



**Regulierung von Phytoplasmosen
im ökologischen Weinbau
- Risikoanalyse und Lösungsansätze**

Erstellt von:

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Institut für Pflanzenschutz im Weinbau
Brüningstraße 84, 54470 Bernkastel-Kues
Tel.: +49 65319718-21, Fax: +49 65 31/49 36
E-Mail: M.Maixner@bba.de
Internet: <http://www.bba.de>

Gefördert vom Bundesministerium für
Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.



Schlußbericht
zum
Forschungsprojekt Nr. 02OE115

**„Regulierung von Phytoplasmosen
im ökologischen Weinbau
-Risikoanalyse und Lösungsansätze“**

Laufzeit: 01.06.2002 bis 31.12.2003

vorgelegt von:
Dr. Markus Langer
Projektleiter: Dr. Michael Maixner

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Institut für Pflanzenschutz im Weinbau
Brüningstr. 84
D-54470 Bernkastel-Kues



Dezember 2003

Inhaltsverzeichnis

1.	Aufgabenstellung	2
2.	Gesamtziel des Vorhabens	3
3.	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	3
3.1.	Ätiologie der Vergilbungskrankheiten	3
3.2.	Wirtschaftliche Bedeutung der Vergilbungskrankheiten	4
3.3.	Epidemiologie und Regulation der Vergilbungskrankheiten	4
4.	Planung und Ablauf des Projektes	6
5.	Material und Methoden.....	9
5.1.	Risikoanalyse.....	9
5.1.1.	Auswahl der Versuchsflächen.....	9
5.1.2.	Erfassung der Vektoren	10
5.1.3.	Erfassung der potentiellen Wirtspflanzen.....	11
5.1.4.	Befallsbonitur der Reben	11
5.1.5.	Molekulargenetische Analysen	11
5.1.5.1.	DNA-Isolierung aus Zikaden.....	11
5.1.5.2.	DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial.....	12
5.1.5.3.	DNA-Isolierung aus <i>Urtica dioica</i>	12
5.1.5.4.	Durchführung der PCR.....	12
5.1.5.5.	RFLP-Analyse	14
5.2.	Lösungsansätze	14
5.2.1.	Untersuchungen zur Biologie der Larven.....	14
5.2.2.	Bodenbearbeitung.....	14
5.2.3.	Bodenbegrünung	14
5.2.4.	Rebschnitt zur Senkung der Symptomausprägung.....	15
5.2.5.	Biologische Bekämpfung von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	15
6.	Ergebnisse und Diskussion	16
6.1.	Risikoanalyse.....	16
6.1.1.	Erfassung der Vektoren	16
6.1.2.	Erfassung weiterer potentieller Vektorarten	18
6.1.3.	Erfassung der Wirtspflanzen.....	18
6.1.4.	Molekulargenetische Analysen	19
6.1.5.	Befallsbonituren der Versuchsflächen.....	21
6.1.6.	Infektionsdruck.....	23
6.1.7.	Differenzierung der BN-Phytoplasmen.....	24
6.2.	Lösungsansätze	26
6.2.1.	Regulation der Vektoren durch Bodenbearbeitung	26
6.2.2.	Regulation der Ackerwinde durch Begrünung.....	28
6.2.3.	Biologische Bekämpfung von <i>Hyalesthes obsoletus</i>	29
6.2.4.	Rebschnittversuche zur Verminderung des Schadens	30
7.	Resumee.....	30
8.	Kommunikation der Ergebnisse	30
8.1.	Veröffentlichungen	31
8.2.	Vorträge	31
8.3.	Internetangebote	32
9.	Zusammenfassung.....	32
10.	Anhang	34

1. Aufgabenstellung

Die Vergilbungskrankheiten der Rebe sind Bakterienerkrankungen, die die Vitalität der Rebe herabsetzen und durch Ausbildung minderwertiger Trauben die Weinqualität negativ beeinflussen können. Die zellwandlosen Bakterien (Phytoplasmen) werden meist von Wildkräutern durch phloemsaugende Insekten wie Zikaden auf die Reben übertragen. Im Phloem der Reben vermehren sich die Phytoplasmen und führen durch Unterbindung des Saftstromes zu den typischen Symptomen wie Blattrollen, Blattvergilbungen und unverholzten Trieben. Da die Erkrankungen sowohl quantitativ als auch qualitativ das Lesegut beeinträchtigen, kann ein starker Befall ein ökonomisches Problem für die betroffenen Winzer darstellen.

