

Harald Schneller¹, Dietlinde Rißler¹, Gabriele Zgraja¹, Mareile Zunker¹,
Olaf Zimmermann¹, Werner Kost², Elke Lasch³, Klaus Schrameyer⁴

Erster Nachweis von ‚Aster-Yellows-Disease‘ an Möhren (Phytoplasmen bedingte Möhrenröte) und in der Kleinzikade *Macrosteles sexnotatus* (Fallén 1806) in Deutschland – Monitoring und Diagnose

First report of aster-yellows disease in carrots and in the leafhopper
Macrosteles sexnotatus (Fallén 1806) in Germany
– monitoring and diagnosis

Zusammenfassung

Im Jahr 2011 gelang es dem LTZ Augustenberg (Baden-Württemberg) erstmals in Deutschland ein Phytoplasma aus der ‚Aster Yellows‘-Gruppe an Möhren nachzuweisen. Durch die Sequenzierung des PCR-Amplifikats konnte der Erreger als *Candidatus* Phytoplasma asteris identifiziert werden. Etwa zwei Prozent der Möhren eines Anbauers zeigten im Jahr 2011 die typischen Symptome wie Rotfärbung des Laubes, am Rübenkörper eine verstärkte Feinwurzelbildung und verlängerte Wurzelenenden. Als Überträger von Phytoplasmen gelten unter anderem Kleinzikaden. Daraufhin wurde in den Jahren 2012 bis 2014 ein Monitoring-Programm durchgeführt. Die potentiellen Vektoren, Kleinzikaden der Gattung *Macrosteles*, wurden zum einen mit Keschern gefangen und morphologisch auf die Arten bestimmt, zum anderen wurde mittels gelber Leimtafeln der Flugverlauf der Zikaden dokumentiert. Anschließend wurden die so gefangenen *Macrosteles*-Zikaden anhand PCR auf Phytoplasmen untersucht. Im Durchschnitt der untersuchten drei Jahre waren die mittels Leimtafeln gefangenen Zikaden der Gattung *Macrosteles* zu 3,3% mit Phytoplasmen infiziert. Dabei blieb der Anteil an befallenen Möhren in allen drei Untersuchungsjahren unter einem Prozent.

Der Anteil der mittels gelben Leimtafeln gefangenen *Macrosteles*-Arten am Gesamtfang betrug im Durchschnitt

der Jahre ca. 18 Prozent. Morphologisch konnten die mit Kescher gefangenen *Macrosteles*-Zikaden den Arten *Macrosteles sexnotatus*, *M. laevis*, *M. cristatus* und *M. ossiannilssoni* zugeordnet werden. Mit ca. 70% war *M. sexnotatus* dabei die häufigste Art. Die Arten *M. laevis* und *M. cristatus* machten ca. je 15% aus. Der Anteil der Art *M. ossiannilssoni* betrug nur ca. zwei Prozent.

Auch bei den von den gelben Leimtafeln isolierten *Macrosteles*-Zikaden mit Nachweis von Phytoplasmen konnte *M. sexnotatus* mit molekularbiologischen Methoden mit 85,7% als die häufigste Art identifiziert werden. Ferner konnten die in *M. sexnotatus* nachgewiesenen Phytoplasmen der ‚Aster-yellows‘-Gruppe zugeordnet werden. Die Kleinzikadenart *M. sexnotatus* spielt nach den vorliegenden Ergebnissen eine große Rolle bei der Übertragung von ‚Aster-Yellows‘ (phytoplasmenbedingte Möhrenröte) im Untersuchungsgebiet und damit vermutlich in Baden-Württemberg und Deutschland. Mit den im Feld aufgestellten gelben Leimtafeln ließ sich der Flugverlauf der Zikaden dokumentieren. Demnach erstreckt sich die Flugzeit der *Macrosteles*-Arten von Mitte Mai (Kalenderwoche 21) bis Mitte November (Kalenderwoche 46). Der frühe Nachweis von Phytoplasmen in den Zikaden bedeutet, dass die Tiere bereits infiziert sind, wenn sie in den Möhrenfeldern auftreten. Noch nicht geklärt ist die Herkunft der *Macrosteles*-Arten. Ein Zuflug ist sowohl von den die Möhrenfelder umgebenden Habitaten (Ried-

Institut

Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg (LTZ), Karlsruhe¹
Landratsamt Tübingen²
Landratsamt Ulm³
Heilbronn⁴

Kontaktanschrift

Harald Schneller, Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg (LTZ), Neßlerstr. 25, 76227 Karlsruhe

Zur Veröffentlichung angenommen

21. August 2016

flächen und Wiesen), als auch von weiter entfernten Gebieten denkbar. Des Weiteren ist noch nicht geklärt, wo und an welchen Wirtspflanzen die Zikaden bei ihrer Migration von ihren Überwinterungspflanzen zu den Möhrenfeldern die Phytoplasmen aufnehmen.

Stichwörter: Möhren, Phytoplasmen, ‚*Candidatus* Phytoplasma asteris‘, Aster Yellows‘-Gruppe, Möhrenröte, Vektoren, Kleinzikaden, *Macrosteles* sp., Monitoring, molekularbiologischer Nachweis, PCR

Abstract

A phytoplasma of the ‘aster-yellows’-group was detected in carrots by the Center for Agricultural Technology Augustenberg (LTZ Augustenberg in the federal state of Baden-Württemberg) in the year 2011. It could be identified as *Candidatus* Phytoplasma asteris by sequence analysis of the PCR-amplification product. This is the first report about this disease in Germany. Nearly two per cent of the carrots were infected and showed the typical red coloring of the foliage. The roots also showed characteristic symptoms of increased root hairs and abnormal root growth. Therefore, a monitoring-program was started, which lasts from 2012 until 2014 (3 years). The potential vectors, leafhoppers from the genus *Macrosteles*, were captured by sweep nets and were dedicated afterwards. Furthermore the migration of the leafhoppers was monitored by the use of yellow sticky traps. After that, the captured leafhoppers were investigated by PCR-based DNA test. Within these tests, ‘aster-yellows’ was confirmed in leafhoppers of the genus *Macrosteles*. On average, 3.3 per cent of specimens collected in the 3 years were infected with ‘aster yellows’ phytoplasma. Within all leafhoppers captured, *Macrosteles* species extended to about 18 per cent. These species were *M. sexnotatus*, *M. laevis*, *M. cristatus* und *M. ossiannil-*

soni. Thereby nearly 70 per cent of the captured *Macrosteles* species were *M. sexnotatus*, followed by *M. laevis* und *M. cristatus*, each represented about 15 per cent. Only 2 per cent of the *Macrosteles* species belonged to *M. ossiannilsoni*. Within the *Macrosteles*-leafhoppers which were infected with aster-yellows, 85.7 per cent belonged to the species *M. sexnotatus*. Therefore it is evident, that the common and wide spread leafhopper *M. sexnotatus* is able to transmit aster-yellows in Germany. It is very easily to detect leafhoppers in the field by using yellow sticky traps. It is also possible to document the migration of the leafhoppers by using these traps. The period of migration of the leafhoppers lasts from the middle of May to the middle of September. The captured *Macrosteles* were infected by aster-yellows very early in the season. This means, that the *Macrosteles* population must have infected itself on different herbs by their migration from their overwintering areas to the carrot fields. Up to now, it is not known, where the *Macrosteles* species originate from. A migration from the surrounding area is also possible, than the migration from areas far from the carrot fields. It is also unknown, where and on which herbs the leafhoppers infect themselves with ‘aster-yellows’ phytoplasma.

Key words: Carrots, aster yellows disease, phytoplasma, ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’, vectors, leafhoppers, *Macrosteles* sp., monitoring, PCR-based DNA test

1 Einleitung/Problemstellung

Im Spätsommer/Frühherbst des Jahres 2011 erhielt das LTZ von einem Pflanzenschutzberater eine Probe Möhren aus einem Betrieb, der Speisemöhren für den Frischmarkt produziert. Das Laub der Möhren war deutlich rot gefärbt (Abb. 1 und 2). Die Möhren zeigten nicht das sortentypische Bild eines abgestumpften Rübenkörpers, sondern deutlich verlängerte spitz zulaufende Wurzel-



Abb. 1. Rotfärbung des Laubes von erkrankten Möhren im Bestand.



Abb. 2. Rotfärbung des Laubes von erkrankten Möhren im Bestand. (Bildnachweis: W. Kost, Tübingen)

enden. Am Rübenkörper selbst war eine starke Feinwurzelbildung festzustellen (siehe Abb. 3 und 4).

Diese stark geschädigten Möhren sind nicht vermarktungsfähig und ungenießbar. Nach Schätzungen des Beraters und des Betriebsleiters betrug der Schaden bzw. der Anteil Möhren mit Rotfärbung des Laubes im Jahr 2011 ca. zwei Prozent. Als Schadursache kam Virusbefall in Betracht. Untersuchungen auf Viren durch das JKI Braunschweig im Jahr 2011 waren negativ (carrot thin leaf virus (CTLV), carrot virus Y (CarVY), carrot yellow leaf virus (CYLV), carrot necrotic dieback virus (CNDV) und carrot red leaf virus (CtRLV)). Daraufhin wurden die Möhren vom LTZ auf Phytoplasmen getestet; das Ergebnis war positiv. Eine Bestätigung erfolgte anschließend durch das JKI Dossenheim, wobei die Zugehörigkeit zur ‚Aster-Yellows‘-Gruppe diagnostiziert wurde (SCHNEIDER, persönliche Mitteilung).

