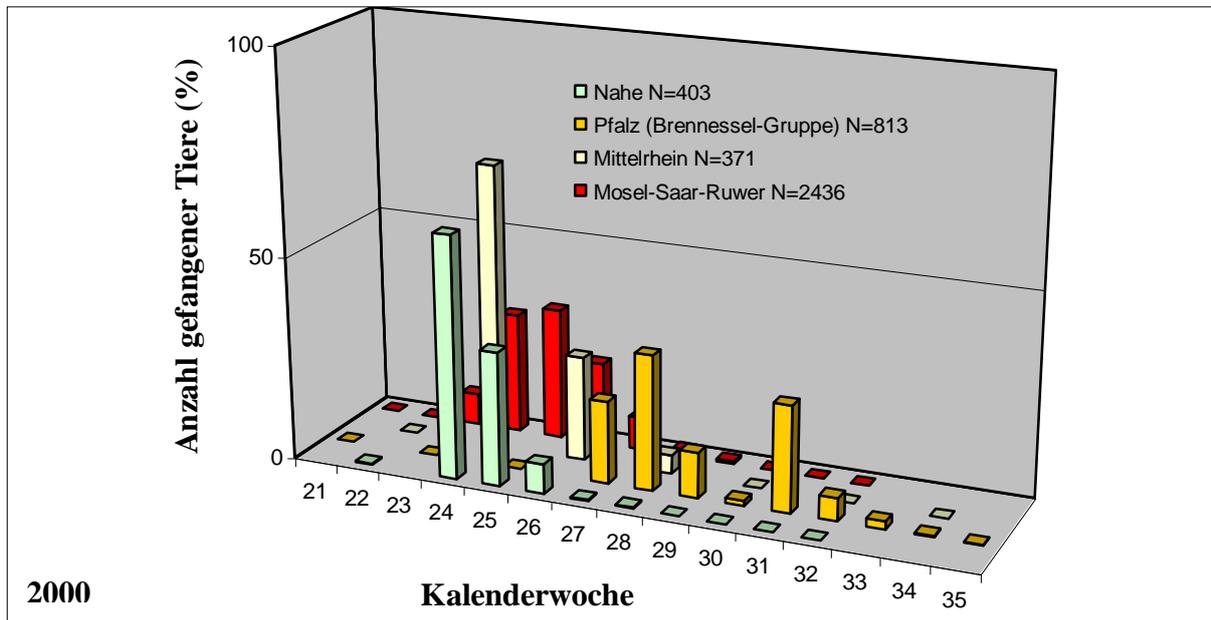


Abb. 3.6b: Übersicht über den durch Lebendfänge ermittelten zeitlichen Verlauf der Flugphasen von *H. obsoletus* in verschiedenen Weinanbaugebieten im Untersuchungsjahr 2000

Im 2. Untersuchungsjahr lagen die Flugphasen von *H. obsoletus* von Standorten der Weinanbaugebiete Nahe und Mittelrhein innerhalb der wöchentlich dokumentierten Flugphase von Populationen aus dem Weinanbaugebiet Mosel-Saar-Ruwer. Im Weinanbaugebiet Pfalz zeigte dagegen eine neuentdeckte Population mit einer Spezifikation auf die Brennessel als Wirts- und Nahrungspflanze eine später einsetzende Flugphase.

Ergebnisse

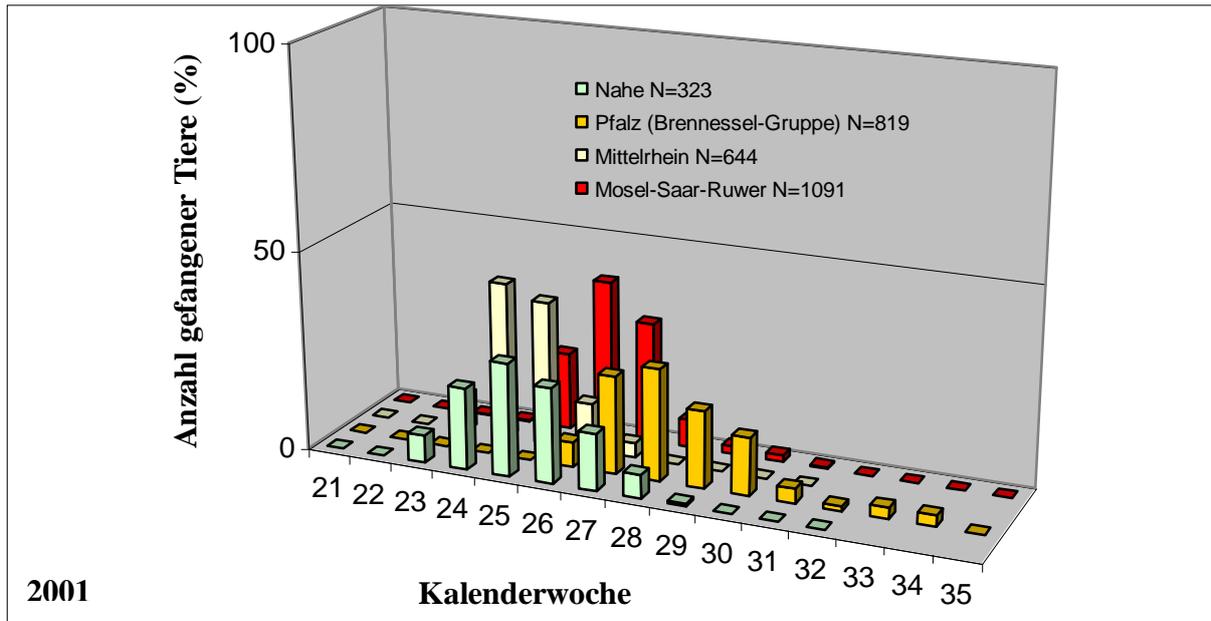


Abb. 3.6c: Übersicht über den durch Lebendfänge ermittelten zeitlichen Verlauf der Flugphasen von *H. obsoletus* in verschiedenen Weinanbaugebieten im Untersuchungsjahr 2001

Das 3. Untersuchungsjahr bestätigte die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen. Bei allen beprobten Populationen, deren gemeinsames Hauptmerkmal in der Spezifizierung auf die Ackerwinde bzw. in verminderterem Maße auf den Kriechenden Hahnenfuß als Wirts- und Nahrungspflanze lag, konnte die Flugphasen im gleichen Zeitraum detektiert werden. Im Weinanbaugebiet Pfalz wurde erneut die in dem Untersuchungsjahr 2000 gemachte Beobachtung einer verspätet einsetzenden Flugphase von der Population, die auf die Brennessel als Wirts- und Nahrungspflanze spezifiziert war, bestätigt.

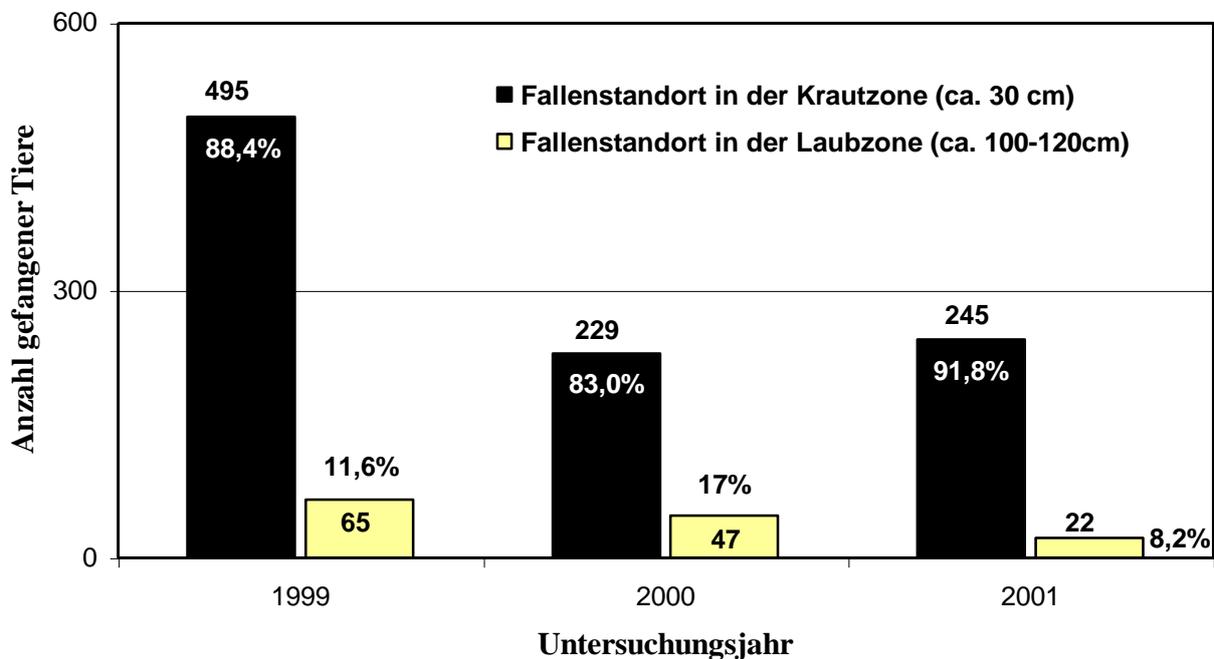


Abb. 3.7: Fangzahlen von *H. obsoletus* 1999-2001 für die in der Kraut- bzw. Laubzone montierten Gelbfallen im Weinanbaugebiet Mosel-Saar-Ruwer

Der überwiegende Anteil der mittels Gelbfallen gefangenen Tiere wurde mit einer hohen Signifikanz von $p \lll 0,001$ mit den in der Krautschicht montierten Gelbfallen erzielt. Daraus ergibt sich, dass sich der Schwerpunkt der Flugaktivität von *H. obsoletus* in Bodennähe befindet und somit eine Windverdriftung in angrenzende Areale wahrscheinlich eine geringere Rolle einnimmt als eine aktive Migration.

Ergebnisse

Geschlechtsbezogene Unterschiede in der Flugaktivität von *Hyalesthes obsoletus*

Der Vergleich der verschiedenen Fangmethoden lässt nicht nur eine allgemeine Beurteilung über die Flugaktivität der Imagines zu, sondern zeigt auch einen geschlechtsbezogenen Unterschied (vgl. Abb. 3.8a-c bzw. Tab. 3.2). Zu diesem Zweck wurden Lebend- und Gelbfallenfänge der populationsstarken Untersuchungsflächen des Mittelrheins geschlechtsspezifisch ausgezählt. Während bei den Lebendfängen beide Geschlechter in etwa derselben, nur von den Voraussetzungen des Versuchsfeld abhängigen Größenordnung gefangen wurden, zeigten sich bei den durch Gelbfallen erzielten Fangzahlen erhebliche Unterschiede. Der Anteil männlicher Vektoren überstieg mit durchschnittlich 77,9% (vgl. Abb. 3.8a) deutlich die Anzahl weiblicher Tiere, was auf eine wesentlich größere Flugaktivität der männlichen Tiere hinweist. Der höchste Anteil männlicher Imagines stieg bei einzelnen Versuchsflächen sogar auf über 88%, was vor allem bei den hohen Fangzahlen des ersten Untersuchungszeitraumes deutlich wird (vgl. Abb. 3.8c).

Tabelle 3.2: Einfluss der Fangmethode auf das Geschlechterverhältnis von *H. obsoletus* und die Darstellung seiner Bewegungszone

Die Gelbfallenfangzahlen belegen mit einer hohen Signifikanz eine höhere Flugaktivität der Männchen. Während beim passiven Gelbfallenfang ein wesentlich höherer Anteil männlicher Imagines gefangen werden konnte, zeigten die mittels Streifnetz durchgeführten Lebendfänge, bei denen aktiv die Populationsstandorte beprobt werden, ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis. Die Fangzahlen belegen zudem mit einer sehr hohen Signifikanz die Krautzone als bevorzugter Aufenthaltsort. N: Gesamtzahl gefangener Individuen;

Weinanbaugebiet	Geschlechterverhältnis			
	Lebendfang		Gelbfallenfang	
	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen
Mosel-Saar-Ruwer	884	888	219	776
Nahe	163	157	1	3
Hessische Bergstraße	12	19	0	0
Pfalz	58	85	8	25
Baden	52	99	2	2
Summe				
Beobachtetes Geschlechterverhältnis (O _i)	1169 Tiere	1248 Tiere	230 Tiere	806 Tiere
Prozent	48,4	51,6	22,2	77,8
Erwartetes Geschlechterverhältnis (E _i)	1209 Tiere	1209 Tiere	518 Tiere	518 Tiere
X ² (Chi ² -Wert mit f=1)	1,291		160,124	
Chi ² -Prüfgröße für:	nicht signifikant (1,291 < 3,841)		hoch signifikant mit p << 0,001	

Weinanbaugebiet Mosel-Saar-Ruwer	Bewegungszone	
	Krautzone	Laubzone
Summe 1999-2001		
Beobachtete Verteilung (O _i)	969 Tiere	134 Tiere
Prozent	87,9	12,1
Erwartete Verteilung (E _i)	551,5 Tiere	551,5
X ² (Chi ² -Wert mit f=1)	316,059	
Chi ² -Prüfgröße für:	hoch signifikant mit p << 0,001	

Ergebnisse

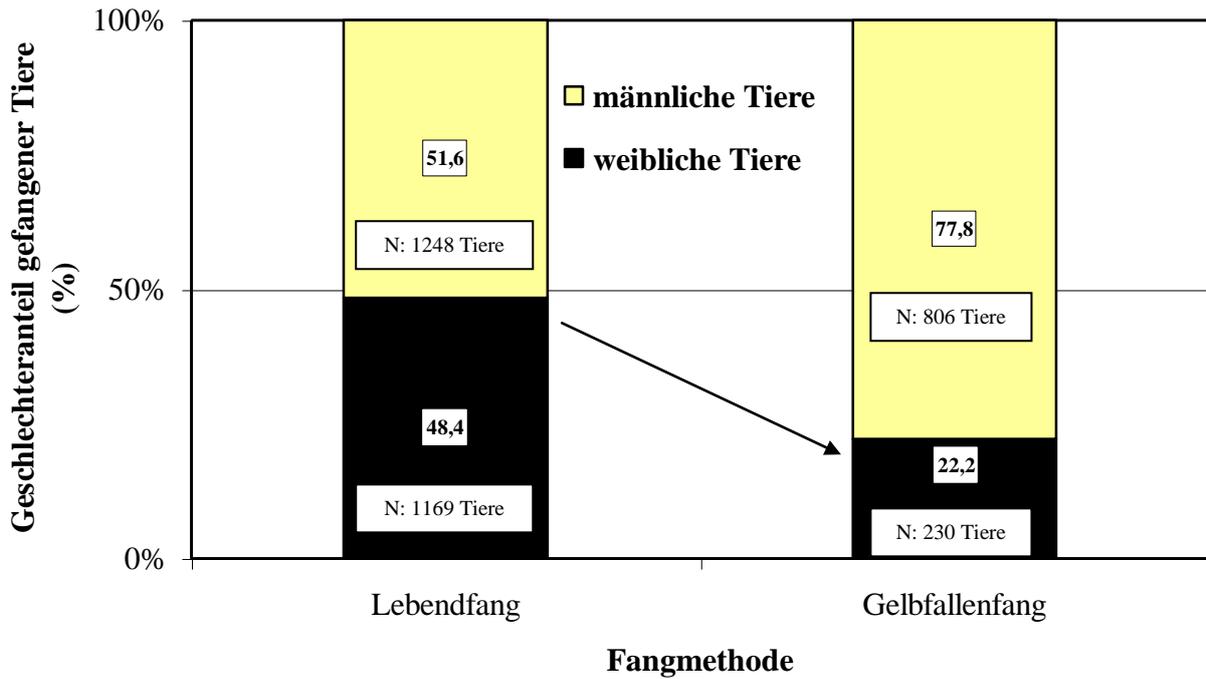


Abb. 3.8a: Unterschied im Geschlechteranteil gefangener *H. obsolete* in Abhängigkeit der Fangmethode

Die Graphik verdeutlicht eine größere Flugaktivität der Männchen gegenüber den weiblichen Tieren. Bei den aktiv angeflogenen Gelbfallen ist der Anteil der gefangenen Weibchen wesentlich geringer als die der männlichen Imagines, während bei den Lebendfängen ein ausgeglichenes Verhältnis auftritt.

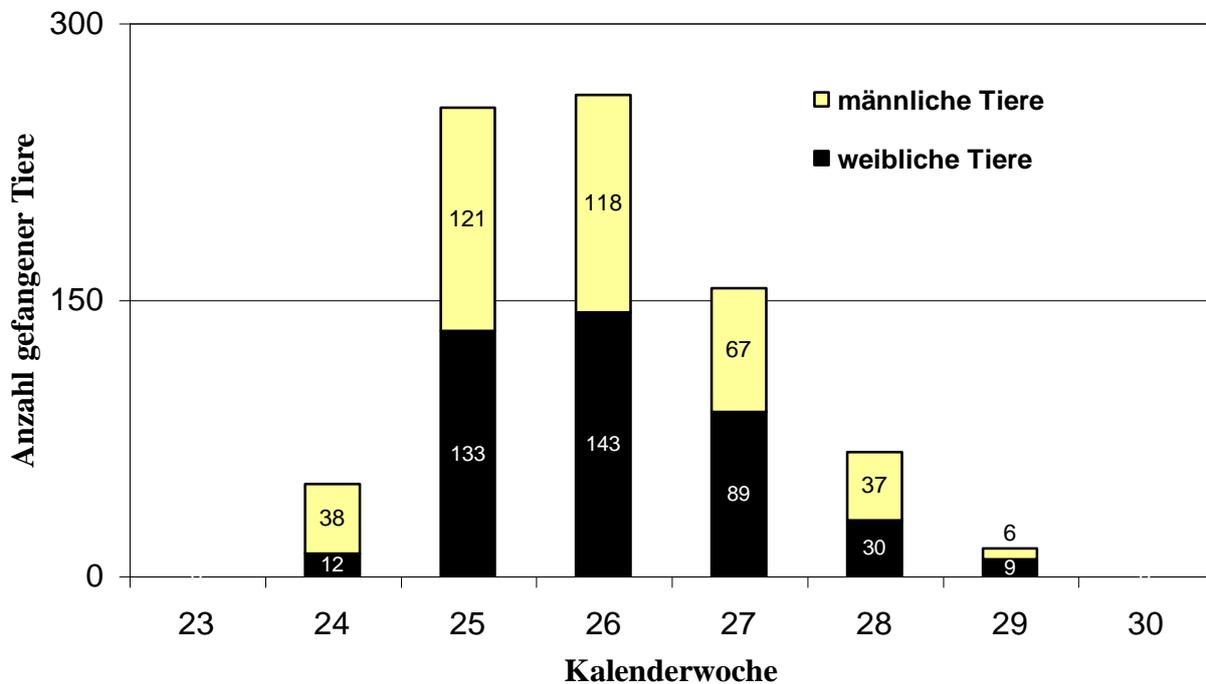


Abb. 3.8b: Geschlechterverhältnisses beim Lebendfang (1999) von *H. obsolete*

Aufgrund der hohen Anzahl lebendgefangener Tiere im ersten Untersuchungsyear eignete sich die Versuchsfläche MEHR-2.1 besonders gut zur Untersuchung des Geschlechteranteils am Gesamtfang auf dieser Fläche. Im Gegensatz zum Gelbfallenfang zeigte sich dabei mit 52% gefangener weiblicher Imagines ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis.

Ergebnisse

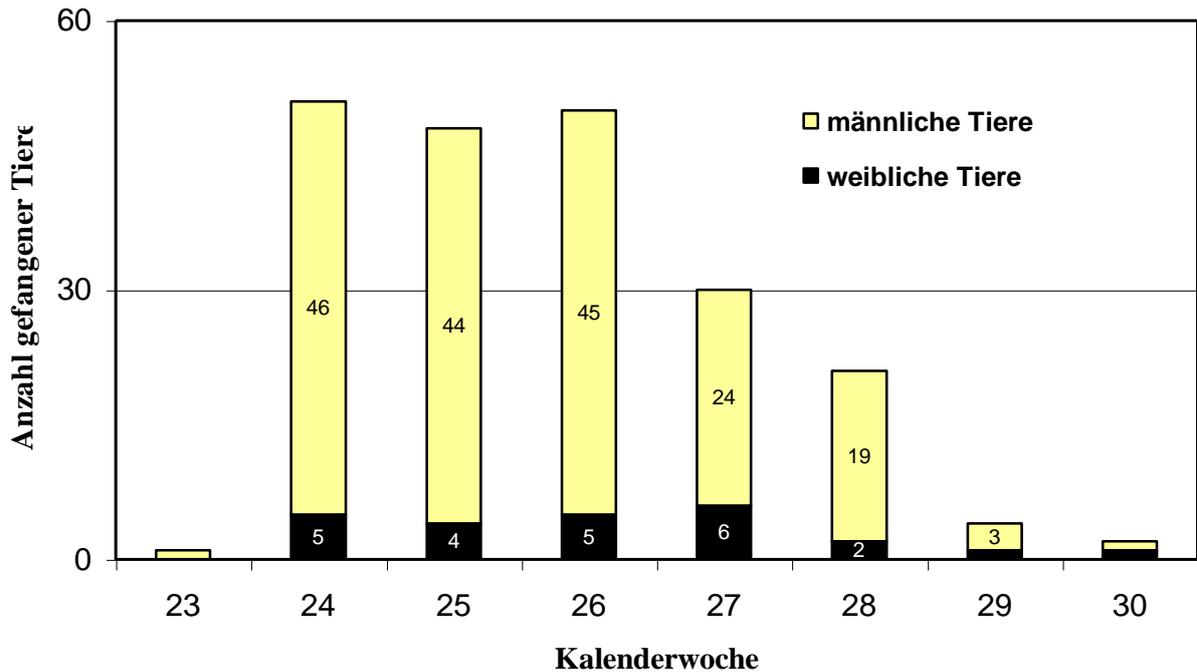


Abb. 3.8c: Geschlechterverhältnis beim Gelbfallenfang 1999 von *H. obsoletus*

Im ersten Versuchsjahr wurden auf der Versuchsfläche BKS-1.1 die höchsten Gelbfallenfangzahlen erreicht. Aus diesem Grund wurde eine umfassende Geschlechterbestimmung durchgeführt. Mit nur 11,6% weiblicher Tiere am Gesamfang auf dieser Fläche lässt sich beispielhaft zeigen, dass die Flugaktivität der Weibchen gegenüber den Männchen sehr gering ist.

3.1.3 Untersuchung der Migrationsaktivität von *Hyalesthes obsoletus*

Die Versuchsanlagen BKS-1 (vgl. Abb. 3.3b), BKS-3, MEHR-2 an der Mittelmosel und BOPP-1 am Mittelrhein dienten der Untersuchung der Frage, ob und in welchem Umfang *H. obsoletus* von stark besiedelten Flächen in angrenzende Areale einwandert bzw. passiv durch den Wind verdriftet wird. Zu diesem Zweck wurden auf den umliegenden Flächen Gelbfallenstandorte eingerichtet und die Anzahl der gefangenen Tiere gezählt.

Auf der Versuchsanlage BKS-1 konnte im zweiten Versuchsjahr eine große Anzahl von Imagines in den angrenzenden Flächen gefangen werden, während im darauffolgenden Jahr die Fangzahl (BKS-1.1A) stark gesunken ist (vgl. Tab. 3.3). Dieselbe Entwicklung konnte ebenfalls auch auf der Versuchsanlage MEHR-2 beobachtet werden. Die Anzahl der gefangenen Tiere auf der Ausgangsfläche ist im Vergleich zu den Fangzahlen benachbarter Flächen wesentlich abgesunken. Die Untersuchungsfläche BOPP-6 am Mittelrhein zeigten im Gegensatz dazu auch im dritten Untersuchungsjahr eine zahlenmäßig sehr starke Population. In allen drei Untersuchungsjahren konnten in den Gelbfallenanlagen der benachbarten Rebflächen regelmäßig Imagines von *H. obsoletus* gefangen werden. Bemerkenswert ist dabei die Beobach-

Ergebnisse

tung, dass trotz der relativ geringen Anzahl einwandernder Vektoren gerade diese Ertragsflächen eine starke Durchseuchung aufwiesen.

Tab. 3.3: Gelbfallenfangzahlen zur Feststellung der Migrationsaktivität von *H. obsoletus*

Der Versuchsstandort BKS-1 zeigte anhand von Gelbfallenfängen im Jahr 2000 eine geringe Migrationsaktivität in die Nachbarareale. Zum Vergleich wurden die Lebendfangzahlen aufgelistet, die einen Spiegel der Populationsstärke wiedergeben. Die anderen Ergebnisse sind aufgrund der geringen Fangzahlen nicht für eine Beurteilung der Migrationsaktivität geeignet.

Versuchsstandort	Jahr	Ausgangsfläche		Angrenzende Flächen	
		Lebendfang	Gelbfallenfang	Lebendfang	Gelbfallenfang
BKS-1		BKS-1.1A		BKS-1.1B-D; BKS-1.2A-D	
	2000	331	94	4	59
	2001	117	14	2	36
MEHR-2		MEHR-2.1		MEHR-2.2A-D	
	2000	482	5	6	32
	2001	12	4	0	19
BOPP-1		BOPP-6		BOPP-1-4	
	1999	160*	/	0	8
	2000	350	/	0	16
	2001	585	/	0	10

Auf der Neuanlage BKS-3.1 konnte dagegen die Einwanderung von *H. obsoletus* anhand der Gelbfallen und die Ansiedlung einer neuen Population durch Lebendfänge beobachtet werden (vgl. Tab. 3.4b). Diese Fläche kennzeichnete sich dadurch, dass sie vor der Neuanpflanzung 1999 rigolt, gegrubbert und somit vollkommen unkrautfrei angelegt wurde. Die sowohl in den angrenzenden Flächen als auch in der Neuanlage montierten Gelbfallen zeigten ebenfalls nur geringe Individuenzahlen, aber die gleichzeitig durchgeführten Lebendfänge bewiesen, dass sich schon ab dem Jahr 2000 auf den von den Randbezirken eingewanderten Nahrungspflanzen eine neue Population angesiedelt hatte. Sogar auf den Hochfallen in 335-350 cm Höhe konnten einzelne Individuen gefangen werden (vgl. Tab. 3.4). Im dritten Versuchsjahr wurde vom Eigentümer eine Unkrautbekämpfung während der Flugphase der Imagines durchgeführt, so dass nach dem Absterben eines Großteils der Nahrungspflanzen die wöchentlichen Lebendfangzahlen stark abgesunken sind. Es zeigte sich aber, dass an solchen Standpunkten, an denen sich die *Ackerwinde* und der *Schwarze Nachtschatten* (vgl. Abb. 3.2d: Bilder 15-16 und Abb. 3.3a: Bild 4) etablieren konnten, sowohl der Vektor als auch symptomtragende Pflanzen auftraten (vgl. Tab. 3.19: Klasse 5).

Ergebnisse

Tab. 3.4: Anzahl eingewanderter Imagines von *H. obsoletus* am Versuchsstandort BKS-3 (Gemarkung Bernkastel)

Die zunehmende Anzahl der lebendgefangenen Imagines von *H. obsoletus* belegen die Entstehung einer neuen Population durch eingewanderte Tiere. Eine kontinuierliche Einwanderung der Vektoren konnte durch Gelbfallen, die in drei verschiedenen Höhenstufen montiert waren, nachgewiesen werden. Auch die bodennahen Gelbfallen der seitlichen Flächen belegen durch ihre relativ hohe Fangzahl die Migration von *H. obsoletus* in die neue Besiedlungsfläche. a: Herbizidanwendung des Eigentümers führte während der Flugphase von *H. obsoletus* vermutlich zu einer Reduzierung der Fangzahlen. .

Jahr	Einwanderungsfläche (BKS-3.1)				Seitliche Ertragsflächen	
	Lebendfang	Gelbfallenfang			Lebendfang	Gelbfallenfang
		Höhe 350 cm	Höhe 120 cm	Höhe 30 cm		Höhe 30 cm
1999	0	1	2	17	4	23
2000	87	2	6	18	34	12
2001*	123	2	1	11	3	18
Summe	210	5	9	46	37	53

3.1.4 Der Fang anderer phloemsaugender Zikadenarten

Der Fang anderer Zikadenarten hatte zum Ziel, weitere mögliche Vektoren der Schwarzholzkrankheit zu identifizieren. Die größte Anzahl der Tiere wurden als Beifänge gesammelt. Dagegen wurden *Oncopsis alni*, der Überträger der FD-Pfalz, *Neotalitrus fenestratus* und *Macropsis fuscata* gezielt gefangen (vgl. Tab. 2.7) und mittels der PCR getestet (vgl. Kap. 3.4.2). Es stellte sich heraus, dass gerade *N. fenestratus* sowohl bei den Streifnetz- als auch bei den Gelbfallenfängen sehr zahlreich gefangen werden konnte. Die große Anzahl von Gelbfallenfängen beweist gleichzeitig eine sehr starke Flugaktivität. Auch *O. alni* konnte regelmäßig mittels Streifnetz gefangen werden. Die Fangzahlen waren dabei von der Fangmethode abhängig. Als erfolgreichste Methode erwies sich ein Abschütteln der Zweige im Fangnetz.

3.2 Untersuchungen zur Biologie von *Hyalesthes obsoletus*

Der Beginn der Flugphase der Imagines variiert von Jahr zu Jahr. Als mögliche Einflussfaktoren wurden Witterungsverhältnisse (Luft- und Bodentemperatur) und trophische Faktoren untersucht. Während durch die Untersuchung der Witterungsverhältnisse der frühest mögliche Zeitpunkt der Flugphase berechnet und ein Prognoseverfahren entwickelt werden sollte, hatte die Untersuchung trophischer Faktoren Aufschluss darüber zu geben, ob durch die Spezifizierung von *H. obsoletus* auf verschiedene, von der Region abhängige Nahrungspflanzen einen Einfluss auf die Flugphase und die Überlebensdauer der Imagines besitzt.

Ergebnisse

3.2.1 Prognose des Flugbeginns adulter *Hyalesthes obsoletus*

Zur Prognose des Flugbeginns adulter Tiere wurde ein Verfahren entwickelt, dass das früheste Auftreten der Imagines mit den erfassten Boden- und Lufttemperaturdaten koordiniert.

Entwicklung eines Prognosemodells zum Flugbeginn von *Hyalesthes obsoletus*

Die meteorologische Datenerhebung wurde nach der allgemeinen Methodik meteorologischer Datenerfassung am Boden durchgeführt und für jedes Untersuchungsjahr ab dem 1. Januar protokolliert. Die Messung der minimalen Bodentemperatur wurde morgens (8:30 Uhr) in 2 cm Bodenhöhe erfasst. Die Messung der Lufttemperatur wurde dreimal täglich durchgeführt (Trockenthermometermessung; Uhrzeiten: 8:30; 14:30; 22:30). Das Ziel war die Erstellung eines Prognoseverfahrens, bei dem ausgehend von einem optimalen Termin (Startdatum) alle Temperaturdaten ab einer bestimmten Größe (Schwellentemperatur) bis zum Flugbeginn des jeweiligen Jahres aufsummiert werden (Temperaturendsumme). Zur Berechnung und Optimierung dieser beiden Parameter wurden für die obengenannten Jahre alle möglichen Kombinationen (Schwellentemperaturen zwischen 0°C bis 12°C in 0,1°C-Schritten mit dem Startdatum vom 1. Januar bis 30. April in 1-Tages Schritten) kombiniert. Die Kombination mit dem geringsten Variationskoeffizient aller Temperaturendsummen stellt die Grundlage des Prognosemodells dar.

Für die Jahre 2000 und 2001 wurden von der Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt Neustadt (SLFA Neustadt) Temperaturwerte der Station Dackenheim zur Verfügung gestellt, die zur Berechnung des Flugbeginns für die Population von *H. obsoletus* am Versuchsstandort UNG-1 (Ungstein, Pfalz) verwendet wurden. Zur Feststellung des Flugbeginns an beiden Standorten wurden schon vor diesem Zeitpunkt die beiden Untersuchungsstandorte beprobt: Auf den Versuchsflächen des Versuchsstandorts BKS-1 fanden tägliche Kontrollen statt, während an dem Versuchsstandort UNG-1 wöchentliche Kontrollen mittels Streifnetz und Gelbfallen durchgeführt wurden. Zusätzlich fanden auch wöchentliche Fangaktivitäten an den Versuchsstandorten des Mittelrheins statt.

Der früheste Zeitpunkt des Einsetzens der Flugphase von *H. obsoletus* wurde für die Jahre 1993-2001 im Jahr 2000 (1. Juni), der späteste Start der Flugaktivität wurde im Jahr 1994 (20. Juni) registriert¹, wobei 1997 keine und 1998 eine nur unvollständige Datenerhebung stattfand. Im gesamten Untersuchungszeitraum 1999 – 2001 konnte sowohl an der Mittelmosel als auch am Mittelrhein der Flugbeginn jeweils in derselben Kalenderwoche festgestellt werden,

¹ Datenerhebung Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Dr. Maixner)

Ergebnisse

während in der Pfalz der Flugbeginn etwa drei Wochen später einsetzte (vgl. Tab. 3.5 und Abb. 3.7 – 3.8). Ein wesentlicher Unterschied der dort vorkommenden Populationen besteht außerdem in der Nahrungspräferenz (vgl. Abb. 3.11, 3.12 und Tab. 3.6, 3.9 und 3.10) da diese Populationen hauptsächlich die Brennessel *U. dioica* als Wirts- und Nahrungspflanze bevorzugen. Diese unterschiedliche Präferenz von *H. obsoletus* könnte auch der Grund dafür sein, dass im Gegensatz zur exakten Vorhersage des Flugbeginns in den beiden anderen Weinanbaugebieten, die Prognose des Flugbeginns in der Pfalz doch sehr ungenau terminiert werden konnte. Die optimalen Parameter zur Berechnung einer mittleren Gesamt-Temperatursumme für die Entwicklung von *H. obsoletus* sind in der Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Als optimales Startdatum wurde für die Bodentemperatur der 1. April, für die mittlere Lufttemperatur der 16. März errechnet. Für diese beiden Startdaten wurden aufgrund des geringsten Variationskoeffizienten bezüglich der Temperaturendsumme die optimale Start- bzw. Schwellentemperatur, ab der die mittleren Temperaturdaten eines Tages zur Temperatursumme addiert werden, mit 4,2°C (Boden) bzw. 6,8°C (Luft) errechnet. Als mittlere Gesamt-Temperatursumme für die Boden- bzw. Lufttemperaturmessung wurde 487,4°C bzw. 1029,9°C errechnet. Sobald einer der beiden Temperaturendsummen erreicht worden ist, muss mit dem Flugbeginn von *H. obsoletus* in den Gebieten des Mittelrheins und der Mosel-Saar-Ruwer Region gerechnet werden. Die durchschnittliche Differenz zwischen errechnetem und mittels Gelbfallen beobachtetem Flugbeginn lag bei 1,9 bzw. 2,1 Tagen (Boden- bzw. mittlere Lufttemperatur), wobei als beobachteter Flugbeginn die Wochenmitte gewählt wurde, da die zur Flugbeobachtung dienenden Gelbfallen für eine Woche im Feld exponiert waren. Der tatsächliche Flugbeginn kann daher im ungünstigsten Fall eine maximale Unschärfe von einer halben Woche aufweisen, wenn die ersten gefangenen Tiere schon zu Beginn bzw. am letzten Tag der Aushangwoche auf die Gelbfalle geflogen sind. Aus diesem Grund wurden im letzten Untersuchungsjahr neben den täglich durchgeführten Streifnetzkontrollen auch solche Gelbfallen täglich überprüft, die sich in der Umgebung der Wetterstation des Instituts in Bernkastel befanden.

Diese Überprüfung ergab eine sehr gute Übereinstimmung zwischen dem entwickelten Prognoseverfahren und dem tatsächlichen Beginn der Flugphase. Auf den Versuchsflächen BKS-1.1, BKS-5 (Standort Bernkastel; Mittelmosel) und BOPP-1.5 (Mittelrhein) konnten mittels Streifnetz die ersten Lebendfänge am 7. Juni protokolliert werden, während die tägliche Kontrolle der Gelbfallen am 8. Juni auf der Fläche BKS-6.1 einen Erstnachweis für den Beginn der Flugphase erbrachten. Die Flugprognose ergab durch die Berechnung der Tempe-

Ergebnisse

raturendsumme, dass ab dem 9. Juni mit dem Beginn der Flugphase zu rechnen war (vgl. Abb. 3.10). Der früheste Flugbeginn überhaupt wurde an der Nahe am 5. Juni (Versuchsfläche MONZ-1) registriert. Auf den Versuchsflächen der Pfalz dagegen wurde bei Populationen mit der Brennessel als Wirts- und Nahrungspflanze in den letzten beiden Versuchsjahren der Flugbeginn erst am 22. bzw. 27. Juni nachgewiesen, während die Flugberechnung anhand der Bodentemperatur den 1. bzw. 7. Juni und mittels der Lufttemperatur den 6. bzw. 12. Juni als Erstflugtag ergab. Die mittlere jährliche Temperatursumme überstieg dabei mit 723°C (Boden) bzw. 1311,2°C (Luft) erheblich die für Populationen mit der Ackerwinde als Wirts- und Nahrungspflanze errechnete Gesamt-Temperatursumme.

Ergebnisse

Tab. 3.5: Vergleich der berechneten Flugprognose (Datum des Flugbeginns) mit dem tatsächlich festgestellten Flugbeginn von *H. obsoletus*

Die Flugprognose für Populationen mit einer Spezifizierung auf *C. arvensis* am Standort Bernkastel konnte im Vergleich zum tatsächlichen Flugbeginn mit einer Unschärfe von durchschnittlich 1,9 bzw. 2,1 Tagen sehr genau bestimmt werden.

Startdatum: Beginn der jährlichen Temperaturmessung; Der geringste Variationskoeffizient ergab als Startdatum den 16. März bzw. 1. April für die Luft- bzw. Bodentemperaturmessung;

Schwellentemperatur: Mindesttemperatur zur jährlichen Berechnung der Temperatursumme;

Temperatursumme: Die Erstellung der jährlichen Temperatursummen für die Boden bzw. mittlere Lufttemperatur erfolgte durch Addition der einzelnen Tageswerte, sofern die Temperaturschwelle von mindestens 4,2°C (Boden) bzw. 6,8°C (mittlere Lufttemperatur) erreicht wurde. Aus den Temperatursummen, die zum Beginn bzw. zum Ende der ersten Flugwoche (WA bzw. WE) erreicht wurden, wurde für jedes Untersuchungs-jahr die mittlere jährliche Temperatursumme ermittelt. Im Anschluss wurde daraus die mittlere Gesamt-Temperatursumme aller Untersuchungs-jahre gebildet. Der geringste Variationskoeffizient (Quotient aus der Standardabweichung der mittleren Gesamt-Temperatursumme und ihrem Mittelwert *100) bestimmte dabei die optimalen Parameter (Startdatum und Schwellentemperatur) zur Erstellung der Flugprognose anhand der Boden bzw. mittleren Lufttemperatur.