Die verschiedenen Phytoplasmen sind meist sehr wirtsspezifisch und spezifisch an einen oder wenige Vektoren gebunden. Daher ist immer auch das Vorkommen geeigneter Vektoren für einen Ausbruch der Krankheit erforderlich.

Die in Deutschland wichtigsten Phytoplasmen der Stolbur-Gruppe, die die Vergilbungskrankheit (VK) oder Schwarzholzkrankheit der Rebe hervorrufen, sind in den deutschen Weinbaugebieten hauptsächlich an *Convolvulus arvensis* als pflanzliche Wirtspflanze und an *Hyalesthes obsoletus* als Vektor gebunden. Aufgrund der besonderen Habitatansprüche des Vektors ist die Schwarzholzkrankheit ein spezifisches Problem der Weinbergssteillagen. Ob auch andere Zikaden als Überträger dieser Rebkrankheit dienen, wird seit längerer Zeit am Institut für Pflanzenschutz im Weinbau untersucht und sollte auch Teil dieser Untersuchung sein.

Im integrierten Weinbau ist die Bekämpfung der Wirtspflanzen und damit die Verminderung des Infektionsdrucks mit Herbiziden ein häufig praktizierter Versuch der Regulierung der Phytoplasmosen. Dem ökologischen Weinbau steht diese Möglichkeit nicht zur Verfügung. Hier müssen die Wirtspflanzen durch mechanische Bodenbearbeitung oder durch Weinbergsbegrünung kontrolliert werden. Diese Maßnahmen sind allerdings insbesondere in den Weinbergssteillagen problematisch.

Phytoplasmosen sind als Rebkrankheiten sowohl im Ertragsweinbau als auch in der Pflanzgutproduktion von großer Bedeutung. Die Ursachen für die zunehmende Ausbreitung der Krankheiten und die ansteigende Befallsstärke in Deutschland und den meisten anderen europäischen Weinbaugebieten sind noch nicht geklärt. Aufgrund der komplexen Übertragungszyklen der Vergilbungskrankheiten haben Kultur- und Bodenbewirtschaftungsmaßnahmen sowie klimatische Faktoren einen wesentlichen Einfluss. Daher ist es notwendig, zu untersuchen, ob und gegebenenfalls wie sich die Ausweitung des ökologischen Weinbaus - insbesondere in Weinbausteillagen mit besonders hohem Infektionsrisiko - auf den Befallsdruck auswirken kann und durch welche mit dem ökologischen Weinbau kompatible Maßnahmen der Infektionsdruck gesenkt werden kann, um wirtschaftliche Schäden durch Phytoplasmosen zu minimieren.

2. Gesamtziel des Vorhabens

Ziel des Projektes war die Beschreibung der Befallssituation und des Infektionsrisikos durch Vergilbungskrankheiten der Rebe (Phytoplasmosen) im ökologischen Weinbau. Durch Erfassung und Quantifizierung der epidemiologisch wirksamen Parameter (alternative Wirtspflanzen, Vektoren) sollten Ansatzpunkte zur Minderung des Infektionsdrucks unter besonderer Berücksichtigung des ökologischen Weinbaus identifiziert werden. Zur Information der Winzer sollte ein Leitfaden erstellt werden, der es den Praktikern ermöglicht, infizierte Pflanzen zu erkennen und, soweit bereits bekannt, Maßnahmen zur Regulierung der Vergilbungskrankheiten zu ergreifen.

3. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Phytoplasmen sind als Krankheitserreger bei mehreren hundert Pflanzenarten bekannt. Bei der Rebe verursachen sie die Vergilbungskrankheiten, die inzwischen weltweit verbreitet sind. Obwohl verschiedene Phytoplasmen mit Vergilbungskrankheiten assoziiert sind, ist das Erscheinungsbild des Syndroms für alle Erreger nahezu identisch. Dagegen unterscheiden sich die einzelnen Phytoplasmosen in Bezug auf ihre Epidemiologie erheblich, da spezifische Vektoren und zum Teil auch alternative Wirtspflanzen in den Übertragungszyklus integriert sind. Die Entwicklung und Anwendung von Regulierungs- und Kontrollmaßnahmen setzt daher voraus, dass die vorherrschenden Erreger identifiziert und die Übertragungswege bekannt sind. Trotz der erheblich gestiegenen Bedeutung der Phytoplasmosen ist dies bisher erst bei drei Vergilbungskrankheiten, der Flavescence dorée (FD), der FD-Pfalz und der Schwarzholz- oder Vergilbungskrankheit (VK), der Fall. Die Vektoren und Übertragungszyklen der letzten beiden Krankheiten wurden von uns identifiziert und beschrieben. Als Vektor der VK in Deutschland wurde der Cixiide *Hyalesthes obsoletus* identifiziert. *Oncopsis alni* erwies sich als Überträger der FD-Pfalz in Deutschland