Phytoplasmen aus unterschiedlichen Gruppen (‚Aster-Yellows‘-Gruppe und ‚Stolbur‘-Gruppe) können an der phytoplasmenbedingten Möhrenröte beteiligt sein. Als Vektoren für Phytoplasmen sind Kleinzikaden aus den verschiedensten Gattungen bekannt, für ‚Aster Yellows‘ werden gemäß serbischen Autoren (DUDUK et al., 2008) Kleinzikaden aus der Gattung *Macrosteles* genannt. Bei folgenden Arten wurden von diesen Autoren Phytoplasmen nachgewiesen: Sandwanderzirpe *Macrosteles quadripunctulatus* (Kirschbaum 1868) (in Deutschland vorkommend) und Wiesenwanderzirpe *Macrosteles sexnotatus* (Fallén 1806) (in Deutschland vorkommend) für Phytoplasmen aus der ‚Aster-Yellows‘-Gruppe und die Ackerwanderzirpe *Macrosteles laevis* (Ribaut 1927) (in Deutschland vorkommend) für Phytoplasmen aus der ‚Stolbur-Gruppe‘.

In der amerikanischen Literatur (DELAHAUT, 1997) findet sich als Vektor für ‚Aster Yellows‘ die Art *Macrosteles quadrilineatus* (Forbes 1885), die aber in Europa bzw. in Deutschland nicht vorkommt; sowie die Art *Macrosteles fascifrons* (Stal 1858), die ebenfalls in Deutschland nicht vorkommt, jedoch in der Fauna Europaea geführt ist. In

der deutschen Zikadenliteratur (KUNZ et al., 2011) wird weiterhin aus der Gattung *Macrosteles* die Kammwanderzirpe *Macrosteles cristatus* (Ribaut 1927) ganz allgemein als Vektor für Phytoplasmen geführt.

Die von DELAHAUT (Wisconsin USA) genannte *Macrosteles*-Art *M. fascifrons* überwintert im Ei-Stadium an Getreide (Gräsern) und ist daher bei ihrer Geburt nicht mit Phytoplasmen infiziert; diese nimmt sie vielmehr erst an den verschiedensten Wirtspflanzen auf. Auch alle unsere heimischen *Macrosteles*-Arten überwintern im Eistadium, so dass sie bei ihrem Schlupf auf ihren Überwinterungspflanzen nicht mit Phytoplasmen infiziert sein können. Delahaut nennt als mögliche Wirtspflanzen (als natürliches Reservoir) an denen *M. fascifrons* die Phytoplasmen aufnehmen kann: Wilde Möhre (*Daucus carota*), Beifußblättriges Traubenkraut (*Ambrosia artemisiifolia*), Kanadisches Berufkraut (*Conzya canadensis*), Löwenzahn (*Taraxacum* sp.) sowie die Strahlenlose Kamille (*Matricaria discoidea*). Dabei dauert es 20 bis 50 Tage nach Aufnahme der Phytoplasmen bis die Erreger weitergegeben werden können. Die ersten Zikaden, die in Wisconsin auftauchen, haben nicht in Wisconsin überwintert. Sie werden im Frühjahr mit warmen Südwinden nach Wisconsin verfrachtet. Die ersten Tiere/Migranten, die ankommen sind Weibchen. Sie legen ihre Eier in Gräser und Unkräuter ab. Mitte Juni erscheint dann die erste ‚heimische‘ Generation, die dann ein erhöhtes Erregerpotential besitzt. Nur ein kleiner Prozentsatz ist mit Phytoplasmen infiziert; nach Schätzungen des Autors im Mittel ca. 2,5%. Es soll in den USA einige resistente bzw. tolerante Möhrensorten geben.

Daneben gibt es weitere Zikadenarten aus anderen Gattungen, die als Überträger von Phytoplasmen bzw. als Vektoren für ‚Aster yellows‘ (Phytoplasmen bedingte Möhrenröte) in Frage kommen. Hier werden von israelischen Autoren (WEINTRAUB und ORENSTEIN, 2004) vor allem der *Circulifer haematoceps* Komplex (Mulsant & Rey) und *Neoliturus fenestratus* (Herrich-Schäffer 1834) genannt. Beide Arten kommen in Deutschland vor, wer-



Abb. 3. Gesunder Möhrenkörper mit abgestumpften Rübenende ohne Feinwurzeln.



Abb. 4. Erkrankter Möhrenkörper mit verlängertem spitz zulaufenden Rübenende und verstärkter Feinwurzelbildung. (Bildnachweis: H. SCHNELLER, LTZ Augustenberg)

den aber bisher nicht als Vektoren für Phytoplasmen genannt. Von den USA (Staat Washington) wird von MUNYANEZA et. al. zudem noch die Kleinzikade *Circulifer tenellus* (Baker 1896) genannt, über deren Vorkommen es in Deutschland keine Angaben gibt. Nach serbischen und italienischen Autoren (DROBNJAKOVIC et.al., 2010) wurden bei Untersuchungen in der südlichen Batschka (Backa) folgende Zikadenarten mit Phytoplasmen identifiziert: Phytoplasmen aus der „Stolbur-Gruppe“ wurden gefunden in *Anaceratagallia laevis* (Ribaut), *Anaceratagallia ribauti* (Ossiannilsson) (in Deutschland vorkommend), *Anaceratagallia venosa* (Fourcroy) (in Deutschland vorkommend), *Psammotettix striatus* (Linnaeus), *Psammotettix confinis* (Dahlbom) (in Deutschland vorkommend) und *Psammotettix alienus* (Dahlbom) (in Deutschland vorkommend). Phytoplasmen aus der ‚Aster-Yellows‘-Gruppe wurden gefunden in *Anaceratagallia laevis* (Ribaut), *Ophiola decumana* (Kontkanen) (in Deutschland vorkommend) und in *Psammotettix confinis* (Dahlbom) (in Deutschland vorkommend). Dabei sollen insbesondere Arten aus den Gattungen *Psammotettix* und *Anaceratagallia* (besonders *P. confinis* und *A. laevis*) eine signifikante Rolle bei der Übertragung der Phytoplasmen spielen, da diese Arten regelmäßig in infizierten Möhrenfeldern gefunden wurden.

1.1 Ziel der Untersuchungen

In Deutschland werden auf 10 200 ha Möhren und Karotten angebaut (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2014). Im Jahr 2013 waren, gemäß Statistischem Landesamt Baden-Württemberg, Möhren nach Spargel und Salaten die Gemüseart mit der größten Anbaufläche (858 ha). Gegenüber dem Jahr 1992 (316 ha) hat sich die Anbaufläche sehr stark erhöht, Tendenz steigend (SEITZ, 2013).

Durch das LTZ Augustenberg wurde deshalb ein Monitoring-Programm zur Überwachung der potentiellen Vektoren für die Jahre 2012 bis 2014 gestartet. Bei unseren Untersuchungen bzw. bei unserem Monitoring-Programm haben wir uns, gemäß den serbischen Autoren, auf die Kleinzikaden aus der Gattung *Macrosteles* beschränkt. Mit Hilfe von gelben Leimtafeln wurde das Auftreten der *Macrosteles*-Zikaden dokumentiert und ihr Migrationsverhalten erfasst. Weiterhin wurde überprüft, ob ein Nachweis von Phytoplasmen in den gefangenen Zikaden molekularbiologisch erfolgen, und gegebenenfalls der Anteil an infizierten Zikaden ermittelt werden kann. Parallel dazu sollten die mit einem Kescher gefangenen und bis zur Art bestimmten *Macrosteles*-Zikaden auch molekularbiologisch untersucht werden, um die mittels gelben Leimtafeln gefangenen *Macrosteles*-Zikaden ebenfalls bis auf die Art bestimmen zu können. Zudem wurden die befallenen Möhren in den Jahren 2012 bis 2014 auf Phytoplasmen getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Monitoring

Zur Überwachung der Zikaden wurden zwei Methoden gewählt: die klassische entomologische Methode durch

Fang der Zikaden mit einem Kescher zur Artbestimmung (a), sowie durch Fang und Überwachung (Monitoring) des Flugverlaufs der Zikaden mittels gelben Leimtafeln (b).

2.1.1 Fang von Kleinzikaden mittels Kescher (a). In dem angegebenen Überwachungszeitraum wurde jeweils an einem Termin im Jahr (siehe Tab. 1) mit einem gewöhnlichen Kescher in den Möhrenfeldern Zikaden gefangen. Hierbei handelte es sich um eine qualitative Erhebung, bei der es vor allem darum ging, die vorhandenen *Macrosteles*-Arten zu erfassen.

Anschließend wurden diese Kescherfänge im Labor ausgewertet. Die gefangenen *Macrosteles* sp. wurden getrennt von den anderen Zikadenarten erfasst und zur Bestimmung der Art weitergegeben.

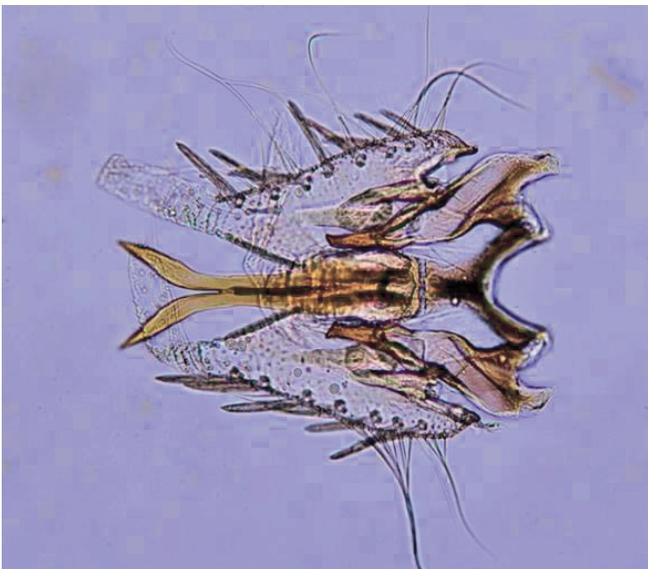
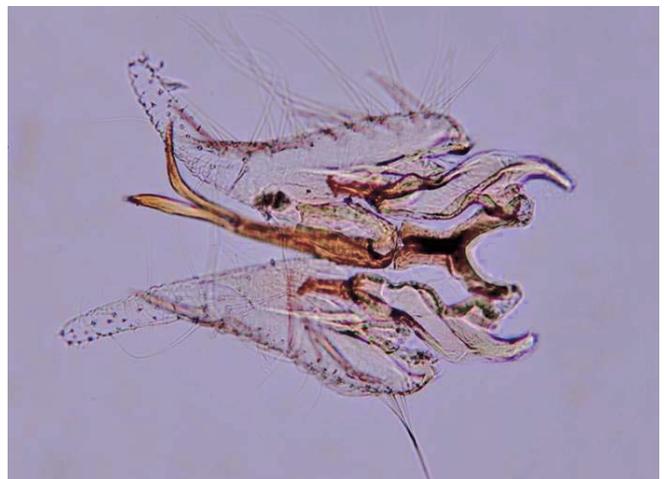
2.1.2 Bestimmung der *Macrosteles*-Arten. In den Jahren 2012 und 2013 erfolgte eine Bestimmung der Arten ausschließlich nach klassischer morphologischer Bestimmung der männlichen Zikaden (siehe 2.1.2.1). Die weiblichen Zikaden können nicht auf die Art bestimmt werden. Die so bestimmten *Macrosteles*-Arten dienten als Referenzprobe für die Etablierung eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens (siehe 2.1.2.2). Dieses wurde dann zur Bestimmung der im Jahr 2014 gefangenen *Macrosteles* sp. herangezogen. Ebenfalls wurden die auf den Leimtafeln gefangenen und positiv auf Phytoplasmen getesteten *Macrosteles*-Zikaden mittels molekularbiologischen Nachweisverfahren auf die Art bestimmt (siehe 2.2.2).