Flugbeginn: Der Nachweis des Flugbeginns der Imagines erfolgte anhand von wöchentlich kontrollierten Gelbfällen, so dass als Datum des Flugbeginns der mittlere Wochentag der Aushangwoche (Expositionswoche) gewählt wurde

$$\text{Variationskoeffizient (\%)} = \frac{\text{Standardabweichung (SD)}}{\text{mittlere Temperatursumme}} \times 100$$

Standort	Jahr	Experimentelle Messdaten für Boden- und Lufttemperaturmessung									
		Startdatum der Temperaturmessung		Schwellentemperatur		Woche des beobachteten Flugbeginns					
		Boden	Luft	Boden (°C)	Luft (°C)	Datum		Anzahl der Tage von Startdatum bis Flugbeginn		Boden	Luft
				WA	WE						
Bernkastel	1993	1. April	16. März	4,2	6,8	1. Juni	7. Juni	62	68	78	84
	1994					16. Juni	22. Juni	77	83	93	99
	1995					12. Juni	18. Juni	73	79	89	95
	1996					11. Juni	17. Juni	72	78	88	94
	1999					8. Juni	14. Juni	69	75	85	91
	2000					29. Mai	4. Juni	59	65	75	81
	2001					6. Juni	12. Juni	67	73	83	89
Ungstein	2000					19. Juni	25. Juni	80	96	96	102
	2001					24. Juni	30. Juni	85	91	101	107
Standort	Jahr	Experimentelle Messdaten für Bodentemperaturmessung					Flugprognose anhand der Bodentemp.	beobachteter Flugbeginn Wochenmitte	Differenz jährlich	Mittlere Gesamtdifferenz	
		WA	WE	Jährliche Mittelwerte	Mittlere Gesamt-Temperatursumme	SD (Var. (%))					
Bernkastel	1993	454,5	507,9	481,2	487,4	25,3 (5,2)	6. Juni	4. Juni	2 Tage	1,9 Tage	
	1994	458	519,3	488,7			16. Juni	19. Juni	3 Tage		
	1995	480,3	545,5	512,9			14. Juni	15. Juni	1 Tag		
	1996	424,4	481,7	453,1			17. Juni	14. Juni	3 Tage		
	1999	466,7	528,4	497,6			7. Juni	11. Juni	4 Tage		
	2000	477,4	561,9	519,7			1. Juni	1. Juni	0 Tage		
	2001	415,1	502,2	458,7			9. Juni	9. Juni	0 Tage		
Ungstein	2000	712,6	798,1	755,4	723	57,9	1. Juni	22. Juni	21 Tage	20,5 Tage	
	2001	657,3	723,8	690,6			7. Juni	27. Juni	20 Tage		
Standort	Jahr	Experimentelle Messdaten für Lufttemperaturmessung					Flugprognose anhand der Lufttemp.	beobachteter Flugbeginn Wochenmitte	Differenz jährlich	Mittlere Gesamtdifferenz	
		WA	WE	Jährliche Mittelwerte	Mittlere Gesamt-Temperatursumme	SD (Var. (%))					
Bernkastel	1993	958,3	1073,2	1015,8	1029,9	44,4 (4,3)	5. Juni	4. Juni	1 Tag	2,1 Tage	
	1994	1041,5	1162,9	1102,2			15. Juni	19. Juni	4 Tage		
	1995	958,9	1044,1	1001,5			17. Juni	15. Juni	2 Tage		
	1996	979,8	1088,8	1034,3			13. Juni	14. Juni	1 Tag		
	1999	1023	1124,2	1073,6			8. Juni	11. Juni	3 Tage		
	2000	919,7	1026,4	973,1			4. Juni	1. Juni	3 Tage		
	2001	966,2	1051,3	1008,8			10. Juni	9. Juni	1 Tag		
Ungstein	2000	1277,2	1395,7	1346,5	1311,2	77,8	6. Juni	22. Juni	16 Tage	15,5 Tage	
	2001	1220,5	1351,5	1286			12. Juni	27. Juni	15 Tage		

Ergebnisse

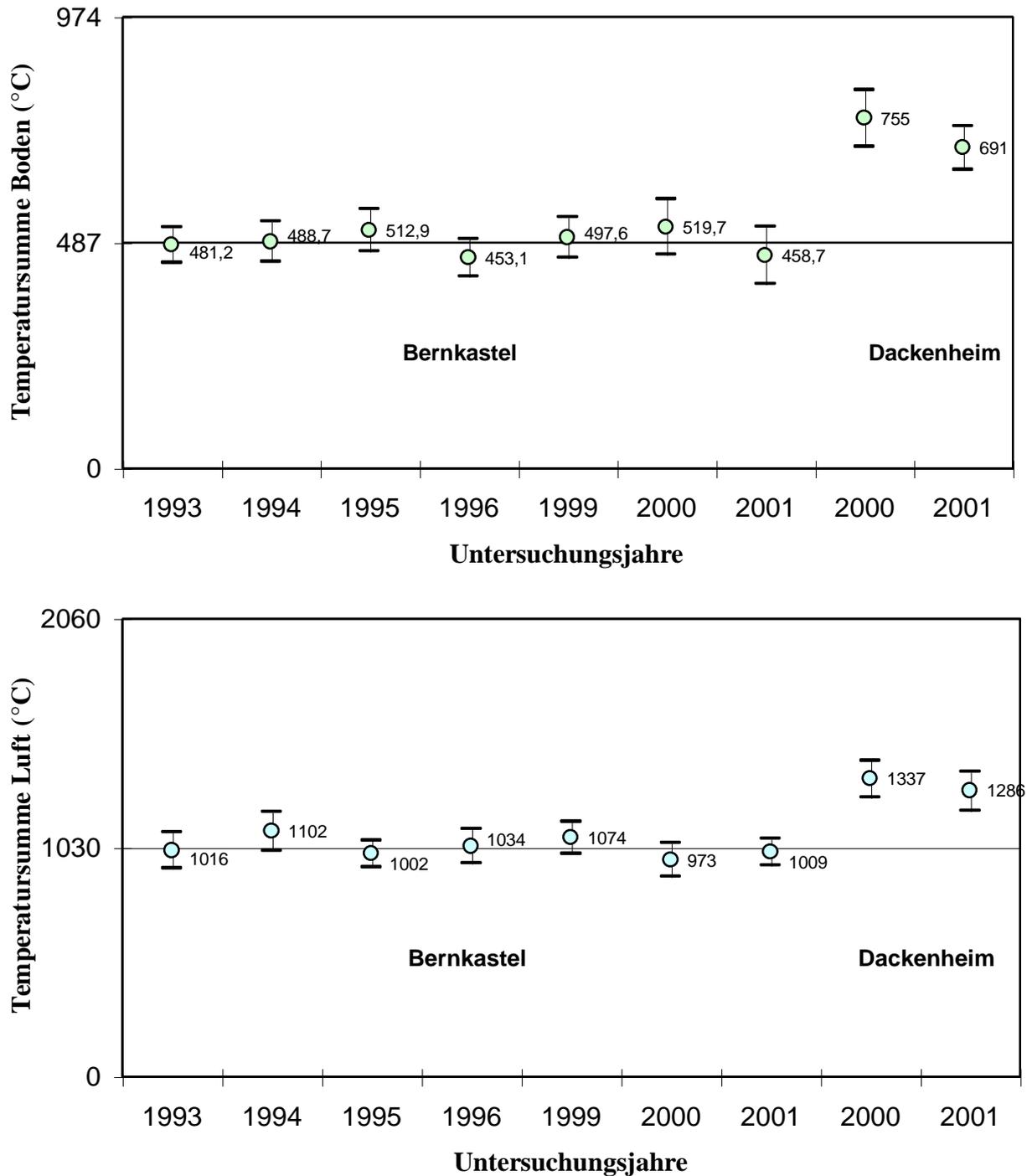


Abb. 3.9: Streuung der jährlichen Temperatursummen-Mittelwerte (Boden bzw. mittlere Lufttemperatur) für die Standorte BKS-1 (Bernkastel-Kues) und UNG-1 (Dackenheim). Der Standort Bernkastel-Kues diente als Beispiel für den weitverbreiteten Typus von *Hyalesthes obsoletus*, der *Convolvulus arvensis* (Ackerwinde) als Wirts- u. Nahrungspflanze bevorzugt. Diese Populationen erreichen früher die Flugphase als beispielsweise Populationen in Ungstein, die ihre Entwicklung an der Brennessel *Urtica dioica* durchlaufen. Zur Erfassung der Wetterdaten in Ungstein wurden Aufzeichnungen der Wetterstation Dackenheim verwendet. Die mittlere Gesamt-Temperatursumme für den Standort Bernkastel-Kues ist als Hauptintervalllinie eingezeichnet. Das Startdatum für die Temperaturmessung war der 1. April (Boden) bzw. 16. März (Luft) des jeweiligen Untersuchungsjahres.

Ergebnisse

● Temperatursumme Boden (°C) ● Temperatursumme Luft (°C)

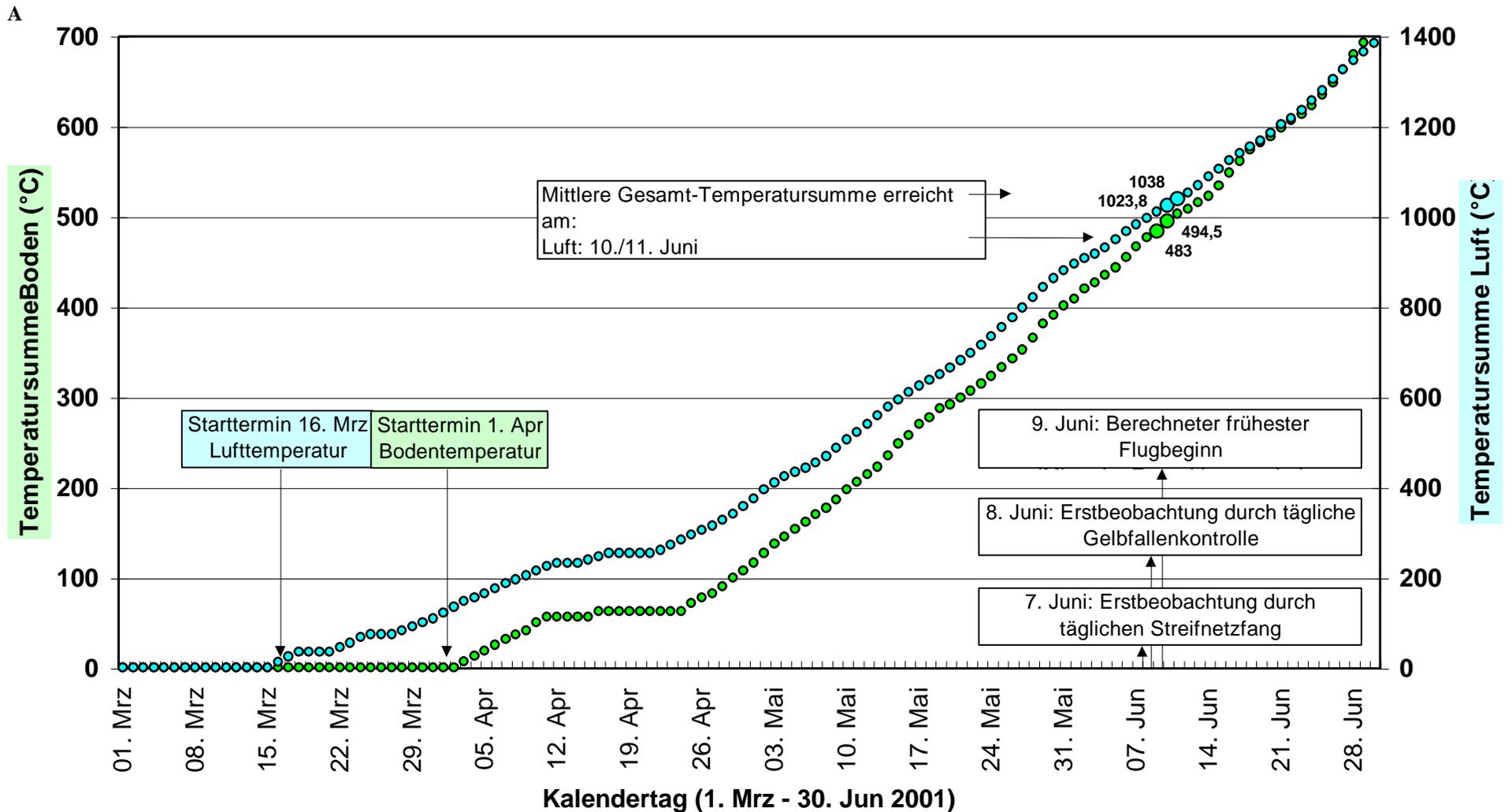


Abb. 3.10: Flugprognosemodell für *H. obsoletus* am Standort Bernkastel für das Untersuchungsjahr 2001

Im Untersuchungsjahr 2001 wurde der Beginn der Flugphase am 7. Juni durch Streifnetzfang, am 8. Juni durch tägliche Gelbfallenkontrolle und am 9. Juni durch die Berechnung der Wochenmitte (Gelbfallenaushangzeit während der ersten Flugwoche: 6.-12. Juni) festgestellt. Die jährliche Temperatursumme erreichte zwischen dem 9./10. Juni (Boden) bzw. 10./11. Juni (Luft) jeweils die mittlere Gesamt-Temperatursumme. Diese errechneten Daten stellen den prognostizierten Termin für den Flugbeginn des Vektors dar. Der errechnete Termin stimmt sehr gut mit dem tatsächlich festgestellten Beginn der Flugphase überein.

Ergebnisse

3.2.2 Einfluss trophischer Faktoren auf die Überlebensdauer von *H. obsoletus*

Obwohl im ersten Versuchsjahr nur sehr wenige Individuen gefangen wurden, die auf die Brennessel als Wirts- und Nahrungspflanze spezifiziert waren, zeigte sich schon anhand der Gelbfallenfänge die Tendenz unterschiedlicher Flugphasen. In den beiden folgenden Untersuchungsjahren wurde diese Tendenz eindrucksvoll anhand großer Lebendfangzahlen auf Versuchsflächen in Ungstein (UNG-1) bestätigt. Im zweiten Versuchsjahr wurde in Vorversuchen außerdem erstmalig deutlich, dass Tiere aus der Brennessel- Gruppe einen längeren Überlebenszeitraum als Tiere aus der Ackerwinde- Gruppe aufwiesen. Aus diesem Grund wurden Haltungsveruche mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluss trophischer Faktoren auf die Überlebensdauer zu untersuchen. Insgesamt wurden 591 lebendgefangene Tiere für die Untersuchung bereitgestellt, wobei sich die Anzahl von Versuchstieren aufgrund der in Kap 2.3.1 beschriebenen Versuchsmaßnahmen auf 482 reduzierte.

In Haltungsveruchen, in denen die Anzahl täglich gestorbener Tiere protokolliert wurde, zeigte sich vor allem in Bezug auf ihre wichtigsten Wirts- und Nahrungspflanzen *U. dioica* und *C. arvensis* eine Adaptation der Tiere an ihre Wirtspflanzen. Ein Wirtswechsel vom Originalwirt *U. dioica* auf den Versuchswirt *C. arvensis* ergab eine hoch signifikante Verkürzung ($p \gg 0,001$) der Überlebenszeit (vgl. Abb. 3.11a). Die mittlere Überlebenszeit sank von 8,7 auf 2,6 Tage. Umgekehrt wurde ein nur schwach signifikanter Unterschied beim von Tieren der Ackerwinde-Gruppe auf den Versuchswirt *U. dioica* festgestellt (vgl. Tab. 3.11b). In dieser Gruppe sank die mittlere Überlebenszeit von 3,8 auf 3 Tage. Eine ebenfalls hochsignifikante Verkürzung der Überlebenszeit zeigten Tiere der Brennessel-Gruppe bei den Versuchswirten *V. vinifera* ($p \ll 0,001$), *R. repens* ($p \ll 0,001$) und *H. pilosella* ($p \ll 0,001$). Dagegen wurden bei *T. officinale* und *L. autumnalis* keine signifikanten Unterschiede detektiert.

Beim Vergleich der Überlebenszeit von Individuen, die auf ihrem Originalwirt verblieben, konnte für die Tiere der Brennessel-Gruppe eine hochsignifikant längere Überlebenszeit ($P \ll 0,001$) festgestellt werden (vgl. Abb. 3.11a/b). Alle Versuchstiere der Ackerwinde-Gruppe waren auf ihrem Originalwirt bereits nach 9 Tagen gestorben, während zu diesem Zeitpunkt noch 31% der Versuchstiere der Brennessel-Gruppe lebten.

Ergebnisse

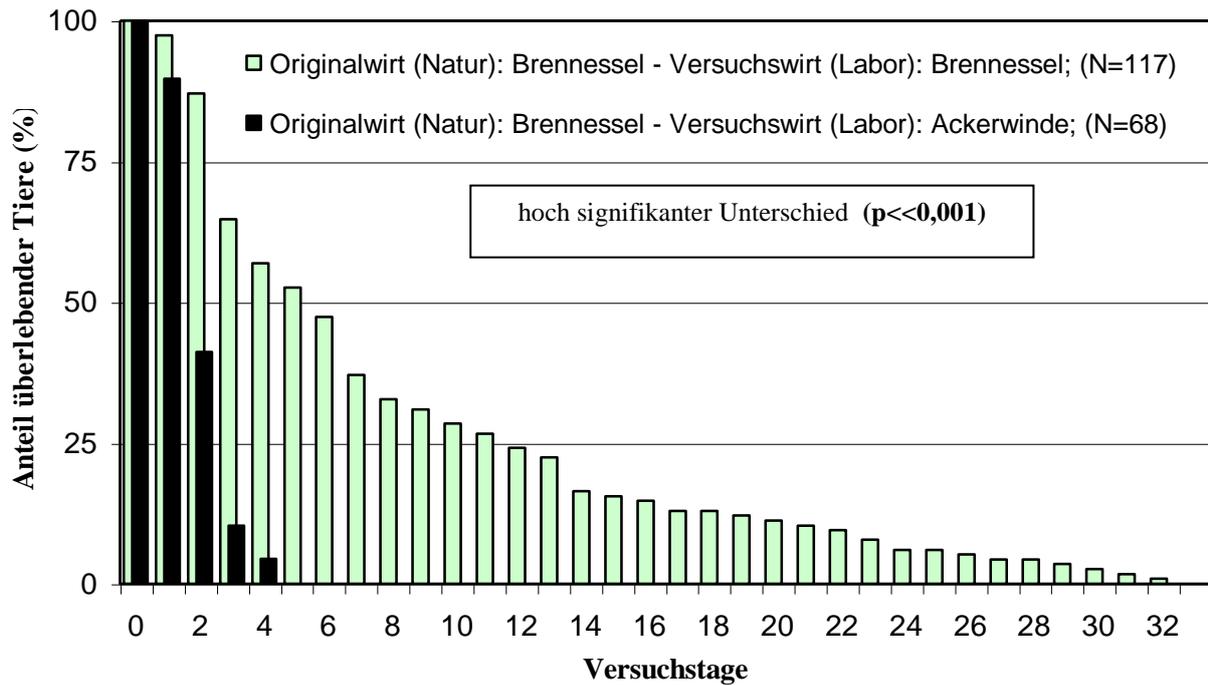


Abb. 3.11a: Anteil überlebender Tiere der „Brennessel“- Gruppe in Abhängigkeit ihres Versuchswirts

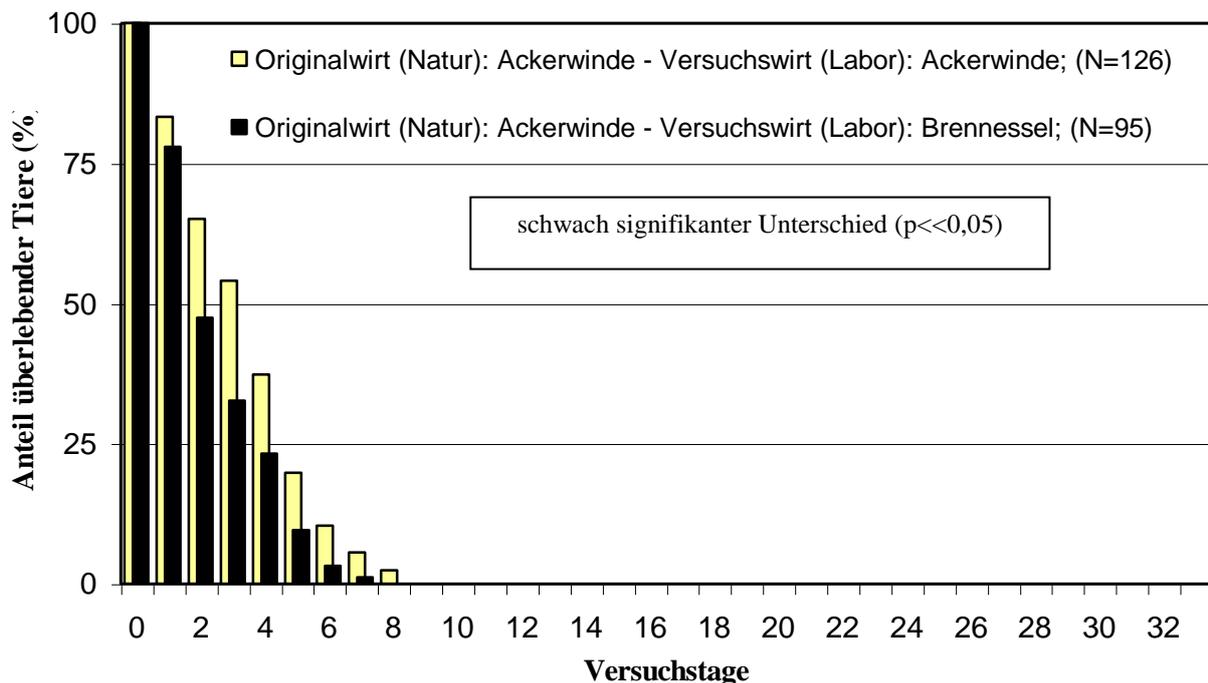


Abb. 3.11b: Anteil überlebender Tiere der „Ackerwinde“- Gruppe in Abhängigkeit ihres Versuchswirts

Abb. 3.11: Einfluss trophischer Faktoren auf den Überlebenszeitraum von *H. obsoletus*

In Haltungsversuchen zeigten Tiere aus Populationen, die auf die Große Brennessel *U. dioica* als Originalwirt spezifiziert sind, beim Wirtswechsel auf die Ackerwinde *C. arvensis* eine hochsignifikant kürzere Überlebenszeit (vgl. Abb. 3.11a). Dagegen zeigten Tiere aus Populationen mit einer Spezifikation auf die Ackerwinde lediglich eine schwach signifikante Verkürzung im Überlebenszeitraum beim Wechsel auf den Versuchswirt *U. dioica* (vgl. Abb. 3.11b). Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass Tiere der Brennessel-Gruppe, die auf ihrem Originalwirt verblieben, einen hochsignifikant ($p < 0,001$) längeren Überlebenszeitraum gegenüber Tieren der Ackerwinde-Gruppe zeigten, die ebenfalls auf ihrem Originalwirt gehalten wurden.

Ergebnisse

Tabelle 3.6a: Ergebnisse der Log-Rang-Teststatistik zur Prüfung auf signifikante Unterschiede in der Überlebenszeit von *H. obsoletus* beim Wechsel des Originalwirts *U. dioica* auf verschiedene Versuchswirte

Die Tests zeigten beim Wechsel der ursprünglichen Wirtspflanze *U. dioica* auf die Versuchswirte *C. arvensis*, *V. vinifera*, *R. arvensis* und *H. pilosella* einen hochsignifikanten Unterschied ($p \ll 0,001$) in der Überlebenszeit von *H. obsoletus*. Dagegen zeigte ein Umsetzen der Tiere auf *T. officinale* bzw. *L. autumnalis* bei $p=0,05$ keinen signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit.

Versuchswirt		Originalwirt: <i>U. dioica</i>	Ergebnis
	N ges.	N _(Originalwirt) ges.	P
<i>C. arvensis</i>	68	117	hoch signifikanter Unterschied mit $p \ll 0,001$
<i>T. officinale</i>	8	117	nicht signifikant
<i>L. autumnalis</i>	15	117	nicht signifikant
<i>V. vinifera</i>		117	hoch signifikanter Unterschied mit $p \ll 0,001$
<i>R. arvensis</i>	17	117	hoch signifikanter Unterschied mit $p \ll 0,001$
<i>H. pilosella</i>	22	117	hoch signifikanter Unterschied mit $p \ll 0,001$

Tabelle 3.6b: Ergebnisse der Log-Rang-Teststatistik zur Prüfung auf signifikante Unterschiede in der Überlebenszeit von *H. obsoletus* beim Wechsel des Originalwirts *C. arvensis* auf verschiedene Versuchswirte

Der Test zeigte beim Wechsel der ursprünglichen Wirtspflanze *C. arvensis* auf den Versuchswirt *U. dioica* lediglich einen schwach signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit von *H. obsoletus*.

Versuchswirt		Originalwirt: <i>C. arvensis</i>	Ergebnis
	N ges.	N _(Originalwirt) ges.	P
<i>U. dioica</i>	95	126	schwach signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$

3.3 UNTERSUCHUNGEN ZU ÜBERTRAGUNGSEIGENSCHAFTEN VON VEKTOREN

Von allen Zikadenarten, deren Vektoreigenschaften bezüglich der beiden in Deutschland bisher vorkommenden Vergilbungskrankheiten der Weinrebe anhand von Übertragungsversuchen überprüft wurden, waren ausschließlich *H. obsoletus* und *O. alni* in der Lage, Testpflanzen zu infizieren (vgl. Tab. 3.7 – 3.9). Auch die in Rebanlagen häufig vorkommende, phloemsaugende Zikade *N. fenestratus* war nicht in der Lage, Versuchspflanzen zu inokulieren (Übertragung der Infektion durch Besaugen), obwohl mittels der PCR-Analyse Phytoplasmen bei einigen Individuen von *N. fenestratus* nachgewiesen werden konnten (TANNE *et al.*, 2001) und dieses Tier in Israel als wahrscheinlicher Überträger des Schwarzholz-Phytoplasmas angesehen wird.²

² Persönliche Mitteilung Dr. Maixner (Biologische Bundesanstalt, Bernkastel-Kues)

Ergebnisse

3.3.1 Untersuchungen zu den Übertragungseigenschaften von *Hyalesthes obsoletus*

Die Untersuchungen der Übertragungseigenschaften von *H. obsoletus* dienten hauptsächlich dem Ziel, potentielle Begrünungspflanzen auf die Möglichkeit einer Infektion durch Vektoren hin zu überprüfen. Befürchtungen, wonach potentielle Begrünungspflanzen selbst durch *H. obsoletus* infiziert werden könnten, wurden bestätigt. Der Vergleich der Werte für die Übertragungseffizienz des Vektors zeigt, dass die Zikade das *Schwarzholz*-Phytoplasma meist mit einer höheren Effizienz auf inokulierbare krautige Pflanzen überträgt als auf Weinreben (vgl. Tab. 3.8). Insgesamt wurden 1425 Individuen in den Übertragungsversuchen getestet. Von den fünf Arten potentieller Begrünungspflanzen für den Steilhang wurden vier Pflanzenarten infiziert, ohne dass diese Pflanzen abstarben. Lediglich *H. pilosella* wurde in keinem der durchgeführten Übertragungsversuche infiziert, obwohl *H. obsoletus* sich gut von dieser Pflanzenart ernähren konnte, was durch die geringe Anzahl von im Versuch gestorbener Tiere deutlich wurde. Von den im Test untersuchten natürlichen Wirtspflanzen von *H. obsoletus* wurde nur der Kriechende Hahnenfuß *R. repens* infiziert. Im Freiland konnten dagegen niemals infizierte Pflanzen dieser Art beobachtet werden. Infizierte Pflanzen reagierten im Test extrem sensibel auf eine Phytoplasmainfektion, indem sie schnell vergilbten und innerhalb weniger Wochen abstarben. Dem entsprechend war die Infektionshäufigkeit von *H. obsoletus* in Beständen dieser Pflanzenart im Vergleich zu Populationen der „Ackerwinde“-Gruppe sehr gering.

Die oft für Übertragungstests verwendete *V. faba* zeigte erwartungsgemäß sehr schnell (ca. 4-6 Wochen) deutliche Symptome der Vergilbungskrankheit und bewies damit ihre Eignung als sehr gute Zeigerpflanze für eine Infektion durch Phytoplasmen der Schwarzholzkrankheit. Im Gegensatz zu allen anderen Pflanzenarten konnte bei dieser Pflanzenart auch sehr gut die Infektion bei einzelnen Zikaden durch Einzeltier-Tests überprüft werden. Im Vergleich zur Weinrebe zeigten sich die Unterschiede in der *Übertragungswahrscheinlichkeit* (PIO) und in der *Übertragungseffizienz* (PEFF) am deutlichsten und sind daher in der Tabelle 3.8 durch Fettdruck hervorgehoben.

Die in den Übertragungsversuchen getesteten natürlichen Weinbergskräuter stellten nur die wichtigste Auswahl der vor allem in den Steillagen des Mittelrheins und der Mittelmosel vorkommenden Begleitflora dar. Eine Tendenz zur starken Anfälligkeit gegenüber einer Inokulation zeigte der nur mit wenigen Exemplaren getestete *Hornklee* (*Lotus corniculatus*). In der Natur konnte außerdem beim *Schwarzen Nachtschatten* (*Solanum nigrum*) eine Phytoplasma beobachtet und mittels PCR-Analyse auch positiv getestet werden (vgl. Tab. 3.18).

Ergebnisse

Tabelle 3.7: Ergebnisse der Übertragungsversuche mit *H. obsoletus*

Die PCR-Testergebnisse ergaben, dass lediglich bei *R. repens* aus der Testgruppe der natürlichen Nahrungspflanzen von *H. obsoletus* eine Übertragung von Phytoplasmen nachgewiesen werden konnte. In der Gruppe der natürlichen Weinbergsflora konnte für *L. corniculatus* und *T. campestre* eine erfolgreiche Übertragung des Erregers nachgewiesen werden. Die Untersuchung potentieller Begrünungspflanzen zeigte, dass alle Pflanzenarten mit Ausnahme von *H. pilosella* infiziert werden können. Die Kontrollgruppe der experimentellen Übertragungspflanzen zeigte erwartungsgemäß bei beiden Pflanzenarten eine erfolgreiche Übertragung des Vektors.

Versuchspflanze		Versuchsjahr	Gesamtanzahl Versuchspflanzen	Gesamtanzahl Versuchstiere	Anzahl (N) Versuchstiere pro Versuchspflanze	Gesamtanzahl getesteter Tiere	Gesamtanzahl infizierter Tiere (PCR-Tests)	Anzahl infizierter Pflanzen ¹ (PCR-Tests)
Natürliche Nahrungspflanzen von <i>H. obsoletus</i>								
<i>Artemisia vulgaris</i>	Gemeiner Beifuß	2000	12	48	4	37	18	0
<i>Cirsium arvense</i>	Acker-Kratzdistel	2000	11	44	4	31	13	0
<i>Leontodon autumnalis</i>	Herbst-Löwenzahn	2000	13	52	4	47	21	0
		2001	10	50	5	40	23	0
<i>Ranunculus repens</i>	Kriechender Hahnenfuß	2000	11	44	4	29	14	7 (63,6)
		2001	6	6	1	6	2	1 (16,7)
			15	75	5	54	24	10 (66,7)
<i>Taraxacum officinale</i>	Gemeiner Löwenzahn	2000	10	40	4	31	19	0
		2001	14	70	5	59	26	0
<i>Urtica dioica</i>	Große Brennessel	2000	16	64	4	54	29	0
Potentielle Begrünungspflanzen								
<i>Dianthus deltoides</i>	Heide-Nelke	1999	12	60	5	42	15	6 (50)
<i>Hieracium pilosella</i>	Habichtskraut	1999	12	60	5	47	8	0
		2000	19	76	4	64	27	0
		2001	11	55	4	38	21	0
<i>Lotus corniculatus</i>	Hornklee	2000	3	12	4	9	8	2 (66,7)
<i>Silene vulgaris</i>	Taubenkopf-Leimkraut	2000	12	60	5	42	16	5 (41,7)
<i>Vicia villosa</i>	Zottige Wicke	2000	10	40	4	29	12	4 (40,0)
Natürliche Weinbergspflanzen								
<i>Clematis vitalba</i>	Gemeine Waldrebe	2000	6	24	4	23	14	0
<i>Daucus carota</i>	Wilde Möhre	2000	27	108	4	84	34	0
<i>Lamium purpureum</i>	Rote Taubnessel	2000	5	20	4	12	6	0
<i>Lotus corniculatus</i>	Hornklee	2000	3	12	4	9	8	2 (66,7)
<i>Malva neglecta</i>	Weg-Malve	2000	6	24	4	13	7	0
<i>Trifolium campestre</i>	Gelber Ackerklee	2000	5	20	4	8	4	0
		2001	12	60	5	42	20	1 (8,3)
Experimentelle Übertragungspflanzen								
<i>Vicia faba</i>	Saubohne	1999	5	30	6	15	3	5 (100,0)
		2000	7	28	4	11	0	0
		2001	68	68	1	68	35	18 (26,5)
15	75		5	71	42	13 (86,7)		
<i>Vitis vinifera</i> „Riesling“	Weinrebe	2001	10	100	10	75	28	4 (40,0)

Ergebnisse

Tabelle 3.8: Berechnung der Übertragungswahrscheinlichkeit- und der Übertragungseffizienz von *H. obsoletus* auf ausgewählte Testpflanzen

Der Vergleich der berechneten Werte für infizierbare Pflanzenarten offenbart im Gegensatz zu den meisten anderen getesteten Pflanzenarten eine geringere Präferenz von *H. obsoletus* für die Weinrebe *V. faba*, was sich in einer deutlich niedrigeren Übertragungswahrscheinlichkeit (PIO) und Übertragungseffizienz (PEFF) ausdrückt. Der größte Unterschied zeigte mit einem mehr als fünffach höheren PIO-Wert und einem mindestens vierfach höheren PEFF-Wert die Versuchspflanze *V. faba*.

Übertragungswahrscheinlichkeit: **PIO: $1-(1-RIO)^{1/N}$** ; RIO: Anteil infizierter Pflanzen; N: Anzahl der Testtiere pro Testpflanze; Übertragungseffizienz: **PEFF: PIO / PFL** ; PFL: Anteil infizierter Testtiere pro Pflanzenart;

Versuchspflanze	Versuchsjahr	Rio	N	1/N	PIO (%)	PFL (%)	PEFF (%)
Ranunculus arvensis	2000	0,64	4	0,25	22,5	48,3	46,7
	2001	0,48	5	0,20	12,3	43,3	28,3
Dianthus deltoides	1999	0,50	5	0,20	13,0	41,4	36,3
Silene vulgaris	2000	0,42	5	0,20	10,3	38,1	27,1
Vicia villosa	2000	0,40	4	0,25	12,0	41,4	29,0
Trifolium campestre	2001	0,10	5	0,20	2,1	47,6	4,4
Vicia faba	2001	0,27	1	1,0	27,0	51,5	52,5
	2001	0,87	5	0,20	33,5	59,2	56,6
Vitis vinifera „Riesling“	2001	0,40	10	0,10	5,0	37,3	13,3

3.3.2 Untersuchungen zu den Übertragungseigenschaften von *O. alni* als Vektor der Phytoplasmose vom FD- Pfalz-Typ

Nachdem schon in einem vom *Forschungsring des Deutschen Weinbaus* geförderten Projekts die Erreger der FD-Pfalz auf der *Schwarzen Erle* (*A. glutinosa*) gefunden wurden und *O. alni* als Vektor dieses Phytoplasmas auf Erlen identifiziert wurde, konzentrierten sich die Versuche auf Übertragungsversuche (vgl. Tab. 3.9) zum Nachweis der Übertragung des Erregers durch die gleiche Zikade auf die Weinrebe. Insgesamt wurden 1033 Tiere, davon 234 Tiere von der Mittelmosel (Graach, Wehlen und Veldenz) und 799 Tiere aus der Pfalz (Böchingen und Maikammer) getestet. Während an der Mittelmosel nur sehr selten Weinstöcke mit dem Erreger der FD-Pfalz infiziert waren, konnte auf den Versuchsflächen der Pfalz dagegen eine höhere Anzahl vereinzelt auftretender symptomatischer Weinreben beobachtet werden. Während die Versuchstiere im Labor problemlos für mindestens eine Woche auf der Schwarzerle überlebten, starben sie auf der Weinrebe nach spätestens 48 Stunden. In den Übertragungsversuchen wurden nur 3 von insgesamt 99 Rebstöcken infiziert. Alle Rebstöcke wurden mittels der PCR-Analyse untersucht, wobei ausschließlich die symptomatischen Pflanzen infiziert waren. Durch RFLP-Analyse des FD9- Fragments (vgl. Abb. 3.2.11) wurden die Erreger der *Elm-Yellows-Gruppe* verifiziert und damit gleichzeitig gezeigt, dass es sich dabei um den FD-Pfalz-Erreger handelte. Auch die Infektionshäufigkeit der Gesamtanzahl aller mittels der PCR-Analyse getesteten Individuen (832 Tiere) war mit 5,7% sehr gering und entspricht damit der Beobachtung einer geringen Verbreitung der FD-Pfalz im Freiland. Aber die Tatsache

Ergebnisse

einer erfolgreichen Übertragung überhaupt und der qualitative Nachweis des FD-Pfalz-Erregers identifiziert *O. alni* als Vektor dieser bisher in Deutschland unbedeutenden Phytoplasnose.

Tabelle 3.9: Ergebnisse der Übertragungsversuche mit *Oncopsis alni*

Die Ergebnisse der Übertragungsversuche bestätigen die Feldbeobachtungen, dass von diesem Vektor nur ein geringes Gefährdungspotential ausgeht, was an der geringen Anzahl infizierter Pflanzen deutlich wird. Lediglich bei 4 der 138 getesteten Pflanzen konnte der Erreger nachgewiesen werden.

Versuchspflanze	Gesamtanzahl Versuchspflanzen	Gesamtanzahl Versuchstiere	Gesamtanzahl getesteter Tiere	Gesamtanzahl infizierter Tiere (PCR-Tests)	Gesamtanzahl infizierter Pflanzen (PCR-Tests)
Versuchstiere der Mittelmosel					
Alnus glutinosa	5	23	10	5	1
<i>Vicia faba</i>	1	3	1	0	0
<i>Vitis vinifera</i> „Riesling“	9	83	71	5 (7,1%)	0
<i>Vitis vinifera</i> „Scheurebe“	13	125	72	11 (15,4%)	2
Versuchstiere der Pfalz					
<i>Vicia faba</i>	33	165	152	11 (7,2%)	0
<i>Vitis vinifera</i> „Scheurebe“	77	634	526	15 (2,9%)	1
Gesamtzahl	138	1033	832	47 (5,7%)	4 (2,9%)

3.4 NACHWEIS UND DIFFERENZIERUNG REBPATHOGENER PHYTOPLASMEN DURCH DIE PCR

Bevor der Nachweis rebpathogener Phytoplasmen im großen Umfang begonnen wurde, war es zunächst zweckmäßig, die bisher angewendeten PCR-Bedingungen zu überprüfen, zumal mit dem „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf) ein neuer Thermocycler in Betrieb genommen wurde. Dabei wurden die im vorangegangenen Forschungsprojekt (vgl. REINERT, 1999) etablierten PCR-Bedingungen durch Erstellung eines Temperaturgradienten bestätigt. Lediglich für die Verwendung des *STOL*-Primerpaars zum spezifischen Nachweis des Schwarzholz-Phytoplasmas wurde zur Verringerung unspezifischer Bandenmuster die Anzahl der Reaktionszyklen auf dreißig (vormals 35) reduziert (vgl. Tab. 2.13).

Ergebnisse

3.4.1 Detektion des Schwarzholz-Phytoplasmas in *Hyalesthes obsoletus*

Regionale Unterschiede in der Ausprägung der Infektionshäufigkeit von *H. obsoletus*

Die Daten zur Infektionshäufigkeit des Schwarzholz-Phytoplasmas in den Vektorpopulationen der verschiedenen Weinbauregionen basieren auf PCR-Tests mit einzelnen Tieren. Soweit möglich, wurden mindestens 100 Tiere pro Beprobungsfläche getestet, wobei die Fangzahlen nicht immer für diesen Probenumfang ausreichten, zumal ein Großteil der Lebendfänge für Übertragungsversuche und Tests zur Feststellung des Einflusses trophischer Faktoren verwendet wurde. Während an der Mittelmosel in den ersten beiden Versuchsjahren auch hohe Fangzahlen anhand der Gelbfallen erreicht werden konnten, basieren die Testergebnisse der anderen Weinanbaugebiete ausschließlich auf lebendgefangene Testtiere. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass zur genauen Feststellung einer Phytoplasmaose lebendgefangene Tiere besser geeignete waren als die von den Gelbfallen entnommenen Tierproben (vgl. Abb. 3.12). In den ersten beiden Untersuchungsjahren wurden zu Vergleichszwecken die Ergebnisse von 3486 lebendgefangenen Tieren und 955 mittels Gelbfallen gefangenen Tieren verglichen. Die Nachweisgrenze lag bei den Gelbfallen-Proben dabei um mindestens zehn Prozentpunkte niedriger. Die im dritten Untersuchungsjahr mittels Gelbfallen erreichten Fangzahlen waren für einen Vergleich der Testergebnisse nicht mehr ausreichend.

Die höchsten Infektionshäufigkeiten konnten bei Tieren der Ackerwinde-Gruppe in den Weinanbaugebieten Mosel-Saar-Ruwer, Mittelrhein, Nahe und bei Tieren der Brennessel-Gruppe im Weinanbaugebiet Pfalz festgestellt werden (vgl. Abb. 3.13 bzw. Tab. 3.10). Die mit 81,4% höchste Infektionshäufigkeit wurde im ersten Versuchsjahr bei einer Population der Ackerwinde-Gruppe festgestellt (vgl. Tab. 3.10.: FlächeBKS-1.1). Dagegen zeigten Tiere gleicher Regionen, die auf dem Kriechenden Hahnenfuß als Wirts- und Nahrungspflanze spezifiziert waren, mit maximal 5,9% eine sehr geringe Infektionshäufigkeit (vgl. Tab. 3.10: Weinanbaugebiet Mosel-Saar-Ruwer bzw. Tab. 3.11: Beprobungsflächen PLAT-1 und PLAT-3 bzw. Tab. 3.13: PLAT-1/3). Wie im bereits vorangegangenen Kapitel beschrieben, reagiert diese Pflanzenart extrem sensibel auf eine Phytoplasmaose, so dass ein frühzeitiges Absterben der betroffenen Pflanzen beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse von Tieren der Brennessel-Gruppe, die in der Pfalz gefangen wurden, sind allerdings differenziert zu betrachten. Während auf einigen Beprobungsflächen (Versuchsfläche UNG-1 und Standorte in der Umgebung) Infektionshäufigkeiten bis maximal 7,8% registriert wurden, zeigten Tiere anderer Beprobungsflächen (BÖCH-1 und Umgebung) Infektionshäufigkeiten zwischen 25,5- 48,4 Prozent (vgl. Tab. 3.10 und Tab. 3.11).

Ergebnisse

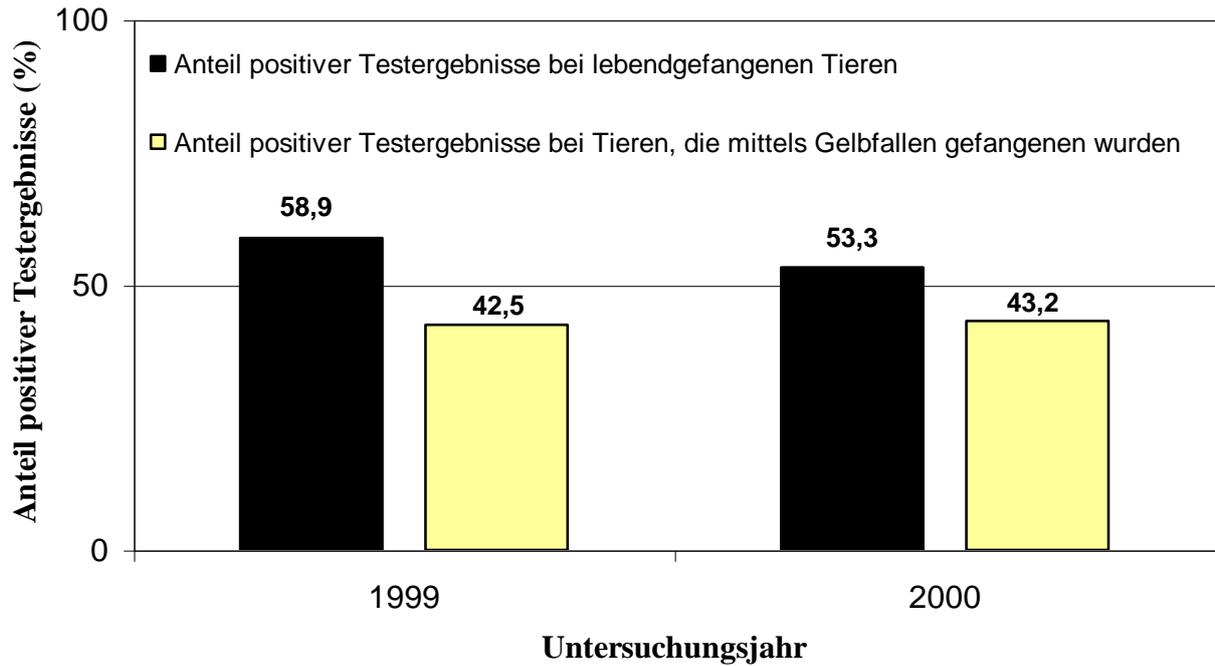


Abb. 3.12: Unterschiede der PCR-Testergebnisse bei lebendgefangenen bzw. mittels passiven Gelbfallen gefangenen Tiere.