Vor der Entwicklung von Bekämpfungsmaßnahmen gegen die FD war der Weinbau in den Befallsgebieten ernsthaft bedroht, während anderen Rebphytoplasmosen keine große Bedeutung zukam. Seit den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts breiten sich jedoch neben der FD auch andere Vergilbungskrankheiten aus und nehmen an Befallshäufigkeit zu. In vielen Gebieten, so auch in Deutschland an Mosel, Nahe und Mittelrhein, übertrifft ihre wirtschaftliche Bedeutung mittlerweile die der wichtigsten Viruskrankheiten.

3.1. Ätiologie der Vergilbungskrankheiten

Erreger der Vergilbungskrankheiten sind Phytoplasmen, zellwandlose, pleomorphe Bakterien aus der Klasse der Mollicutes. Sie sind obligate Zellparasiten in Pflanzen und Insekten und bislang in-vitro nicht kultivierbar. Daher konnte die Ätiologie der meisten Vergilbungskrankheiten erst mit Hilfe molekularbiologischer Arbeitsmethoden aufgeklärt werden.

Ein wesentlicher Durchbruch bei der Charakterisierung der reboopathogenen Phytoplasmen war die Entwicklung molekularbiologischer Nachweismethoden. Die phylogenetische Klassifizierung beruht auf der Analyse von Restriktionsfragmentmustern oder auf dem direkten Vergleich der DNA-Sequenzen. Die Vergilbungskrankheiten der Rebe werden durch Phytoplasmen aus mindestens vier verschiedenen Gruppen hervorgerufen. Als Erreger der VK wurde von uns ein Phytoplasma der Stolbur-Gruppe und als Ursache der FD-Pfalz ein Phytoplasma der Elm-Yellows-Gruppe identifiziert. Sowohl die Erreger der Schwarzholzkrankheit als auch der FD-Pfalz lassen sich in verschiedene Isolate differenzieren, denen jedoch bis zur vorliegenden Studie weder geographische Muster noch eine biologische Bedeutung in Bezug auf die Pathogenität, Epidemiologie oder Wirtsspezifität zugewiesen werden konnte.

3.2. Wirtschaftliche Bedeutung der Vergilbungskrankheiten

Die reboopathogenen Phytoplasmen befallen *Vitis vinifera*- und interspezifische Rebsorten, Unterlagen und Wildreben. Bis heute ist kein resistenter *Vitis*-Genotyp bekannt. Allerdings gibt es Unterschiede in der Stärke der Symptomausprägung bei Ertragsrebsorten, während viele Unterlagsreben infiziert werden, ohne Krankheitssymptome zu entwickeln.

Wir konnten die Schwarzholzkrankheit inzwischen in 10 der 13 deutschen Weinbaugebiete nachweisen. Wirtschaftlich bedeutsame Befallshäufigkeiten erreicht sie jedoch nur in Gebieten, wo die Habitatansprüche des Vektors optimal erfüllt werden. In Deutschland sind dies vor allem die Weinbau-Steillagen an Mosel, Mittelrhein und Nahe, wo regelmäßig Befallshäufigkeiten von 30% und mehr beobachtet werden. Am Mittelrhein verdoppelten sich die Befallswerte seit Beginn der 90er Jahre. Ein Zusammenhang mit klimatischen Faktoren ist dabei nicht auszuschließen.

Infizierte Reben kümmern zunehmend, da die Verholzung der Triebe gestört ist, so dass diese im Winter absterben. Die Erträge kranker Reben sind vermindert und die Mostqualität ist durch hohe Säure- und verringerte Zuckerwerte sowie durch die Bildung von Bitterstoffen erheblich beeinträchtigt. Besondere Probleme bestehen in Lagen mit hohem Infektionsdruck bei der Neu- und Wiederbepflanzung von Rebflächen.

3.3. Epidemiologie und Regulation der Vergilbungskrankheiten

Phytoplasmen sind obligate Zellparasiten, die jedoch in der Regel weder die Samen ihrer Wirtspflanzen noch die Eier ihrer Überträger infizieren. Sie sind daher auf einen zyklischen Wechsel zwischen Pflanze und Vektor angewiesen. Viele Phytoplasmen weisen eine hohe Wirtsspezifität auf und werden nur von einer Vektorart übertragen. Überträger sind ausschließlich phloemsaugende Zikaden oder Psylliden. Die Epidemiologie der Phytoplasmosen wird daher wesentlich durch die Biologie der Überträger determiniert. Ansatzpunkte zur Unterbrechung des Infektionszyklus sind somit nur zu finden, wenn die jeweiligen Überträger bekannt sind.