2.1.2.1 Bestimmungen der mittels Kescher gefangenen *Macrosteles*-Arten nach klassischen entomologischen Methoden

Da eine sichere Bestimmung der Weibchen nach morphologischen Merkmalen nicht möglich ist, wurden nur die Männchen berücksichtigt. Dazu wurde der Hinterleib vollständig abgetrennt und in Kalilauge (Kaliumhydroxid 10%) mazeriert. Nach der Abtrennung der Hinterleibspitze und Öffnung des Pygophor waren die für die Bestimmung wichtigen Strukturen, besonders das spermaübertragende Organ Aedeagus, freigelegt. Diese konnten dann mikroskopisch untersucht und beurteilt werden (Abb. 5 bis 8). Zusätzlich wurde die Struktur des männlichen Singapparates im vorderen Teil des Hinterleibs beurteilt. Form und Länge im Vergleich zum 3. Abdominalsternit wurden berücksichtigt. Die Bestimmung der

Tab. 1. Termine der Zikadenfänge in den Jahren 2012 bis 2014

| Jahr | Datum | Kalenderwoche |
|------|--------|---------------|
| 2012 | 07.08. | 32 |
| 2013 | 13.08. | 33 |
| 2014 | 02.09. | 36 |

Abb. 5. *Macrosteles laevis* in Chicoree.Abb. 6. *Macrosteles laevis/sexnotatus* an Spargel.Abb. 7. Männliches Genital von *Macrosteles cristatus*.Abb. 8. Männliches Genital von *Macrosteles sexnotatus*. (Bildnachweis: K. SCHRAMMEYER, Heilbronn)

Zikaden erfolgte nach dem Familienschlüssel von HOLZINGER, KAMMERLANDER, NICKEL sowie auf Gattungs- und Artstatus nach BIEDERMANN, NIEDRIGNHAUS.

2.1.2.2 Bestimmungen der mit Kescher gefangenen *Macrosteles*-Arten mittels Sequenzanalyse

Die *Macrosteles*-Arten wurden mittels Sequenzierung bestimmt. Von der genomischen DNA der *Macrosteles*-Zikaden wurde der COI-Bereich (Cytochrom C Oxidase, Untereinheit 1) untersucht, der bereits in verschiedenen phylogenetischen Studien, sowie bei DNA-Barcoding verwendet wurde. Der COI-Bereich liefert für die meisten Tierarten brauchbare Sequenzinformationen, die zur Artenbestimmung geeignet sind. Auf Basis der Sequenzdaten der bestimmten *Macrosteles*-Arten konnte eine RFLP-Methode (Restriktions-Fragmentlängenpolymorphismus) erarbeitet werden. Hierbei werden die PCR-Produkte mit einem Restriktionsenzym gespalten und damit ein artspezifisches Schnittmuster erzeugt.

Für die DNA-Isolierung wurden ganze *Macrosteles*-Zikaden einzeln in ein Reaktionsgefäß überführt, homogenisiert (zerkleinert) und mit 1,2 ml CTAB-Extraktionspuffer versetzt. Dazu wurde Proteinase (AppliChem) und RNase (AppliChem) zugegeben und für 2 h bei 60°C im Thermoschüttler inkubiert. Der Extrakt wurde durch Chloroform-Phasentrennung vorgereinigt. Die Bindung und Reinigung der DNA wurde mit dem Wizard Clean Up System (Promega) durchgeführt und die gereinigte DNA in sterilem Wasser (Elutionspuffer pH 9) gelöst.

Der COI-Bereich wurde zunächst mittels klassischer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit dem Primerpaar LCO-1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' und HCO-2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' (nach FOLMER et al. 1994) amplifiziert.

Für die PCR wurde ein 25 µl Reaktionsgemisch mit folgenden Komponenten hergestellt: 12,5 µ HotStar Taq Polymerase Mastermix (Qiagen), Primer LCO/HCO je

2 µl und 6,5 µl steriles Wasser vorbereitet und 2 µl DNA dazugegeben.

Die Amplifizierung der DNA wurde auf dem Thermocycler PeqStar 2x (Peqlab) mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

95°C – 15 min, (94°C – 30 sec, 46°C – 60 sec, 72°C – 1 min) × 40 Zyklen, 72°C – 10 min, 12°C ~

Vor der Sequenzierung wurden unerwünschte Nebenprodukte der PCR wie überschüssige Primer, nicht eingebundene Nukleotide und Puffer-Salze mit einem Säulensystem (Wizard PCR Clean Up System, Fa. Promega) abgetrennt. Die Sequenzierung wurde mit dem Sequenzer ABI Prism 310, der Fa. Applied Biosystems (heute Life Technologie) durchgeführt. Ebenso für die Sequenzierreaktion wurden alle Reagenzien von Applied Biosystems verwendet (Big Dye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit, Big Dye terminator Sequencing Buffer und POP 6-Polymer für die Kapillare). Als Sequenzierprimer wurden jeweils der LCO-1490 und HCO-2198 eingesetzt.

Anmerkung: Die Sequenzierreaktion wird mit nur einem Primer durchgeführt, so dass die DNA linear amplifiziert wird. Zu dem Reaktionsansatz werden außer dNTPs die vier mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs (Didesoxynukleosidtriphosphate) in geringer Menge zugegeben, die nach Einbau zu einem Kettenabbruch der Polymerisationsreaktion führen. Diese Kettenabbruch-Produkte werden mittels Kapillarelektrophorese auf dem Sequenzer ABI Prism 310 (Fa. Applied Biosystems) aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zu ddNTP-spezifischer Fluoreszenz angeregt. Die Abfolge der Farbsignale geben direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder und werden in Form eines Elektropherogramms dargestellt. Für die Sequenzierreaktion wurden folgende Reagenzien zusammen pipettiert: 4 µl BD Terminator, 2 µl Sequenzierungs Puffer, 1 µl Primer (5 pmol), 11 µl steriles Wasser und 2 µl DNA (gereinigtes PCR-Produkt) dazugegeben. Die Sequenzierreaktion wurde auf dem Thermocycler, mit dem Programm: 96°C – 1 min, (96°C – 10 sec, 50°C – 5 sec, 60°C – 2 min) × 25 Zyklen, 12°C ~ durchgeführt.

Nach der Sequenzierreaktion wurde ein Reinigungssäulensystem (DyeEx 2.0 Spin Kit der Fa. QIAGEN) eingesetzt, um die restlichen Mengen an Dye-Terminator (mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs) zu entfernen.

Sequenziert wurden Sequenzen in beiden Richtungen (mit Vorwärts- und Rückwärtsprimer) mit einer Länge von 720 bp. Die Sequenzendaten der untersuchten *Macrosteles*-Arten wurden mit der Software „DNASTAR Lasergene, Version 12.1“ ausgewertet.

2.1.3 Überwachung der Aktivität bzw. des Flugverlaufs der Kleinzikaden (*Macrosteles* sp.) mittels gelben Leimtafeln im Feld (b). In den jeweiligen Untersuchungszeiträumen der Jahre 2012 bis 2014 (s. Tab. 2) wurden in zwei Möhrenfeldern jeweils vier gelbe Leimtafeln im Format 5,5 × 12 cm an ca. 40 cm langen Etikettenstäben montiert und im Abstand von etwa zehn Metern entlang eines Möhrendammes aufgestellt. Die Leimtafeln wurden so an den Stäben angebracht, dass sie nach Möglichkeit immer knapp über dem Laub der Möhren platziert waren (s. Abb. 9). Der Möhrendamm mit dem gelben Leimtafeln war dabei mindestens zehn Meter vom Feldrand entfernt.

Die Leimtafeln wurden wöchentlich abgenommen und durch neue ersetzt. Die insgesamt acht abgenommenen Leimtafeln wurden von den Beratern regelmäßig an das LTZ Augustenberg geschickt. Hier wurden alle Kleinzikaden im Labor vorsichtig von den Leimtafeln entfernt. Im Jahr 2012 wurden die so abgetrennten Zikaden in vier Gruppen eingeteilt: *Macrosteles*-Arten, „*Eupterix*“-Arten (Kräuterzikaden), „*Empoasca*“-Arten und weitere Arten. In den Jahren 2013 und 2014 wurde vereinfacht nur nach 2 Gruppen sortiert, *Macrosteles*-Arten und „sonstige Arten“. Anschließend wurden alle abgelösten *Macrosteles* sp. im Labor des LTZ mittels PCR auf Phytoplasmen untersucht.