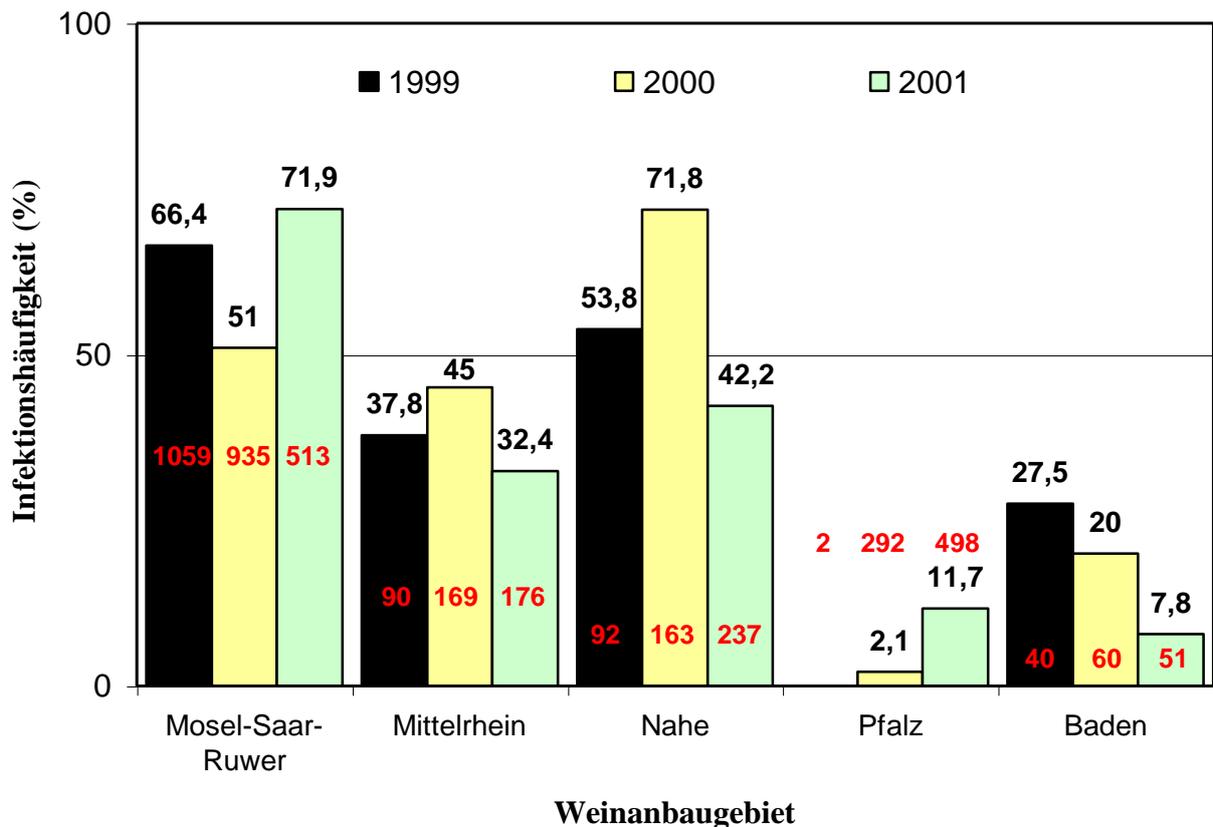


Abb. 3.13: Zusammenfassung der im Untersuchungszeitraum festgestellten Infektionshäufigkeiten (%) für die Gesamtheit der getesteten Lebendfänge von *Hyalesthes obsoletus*. Für die Weinanbaugebiete Mosel Saar Ruwer, Mittelrhein, Nahe und Baden sind die Infektionshäufigkeiten von Tieren der „Ackerwinde“-Gruppe dargestellt, während die für das Weinanbaugebiet Pfalz ermittelten Infektionshäufigkeiten aus Populationen der „Brennessel“-Gruppe stammen. Die rot markierten Zahlen geben dabei die Gesamtanzahl der getesteten Tiere an.

Ergebnisse

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden gleichzeitig mit dem erstmaligen Nachweis des Vektors für die Standorte an der Nahe, in der Pfalz (Böchingen), in Franken (Randersacker) im Rheingau (Gemarkung Lorch) und in Baden sowohl eine Infektion der Vektoren als auch der Weinreben (vgl. Tab. 3.15 und 3.16) mit dem Schwarzholz-Phytoplasma nachgewiesen.

Untersuchungen zur Infektionshäufigkeit bei weiblichen und männlichen Imagines von *Hyalesthes obsoletus*

Das Ziel dieser Untersuchungen war die Klärung einer eventuellen geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Sensibilität gegenüber dem Erreger. Die Untersuchung sollte damit eine Beurteilung über eine vom Geschlecht des Tieres abhängige Ausbreitung der Schwarzholzkrankheit ermöglichen.

Insgesamt wurden 2515 Weibchen und 2972 Männchen im Untersuchungszeitraum mittels der PCR einzeln getestet. Es zeigte sich, dass die Weibchen im gesamten Untersuchungszeitraum eine zwischen 0,1 Prozent (Tiere der „Brennessel-Gruppe“) und 8,4 Prozent (Tiere der „Ackerwinde-Gruppe“) höhere durchschnittliche Infektionshäufigkeit aufwiesen (vgl. Tab. 3.10). Beide Geschlechter zeigten auf der Untersuchungsfläche BKS-1.1 mit 83,7 Prozent (Weibchen) bzw. 78,7 Prozent (Männchen) die höchsten Infektionshäufigkeiten, die innerhalb einer Population festgestellt werden konnten (vgl. Tab. 3.11). Starke geschlechtsspezifische Schwankungen sind dabei häufig detektiert worden, wobei der größte Unterschied mit 17,2 Prozent auf der Untersuchungsfläche MEHR-2.1 festgestellt werden konnte (vgl. Tab. 3.11 und Abb. 3.15). Die Untersuchungsergebnisse belegen einerseits, dass beide Geschlechter in unterschiedlichem Maße von einer Infektion betroffen sein können, andererseits weisen sie gleichfalls dieselbe Tendenz in der Ausprägungsstärke auf. Unterschiede in der Infektionshäufigkeit über 10 Prozent wurden bei nur 6 verschiedenen Populationen (vgl. Tab. 3.11: Versuchsfeldschlüssel A4, A7, A10-12, A16 und A21) festgestellt. Sowohl bei Populationen mit einem stärker infizierten weiblichen bzw. männlichen Anteil konnten in benachbarte Flächen unterschiedliche Durchseuchungsgrade auftreten (vgl. Abb. 3.14).

Ergebnisse

Tabelle 3.10: Zusammenfassung der mittels PCR-Analysen festgestellten Infektionshäufigkeiten von *H. obsoletus*;

Weinanbaugebiet	Beprobungspflanze A: Ackerwinde; B: Brennessel; H: Knolliger Hahnenfuß;		Fangjahr	Fangmethode G: Gelbfaltenfang; L: Lebendfang;	Gesamtzahl getesteter Tiere	Gesamtzahl weiblicher Tiere	Gesamtzahl männlicher Tiere	Gesamtzahl PCR-positiver Tiere	Gesamtzahl PCR-positiver Weib- chen	Gesamtzahl PCR-positiver Männ- chen
Mosel Saar Ruwer (Mittelmosel)	A	1999	L		1059	518	541	703	347	356
		2000			935	441	494	477	235	242
		2001			513	247	266	369	205	164
		Durchschnittliche Infektionshäufigkeit:								65,3 %
	G	1999	G		352	62	290	154	29	125
		2000			294	73	221	127	33	94
		2001			15	2	13	0	0	0
		Durchschnittliche Infektionshäufigkeit:								45,9 %
	H	1999	L		251	124	127	9	5	4
		2000			51	26	25	0	0	0
		2001			18	3	15	0	0	0
		1999	G		16	11	15	0	0	0
	2001			20	8	12	1	0	1	
Summe	A	1999-2001	L+G	3168	1343	1825	1830	849	981	
Summe	H	1999-2001	L+G	356	172	194	10	5	5	
Mittelrhein	A	1999	L		90	39	51	34	13	21
		2000			169	87	82	76	39	37
		2001			176	88	88	57	32	25
	H	2001	L		52	19	33	5	2	3
	Summe	A	1999-2001	L	435	214	221	167	84	83
	Summe	H	1999-2001	L	52	19	33	5	2	3
Nahe	A	1999	L		92	43	49	49	24	25
		2000			163	81	82	117	62	55
		2001			237	92	145	100	41	59
	Summe	A	1999-2001	L	492	216	276	166	127	139
								(58,8%)	(50,4%)	
Pfalz	B	1999	L		2	1	1	0	0	0
		2000			292	207	85	6	4	2
		2001			498	276	218	58	36	22
		1999	G		6	1	5	3	1	2
	Summe	B		1999-2001	L+G	798	485	309	67	41
								(8,5%)	(8,4%)	
Baden (Ortenau)	A	1999	L		40	16	24	11	5	6
		2000			60	22	38	12	6	6
		2001			51	14	37	4	1	3
		1999	G		4	2	2	0	0	0
	Summe	A		1999-2001	L+G	155	54	101	27	12
								(22,2%)	(14,9%)	
Hessische Bergstraße	A	1999	L		22	7	15	4	0	4
		2000			9	5	4	3	2	1
	Summe	A	1999-2001	L	31	12	19	7	2	5
Testumfang L + G	1999-2001				5487	2515	2972	2379	1122	1257

Ergebnisse

Tab. 3.11: Zusammenfassung der PCR-Testergebnisse (Einzeltiertests) von *Hyalesthes obsoletus* 1999 bis 2001

In Abhängigkeit der Fangmethode wurden anhand der PCR-Testergebnisse für alle Beprobungsflächen der Untersuchungsjahre 1999 – 2001 die geschlechtsbezogenen Infektionshäufigkeiten der einzelnen Populationen aufgelistet. Die stärksten Infektionshäufigkeiten traten bei den Populationen auf, die gezielt auf Flächen von der Ackerwinde der Weinanbaugebiete am Mittelrhein und an der Mittelmosel gefangen wurde. Jeder Beprobungsfläche wurde in Abhängigkeit des Untersuchungsjahres und der beprobten Pflanzenart eine jeweilige Identifikationsnummer zugeordnet (Versuchsfächenschlüssel), die ein Vergleich mit den in der Abbildung ... abgebildeten geschlechtsbezogenen Infektionshäufigkeiten ermöglicht.

Beprobungsfläche (Flächencharakteristik: B: Brachfläche; E: Ertragsfläche; S: Steilhang)	Beprobungspflanze A: Ackerwinde; B: Brennnessel; H: Kriechender Hahnenfuß;	Versuchsfeldschlüssel	Untersuchungsjahr	Fangmethode G: Gelbfallenfang L: Lebendfang	Gesamtzahl getesteter Tiere	Gesamtanzahl weiblicher Tiere	Gesamtanzahl männlicher Tiere	Gesamtanzahl PCR-positiver Tiere (Anteil infizierter Testtiere)	Gesamtanzahl PCR-positiver Weibchen (Anteil infizierter Weibchen)	Gesamtanzahl PCR-positiver Männchen (Anteil infizierter Männchen)
Mosel Saar Ruwer (Mittelmosel)										
BKS-1.1 (B;S)	A	A1	1999	L	274	147	127	223 (81,4)	123 (83,7)	100 (78,7)
		A2	2000		145	73	72	80 (55,2)	42 (57,5)	38 (52,8)
		A3	2001		117	66	51	61 (52,1)	35 (53,0)	26 (51,0)
		A4	1999	G	193	21	172	109 (56,5)	14 (66,7)	95 (55,2)
		A5	2000		122	48	74	54 (43,6)	23 (47,9)	31 (41,9)
			2001		0	-	-	-	-	-
BKS-2.1 (E;S)	A		1999	L	18	9	9	13	8	5
		A6	2000		86	32	54	42 (48,8)	15 (46,9)	27 (50,0)
			2001		15	6	9	8	4	4
			1999	G	10	4	6	5	2	3
			2000		11	5	6	4	3	1
			2001		2	2	0	0	0	0
BKS-3.1 (E;S)	A		1999	L	0	-	-	-	-	-
		A7	2000		67	31	36	18 (26,9)	10 (32,3)	8 (22,2)
		A8	2001		116	55	61	77 (66,4)	34 (61,9)	43 (70,5)
			1999	G	39	13	26	6	2	4
			2000		32	4	28	13	1	12
BKS-4 (E;S)	A		1999	G	42	14	28	14	6	8
			2000		11	2	9	2	0	2

Ergebnisse

Fortsetzung Tab. 3.11

Beprobungsfläche (Flächencharakteristik: B: Brachfläche; E: Ertragsfläche; S: Steilhang)	Beprobungspflanze A: Ackerwinde; B: Brennessel; H: Kriechender Hahnenfuß;	Versuchsfeldschlüssel	Untersuchungsjahr	Fangmethode G: Gelbfallen- bzw. L: Lebendfang	Gesamtzahl getesteter Tiere	Gesamtanzahl weiblicher Tiere	Gesamtanzahl männlicher Tiere	Gesamtanzahl PCR-positiver Tiere (Anteil infizierter Testtiere)	Gesamtanzahl PCR-positiver Weibchen (Anteil infizierter Weibchen)	Gesamtanzahl PCR-positiver Männchen (Anteil infizierter Männchen)
BKS-5	A		2000	L	48	30	28	27	12	15
			2001		43	21	22	15	7	8
			1999	G	16	2	14	7	0	7
			2000		23	1	22	5	1	4
BKS-6.1-2 (E;S)	A	A9	1999	L	177	75	102	130 (73,5)	50 (66,7)	80 (78,4)
		A10	2000		172	80	92	103 (59,9)	55 (68,8)	48 (52,2)
		A11	2001		178	75	103	101 (56,7)	36 (48,0)	75 (63,1)
			1999	G	7	0	7	4	0	4
			2000		31	2	29	16	2	14
MEHR-2.1 (B;S)	A	A12	1999	L	244	107	137	152 (62,3)	77 (72,0)	75 (54,8)
		A13	2000		204	115	89	125 (61,3)	73 (63,5)	52 (58,4)
MEHR-2.1 (B;S)	A		2001	G	14	9	5	9	5	4
			2000		31	7	24	11	0	11
KRÖV-1.1 (E;S)	A	A14	1999	L	235	125	110	98 (41,7)	50 (40)	48 (43,6)
		A15	2000		138	58	80	77 (55,8)	36 (62,1)	41 (51,3)
			2001		18	12	6	14	10	4
			1999	G	45	8	37	9	5	4
			2000		31	3	28	21	3	18
PLAT-1 (B;S)	H	H1	1999	L	136	76	60	8 (5,9)	5 (6,6)	3 (5,0)
			2000		9	5	4	0	0	0
			2001		17	2	15	0	0	0
			2001		20	8	12	1	0	1
PLAT-3 (E;S)	H	H2	1999	L	115	48	67	1 (0,9%)	0	1 (1,5%)
			2000		42	21	21	0	0	0

Ergebnisse

Fortsetzung Tab. 3.11

Beprobungsfläche (Flächencharakteristik: B: Brachfläche; E: Ertragsfläche; S: Steilhang)	Beprobungspflanze A: Ackerwinde; B: Brennessel; H: Kriechender Hahnenfuß	Versuchsfeldschlüssel	Untersuchungsjahr	Fangmethode G, Gelbfallen- bzw. L: Lebendfang	Gesamtzahl getesteter Tiere	Gesamtanzahl weiblicher Tiere	Gesamtanzahl männlicher Tiere	Gesamtanzahl PCR-positiver Tiere (Anteil infizierter Testtiere)	Gesamtanzahl PCR-positiver Weibchen (Anteil infizierter Weibchen)	Gesamtanzahl PCR-positiver Männchen (Anteil infizierter Männchen)
PLAT-3 (E;S)	H		2001		1	1	0	0	0	0
			1999	G	26	11	15	0	0	0
PLAT-4 (B;S)	A		2000	L	24	7	17	0	0	0
			2001		12	3	9	1	1	0
			2001		13	0	13	0	0	0
MAR-1 (B; S)	A		2000		2	1	1	1	0	1
Zusätzliche Beprobungsflächen entlang der Mittelmosel (A)			1999	L	111	55	56	87	39	48
			2000		49	23	26	29	16	13
Mittelrhein										
BOPP-5 (E;S)	A	A17	1999	L	90	39	51	34 (37,8)	13 (33,3)	21 (41,2)
		A18	2000		169	87	82	76 (45,0)	39 (44,8)	37 (45,1)
		A19	2001		176	88	88	57 (32,4)	32 (36,4)	25 (28,4)
BOPP-6 (E;S)	H		2001	L	52	19	33	5	2	3
Nahe										
KF-1 (E)	A		1999	L	8	3	5	2	1	1
			2000		2	2	0	0	0	
KK-1 (E)	A		1999	L	5	1	4	0	0	0
			2000		3	1	2	2	1	1
NK-1 (E;S)	A		1999	L	4	1	3	1	0	1
			2000		33	18	15	21	11	10
			2001		40	22	18	5	3	2
			1999	G	4	1	3	1	0	1

Ergebnisse

Fortsetzung Tab. 3.11

Beprobungsfläche (Flächen- charakteristik: B: Brachfläche; E: Ertragsfläche; S: Steilhang)	Beprobungspflanze A: Ackerwinde B: Brennessel H: Kriechender Hahnenfuß	Versuchsfeldschlüssel	Untersuchungsjahr	Fangmethode G: Gelbfallen- bzw. L: Lebendfang	Gesamtzahl geesteter Tiere	Gesamtanzahl weiblicher Tiere	Gesamtanzahl männlicher Tiere	Gesamtanzahl PCR-positiver Tiere (Anteil infizierter Testtiere)	Gesamtanzahl PCR-positiver Weibchen (Anteil infizierter Weibchen)	Gesamtanzahl PCR-positiver Männchen (Anteil infizierter Männchen)	
MONZ-1 (E)	A	A20	1999	L	75	38	37	46 (61,3)	23 (60,5)	23 (62,2)	
		A21	2000		125	60	65	94 (75,2)	50 (83,3)	44 (67,7)	
		A22	2001		197	70	127	95 (48,2)	38 (54,3)	57 (44,9)	
Pfalz											
UNG-1 (E)	B		1999	L	2	1	1	0	0	0	
		B1	2000		281	200	81	4 (1,4)	3 (1,5)	1 (1,3)	
		B2	2001 ^a		238	139	99	14 (5,9)	9 (6,5)	5 (5,1)	15 (5,6)
			2001 ^b		420	245	171	31 (7,4)	21 (8,6)	10 (5,8)	
BÖCH-1 (E)	B		1999	G	6	1	5	3	1	2	
			2000	L	11	7	4	2	1	1	
		B3	2001		78	31	47	27 (34,6)	15 (48,4)	12 (25,5)	
BADEN (Ortenau)											
NEU-1 (E)	A		1999	L	40	16	24	11	5	6	
		A23	2000		60	22	38	12 (20)	6 (27,3)	6 (15,8)	
		A24	2001		51	14	37	4 (7,8)	1 (7,1)	3 (8,1)	
			1999	G	4	2	2	0	0	0	
Hessische Bergstraße											
HEPP-1 (E)	A		1999	L	22	7	15	4	0	4	
			2000		9	5	4	3	2	1	

Ergebnisse

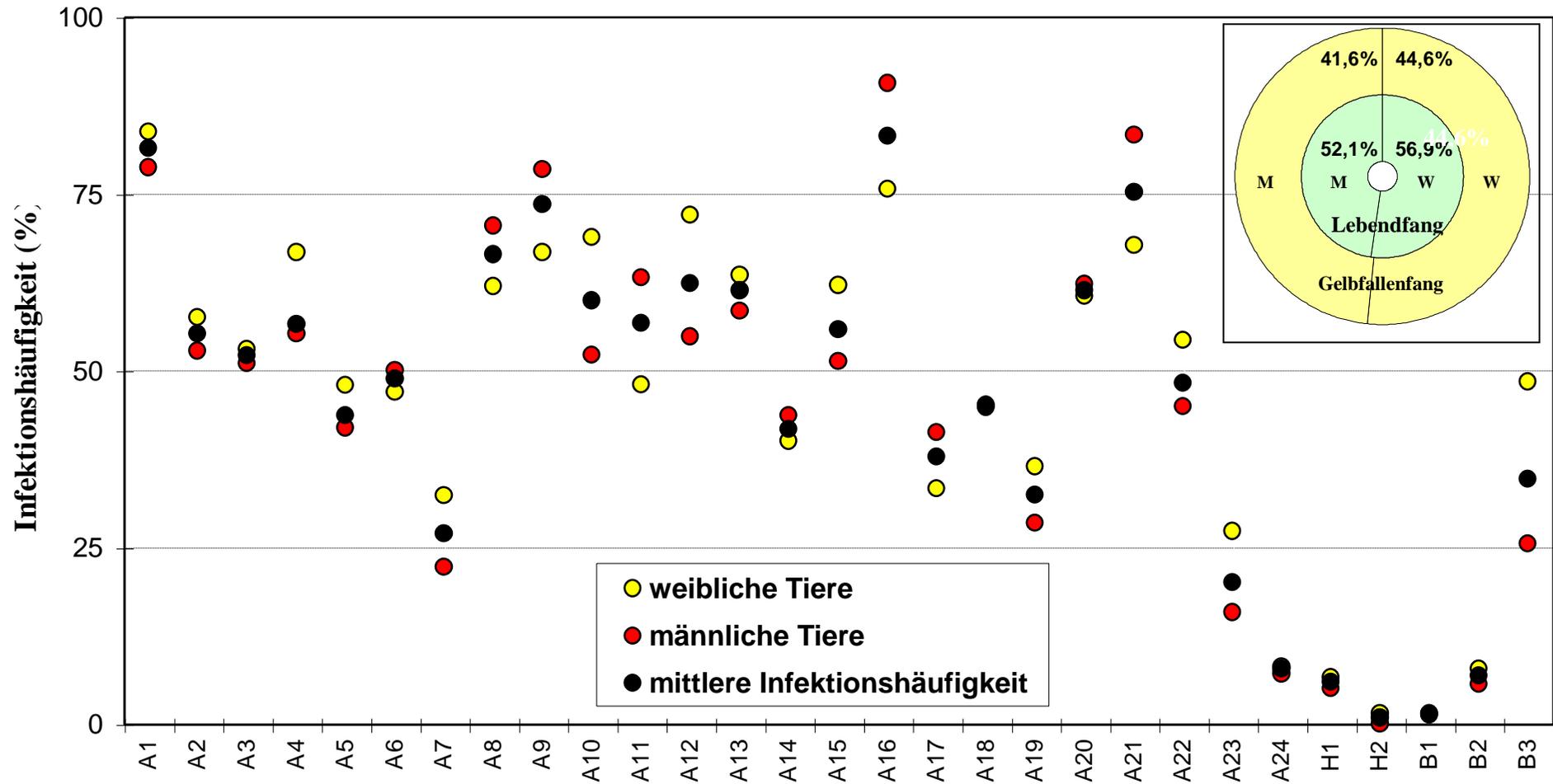


Abb. 3.14: Infektionshäufigkeiten der weiblichen und männlichen Imagines verschiedener Populationen von *H. obsolete* in den Jahren 1999-2001

Der Versuchsflächenschlüssel ist in Tab. 3.11 aufgeführt: Der Anfangsbuchstabe steht für die jeweilige Beprobungspflanze. Die Ziffer bezieht sich auf das jeweilige Versuchsfeld und das jeweilige Jahr. Die integrierte Abbildung zeigt die im Untersuchungszeitraum festgestellte Infektionshäufigkeit bei weiblichen (W) und männlichen (M) Imagines von *H. obsolete*.

Ergebnisse

Untersuchungen zum Verlauf der Infektionshäufigkeit während der Flugphase von *Hyalesthes obsoletus*

Die Untersuchungen zum Verlauf der Infektionshäufigkeit innerhalb einer Population wurde mit dem Ziel durchgeführt, Anhaltspunkte über den möglichen Zeitpunkt der Akquisition des Schwarzholz-Phytoplasma zu erhalten. Aus diesem Grund wurden solche Beprobungsflächen ausgesucht, die mit stark durchseuchten Populationen und gleichzeitig hoher Zikadendichte gekennzeichnet waren. Die Mindesttestzahl betrug, soweit möglich, 50 wöchentlich getestete Tiere. Die Ergebnisse zeigen eindeutig (vgl. Tab. 3.12), dass schon mit dem Beginn der Flugphase oftmals ein hoher Prozentsatz der Imagines infiziert war (vgl. Abb. 3.15 und Tab. 3.14). Auf einigen Flächen wurde sogar der höchste Prozentsatz an Infektionshäufigkeit schon zum Beginn der Flugphase ermittelt.

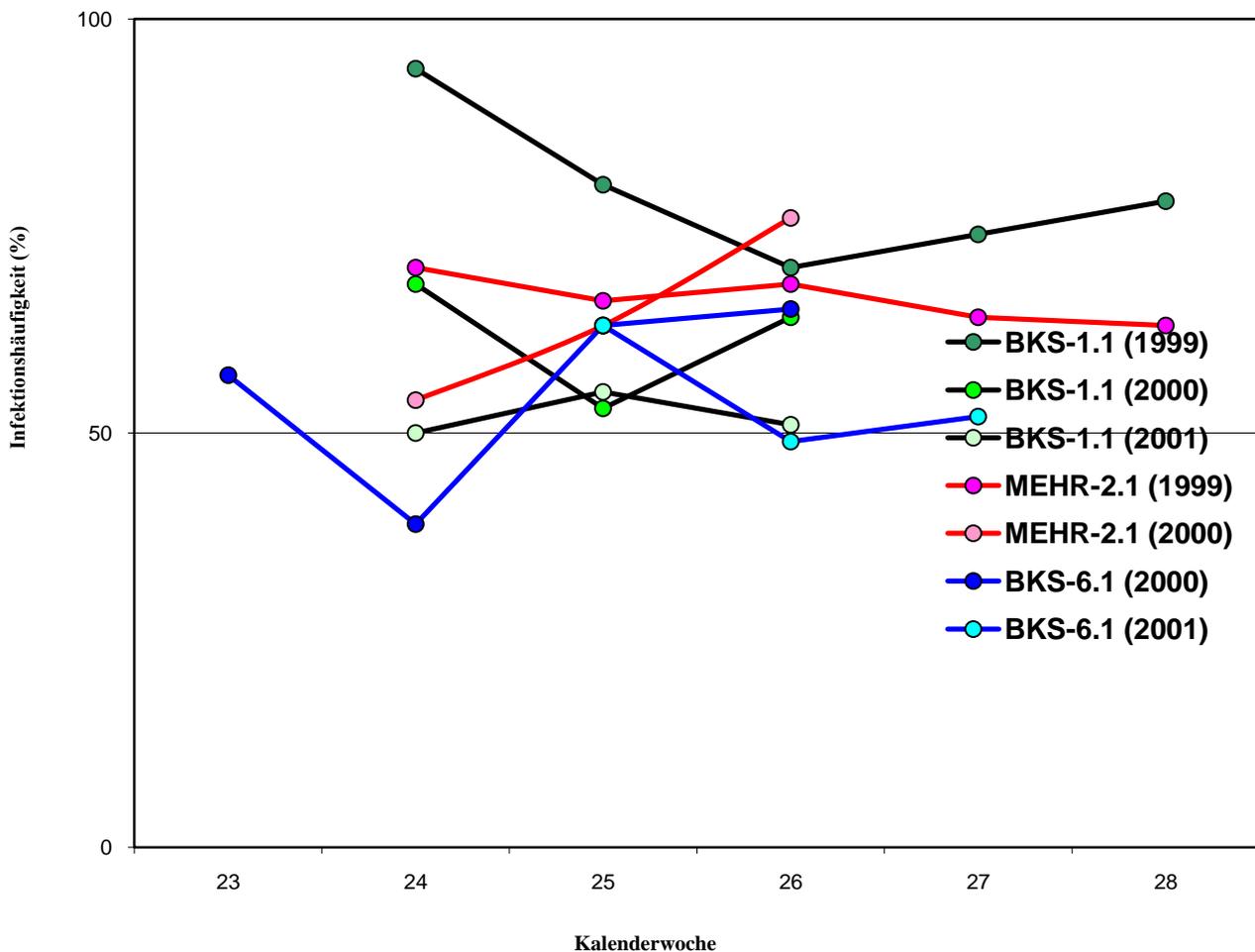


Abb. 3.15: Verlauf der Infektionshäufigkeit von *H. obsoletus* während der Flugphase der Imagines

Verlauf der Infektionshäufigkeit von Populationen der Ackerwinde-Gruppe an ausgewählten Untersuchungsflächen. Die Infektionshäufigkeit ist schon zu Beginn der Flugphase der Imagines sehr hoch. Der weitere Verlauf der Flugphase der Imagines zeichnet sich zwar durch Schwankungen in der Infektionshäufigkeit aus, ihre Stärke bleibt aber weitgehend erhalten.

Ergebnisse

Nachweis des Schwarzholz-Phytoplasmas mittels Gruppentests (Batch-Tests)

1. Voruntersuchungen zur Sensibilität der PCR-Technik bei Batch-Tests

Für die durchzuführenden Gruppentests musste zunächst die Frage geklärt werden, bis zu welcher Gruppengröße sich gerade ein infiziertes Tier nachweisen lässt. Zunächst wurde anhand entlang der Körperlängsachse geschnittener Tierpräparate die Bestimmung der Nachweisbarkeit eines geringen Pathogen-Titer überprüft. Die zur Verfügung stehenden Tierproben stammten von schwach- bzw. hochinfizierten Beprobungsflächen.

Tabelle 3.12: Anteil infizierter Tiere (Einzeltier-Tests) während der Flugphase der Imagines von *H. obsoletus* auf ausgewählten Beprobungsflächen

NT: Anzahl getesteter Tiere; N+: Anzahl infizierter Tiere;

Versuchsfläche	Jahr	Fangwoche													
		1		2		3		4		5		6		7	
		NT	N+	NT	N+	NT	N+	NT	N+	NT	N+	NT	N+	NT	N+
BKS-1.1	1999	50	47	90	70	59	41	50	37	18	18	12	7	3	1
	2000	2	0	29	15	58	31	52	33	4	1				
	2001	1	0	3	1	6	0	40	21	52	26	14	5	3	2
BKS-3.1	2000	51	11	15	6										
	2001	50	32	55	36	3	1	8	8						
KRÖV-1.1	1999	50	23	50	24	16	5	48	23	14	7	5	3	5	2
	2000	8	3	50	38	60	38	5	2	12	9	1	1	2	0
	2001	3	3	9	5	2	2	4	4						
MONZ-1.1	1999	72	46	0	0	3	0								
	2000	50	34	52	30	23	20								
	2001	21	12	66	32	35	13	54	28	15	8	6	2		
MEHR-2.1	1999	50	35	55	36	28	19	30	19						
	2000	17	7	55	30	51	30	55	42	20	11	4	2	2	1
	2001	3	2	0	0	6	2	1	1	1	1	3	3		
BKS-6.1	1999	50	35	50	38	43	35	22	18	7	5				
	2000	51	29	184	71	65	41	136	89	21	12				
	2001	82	52	131	64	71	37	25	12	1	0				
BOPP-1.5	1999	50	18	0	0	37	16	0	0	1	0				
	2000	81	29	0	0	69	38	27	9	2	2				
	2001	6	1	54	21	71	28	50	7						

Es konnte zunächst festgestellt werden, dass die Probenherkunft und die Fangmethode entscheidend für die Beurteilung einer Infektion sein kann (vgl. Tab. 3.13): Während bei lebendgefangenen Tieren von schwach durchseuchten Populationen (PLAT-1.1 bzw. PLAT-1.2) ein unterschiedliches Ergebnis (jeweils nur eine Körperhälfte zeigt ein positives Ergebnis) bei 2,9 % der einzeln getesteten Körperhälften auftrat, zeigten 15,6-24,4% der lebendgefangenen Tiere aus stark infizierten Populationen (BKS-1.1 bzw. MONZ-1.1) ein unterschiedliches Testergebnis. Den mit 25,5% größten Unterschied zeigten Tierproben, die mittels Gelbfallen aus einer stark durchseuchten Population gefangen wurden (BKS-1.1). Damit ist die in den Voruntersuchungen

Ergebnisse

ermittelte PCR-Sensibilität – Detektion des Pathogens aus einem infizierten und 24 nicht infizierten Tieren – einerseits mit Unsicherheit belastet, da ein bestimmter Anteil der als „nicht infiziert“ eingestuften Körperhälften tatsächlich infiziert sein konnte und sich damit die festgestellte Sensibilität vermindern würde. Andererseits sind aus der Literatur (BATTACHARYYA, 1979) sogar noch größere Testgruppen bekannt. Für die im Anschluss vorgenommenen Batch-Tests wurde die maximale Gruppengröße daher auf 20 Tiere begrenzt.

Tabelle 3.13: Untersuchungen zur Übereinstimmung der PCR-Ergebnisse bei der Detektion des Schwarzholz-Phytoplasma in sagittal geschnittenen Körperhälften von *H. obsoletus*

In Abhängigkeit der Fangfläche und der Fangmethode zeigte der Vergleich der Körperlängsschnitte Unterschiede in dem PCR-Ergebnis von bis zu 25,5%. Ih.: Anhand von Einzeltiertests festgestellte Infektionshäufigkeit (%) einzelner Populationen; G bzw. L: Gelb- bzw. Lebendfang; A+ = B+ bzw. A- = B-: Positives bzw. negatives PCR-Ergebnis bei beiden Körperhälften; A ≠ B: Unterschiedliches PCR-Ergebnis bei beiden Körperhälften;

Fläche	Ih. (%)	Fangmethode	N	Ergebnis			
				A bzw. B: Linke bzw. rechte Körperhälfte			Abweichung (%)
				A+ = B+	A- = B-	A ≠ B	
PLAT-1.1/2	5,9	L	136	3	129	4	2,9
BKS-1.1	81,4	L	257	173	44	40	15,6
MONZ-1.1	61,3	L	41	23	8	10	24,4
BKS-1.1	56,5	G	55	16	25	14	25,5

2. Gruppentests (Batch-Tests)

Die Gruppentests wurden anhand ganzer, ungeschnittener Tiere durchgeführt. Im Vergleich zu den Einzeltiertests ergab bei den Gruppentests die Berechnung der „Infection Rate“ eine wesentlich geringere Infektionshäufigkeit. Das Ergebnis zeigt allerdings unter Beachtung des Testansatzes, die eine gewisse Unschärfe aufgrund der Alternative einkalkuliert, dass nämlich kein Tier oder ein oder mehrere Tiere infiziert sein können, immerhin eine den Ergebnissen der Einzeltiertests entsprechende Tendenz: Die Berechnung des IR-Wertes ergibt für stark infizierte Populationen höhere Werte für die Infektionshäufigkeit als für schwach infizierte Populationen. Die Ergebnisse für die einzelnen Gruppengrößen zeigen außerdem, dass zum sinnvollen Einsatz der Batch-Tests Vorinformationen über die Größenordnung der Infektionshäufigkeit, die aufgrund der Einzeltiertests ermittelt wurden, vorliegen sollten. So führten Gruppengrößen mit mindestens 10 Tieren aus stark infizierten Feldern (BOPP-2, MONZ-1) zu nicht mehr auswertbaren Ergebnissen, da der Anteil positiv getesteter Testgruppen bei 100% lag. Als geeignet erwiesen sich hierfür Testgruppengrößen zwischen 2 bis 5 Tieren, was zu berechenbaren IR-Werten führte. Bei

Ergebnisse

gering infizierten Populationen (UNG-1) dagegen waren Gruppengrößen von 20 Tieren zur Berechnung des IR-Wertes durchaus geeignet. Im Gegensatz zum IR-Wert bestätigte die Berechnung des MFIR-Wertes für stark infizierte Populationen die von Bhattacharyya et al. (1979) aufgeführte These, dass der MFIR-Wert die tatsächliche Infektionshäufigkeit für hochinfizierte Populationen noch stärker als der IR-Wert unterschätzt, während für schwach infizierte Populationen die IR- und MFIR-Werte übereinstimmen. Trotz der Unterschätzung könnte die Berechnung des IR-Wertes zumindest zur ungefähren Einschätzung der Infektionslage und zur Entscheidung von in größerer Anzahl durchzuführender Einzeltests genutzt werden.

Tabelle 3.14: Vergleich der Ergebnisse von Einzeltier- und Gruppentests von *Hyalesthes obsoletus*

F: Fangmethode; GF: Gelbfalle; LF: Lebendfang; N: Anzahl

Die Berechnung der Infektionshäufigkeit einzelner Populationen anhand von Gruppentests unterschätzt zwar die in Einzeltiertests festgestellte Infektionshäufigkeit, aber tendenziell gibt sie einen Hinweis auf gering bzw. stark infizierte Populationen. **Ih.:** Anhand von Einzeltiertests festgestellte Infektionshäufigkeit (%) einzelner Populationen; **KW:** Kalenderwoche; **n_m:** Anzahl der Testgruppen mit der Gruppengröße m; **m:** Anzahl der Tiere pro Gruppe; **N:** Gesamtanzahl der getesteten Tiere; **n⁺:** Anzahl PCR-positiver Gruppen; **n⁺/n:** Verhältnis PCR-positiver Gruppen im Vergleich zur Gruppenanzahl; **MFIR:** Berechnungsgrundlage der Infektionshäufigkeit anhand von Batch-Tests für gering infizierte Populationen („Minimum Field Infection Rate“ ($MFIR = ((1-R/n)*100)/m$) wobei R = Anzahl negativ getesteter Gruppen); **IR:** Berechnungsgrundlage der Infektionshäufigkeit anhand von Batch-Tests („Infection rate“ ($IR = (1-(R/n)^{1/m})*100$); **SD:** Standardabweichung);

Hyalesthes obsoletus										
Fläche	Einzeltiertest		Gruppentest							
	Inf.häuf. (%)	Fangwoche (KW)	n _m	m	N	Ergebnis		MFIR	IR	SD
						n ⁺	n ⁺ /n (%)	(%)	(%)	
BOPP-6	35,8 (N=81)	24	24	2	48	7	29,2	14,6	15,8	5,5
			10	5	50	5	50	10	13	5,5
			4	10	40	4	100	10	100	
MONZ-1.1	68 (N=50)	24	25	2	50	7	28	14	15,2	5,3
			10	5	50	9	90	18	36,9	12,0
			5	10	50	5	100	10	100	
UNG-1.1	0,6 (N=179)	27, 28, 31	19	20	380	1	5,3	0,3	0,3	0,3

Die Ergebnisse der Gruppentests zeigen außerdem, dass diese Methode zur Überprüfung einer etwaigen Infektion eine günstige Alternative im Hinblick auf den finanziellen und zeitlichen Aufwand darstellt. Zur genauen Bestimmung der Infektionshäufigkeit sind dagegen Einzeltiertests unumgänglich (vgl. Abb. 3.16 und Tab. 3.14).

Ergebnisse

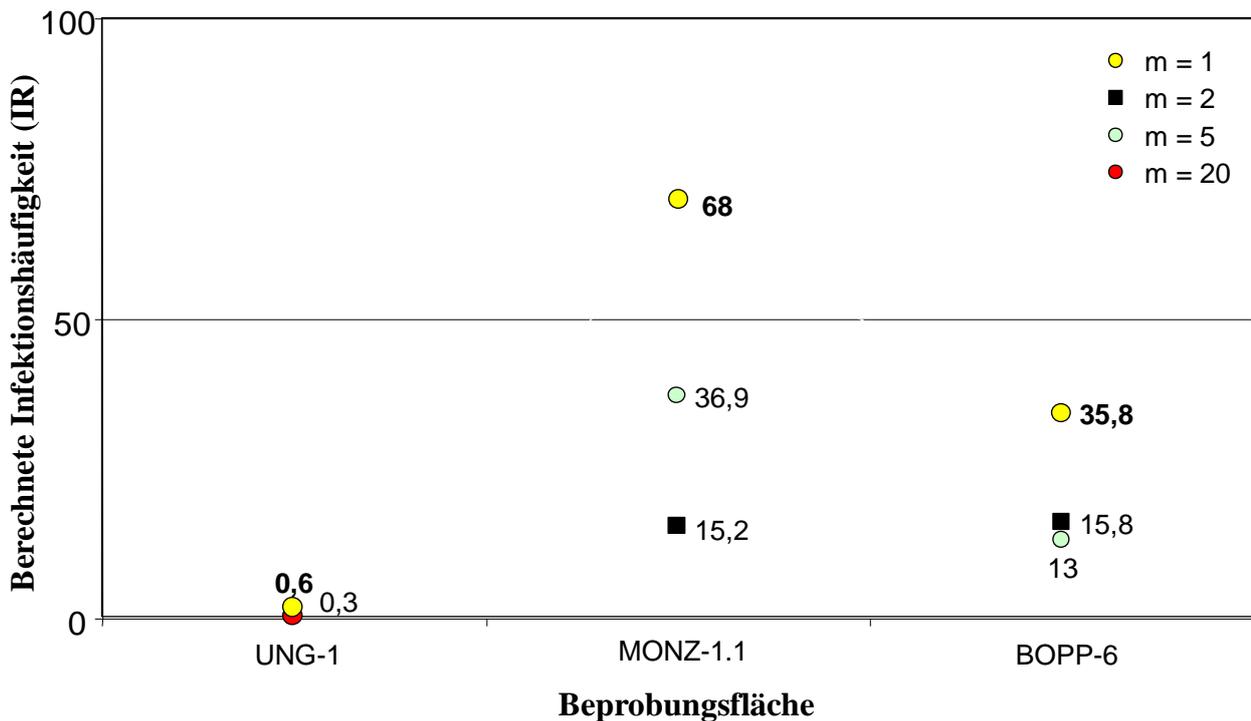


Abb. 3.16: Vergleich der durch Einzeltier- bzw. Gruppentests ermittelten Infektionshäufigkeiten bei schwach bzw. stark infizierten Populationen von *H. obsoletus*. Die berechneten IR-Werte entsprechen tendenziell der durch Einzeltiertests ermittelten Infektionshäufigkeit verschiedener Populationen. m: Gruppengröße (wobei m=1 die Einzeltiertests darstellen);

3.4.2 Detektion von Phytoplasmen in anderen Zikadenarten

Die Ergebnisse der PCR-Tests zum Nachweis des Erregers der FD-Pfalz in *O. alni* wurden bereits im Kapitel 3.3.2 dargestellt. Darüber hinaus wurden 14 weitere phloemsaugende Zikadenarten untersucht, die entweder als Beifänge auf Gelbfallen oder gezielt mit dem Streifnetz gefangen wurden (vgl. Tab. 2.7). Von besonderem Interesse waren dabei *N. fenestratus*, als Vektor für Phytoplasmen in Israel unter besonderer Beobachtung stehend und die als Vektor des *Rubus-Stunt*-Phytoplasma an Brom- und Himbeeren bekannte Macropside *M. fuscula*. Bei *N. fenestratus* ließ sich das Schwarzholz-Phytoplasma lediglich bei 4 Tieren (N=287 Tiere) erfolgreich nachweisen. In keiner der zusätzlich untersuchten Zikadenarten gelang der Nachweis des Schwarzholz-Phytoplasmas. Damit wird die herausragende Bedeutung von *H. obsoletus* für die Epidemiologie der Schwarzholzkrankheit in Deutschland unterstrichen. *M. fuscula* wurde häufig auf den in den Weinbergen exponierten Gelbfallen gefangen. Dabei konnte bei 25 von 141 getesteten Tieren (18%) das *Rubus-Stunt*-Phytoplasma nachgewiesen werden. Da nur wenige Individuen dieser Zikadenart lebend gefangen werden konnten, wurden nur wenige, nicht erfolgreiche

Ergebnisse

Übertragungsversuche durchgeführt. Daher konnte keine Aufklärung darüber gewonnen werden, ob *M. fuscula* Weinreben mit dem Rubus-Stunt-Phytoplasma infizieren kann, oder ob infizierte Weinreben im Feld deswegen nicht erkannt werden können, weil sich Rebphytoplasmosen anhand der Krankheitssymptome nicht unterscheiden lassen.