Die Schwarzholzkrankheit und andere Phytoplasmosen vom Stolbur-Typ sind auch in nördlichen Weinbaugebieten verbreitet. Wir identifizierten die Zikade *Hyaletthes*

obsoletus als Vektor der Schwarzholzkrankheit und beschrieben den natürlichen Zyklus des Erregers zwischen der Ackerwinde als natürliche Wirtspflanze und der Zikade, die nur in Ausnahmefällen an Reben saugt. In Befallslagen kann ein erheblicher Teil der Windenpopulation von diesem Erreger befallen sein und als Infektionsquelle für die Vektoren dienen. So waren z.B. an der Mosel in Weinbergen mit *C. arvensis* als vorherrschendem Unkraut mehr als ein Drittel der getesteten *H. obsoletus* mit dem VK-Phytoplasma infiziert, während der Anteil infizierter Vektoren in einem Weinberg mit anderer Unkrautflora nur ca. 7 % betrug. Schon die an den Wurzeln der Winden saugenden Larven werden infiziert.

H. obsoletus ist eine extrem xerotherme Zikadenart, die sich in Deutschland an der nördlichen Grenze ihres Verbreitungsgebiets befindet. Sie ist polyphag, bevorzugt aber krautige Pflanzen und saugt nur selten an Reben. Allerdings haben die Larven ein engeres Wirtsspektrum als die Adulten. In Weinbergsarealen entwickeln sie sich besonders an *Convolvulus arvensis*, *Urtica dioica*, *Artemisia vulgaris*, *Senecio erucifolius* und *Ranunculus bulbosus*, die entweder in den Rebflächen selbst oder in deren Umgebung wachsen.

Die Schwarzholzkrankheit tritt überall dort auf, wo der Vektor *H. obsoletus* geeignete Bedingungen findet. Obwohl *H. obsoletus* an allen überprüften Standorten mit vergilbungsranken Reben gefunden wurde, erreicht die Zikade nur in mikroklimatisch bevorzugten Lebensräumen hohe Populationsdichten. Dazu gehören die Weinbergs-Steillagen der Weinbaugebiete Mosel-Saar-Ruwer, Mittelrhein und Nahe, wo zugleich auch die Schwarzholzkrankheit ihre höchsten Befallswerte erreicht. Dabei sind neben günstigen Temperaturen auch die Bodenverhältnisse von großer Bedeutung, denn die Larven entwickeln sich an den Wurzeln der Wirtspflanzen, können im Boden aber nicht aktiv graben. Lockere, skelettreiche Böden - wiederum ein Merkmal der Weinbergs-Steillagen - sind besonders günstig für den Vektor.

Phytoplasmosen sind "One-hit-diseases", welche die Wirtspflanzen durch eine einmalige Inokulation dauerhaft und systemisch infizieren. Für die Epidemiologie der Vergilbungskrankheiten sind daher alle Faktoren entscheidend, die das Zusammentreffen infektiöser Vektoren mit den sensiblen Reben beeinflussen. Ein Maß für den Infektionsdruck ist der Anteil infizierter Tiere in einer Vektorpopulation. Daneben spielen aber auch noch Populations- und Aktivitätsdichte der Vektoren, ihr Wirtsspektrum und die Übertragungseffizienz eine Rolle. Wo die übrigen Faktoren den Habitatansprüchen von *H. obsoletus* genügen, besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der krautigen Wirtspflanzen wie der Ackerwinde oder Hahnenfuß und der Populationsdichte dieser Zikade. Die Häufigkeit der mit dem Schwarzholzkrankheit -Phytoplasma infizierten Tiere in den Zikadenpopulationen wird dagegen allein vom Vorkommen der Wirtspflanzen des Phytoplasmas und der Frequenz infizierter Pflanzen bestimmt. Neben der Durchseuchung der Vektorpopulationen ist die Infektionswahrscheinlichkeit auch eine Funktion der Übertragungseffizienz des Vektors, die wiederum von dessen Wirtspflanzenpräferenz beeinflusst wird. So überträgt *H. obsoletus* das Schwarzholzkrankheit -Phytoplasma mit signifikant höherer Effizienz auf krautige Pflanzen als auf Reben.