2.2 Methoden Diagnose

Drei Arbeitsprozesse beinhalteten die Diagnose: Nachweis von Phytoplasmen in gefangenen Kleinzikaden der Gattung *Macrosteles* (c), Bestimmung der mit Phytoplasmen infizierten *Macrosteles* auf die Art und Nachweis der

Tab. 2. Zeitraum der Überwachung in den Jahren 2012 bis 2014

| Jahr | Überwachungszeitraum | Anzahl Wochen |
|------|---------------------------------------|---------------|
| 2012 | 28.03.12 (KW 13) bis 14.11.12 (KW 46) | 33 |
| 2013 | 01.04.13 (KW 14) bis 12.11.13 (KW 46) | 32 |
| 2014 | 16.04.14 (KW 16) bis 28.10.14 (KW 44) | 28 |



Abb. 9. Gelbe Leimtafel im Möhrenbestand. (Bildnachweis: H. SCHNELLER, LTZ Augustenberg)

Phytoplasmen-Gruppe in den infizierten *Macrosteles*-Arten mittels DNA-Sequenzierung (d) und Nachweis von Phytoplasmen in auffälligen Möhren mittels PCR (e).

2.2.1 Nachweis von Phytoplasmen in gefangenen Kleinzikaden der Gattung *Macrosteles* (c). In 2012 wurden zunächst Mischproben von 2 bis 3 *Macrosteles*-Zikaden auf Phytoplasmen untersucht. Nachdem in einigen dieser Mischproben Phytoplasmen nachgewiesen werden konnten, wurden in 2013 und 2014 nur noch Einzeltieruntersuchungen durchgeführt.

Für die Gewinnung der Gesamt-DNA aus den Zikaden wurde die CTAB-Methode nach JARAUSCH et al. (2004) gewählt. Bei diesem Verfahren wird die DNA mit Chloroform-Isoamylalkohol gefällt. Die gewonnenen DNA-Pellets wurden bis zur Durchführung der PCR (Polymerase chain reaction) bei -20°C aufbewahrt und dann in 25 µl TE-Puffer gelöst.

Für den Nachweis der Phytoplasmen wurde eine nested PCR mit Universal-Phytoplasmen-Primern durchgeführt. Die 1. Amplifikation erfolgte mit dem Primer-Paar P1 (DENG und HIRUKI, 1991)/P7 (SMART et al., 1996) und die 2. Amplifikation (nested) mit dem Primer-Paar fU5/rU3 (LORENZ et al., 1995). Die Größe der Amplifikate bei positivem Befund liegt bei ca. 880 bp. Die PCR-Produkte wurden mit Elektrophorese auf einem Agarose-Gel (1,2%) mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.2 Bestimmungen der mit Phytoplasmen infizierten *Macrosteles* auf die Art und Nachweis der Phytoplasmen in den infizierten *Macrosteles*-Arten mittels DNA-Sequenzierung (d). Zur Bestimmung der Phytoplasmen mittels Sequenzierung wurden PCR-Produkte der *Macrosteles*-Proben mit einem positiven Phytoplasmen-Befund herangezogen. Mit den Primern P1-P7/fU5-rU3 wurde mittels nested PCR ein ca. 880 bp Fragment aus dem Bereich des 16S rRNA-Gens amplifiziert. Nach der Reinigung der Amplifikate mit dem Wizard PCR Clean Up System (Fa. Promega) wurden die Sequenzierreaktionen mit den Vorwärts- und Rückwärtsprimern fU5-rU3 durchgeführt. Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden mit dem Säulensystem DyeEx 2.0 Spin Kit (Fa. QIAGEN) gereinigt (genaue Beschreibung siehe 2.1.2.2.) und auf dem Sequenzer ABIPrism 310 sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Software „DNASTAR Lesergene v. 12.1“.

2.2.3 Nachweis von Phytoplasmen in auffälligen Möhren mittels PCR (e). Für die Untersuchung wurde Phloem aus dem Rübenkörper und aus den Blättern bzw. Blattstielen verwendet. Für die Isolierung der Gesamtnukleinsäure aus den Möhren wurde das Verfahren nach MENZEL et al. (2002) gewählt. Bei dieser Extraktionsmethode wird die Nukleinsäure über mehrere Arbeitsschritte an Silica-Partikel gebunden und gereinigt. Als Extraktionspuffer wurde der von MENZEL (2003) empfohlene 6 M Guanidiniumhydrochlorid-Puffer verwendet. Die abschließend in TE-Puffer von den Silica-Partikeln gelöste Gesamtnuklein-

säure wurde bis zur Durchführung der PCR bei -20°C eingefroren.

Der Nachweis der Phytoplasmen erfolgte wie bei den Zikaden-Untersuchungen mit nested PCR (siehe Kapitel 2.2.1).

3 Ergebnisse

Die Darstellungen der Ergebnisse richten sich nach dem Ablauf der Handlungsschritte in dem jeweiligen Untersuchungsjahr: Kescherfänge zur Artbestimmung und als Referenznachweis für PCR (a), Aufstellen der Leimtafeln im Feld und Auswertung der gefangenen Zikaden (b): (a) und (b) = Monitoring; Nachweis von Phytoplasmen in den gefangenen Zikaden (c), Bestimmung der infizierten *Macrosteles*-Arten und Nachweis von ‚Aster-Yellows‘-Phytoplasmen in infizierten Zikaden (d) und in befallenen Möhren (e): (c) bis (e) = Diagnose.

3.1 Ergebnisse Monitoring

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Kescherfänge (a) aus den Jahren 2012 bis 2014 und der anschließend erfolgten Artenbestimmung mit klassischen entomologischen Methoden (morphologischen Merkmale) und mit molekularbiologischen Methoden dargestellt.

Danach folgen die Ergebnisse des Zikaden-Monitorings mittels denen in den Möhrenfeldern aufgestellten gelben Leimtafeln (b).

3.1.1 Ergebnisse Kescherfänge (a)

3.1.1.1 Ergebnisse 2012

Am 07.08.2012 wurden 12 Kleinzikaden aus der Gattung *Macrosteles* gefangen und morphologisch bestimmt (s. Tab. 3). Von diesen 12 Zikaden waren: 9 Männchen von *Macrosteles sexnotatus* und 1 Männchen von *Macrosteles cristatus* sowie 2 Weibchen *Macrosteles* sp., die nicht auf die Art bestimmt werden können.

Von diesen Kleinzikaden wurden anschließend 7 Männchen der Art *M. sexnotatus* auf Phytoplasmen untersucht, die jedoch alle ohne Befund waren.

3.1.1.2 Ergebnisse 2013

Artenverteilung von 31 Männchen der Gattung *Macrosteles* aus einer Stichprobe von 145 Tieren aus einem Kescherfang vom 13.08.2013 in Möhren (s. Tab. 4).

Alle 31 Männchen von *Macrosteles* sp. waren frei von Phytoplasmen.

Tab. 3. Artenverteilung von 10 morphologisch bestimmten Männchen im Jahr 2012

| Herkunft/ Schlag | <i>M. sexnotatus</i> | <i>M. cristatus</i> | <i>M. laevis</i> | <i>M. ossianilssonii</i> |
|---------------------|----------------------|---------------------|------------------|--------------------------|
| 7438/11 | 9 | 1 | 0 | 0 |

Tab. 4. Artenverteilung von 31 morphologisch bestimmbaren Männchen im Jahr 2013

| Herkunft/ Schlag | M. <i>sexnotatus</i> | M. <i>cristatus</i> | M. <i>laevis</i> | M. <i>ossiannilssoni</i> |
|---------------------|-------------------------|---------------------|------------------|--------------------------|
| 7438/7 | 6 | 4 | 5 | 0 |
| 7438/10 | 4 | 1 | 0 | 1 |
| 7438/4 | 5 | 3 | 2 | 0 |
| Summe | 15 | 8 | 7 | 1 |
| Anteil in % | 48,4 | 25,8 | 22,6 | 3,2 |

3.1.1.3 Ergebnisse 2014

Artenverteilung von 27 Kleinzikaden der Gattung *Macrosteles* aus einem Kescherfang vom 02.09.2014 in Möhren. Die Auswertung bzw. Bestimmung erfolgte im Jahr 2014 erstmals per DNA-Sequenzierung (PCR). Von den 27 gefangenen *Macrosteles* (Männchen und Weibchen) waren 18 bestimmbar (s. Tab. 5).

Von den 18 per PCR bestimmbaren *Macrosteles* sp. wurde eine Zikade der Art *M. sexnotatus* positiv auf Phytoplasmen getestet.

3.1.1.4 Zusammenfassungen der Ergebnisse 2012 bis 2014

In Tab. 6 sind die Ergebnisse der Jahre 2012 bis 2014 zusammengefasst dargestellt.

Demnach ist *M. sexnotatus* mit ca. 70% der gefangenen *Macrosteles* die häufigste Art. Die anderen beide Arten *M. cristatus* und *M. laevis* sind mit je ca. 15% am Fang beteiligt. Die Art *M. ossiannilssoni* spielt mit ca. 2% gefangener Tiere dagegen eine untergeordnete Rolle.

Tab. 5. Verteilung von 18 per DNA-Sequenzierung bestimmbaren *Macrosteles*-Arten (Männchen und Weibchen) im Jahr 2014

| Herkunft/ Schlag | M. <i>sexnotatus</i> | M. <i>cristatus</i> | M. <i>laevis</i> | M. <i>ossiannilssoni</i> |
|---------------------|-------------------------|---------------------|------------------|--------------------------|
| 7438/5 | 16 | 0 | 2 | 0 |
| Anteil in % | 88,9 | 0,0 | 11,1 | 0,0 |

Tab. 6. Verteilung der mittels Kescher gefangenen und morphologisch oder molekularbiologisch bestimmten *Macrosteles*-Arten in den Jahren 2012 bis 2014

| Jahr | M. <i>sexnotatus</i> | M. <i>crisatus</i> | M. <i>laevis</i> | M. <i>ossiannilssoni</i> | Summe |
|---------|-------------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------|-------|
| 2012 | 9 | 1 | 0 | 0 | 10 |
| 2013 | 15 | 8 | 7 | 1 | 31 |
| 2014 | 16 | 0 | 2 | 0 | 18 |
| Summe | 40 | 9 | 9 | 1 | 59 |
| Prozent | 67,8 | 15,3 | 15,3 | 1,7 | 100 |

3.1.2 Ergebnisse Leimtafelfänge der Jahre 2012 bis 2014 (b)

3.1.2.1 Anzahlen gefangener Zikaden 2012 bis 2014

In der nachfolgenden Tab. 7 sind die Anzahlen der gefangenen Zikaden für das Jahr 2012 angegeben. Von den insgesamt 1564 gefangenen Zikaden waren 495 Tiere aus der Gattung *Macrosteles*; dies entspricht 31,6% der insgesamt gefangenen Zikaden. Auf die „sonstigen“ Arten entfielen 68,4%; davon auf die *Empoasca*-Arten 49%, auf die *Eupteryx*-Arten ca. 2,3% und auf die weiteren Arten ca. 17,1% (Tab. 8).