3.4.3 Charakterisierung und Differenzierung der in deutschen Weinanbaugebieten vorkommenden Phytoplasmaisolate

Zur Charakterisierung der detektierten Phytoplasmen und ihre anschließende Differenzierung innerhalb der *Stolbur*- (Schwarzholzkrankheit) bzw. der *Elm-Yellows*- (FD-Pfalz) Gruppe standen infizierte Zikaden (*H. obsoletus* bzw. *O. alni*), Weinreben und Wirts- und Nahrungspflanzen von *H. obsoletus* zur Verfügung. Das Ziel war die Aufklärung über die geographische Verbreitung der verschiedenen Isolate in den deutschen Weinanbaugebieten (vgl. Tab. 3.1.5 bzw. Abb. 3.17A-B). Das Schwarzholz-Isolat *Typ B* wurde in fast allen von der Schwarzholzkrankheit betroffenen deutschen Weinanbaugebieten gesichert nachgewiesen (vgl. Abb. 3.17A₁). Lediglich für das Weinanbaugebiet Franken konnte bis zum Abschluss des Projektes noch keine gesicherte Unterscheidung zwischen den beiden Typen A und B getroffen werden. Das Schwarzholz-Isolat *Typ A* ist schon seit längerer Zeit nur aus der Pfalz (Versuchsflächen UNG-1 und BÖCH-1) bekannt und konnte während des Untersuchungszeitraums auch nur dort nachgewiesen werden. In einem einzigen Exemplar von *H. obsoletus* aus der Pfalz konnte auch der *Typ B* nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.17A₂). Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass in diesem Weinanbaugebiet beide Isolate zusammen vorkommen.

Im Weinanbaugebiet Franken konnte die FD-Pfalz bislang nur in einer einzigen Weinrebe nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um ein Isolat, das sich von den bisher bekannten Typen unterscheidet und daher als *Typ D* bezeichnet wird. Sowohl in der Pfalz als auch an der Mosel wurden die FD-Pfalz-Typen A, B und C in Reben oder in *O. alni* detektiert (vgl. Abb. 3.17B₁ bzw. B₂). In der natürlichen Wirtspflanze von *O. alni*, der Schwarzerle, sind häufig Mischinfektionen der drei Typen festzustellen.

Die Ergebnisse bedeuten für das Befallsmonitoring in Deutschland, dass mit zwei gruppenspezifischen Primern alle rebpathogenen Phytoplasmen detektiert werden können. Solange keine Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten der beiden Phytoplasmengruppen in Bezug auf die Epidemiologie festgestellt werden, reicht dieses Verfahren für eine Überwachung des Befalls aus.

Ergebnisse

Tabelle 3.15: Verbreitung der Isolate reopathogener Phytoplasmen in den deutschen Weinanbaugebieten

a: Zum Abschluss des Forschungsprojektes war die Untersuchung noch nicht abgeschlossen;

Weinanbaugebiet	Stolburgruppe			Elm-Yellows-Gruppe				
	Schwarzholzkrankheit			FD-Pfalz				
	Nachweis	Typ A	Typ B	Nachweis	Typ A	Typ B	Typ C	Typ D
Ahr								
Baden	+		+	+				
Franken ^a	+	?						+
Hess. Bergstraße	+		+					
Mittelrhein	+		+					
Mosel Saar Ruwer	+		+	+	+	+	+	
Nahe	+		+					
Pfalz	+	+	(+)	+	+	+	+	
Rheingau	+		+					
Rheinhessen ^A	+		+	+	?			
Saale Unstrut								
Sachsen								
Württemberg								

3.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR BEFALLSSTÄRKE VON REBFLÄCHEN

Die regelmäßig durchgeführten Befallsbonituren ergaben, dass in all den in die Untersuchung einbezogenen Weinanbaugebieten die *Schwarzholzkrankheit* detektiert bzw. bestätigt werden konnte. Durch die Erfassung der Stärke der Durchseuchung kann die Bedeutung der Schwarzholzkrankheit beschrieben und die zeitliche Dynamik analysiert werden. Der zweite, in weitaus geringerem Maße vorkommende und als *FD-Pfalz* bezeichnete Erregertypus wurde in der Pfalz bestätigt und an der Mittelmosel sowie in Franken erstmalig nachgewiesen. Die Gesamtergebnisse der Befallsbonituren sind in der Tabelle 3.16 zusammenfassend aufgeführt.

Ergebnisse

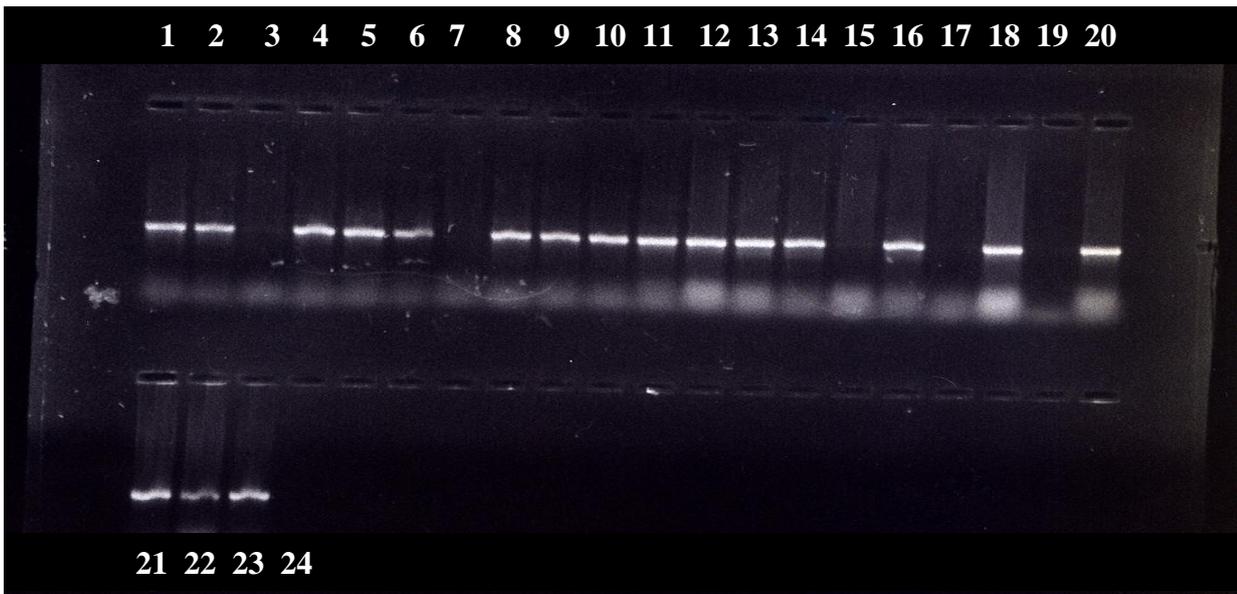


Abb. 3.17 A-1: Schwarzholzkrankheit: Amplifikation von Phytoplasma-DNA vom VK-Typ
 Amplifikation von Phytoplasma-DNA mit dem Primerpaar f/r STOL: Die beiden Stolbur-Muster VK-A und VK-B sind mit diesem Primerpaar allerdings nicht zu unterscheiden
1-23: Isoliert aus *Hyalesthes obsoletus* (Fundorte Deutschland: 1-2=BKS-1, 3-5=BKS-3; 6-8=NK-1; 9-10=BOPP-6; 11-16=UNG-1; 17-23=BKS-2; 24=Wasserprobe)

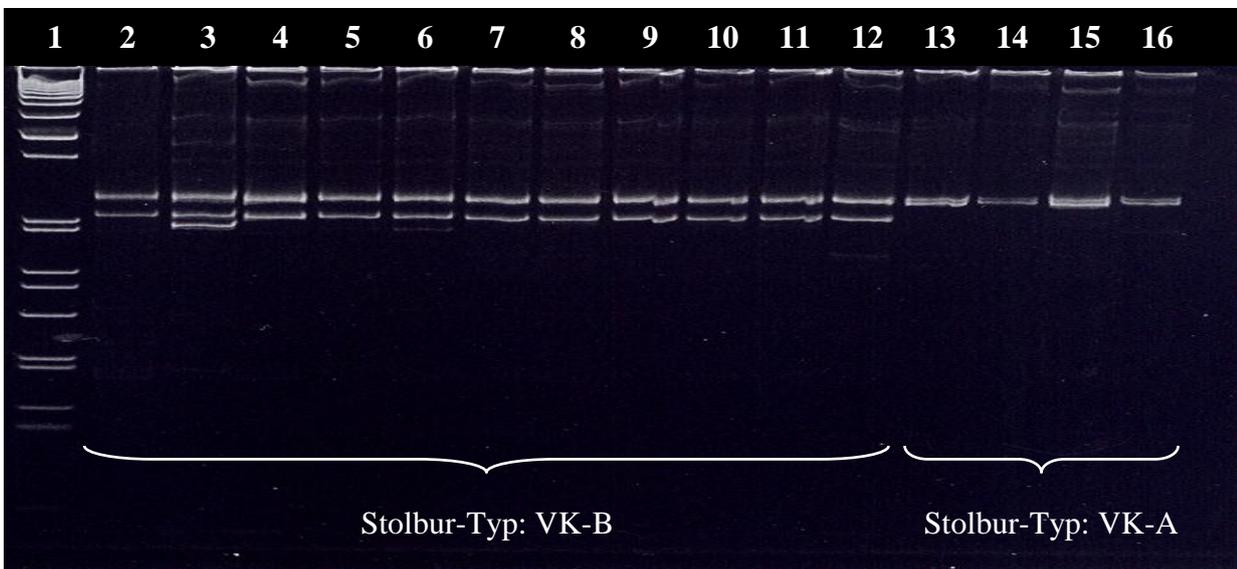


Abb. 3.17 A-2: Schwarzholzkrankheit: Muster der beiden Stolbur-Isolate VK-A und VK-B
 RFLP-Analyse von PCR-Produkten, die mit dem Primerpaar STOL 4 amplifiziert und mit *Dra* I verdaut wurden.
 S= 1kb ladder
1: Standard;
2-12: Stolbur-Typ B Phytoplasma: Isoliert aus *Hyalesthes obsoletus* (Fundorte Deutschland: 2=PLAT-1; 3=BKS-1; 4=KRÖV-1; 5=BKS-6; 7=MEH-1; 8=NEU-1; 9=BOPP-6; 10=MONZ-1); Isoliert aus *Vitis vinifera*: 11=Fundort Italien (SA 1); 12=Fundort Spanien;
13-16: Stolbur-Typ A Phytoplasma: Isoliert aus *Hyalesthes obsoletus* (Fundort Deutschland: 13=BÖCH-1; 14-16=Ungstein);

Ergebnisse

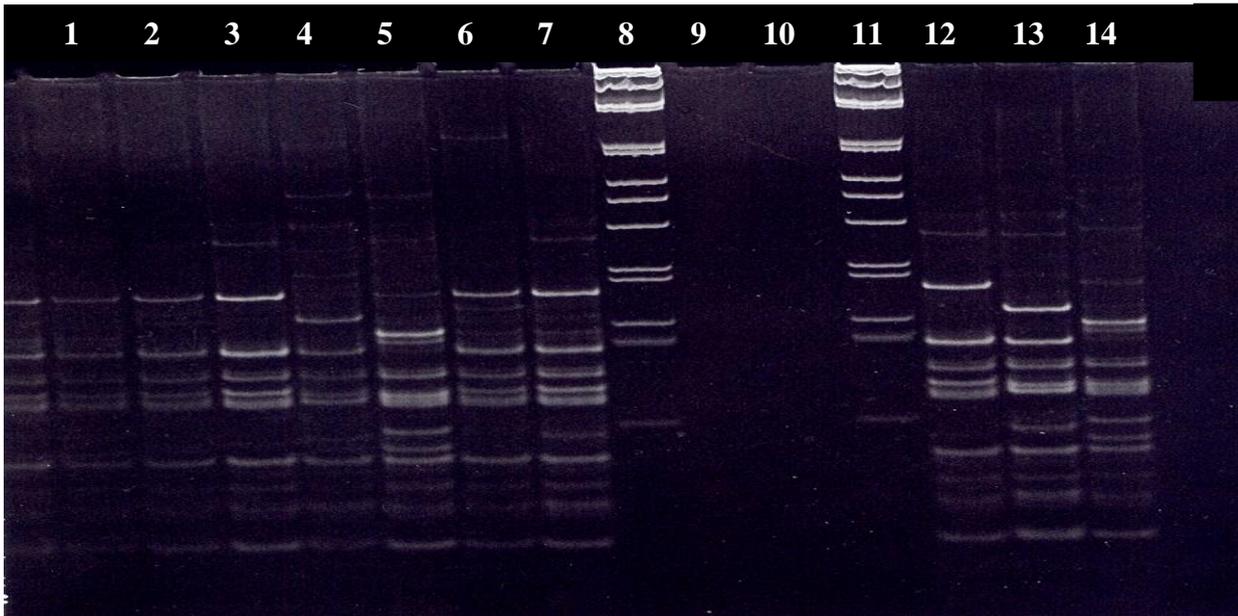


Abb. 3.17 B-1: FD-Pfalz: Muster der FD-Pfalz Isolate A, B und C

RFLP-Analyse von PCR-Produkten, die mit dem Primerpaar f/r FD 9 amplifiziert und mit Tru I verdaut wurden.
Standart= 1kb ladder

1-3: FD-A Phytoplasma: Isoliert aus *Oncopsis alni* (Fundorte Deutschland: 1-2=BÖCH-1; 3=Graach (Mosel))

4: FD-B Phytoplasma: Isoliert aus *Oncopsis alni* (Fundort Deutschland: 4=Graach (Mosel))

5: FD-C Phytoplasma: Isoliert aus *Oncopsis alni* (Fundort Deutschland: 5=BÖCH-1)

6-7: FD-A Phytoplasma: Isoliert aus *Oncopsis alni* (Larve=7) (Fundort Deutschland: 6=MAIK-1; 7=BÖCH-1)

8, 11: Standart (S) 1kb ladder; **9, 10:** Neutralprobe (Wasser)

12: FD-A Phytoplasma: Isoliert aus *Oncopsis alni* (Fundort Deutschland: BÖCH-C)

13: FD-B Phytoplasma: Isoliert aus *Oncopsis alni* (Fundort Deutschland: Graach (Mosel))

14: FD-C Phytoplasma: Isoliert aus *Oncopsis alni* (Fundort Deutschland: BÖCH-A)

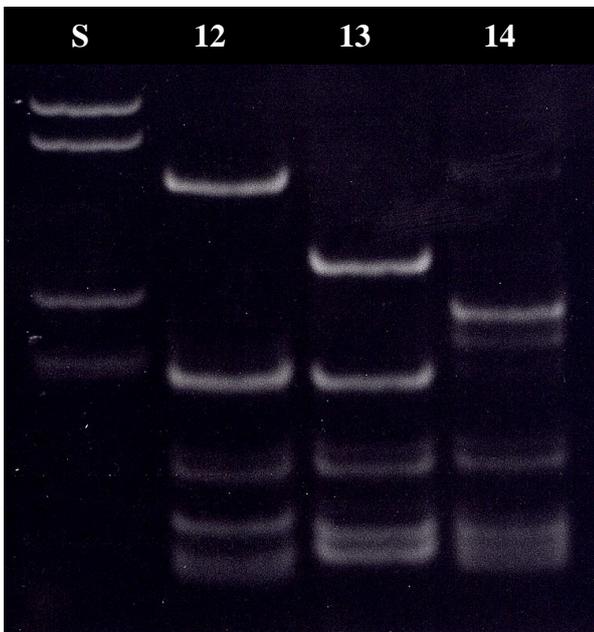


Abb. 3.17 B-2: FD-Pfalz: Muster der FD-Pfalz Isolate A, B und C

12: FD-A Phytoplasma: Isoliert aus *Oncopsis alni* (Fundort Deutschland: BÖCH-C)

13: FD-B Phytoplasma: Isoliert aus *Oncopsis alni* (Fundort Deutschland: Graach (Mosel))

14: FD-C Phytoplasma: Isoliert aus *Oncopsis alni* (Fundort Deutschland: BÖCH-A)

Ergebnisse

Tabelle 3.16: Durchseuchungsgrad der wichtigsten Untersuchungsflächen

A: Sonderfläche, die zusätzlich in die Begutachtung miteingezogen wurde; B: Kontinuierlicher Herbizideinsatz; FD: FD-Pfalz-Phytoplasma festgestellt; H. ob.: Populationsstandort in der Boniturfäche; VK Typ-A: VK-Phytoplasma Typ A;

Gemarkung	Versuchsfläche	Rebsorte	Anzahl der Rebstöcke	Befallsstärke		
				1999	2000	2001
Mosel-Saar-Ruwer						
Bernkastel	BKS-1.2a	Riesling	613	2,0	1,1	0,7
	BKS-1.2b	Riesling	233	/	1,7	3,0
	BKS-1.2c	Riesling	587	1,6	0,8	0,2
	BKS-2.1	Riesling	1384	8,2	12,1	7,4
	BKS-2.2	Riesling	683	7,8	13,5	9,4
	BKS ^A	Riesling	307	/	11,7	6,4
	BKS-3.1	Riesling	2815	/	1,3	0,2
	BKS-4.1	Riesling	885	13,6	15,8	14,7
	BKS-5	Riesling	993			2,5
	BKS-6.1-6.2	Riesling: Rebstöcke in einem zu schlechten Zustand und wurden 2001 entfernt				
Zeltingen	ZEL-1a	Riesling	136	/	7,2	8,8
	ZEL-1b, e, h	Riesling	352	/	20,2	13,6
	ZEL-1c	Riesling	98	/	7,9	14,3
	ZEL-1d, g	Riesling	210	/	16,7	17,6
	ZEL-1e, i	Riesling	210	/	14,7	16,2
Kröv	KRÖ-1 ^o	Riesling	571	4,3	4,4	5,4
	KRÖ-1b ^B	Riesling	280	/	4,3	8,2
Mehring	MEH-1.1	Riesling	640	/	/	1,4
	MEH-2.1a	Riesling	410	/	/	2,2
	MEH-2.1b	Riesling	330	/	/	2,1
Enkirch	STEF ^A	Riesling	708	/	/	11,6
Senheim	GOE-1 ^A	Riesling	672	38,1	34,8	47,5
	GOE-2 ^A	Riesling	189	/	4,8	10,5
Müden	MÜD-1	Riesling	416	/	/	34,9
Mittelrhein						
Boppard	BOPP-1.1	Riesling	616	38,2	37,8	43,0
	BOPP-1.1.2	Spätburgunder	824	7,2	4,2	5,7
	BOPP-2	Riesling	584	53,4	61,3	67,1
	BOPP-3	Riesling	437	35,3	38,7	42,6
	BOPP-4	Riesling	944	64,0	53,1	60,3
	BOPP-5	Riesling	589	36,9	30,4	38,5
	BOPP-6	Riesling ^{H. ob.}	1161	/	/	41,4
Nahe						
Monzingen	MONZ.1.1	Riesling	1222	/	/	7,6
	MONZ-1.2	Riesling	280	/	/	35,4
	MONZ-1.3	Riesling	932	/	/	28,8
	MONZ-1.4	Riesling	200	/	/	9,0
					1999	2000
	MONZ-1.5	Riesling	304	/	/	21,4
Norheim	NK-1	Riesling	1282	/	/	3,8
Pfalz						
Böchingen	BÖCH-1.1	Scheurebe ^{FD}	1708	0,5	0,6	0,4
	BÖCH-1.2	Scheurebe ^{FD}	1919	0,1	0,1	0,1
	BÖCH-1.3	Dornfelder	1636	0,0	0,0	0,1
	BÖCH-1.4	Dornfelder	925	0,0	0,0	0,0
Maikammer	MAI-1	Scheurebe ^{FD}	1912	0,3	0,4	0,6
Ungstein	UNG-1	Riesling ^{VK Typ-A}	517	3,1	1,4	3,1
	UNG ^A	Riesling	2275	/	/	0,4
Baden						
Neuweier	NEU-1.1	Riesling	680	/	/	7,9
	NEU-1.2	Riesling	756	/	/	2,1

Ergebnisse

Fortsetzung Tab. 3.16

Gemarkung	Versuchsfläche	Rebsorte	Anzahl der Rebstöcke	Befallsstärke		
				1999	2000	2001
Hessische Bergstraße						
Heppenheim	HEPP-1.1	Riesling	279	2,2	4,4	8,6
	HEPP-1.2	Traminer	359	<0,5	<,05	<0,5
	HEPP-1.3	Dornfelder	236	/	<0,5	<0,5
Franken						
Thüngersheim	THÜNG-1	Scheurebe	Schwarzholzkrankheit festgestellt (ca. 15 %)			
Randersacker	RAND-1	Rivaner	Schwarzholzkrankheit festgestellt (<0,5)			
Iphofen	IPHOF-1	Scheurebe ^{FD}	Schwarzholzkrankheit festgestellt (<0,5)			

3.5.1 Zur Verbreitung der Schwarzholzkrankheit in den deutschen Weinanbaugebieten

Die am stärksten von der Schwarzholzkrankheit betroffenen Gebiete befinden sich in den Steillagen des Mittelrheins, wo mit teilweise über 60% die stärksten Durchseuchungsgrade überhaupt festgestellt werden konnten und an der Mittelmosel. Die Befunde bestätigen damit die bisherigen Beobachtungen. An der Nahe konnten im Untersuchungszeitraum erstmalig starke Durchseuchungsgrade festgestellt werden (vgl. Tab. 3.16). In der Pfalz gelang es, den Phytoplasmatypus A zu detektieren. In den anderen untersuchten Weinanbaugebieten ist dagegen die Verbreitung der Schwarzholzkrankheit bisher als gering anzusehen.

3.5.2 Analyse der zeitlichen Dynamik der Schwarzholzkrankheit

Am Mittelrhein wurde die Schwarzholzkrankheit auf langjährigen Untersuchungsflächen schon seit 1991 bonitiert. Die Untersuchung dieser Flächen wurde weitergeführt, so dass es möglich war, Daten anhand einer langjährigen Beobachtung zu gewinnen. Es zeigte sich, dass die Befallsstärke kontinuierlich zunahm und im Jahr 1997 einen Höhepunkt erreichte (vgl. Abb. 3.18).

Bis zum Jahr 2000 nahm die Befallsstärke wieder ab. Danach wurde wiederum ein Anstieg aufgezeichnet. Der Populationsstandort konnte auf der sehr nahen Untersuchungsfläche BOPP-6 ausgemacht werden. Die Vektoren dieser zahlenstarken Population waren zudem noch stark infiziert. Obwohl die Untersuchungen zur aktiven Migrationsaktivität von *H. obsoletus* kein eindeutiges Ergebnis lieferten, zeigen diese Untersuchungen, dass die Befallsstärken der angrenzenden Rebflächen den sehr hohen Infektionsdruck dieser Population widerspiegeln. Die Gelbfallenfänge bestätigen, dass der Vektor tatsächlich in diese Rebflächen eindringt, wobei trotz intensiver Suche kein anderer Populationenstandort gefunden werden konnte.

Ergebnisse

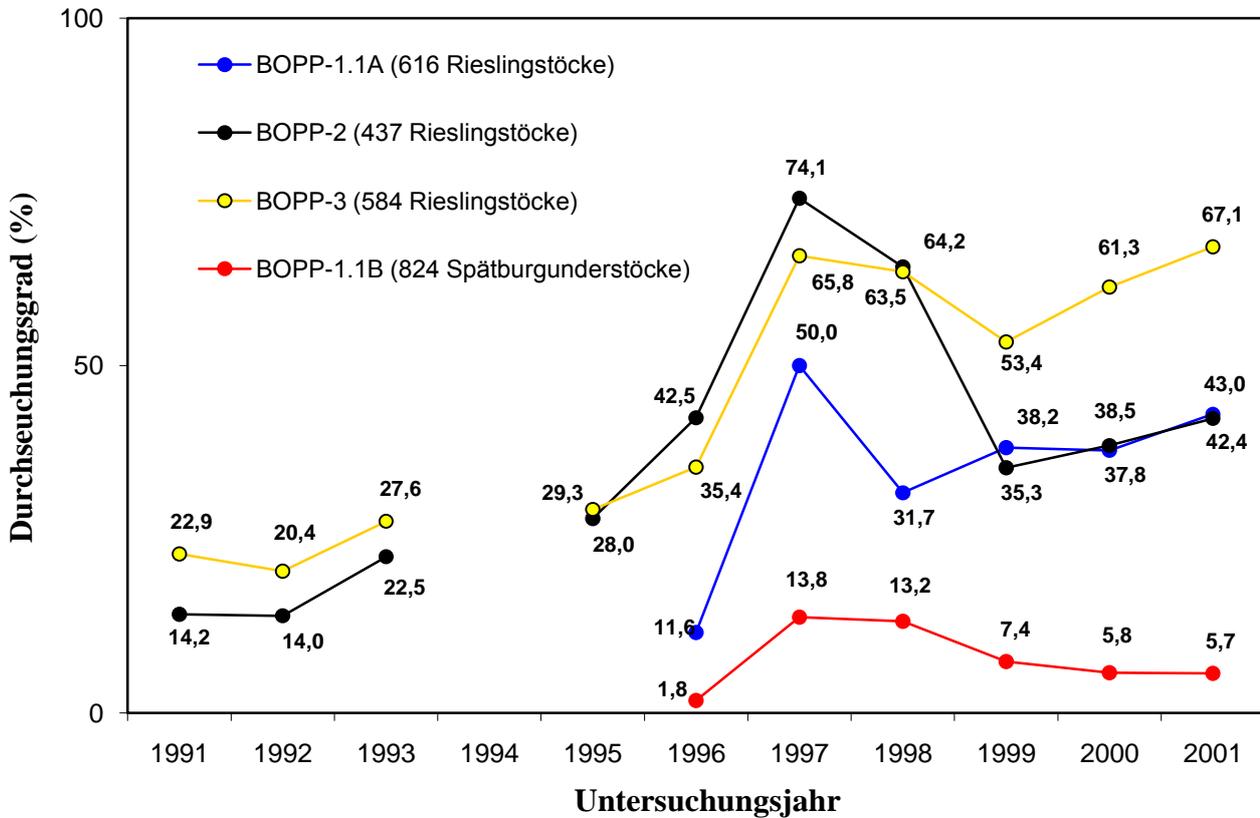


Abb. 3.18: Verlauf der Befallsstärke verschiedener Untersuchungsflächen am Mittelrhein.

Eine weitere bemerkenswerte Beobachtung war der stark unterschiedliche Befallsgrad zwischen der Riesling- und der Spätburgunderrebe. Obwohl alle Untersuchungsflächen einen gleichen korrespondierenden Infektionsverlauf zeigten, konnte bei den Spätburgunder-Reben im Gegensatz zu den Rieslingreben ein wesentlich geringerer Durchseuchungsgrad festgestellt werden. Ein Grund für diese Unterschiede könnte in einer unterschiedlichen Persistenz der Symptome beider Rebsorten liegen.

Im Gegensatz zur Rieslingrebe zeigen die Spätburgunderreben auch wesentlich kürzere Zeiten, in denen eine kontinuierliche Symptomausprägung detektiert werden konnte (vgl. Abb. 3.19). Im dritten Jahr zeigten nur noch 5 Prozent der Spätburgunderreben eine Symptomausprägung, während die Rieslingstöcke eine Infektionshäufigkeit zwischen 24 und 36 Prozent aufwiesen.

3.5.3 Zum Infektionsdruck durch *H. obsoletus*

Vor allem die Untersuchungsflächen am Mittelrhein und an der Nahe (MONZ-1) weisen hohe Befallswerte auf (vgl. Abb. 3.21). Dagegen konnten aber auch Untersuchungsflächen (BKS-1;

Ergebnisse

MEH-1) mit einem nur geringen Durchseuchungsgrad der Rebflächen festgestellt werden, obwohl sich in deren Nachbarschaft hochinfizierte Populationen befanden (vgl. Abb. 3.23a und Tab. 3.17). Ein unterschiedlich ausgerichteter Infektionsdruck konnte auf der Untersuchungsfläche NEU-1A beobachtet werden (vgl. Abb. 3.22b). Im Gegensatz zur Nachbarfläche NEU-1B zeigte sie einen wesentlich stärkeren Durchseuchungsgrad.

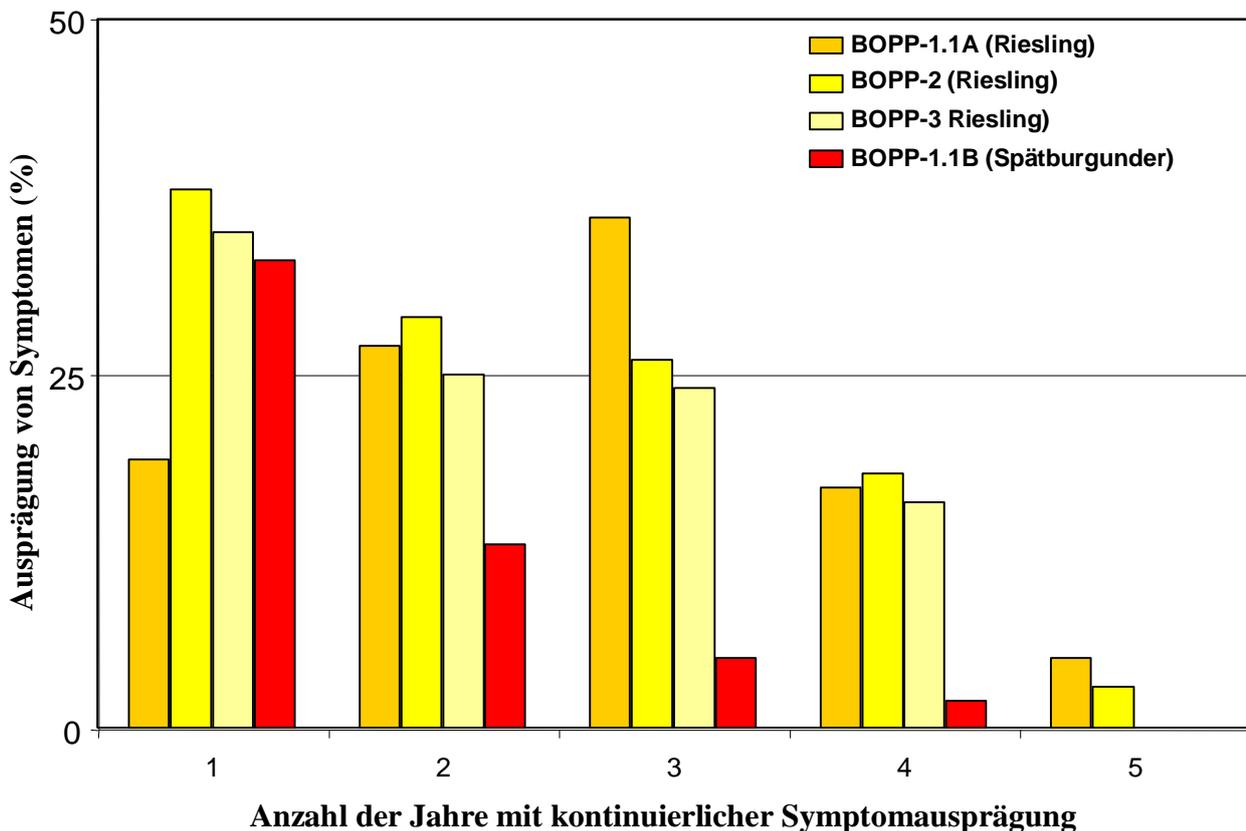


Abb. 3.19: Anzahl der Jahre mit kontinuierlicher Symptomausprägung

Im Gegensatz zum Riesling (orange, gelb und hellgelb) zeigt der Spätburgunder (rot) eine wesentlich geringere Kontinuität in der Symptomausprägung

3.5.4 Räumliche Verteilungsmuster symptomatischer Rebstöcke

Der Vergleich der räumlichen Verteilungsmuster ergab kein einheitliches Bild. Aggregationen kranker Reben variierten zwischen den einzelnen Flächen und in ihrer Größe, die zudem keinen deutlichen Befallsgradienten zeigten. Ein Befallsgradient wäre theoretisch dann zu erwarten gewesen, wenn der Befall mit zunehmender Entfernung vom Infektionsstandort abnehmen würde. Auf Rebflächen mit einem hohen Durchseuchungsgrad der Rebstöcke wurde ein solcher Befallsgradient nicht festgestellt (vgl. Abb. 3.21 und 3.22). Lediglich auf der Untersuchungsfläche UNG-1 konnte eine anfängliche Aggregation von sieben symptomtragenden Pflanzen festge-

Ergebnisse

stellt werden (vgl. Abb. 3.20). Im ersten Untersuchungsjahr war der Populationsstandort nicht bekannt, die symptomatischen Reben traten dort nur in einem Radius von ca. 5-6m auf. Im zweiten Untersuchungsjahr konnte dann der Populationsstandort in einer Entfernung von ca. 1-7m zu diesen erkrankten Pflanzen festgestellt werden. Im letzten Untersuchungsjahr begann sich diese anfängliche Aggregation hin zur einer flächigen Ausbreitung zu erweitern. In einem Abstand von etwa 12-14m konnten zu diesem Zeitpunkt schon 16 symptomtragende Rebstöcke detektiert werden.

Tabelle 3.17: Auswirkung des Infektionsdrucks von Populationen der Cixiide *H. obsoletus* auf angrenzende Rebflächen

Die ausgewählten Untersuchungsflächen in den Gemarkungen Bernkastel, Kröv und Monzingen zeigten trotz hoher Infektionshäufigkeiten in den Zikadenpopulationen oftmals einen vergleichsweise niedrigen Durchseuchungsgrad, während sich in der Gemarkung Boppard die hohe Infektionshäufigkeit innerhalb der Zikadenpopulation auch im Durchseuchungsgrad der Ertragsrebflächen widerspiegelt.

a: Die Werte benachbarter Rebflächen wurden so zusammengefasst, dass der nur jeweils niedrigste bzw. höchste Prozentwert aufgelistet wurde; b: Die Anzahl gefangener bzw. getesteter Tiere war zu gering zur Angabe einer prozentualen Infektionshäufigkeit; c: Der Durchseuchungsgrad wurde nur im Rahmen einer abschließenden Untersuchung im Jahr 2001 festgestellt; d bzw. e: Durchseuchungsgrade von Riesling- bzw. Spätburgunderreben;

Gemarkung	Infektionshäufigkeit der Population von <i>H. obsoletus</i> (%)			Durchseuchungsgrad benachbarter Rebflächen ^a (%)		
	1999	2000	2001	1999	2000	2001
Bernkastel	Untersuchungsfläche BKS-1.1A (Brache)			Untersuchungsflächen BKS-1.2A; B; C		
	81,4	55,2	52,1	1,6 / 2,0	0,8 / 1,7	0,2 / 3,0
Bernkastel	Untersuchungsfläche BKS-6.1			Untersuchungsflächen BKS-6.1; BKS-6.2		
	73,5	59,9	56,7	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Kröv	Untersuchungsfläche KRÖV-1A			Untersuchungsflächen KRÖV-1A; B; C		
	41,7	55,8	- ^b	4,3	4,3 / 4,4	5,4 / 8,2
Monzingen	Untersuchungsflächen MONZ-1.1; MONZ-1.2A			Untersuchungsflächen MONZ-1.2A; B; C; D		
	61,3	75,2	48,2	-	-	7,0 / 35,4^c
Boppard	Untersuchungsfläche BOPP-6			Untersuchungsflächen BOPP-1.1; BOPP-1.2; BOPP-2; BOPP-3		
	37,8	45,0	32,4	36,9 / 64,0^d 7,2^e	30,4 / 61,3^d 4,2^e	28,3 / 67,1^d 5,7^e
Neuweier	Untersuchungsfläche NEU-1			Untersuchungsflächen NEU-1A; NEU-1B		
	27,5	20	7,9			7,9 / 2,1

Ergebnisse

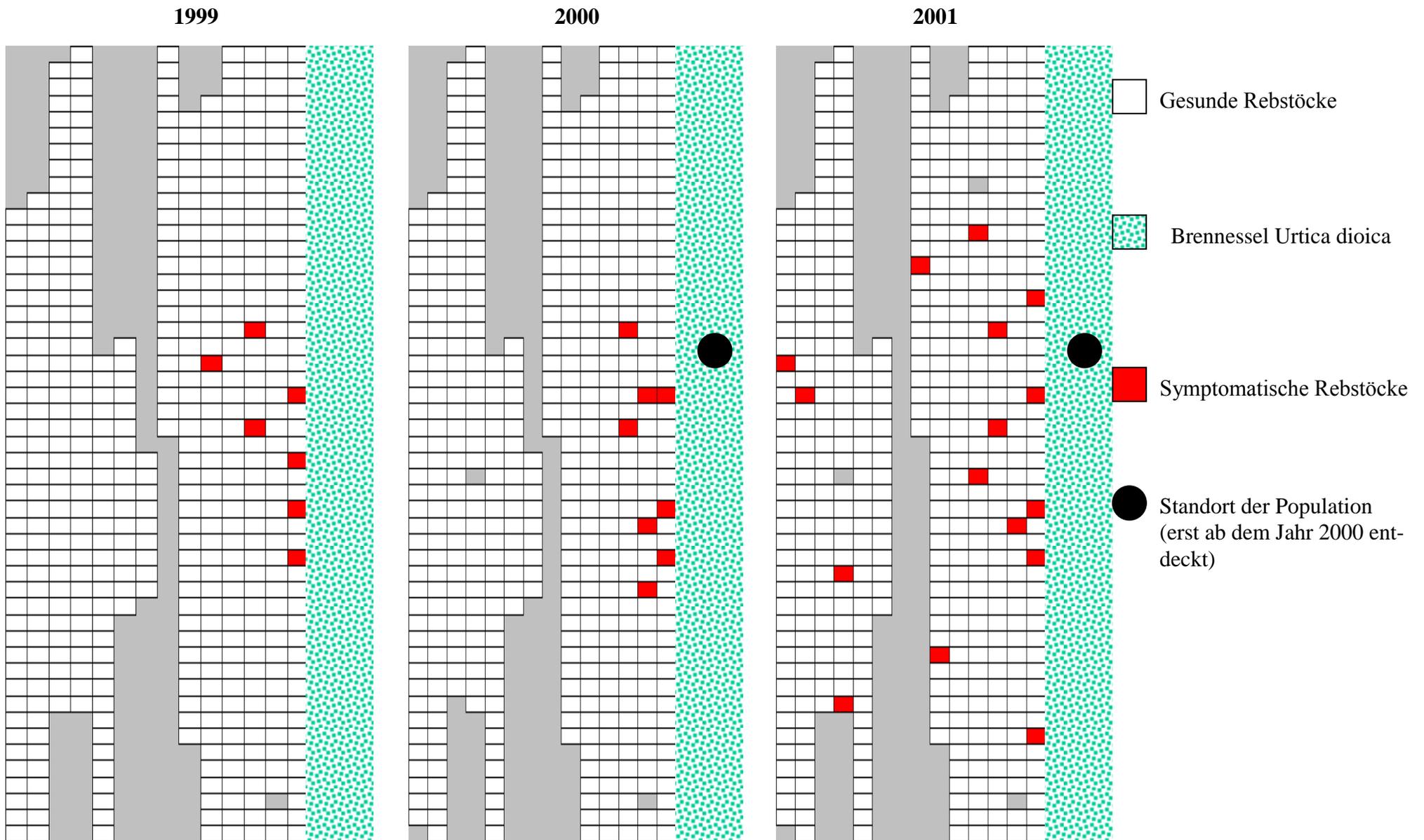


Abb. 3.20: Entwicklung der Schwarzholzkrankheit 1999 – 2001 auf der Ertragsreblfläche UNG-1 (Darstellung nicht maßstabsgetreu abgebildet)

In den ersten beiden Untersuchungsjahren zeigte sich ein Befallsgradient direkt in Angrenzung am Populationsstandort von *H. obsoltus*. Dieser Gradient erweiterte sich im dritten Untersuchungsjahr zu einer zunehmend einer flächig verteilten Symptomausprägung, bei der auch zunehmend entfernte Pflanzen infiziert wurden.

Ergebnisse

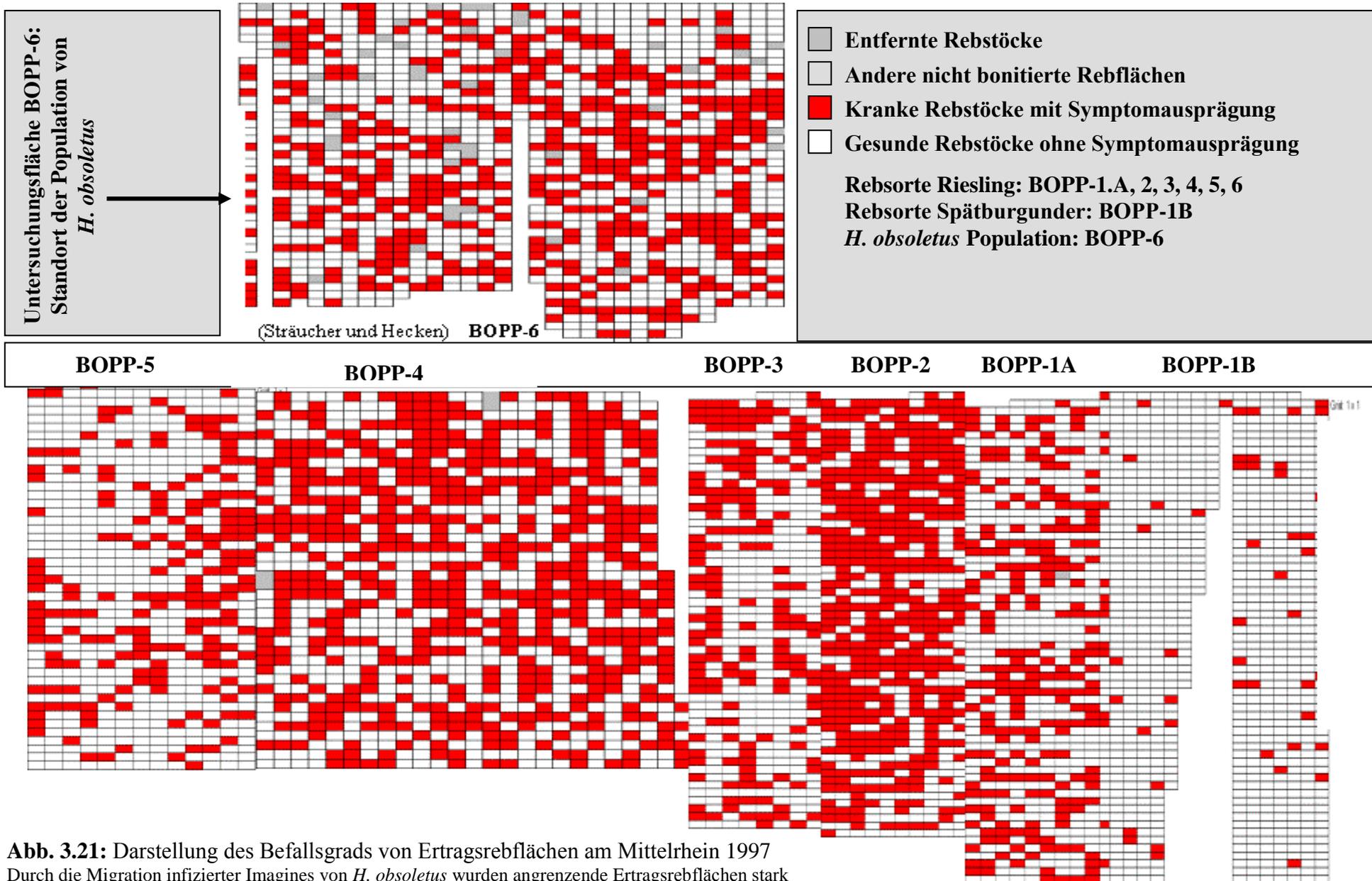


Abb. 3.21: Darstellung des Befallsgrads von Ertragsreblächen am Mittelrhein 1997
Durch die Migration infizierter Imagines von *H. obsoletus* wurden angrenzende Ertragsreblächen stark durchsucht. Vor allem die Ertragsreblächen, auf denen der Riesling wächst, zeigen extrem hohe Durchsuchungswerte. Im Gegensatz zum Riesling zeigte der Spätburgunder eine wesentlich geringere Sensibilität gegenüber dem Phytoplasma.