Von den „weiteren Arten“ konnten, sofern sie gut erhalten waren, von den Leimtafeln stichprobenhaft folgende Zikaden morphologisch bestimmt: *Anaceratagallia ribauti*, *Errastunus ocellaris*, *Loadelphax striatella*, *Macropsis scutellata*, *Psammodittix alienus* und *Streptanus aemulans*.

In den Jahren 2013 und 2014 wurde vereinfacht nur nach 2 Gruppen sortiert, *Macrosteles*-Arten und „sonstige Arten“. Im Jahr 2013 betrug der Anteil gefangener *Macrosteles*-Arten auf den Leimtafeln 11,9% (s. Tab. 9) und 13,5% im Jahr 2014 (s. Tab. 10). Im Durchschnitt der Jahre 2012 bis 2014 war die Gattung *Macrosteles* am gesamten Zikadenfang auf gelben Leimtafeln mit 17,8% beteiligt (s. Tab. 11). Der prozentuale Anteil an *Macrosteles*-Arten wird stark vom Auftreten der „*Empoasca*“-Arten bestimmt, die in den letzten beiden Jahren (2013 und 2014) gegen Ende der Fangperiode (Ende Oktober) in hohem Maße auf den Leimtafeln gefangen werden konnten.

3.1.2.2 Fangverlauf der Kleinzikade *Macrosteles* sp. an gelben Leimtafeln (b)

In den Abbildungen 10 bis 12 (*alte Zählung 1 bis 3*) wird der Fangverlauf der *Macrosteles*-Arten für die Jahre 2012 bis 2014 dargestellt.

Tab. 7. Im Zeitraum von KW 13 bis 46 im Jahr 2012 auf acht gelben Leimtafeln gefangene Kleinzikaden

| Zikaden-Gruppe | Schlag 7438/12 | Schlag 7438/3 | Summe | Prozent |
|---------------------------|-------------------|------------------|-------|---------|
| <i>Macrosteles</i> -Arten | 216 | 279 | 495 | 31,6 |
| „sonstige“ Arten | 528 | 541 | 1069 | 68,4 |
| Summe/Prozent | 744 | 820 | 1564 | 100,0 |

Tab. 8. Aufteilung der im Zeitraum von KW 13 bis 46 im Jahr 2012 auf 8 gelben Leimtafeln gefangenen „sonstigen“ Arten

| Zikaden-Gruppe | Schlag 7438/12 | Schlag 7438/3 | Summe | Prozent |
|---------------------------|-------------------|------------------|-------|---------|
| „ <i>Empoasca</i> “-Arten | 374 | 392 | 766 | 49,0 |
| „ <i>Eupteryx</i> “-Arten | 18 | 18 | 36 | 2,3 |
| weitere Arten | 136 | 131 | 267 | 17,1 |
| Summe/Prozent | 528 | 541 | 1069 | 68,4 |
| Summe/Prozent | 744 | 820 | 1564 | 100,0 |

Tab. 9. Im Zeitraum von KW 14 bis 46 im Jahr 2013 auf acht gelben Leimtafeln gefangene Kleinzikaden

| Zikaden-Gruppe | Schlag 7438/4 | Schlag 7438/7 | Summe | Prozent |
|-------------------|------------------|------------------|-------|---------|
| Macrosteles-Arten | 97 | 108 | 205 | 11,9 |
| „sonstige“ Arten | 616 | 907 | 1523 | 88,1 |
| Summe/Prozent | 713 | 1015 | 1728 | 100,0 |

Tab. 10. Im Zeitraum von KW 16 bis 44 im Jahr 2014 auf acht gelben Leimtafeln gefangene Kleinzikaden

| Zikaden-Gruppe | Schlag 7438/5 | Schlag 7438/10 | Summe | Prozent |
|-------------------|------------------|-------------------|-------|---------|
| Macrosteles-Arten | 213 | 140 | 353 | 13,5 |
| „sonstige“ Arten | 1183 | 1077 | 2260 | 86,5 |
| Summe/Prozent | 1401 | 1215 | 2616 | 100,0 |

Tab. 11. Im Durchschnitt der Jahre 2012 bis 2014 auf acht gelben Leimtafeln gefangene Kleinzikaden der Gattung *Macrosteles*

| Jahr | Anzahl <i>Macrosteles</i> sp. | Anteil am Gesamtfang in Prozent |
|------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| 2012 | 495 | 31,6 |
| 2013 | 205 | 11,9 |
| 2014 | 353 | 13,5 |
| Durchschnitt der Jahre | 351 | 17,8 |

Betrachtet man den Fangverlauf der drei Jahre, so wird ersichtlich, dass 2 bis 3 Fangspitzen bzw. Flughöhepunkte in Möhrenfelder festgestellt werden konnten (s. Tab. 12).

Die ersten *Macrosteles* auf den Leimtafeln wurden in den Jahren 2012 und 2014 in KW 21 (Mitte Mai), im Jahr 2013 im KW 23 (Ende Mai/Anfang Juni) registriert. Die letzten Zikaden, eine Woche ohne Fang, wurden im Jahr 2012 in KW 46 (Anfang/Mitte November), im Jahr 2013 in KW 44 und im Jahr 2014 ebenfalls in KW 44 (Ende Oktober) festgestellt. Wobei im Jahr 2014 in KW 44 noch 1 *Macrosteles* gefangen wurde (s. Tab. 13). Danach wurde das Monitoring eingestellt.

Es wird deutlich, dass das Auftreten der *Macrosteles*-Zikaden über die drei Jahre sehr ähnlich verlaufen ist. Lediglich im kalten und nassen Frühjahr 2013 war das erste Auftreten der Zikaden auf den Leimtafeln zwei Wochen später.

3.2 Ergebnisse Diagnose

3.2.1 Ergebnisse Nachweise von Aster-Yellows in *Macrosteles* (c). Untersuchung von auf Leimtafeln gefangenen *Macrosteles*-Arten auf Phytoplasmen mittels PCR in den Jahre 2012 bis 2014.

3.2.1.1 Ergebnisse 2012

Im Jahr 2012 wurden im Zeitraum von KW 13 (28.03.12) bis KW 46 (14.11.12) im Rahmen des durchgeführten Zikaden-Monitorings insgesamt 495 *Macrosteles* sp. gefangen. (siehe Kapitel 3.1.2). 304 *Macrosteles* wurden mittels PCR auf Phytoplasmen untersucht, wovon in acht Proben (Mischproben 2 bis 3 Tiere) Phytoplasmen

nachweisbar waren. Das bedeutet, dass 2,6% der *Macrosteles*-Zikaden mit Phytoplasmen infiziert waren.

Alle 8 positiv getesteten *Macrosteles* sp. wurden dabei in den Kalenderwochen 24 bis 26 gefangen.

3.2.1.2 Ergebnisse 2013

Im Jahr 2013 wurden zwischen KW 22 (04.06.13) und KW 44 (28.10.13) 205 *Macrosteles* auf Leimtafeln gefangen. Von den 198 untersuchten Tieren (Einzeltierproben) konnten in 11 *Macrosteles*-Zikaden Phytoplasmen nachgewiesen werden; das entspricht 5,6% infizierte Zikaden.

In KW 25 wurden 3 *Macrosteles* sp., 1 *Macrosteles* sp. in KW 27, in KW 33 wurden 5 und in KW 36 und KW 39 je 1 *Macrosteles* sp. positiv auf Phytoplasmen getestet.

3.2.1.3 Ergebnisse 2014

Im Jahr 2014 wurden zwischen KW 21 (20.05.14) und KW 43 (21.10.14) 353 *Macrosteles* gefangen und auf Phytoplasmen untersucht. Von diesen 353 *Macrosteles* sp. (Einzeltierproben) waren 9 Tiere positiv (Phytoplasmen nachweisbar); das entspricht 2,5% infizierte Tiere.

Zwischen KW 23 und 24 wurde je 1 *Macrosteles* sp., in KW 30 bis 32 wurden 6 und 1 *Macrosteles* sp. in KW 34 positiv auf Phytoplasmen getestet.

Die Ergebnisse der drei Untersuchungsjahre sind in Tab. 14 zusammengefasst. Demnach waren von 855 untersuchten *Macrosteles* 3,3% mit Phytoplasmen infiziert. Die ersten positiv getesteten *Macrosteles* sp. traten in den Kalenderwochen 23 bis 25 (Ende Mai bis Mitte Juni) auf. Weitere positiv getestete Proben waren in den Kalenderwochen 30 bis 34 (Mitte Juli bis Mitte August) zu verzeichnen (s. Tab. 15).

Bei 21 der insgesamt 28 *Macrosteles*-Zikaden, in denen Phytoplasmen nachgewiesen wurden, konnte mittels der molekularbiologischen Methoden die Art bestimmt werden (siehe 3.2.2.).

3.2.2 Bestimmung von mit Phytoplasmen „infizierten“ *Macrosteles* auf die Art mittels Sequenzierung (d).

Zur Auswertung der Sequenzdaten wurde die BLAST-Suchfunktion (Basic Local Alignment Search Tool) in der Lesergene-Software bzw. direkt auf der NCBI-Seite: National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet. Hier wurden *Macrosteles*-Sequenzen mit den Sequenzen aus der NCBI-Datenbank miteinander verglichen und die wahrscheinlichste Übereinstimmung der Sequenzen als Ähnlichkeitsfaktor errechnet. In der NCBI-Datenbank befin-

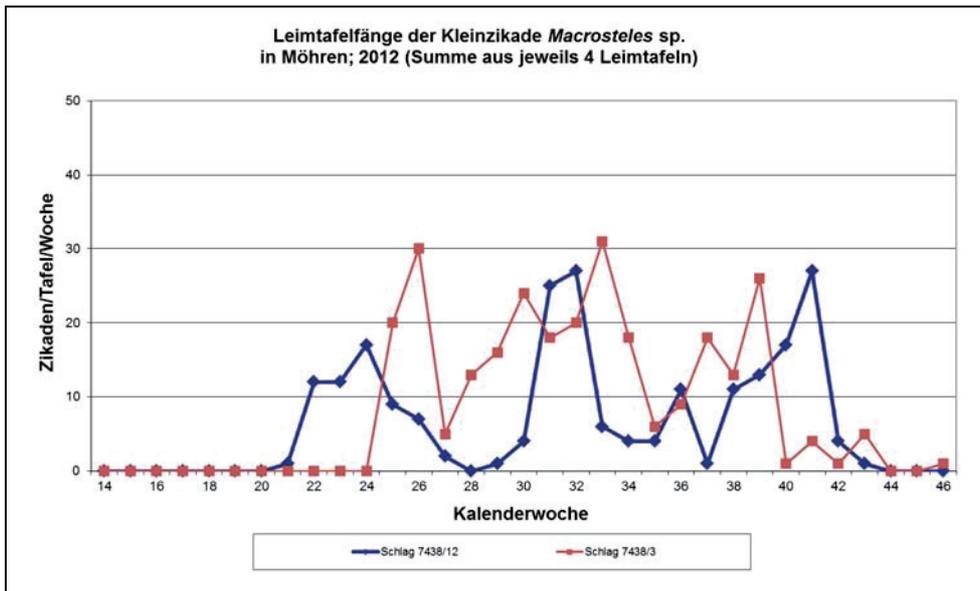


Abb. 10. Fangverlauf der Kleinzikade *Macrosteles* sp. im Jahr 2012.

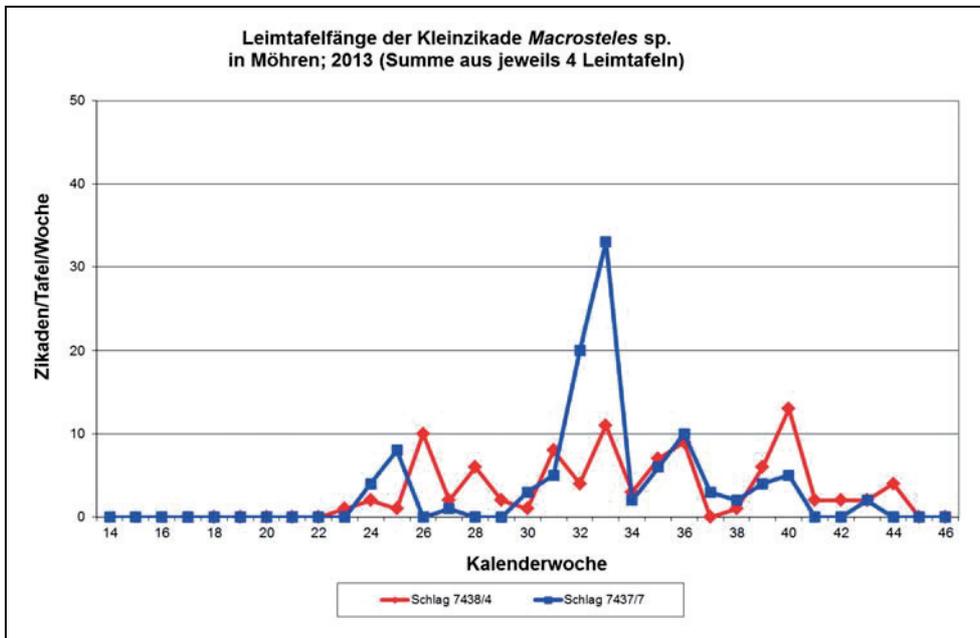


Abb. 11. Fangverlauf der Kleinzikade *Macrosteles* sp. im Jahr 2013.

den sich COI-Sequenzen der Art *M. sexnotatus*, die bei der BLAST-Suche zu Verfügung stehen. Die Arten *M. cristatus* und *M. laevis* wurden nach der sicheren morphologischen Untersuchung sequenziert und als Vergleichssequenz angelegt, um mit allen unbekanntem *Macrosteles*-Sequenzen vergleichen zu können. Der Sequenzenvergleich wurde mit Hilfe der MegAlign-Software (Teil der Lesergene-Software) entweder direkt an zwei Sequenzen (Vergleichssequenz und unbekannte Sequenz) oder mittels phylogenetischer Analyse durchgeführt. Abb. 13 zeigt einen Stammbaum der untersuchten *Macrosteles*-Arten,

der nach der phylogenetischen Analyse mit MegAlign Software, ClustalV-Funktion erstellt wurde.

Im Jahr 2012 wurden von den 8 mit Phytoplasmen infizierten *Macrosteles*-Zikaden 7 Tiere molekularbiologisch untersucht. Alle 7 Zikaden konnten der Art *M. sexnotatus* zugeordnet werden.

Im Jahr 2013 wurden von den 11 mit Phytoplasmen infizierten *Macrosteles*-Zikaden 9 Tiere molekularbiologisch untersucht und folgenden Arten zugeordnet:

4 Tiere waren *M. sexnotatus* und 1 Tier war *M. cristatus*; 4 Zikaden waren nicht (mehr) bestimmbar.

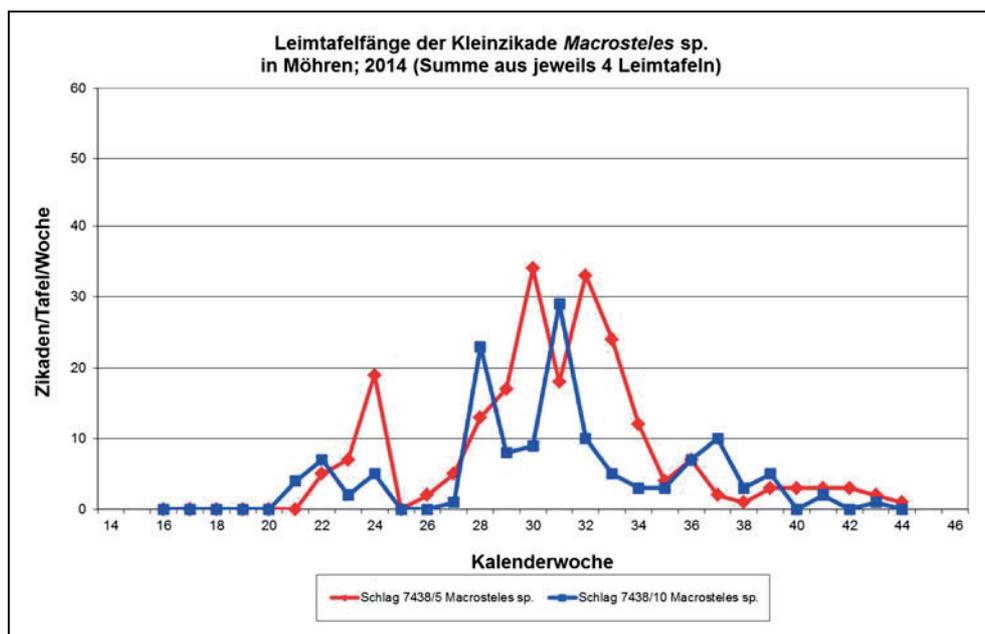


Abb. 12. Fangverlauf der Kleinzikade *Macrosteles* sp. im Jahr 2014.

Tab. 12. Fangspitzen laut Gelbtafelanfängen in den Jahren 2013 bis 2014 (KW = Kalenderwoche)

| Jahr | KW | KW | KW |
|------|---------|---------|---------|
| 2012 | 22 – 26 | 30 – 34 | 40 – 42 |
| 2013 | 24 – 26 | 31 – 33 | 40 |
| 2014 | 22 – 24 | 28 – 32 | 37 |

Tab. 13. Fang der ersten und letzten *Macrosteles*-Zikaden auf gelben Leimtafeln in den Jahren 2012 bis 2014

| Jahr | Erste <i>Macrosteles</i> Kalenderwoche | Letzte <i>Macrosteles</i> Kalenderwoche |
|------|--|---|
| 2012 | 21 | 46 |
| 2013 | 23 | 44 |
| 2014 | 21 | 44 |

Im Jahr 2014 wurden von den 9 mit Phytoplasmen infizierten *Macrosteles*-Zikaden 9 Tiere molekularbiologisch untersucht und folgenden Arten zugeordnet:

7 Tiere waren *M. sexnotatus*, 1 Tier war *M. cristatus* und 1 Tier konnte als *M. laevis* bestimmt werden.

In Tab. 16 sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Artenbestimmung von *Macrosteles* zusammengefasst.

3.2.3 Nachweise von ‚Aster-Yellows‘ in Möhren (e).

Untersuchungen 2012

In 6 Mischproben mit verdächtigen Möhren und unterschiedlich starker Rotfärbung des Laubes und Wurzelbärten wurden in allen Fällen Phytoplasmen nachgewiesen. Der Befall im Feld mit ‚Aster-Yellows‘ (der Phytoplasmen-bedingten Möhrenröte) wurde von den Beratern auf unter 1% geschätzt.

Untersuchungen 2013

In diesem Jahr wurden 24 Proben mit verdächtigen Möhren untersucht. In 16 Möhren mit charakteristischen Symptomen der Möhrenröte wurden Phytoplasmen nach-

gewiesen. Der Befall im Feld mit ‚Aster Yellows‘ wurde von den Beratern auf deutlich unter 1% geschätzt.