Ergebnisse

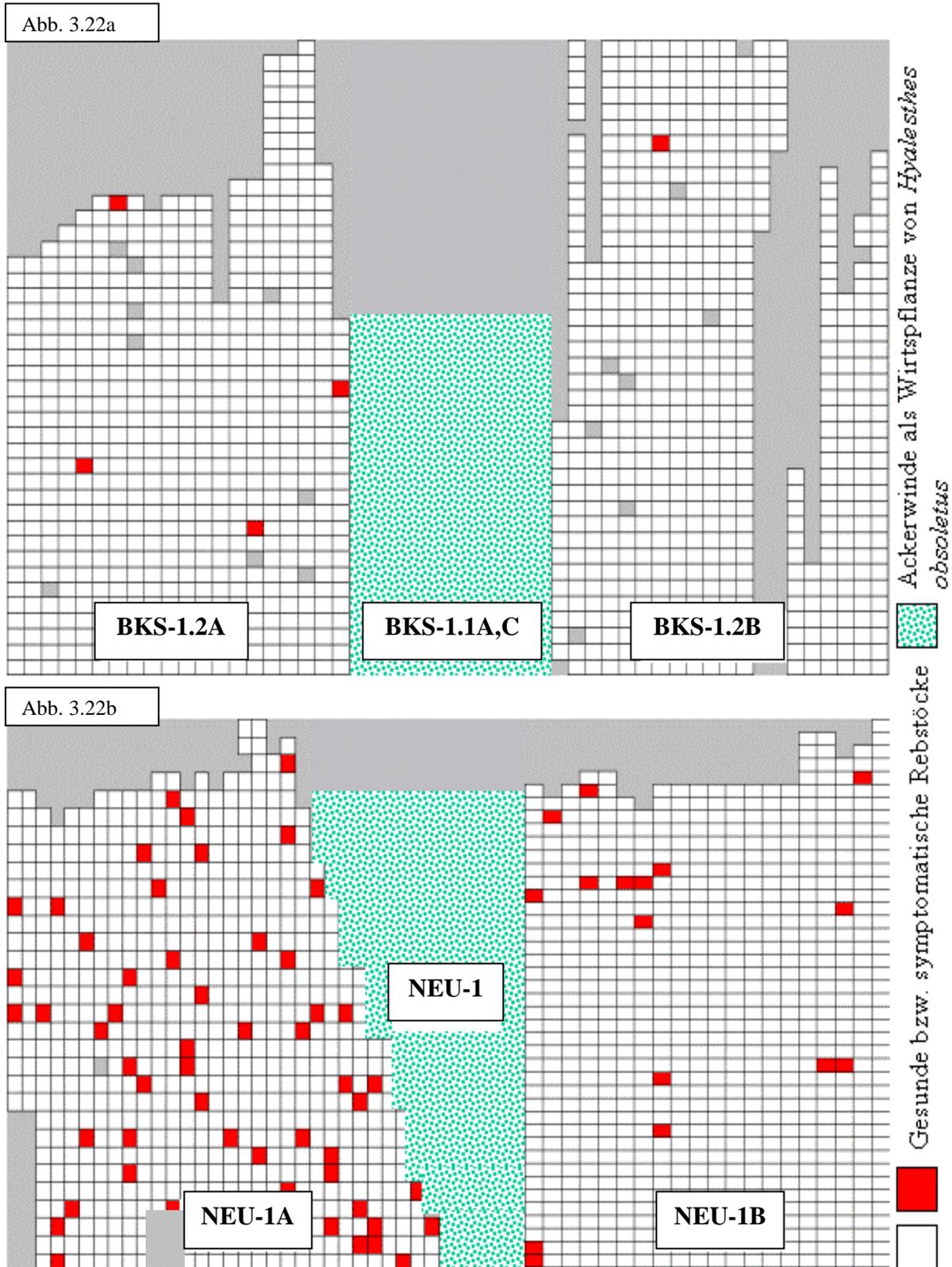
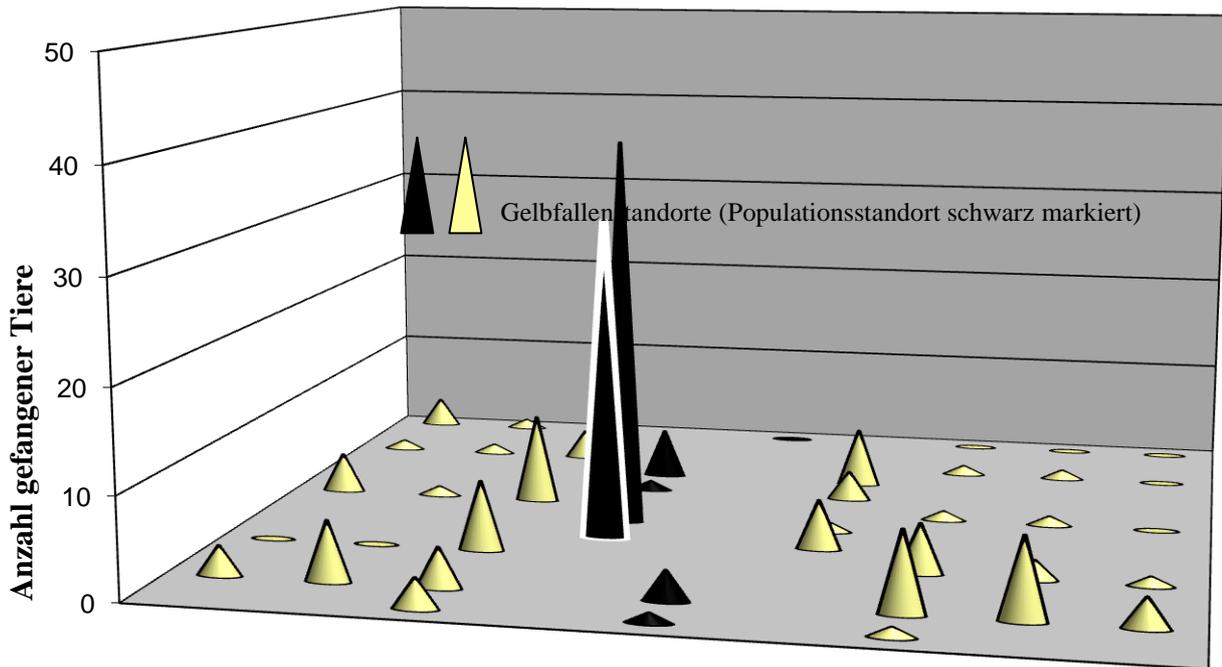


Abb. 3.22: Unterschiedliche Ausprägung des Infektionsdrucks von *Hyalesthes obsoletus*
Auf den Untersuchungsflächen BKS-1.2A/B konnte trotz einer hohen Populationsdichte und einer hohen Infektionshäufigkeit weder eine starke Durchseuchung noch ein Befallsgradient festgestellt werden. Dagegen zeigte eine kleinere Population von *H. obsoletus* mit einer gleichzeitig wesentlich geringeren Infektionshäufigkeit einen wesentlich stärkeren und dabei gerichteten Infektionsdruck auf benachbarte Rebflächen.

Ergebnisse



Versuchsanlage BKS-1.1

Abb. 3.23: Migrationsaktivität von *Hyalesthes obsoletus* im Jahr 2000 auf der Versuchsanlage BKS-1.1 (Gemarkung Bernkastel)

In den angrenzenden Ertragsreblflächen erbrachten die Fangzahlen der Gelbfallen den Nachweis einer kontinuierlichen Migrationsaktivität der Imagines von *H. obsoletus*. Trotz der Gegenwart infizierter Vektoren zeigte sich nur ein sehr geringer Durchsechungsgrad.

3.6 BEDEUTUNG DER WIRTS-PFLANZEN VON *H. OBSOLETUS* UND METHODEN ZUR BEKÄMPFUNG IHRER VERBREITUNG

3.6.1 Erfassung des pflanzlichen Artenspektrums der Weinbergflora und ihre Bedeutung für *Hyalesthes obsoletus*

H. obsoletus nutzt offensichtlich ein deutlich höheres Artenspektrum an Nahrungs- als an Wirtspflanzen. Als Hauptwirtspflanzen, an denen regelmäßig Eigelege zu finden sind, nutzt der Vektor *Convolvulus arvensis* (Ackerwinde), *Ranunculus repens* (Kriechender Hahnenfuß) und *Urtica dioica* (Große Brennnessel). Auch die Gemeine Zaunwinde (*Calystegia sepium*) kann als Wirtspflanze von *H. obsoletus* genutzt werden. Im Untersuchungszeitraum konnten vor allem an *R. repens*, *C. arvensis* und *U. dioica* mittels Streifnetz große Fangzahlen erreicht werden (vgl. Tab. 3.3 und 3.4). Im Vergleich dazu wurden bei den in vorangegangenen Jahren als Wirtspflan-

Ergebnisse

zen identifizierten Pflanzenarten *Cirsium arvense* (Acker-Kratzdistel), *Senecio erucifolius* (Raukenblättriges Geiskraut) und *Taraxacum spec* (Löwenzahn) insgesamt nur wenige Individuen gefangen, so dass diese Arten eher als Alternativ-Wirte angesehen werden können (vgl. Tab. 3.18). Darüber hinaus aber zeigten Gewächshausversuche (vgl. Kap. 3.2.2 und 3.3.1), dass sowohl *Cirsium arvense*, *Taraxacum spec.*, als auch *Hieracium pilosella* (Kleines Habichtskraut) und *Solanum nigrum* (Schwarzer Nachtschatten) als Nahrungspflanzen für die Imagines nutzbar sind. Auf den beiden letztgenannten Pflanzenarten wurden ebenfalls, wenngleich auch in sehr geringer Anzahl, Imagines gefangen. Auf der im ersten Versuchsjahr angelegten Ertragsrebfläche BKS-3.1 konnte neben der Ackerwinde eine große Verbreitung des Schwarzen Nachtschattens festgestellt werden. Ein großer Anteil dieser Pflanzen zeigte anhand typischer Dunkelverfärbungen Symptome einer Phytoplasmostose, die durch anschließende PCR-Tests dem Stolbur-Typ, zu denen auch die Schwarzholzkrankheit zählt, zugeordnet werden konnte. Als eine weitere, gelegentlich genutzte Nahrungspflanzenart kann *Amaranthus retroflexus* (ZurückgeboGENER Fuchsschwanz) angesehen werden. An der Nahe (MONZ-1) wurde im zweiten Untersuchungsjahr auf *A. retroflexus* eine große Anzahl Imagines gefangen. Auf *Calystegia sepium* hingegen wurden zwar im gesamten Untersuchungszeitraum einzelne Individuen gefangen, doch ist die Fangzahl insgesamt bisher außerordentlich gering gewesen. Interessant ist hierbei allerdings die Beobachtung, dass die einzige größere Fangzahl im Untersuchungszeitraum (etwa 15 Tiere) auf der Versuchsfläche NEU-1 in direkter Nachbarschaft zur Ackerwinde erreicht wurde. Die Weinrebe kann dagegen als tatsächlicher Zufallwirt bezeichnet werden. Gelegentliche Fänge mittels Streifnetz bzw. Motorsauger konnten trotz regelmäßiger und intensiver Überprüfung nur dann erfolgreich sein, wenn beispielsweise durch Herbizideinsatz des Winzers während der Flugzeit die natürlichen Wirts- und Nahrungspflanzen im betroffenen Weinfeld vernichtet wurden und ein Ausweichen der Vektoren auf die Weinreben somit als direkte Folge der Spritzung zu interpretieren war. Auf vielen der in die Untersuchung miteinbezogenen Versuchs- und Beobachtungsflächen, die zuvor durch eine großangelegte, flächendeckende und mehrmalige Herbizidanwendung ihrer Pflanzengesellschaft beraubt wurden, gehören die Wirts- und Nahrungspflanzen zu den Erstbesiedlern und konnten sich aufgrund mangelnder Konkurrenz stark ausbreiten. Dieser Umstand konnte sehr gut auf der Einrichtung der Neuanlage BKS-3.1 beobachtet werden, auf der sich im ersten Untersuchungsjahr vor allem *C. arvensis* und *S. nigrum* stark ausbreiten konnten.

Im folgenden sind in der Tabelle 3.18 die wichtigsten in den Weinanbaugebieten vorkommenden Pflanzenarten sowie ihre Bedeutung für *H. obsoletus* aufgeführt. Von allen festgestellten Wirtspflanzen, die *H. obsoletus* zur Entwicklung nutzt, ist die Ackerwinde aufgrund der hohen Fang-

Ergebnisse

zahlen, die an dieser Pflanze erzielt wurden und der Feststellung, dass Populationen, die diese Pflanze als Wirts- und Nahrungspflanze verwenden, oftmals eine sehr hohe Infektionshäufigkeit zeigten, der herausragende Ansatzpunkt, die Schwarzholzerkrankung der Weinrebe zu bekämpfen.

3.6.2 Die Verbreitung der Ackerwinde *Convolvulus arvensis* als Wirts- und Nahrungspflanze für *Hyalesthes obsoletus* und Methoden zur Begrenzung ihrer Verbreitung

Die im Forschungsvorhaben untersuchten Bekämpfungsmaßnahmen der Ackerwinde zielten darauf ab, den Verbreitungsgrad dieser wichtigsten Wirtspflanze in den Untersuchungsflächen reduzieren und gleichzeitig die Auswirkungen auf die Populationsgröße hin untersuchen zu können. Die Verbreitung der Pflanzen wurde auf den Untersuchungsflächen als Bedeckungsgrad erfasst.

Erfassung des Bedeckungsgrades der Ackerwinde *C. arvensis*

Der Bedeckungsgrad der Ackerwinde wurde auf den in Tabelle 3.19 aufgeführten und in sechs verschiedene Klassen eingeteilten Versuchsflächen im Anschluss an die Flugphase von *H. obsoletus* erfasst. Die Ergebnisse zeigen, dass vor allem die Untersuchungsflächen der Klassen 1 und 5 (offene Brachflächen, die jahrelang in einem niedrig bewachsenen Zustand verharren und unregelmäßig vom Winzer mit Herbizid behandelte Ertragsreblflächen) von der Ackerwinde stark besiedelt werden können, während der Windenanteil auf Flächen der Klassen 2 und 3, die schnell durch eine natürliche Sukzession bzw. durch gezielte Begrünung eine geschlossene Pflanzendecke bilden konnten, deutlich geringer war. Einen ebenfalls geringen Bedeckungsgrad zeigten auch Flächen der Klasse 4, auf denen ein regelmäßiger Herbizideinsatz erfolgte. Obwohl dort zwar mit der Verringerung des Vorkommens der Ackerwinde gleichzeitig eine Abnahme der Populationsstärken registriert wurde (vgl. Tab. 3.19), konnten allerdings regelmäßig an einzelnen, weit über die Parzellen verstreuten Standorten der Ackerwinde, die trotz des Herbizideinsatzes weiter existierten, Vektoren gefangen werden (NOR-1). Die Fläche BKS-3.1 (Klasse 6) kann als Idealbeispiel dafür angesehen werden, wie sich die Ackerwinde in einer von Konkurrenzpflanzen befreiten Fläche ansiedeln kann. Innerhalb eines Jahres nach Errichtung einer neuen Junganlage war der Anteil der Ackerwinde auf 29,1% angestiegen. Obwohl im drauffolgenden Jahr vom Bewirtschafter eine flächendeckende Herbizidspritzung durchgeführt wurde, erreichte der Bedeckungsgrad immerhin noch 12,4%.

Ergebnisse

Tabelle 3.18: Zusammenfassung der am häufigsten auftretenden Pflanzenarten und ihre Bedeutung für *Hyalesthes obsoletus*

X: zutreffendes Merkmal bzw. Vorkommen festgestellt; X¹: Instituteigene Untersuchungen und Beobachtungen vor Beginn des Forschungsprojektes; X²: In Nachfolgeuntersuchungen ergab sich, dass diese Pflanzenart auch eine Wirtspflanze des Vektors darstellt (MAIXNER, M. & LANGER, M. (2008); (X): als Zufallswirt erkannte Gattung ohne weitergehende Artbestimmung;

Pflanzen			Phytoplasma	<i>Hyalesthes obsoletus</i>			Untersuchungsstandorte															
Art	Familie	Deutscher Pflanzenname	Wirtspflanze	Wirtspflanze	Nahrungspflanze	Zufallswirt	BKS-1	BKS-2	BKS-3	BKS-6	BOPP-2	KF-1	KK-1	KRÖV-1	MAR-1	MEHR-1	MONZ-1	NOR-1	PLAT-1	Sonstige Flächen		
<i>Achillea millefolium</i>	Asteraceae	Scharfgarbe							X												X	
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Amaranthaceae	Zurückgeb. Fuchsschwanz			X			X	X				X				X				X	
<i>Anagallis arvensis</i>	Primulaceae	Roter Gauchheil												X			X				X	
<i>Artemisia absinthum</i>	Asrereaceae	Wermut												X							X	
<i>Artemisia vulgaris</i>	Asteraceae	Gemeiner Beifuß		X ¹												X					X	
<i>Atriplex pátula</i>	Chenopodiaceae	Langblättrige Melde					X	X	X			X				X					X	
<i>Calystegia sepium</i>	Convolvulaceae	Zaunwinde	X ²		X				X						X						X	
<i>Cardaria draba</i>	Brassicaceae	Pfeilkresse	X ¹		X ¹																X	
<i>Carduus nutans</i>	Asteraceae	Nickende Distel																	X			
<i>Centaurea cyanus L.</i>	Asteraceae	Kornblume													X		X				X	
<i>Chenopodium album</i>	Chenopodiaceae	Weißer Gänsfuß							X						X						X	
<i>Chrysanthemum vulgare</i>	Asteraceae	Rainfarn			X ¹																X	
<i>Cirsium arvense</i>	Asteraceae	Acker-Kratzdistel	X ¹						X										X		X	
<i>Cirsium vulgare</i>	Asteraceae	Gemeine Kratzdistel							X	X											X	
<i>Clematis vitalba</i>	Ranunculaceae	Gemeine Waldrebe	X ¹																		X	
<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	Ackerwinde	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X
<i>Daucus carota</i>	Apiaceae	Wilde Möhre			X ¹				X			X					X				X	
<i>Digitalis purpurea</i>	Scrophulariaceae	Roter Fingerhut													X							

Ergebnisse

Fortsetzung Tab. 3.18

Pflanzen			Phyto- plasma	<i>Hyalesthes obsoletus</i>			Untersuchungsstandorte														
Art	Familie	Deutscher Pflanzenname	Wirtspflanze	Wirtspflanze	Nahrungs- pflanze	Zufallswirt	BKS-1	BKS-2	BKS-3	BKS-6	BOPP-2	KF-1	KK-1	KRÖV-1	MAR-1	MEHR-1	MONZ-1	NOR-1	PLAT-1	Sonstige Flä- chen	
<i>Echium vulgare</i>	Boraginaceae	Natternkopf							X	X					X	X	X		X	X	
<i>Epilobium adenecaulon</i>	Onagraceae	Drüsiges Weidenröschen				(X) ¹	X													X	
<i>Epilobium angustifolium</i>	Onagraceae	Schmalblättr. Weidenröschen					X		X				X			X	X				X
<i>Epilobium hirsutum</i>	Onagraceae	Zottiges Weidenröschen								X						X		X			X
<i>Erigeron strigosus</i> var. <i>Septentionalis</i>	Asteraceae	Gemeiner Feinstrahl															X				
<i>Euphorbia helioscopia</i>	Euphorbiaceae	Sonnen-Wolfsmich							X						X						X
<i>Galeopsis angustifolia</i>	Euphorbiaceae	Schmalblättr. Hohlzahn					X								X				X	X	
<i>Galeopsis tétrahit</i>	Lamiaceae	Gemeiner Hohlzahn																		X	
<i>Gallium mollugo</i>	Rubiaceae	Gemeines Labkraut			X ¹										X						
<i>Geum allepicum</i>	Rosaceae	Steife Nelkenwurz											X								
<i>Hierácium cf. pilosélla</i>	Asteraceae	Kleines Habichtskraut			X				X											X	
<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae	Tüpfel-Johanniskraut				(X) ¹	X									X	X			X	
<i>Hypericum tetrapterum</i>	Hypericaceae	Flügel-Johanniskraut																X			
<i>Hypochoeris maculata</i>	Asteraceae	Geflecktes Ferkelkraut													X						
<i>Lactuca saligna</i>	Asteraceae	Weiden-Lattich															X				
<i>Lactuca serriola</i>	Asteraceae	Stachel-Lattich											X	X	X		X				
<i>Lapsana communis</i>	Asteraceae	Rainkohl												X							
<i>Leontodon autumnalis</i>	Asteraceae	Herbst-Löwenzahn											X		X						
<i>Linaria vulgaris</i>	Scrophulariaceae	Gemeines Leinkraut			X ¹				X					X	X				X	X	
<i>Malva neglecta</i>	Malvaceae	Weg-Malve							X	X		X	X	X	X			X		X	

Ergebnisse

Fortsetzung Tab. 3.18

Pflanzen			Phyto- plasma	<i>Hyalesthes obsoletus</i>			Untersuchungsstandorte														
Art	Familie	Deutscher Pflanzenname	Wirtspflanze	Wirtspflanze	Nahrungs- pflanze	Zufallswirt	BKS-1	BKS-2	BKS-3	BKS-6	BOPP-2	KF-1	KK-1	KRÖV-1	MAR-1	MEHR-1	MONZ-1	NOR-1	PLAT-1	Sonstige Flä- chen	
<i>Matricaria inodora</i>	Asteraceae	Duftlose Kamille													X						
<i>Medicago sativa</i>	Fabaceae	Luzerne		X ¹									X								
<i>Plantago major ssp major</i>	Plantaginaceae	Großer Wegerich												X							
<i>Potentilla reptans</i>	Rosaceae	Kriechendes Fingerkraut			X ¹																X
<i>Prunus spinosa</i>	Rosaceae	Schlehdorn	X ¹			X ¹															X
<i>Ranunculus repens</i>	Ranunculaceae	Kriechender Hahnenfuß	X	X			X			X					X				X		X
<i>Ranunculus bulbosus</i>	Ranunculaceae	Knolliger Hahnenfuß	X	X																	
<i>Rubus spec</i>	Rosaceae	Brombeere																			X
<i>Salix caprea</i>	Saliaceae	Sal-Weide				X ¹															X
<i>Sanguisorba minor</i>	Rosaceae	kleiner Wiesenknopf											X								
<i>Senecio erucifolius</i>	Asteraceae	Raukenblättriges Kreuzkraut		X ¹										X					X		
<i>Senecio vulgaris</i>	Asteraceae	Gemeines Kreuzkraut					X						X	X	X				X		X
<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae	Schwarzer Nachtschatten	X		X		X	X	X	X					X	X					X
<i>Sonchus arvensis</i>	Asteraceae	Acker-Gänsedistel			X										X						X
<i>Sonchus asper</i>	Asteraceae	Dornige Gänsedistel						X	X				X	X		X	X				
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae	Kohl-Gänsedistel					X	X													
<i>Taraxacum laevigatum</i>	Asteraceae	Rotfrüchtiger Löwenzahn																			X
<i>Taraxacum officinale</i>	Asteraceae	Gemeiner Löwenzahn		X ¹					X					X							X
<i>Thlapsi arvense</i>	Brassicaceae	Acker-Hellerkraut						X							X				X		
<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae	Große Brennnessel	X	X			X	X		X					X	X					X
<i>Urtica urens</i>	Urticaceae	Kleine Brennnessel					X								X						

Ergebnisse

Bekämpfung der Ackerwinde durch Bodenbewirtschaftungsmaßnahmen

Die natürliche Sukzession brachliegender Flächen zuzulassen kann, sofern sie schnell zu geschlossenen Pflanzendecken führt, eine erfolgreiche Strategie zur Verhinderung der Ansiedlung der Ackerwinde sein (vgl. Tab. 3.19: Klasse 2). Für solche Flächen, die sich dagegen durch eine langsame Verbuschung auszeichneten, können Begrünungsmaßnahmen die Ansiedlung der Ackerwinde behindern bzw. verdrängen. Nicht alle Areale, vor allem solche im Steilhangbereich, an denen die Ackerwinde sich schon angesiedelt hatte, wurden überwuchert. Eine nachhaltige Reduzierung solcher Stellen konnte aber beispielsweise erfolgreich durch das Habichtskraut *H. pilosella* erreicht werden (vgl. Tab. 3.19: Klasse 3 - Untersuchungsfläche BKS-1.1B). Ihre Triebe überwucherten *die Ackerwinde*, wobei das Blattwerk infolge einer dichten Anpflanzung dicht beieinander steht und daher nur wenig Tageslicht zu der darunter wachsenden Ackerwinde durchlässt. Dieses anschauliche Beispiel biologischer Bekämpfungsmaßnahmen zeigt sich vor allem im Unterschied zur Kontrollfläche BKS-1A, auf der der Windenanteil innerhalb der drei Untersuchungsjahre durch natürliche Sukzession von 28,9 % lediglich auf 13,8 % zurückging, während der Windenanteil auf der Versuchsparzelle BKS-1.1B im gleichen im gleichen Zeitraum auf unter 4 Prozent gesenkt werden konnte.

Mit der Reduzierung war gleichzeitig auch ein Rückgang der Fangzahlen von *H. obsoletus* zu verzeichnen: Während auf den beiden Untersuchungsflächen BKS-1A bzw. 1C 1199 Tiere gefangen wurden, war die Gesamtzahl der gefangenen Tiere auf der Fläche BKS-1.1B mit 4 Tieren erstaunlich gering. Allerdings kann eine Reduzierung der Tierpopulation nur dann erfolgen, wenn diese keine Alternativgrundlage zur Ernährung bzw. zur Eiablage finden kann, wie dies auf der Fläche PLAT-1A beobachtet werden konnte: Obwohl eine fast geschlossene, natürlich entstandene Pflanzendecke die mögliche Ansiedlung der *Ackerwinde* verhinderte, fand *H. obsoletus* in *R. repens* eine alternative Wirts- und Nahrungspflanze, was durch die Fangzahlen belegt wird.

Auch der Bedeckungsgrad angepflanzter Begrünungspflanzen bzw. der durch eine natürliche Sukzession entstandenen Pflanzendecke wurde erfasst. *H. pilosella* zeigte sowohl auf der Fläche als auch im Rebunterstockbereich, sofern die vorgezogenen Jungpflanzen anwuchsen und dicht zusammengesetzt wurden (Pflanzenabstand 20-25 cm), einen starken Verdrängungseffekt und eine sich schnell schließende Pflanzendecke (vgl. Tab. 3.20: BKS-1.1B und BKS-2.1B). Die schon vor Projektbeginn ausgebrachten *Mulchmischungen* zeigten dagegen ein differentes Ergebnis. Obwohl sie teilweise sehr geschlossene Pflanzendecken bilden konnten, ist eine abschließende Bewertung nicht eindeutig genug, was vor allem daran liegt, dass auch auf den Kontrollflächen sich nur ein geringes Windenwachstum einstellte (vgl. Tab. 3.20: BKS-2.1E;

Ergebnisse

BKS-2.2A; BKS-2.2E). Gleichzeitig setzte sich die Ackerwinde an jenen Stellen fest, an denen die deckende Pflanzenschicht beschädigt war.

Einen Bedeckungsgrad bis zu 70% erreichten *Gras- und Kräutermischungen* noch in der gleichen Vegetationsperiode (vgl. Tab. 3.20: MAR-1.1/2; MAR-1.6-1.9; PLAT-4C; PLAT-4D). Kräuteranpflanzungen im Rebunterstockbereich (vgl. Tab. 3.20: BKS-2.1B; BKS-2.2C,D) sollten vor allem die durch das abfließende Regenwasser entstehenden Auswaschungen abdecken, den Untergrund festigen und dadurch eine Ansiedlung der *Ackerwinde* in diesen sensiblen Bereichen verhindern. Es konnte beobachtet werden, dass bei einigen Rebstöcken die Kräuter eingetrocknet waren. Trotzdem zeigte sich bei den übrigen Rebstöcken das erwünschte Ergebnis einer zunehmenden Bedeckung und Festigung des Bodens.

Eine eindeutige, die *Ackerwinde* verdrängende Bewertung, kann nicht für jedes Untersuchungsfeld abgegeben werden, da diese sich nicht auf jeder Kontrollfläche im Untersuchungszeitraum ansiedelte. Es zeigte sich aber, dass bei den meisten Rebstöcken, in deren Stammbereich sich die *Ackerwinde* im Vorjahr ansiedeln konnte, diese bereits verdrängt waren und gleichzeitig einzelne Versuchsflächen im Gegensatz zu benachbarten Kontrollflächen keine Ansiedlung von *C. arvensis* aufwiesen (vgl. Tab. 3.20: MAR-1.6 - 1.8).

Tabelle 3.19: Einfluss der Bodenbewirtschaftung auf den Bedeckungsgrad der Ackerwinde *Convolvulus arvensis* und auf das Vorkommen von *Hyalesthes obsoletus*

Der höchste Bedeckungsgrad zeigte sich auf Flächen der Klassen 1 und 5. Auf diesen Flächen erfolgte auch eine hohe Lebendfangzahl von *H. obsoletus*. Den geringsten Bedeckungsgrad zeigten Flächen der Klassen 2, 3 und 4, die sich entweder durch geschlossene Pflanzendecken aufgrund natürlicher Sukzession bzw. künstlicher Begrünung auszeichneten oder auf denen der Bewirtschafter regelmäßige Herbizidmaßnahmen durchführte. Diese Flächen zeigten geringe Fangzahlen von *H. obsoletus*. 1: Einsatz von Herbizid während der Wachstumsphase von *C. arvensis* und gleichzeitig während der Flugphase von *H. obsoletus*; 2: Herbizidmaßnahmen zu einem nicht optimalen Zeitpunkt; -: Keine Untersuchungsmaßnahmen durchgeführt;

Fläche	Anzahl Parzellen	Anzahl Messpunkte	Bedeckungsgrad (%) der Ackerwinde			Lebend- und Gelbfallenfangzahlen von <i>Hyalesthes obsoletus</i>		
			1999	2000	2001			
Klasse 1:								
Untersuchungsflächen mit natürlicher Sukzession ohne schnelle Bildung einer geschlossenen Pflanzendecke								
BKS-1.1A	1	24	28,9	17	13,8	749 (211)	335 (94)	119 (14)
MEHR-2.1	1	24	26,5	9	7,5	586	488 (5)	12 (4)
MONZ-1	2	48			4	153	363	278
Klasse 2:								
Untersuchungsflächen mit natürlicher Sukzession und schneller Bildung einer geschlossenen Pflanzendecke								
BKS-2.2B	1	25	1,6	1,1	1,2	Keine Fänge durchgeführt		
PLAT-4B	1	24	-	0	0	-	24 (7)	12 (26)
MAR-1.5	1	24	-	5,6	0,8	-	2	0
MEHR-2.2E	1	24	-	9	1,4	-	0	0

Ergebnisse

Fortsetzung Tab. 3.19

Fläche	Anzahl Parzellen	Anzahl Mess- punkte	Bedeckungsgrad (%) der Ackerwinde			Lebend- und Gelbfallenfangzahlen von <i>Hyalesthes obsoletus</i>		
			1999	2000	2001			
Klasse 3:								
Untersuchungsflächen, auf denen Begrünungsmaßnahmen durchgeführt wurden								
BKS-1.1B	1	24	22	2,3	3,4	/	Vereinzelte Individuen ^{a)}	
BKS-2.1E	1	25	0	1,8	4,7	0 (0)	0 (0)	0 (0)
BKS-2.2A	1	25	0	0,7	0,3	Keine Lebendfänge durchgeführt		
BKS-2-2E	1	25	0	0	0,9			
MAR-1	5	120	-	7,9	0,8	/	2 (3)	0 (7)
PLAT-4C/D	2	48	-	0	0	/	24 (7)	12 (26)
Klasse 4:								
Untersuchungsflächen, auf denen regelmäßige Herbizidmaßnahmen (Winzer) durchgeführt wurden								
BKS-1.2 (C1-C3)	5	120	-	1,2	0,6	Keine Lebendfänge durchgeführt		
BOPP-1.1.1	4	96	-	0	0	Keine Lebendfänge durchgeführt		
KRÖV-1.3	1	24		0,5	1,3	-	0	0
MEHR-2.2	4	96		2,1	0,5	-	0	0
NK-1	2	50	-	- ²	6,9 ²	5 (4)	34	45
ZELT-1A	1	24	-	2,4	0,5			
ZELT-1B	1	24	-	43,0 ²	1,2			
ZELT-1C	1	24	-	0,4	0,3			
ZELT-1D	1	24	-	23,5 ²	0,2			
ZELT-1E	1	24	-	15,4 ²	0,6			
ZELT-1F	1	24	-	16,3 ²	0,1			
ZELT-1G	1	24	-	13,1 ²	0,2			
ZELT-1H	1	24	-	6,3 ²	0,4			
ZELT-1I	1	24	-	12,2 ²	0,1			
Klasse 5:								
Untersuchungsflächen, auf denen ein unregelmäßiger Herbizideinsatz (Winzer) durchgeführt wurde								
BOPP-6	1	24		42	49,2	160	350	585
MEHR-1A	1	24	-	-	41,1	Keine regelmäßige Kontrollen		
BKS-3.1	1	24	17,8	29,4	12,4 ²	0 (20)	87 (27)	119 (14) ¹

Eine *natürliche Sukzession* zuzulassen kann ebenfalls erfolgreich sein, wie dies auf den Untersuchungsflächen PLAT-1A bzw. MEH-2.2C zu beobachten war. Dort konnte in der gleichen Vegetationsperiode ein Bedeckungsgrad bis über 90% (vgl. Tab. 3.20: PLAT 1A) erreicht werden. Als gegensätzliche Beispiele dienen dazu die Flächen BKS-1.1A bzw. MEH-2.1, auf denen sich trotz

Ergebnisse

langjähriger Sukzession keine geschlossenen Pflanzendecken, dafür aber sehr hohe Bedeckungsgrade der *Ackerwinde* einstellen konnten. Da die Fangzahlen einerseits und die Ergebnisse der PCR-Tests andererseits belegen, dass schon ein geringes Vorkommen der *Ackerwinde* ausreicht, um infizierten Populationen von *H. obsoletus* eine Nahrungsgrundlage zu bieten (vgl. Tabelle 3.21: NK-1), sollte zumindest in Gebieten, in denen die *Ackerwinde* häufig vorkommt, eine Begrünung durchgeführt werden.

Die Abdeckung mittels *Ölleinstroh* war zwar ebenfalls sehr effektiv, doch ist die Ausbringung sehr aufwendig. Zudem können Wildtiere und die Auswirkungen ungünstiger Witterungsverhältnisse die Abdeckung aufreißen, so dass sich dort die *Acker-* bzw. *Zaunwinde* festsetzen und sich ausbreiten kann.

Bodenbearbeitungsmaßnahmen wie beispielsweise das Grubbern können zwar dazu führen, dass die im Boden vorhandenen Gelege bzw. die zur Oberfläche führenden Wege der Larven von *H. obsoletus* zerstört werden. Die Wirkung auf den Bedeckungsgrad der *Ackerwinde* ist unterschiedlich: Einerseits zeigten die Untersuchungsflächen BKS-1.D und BKS-2.1D (vgl. Tabelle 3.20) nur einen geringen Bedeckungsgrad, andererseits zeigte die Erfassung auf der Untersuchungsfläche KRÖV-1.B dagegen einen sehr hohen Bedeckungsgrad mit einer gleichzeitig auftretenden sehr starken Population von *H. obsoletus*.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass *H. pilosella* den höchsten Bedeckungsgrad und den nachweisbar stärksten Verdrängungseffekt erreicht. Diese Pflanze ist vor allem dann geeignet, wenn der Untergrund steinig, gering wasserführend und starker Sonneneinstrahlung ausgesetzt ist, wie dies in vielen Steillagenbereichen vorkommt (vgl. Tab. 3.20: BKS-1.1B). Sowohl *Mulch-* als auch *Gras-* und *Kräutermischungen* können immerhin aufgrund der schnellen Bildung dichter werdender Pflanzendecken eine starke Ausbreitung der *Ackerwinde* aufgrund ihrer Konkurrenz beeinträchtigen bzw. verhindern. Einen umfassenden Überblick aller Versuchsflächen, auf denen der Bedeckungsgrad von *C. arvensis* erfasst wurde, ist in der Tabelle 3.20 aufgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 3.20: Darstellung der Ergebnisse von den 1999 – 2001 durchgeführten Begrünungsversuchen zur Verdrängung der Ackerwinde *Convolvulus arvensis* (% Bedeckungsgrad).

B: Brachfläche; E: Ertragsreiblefläche; gP: geschlossene Pflanzendecke; K: Kontrollfläche; N gesamt: Anzahl gefangener Tiere (Lebend- und Gelbfallenfänge 1999 – 2001); nf: nicht feststellbar;
 - bzw. +: erkennbarer bzw. nicht erkennbarer Verdrängungseffekt; 1: Geschlossene Strohmatte wurde durch Wildtiere stellenweise aufgerissen; 2: Bodenbearbeitungsmaßnahmen durch Winzer; 3: Als Wirts- und Nahrungspflanze diente *R. arvensis*; ?: Verdrängungseffekt aufgrund der Versuchsanordnung fraglich;

Versuchsfläche	Versuchsparzelle	Nutzungsart	Versuchsbeginn	Begrünungspflanze	Bedeckungsgrad <i>Convolvulus arvensis</i>			Bedeckungsgrad Begrünungspflanze			Erkennbarer Verdrängungseffekt
					1999	2000	2001	1999	2000	2001	
BKS-1.1	Bks-1.1A	B	1990	Kontrollfläche: natürliche Sukzession	28,9	17	13,8	28,5	30,0	27	-
	Bks-1.1B		1999	<i>Hieracium pilosella</i>	22,0	2,3	3,4	31,5	80,3	83,6	+
	BKS-1.1C		2000	Abdeckung Ölleinstroh		3,5	3,1		Geschlossene Strohlage ¹		+
	BKS-1.1D		1999	Kontrollfläche: natürliche Sukzession nach Grubbern	2,5	3,5	3,1			37,5	?
BKS-2.1	BKS-2.1A	E	1999	Kontrollfläche: natürliche Sukzession	0	3,1	7,9	Kontrollfläche wurde durch Verwendung als Anfahrtsweg nicht mehr als Referenz verwendet			
	BKS-2.1B		1999	<i>Hieracium pilosella</i> (50 Reben) (Rebunterstockbereich)	0,2	2,7	1,6		41,5	48,3	(+)
	BKS-2.1C		1999	Regelmäßiger Herbizideinsatz (1 Spritzung pro Jahr)	0	9,3	0				+
	BKS-2.1D		1999	Kontrollfläche: natürliche Sukzession nach Grubbern (jährlich)	0	0	0,2		19,0	22,8	?
	BKS-2.1E		1999	Mulchmischung 3	0	1,8	4,7		96,6	91,5	(+)
BKS-2.2	BKS-2.2A	E	1997	Mulchmischung 3	0	0,8	0,3		87,5	81,6	?
	BKS-2.2B		1997	Kontrollfläche: natürliche Sukzession nach Grubbern	1,7	1,5	1,2	78,8	52,7	50,6	?
	BKS-2.2C		1998	Rebunterstockbereich : <i>Silene vukgaris</i> (50 Reben) <i>Hieracium pilosella</i> (50 Reben) <i>Dianthus deltoides</i> (50 Reben)	0,3	0,6	0		52,7 58,0 Nf	50,6 27,3 nf	?
	BKS-2.2D		1998	<i>Sedum album</i> (50 Reben) (Rebunterstockbereich)	0,1	1,2	0		21,4	15,4	?

Ergebnisse

Fortsetzung Tab. 3.20

Versuchsfläche	Versuchsparzelle	Nutzungsart	Versuchsbeginn	Begrünpflanze	Bedeckungsgrad <i>Convolvulus arvensis</i>			Bedeckungsgrad Begrünpflanze			Erkennbarer Verdrängungseffekt
					1999	2000	2001	1999	2000	2001	
					1999	2000	2001	1999	2000	2001	?
MAR-1	MAR-1.1	B	2000	Gras- u. Kräutermischung (Var. 1)		11,2	0			41,3	+
	MAR-1.2		2000	Gras- u. Kräutermischung (Var. 3)		0,4	2,2			37,5	?
	MAR-1.3		2000	Abdeckung Ölleinstroh		0	0,5		Geschlossene Strohlage ¹		+
	MAR-1.4		2000	Kontrollfläche: natürliche Sukzession nach einmaligem Herbizideinsatz		10,8	0			49,6	+
	MAR-1.5		2000	Kontrollfläche: natürliche Sukzession		5,6	0,8			58,6	+
	MAR-1.6		2001	Gras- u. Kräutermischung (Var. 1)			0			70,4	+
	MAR-1.7		2001	Gras- u. Kräutermischung (Var. 4)			0			48,4	+
	MAR-1.8		2001	Gras- u. Kräutermischung (Var. 2)			0			52,1	+
	MAR-1.9		2001	Kontrollfläche: natürliche Sukzession nach Grubbern				7,6			22,0
PLAT-1 ³	PLAT-1A	B	Ca. 1995	Kontrollfläche: natürliche Sukzession	0	0	0	91,5	93,2	94,2	(+)
PLAT-4	PLAT-4A	B	2000	Abdeckung Ölleinstroh		0	0		Geschlossene Strohlage ¹		(+)
	PLAT-4B		2000	Kontrollfläche: natürliche Sukzession		>0,1	0			65	(+)
	PLAT-4C	B	2000	Gras- u. Kräutermischung (Var. 1)		0	0			82	(+)
	PLAT-4D		2000	Gras- u. Kräutermischung (Var. 2)		>0,1	0			73	(+)
KRÖV-1	KRÖV-1A	E	1999	<i>Hieracium pilosella</i>				Nur wenige Pflanzen angewachsen			
	KRÖV-1B		1999	Kontrollfläche: natürliche Sukzession nach Grubbern	30,6		23,2	13,7 ²			
	KRÖV-1C		1999	Regelmäßiger Herbizideinsatz		0	0,5	1,3			

Ergebnisse

3.6.3 Einfluss der Wirtspflanzen auf den Infektionsdruck der Schwarzholzkrankheit

Wie wichtig die Bekämpfung der Wirts- und Nahrungspflanzen tatsächlich ist, zeigt sich beim Vergleich zwischen dem Bedeckungsgrad der Wirts- und Nahrungspflanzen einerseits und der Infektionshäufigkeiten innerhalb der diese Pflanzen nutzenden Populationen. Es zeigte sich, dass die Art der vorherrschenden Wirtspflanze bestimmend für die auftretende Infektionshäufigkeit innerhalb einer Population und deren Größe ist (vgl. Abb.3.2). Es konnte beobachtet werden, dass bei einer Abnahme des Bedeckungsgrades sowohl die Anzahl gefangener Tiere als auch die Infektionshäufigkeit geringer wurde. In der Abbildung 3.24 ist stellvertretend die Untersuchungsfläche BKS-1.1 (Gemarkung Bernkastel) ausgewählt worden. Der anfänglich hoher Bedeckungsgrad der Ackerwinde wurde sowohl durch eine natürliche Sukzession als auch durch Abdeckversuche reduziert. Mit der Abnahme des Bedeckungsgrads nahm gleichzeitig sowohl die Infektionshäufigkeit innerhalb der Population als auch die Populationsgröße, die sich in den regelmäßigen Fangzahlen widerspiegelt, ab. Die stärksten Abnahmen wurden dabei bei solchen Populationen beobachtet, die die Ackerwinde als Wirts- und Nahrungspflanze nutzen. Es handelt sich dabei auch um diejenigen Standorte, auf denen z.T. die größten Fangzahlen erzielt und die höchsten Infektionshäufigkeiten festgestellt werden konnten (vgl. Abb. 3.2.5). Auf Untersuchungsflächen, die als Hauptschwerpunkt für Fangaktivitäten darstellten, kann die intensive Fangaktivität mittels Streifnetz ein zusätzlicher Faktor für die Reduzierung der Populationsgröße darstellen.

Die Auswirkungen auf die Infektionshäufigkeit durch Bekämpfungsmaßnahmen, aber auch durch die natürliche Sukzession solcher Flächen, die nicht im trocken-steinigen Steilhangbereich lagen, sind für die Untersuchungsflächen am Standort Bernkastel-Kues, aber auch für den Standort Monzingen gut in der Abbildung 3.25 erkennbar. Mit der Abnahme des Bedeckungsgrads reduzierten sich auch Populationsgrößen und die Infektionshäufigkeiten. Für die Untersuchungsflächen BOPP-6 am Mittelrhein gelten diese Gründe nicht, da dort die Ackerwinde immer noch einen hohen Bedeckungsgrad aufwies. Hier scheint es vielmehr um eine natürliche Schwankungen der Infektionshäufigkeit einer einzelnen Population zu handeln

Die bevorzugten Flächen, auf denen sich *C. arvensis* ansiedelt, sind die im Zunehmen begriffenen Brachflächen. Während auf solchen Flächen, die durch eine gelungene natürliche Sukzession bzw. durch eine künstliche Begrünung der Bedeckungsgrad von *C. arvensis* reduziert werden konnte, treten umgekehrte Effekte bei Flächen auf, die zwar durch eine Herbizidanwendung zunächst unkrautfrei gemacht worden sind, danach aber sich selbst überlassen wurden (BOPP-6, BKS-3.1). Die Ackerwinde konnte auf diesen Flächen oftmals ungestört einwandern und bildete

Ergebnisse

großflächig zahlreiche, verschieden große Aggregationen, auf denen zahlreiche Vektoren gefangen werden konnten (vgl. Abb. 3.26). Nachdem auf der Untersuchungsfläche BKS-3.1 (Bernkastel-Kues) im ersten Untersuchungsjahr eine mit Herbizid behandelte Fläche als Neuanlage eingerichtet war, trat schon im drauffolgenden Jahr die Ackerwinde vermehrt auf. Im letzten Untersuchungsjahr wurde an insgesamt 60 Messpunkten ein Bedeckungsgrad von 21% ermittelt. Während zwar noch 24 Messpunkte frei von Bewuchs der Ackerwinde blieben, zeigten 10 Messpunkte schon einen Bedeckungsgrad von über 50%. Im folgenden können solche Aggregationen zu großflächigen Rasenformationen zusammenwachsen, wie sie auf der Untersuchungsfläche BOPP-6 (Boppard) am Mittelrhein beobachtet werden konnten. Die Untersuchungsfläche diente gleichfalls als Untersuchungsfläche zur Migrationsaktivität. Während 1999 kein einziger Vektor mittels Streifnetz gefangen werden konnte, stieg ihre Zahl bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes auf 119 Tiere an. Diese Fläche steht daher als Beispiel für viele andere Flächen, deren natürlicher Bewuchs durch Kulturmaßnahmen entfernt wurde und somit der Ackerwinde Platz zur Einwanderung bieten.

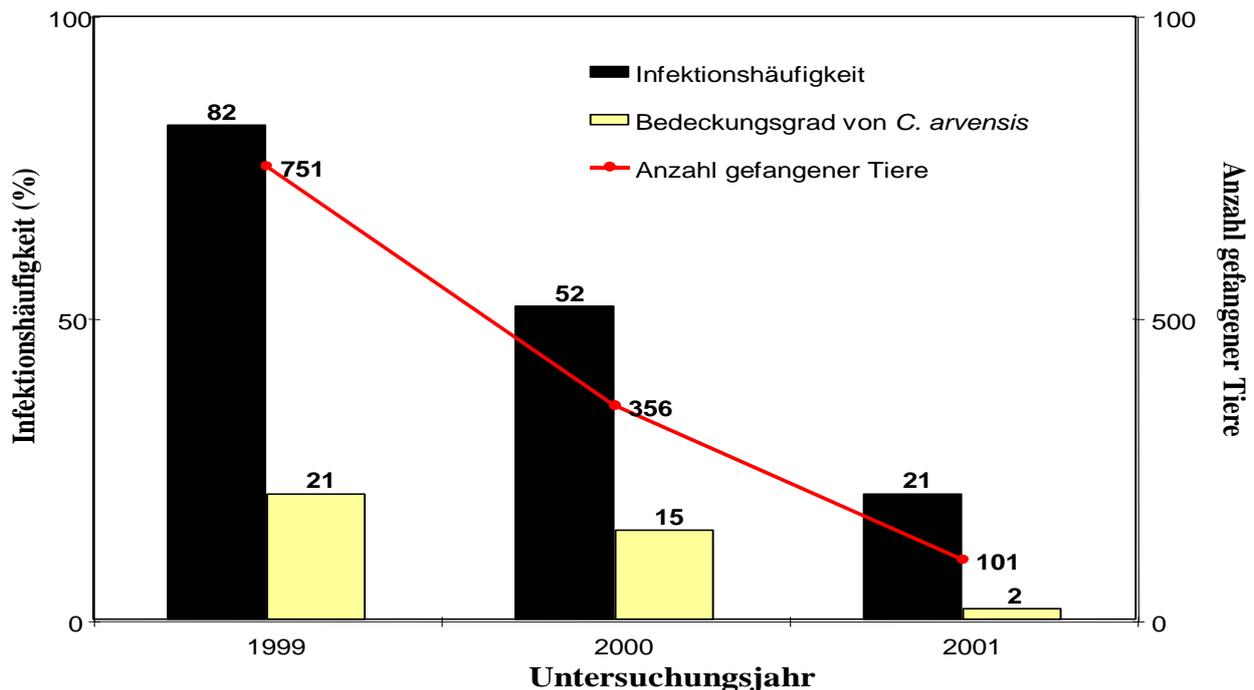


Abb. 3.24: Abhängigkeit der Infektionshäufigkeit (%) und der Populationsgröße (Anzahl gefangener Tiere, %) von *H. obsoletus* vom Bedeckungsgrad der Wirts- und Nahrungspflanze (*C. arvensis*) am Beispiel der Untersuchungsfläche BKS-1.1 (Gemarkung Bernkastel)
Mit abnehmendem Bedeckungsgrad nimmt sowohl die Infektionshäufigkeit innerhalb der Population als auch die Populationsgröße ab.

Ergebnisse

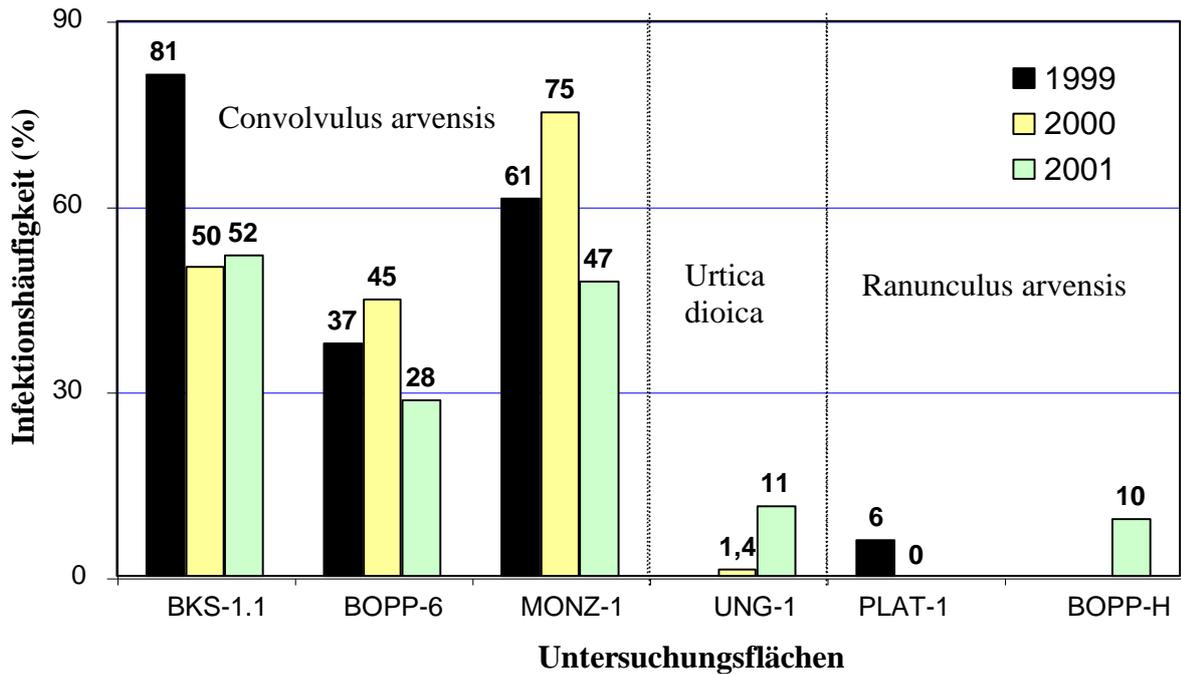


Abb. 3.25: Verlauf der Infektionshäufigkeiten von unterschiedliche Wirts- und Nahrungspflanzen nutzende Populationen von *Hyalesthes obsoletus* im Untersuchungszeitraum 1999-2001
Die Abbildung zeigt die Abnahme der Infektionshäufigkeiten für die Gesamtheit der Untersuchungsflächen an den Standorten Bernkastel-Kues (BKS) und Monzingen (MONZ) sowie den Standort Boppard (BOPP-6). An den Standorten Ungstein (UNG) Platten (PLAT) und Boppard (BOPP-5) lebten Populationen auf der Brennessel bzw. auf dem Kriechenden Hahnenfuß. Hier traten im Vergleich zu Populationen auf der Ackerwinde keine hohen Infektionshäufigkeiten auf.

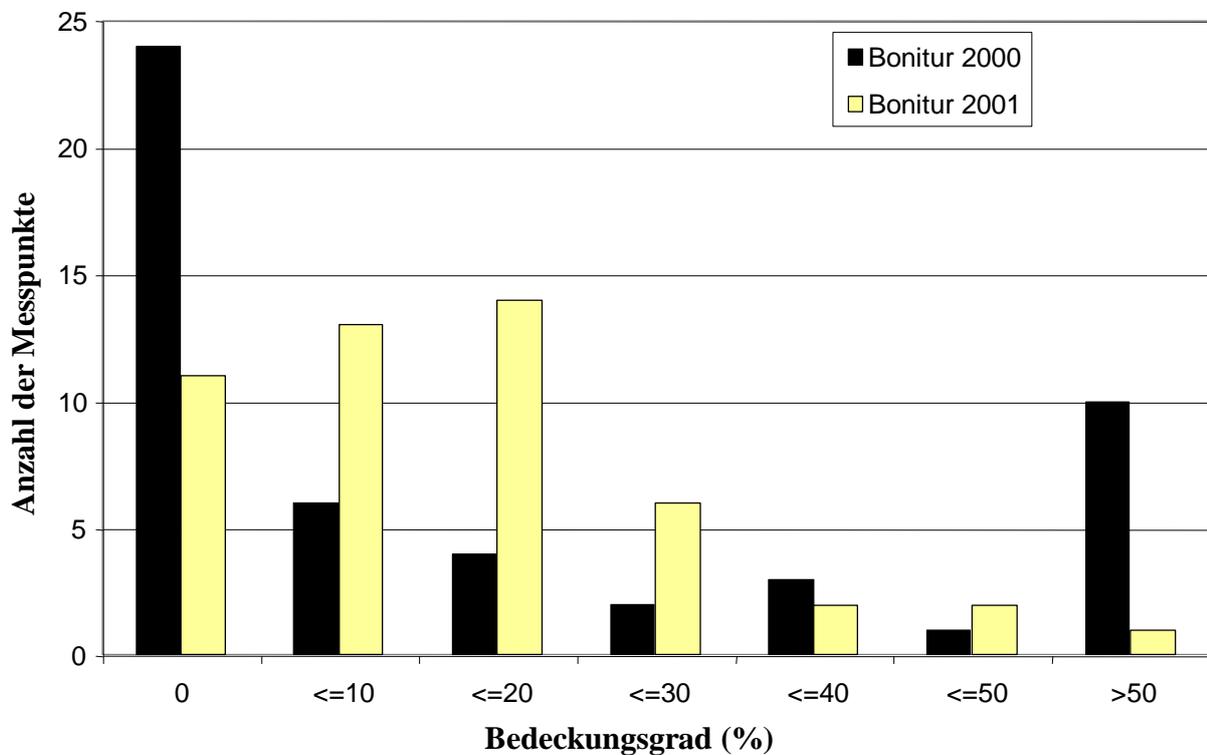


Abb. 3.26 : Stärke der Aggregationsbildung von *Convolvulus arvensis* an 60 regelmäßig verteilten Messpunkten in einer zuvor mit Herbizid behandelten Ertragsrebläche (Gemarkung Bernkastel: BKS-3.1).

4 DISKUSSION

4.1 DER FANG DES VEKTORS *HYALESTHES OBSOLETUS*

Zur Erfassung des Infektionsdrucks, den die Schwarzholzkrankheit auf die Weinreben ausübt, wurden Populationsstandorte in den Weinanbaugebieten, in denen eine Vergilbungskrankheit auftritt, gesucht und beprobt. Diese Populationsstandorte sollten u.a. Erkenntnisse über die Faktoren des Infektionsdrucks, nämlich Populationsstärke, Infektionshäufigkeit und Migrationsbewegungen des Vektors erbringen. Die Untersuchungsergebnisse des ersten Untersuchungsjahres bestätigen die richtige Auswahl der Versuchsstandorte, so dass nachfolgend in die Untersuchung aufgenommene Flächen lediglich der Erweiterung des Forschungsvorhabens dienten.

Die Fangzahlen der Vektoren, die mit dem Streifnetz oder mit den auf den Untersuchungsflächen ausgebrachten Gelbfallen (Klebefallen) erreicht wurden, belegen, dass sich dieser Vektor in Deutschland zumindest regional etabliert hat, zumal im Rahmen dieses Forschungsprojektes ausschließlich solche Gebiete beprobt wurden, die durch den Weinanbau gekennzeichnet waren und darüber hinaus symptomatische Rebstöcke aufwiesen. Eine der wichtigsten Kennzeichen der Standorte, an denen große Populationen nachgewiesen werden konnten, zeigten einen durch Herbizideinsatz ihrer natürlichen Pflanzendecke beraubten hohen Bedeckungsgrad der Ackerwinde *C. arvensis*, die als eine ihrer wichtigsten Wirts- und Nahrungspflanzen bekannt ist. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass auch andere, nicht in die Untersuchung einbezogene Flächen ebenfalls günstige Standortbedingungen für diesen Vektor bieten können, wobei natürlich die gezielte Auswahl solcher Standorte eine hohe Fangzahl begünstigt. Im Vergleich zur passiven Gelbfallenfangmethode, bei der ein Vektor aufgrund seiner Flugaktivität gefangen wird, war die Streifnetzmethode, bei der gezielt Wirts- und Nahrungspflanzen beprobt werden konnten, in Bezugnahme zur Fangzahl wesentlich erfolgreicher (vgl. Abb. 3.4). Der Lebendfang war damit das Mittel der Wahl, um genügend Tiere für den Erregernachweis mittels der PCR (vgl. Tab. 3.10), den trophischen Untersuchungen (vgl. Abb. 3.11) und den Übertragungsversuchen (vgl. Tab. 3.7) bereitzustellen. Zur Feststellung des Flugverlaufs in Bezug auf den Beginn des Auftreten von *H. obsoletus*, Höhepunkt seines Aufkommens und der Endphase seiner Flugphase genügt allerdings die Exposition von Gelbfallen in den betroffenen Gebieten (vgl. Abb. 3.5 und 3.6) zwischen der 20. und 34. Jahreswoche, unabhängig davon, welche Wirtspflanze genutzt wird. Der Vorteil der Lebendfangmethode ist die

Diskussion

einer gezielten Suche nach dem Vektor. In diesem Forschungsvorhaben wurde durch gezielte Sucheaktivitäten, ausgelöst durch das Auftreten symptomatischer Rebstöcke, erstmals Nachweise für den Vektor an der Nahe (Bad Kreuznach, Norheim), in der Pfalz (Böchingen) und in Baden (Neuweier) erbracht (vgl. Tab. 3.3). Daher ist die Kombination beider Fangmethoden trotz des organisatorischen Mehraufwands in Bezug auf die genannten Untersuchungsaspekte als sehr erfolgreich zu bezeichnen.

4.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOLOGIE VON *HYALESTHES OBSOLETUS*

4.2.1 Prognose des Flugbeginns von *Hyalesthes obsoletus* und Untersuchungen zu seiner Nahrungsspezifikation

Eine exakte Voraussage über das erste Auftreten der Imagines konnte durch die Entwicklung eines Prognosemodells erstellt werden. Die Parameter des Prognosemodells (Startdatum der Temperaturmessung, Schwellentemperatur und mittlere Gesamt-Temperatursumme) ergaben die Berechnung des ersten Auftretens der Imagines allerdings nur für Populationen, die auf *C. arvensis* als Hauptwirts- und Nahrungspflanze spezifiziert sind (vgl. Abb. 3.10). Populationen in der Pfalz, die *U dioica* als Wirts- und Nahrungspflanze nutzen, weisen einen bis zu drei Wochen verzögerten Beginn der Flugphase auf. Obwohl aus früheren Jahren keine Beobachtungsdaten vorlagen und im ersten Untersuchungsjahr nur einzelne Individuen gefangen werden konnten, zeigt die Datenerhebung der letzten beiden Untersuchungsjahre, dass das verspätete Einsetzen des Fluges die Regel zu sein scheint, zumal innerhalb beider „Nahrungsgruppen“ der Flugbeginn sich nur in geringem Maße unterscheidet. Aufgrund des verzögerten Flugbeginns wurde für das 3. Versuchsjahr ein Versuchsplan erstellt, um Unterschiede im Einfluss trophischer Faktoren auf den Lebenszyklus von *H. obsoletus* eingehend zu untersuchen (vgl. Kap. 3.2.2). Es stellte sich nämlich eine signifikant längere durchschnittliche Überlebenszeit bei Zikaden der Brennesselgruppe heraus. Zur Evaluierung eines Prognosemodells für diese Zikadengruppe müssten daher die Beobachtungsdaten kommender Jahre herangezogen werden. Diese Verzögerung im Auftreten zeigte sich bereits im Jahr 2000, als nur durch eine gezielte Suche am Untersuchungsstandort diese Population entdeckt wurde. Damit erklären sich auch die geringen Fangzahlen vorangegangener Jahre. Die Fangaktivität fand wahrscheinlich zu einem zu frühen Zeitpunkt statt.

Obwohl das Prognosemodell an sich diese Nahrungsspezifikation von *H. obsoletus* nicht beinhaltet, ist sie doch für die Vorhersage zum Flugbeginn aller Vektoren geeignet, unabhängig seiner Nahrungsspezifikation. Zwei Möglichkeiten zur Modifikation bieten sich an. Eine Möglichkeit wäre

Diskussion

beispielsweise, entweder die mittlere Gesamt-Temperatursumme für die auf *U. dioica* spezifizierten Tiere zu erhöhen oder aber die Messung der Luft- bzw. Bodentemperatur zu einem späteren Zeitpunkt zu beginnen, wobei sich dabei der Aufwand eines verlängerten Messzeitraums erübrigen würde. Die Anwendung dieser Methode hätte vor allem in solchen Gebieten einen Sinn, in denen die Zikaden überwiegend bzw. ausschließlich auf *U. dioica* spezifiziert sind. Der Vorteil, das Startdatum der Temperaturmessung beizubehalten und eine vergrößerte mittlere Gesamt-Temperatursumme einzubeziehen liegt darin, dass die Temperaturmessung für alle Vektoren dieser Zikadenart, unabhängig ihrer Nahrungsspezifikation beginnt. Diese Methode könnte in solchen Gebieten angewendet werden, in denen Populationen aus unterschiedlichen Nahrungsgruppen vorkommen. Auf der Basis mehrjähriger Temperaturmessungen könnten mittlere Gesamt-Temperatursummen für die jeweilige Nahrungsgruppe erstellt werden, sofern ein späteres Erscheinen festgestellt werden sollte. Nachfolgende Untersuchungen bestätigten, dass der Vektor in großem Umfang *U. dioica*, aber auch *C. sepium* als Wirts- und Nahrungspflanze zu nutzen vermag. *U. dioica* gehört mittlerweile zu den Hauptwirts- und Nahrungspflanzen von *H. obsoletus* (vgl. LANGER, M. & MAIXNER, M., 2004). Während im Untersuchungszeitraum im Gegensatz zu *U. dioica* nur wenige Individuen auf *C. sepium* gefangen werden konnten, ergibt sich nun ein noch differenziertes Bild. In dieser Pflanzenart bzw. in Vektoren, die diese Pflanzenart besaugten, entdeckten LANGER und MAIXNER Phytoplasmen des neuen Stolbur-Typs III nachweisen.

Ein weiterer Aspekt verdient im Zusammenhang mit diesem Prognosemodell Beachtung. Nach Erfassung des DWD (Deutscher Wetterdienst, 2009) stieg die Jahresmitteltemperatur der Luft in Deutschland zwischen 1901 und 2007 um 1,0°C an (vgl. Abb. 7.1 im Anhang). Dabei wurden die neun der zehn wärmsten Jahre zwischen 1989 und 2008 festgestellt. Das bedeutet für die Prognose des Flugbeginns, dass die benötigte Gesamt-Temperatursumme des Vektors früher erreicht werden kann und somit mit einer zukünftig früheren Flugphase von *H. obsoletus* gerechnet werden kann. Ob sich darüber hinaus diese Temperaturveränderung auch auf die weitere Verbreitung des Vektors auswirkt, wäre ein weiterer Aspekt zukünftiger Forschungen. Es dürfte allerdings sehr wahrscheinlich sein, dass die polyphage Lebensweise und die gleichzeitige Steigerung der Jahresmitteltemperatur nachhaltig einen steigenden Infektionsdruck durch diesen xerothermen Vektor zur Folge hat. Das Ergebnis der Nahrungsspezifikation äußert sich auch in einem signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit (vgl. Abb. 3.11), wobei Individuen der „Brennessel-Gruppe“ mit durchschnittlich 8,7 Tagen die längste Überlebenszeit zeigten. LESSIO *et al.* (2007) stellten in Italien den gleichen Sachverhalt bei ihren Untersuchungen zur Populationsdynamik fest. In ihren Laborversuchen zeigte *H. obsoletus* die größte Lebensspanne auf *U. dioica*, die dort die wichtigste Wirtspflanze darstellt.

Diskussion

In seiner natürlichen Umgebung konnte der Vektor auf dieser Nahrungspflanze bis zu drei Wochen überleben. Die in den trophischen Experimenten festgestellt signifikante Verkürzung der Überlebenszeit, die bei einem experimentellen Wechsel der Nahrungspflanze vor allem bei der Brennessel-Gruppe sichtbar wurde, bestätigt zumindest eine fortgeschrittene Spezifizierung, da die Tiere anscheinend nicht mehr in der Lage waren, aus der Ackerwinde essentielle Inhaltsstoffe zu beziehen. Die gleiche Beobachtung machten LESSIO *et al.* (2007) bei ihren Untersuchungen zur Lebensspanne der Imagines. Sie stellten gleichfalls eine Verkürzung in der Überlebenszeit fest, wenn der Vektor auf andere Pflanzen gesetzt wurde. Die kürzeste Überlebenszeit von einem Tag zeigte der Vektor auf der Weinrebe.

Eine weitere Möglichkeit des auf die Überlebensdauer negativen Einflusses könnte auch darin liegen, dass sich nicht verträgliche Pflanzeninhaltsstoffe im Körper der Tiere anreichern. Auch das Ergebnis eines Wirtswechsels auf *R. repens* zeigt die gleiche Tendenz. Gleichzeitig bestätigten auch die Forschungsergebnisse der Tiere der Ackerwinde-Gruppe bei einem Wechsel der Nahrungspflanzen dieses Ergebnis, wenngleich in schwächerer Ausprägung. Damit konnte indirekt auch gezeigt werden, dass eine Infektion für die Lebensdauer von *H. obsoletus* bedeutungslos zu sein scheint, da die stärksten Auswirkungen bei einem Wechsel der Nahrungspflanzen nicht Tiere aus der hochinfizierten Ackerwinde-Gruppe betrafen, sondern solche aus der schwach infizierten Brennessel-Gruppe. Im Experiment konnte auch kein Unterschied in der Agilität zwischen den Tieren der unterschiedlichen Gruppen festgestellt werden. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass der zwischen den Populationen beobachtete Unterschiede im Auftreten tatsächlich nicht in der Witterung, sondern im Einfluss trophischer Faktoren ihre Erklärung findet. Die bisher festgestellten Durchseuchungsgrade der Ertragsreblächen durch Vektoren der Brennessel-Gruppe geben auch Anlass zur Befürchtung, dass von ihnen ebenfalls eine zukünftige Gefährdung durch zunehmenden Infektionsdruck ausgehen kann. Die höchsten Durchseuchungsgrade lagen zwischen 25,5-48,4 Prozent (vgl. Tab. 3.10 - 3.11).

Ein Nachteil der Untersuchungen zur Nahrungsspezifikation war allerdings, dass die Anzahl von Versuchstieren aufgrund anderer Untersuchungen begrenzt war und die Durchführung der Experimente aufgrund der späten Entdeckung der Brennessel-Gruppe erst im letzten Untersuchungs Jahr erfolgen konnte. Die Testergebnisse beim Wirtswechsel von Tieren der Brennessel-Gruppe auf andere in die Versuche integrierte Pflanzenarten zeigen zwar die gleiche, wenngleich auch eine unterschiedlich starke Tendenz einer verkürzten Überlebenszeit, doch reicht die Anzahl der Testtiere hier nicht mehr aus, das Ergebnis eindeutig zu bestätigen. Daher wäre eine Erweiterung des Spektrums der getesteten Pflanzenarten mit gleichzeitiger Erhöhung der Anzahl von Testtieren sinnvoll, zumal nicht nur bekannte Wirts- und Nahrungspflanzen (vgl. Tab. 3.7), sondern auch weitere als potentiell-

Diskussion

le Begrünungspflanzen vorgesehene Pflanzenarten in die Versuche integriert werden könnten, so dass nicht nur die Wirts- und Nahrungsspezifikation von *H. obsoletus* untersucht, sondern auch mögliche Risiken bei der Bekämpfung der Schwarzholzkrankheit im Vorfeld minimiert werden könnten. Abschließend kann also festgestellt werden, dass diese Tests nicht nur die Spezifikation an sich, sondern auch eine beginnende Unumkehrbarkeit des Spezifikationsprozesses zeigen.

Im Untersuchungszeitraum zeigte sich bei Beprobungen von der Wirtspflanze *C. arvensis*, dass sich beim Fang mit dem Streifnetz ein etwa ausgewogenes Geschlechterverhältnis (48,4% Weibchen zu 51,6% Männchen) ergibt, während die passiven Gelbfallenfänge die höhere Flugaktivität der Männchen dadurch belegten, dass ihr Anteil mit 77,8% weit den weiblichen übertraf (vgl. Abb. 3.8a-c). Es zeigte sich aber gleichzeitig bei den zweijährigen Beprobungen der Wirtspflanze *U. dioica*, dass gerade der weibliche Anteil mit 62% bei den Lebendfängen den männlichen Anteil übertraf (vgl. Tab. 3.10: Pfalz). Worauf sich letztendlich diese größere Fangzahl begründet, muss der Gegenstand weitere Forschungen sein, zumal RIOLO *et al.* (2007) in Italien entgegengesetzte Beobachtungen machten. Während ihre Fangzahl bei Lebendfängen von *U. dioica* annäherungsweise ausgeglichen erscheint (51,9% Weibchen zu 48,1% Männchen), stieg der Anteil weiblicher Imagines bei Beprobung von *C. arvensis* auf 70,5%. Trotzdem belegt die sehr hohe Individuenzahl von 661 bzw. 2507 Tieren, die mittels Gelbfallen bzw. Streifnetz im Untersuchungszeitraum an der Mittelmosel an *C. arvensis* gefangen wurden, die Beurteilung einer höheren Flugaktivität der Männchen, zumindest für diesen Wirtspflanze.

4.2.2 Übertragungsversuche mit *Hyalesthes obsoletus*

Die Übertragungsversuche mit *H. obsoletus* wurden mit dem Ziel durchgeführt, die Übertragungseigenschaften des Vektors auf seine natürlichen Nahrungspflanzen und auf solche Pflanzen zu testen, die zur natürlichen Weinberg flora gehören (vgl. Tab. 3.7). Ein zusätzliches Ziel war die Überprüfung dieser Eigenschaft auf die Weinrebe und auf potentielle Begrünungspflanzen. Die Ergebnisse zeigen, dass teilweise schon eine kleine Anzahl von Testpflanzen genügte, um eine positive Übertragung feststellen zu können. Die Ergebnisse belegen bei vier der fünf zur Begrünung vorgesehenen Pflanzenarten eine Infizierung. Zur Verdrängung der Wirtspflanzen von *H. obsoletus* sind diese Pflanzenarten daher nicht geeignet, da sie das angestrebte Ziel einer Reduzierung des Reservoirs für Pathogene dahingehend gefährden könnten, indem sie selbst als Infektionsquelle des Vektors dienen könnten. Dagegen konnte dem Habichtskraut *H. pilosella* in 42 Übertragungsversuchen keine Infektion nachgewiesen werden, was positiv zu werten ist, da sie eine gute Verdrängungseigenschaft gegenüber der Ackerwinde zeigte (vgl. Tab. 3.22) und selbst an den trockenen Untersu-

Diskussion

chungsflächen im Steillagenbereich einen hohen Bodenbedeckungsgrad entwickeln kann (vgl. Tab. 3.20: Versuchsfläche BKS-1.1B). Damit stellt *H. pilosella* die ideale Versuchspflanze für weitere Untersuchungen zur Beziehung zwischen Wirt, Vektor und dem Pathogen dar. Die Übertragungsversuche zeigten weiterhin, dass *R. repens* als eine natürliche Nahrungspflanze des Vektors einerseits zwar ein geeigneter Wirt des Vektors darstellen kann, andererseits aber tatsächlich keine herausragende Bedeutung für die Epidemiologie der Schwarzholzkrankheit besitzt, da im Freiland nur langlebige Pflanzen, an denen die Larven des Vektors durch Besaugen infiziert werden können, auch als Infektionsquelle in Frage kommen. Die Übertragungsversuche und die daraus berechnete Übertragungseffizienz des Vektors zeigen, dass durch die Präferenz des Vektors für krautige Pflanzen der Infektionsdruck der Schwarzholzkrankheit auf Weinreben im Vergleich zur der in Frankreich sich ausbreitenden *Flavescence dorée* als weniger gefährlich einzustufen ist, da der Vektor nicht von Rebe zu Rebe, sondern von Wirtpflanze zur Rebe weitertragen muss.

Ein Nachteil der durchgeführten Übertragungsversuche bestand darin, dass die Anzahl gefangener Vektoren letztendlich die Testanzahl und damit auch die Aussagekraft der Ergebnisse überhaupt bestimmt, so dass die Anzahl der getesteten Pflanzenarten auf die wichtigsten beschränkt werden musste. Die Lösung dieses Problems wäre eine erfolgreiche Zucht von *H. obsoletus*. Sie garantiert eine Unabhängigkeit gegenüber den natürlichen Witterungsbedingungen und minimiert gleichzeitig die Abhängigkeit vom Fangenerfolg während der Flugphase des Vektors. Trotz nachgewiesener Eiablage der Versuchstiere konnten keine Larven beobachtet werden. Für eine erfolgreiche Zucht müssten daher zunächst einmal die Zuchtbedingungen wie die Auswahl des Bodens und seiner Textur, der Temperatur und der Bodenfeuchtigkeit evaluiert werden.

Ein weiterer Aspekt ist die Frage, wie viel Testtiere auf eine Pflanze gesetzt werden sollen. In der natürlichen Umgebung zeigten Streifnetzfänge an *U. dioica* durch Abschütteln einzelner Pflanzen eine Höchstanzahl von 18 gefangenen Tieren. Diese Fangzahl war allerdings die Ausnahme, da sonstige Überprüfungen selten mehr als 5 Tiere für eine einzelne Pflanze ergaben. Daher ist die Auswahl von ca. fünf Testtieren, die im Versuch auf eine einzelne Pflanze gesetzt wurden, eine wahrscheinlich natürliche Obergrenze. Die begrenzte Anzahl an Testtieren war schließlich auch ein Grund dafür, die Anzahl auf diese Größe zu beschränken, zumal das Habichtskraut auf der Untersuchungsfläche BKS-1B (Bernkastel-Kues) schon ab dem zweiten Jahr mit 80,3 % einen sehr hohen Bedeckungsgrad aufwies, dort aber lediglich nur noch vereinzelt Tiere gefangen werden konnten. Die Anzahl von 5 Versuchstieren pro Versuchspflanze ist bei dieser Pflanzenart damit als eine Extremzahl zu betrachten. Gleichzeitig wird allerdings durch diese Mindestanzahl von Testtieren aber auch eine hohe Absicherung für eine Übertragung des Erregers erreicht. Die Übertragungsversuche

Diskussion

zeigten, dass mit dieser Untersuchungsmethode der Erreger übertragen und nachgewiesen werden kann. Die Beurteilung gilt auch in Bezug auf den zweiten Vektor *O. alni*. Trotz der wesentlich geringeren Infektionshäufigkeit in der getesteten Population konnten durch Übertragungsversuche ebenfalls positive Ergebnisse erzielt werden. Obwohl *O. alni* als monophage Art die Schwarzerle *A. glutinosa* nutzt, zeigen die Übertragungsversuche, dass eine Übertragung des Erregers möglich ist. Abschließend lassen sich die Übertragungsversuche als eine sehr gute Möglichkeit zur experimentellen Beobachtung der Transmission beurteilen.

4.3 NACHWEIS UND IDENTIFIZIERUNG REBPATHOGENER PHYTOPLASMEN DURCH DIE PCR

Die Charakterisierung der in Deutschland vorkommenden Vergilbungskrankheiten und die Stärke ihrer Ausprägung haben mittlerweile einen deutlich epidemiologischen Aspekt. Daher gehört das Aufspüren der Erreger, ihre Unterscheidung in unterschiedlichen Isolate und die Feststellung der Infektionshäufigkeiten zum zentralen Bestandteil dieses Forschungsvorhabens. Die Untersuchungen wurden hauptsächlich durch Verwendung tierischem Materials durchgeführt, da ihre Aufbereitung sich als weniger problematisch erwies als die Extraktion bakterieller DNA aus symptomtragenden Rebstöcken. POOLER *et al.* (1997) vermuteten zwar, dass die PCR durch spezifische Inhaltsstoffe bei verschiedenen Insektentaxa gehemmt werden könnte, da unterschiedliche Primerpaare mit ähnlicher Spezifität zu einem unterschiedlichen Ergebnis führten, wie es sich beispielsweise bei den Primerpaaren fAY/rEY und fFD9/rFD9 andeutete. Trotzdem zeigte die große Anzahl eindeutig positiver Testergebnisse, dass in den meisten Fällen ein gesicherter Nachweis des Erregers im Körper von *H. obsoletus* erreicht wurde. Die PCR ist damit das herausragende Nachweismittel der Wahl. Untersuchungsflächen an der Nahe zeigten mit einer durchschnittlichen Infektionshäufigkeit von 72% im Untersuchungsjahr 2000 die höchste durchschnittliche Durchseuchung einer Population überhaupt. Auch zum Infektionsverlauf ergaben die Einzeltiertests ein eindeutiges Bild. Es stellte sich heraus, dass die Imagines einer Population schon zu Beginn der Flugzeit eine hohe Infektionshäufigkeit vorweisen, was damit frühere Untersuchungen bestätigt, dass die Pathogene nicht erst im adulten Stadium, sondern vielmehr schon während des Larvenstadiums durch Besaugen der Wirtspflanze aufgenommen werden können. Obwohl nur eindeutige PCR-Ergebnisse als positiver Nachweis gewertet wurden, erlaubt die große Anzahl positiver Ergebnisse damit eindeutige Aussagen zur Infektionshäufigkeit treffen zu können.

Diskussion

In Rebstöcken gestaltete sich der Erregernachweis allerdings schwieriger. Die Gewebe der Weinrebe *V. vinifera* weisen einen hohen Gehalt an Polysacchariden, Polyphenolen und Phenoloxidasen. Polysaccharide können bei der DNA-Fällung zusammen mit der DNA ausfallen, so dass nach der Zentrifugation das normalerweise kleine lösliche Pellet einem schwer löslichen, gelatinen Klumpen ähnelt (LIN & WALKER, (1997); zitiert in REINERT, 1999). Andere, die PCR negativ beeinflussende Faktoren ist die Hemmung der DNA-Polymerase durch Polysaccharide (DEMEKE & ADAMS, 1992) bzw. die Änderung der räumlichen Struktur der DNA durch Phenoloxidasen (NEWBURRY & POSSINGHAM, 1977). Untersuchungen von MAIXNER *et al.* (1997) zeigten dabei eine Diskrepanz zwischen der sichtbaren Symptomausprägung und dem PCR-Nachweis des Erregers. Diese Erkenntnisse und das Bestreben, die Infektionshäufigkeit in den verschiedenen Vektorpopulationen festzustellen, führten dazu, den Vektor in den Mittelpunkt des Erregernachweises zu stellen.

Das gruppenspezifische Primerpaar fSTOL/rSTOL erwies zum Nachweis des Stolbur-Phytoplasmas, zu dem die Erreger der Schwarzholzkrankheit gehören, in der Regel als geeignet. Das gleiche gilt für die Überprüfung von Phytoplasmen, die der Elm-Yellows-Gruppe (EY-Gruppe) zugerechnet werden und mit dem Primerpaar fAY/rEY amplifiziert wurden. Auf den Einsatz des breit detektierenden Primerpaars P1/P7 wurde daher weitgehend verzichtet. Der Einsatz dieses Primerpaares, das den für die Klassifizierung von Phytoplasmen ausschlaggebenden ribosomalen Bereich amplifiziert, wäre nur dann sinnvoll gewesen, wenn ein grundlegender Nachweis eines Phytoplasmas das Ziel der Analyse gewesen wäre. Da aber mittlerweile die räumliche Verbreitung der VK bzw. der FD-Pfalz und deren Vektoren bekannt sind, wurde dieses Primerpaar bei anderen Zikadenarten teilweise noch eingesetzt, während bei *H. obsoletus* und *O. alni* überwiegend der Nachweis durch den Einsatz gruppenspezifischer ribosomaler Primer durchgeführt wurde. Die von REINERT (1999) evaluierten Detektionsmethoden ergaben eine ausreichend sensitive Basis sowohl zum gruppenspezifischen Nachweis als auch zur RFLP-Analyse erhaltener DNA-Fragmente. Die Aufklärung der verschiedenen VK-Isolate durch eine Amplifikation mit dem Primer STOL 4 und einer anschließenden Restriktionsanalyse durch das Enzym *DRA I* bestätigte frühere Beobachtungen der regionalen Abgrenzung beider Stolbur-Typen *VK-A* und *VK-B* (vgl. Abb. 3.17 A). LANGER & MAIXNER (2004) konnten in nachfolgenden Untersuchungen zeigen, dass der Stolbur-Typ *VK-A*, der mittlerweile als *VK-Typ I* bezeichnet wird, in Deutschland mittlerweile in vielen deutschen Weinbauregionen vorkommt. Die Aufnahme des Isolats geschieht durch Besaugen von *U. dioica*. Ihre Untersuchungen bestätigten gleichfalls, dass der Stolbur-Typ *VK-B*, mittlerweile umbenannt in *VK-Typ II*, immer noch das am meisten verbreitete Isolat darstellt. Dieses Isolat ist vor allem in *C.*

Diskussion

arvensis nachzuweisen. Die Feststellung von *C. sepium* als wichtiger Wirt von *H. obsoletus* offenbarte sogar ein bisher unbekanntes Isolat, nämlich den *VK-Typ III*, der mit dem Primer tufAY und der anschließenden RFLP-Analyse mit *HpaII* verifiziert wurde. Dieser Typ konnte im Vektor, in der Weinrebe und in *C. sepium* detektiert werden (vgl. LANGER, M. & MAIXNER, M., 2004). Diese Ergebnisse werden von RIOLO *et al.* (2007) ebenfalls bestätigt. Sie konnten den *VK-Typ II* ebenfalls nur in *C. arvensis* nachweisen, während der *VK-Typ I* ausschließlich in *U. dioica* nachgewiesen werden konnte.