Untersuchungen 2014

Es wurden 15 Proben mit verdächtigen Möhren untersucht. In allen Proben wurden Phytoplasmen nachgewiesen. Der Befall im Feld mit ‚Aster yellows‘ wurde von den Beratern wiederum auf deutlich unter 1% geschätzt. Tab. 17 fasst die Ergebnisse für alle drei Jahre zusammen.

In ersten molekularbiologischen Analysen der Phytoplasmen aus Möhren am JKI Dossenheim im Jahr 2012 konnten diese der ‚Aster-Yellows‘-Gruppe zugeordnet werden (SCHNEIDER, persönliche Mitteilung). Spätere Untersuchungen an insgesamt 24 Möhrenproben aus den Jahren 2013 bis 2015 am LTZ bestätigten diese Zugehörigkeit. Ein Vergleich der Sequenzen aus den Möhren mit denjenigen aus den Zikaden (s.u. 3.2.1) zeigte eine Übereinstimmung von 99 bis 100% mit der NCBI-Referenzsequenz für *Candidatus phytoplasma asteris* ((Aster yellows group 16SrI) sowie der von NISBET et al. (2014) ermittelten Sequenz (AC.No. KJ819956). Dieser Erreger

Tab. 14. Anteil der mit Phytoplasmen infizierten *Macrosteles*-Zikaden am Gesamtfang der *Macrosteles*-Arten auf gelben Leimtafeln in den Jahren 2012 bis 2014

| Jahr | Anzahl gefangener <i>Macrosteles</i> | Anzahl untersuchter <i>Macrosteles</i> | Anteil infizierter Tiere | Anteil in Prozent |
|----------------|--------------------------------------|--|--------------------------|-------------------|
| 2012 | 495 | 304 | 8 | 2,6 |
| 2013 | 205 | 198 | 11 | 5,6 |
| 2014 | 353 | 353 | 9 | 2,5 |
| Summe/ Prozent | 1053 | 855 | 28 | 3,3 |

Tab. 15. Zeitliches Auftreten der mittels gelben Leimtafeln gefangenen und positiv getesteten *Macrosteles* sp. in den Jahren 2012 bis 2014 (KW = Kalenderwoche)

| Jahr | erste positiv getesteten Zikaden in KW (Anzahl Tiere) | weitere positiv getesteten Zikaden in KW (Anzahl Tiere) | letzte positiv getesteten Zikaden in KW (Anzahl Tiere) |
|------|---|---|--|
| 2012 | 25 (6 Tiere) 26 (2 Tiere) | | |
| 2013 | 25 (3 Tiere) | 27 (1 Tier) 33 (5 Tiere) | 36 (1 Tier) 39 (1 Tier) |
| 2014 | 23 (1 Tier) 24 (1Tier) | 30 (1 Tier) 31 (4 Tiere) 32 (1 Tier) | 34 (1 Tier) |

wurde bei ähnlicher Symptomausprägung in Möhren auch bereits im Vereinigten Königreich gefunden (NISBET et al., 2014).

4 Diskussion der Ergebnisse

Bei der Untersuchung bzw. Überwachung der Zikaden wurde deutlich, dass mit gelben Leimtafeln ein Nachweis von Kleinzikaden im Feld möglich ist; auch lässt sich die Aktivität der *Macrosteles*-Zikaden erfassen und ihr Flugverlauf abbilden. Die von den Leimtafeln abgelösten Zikaden können im Labor mittels molekularbiologischer

Methoden bis zur Art bestimmt und in den Tieren eventuell vorhandene Phytoplasmen mit Hilfe der PCR nachgewiesen werden. Das in diesen Untersuchungen gefundene ‚*Candidatus* Phytoplasma asteris‘ gehört zur Aster Yellows-Gruppe, welche einen sehr großen Wirtspflanzenkreis umfasst (LEE et al., 2004).

4.1 Monitoring

Mittels Kescherfang konnten 4 *Macrosteles*-Arten in den Möhrenfeldern nachgewiesen werden: *M. sexnotatus*, *M. laevis*, *M. cristatus* und *M. ossiannilssoni*. Dabei war *M. sexnotatus* mit knapp 70% die häufigste Art. Bei den auf Leimtafeln gefangenen Zikaden waren die *Macrosteles*-

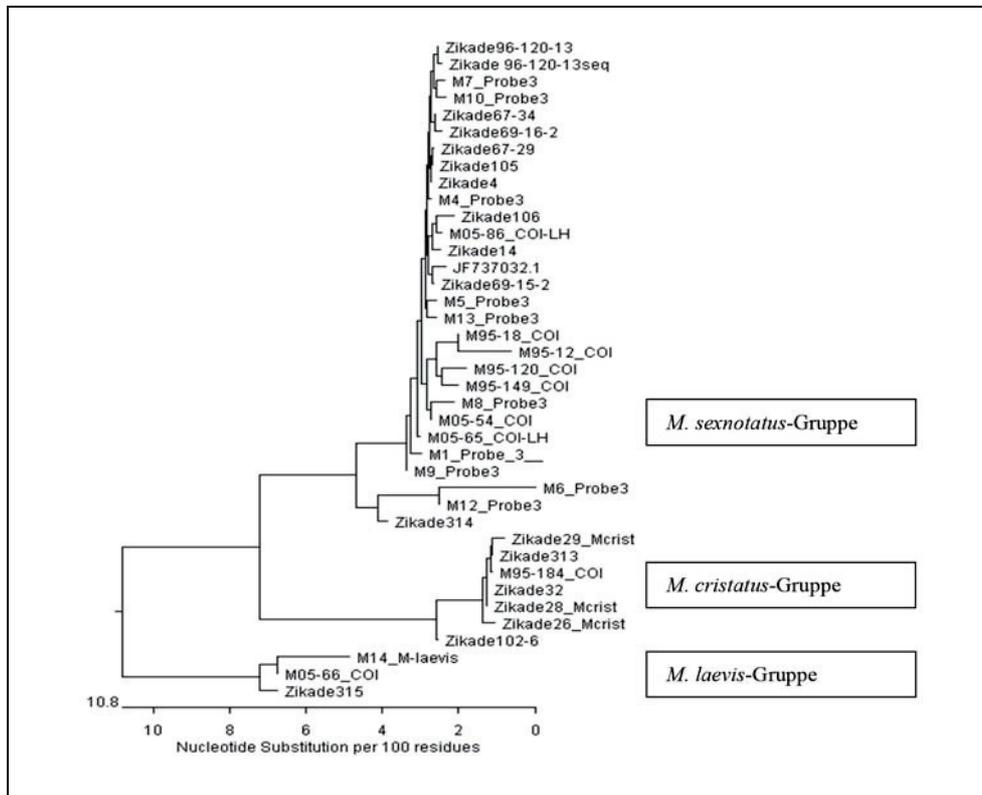


Abb. 13. Stammbaum der untersuchten *Macrosteles*-Arten.

Tab. 16. Artenverteilung der mit Phytoplasmen infizierten *Macrosteles*-Zikaden

| Jahr | Anzahl infizierte Zikaden | Anzahl davon bestimmbare Zikaden | <i>Macrosteles M. sexnotatus</i> | <i>Macrosteles M. cristatus</i> | <i>Macrosteles M. laevis</i> |
|---------|---------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| 2012 | 8 | 7 | 7 | 0 | 0 |
| 2013 | 11 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 2014 | 9 | 9 | 7 | 1 | 1 |
| Summe | 28 | 21 | 18 | 2 | 1 |
| Prozent | | 100,0 | 85,7 | 9,5 | 4,8 |

Tab. 17. Nachweise von ‚Aster-Yellows‘ in Möhren und geschätzter prozentualer Anteil befallener Möhren im Bestand

| Jahr | Anzahl Proben | Anzahl positiv getestete Proben | Befall im Bestand |
|------|---------------|---------------------------------|-------------------|
| 2012 | 6 | 6 | < 1% |
| 2013 | 24 | 16 | < 1% |
| 2014 | 15 | 15 | < 1% |

les-Arten mit ca. 17% Anteil am Gesamtfang relativ stark vertreten. Bei den von den Gelbtafeln isolierten *Macrosteles*-Zikaden mit Nachweis von Phytoplasmen konnte mit molekularbiologischen Methoden, *M. sexnotatus* mit 85,7% als die häufigste Art identifiziert werden. Ferner konnten die in *M. sexnotatus* nachgewiesenen Phytoplasmen der ‚Aster-yellows‘-Gruppe zugeordnet werden. Das bedeutet, dass die Kleinzikadenart *M. sexnotatus* eine große Rolle bei der Übertragung von ‚Aster-Yellows‘ im Untersuchungsgebiet und damit vermutlich in Baden-Württemberg und Deutschland spielt.

Die Flugzeit der Kleinzikaden der Gattung *Macrosteles* erstreckte sich in allen Jahren von KW 21 bis KW 46 (von Mitte Mai bis Mitte November). Dabei deuten die Fangzahlen auf 2 starke Einflüge und je nach Jahr auch auf einen dritten Einflug hin. Die Auswertung der Fallenfänge ergab dabei folgendes Bild:

Frühjahr und Frühsommer. Im Jahr 2012 wurde in KW 21 (Mitte Mai) die erste *Macrosteles* sp. auf den gelben Leimtafeln gefangen. Im Jahr 2013 war dies erst in KW 23, also 2 Wochen später als 2012 der Fall. Vermutlich war das kalte und feuchte Frühjahr im Jahr 2013 dafür der Grund. Im Jahr 2014 war die erste *Macrosteles* sp. dann wieder, wie im Jahr 2012 in KW 21 (Mitte Mai) auf den Leimtafeln zu finden. Dies ist auch der in der Literatur genannte Zeitpunkt, ab dem adulte Zikaden im Jahr an den Pflanzen zu finden sind (KUNZ et. al., 2011).