Auch die RFLP-Analyse von Phytoplasmen-DNA der EY-Gruppe, für die das gruppenspezifische Primerpaar FD9 verwendet und dessen DNA-Fragment anschließend mit dem Restriktionsenzym *Tru I* verdaut wurde, offenbarte die erwarteten Isolate der FD-Pfalz in die Typen A (*PGY-A*), B (*PGY-B*) und C (*PGY-C*) (vgl. Abb. 3.17 B). Obwohl bei den meisten Proben die Detektion der Phytoplasmen-DNA eindeutig war, traten auch solche Fälle auf, die durch ein schwaches Bandenmuster schwierig zu beurteilen waren. Um der Gefahr vorzubeugen, dass uneindeutige Ergebnisse bzw. Fehlamplifikationen als positives Testergebnis gewertet wurden, wurde ein solches Ergebnis entweder als negativ bewertet, da die nachzuweisende Infektionshäufigkeit nicht eine Ober-, sondern eine Mindestgrenze darstellen sollte oder aber die PCR wurde wiederholt. Zusammenfassend zeigen allerdings die Ergebnisse der PCR- und RFLP-Analysen, dass sich diese Nachweismethoden zur Identifikation des Schwarzholz- bzw. FD-Phytoplasmas sowie ihrer weiteren Differenzierung bewährt haben und die herausgefundenen Ergebnisse in das von SEEMÜLLER *et al.* (1998) entwickelte System eingeordnet werden konnten. Für das Befallsmonitoring in Deutschland bedeuten diese Ergebnisse, dass mit zwei gruppenspezifischen Primern alle derzeit auftretenden reopathogenen Phytoplasmen detektiert werden können.

4.3.1 Detektion des Schwarzholzphytoplasmas in *Hyalesthes obsoletus*

Die Standortfaktoren zur Feststellung der Infektionshäufigkeit waren ideal, da starke Populationen im Untersuchungszeitraum trotz teilweiser Einbrüche der Fangzahlen im letzten Untersuchungsjahr zur Verfügung standen. Die hohen Nachweiszahlen für den Erreger bestätigten die PCR als Nachweismethode erster Wahl. Die besonders hohe Zahl von Einzeltiertests ergab ein sehr genaues Bild zur Infektionshäufigkeit, vor allem für solche Populationen, die aufgrund ihrer Lage in den Hauptbefallsregionen von besonderem Interesse waren (vgl. Tab. 3.11).

Phytoplasma-Nachweis in *Hyalesthes obsoletus* durch Einzeltiertests

Auf der Grundlage von Einzeltiertests von lebendgefangenen Tieren wurde im ersten Versuchsjahr mit 81,4% (vgl. Tab. 3.11: BKS-1.1A) die höchste Infektionshäufigkeit während des Forschungs-

Diskussion

projektes festgestellt. Die Testbedingungen nach der u.a. von REINERT (1999) evaluierten Methode waren sehr geeignet, dieses Phytoplasma zu detektieren. Unterschiede im Testergebnis ergaben sich allerdings beim Vergleich zwischen lebendgefangenen Tieren und denjenigen, die mit einer Gelbfalle gefangen wurden. Es zeigte sich nämlich, dass der Nachweis des Phytoplasmas bei lebendgefangenen Tieren sensitiver war, was sich in einem höheren Prozentsatz positiver Proben manifestierte (vgl. Abb. 3.12). Der Grund könnte darin liegen, dass Tiere, die zu Beginn der Expositionszeit einer Falle gefangen wurden, in der nachfolgenden Zeit schädigenden Witterungsbedingungen ausgesetzt waren, da die Aushangzeit der einzelnen Gelbfallen in Abhängigkeit der Entfernung der Untersuchungsfläche zwischen einer und zwei Wochen betrug. Ebenso kann die Entnahme der Tierproben von den Gelbfallen zu einer Beschädigung des Exemplars führen. Trotzdem ergab ein Vergleich beider Fangmethoden, dass die Prozentzahlen positiv getesteter Tiere sich vergleichbar den Testergebnissen der lebendgefangenen Tiere verhielt.

Die Erwartung wurde bestätigt, dass in den Hauptverbreitungsgebieten der Schwarzholzkrankheit tatsächlich auch die größten Durchseuchungsgrade in den Populationen festgestellt werden konnten (vgl. Abb. 3.13), auch wenn einzelne Nachbarflächen der Populationen teilweise einen nur geringen Befallsgrad der Rebflächen aufwiesen (vgl. Tab. 3.16: BKS-1.2). Die PCR-Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Infektionshäufigkeit schon zu Beginn der Flugphase sehr hoch ist (vgl. Abb. 3.15). Damit ergibt sich folgendes Bild: Während die Imagines, insbesondere die flugaktiveren Männchen (vgl. Tab. 3.2), für die Verbreitung des Erregers sorgen, sind es die Larven, die das Phytoplasma aufnehmen. Die Möglichkeit, dass *H. obsoletus* auch während seiner kurzlebigen Imaginalphase sich als gesundes Tier infiziert und im Anschluss als Vektor fungiert, kann zwar nach diesen Ergebnissen nicht vollständig ausgeschlossen werden, aber die vom Pathogen benötigte Latenzzeit von ca. 4 Wochen, wie sie von anderen Phytoplasmavektoren her bekannt ist, übersteigt die bei den Transmissionsversuchen festgestellte Überlebensdauer der Imagines. Diese Schlussfolgerung stellt damit keinen Widerspruch zu den von LESSIO *et al.* (2007) gemachten Untersuchungen dar, die bei Larven von *H. obsoletus* eine allgemeine Infektionshäufigkeit zwischen 6-8%, bei Imagines aber eine allgemeine Infektionshäufigkeit von 9-50% detektierten. In einem der beiden Untersuchungsgebiete stellten sie gleichfalls zu Beginn der Flugphase die höchste Infektionshäufigkeit fest. Interessant wäre es festzustellen, ob ein signifikanter Unterschied in der Infektionshäufigkeit zwischen Larven und Imagines derselben Population existiert. Dafür wäre es notwendig, Imagines durch einen täglichen Fang von ihren Nahrungspflanzen abzusammeln und möglichst direkt auf eine Infektion hin zu untersuchen bzw. die Proben einzufrieren.

Diskussion

Phytoplasma-Nachweis in *Hyalesthes obsoletus* durch Gruppentests (Batch-Tests)

Die Gruppentests wurden mit dem Ziel durchgeführt, zunächst die Ergebnisse der Einzeltier-tests zu reproduzieren und für zukünftige Untersuchungen eine arbeits- und kostengünstigere Methode zu entwickeln. Es zeigte sich allerdings, dass Vorinformationen über die zu erwartende Infektionshäufigkeit dafür wichtig sind: Bei Populationen mit einer hohen Infektionshäufigkeit ergaben alle Testgruppen ab einer bestimmten Gruppengröße (10 Tiere) ein zu 100% positives Ergebnis. (vgl. Tab. 3.14: BOPP-6 und MONZ-1.1). Das bedeutet einerseits, dass ohne eine vorliegende Information über die Infektionshäufigkeit verschieden große Testgruppen gebildet werden müssen. Andererseits können große Testgruppen einen positiven Nachweis für Populationen erbringen, die nur eine sehr eringe Infektionshäufigkeit aufweisen (vgl. Tab. 3.14: UNG-1.1). Beim Vergleich der Einzeltier-tests zeigen die Ergebnisse der Gruppentests starke Abweichungen. Ein Grund dafür könnte sein, dass aufgrund der hier ebenfalls begrenzten Versuchstierzahl die Anzahl verschiedener Gruppengrößen zu gering war, als dass ein genaueres Austarieren möglich war. Die Berechnung des IR („Infection Rate“) zeigte immerhin für Gruppengrößen zwischen 2-5 Tieren bei hochinfizierten Populationen eine, den Ergebnissen der Einzeltier-tests vergleichbaren Größenordnung. Die von Bhattacharyya *et al.* (1979) aufgestellte These, dass eine Berechnung der Infektionshäufigkeit anhand der „*Minimum Field Infection Rate* (MFIR)“, die im Gegensatz zur „*Infection Rate*“ die Anzahl negativ getesteter Gruppen in die Rechnung integriert, die tatsächliche Infektionshäufigkeit bei hochinfizierten Populationen stark unterschätzt, konnte anhand der Ergebnisse bestätigt werden (vgl. Tab. 3.14: MFIR bzw. IR). Abschließend kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Batch-Tests für einen Nachweis des Erregers im Vergleich zu den Einzeltier-test tatsächlich eine Alternative darstellen. Zur genauen Erfassung einer Infektionshäufigkeit innerhalb einer Population von *H. obsoletus* sind die Ergebnisse allerdings zu ungenau.

4.3.2 Differenzierung verschiedener Phytoplasma-Isolate

Die PCR eignete sich auch, die verschiedenen Isolate der Schwarzholzkrankheit nachzuweisen (vgl. Abb. 3.17). Die Einzeltier-tests zeigten auch in dieser Untersuchung ihre Eignung, zumal gezielt nach selteneren bzw. neuen Erregertypen gesucht wurde. So konnte immerhin in einem einzigen Exemplar von *H. obsoletus* aus der Pfalz (UNG-1) der sonst in anderen Weinanbaugebieten vorherrschende Typus VK Typ-B nachgewiesen werden. Ebenso konnte mit dem Typus D in einer Rebe aus Franken ein neues Isolat der FD-Pfalz detektiert werden. In dem Vektor *O. alni* und in untersuchten Reben konnten die bisher bekannten FD-Pfalz Isolate A, B, und C nachgewiesen werden. Es zeigte sich dabei, dass die Sensibilität der PCR zur dieser Differenzierung geeignet ist. Die Untersuchungen entsprachen der Erwartung, dass die Schwarzholzkrankheit von Typ VK-B (VK-

Diskussion

Typ II) der vorherrschende Typus von Vergilbungskrankheiten in Deutschland ist. Neuere Untersuchungen belegen aber mittlerweile auch für das Isolat VK-A (VK-Typ I) eine zunehmende Etablierung. So zeigten fortgeführte „Untersuchungen zum Auftreten der Schwarzholzkrankheit in Reben“ eine bis zu 50 Prozent hohe Infektionshäufigkeit mit dem VK-A Isolat der Vektoren (MINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LÄNDLICHER RAUM BADEN WÜRTTEMBERG, 2008).

4.3.3 Untersuchung anderer Zikadenarten

O. alni ist in Deutschland bisher der einzige Vektor der FD-Pfalz und konnte auf Gelbfällen in den von der FD-Pfalz befallenen Weinbergsarealen gefangen werden. Trotz der gezielten Suche ist kein starker Befall durch die FD-Pfalz in der Pfalz aufgetreten. Der Grund ist wahrscheinlich in der Lebensweise des Vektors zu finden, da diese Zikadenart monophag die Schwarzerle *Alnus glutinosa* als Wirts- und Nahrungspflanze nutzt (OSSIANILSON, 1981). LEDERER & SEEMÜLLER (1991) prognostizierten anhand ihrer Untersuchungen, dass fast alle Erlen in Deutschland ab dem fünften Jahr als phytoplasmainfiziert gelten können. Trotzdem ist die epidemiologische Situation der FD-Pfalz in Deutschland unbedeutend, da symptomatische Rebstöcke nur in der Nähe von *A. glutinosa* detektiert werden konnten. *O. alni* besitzt zwar die Fähigkeit, die Erreger auch auf die Weinrebe zu übertragen, doch scheint er durch seine enge Wirtsbindung in der Natur ein ineffizienter Überträger zu sein, was durch die geringe Befallshäufigkeit der Rebflächen belegt wird. Der Vektor kann offenbar die Weinreben nicht zur Nahrungsaufnahme nutzen, denn die im Labor gehaltenen Versuchstiere starben nach spätestens 48 Stunden, obwohl kurz nach dem Aufsetzen auf die Weinrebe eine Punktierung (Anstechen der Blattader) stattfand. Damit ist die Beobachtung zu erklären, dass diese Krankheit nur in solchen Rebanlagen auftritt, in deren Nähe sich Gewässer mit Erlenbeständen befinden. Solange kein Vektor mit einer größeren Übertragungseffizienz auftritt, sind das Infektionsrisiko und die zu erwartenden Befallshäufigkeiten sehr gering, so dass keine wirtschaftlichen Schäden durch diese Krankheit zu erwarten sind. Allerdings zeigt der Verlauf der *Flavescence dorée* in Frankreich, dass sich die Situation durch Einschleppung eines eng an die Weinrebe gebundenen Vektors jedoch dramatisch verändern kann. Ein weiterer Grund könnte in der geringen Überlebenszeit von *O. alni* auf Reben liegen, so dass damit auch eine verkürzte Besaugungsphase in Verbindung mit einer damit geringeren Vektoreffizienz auftritt (REINERT, 1999).

In die Untersuchung wurden zusätzlich 14 weitere Zikadenarten aufgenommen, wobei nur bei *Neoliturus fenestratus*, einer Zikadenart, die in Israel als Vektor von Phytoplasmen bekannt ist, der Erreger in einem Einzeltier und einem Gruppentest gesichert nachgewiesen werden konnte. Obwohl diese Zikade auf Rebflächen in einer sehr hohen Anzahl vorkommt, zeigen die Ergebnisse, dass sie

Diskussion

zur Verbreitung der Schwarzholzkrankheit nicht in Betracht kommt. *H. obsoletus* nimmt damit gegenwärtig eine herausragende Stellung als Vektor in den deutschen Weinanbaugebieten ein.

4.4 UNTERSUCHUNGEN ZUM INFEKTIONSDRUCK VON *HYALESTHES OBSOLETUS*

Zur Erfassung des Infektionsdrucks dieser Zikade mussten zunächst die Kriterien erfasst werden, die es erlauben, einen Infektionsdruck beschreiben und qualitativ beurteilen zu können. Dazu gehörte zunächst einmal die Auswahl geeigneter Standorte zur Erfassung der Migrationsaktivität des Vektors. Sie wurde durch Streifnetz- bzw. Gelbfallenfänge charakterisiert. Die Erfassung des Bedeckungsgrades der Wirts- und Nahrungspflanzen von *H. obsoletus* wurde als zweites Kriterium erachtet, da nur sie ein Überleben am jeweiligen Standort ermöglichen. Ein drittes Kriterium, dass den Infektionsdruck zu beurteilen helfen soll, wurde in der Größe einer Population gesehen und bezüglich der Weitergabe der Schwarzholzkrankheit ein weiteres in der Feststellung der Infektionshäufigkeit innerhalb einer Population. Abschließend sollte auch noch die allgemeine geographische Lage der Beobachtungsfläche miteinbezogen werden.

4.4.1 Erfassung der Migrationsaktivität

Zur Erfassung der Migrationsaktivität wurden Gelbfallenstandorte in den Befallslagen eingerichtet). Die einzelnen Fallenstandorte sollten entweder eine Einwanderung von Vektoren (vgl. Tab. 3.4) oder eine Migration aus dem Populationsstandort (vgl. Tab. 3.3) in benachbarte Flächen erfassen. Diese Untersuchungen waren nach Feststellung hoher Populationsdichten im ersten Untersuchungsjahr für das darauffolgende Jahr geplant. Auf zwei der drei dazu eingerichteten Flächen, von denen eine Migration in die umliegenden Flächen erfasst werden sollte (BKS-1 und MEHR-1.1), brachen im Folgejahr die Populationen drastisch ein, so dass weniger Individuen in den angrenzenden Flächen mit den Gelbfallen gefangen werden konnten als dies geplant war. Der Einbruch dieser Populationen basiert wahrscheinlich auf den abnehmenden Anteil der Ackerwinde als Wirts- und Nahrungspflanze infolge von zunehmender Sukzession, einem Schlechtwettereinbruch während der Flugphase und starker Fangaktivitäten. Trotzdem ließ sich die Anzahl gefangener Tiere in den umliegenden Flächen zumindest als eine Tendenz zur Migration interpretieren. Die Beobachtung des dritten Gelbfallenstandortes (BKS-3.1) zeigte dagegen sehr deutlich eine Einwanderung des Vektors in eine Fläche, die im ersten Jahr vollständig frei von krautigen Pflanzen und von Vektoren war (vgl. Tab. 3.2). Eine vom Bewirtschafter durchgeführter Herbizideinsatz führte zwar während der Flugphase der Imagines zu einem Einbruch der Fangzahlen, sie belegen aber die Einwanderung des Vektors und die Neuansiedlung einer Population an jenen Standorten, die aufgrund der fehlenden

Diskussion

Vegetation eine ideale Ansiedlungsfläche für *C. arvensis* und *S. nigrum* dienen. Die Fangzahlen belegten, dass im Untersuchungszeitraum an diesen Standorten bereits eine neue Population entstanden ist. Obwohl die Fangzahlen der Gelbfallen keine Auskunft darüber zulassen, ob eine aktive Einwanderung oder eine passive Windverdriftung zu diesen Einwanderungszahlen führte, konnte zumindest eine Migration an sich festgestellt werden. Einen möglichen Hinweis auf eine stattgefunden Windverdriftung können allerdings diejenigen Imagines geben, die auf den Gelbfallen gefangen wurden, die in einer Höhe zwischen 335 und 350 cm gefangen wurden. Diese Annahme wird durch den Vergleich der Gelbfallenfanzahlen jener Standorte bestätigt, an denen sowohl in der Kraut- als auch in der Laubschicht Gelbfallen angebracht waren. Dort zeigte sich eine signifikante Bewegungszone des Vektors in der bodennahen Krautschicht (vgl. Tab. 3.2 und 3.4 bzw. Abb. 3.7).

Ähnlich der Untersuchungsfläche BKS-3.1 waren die Untersuchungsflächen in Boppard am Mittelrhein angelegt (vgl. Tab. 3.3: BOPP-1 bis 6). Es zeigte sich auch dort, dass in den durch Herbizid freigehaltenen Ertragsreblflächen BOPP-1 bis 5 nicht nur ein sehr starker Durchseuchungsgrad auftrat, sondern dass dieser Befall schon jahrelang anhält, so dass es sich dabei auch um kontinuierliche Neuinfektionen handeln muss, die vermutlich durch Migrationsaktivitäten des Vektors aus der Untersuchungsfläche BOPP-6 ausgelöst wurden, auf der ebenfalls ein hohe Infektionshäufigkeit innerhalb der Population ausgemacht werden konnte. Diese Flächen belegen damit eine Migration unter gleichzeitiger Verbreitung der Infektion von *H. obsoletus*. Hier zeigte sich zudem, dass die hohe Infektionshäufigkeit dieser Population sich auch in der Befallshäufigkeit der angrenzenden Reblflächen niederschlägt. Während diese Versuchsflächen speziell zur Untersuchung der Migrationsaktivität von *H. obsoletus* eingerichtet wurden, zeigte auch die Auswertung von Gelbfallen anderer Versuchsflächen, dass nur selten höhere Fangzahlen mittels Gelbfallen erreicht werden konnten. Die Migrationsaktivität von *H. obsoletus* ist daher in Bezugnahme auf die Fangzahlen, die durch Lebendfänge an Populationsstandorten erreicht wurden, als gering anzusehen, aber die hochinfizierten Untersuchungsflächen an der Mittelmosel und am Mittelrhein zeigen auch, dass die Gelbfallenfänge eine kontinuierliche Migrationsaktivität von *H. obsoletus* belegen, der sich dadurch als ein überaus erfolgreicher Vektor der Schwarzholzkrankheit erweist.

Die Migration von *H. obsoletus* zeigte auf den meisten Flächen ein uneinheitliches Bild. Es konnten entweder weit voneinander entfernte vergilbungskranke Rebstöcke oder aber, und das trifft für stark durchseuchte Reblflächen zu, kaum voneinander abzugrenzende Agglomerationen kranker Rebstöcke detektiert werden. Eine kontinuierliche Abnahme symptomtragender Pflanzen mit zunehmender Entfernung vom Populationsstandort konnte nur im Ansatz auf der Fläche UNG-1 (vgl. Abb. 3.20) beobachtet werden. Die Streuung der Aggregationen bzw. einzelner erkrankter Reben über der Ge-

Diskussion

samtfläche lässt eher vermuten, dass entweder eine, im Sinne eines Hintergrundrauschens aus mehreren Richtungen erfolgende Migrationsaktivität von *H. obsoletus* als Grund für dieses Schadbild verantwortlich sein könnte, oder die Streuung der beobachteten Cluster aber mit der Verteilung der Wirtspflanzen und Infektionsquellen zusammenhängen könnte, vor allem dann, wenn sich die Wirtspflanzen in der beobachteten Rebfläche selbst befinden. BRESSAN *et al.* (2007) konnte die Abnahme symptomtragender Rebstöcke in Abhängigkeit der Entfernung nachweisen. Es gelang auch gleichzeitig, die Abnahme der Individuenzahlen von *H. obsoletus* mit zunehmender Entfernung festzustellen. Innerhalb eines Radius von 12m reduzierte sich ihre Anzahl auf ein Drittel.

Trotz der festgestellten Migration von *H. obsoletus* spiegeln die festgestellten Befallsgrade keinen kontinuierlich starken Infektionsdruck wieder. Wie im Kapitel 3.5.2 aufgeführt, zeigen vor allem Untersuchungsflächen an der Mittelmosel, am Mittelrhein (vgl. Abb. 3.21) und an der Nahe (MONZ-1) hohe Befallswerte. Diese Ergebnisse sprechen zunächst einmal für einen starken Infektionsdruck infolge einer Migration des Vektors. Andererseits zeigen in denselben Regionen andere Untersuchungsflächen genau das gegenteilige Bild. Es konnte beobachtet werden, dass bestimmte Untersuchungsflächen, in deren Nachbarschaft hochinfizierte und gleichzeitig zahlenstarke Populationen vorkommen (BKS-1; MEH-1), einen nur sehr geringen Durchseuchungsgrad der Rebstöcke aufweisen (vgl. Abb. 3.23a und Tab. 3.17). Zudem wurde eine unterschiedlich ausgerichtete Migrationsaktivität von *H. obsoletus* und ein sich daraus ergebender unterschiedlicher Infektionsdruck auf benachbarte Flächen auf den Untersuchungsflächen NEU-1A/B (vgl. Abb. 3.22) festgestellt. Eine Migration aufgrund eines eventuellen Mangels an Wirts- und Nahrungspflanzen konnte aufgrund des hohen Bedeckungsgrades der Ackerwinde für diesen Populationsstandort ausgeschlossen werden. Eventuell könnten mikroklimatische Faktoren wie der Windrichtung in Bodennähe bzw. die Stärke der Sonneneinstrahlung am Boden, was zu einer unterschiedlichen Bodenerwärmung führen könnte, eine Rolle spielen.

Es muss daraus der Schluss gezogen werden, dass sich eine Migrationsaktivität von *H. obsoletus* und ein sich daraus ergebender Infektionsdruck auf benachbarte Flächen entwickeln kann, gleichwohl aber nicht unbedingt zwangsläufig ist. Eine Migration aufgrund eines Mangels an Wirts- und Nahrungspflanzen könnte hauptsächlich für solche Populationsstandorte in Betracht gezogen werden, deren Wirtspflanzenvorkommen durch Kulturmaßnahmen reduziert bzw. vernichtet wurde.

4.4.2 Erfassung des Bedeckungsgrades der Ackerwinde *Convolvulus arvensis*

Die Erfassung des Bedeckungsgrades der Ackerwinde ist auch im Zusammenhang mit der Entwicklung geeigneter Bekämpfungsmaßnahmen gegen die Schwarzholzkrankheit zu sehen. Die Methode,

Diskussion

bei der in regelmäßigen Abständen Messpunkte aufgestellt werden, lohnt sich einer differenzierteren Betrachtung. Auf Flächen, in denen die Winde gleichmäßig verteilt ist, kann der Bedeckungsgrad den Bewuchs auf der Gesamtfläche ausdrücken (vgl. Tab. 3.19). Ein Problem tritt dann auf, wenn Aggregationen der Ackerwinde an einzelnen Standorten in der Fläche gehäuft auftauchen, die mit gleichmäßig über der Gesamtfläche verteilten Messpunkten nicht in ihrem tatsächlichen Umfang zu erfassen ist (vgl. Tab. 3.19: Klasse 5 – BKS-3.1). Die Folge ist, dass für solche Flächen ein wesentlich geringerer Bedeckungsgrad errechnet wird als er tatsächlich ist. Ein Raster mit gleichmäßig verteilten Messpunkten erfasst dabei in großen Umfang noch windenfreie Areale. Als ein typisches Beispiel solcher Aggregationen konnte schon im zweiten Jahr auf der größten Untersuchungsfläche BKS-3.1 beobachtet werden, an denen durch Lebendfänge auch der Vektor in zunehmender Zahl nachgewiesen werden konnte. In einer solchen Anlage wäre daher ein differenziertes Vorgehen sinnvoll. Nachdem der Bedeckungsgrad für die Gesamtfläche erfasst wurde, könnte der Teil, in dem sich schon Aggregationen herausgebildet haben, nochmals gesondert ein Bedeckungsgrad erfasst werden. Gerade solche Rasen, die ihren Ursprung in den Aggregationen haben, können als ideale Grundlage für starke Populationen dienen, wie dies bereits am Untersuchungsstandort Boppard (vgl. Tab. 3.19: Klasse 5 – BOPP-6) festgestellt werden konnte. Der separat gemessene Bedeckungsgrad weist damit auf das tatsächliche Gefährdungspotential hin, das von solchen Arealen ausgeht.

Es konnte festgestellt werden, dass sich durch eine Verminderung des Bedeckungsgrades sowohl die Populationsdichte reduziert, was wahrscheinlich mit dem zu Verfügung stehenden Nahrungsangebot in Verbindung gebracht werden könnte, als auch die Infektionshäufigkeit (vgl. Abb. 3.24). Sollte der Grund der Abnahme des Bedeckungsgrades in der Zunahme der Sukzession zu finden sein, dann könnte eine Erklärung dafür sein, dass die infizierte Ackerwinde, deren äußere Symptomatik sich in einer Zwergwüchsigkeit äußert, schneller von konkurrierenden Pflanzen überwuchert werden könnte als gesunde Pflanzen, so dass die infizierten Bestände der Ackerwinde damit schneller reduziert werden könnten als die gesunden. Ein weiterer Aspekt sei an dieser Stelle noch erwähnenswert. Zur gezielten Suche nach *H. obsoletus* fielen zunächst großflächige Ansammlungen der Ackerwinde auf. Es zeigte sich aber auch, dass an solchen Stellen, an denen nur einzelne Pflanzen wachsen, ebenfalls Tiere gefangen werden konnten. Als Beispiel sei an dieser Stelle der Standort Norheim an der Nahe (NOR-1) erwähnt. Dort konnte sich auf einer Rebfläche, die durch einen Herbizideinsatz ihres natürlichen Bewuchses beraubt war, im Unterstockbereich von Rebstöcken weit verstreute Areale mit der Ackerwinde ansiedeln, an denen alle dort vorkommenden Vektoren gefangen wurden. Das bedeutet, dass sich zwar durch Verminderung des Bedeckungsgrades auch

Diskussion

der Infektionsdruck vermindert, andererseits können solche Areale immer wieder die Basis für eine Ausbreitung sein.

4.4.3 Bekämpfung von *Convolvulus arvensis*

In den starken Befallslagen, vornehmlich im Steilhangbereich, deren Brachflächen lange Zeit in einem niedrig bewachsenen Zustand verharren und daher für die Ansiedlung der Ackerwinde besonders günstig sind, wurden Bodenbewirtschaftungsmaßnahmen zur Verdrängung der Ackerwinde durchgeführt (vgl. Tab. 3.20). Das Ziel war es, geschlossene Pflanzendecken zu erhalten, um damit entweder die Ackerwinde zu verdrängen oder aber ihre Ansiedlung zu erschweren bzw. zu verhindern. Eine äußerst erfolgreiche Verdrängung zeigte *Hieracium pilosella* durch die schnelle Bildung geschlossener Pflanzendecken. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sie erst einmal im Gewächshaus vorgezogen muss, damit sie gerade in trockenen Steilhangbereichen anwachsen kann. Zudem zeigt sie auf Flächen, die mechanisch bearbeitet oder mit Herbizid behandelt werden, nur wenige Stellen, wo sie überdauern kann. Auch die für den sonnigen Steilhangbereich getesteten Mulchmischungen bzw. Gräser können geschlossenen Pflanzendecken bilden, insofern genügend Wasser zur Verfügung steht. Der Vorteil gegenüber *H. pilosella* ist, dass die Pflanzen nicht vorgezogen werden müssen, sondern im Frühjahr ausgesät werden können. Allerdings muss nicht in jedem Fall eine neuentstandene Brachfläche begrünt werden, denn Gräser, die vom Randzonenbereich einwandern, können die natürliche Sukzession beschleunigen. Daher wäre eine Alternative zur Sofort-Begrünung, dass im ersten Jahr nach dem Entstehen der Brache die natürliche Sukzession beurteilt wird. Eine schnellstmögliche Begrünung wäre allerdings für solche Flächen anzuraten, deren zu erwartender Bewuchs aufgrund einer hohen Strahlungsintensität der Sonne und daraus folgenden hohen Temperaturwerten und einer trockenen Lage aufgrund einer steinigten Bodenstruktur als gering zu bewerten ist.

Im Gegensatz zu diesem meist einmaligen Aufwand einer Bekämpfung durch Begrünung garantiert dagegen nur ein jährlich durchzuführender, kosten- und arbeitsintensiver *Herbizideinsatz* eine wirkungsvolle Reduzierung der *Ackerwinde*, allerdings nur, wenn dieser zum richtigen Zeitpunkt erfolgt (vgl. Tab. 3.19: Klasse 4 – Untersuchungsflächen NK-1 und Zelt-1). Sollte die Entscheidung des Winzers für einen Herbizideinsatz fallen, so wäre der ideale Zeitpunkt dafür zwischen dem Abklingen der Flugphase von *H. obsoletus* (ca. 30. Woche) und der Blütenphase von *C. arvensis* (Mai bis Oktober), um die Hauptblütezeit und damit die Samenentstehung zu verhindern. Ein zu einem früheren Zeitpunkt angelegter Herbizideinsatz hätte ein Ausweichen der Tiere auf Alternativpflanzen und somit auch auf die Weinrebe zur Folge. Abzuraten ist aber auf jeden Fall ein unregelmäßi-

Diskussion

ger Herbizideinsatz: Der Konkurrenz beraubt, gelingt es der Ackerwinde sehr schnell, großflächige und dichte Ansammlungen zu bilden.

4.4.4 Bewertung des Infektionsdrucks durch den Vektor *Hyalesthes obsoletus* und die Feststellung des Befallsgrades von Rebflächen

Das Schadbild, das der Vektor vor allem beim Zug durch die Anbauregionen der Mittelmosel und des Mittelrheins hinterlässt, zeigt das Bild einer mittlerweile gut etablierten Tierart. Die Abbildung 3.21 zeigt das Schema eines Schadbildes von Rebflächen am Mittelrhein, die sich in einer der am stärksten von der Schwarzhholzkrankheit betroffenen Regionen befinden. Es konnte festgestellt werden, dass sich in den am stärksten betroffenen Regionen auch die Populationen mit der höchsten Infektionshäufigkeit etabliert haben. Die zur Erfassung des Infektionsdrucks notwendigen Kriterien konnten durch die Untersuchungen von Populationsdichte, Migrationsaktivität, Infektionshäufigkeit innerhalb einzelner Populationen und Bedeckungsgrad der Ackerwinde *C. arvensis*, der wichtigsten Wirts- und Nahrungspflanze des Vektors weitgehend erforscht werden und erlauben konkrete Aussagen über die Qualität des Infektionsdrucks von *H. obsoletus* zu. Es konnte gezeigt werden, dass die Höhe des Bedeckungsgrads letztendlich auch die Populationsdichte und die Infektionshäufigkeit bedingt. Die Dichte einer Population und der Grad ihrer Durchseuchung sind aber die Faktoren, die auch die Stärke eines Befalls bedingen. Nur dort, wo hohe Populationsdichten und hohe Infektionshäufigkeiten zusammentreffen, zeigen sich die stärksten Befallsgrade. Es wurde gezeigt, dass eine Möglichkeit zur Bekämpfung der Schwarzhholzkrankheit darin liegt, ihre Wirts- und Nahrungspflanzen durch eine künstliche Begrünung zurückzudrängen und sie damit dem Vektor als Lebendgrundlage zu entziehen.

Trotz dieser Aufklärung blieben eine wichtige Fragen zunächst unbeantwortet. Eine wichtige Grundfrage zur Beurteilung einer epidemiologischen Verbreitung einer Krankheit ist die, ob eine Bewegung des Vektors von einer Pflanze auf die zweite Pflanze stattfindet. (FERRIS & BERGER, 1993). Bisher ist dieser Zyklus bei *Scaphoideus titanus*, dem Vektor der FD in Frankreich bekannt. Feldbeobachtungen von *H. obsoletus* scheiterten daran, dass der Vektor an Weinreben zu schwer aufzufinden war. Laborbeobachtungen zeigten allerdings, dass die meisten Tiere so lange auf der Pflanze wanderten, bis sie eine geeignete Stelle zum Besaugen gefunden hatten. Diese Frage ist deshalb von größtem Interesse, da im Falle einer Bewegung von „Rebe zu Rebe“ auch eine kleine Anzahl von Tieren ausreichend wäre, starke Befallsgradienten in die Rebflächen zu implizieren. Die höchsten Befallsdichten am Mittelrhein könnten diese Überlegung zunächst einmal stützen. Da keine direkten Feldbeobachtungen des Vektors vorliegen, muss die Lösung dieser Frage indirekt aus den Beobachtungsdaten abgeleitet werden. Im Falle einer Bewegung von Rebstock zu Rebstock

Diskussion

müssten in schwach befallenen Rebflächen kleine Agglomerationen symptomatischer Pflanzen zu erkennen sein bzw. zumindest zusammenhängende „Spuren“ infolge der Vektorbewegung. Diese Agglomerationen sind aber nicht festgestellt worden. Natürlich wurden in stark befallenen Rebfläche zahlreiche Ballungen symptomtragender Rebstöcke gefunden, die sich wesentlich wahrscheinlicher durch den enormen Befallsgrad bzw. durch vorhandene Wirtspflanzen erklären lassen. Agglomerationen auf schwach durchseuchten Rebflächen waren nur dort vorhanden, wo sich gleichzeitig ein Populationsstandort in unmittelbarer Nähe befand (vgl. Abb. 3.20). Aufgrund dieses Aspektes lässt sich eine Bewegung von „Rebe zu Rebe“ als Regelfall ausschließen. Diese Schlussfolgerung beantwortet damit auch eine zweite wichtige Frage zur Epidemiologie eines Vektors: Kann ein Vektor, nachdem er den Erreger aquiriert hat, diesen nach einer spezifischen Latenzzeit durch eine Bewegung von „Pflanze zu Pflanze“ weitergeben? Aus den Untersuchungen zum Verlauf der Infektionshäufigkeit (vgl. Abb. 3.16) konnte bestätigt werden, dass schon bereits zu Beginn der Flugphase der Imagines eine hohe Infektionshäufigkeit vorhanden ist. Damit werden frühere Untersuchungen zum Lebenszyklus von *H. obsoletus* bestätigt, bei denen festgestellt wurde, dass die Tiere sich bereits im Larvenstadium infizieren (SFORZA, 1999). Gegen diese These einer Weitergabe der Infektion spricht auch der vermutlich zu geringe Titergehalt der Pathogene zu dem Zeitpunkt der Flugphase. Kranke Pflanzen zeigen zu diesem Zeitpunkt noch keine Symptome. Es ist also mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen, dass die Imagines von *H. obsoletus* eine Bewegung von „Pflanze zu Pflanze“ vollziehen, dabei die Pathogene aufnehmen und nach der Latenzzeit andere Pflanzen infizieren.

Im Gegensatz zum Vektor sind die Symptome der Schwarzholzkrankheit bei den Rebsorten meistens gut zu erkennen. Trotzdem ist das Erscheinungsbild der Schwarzholzkrankheit sehr heterogen. Es gibt kein auffälliges, für alle Rebsorten zutreffendes Einzelsymptom, das sich durch konstantes Auftreten äußert. Zur Heterogenität trägt auch die Feststellung bei, dass nicht jede Rebsorte gleichermaßen von der Schwarzholzkrankheit betroffen ist. Die festgestellten Unterschiede in den langjährigen Beobachtungen zwischen dem „Riesling“ und dem „Spätburgunder“ offenbaren deutlich eine von der Sorte abhängige Sensibilität gegenüber der Schwarzholzkrankheit. Ob der unterschiedliche Infektionsverlauf auf eine Unterdrückung der Symptomausprägung zurückzuführen ist, der möglicherweise auf einen zu niedrigen Titergehalt des Pathogens basiert, lässt sich ebenso wenig ausschließen wie eine Genesung kranker Reben. Zu erwähnen bleibt allerdings, dass eine im Jahr zuvor erfolgte Neuinfektion nicht von einer kontinuierlichen Infektion zu unterscheiden ist. Da diese Möglichkeit allerdings beide Rebsorten betreffen kann, stellt sie kein ausschließendes Kriterium für die Beurteilung einer mehrjährigen Symptomausprägung dar.

Diskussion

Ein weiteres Problem tritt bei der Unterscheidbarkeit in der Symptomausprägung zwischen der Schwarzholzkrankheit und der FD-Pfalz auf. Es war während der Bonitur nicht möglich, beide Vergilbungskrankheiten anhand der ausgeprägten Symptome eindeutig zu unterscheiden. REINERT (1999) stellte fest, dass die Unterschiede zwischen infizierten Reben unterschiedlicher Sorten größer sind als zwischen Pflanzen der gleichen Sorte, die mit unterschiedlichen Erregern infiziert sind. Unabhängig davon bleibt die visuelle Erfassung kranker Rebstöcke die beste Möglichkeit, die Befallsstärke zu detektieren. Während des Untersuchungszeitraumes konnten die Symptome sehr gut protokolliert werden, was auch für das dritte Untersuchungsjahr gilt, obwohl die Symptomatik an der Mittelmosel schwächer ausgeprägt war. Die Sorte Riesling stellte auf den Untersuchungsflächen eine dominante, leicht zu beurteilende Rebsorte dar. Damit ist die visuelle Bonitur die ideale Ergänzung zur PCR, mit der das Pathogen nachgewiesen und klassifiziert werden kann.

Eine Frage bleibt letztendlich unbeantwortet, nämlich, worauf sich die unterschiedlich starken Befallsgradienten von nahe zusammenliegenden Rebflächen letztendlich gründen. Es könnte an einer unterschiedlich starken Genesungsfähigkeit der verschiedenen Rebsorten liegen, oder daran, dass ein zu niedriger Titergehalt eine Symptomatik verhindert. Ein weiterer Aspekt ist, dass die Unterlage, auf denen die meisten Reben gepfropft wurden, einen Einfluss haben könnten¹. Da sich der Infektionsdruck letztendlich im Befallsgrad der Rebfläche äußert, ist dieser Befallsgrad gleichzeitig auch ein Indikator einer erfolgreichen Vektor-Pathogen-Beziehung.

4.5 AUSBLICK

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass zumindest in den Befallslagen der Mittelmosel, des Mittelrheins und der Nahe Maßnahmen zur Minderung des Infektionsdrucks notwendig geworden sind. Diese Maßnahmen zur Epidemiologie müssen sich dahingehend auswirken, dass der Übertragungszyklus zuverlässig unterbrochen wird. Beispielsweise wird die Flavescence dorée in Südeuropa ausschließlich von Rebe zu Rebe übertragen, da der Vektor außer der Rebe keine Wirtspflanze besitzt. Die Bekämpfung findet daher durch den Einsatz von Insektiziden statt. Im Gegensatz dazu spricht die Lebensweise von *H. obsoletus* gegen einen Einsatz von Insektiziden. Wenn die Schwarzholzkrankheit nachhaltig bekämpft werden soll, ist das oberste Ziel daher die Minderung des Infektionsrisikos, indem vor allem seine Wirts- und Nahrungspflanzen bekämpft werden. Dadurch wird dem Vektor die Hauptwirtspflanze zur Überwinterung und die Quelle seiner Infektion entzogen.

¹ Im Rahmen dieser Auffälligkeiten wurden von der Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft entsprechende Versuchsflächen eingerichtet (Dr. Maixner)

Diskussion

Das Ziel, die Wirts- und Nahrungspflanzen von *H. obsoletus* zu bekämpfen, muss ein nachhaltiges sein. Der Einsatz von Herbiziden ist daher sehr fragwürdig, da die Flächen, sofern sie nicht anschließend begrünt werden, kontinuierlich bespritzt werden müssen und damit permanent ihrer natürlichen Pflanzengesellschaft beraubt sind. Es beginnt dadurch ein Kreislauf, der zwar einerseits die Wirtspflanzen vernichtet, andererseits keine Dauerlösung darstellt, zumal Problemzonen wie der Unterstockbereich weiterhin Wirtspflanzenstandorte darstellen können. Da die Untersuchungsergebnisse belegen, dass sich oftmals auf mit Herbizid behandelten Flächen ein hoher Bedeckungsgrad der Ackerwinde entwickelt, ist eine Dauerlösung durch Begrünung anzustreben, vor allem für Lagen in Regionen mit einem hohen Infektionsrisiko. Die Begrünungspflanzen bewirken bei gutem Wuchs eine Verdrängung der Ackerwinde durch Überwucherung bzw. dadurch, dass die Stellen zur Ansiedlung kontinuierlich vermindert werden. Aufgegebene Rebflächen sollten direkt nach der Rodung gegrubbert und mit für den Steilhang geeigneten Saatmischungen eingesät werden. Obwohl der Aufwand sehr hoch ist, kann die Ansiedlung von *H. pilosella* für solche Flächen empfohlen werden, die durch eine steinige und unebene Bodentextur charakterisiert sind.

Trotz dieser Maßnahmen bleibt in starken Befallslagen das Risiko durch die Einwanderung der Vektoren aus Flächen, an denen Standorte von Wirtspflanzen vorkommen. Nachfolgende Untersuchungen belegen zudem, dass auch *C. sepium* (vgl. LANGER, M & MAIXNER, M., 2004) und *Cardaria draba* (vgl. SFORZA et al., 2008) zum Wirtsspektrum des Vektors gehören. Aus diesem Grund ist zu empfehlen, Rodungs- und Brachflächen in ein vom Bundesland zu unterstützendes Bekämpfungskonzept zu integrieren, da die Ergebnisse einer erfolgreichen Bekämpfung von *C. arvensis* belegen, dass mit der Zurückdrängung der Wirtspflanze gleichzeitig auch die Populationsstärke und die Infektionshäufigkeit in einer Population zumindest stark verringert werden können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Untersuchungszeitraum wurden 11000 Exemplare der Zikade *Hyalesthes obsoletus*, dem Vektor der Schwarzholzkrankheit der Weinrebe, gefangen. In den Weinanbaugebieten Rheingau und Franken wurden erstmalig der Vektor und symptomatische Rebstöcke nachgewiesen.

Die höchsten Populationsdichten zeigten Populationen mit einer Spezifizierung auf *Convolvulus arvensis* bzw. auf *Urtica dioica*. Dabei wurden die höchsten Infektionshäufigkeiten (bis zu 81%) bei Populationen mit einer Spezifizierung auf *C. arvensis* festgestellt. Untersuchungen zur Migrationsaktivität ergaben eine Einwanderung des Vektors in umliegende Flächen.

Untersuchungen zur Nahrungsspezifikation ergaben Unterschiede im Beginn der Flugphase und in der Dauer der Überlebenszeit. Ein zur genauen Terminierung des Flugbeginns entwickeltes Flugprognosemodell ergab eine mit einer mittleren Differenz von 1,9 bzw. 2,1 Tagen exakte Voraussagegenauigkeit für auf *C. arvensis* spezifizierte Populationen.. Die Flugphase liegt zwischen der 23. und 30 Kalenderwoche.

Die PCR-Ergebnisse bestätigen das Vorkommen der Isolate *VK-A* und *VK-B* der Schwarzholzkrankheit. Zu den drei bekannten Isolaten der FD-Pfalz konnte ein bisher unbekanntes viertes Isolat (*FD-D*) entdeckt werden.

Die höchsten Durchseuchungsgrade zeigten Rebflächen in den Weinanbaugebieten Mosel-Saar-Ruwer, Mittelrhein und Nahe. Es traten allerdings sortenbedingte Unterschiede auf.

Eine erfolgreiche Bekämpfungsstrategie der Schwarzholzkrankheit liegt in der Verdrängung der Hauptwirtspflanzen des Vektors.

Summary

11,000 individuals of *Hyalesthes obsoletus*, the vector of the German Schwarzhholzkrankheit were caught between 1999 and 2002. Evidence of the occurrence of both the vector and symptomatic vines was provided in the Rheingau and Franken areas.

The highest population densities were found for populations with a specification for *Convolvulus arvensis* respectively *Urtica dioica*. However, populations with a specification for *C. arvensis* alone showed the highest infection, rates.

The study of migration activity provided evidence of the immigration of the vector into adjacent areas. Additional studies on food specification showed differences concerning the onset of the flight phase and survival times. A forecast model for exactly determining the flight onset was developed. For populations specified for *C. arvensis*. The mean difference in forecast accuracy amounted to 1.9 respectively 2.1 days. For these the flight phase lies between the 23rd and the 30th calendar week.

The PCR results confirm the existence of the VK-A and VK-B isolates of Schwarzhholzkrankheit. In addition to the already known isolates of the FD-Pfalz, a fourth isolate (FD-Pfalz D) could be discovered.

The highest infection rates occurred in vineyards in the Mosel-Saar-Ruwer, Mittelrhein and Nahe wine-growing areas. However, infection rates varied depending on the type of grape.

Schwarzhholzkrankheit can be successfully fought by suppressing the main host of the vector.

6. LITERATUR

- AGES (Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit): "Blondes Gold" bedroht Österreichs Weinbau. Pressemitteilung Wien, 11.12.2006.
- Ahrens, U. (1994) charaterisierung von phytopathogenen Mykoplasmen hoziger Pflanzen und Detektion der Erreger durch *in vitro*-Amplifikation von ribosomaler DNA. Diss. Univ. Heidelberg.
- Alma, A.; Arno, C.; Arzone, A. & Vidano, C. (1988): New biological data reports on Auchenorrhyncha in vineyards. In: Vidano, A. & Arzone, A. (Hrsg.): Proceedings of the 6th Achen. Meeting, Turin, Italy, 7-11 Sept. CNR-IPRA, 509-516.
- Alma, A.; Davis, R.E., Vibio, M.; Bosco, D. & Bertaccini, A. (1996): Mixed infections of grapevines in nothern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup 16SrI-B strains previously unreported inthis host plant. Plant Dis. **80**: 418-421.
- Alma, A.; Bosco, D.; Danielli, A.; Vibio, M. & Arzone, A. (1997): Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of Scaphoideus titanus Ball reared on healthy plants. Insect Molecular Biology **6**: 105-114.
- Arnaud, G.; Malembic-Mather, S; Salar, P.; Bonnet, P.; Maixner, M.; Marcone, C.; Boudon-Padieu, E. & Foissac, X. (2007) : Multilocus Sequence Typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct Flavescence Dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. Appl. Environment. Micro. **73** (12): 4001-4010.
- Battle, A.; Lavina, A.; Boudon-Padieu, E.; Larrue, J. & Annaclerio, F. (1991) : Hot-water treatment of dormant grape cuttings: It's effects on Agrobacterium tumefaciens and on cra<afting and growth of vine. Vitis **30**: 177-187.
- Belli, G.; Fortusini, A. ; Osler, R. & Amici A. (1973): Presenza di una malattia del tipo "Flavescence dorée" in vigneti dell'Oltrepò pavese. Riv. Patol. Veg., Pavia, Ser. IV, **9** (Suppl.):50-55.

Literatur

- Bertaccini, A.; Vibio, M. & Stephani, E. (1995): Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting grapevine in Liguria (Italy). *Phytopathologia Medditerranea* **34**: 137-141.
- Bhattacharyya, G. H.; Karandinos, M. G. & DeFoliart G. R. (1979): Point estimation and confidence for infection rates using pooled organisms in epidemiologic studies. *Am J Epidemiol.* **109**: 124-131.
- Bianco, P.A.; Davis, R.E.; Prince, J.P.; Lee, I.M.; Gundersen, D.E.; Fortusini, A. & Belli, G. (1993): Double and single infections by aster yellows and elm yellows MLOs in grapevines with symptoms characteristic of flavescente dorée. *Riv. Patologia Veg.* **3**: 69-82.
- Blatný, C.; Brcák, J.; Pozdena, J.; Dlabola, J.; Limberg, J. & Bojnanský, V. (1954): Die Übertragung des Stolburvirus bei Tabak und Tomaten und seine virogeographische Beziehungen. *Phytopathol. Z.* **22** : 381-416.
- Bonfils, J & Schvester, D. (1960): Les cicadelles (Homoptera, Auchenorrhyncha) dans leur rapports avec la vigne dans le sud-ouest de la France. *Ann Epiphyt* **11** : 325-336.
- Borth, W.B.; Hu, J.S.; Kirkpatrick, B.C.; Gardner, D.E. & German, T.L. (1995): Occurrence of phytoplasmas in Hawaii. *Plant Dis.* **79**: 1094-1097.
- Botti, S.; Paltrinieri, S.; Mori, N.; Milanesi, L.; Bondavalli, R. & Bertaccini, A. (2005): Variabilità Molecolare di fitplasmi 16SrXII in vigneti delle province di Modena e Reggio Emilia. Atti 3° Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmi, Milano 22-24 giugno 2005. Zitert in: Maixner, M. (2006): Grapevine yellows – Current developments and unsolved questions. Extended Abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, Südafrika, 3.-7. April 2006.
- Boudon-Padieu, E. (1996) : Jaunisses à phytoplasme de la vigne. Diagnostic, épidémiologie et développement des recherches. *C. R. Acad. Agric. Fr.* **82**: 5-20.
- Boudon-Padieu, E. (1999): Grapevine phytoplasmas. In: First Internet Conference on Phytophagogenic Mollicutes, May 24th-29th 1999. (<http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>).

Literatur

- Boudon-Padieu, E. (2003): Biologie et écologie des phytoplasmes. 14th ICVG Conference, Locorotondo, 12-17th September, 2003.
- Carle, P. (1965): Fluorescopie des symptômes histologiques de la Flavescence dorée de la vigne. Application à la détection rapide des lésions précoces sur cépage sensible (*Baco 22A*). Ann. Epiphyties **16** : numéro hors-série: 73-85.
- Caudwell, A. (1957): Deux années d'études sur la flavescence dorée, nouvelle maladie grave de la vigne. Ann. Amélioration Plantes **4** : 359-393.
- Caudwell, A. (1961) : Etude sur la maladie du bois noir de la vigne : ses rapports avec la flavescence dorée. Ann. Epiphyties **12**: 241-262.
- Caudwell, A. ; Moutous, G. ; Brun, P. ; Larrue, J. ; Ffos, A. ;Blanc, G. & Schick, J.P. (1974) : Les épidémies de flavescence dorée en Armagnac et en Corse et les nouvelles perspectives de lutte contre le vecteur par des traitements ovicides d'hiver. Bull. Techn. Inf. **25** : 783-794.
- Caudwell, A. & Kuszala, C. (1992): Mise au point d'un test ELISA sur les tissus de vignes atteintes de flavescence dorée. Res. Microbiol. **143** : 791-806.
- Cazelles, O. & Kuszala, C. (1993): Prospection des jaunisses de la vigne en Suisse romande et au Tessin et comparaison avec la flavescence dorée par le test ELISA. Revue Suisse Vitic. Arboric.Hortic. **25** : 257-259.
- Chikowski, L.N. & Sinha (1990) : Differentiation of MLO diseases by means of symptomatology and vector transmission. Zentralbl. Bakteriologie. **20**: 280-287.
- Cousin, M.T.; Darpoux, H.; Faivre-Aamiot, A. & Staron, T. (1970): Sur la présence de micro-organisme de type mycoplasme dans la parenchyme cortical de féveroles présentant des symptômes de virescence. C.R. Acad. Sci. Paris **271**: 1182-1184.
- Credi, R. (1994): Occurrence of anomalous mycoplasma-like organisms in grapevine yellow-diseased phloem. J. Phytopath. **142**: 310-316.
- Daire, X.; Boudon-Padieu, E. ; Berville, A. ; Schneider, B. & Caudwell, A. (1992) : Cloned DNA probes for detection of grapevine Flavescence dorée mycoplasma-like organisms (MLO). Ann. Appl. Biol. **121**: 95-103.

Literatur

- Daire, X. (1994): Détection et différenciation de mycoplasme-like organisms (MLO) associés aux malades de la vigne de type jaunisse. Diss. Dijon.
- Daire, X. ; Claire, D. ; Larrue, J. ; Boudon-Padieu, E. ; Alma, A. ; Arzone, A. ; Carraro, L. ; Osler, R. ; Refatti, E.; Granata, G.; Credi, R.; Tanne, E.; Pearson, R. & Caudwell, A. (1993): Occurrence of diverse MLOs in tissues of grapevine affected by grapevine yellows in different countries. *Vitis* **32**: 247-248.
- Daire, X ; Clair, D. Reinert, W. & Boudon-Padieu, E. (1997): Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of nonribosomal DNA. *Europ. J. Plant Pathol.* **103**: 507-514.
- Davis, R.E. ; Dally, E.L. ; Gunderson, D.E. ; Lee, I.M. & Habili, N. (1997): “*Candidatus* *Phytoplasma australiense*”, a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47** : 262-269.
- Davis, R.E. ; Dally, E. L.; Tanne, E. & Rumbos, I:C. (1997a): Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Israel and Greece belong to the stolbur phytoplasma subgroup, 16SrXII-A. *J. Plant Pathol.* **79**: 181-187.
- Davis, R.E.; Jomantiene, R.; Dally, E.L. & Wolf, T.K. (1998) : Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Virginia belong to group 16SrI, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrII, new subgroup I. *Vitis* **37**: 131-137.
- Deng, S. & Hiruki, C. (1991): Amplification of 16rRNA genes from culturable and nonculturable *Mollicutes*. *J. Microbiol. Meth.* **14**: 53-61.
- Demeke, T. & Adams, R.P.(1992): The effect of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Bio Techniques* **12**: 332-334.
- Deutscher Wetterdienst (2009): Klimawandel im Detail – Zahlen und Fakten zum Klima in Deutschland. Pressekonferenz am 28.04.09 in Berlin.
- Doi, Y. ; Teranaka, M. ; Yora, K & Asuyama, H. (1967) : Mycoplasma or PLT group-like organisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf,

Literatur

potato witches`broom, aster yellows or pulowina witches`broom. Ann. Phytopathol. Soc. Japan **33**: 259-261.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990): Isolation of plant DANN of fresh tissue. Focus12: 13-15.

ENTAV (Etablissement National Technique pour l`Amélioration de la Viticulture) – Groupe De Travail National – Flavescence Dorée (2006): Jaunisses a Phytoplasmaes de la vigne.

Esau, K. (1969): Pflanzenanatomie. Übersicht von B. und W. Eschrich. Stuttgart: G. yellow virus. Virology **24**: 401-413.

Ferriss, R.S. & Berger, P.H. (1993): A Stochastic Simulation Model of Epidemics of Arthropod-Vectored Plant Viruses. Ecology and Epidemiol. Vol 83 (12): S. 1269-1278.

Garau, R.; Sechi, A.; Tolu, G.; Prota, V.A.; Lentini, A. & Prota, U. (2004): Goniagnathus guttulineris (Kirschbaum), new natural host of the stolbur subgroup 16SrXII-A phytoplasma in Sardinia. Journal of Plant Pathology, **86**(4): 179. Zitiert in: Maixner, M. (2006) : Grapevine yellows – Current developments and unsolved questions. Extended Abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, Südafrika, 3.-7.April 2006.

Garbridge, M.G.; Chandler, D.F.K. & Daniels, M.J. (1985): Pathogenity factors in mycoplasmas and spiroplasmas. In: Razin, S. & Barile, M.F. (Hrsg.): The Mycoplasmas, Vol **IV**: 313-351. Orlando: Acad. Press.

Gärtel, W. (1959) : Die „Flavescence Dorée“ oder „Maladie du Baco 22 A“. Weinberg und Keller **6**: 295-311.

Gärtel, W. (1965): Untersuchungen über das Auftreten und das Verhalten der Flavescence dorée in den Weinbaugebieten an Mosel und Rhein. Weinberg und Keller **12**: 347-376.

Gärtel, W. (1971): Probleme der Rebenpathologie im chilenischen Weinbau. Unveröffentl. Manuskript , Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Rebkrankheiten, Bernkastel-Kues.

Gianotti, J.; Caudwell, A.; Vago, C. & Duhoit, J.L. (1969): Isolement et purification de micro-organismes de type mycoplasme à partir de vignes atteintes de Flavescence dorée. C. R. Acad. Sci. Paris **268**: 845-847.

Literatur

- Granata, G. (1985): Epidemic yellows in vineyards of CV Inzolia in Sicily. *Phytopath. Medit.* **24**: 79-81.
- Gundersen, D.E.; LEE, I.M.; Rehner, S.A.; Davis, R.E. & Kingsbury D.T. (1994): Phylogeny of Mycoplasmalike Organisms (Phytoplasmas): a Base for Their Classification. *J. Bacteriol.* **94**: 5244-5255.
- Haupt, H. (1935): Unterordnung Gleichflügler, Homoptera. In: Brohmer, Ehrmann, Ulmer (Hrsg.): *Tierwelt Mitteleuropas*. Vol. 4 (3):115-262.
- Harris, K.F. (1980): *Apids, Leafhoppers and Planthoppers*. Acad. Press. Inc.: 1-13.
- Herschler, A. (1937): Erfahrungen über Wachstumsstörungen an Reben durch Bodenverhältnisse. *Der Deutsche Weinbau* **16**: 177-179.
- Hirumi, H. & Maramorosch (1972): Ultrastructure of the aster yellows agent: Mycoplasma-like bodies in sieve tube elements of *Nicotiana rustica*. *Ann. New York Acad. Sci.* **225**: 201-222.
- Hoch, H. & Remane, R. (1985): Evolution und Speziation der Zikaden-Gattung *Hyalesthes* SIGNORET, 1865 (Homoptera Auchenorrhyncha Fulgoroida Cixiidae). *Marburger Entomologische Puplicationen* **2**: Heft 2, 1-427.
- ICSB/M (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes), (1993): Minutes of the Meetings, 1. – 2. Aug. 1992. *Int. J. Bacteriol.* **43**: 394-397.
- ICSB/M (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes), (1995): Revised Minimum Standards for Description of New Species of the Class Millicutes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **95** : 605-612.
- ICSB/M (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes), (1997): Minutes of the Meetings, 12 and 18. July 1996. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47** : 911-914.
- Irwine, M. E. & Ruesink, W. G. (1986): Vector intensity: A product of propensity and activity. In: McLean, G. D., Garret, R. G. & Ruesink, W. G. (eds.): *Plant virus*

Literatur

epidemics: Monitoring, modelling and predicting outbreaks. Acad. Press, Sydney: S. 13-33.

Ishii, T.; Doi, Y.; Asuyama, K. & H. (1967): Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. Ann. Phytopathol. Soc. Japan **33**: 267-275.

Johannesen, J.; Lux, B.; Michel, K.; Seitz, A. & Maixner, M. (2007): Invasion biology and host specificity of the grapevine yellows vector *Hyalothrips obsoletus* in Europe. Entomol. Experimentalis et Applicata **126** : 217-227.

Karatte, S. (1989): Untersuchungen zum Resistenzverhalten verschiedener *Malus*-Formen gegen die Apfeltriebsucht und zur Schadwirkung des Erregers. Diss. Univ. Heidelberg.

Kölber, M.; Lazar, J.; Davis, R.E., Tökes, G.; Scendrey, G.; Mikulas, J.; Kribzbai, L. & Papp, E. (1997): Occurrence of grapevine yellow disease in grapevine growing regions of Hungary. Extended Abstracts 12th Meeting ICVG, Lisbon, Portugal, 29. Sept. – 2. Oct. 1997: 73-74

Kollar, A. & Seemüller, E. (1989): Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. J. Phytopath **127**: 177-186.

Kunkel, L.O. (1952): Transmission of alfalfa witches' broom to nonleguminous plants by dodder, and the cure in periwinkle by heat. Phytopath **42**: 27-31.

Kunze, L. (1979): Wurzelschäden durch Treibsucht befall an Apfelbäumen. Mitteilung der Biologischen Bundesanstalten **144**: 204-205.

Kuske, C.R.; Kirkpatrick, B.C. & Seemüller, E. (1991): Differentiation of virescence Mlos using western aster yellows mycoplasma-like organism chromosomal DNA probes and restriction fragment length polymorphism analysis. J. Gen. Microbiol. **137**: 153-159.

Kuske, C.R. & Kirkpatrick, B.C. (1992): Distribution and multiplication of western aster yellows mycoplasma-like organisms in *Cantharanthus roseus* as determined by DNA hybridization analysis. Phytopathol. **82**: 457-462.

Literatur

- Langer, M. & Maixner, M. (2003): Regulierung von Phtoplasmosen im ökologischen Weinbau. Risikoanalyse und Lösungsansätze. Schlußbericht zum Forschungsbericht Nr. 01OE115. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Bernkastel-Kues.
- Langer, M. & Maixner, M. (2004): Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis* **43** (4), 191-199..
- Lavina, A.; Battle, A.; Larrue, J.; Daire, X.; Clair, D. & Boudon-Padieu, E. (1995): First report of grapevine bois noir phytoplasma in Spain. *Plat Dis.* **79**: 1075.
- Lederer, W. & Seemüller, E. (1991): Occurrence of mycoplasma-like organisms in diseased and non-symptomatic alder trees (*Alnus spp.*). *EUR. J. Forest Pathol.* **21**: 90-96.
- Lee, I.M.; Gunderson-Rindal, D.E.; Davis, R.E. & Bartoszyk I.M. (1998): Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48** : 1153-1169.
- Lessio, F. & Alma, A. (2004): Seasonal and Daily Movement of *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera: Cicadellidae). *Environmental Entomology* §§ (6): 1689-1694. Zitiert in: Maixner, M. (2006): Grapevine yellows – Current developments and unsolved questions. Extended Abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, Südafrika, 3.-7. April 2006.
- Levadoux, L. (1955): L'état sanitaire et la sélection du Baco 22A. *Agriculture* **172** : 257-259.
- Lherminier, J.; Courtois, M. & Caudwell, A. (1994): Determination of the distribution and multiplication sites of Flavescence dorée mycoplasma-like organisms in the host plant *Vicia faba* by ELISA and immunocytochemistry. *Phys. Mol. Plant Pathol.* **45**: 125-138.
- Lombardo, G. ; Bassi, M. & Greola, F.M. (1970): Mycoplasma development and cell alterations in white clover affected by clover dwarf. *Protoplasma* **70**: 61-71.
- McCoy, R.E. (1989): Mycoplasmas and yellow diseases. In: Whitcomb, R.F. & Tully, J.G. (Hrsg.): *The mycoplasmas. Vol III: Plant and insect mycoplasmas*: 229-264. New York, San Francisco, London: Acad. Press.

Literatur

- Magarey, P.A. & Wachtel, M.F. (1986): Mycoplasma-like organisms associated with Australian grapevine yellows. *Plant Dis.* **70**: 363.
- Maixner, M. (1994): Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis* **33**: 103-104.
- Maixner, M. ; Ahrens, U. & Seemüller, E. (1995): Detection of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit). MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *EUR. J. Plant Pathol.* **101**: 241-250.
- Maixner, M; Rüdel, M.; Daire, X. & Boudon-Padieu, E. (1995) : Diversity of grapevine yellows in Germany. *Vitis* **34**: 235-236.
- Maixner, M.; Ahrens, U. & Seemüller, E. (1995a): Detection of the german grapevine yellows (Vergilbungskrankheit). MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**: 241-250.
- Maixner, M.; Daire, X.; Boudon-Padieu, E. ; Lavina, A. ; Battle, W. & Reinert, W. (1997) : Phytoplasmas. In : Walter, B. (Hrsg.): Sanitary selection of the grapevine. Protocols for detection of viruses and virus-like diseases. Editions INRA, Les Colloques **86**: 183-195.
- Maixner, M. & Reinert, W. (1999): *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Cicadellidae) as a vector of the alder yellows phytoplasma of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.. *Eur. J. Plant. Pathol.* **105**: 87-94.
- Maixner, M. & Langer, M. (2008): Regulierung von Phytoplasmen im ökologischen Weinbau Risikoanalyse und Lösungsansätze.
In: www.jki.bund.de/nn_911284/DE/Home/pflanzen__schuetzen (16.01.2008).
- Marcone, C.; Ragozzino, A., Credi, R. & Seemüller, E. (1996): Detection and characterization of phytoplasmas infecting grapevine in southern Italy and their genetic relatedness to other phytoplasmas of elm yellows group. *Eur. J. Forest Pathol.* **27**: 45-54.
- Marwitz, R. (1990): Diversity of yellow disease agents in plant infection. *Zentralbl. Bakteriol.* **20** (Suppl.): 431-434.

Literatur

- McCoy, R.E. (1979): Mycoplasmas and yellow diseases. In: Whitcomb, R.F. & Tully, J.G. (Hrsg.): The mycoplasmas. VOL. III: Plant and insect mycoplasmas, pp. 229-264. New York, San Francisco, London: Academic Press.
- Mendgen, K. (1970): Untersuchungen über eine Vergilbungskrankheit der Reben an Rhein, Mosel und Saar. Diss., Göttingen.
- Milkus, B.; Clair, D.; Idir, S. Habili, N. & Boudon-Padieu, E. (2005): First detection of stolbur phytoplasma in grapevines (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay) affected with grapevine yellows in the Ukraine. *Plant Path.* **54**(2): 236. Zitiert in: Maixner, M. (2006) : Grapevine yellows – Current developments and unsolved questions. Extended Abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, Südafrika, 3.-7. April 2006.
- Ministerium für Ernährung und Ländlicher Raum Baden Württemberg (2008): Abschlussbericht 2008 zum Forschungsvorhaben. Untersuchungen zum Auftreten der Schwarzholzkrankheit in Reben.
- Müller, K. (1925): Die Perenosporakrankheit des Weinstockes und ihre Bekämpfung. *Weinbau und Kellerwirtschaft* **4**.
- Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Colwell, R.R.; De Vos, P. ; Goodfellow, M. ; Grimont, P.A.D. ; Pfennig, N.; Stackebrandt, E. & Zavarzin, G.A. (1990): Report of the ad hoc Committee on Approaches to Taxonomy within the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40** : 213-215.
- Murray, R.G.E. & Schleifer, K.H. (1994) : Taxonomic notes : A proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44** : 174-176.
- Newberry, H.G. & Possingham, J.V. (1977): Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissues containing phenolic compounds. *Plant Physiol.* **60**: 534-547.
- Nienhaus, F. (1985): Research on infection of forest trees with viruses and mycoplasma microorganisms. *Allg. Forstz.* **40**: 119-124.
- Ossiannilsson, F. (1981): The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. Part 2: The families Cicadidae, Cercopidae, Membracidae and Cicadellidae (excl.

Literatur

- Deltocephalinae). In: Fauna Entomologica Scandinavia, Vol 7,2. Klampenborg: Scandinavian Press.
- Padovan, A.C.; Gibb, K.S.; Daire,X. & Boudon Padieu, E. (1996): A comparison of the phytoplasma associated with the Australian grapevine yellows to other phytoplasmas in grapevine. *Vitis* **35**: 189-194.
- Pearson, R.C.; Pool, R.M.; Gonsalves, D. & Coffinet, M.C. (1985): Occurrence of Flavescence dorée-like symptoms on “White Riesling” grapevines in New York, USA. *Phytopathologia Mediterranea* **24**: 82-87.
- Pooler, M.R.; Myung, I.S.; Bentz, J. Sherald, J. & Hartung, J.S.: (1997): Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. *Letters Appl. Microbiol.* **25**: 123-126.
- Purcell, A.H. (1982): Insect vector relationships with Procariotic plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* **20**: 397-417.
- Prince, J.P.; Davis, R.E. ; Wolf, T.KKk. ; Lee,I.M. ; Mogen,B.D. ; Dally, E.L.; Bertaccini, A.; Credi, R. & Barba, M. (1993): Moleciúlar detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopath.* **83**: 1130-1137.
- Reinert, W. (1999): Detektion und Differenzierung reboopathogener Phytoplasmen (Mollicutes, Eubacteria) in Deutschland unter Berücksichtigung phytopathologischer Aspekte. Diss. Technische Universität Darmstadt.
- Riedle-Bauer, M.; Hanak, K.; Schildbauer, M.; Tiefenbrunner, W.& Regner, F. (2006): Epidemiology of stolbur phytoplasma in Austrian vineyards. Extended abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, Südafrika, 3-7 April 2006. Zitiert in: Maixner, M. (2006) : Grapevine yellows – Current developments and unsolved questions. Extended Abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, Südafrika, 3.-7.April 2006.
- Quartau, J. A.; Guimaraes, J. M.& André, G. (2001) : On the occurrence in Portugal of the Nearctic *Scaphoideus titanus* Ball (Homoptera, Cicadellidae), the natural vector of the grapevine Flavescence dorée (FD). *IOBC/WPRS Bulletin*, **24**(7): 273-276. Zitiert in: Maixner, M. (2006) : Grapevine yellows – Current developments and unsolved

Literatur

questions. Extended Abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, Südafrika, 3.-7.April 2006.

Rumbos, I.C. (1988): Present knowledge on the yellows disease of grapevine. Proceedings of the International Symposium on Plant Protection Problems and Prospects of Integrated Controls in Viticulture, Lisboa, 6-9 July 1988: 473-482.

Sabaté, J.; Lavina, A. & Batlle, A. (2003): Potential vectors of grapevine Bois noir phytoplasma in Spain and evaluation of their transmission capacity. Extended Abstracts 14th Meeting of the ICVG, 12.-17. September 2003 Locorotondo (Bari), Italien: 113. Zitiert in: Maixner, M. (2006): Grapevine yellows – Current developments and unsolved questions. Extended Abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, Südafrika, 3.-7.April 2006.

Samaddar; K.R.; Das, J.; Barat, N. & Sengupta, C. (1996): Histological and biochemical changes in Mycoplasma infected leaves of eggplant. J. Mycopathol. Res. **34**: 149-155.

Saric, A.; Skoric, D.; Bertaccini, A.; Vibio, M. & Murari, E. (1997): Molecular detection of phytoplasma infection grapevines in Slovenia and Croatia. Extended Abstracts 12th Meeting ICVG, Lisbon, Portugal, 29. Sept. – 2. Oct. 1997:77.-78.

Schlag, M.G. & Gal, M. (1996): The nacreous sieve-element wall in healthy and in MLO-infected apple trees, Int. J. Plant Science **157**: 80-91.

Schneider, B.; Ahrens, U.; Kirkpatrick, B.C. & Seemüller, E. (1993): Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. J. Gen. Microbiol. **139**:675-686.

Schneider, B.; Seemüller, E.; Smart, C.D. & Kirkpatrick, B.C. (1995): Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin, S. & Tully, J.G. (Hrsg.): Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology, Vol. 1, S. 369-380. San Diego: Acad. Press.

Schneider, B.; Marcone, C.; Kampmann, M.; Ragozino, A.; Lederer, W.; Cousin, M.T. & Seemüller, E. (1997a): Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. European J. Plant Pathol. **103**: 675-686.

Literatur

- Schneider, B.; Gibb, K.S. & Seemüller, E. (1997b): Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* **143**: 3381-3389.
- Schneider, B.; Torres, E.; Martin M. P.; Schröder, M.; Behnke, H.D. & Seemüller, E. (2005): „Candidatus *Phytoplasma pini*“, a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 303-307.
- Sears, B.B.; Lim, P.O.; Holland, N.; Kirkpatrick, B.C. & Klomparens K.L. (1989): Isolation and characterisation of DNA from a mycoplasma-like organism. *Mol. Plant microbe Interact.* **2**: 175-180.
- Seemüller, E. (1989): Mycoplasmen als Ursache von Gehölzkrankheiten in Europa. *Forum Mikrobiologie* **12**: 144-151.
- Seemüller, E., Schneider, B.; Mäurer, R.; Ahrens, U.; Daire, X.; Kison, H.; Lorenz, K.H.; Firrao, G.; Avinent, L.; Sears, B.B. & Stackebrandt, E. (1994): Phylogenetic classification of phytopathogenic Mollicutes by Sequence Analysis of 16S Ribosomal DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 440-446.
- Seemüller, E.; Marcone, C.; Lauer, U.; Ragozzino, A. & Göschl, M. (1998): Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant. Pathol.* **80**: 3-26.
- Seljak, G. (2006): Distribution of grapevine yellows and its vectors in Slovenija. Personal communication. Zitiert in: Maixner, M. (2006): Grapevine yellows – Current developments and unsolved questions. Extended Abstracts 15th Meeting ICVG, Stellenbosch, Südafrika, 3.-7. April 2006.
- Sergel, R. (1986): *Hyalesthes obsoletus* Signoret in Germany. *Biol. Zeitschrift* **1** (1): 90-93.
- Sforza, R.; Clair, D.; Daire, X.; Larrue, J. & Boudon-Padieu, E. (1995): Leafhoppers, Planthoppers and Phytoplasmas. Mitteilung des Instituts I.N.R.A., Laboratoire des mycoplasmes des plantes, Dijon (Frankreich).
- Sforza, R.; Bourgoïn, T.; Wilson, S.W. & Boudon-Padieu, E. (1999): Field observations, laboratory rearing and description of immatures of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae). *Eur. J. Entmol.* **96** : 409-418.

Literatur

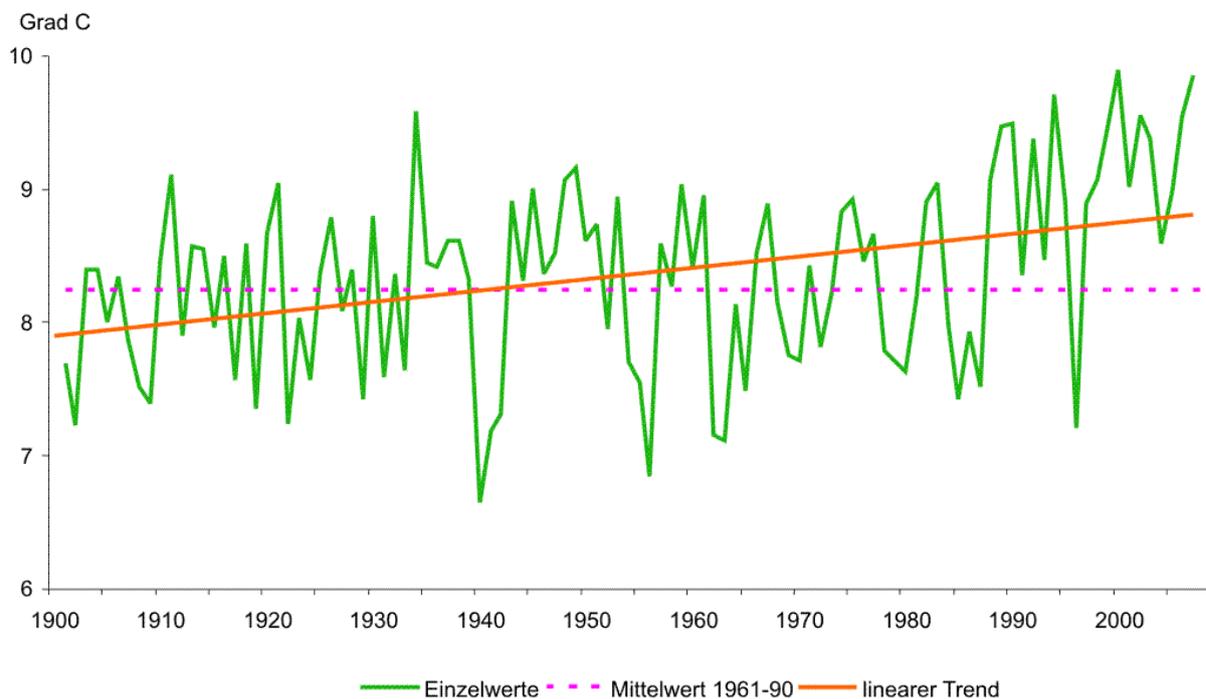
- Sforza, R.; Claire, D.; Daire, X.; Larrue, J. & Boudon-Padieu, E. (2008) : The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera, Cixiidae) in the occurrence of Bois noir of Grapevines in France. *J. Phytopathol.* **146**: 549-556.
- Siller, W.; Kuhbandner, B.; Marvitz, R.; Petzhold, H. & Seemüller, E. (1987): Occurrence of mycoplasma-like organisms in parenchyma cells of *Cuscuta odorata* (Ruix et Pav.). *J. Phytopathol.* **119**: 147-159.
- Sinha, R.C. (1984): Transmission mechanism of mycoplasma-like organisms by leafhopper vectors. In: Harris, K.F. (Hrsg.): *Current topics in vector research*, Vol. **II**: 93-109. New York, Philadelphia, Eastbourne: Praeger scientific.
- Smart, C.D.; Schneider, B.; Blomquist, C.L.; Guerra, L.J.; Harrison, N.A.; Ahrens, U.; Lorenz, K.H.; Seemüller, E. & Kirkpatrick, B.C. (1996): Phytoplasma-specific Pcr primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Env. Microbiol.* **62**: 2988-2993.
- Stackebrandt, E. (1997): Identifying culturable and uncultured Prokaryotes. *Symbiosis* **22**: 47-58.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M. (1994): Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. *Int. J. Bacteriol.* **44**: 846-849.
- Stellwaag, F. (1928): *Die Einbauinsekten der Kulturkänder*. Parey, Berlin.
- Sylvester, E.S. (1985): Multiple Acquisition of viruses and vector-dependent procaryotes : Consequences on Transmission. *Ann. Rev. Entomol.* **30**: 71-88.
- Tanne, E.; Boudon-Padieu, E.; Clair, D. ; Davidirich, M. ; Melamed, S. & Klein, M. (2001) : Detection of Phytoplasma by Polymerase Chain Reaction of Insect Feeding medium and his use in determing vector ability. *Pphytopathol.* **91**: 741-746.
- Thottapilly, G.; Rossel, H.W.; Reddy, D.V.R.; Morales, F.J.; Green, S.K. & Makkouk, K.M. (1990): *Vectores of Virus and Mycoplasma Diseases: An Overview*. Ins. Pests of Food Legumes, Wiley & sons: 323-342.

Literatur

- Tiefenbrunner, W. (2006): Ethologische Untersuchungen potentieller Vektoren von Phytoplasmen – Attraktivität verschiedener Farbtafeln auf Zikaden (Hemiptera: Auchenorrhyncha) im Weingarten-.Projektreport:
In: www.dafne.at/dafne.plus.homepage/download.php?t:ProjectReüprrtAHachment&k=954
- Tsai, J.H. (1979): Vector transmission of mycoplasmal agents of plant diseases. In: Whitcomb, R.T. & Tully, J.G.: The Mycoplasmas, Vol **III**. Plant and insect mycoplasmas: 265-307. New York: Acad. Press.
- Uyemoto, J.K. (1976): A new disease affecting the grapevine variety de Chaunac. Proc. Am. Phytopatol. Soc. **1**: 146.
- Van der Plank, J.E. (1975): Principles of plant infection. New York: Acad. Press.
- Vidano, C. (1964): Scoptera in Italia dello *Scahphoideus littoralis* Ball cicalina americana collegata alla “Flavescence dorée” della vite. Italia Agric **101**: 1031-1049.
- Weber, A. & Maixner, M. (1998): Survey of populations of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha, Cixiidae) for infection with the phytoplasma causing grapevine yellows in Germany. J. Appl. Entomol. **122**: 375-381.
- Weintraub, P. & Beanland, LeA. (2006): Insect vectors of phytoplasmas. Ann. Rev. Entomol. **51**: 91-111.
- Wolf, T.K.; Prince, J.P. & Davis, R.E. (1994): Occurrence of grapevine yellows in Virginian vineyards. Plant Dis. **78**: 208.
- Ziegler, A.; Lange, S. & Bender, R. (2004): Überlebenszeitanalyse: Der Log-Rang-Test. In: Dtsch Med Wochenschr **129**: T4-T6.

7. Anhang

7.1 ANSTIEG DER JAHRESMITTELTEMPERATUR IN DEUTSCHLAND ZWISCHEN 1901 UND 2007



Quelle: Deutscher Wetterdienst (DWD), Mitteilung vom 22.09.2008

Abb. 7.1: Jahresmitteltemperatur in Deutschland 1901-2007

Zwischen 1901 und 2007 stieg die Jahresmitteltemperatur um $1,0^{\circ}\text{C}$ an. Der Anstieg ist am linearen Trend erkennbar. Zwischen 1989 und 2008 wurden neun der zehn wärmsten Jahre festgestellt (vgl. Deutscher Wetterdienst, 2009).

Anhang

7.2 AUS DEM FORSCHUNGSPROJEKT HERVORGEANGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

- Darimont, H. & Maixner, M. (2000): Übertragungseffizienz der Vektoren von Reb-phytoplasmosen. In: 52. Deutsche Pflanzenschutztagung in Freising-Weihestephan, 9.-12. Oktober 2000. Mitteilungen Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft. **376**, 371-372.
- Darimont, H. & Maixner, M. (2001): Actual distribution of *Hyaletthes obsoletus* Signoret (Auchenorrhyncha : Cixiidae) in German viticulture and its significance as a vector of Bois noir. IOBC/wprs Bulletin **24** (7), 199-202.
- Darimont, H. & Maixner, M. (2002): Einfluss standortspezifischer Faktoren auf den Indektionsdruck durch die Schwarzholzkrankheit der Rebe. Mitteilungen Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft. **390**, 228-229.
- Langer, M.; Darimont, H. & Maixner, M. (2003): Control of phytoplasma vectors in organic viticulture. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 2003, **55** (12), 277-281.
- Maixner, M. & Darimont, H.: Untersuchungen zur Überwachung und Minderung des Infektionsdruckes durch die Vergilbungskrankheit der Weinrebe. In: Jahresbericht 1999 des Forschungsrings des Deutschen Weinbaus: DLG, 2002, 38-39.
- Maixner, M.; Darimont, H. & Reinert, W. (2000): Course of infestation by grapevine yellows in vineyards after replanting. Extended Abstracts 13th Meeting ICVG, Adelaide, Australia, 12-17. March 2000, 109-110.
- Maixner, M.; Reinert, W. & Darimont, H. (2000): Transmission of an elm yellows group grapevine phytoplasma by *Oncopsis alni*. Extended Abstracts 13th Meeting ICVG, Adelaide, Australia, 12.-17. March 2000, 89-90.
- Maixner, M.; Reinert, W. & Darimont, H. (2000): Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis* **39** (2), 83-84.
- Maixner, M.; Darimont, H. & Mohr, H.D. (2001): Studies of transmission of Bois noir to weeds and potential ground-cover plants by *Hyaletthes obsoletus* Signoret (Auchenorrhyncha: Cixiidae). IOBC/wprs Bulletin **24** (7), 249-252.

Anhang

Maixner, M.; Lüers, J. & Darimont, H. (2002) : Prognose der Flugaktivität von *Hyalesthes obsoletus* und Einfluss klimatologischer Faktoren auf die Phänologie der Reben. In: Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt **390**: 228-229.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Möhl, der die Betreuung der Arbeit übernahm, für seine Ratschläge und geduldige Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. U. Müller für die Übernahme des Referats und damit der Möglichkeit, die Dissertation abschließen zu können.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. H. Kallenborn für die fachkundige Unterstützung meiner Arbeit, für seine konstruktive Kritik und für die Bereitschaft, die Arbeit jederzeit mit Rat und Tat zu unterstützen. Ich verdanke ihm in jeder Hinsicht mehr, als sich an dieser Stelle aufzuführen lässt.

Ich danke dem Leiter des Instituts im Weinbau der BBA, Herrn Dr. W. Englert für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die Motivierung während und nach Abschluss des Forschungsprojektes

Mein ganz besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Dr. M. Maixner, der dieses Forschungsvorhaben „ins Leben rief“. Auch ihm kann ich an dieser Stelle nicht ausführlich genug danken. Seine Unterstützung und motivierende Hilfsbereitschaft waren ein wichtiger Aspekt sowohl beim Gelingen des Forschungsprojektes als auch bei der Niederschrift.

Frau Y. Gerhard und Frau D. Kröner möchte ich an dieser Stelle ebenfalls für die wertvolle Unterstützung meiner Untersuchungen danken. Ohne ihre Hilfe wäre die Einarbeitung wesentlich zeitaufwendiger gewesen. Darüber hinaus konnte ich immer wieder von ihren Fähigkeiten und Erfahrungen in der Laborarbeit profitieren.

Für die Unterstützung auf den Weinfeldern und ihren Humor danke ich auch allen Versuchsfeldarbeitern.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. H. Mohr für die ausführliche Beratung zum Anlegen von Versuchsflächen und für die gemeinsam verbrachten Musikabende.

Zum Abschluss sei an dieser Stelle auch allen Winzern gedankt, die ihre Flächen für dieses Forschungsvorhaben zur Verfügung stellten.

Für die finanzielle Förderung danke ich auch dem Forschungsring des Deutschen Weinbaus bei der DLG.