Im Jahr 2012 war in KW 24 (Mitte Juni) der vorläufig höchste Einflug auf dem zuerst gesäten Möhrenfeld fest-

zustellen (Schlag 7438/12). In dem späteren gesäten Möhrenfeld (Schlag 7438/3) war der höchste Einflug in KW 26 (Ende Juni) zu verzeichnen. Im Jahr 2013 war dies erst in KW 26 der Fall, also 1 bis 2 Wochen später. Im Jahr 2014 war dies wieder in KW 24 (Mitte Juni) in Schlag 7438/5 der Fall. In dieser Fangperiode lassen sich auch die ersten mit Phytoplasmen infizierten *Macrosteles* diagnostizieren.

Sommer. Im Jahr 2012 kam es im Schlag 7438/12 zu Fangspitzen in KW 32 und 41; im Schlag 7438/3 waren die Fangspitzen in KW 33 und 39 festzustellen. Im Jahr 2013 wurden die meisten *Macrosteles*-Zikaden in KW 33 und 40 gefangen. Im Jahr 2014 kam es zu Fangspitzen in KW 30/32 und deutlich abgeschwächt in KW 36. In dieser Zeit konnten im Jahr 2014 auch die meisten (6 positive Tiere) infizierten *Macrosteles* sp. diagnostiziert werden.

Herbst. Die Leimtafelfänge nahmen ab der KW 42/43 (Mitte Oktober) deutlich ab. Das deckt sich mit Literaturangaben, wonach Adulte nur bis Mitte Oktober zu finden sind (KUNZ et al., 2011). Im Jahr 2012 wurde in KW 46 (Mitte November) lediglich noch 1 *Macrosteles* sp. gefangen, nachdem zwei Wochen lang kein Fang mehr voraus ging. Danach wurde das Monitoring eingestellt. Dies war sowohl im Jahr 2012 sowie im Jahr 2013 in KW 46 der Fall. Im Jahr 2014 wurde das Monitoring in KW 44 (Ende Oktober) eingestellt, nachdem nur noch 1 bzw. 0 *Macrosteles* sp. auf den beleimten Gelbtafeln gefangen wurden.

Im Herbst wandern die *Macrosteles*-Zikaden auf ihre Überwinterungspflanzen zurück, wo die Eiablage auf verschiedenen Gräsern erfolgt. Die *Macrosteles*-Arten überwintern im Eistadium, so dass sie bei ihrem Schlupf auf ihren Überwinterungspflanzen im Frühjahr nicht mit Phytoplasmen infiziert sein können. Die ersten positiv getesteten *Macrosteles* sp. traten in den Kalenderwochen 23 bis 25 (Ende Mai bis Mitte Juni) auf. Dieser frühe Nachweis von Phytoplasmen in den Zikaden bedeutet, dass die Tiere bereits infiziert sind, wenn sie das erste Mal in die Möhrenfelder einfliegen. Weitere positiv getestete *Macrosteles* sp. waren in den Kalenderwochen 30 bis 34 (Mitte Juli bis Mitte August) zu verzeichnen. Dies deu-

tet auf eine zweite Einflugwelle mit infizierten *Macrostes* sp. hin.

4.2 Diagnosen

Phytoplasmen aus der ‚Aster-yellows‘-Gruppe lassen sich in rotlaubigen Möhren mit Wurzelbärten molekularbiologisch nachweisen. Die Phytoplasmen sind in Kleinzikaden der Gattung *Macrostes* sp., die mittels Leitafeln gefangen wurden, ebenfalls nachweisbar. Der Anteil an mit Phytoplasmen infizierten Zikaden von *Macrostes* sp. betrug dabei im Durchschnitt von 3 Jahren 3,3%. Dass entspricht in etwa kanadischen Untersuchungen, bei denen 3,8% der untersuchten Zikaden (*Macrostes quadrilineatus*) in den Jahren 2001 bis 2008 in Saskatchewan infiziert waren (aster yellows factsheet: www.agriculture.gov.sk). Gemäß amerikanischen Autoren liegt der Anteil infizierter Zikaden bei 2,5 Prozent (DELAHAUT, 1997). Der von uns ermittelte Wert von 3,3% liegt damit in etwa in der Mitte der Werte dieser Autoren. Diese 3,3% infizierten *Macrostes* sp. verursachten in den drei untersuchten Jahren einen Befall, welcher stets unter 1 Prozent befallener Möhren lag. Dieser Grad der Schädigung war für den betroffenen Landwirt noch tolerierbar. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass so lang der Anteil an infizierten *Macrostes*-Zikaden unter 3,3% ist, auch der Anteil an infizierten Möhren unter 1% bleibt.

Noch nicht geklärt ist die Herkunft der *Macrostes*-Arten. Ein Einflug ist sowohl von den die Möhrenfelder umgebenden Habitaten (Wiesen, Riedflächen), als auch von weiter entfernten Gebieten denkbar. Des Weiteren ist noch nicht geklärt, wo und an welchen Wirtspflanzen sich die Zikaden bei ihrer Migration von ihren Überwinterungspflanzen zu den Möhrenfeldern mit Phytoplasmen infizieren. Offen bleibt ebenfalls die Frage, ob nicht auch adulte Tiere in milden Wintern in geschützten Lagen überleben können und so zur schnelleren Übertragung von Phytoplasmen an Kulturpflanzen, wie Möhren, beitragen können.

Diesen Fragen sowie der Identifizierung potentieller Gegenspieler der Zikaden soll bei weiteren Untersuchungen nachgegangen werden.

Danksagung

Für ausgezeichnete technische Assistenz wird Frau Vanessa LESSLE und Herrn Philipp HERMS (beide LTZ) gedankt. Herrn Dr. Bernd SCHNEIDER (JKI Dossenheim) gebührt Dank für erste molekularbiologische Analysen des Erregers und dessen taxonomische Zuordnung zur ‚Aster yellows group‘.

Literatur

- BIEDERMANN, R., R. NIEDRINGHAUS, 2004: Die Zikaden Deutschlands. Bestimmungstabellen für alle Arten. Scheeßel, WABV Fründ, 409 S.
- DELAHAUT, K.A., 1997: Aster leafhopper. University of Wisconsin. Madison, WI 53706.
- DENG, S., C. HIRUKI, 1991: Amplification of 16 s rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiology Methods* **14**, 53-61.
- DROBNJAKOVIC, T., P. PERIC, D. MARCIC, L. PICCIAU, A. ALMA, J. MITROVIC, B. DUDUK, A. BERTACCINI, 2010: Leafhoppers and Cixiids in phytoplasma-infected carrot-fields: species composition and potential phytoplasma vectors. *Pestic. Phytomed. (Belgrade)* **25**(4), 311-318.
- DUDUK, B., P. PERIC, D. MARCIC, T. DROBNJAKOVIC, L. PICCIAU, A. ALMA, A. BERTACCINI, 2008: Phytoplasmas in carrots: disease and potential vectors in Serbia. *Bulletin of Insectology* **61** (2), 327-331.
- HOLZINGER, W.E., I. KAMMERLANDER, H. NICKEL, 2003: Die Zikaden Mitteleuropas. Leiden (u.a.), Brill, 673 S.
- JARAUSCH, B., N. SCHWIND, W. JARAUSCH, G. KRZAL, 2004: Overwintering adults and springtime generation of *Cacopsylla picta* (synonym *C. costalis*) can transmit apple proliferation phytoplasmas. *Acta Horticulturae* **657**, 409-413.
- KUNZ, G., N. HERBERT, R. NIEDRINGHAUS, 2011: Fotoatlas der Zikaden Deutschlands – Photographic Atlas of the Planthoppers and Leafhoppers of Germany. Scheeßel, WABV Fründ, 293 S.
- LEE, I.-M., D.E. GUNDERSEN-RINDAL, R.E. DAVIS, K.D. BOTTNER, C. MARCONE, E. SEEMÜLLER, 2004: ‚*Candidatus Phytoplasma asteris*‘, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 1037-1048.
- LORENZ, K.-H., B. SCHNEIDER, U. AHRENS, E. SEEMÜLLER, 1995: Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasma by PCR amplification of Ribosomal and Non-Ribosomal DNA. *Phytopathology* **85**, 771-776.
- MENZEL, W., W. JELKMANN, E. MAISS, 2002: Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* **99**, 81-92.
- MENZEL, W., 2003: Entwicklung, Optimierung und Erprobung von Nachweisverfahren von Viren an Apfel und Untersuchungen zur Ätiologie der Gummiholzkrankheit (ARW). Dissertation, Universität Hannover.
- MUNYANEZA, J.E., J.M. CROSSLIN, J.E. UPTON, J.L. BUCHMAN, 2010: Incidence of the beet leafhopper-transmitted virescence agent phytoplasma in local populations of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus*, in Washington State. *Journal of Insect Science* **10**:18 available online: insectscience.org/10.18.
- NISBET, C., S. ROSS, W.A. MONGER, F. HIGHET, C. JEFFRIES, 2014: First report of ‚*Candidatus Phytoplasma asteris*‘ in commercial carrots in the United Kingdom. *New Disease Reports* **30**, 16.
- ORENSTEIN, S., A. FRANCK, L. KUZNETZOVA, I. SELA, E. TANNE, 1999: Association of Phytoplasmas with a yellows disease of carrot in Israel. *Journal of Plant Pathology* **81**(3), 193-199.
- SEITZ, R., 2013: Gemüseanbau im Trend. *Statistisches Monatsheft Baden-Württemberg*. **8**/2013.
- SMART, C.D., B. SCHNEIDER, C.L. BLOMQUIST, L.J. GUERRA, N.A., HARRISON, U. AHRENS, K.-H. LORENZ, E. SEEMÜLLER, C.B., KIRKPATRICK, 1996: Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2988-93.
- STATISTISCHES BUNDESAMT (Hrsg.), 2014: Spargel war auch 2013 das Gemüse mit der größten Anbaufläche. Pressemitteilung vom 06.03.2014, **077/14**.

Weitere Quellen:

- <http://www.agriculture.gov.sk.ca/Default.aspx?DN=138085f7-6d21-41d7-8a92-f43d7f901570>; Aster Yellows factsheet; aktueller Abruf am 22.05.2015.
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; aktueller Abruf am 22.05.2015.