Zur Abschätzung des Infektionsrisikos müssen Vektoren gefangen und auf Phytoplasmabefall getestet werden. Um ausreichend Untersuchungsmaterial zu erhalten, müssen die Untersuchungsflächen während des Flughöhepunkts der Zikaden beprobt werden, der schon kurz nach Flugbeginn erreicht wird. Zur optimalen Terminierung wurde von uns ein Prognoseverfahren entwickelt, das die Vorhersage des Flugbeginns aufgrund von Luft- und Bodentemperaturdaten ermöglicht.

Durch Phytoplasmosen und Virose infizierte Reben können im Feld nicht geheilt werden. Der Schwerpunkt aller Regulationsmaßnahmen muss daher auf der Unterbrechung der Infektionszyklen liegen und deren spezifische Eigenschaften in Bezug auf Infektionsquellen und die Biologie der Vektoren berücksichtigen. Diese Strategien unterscheiden sich daher erheblich und sind zum Teil besonders für den ökologischen Weinbau problematisch.

Zur Regulation der Schwarzholzkrankheit trägt weder die Rodung kranker Reben bei, da diese kein Glied des natürlichen Zyklus und keine Infektionsquelle für den Vektor sind, noch ist *H. obsoletus* direkt - z.B. durch Insektizide - zu bekämpfen, denn diese Zikade lebt nicht auf Reben und hält sich auch außerhalb der Rebflächen auf. Zudem sind die Entwicklungsstadien im Boden verborgen. Inwieweit die im Boden lebenden Larvalstadien durch Bodenbearbeitungsmaßnahmen geschädigt werden können, war bisher nicht bekannt. Die Regulierung der natürlichen Wirtspflanzen der Zikade und des Schwarzholzkrankheit - Phytoplasmas ist daher ein wichtiger Ansatzpunkt zur Bekämpfung der Schwarzholzkrankheit. Gerade in den stark befallenen Steillagen ist jedoch oft keine geschlossene Begrünung möglich, durch die die konkurrenzschwache Ackerwinde sonst zurückgedrängt wird. Daher wird die Ackerwinde auf solchen Flächen in der Regel durch Herbizide bekämpft, eine Möglichkeit, die im ökologischen Weinbau nicht zur Verfügung steht. Am Institut für Pflanzenschutz im Weinbau wurden bereits Begrünungsvarianten erprobt, die an die Bedingungen im Steilhang angepasst sind. Allerdings muss dabei sichergestellt werden, dass die Begrünungspflanzen nicht selbst als Wirtspflanzen der Phytoplasmen fungieren. Erste Untersuchungsergebnisse dazu liegen vor.

Informationen über die phytopathologische Situation in Bezug auf Phytoplasmosen in ökologisch bewirtschafteten Weinbergs-Steillagen lagen bisher nicht vor. Einerseits erschien es möglich, dass diese Rebflächen durch eine reichhaltigere Flora an Wirtspflanzen von Erregern und Vektoren einem höheren Infektionsrisiko ausgesetzt sind, andererseits fördert eine hohe Biodiversität die natürliche Begrenzungsfaktoren von Schaderregern und Pathogenen und könnte dadurch zu einer Verminderung des Infektionsdrucks beitragen. Das Forschungsprojekt sollte zur Klärung dieser offenen Fragen beitragen.

4. Planung und Ablauf des Projektes

Das Projekt gliederte sich in zwei Bereiche. Zum einen stand vor allem im ersten Untersuchungsjahr die Risikoanalyse im Vordergrund, da bislang aus dem ökologischen Weinbau keine Erfahrungen hinsichtlich dieser Problemstellung vorlagen. Der zweite, weiterführende Schwerpunkt war die Ausarbeitung von Lösungsansätzen, die speziellen Bedingungen des ökologischen Weinbaus

Rechnung tragen sollten. Da auch im konventionellen Anbau eine Bekämpfung der Vektoren mittels Insektiziden nicht sinnvoll ist, können die erarbeiteten Lösungsansätze u. U. auch für die integriert (konventionell) arbeitenden Winzer von Bedeutung sein.

Die Probeflächen wurden im Mai 2002 ausgewählt, da schon in der ersten Juniwoche schon mit dem Flugbeginn der Vektoren gerechnet werden musste. Parallel dazu wurden die Halterungen für die Gelbfallen von der technischen Abteilung angefertigt.

Insgesamt wurden im Jahr 2002 19 Untersuchungsflächen in sieben Gemeinden der Mittel- und Untermosel ausgewählt. Es handelt sich dabei überwiegend um Privatflächen ökologisch arbeitender Winzer, die uns für unsere Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurden.

Die Risikoanalyse bestand zum einen aus der Erhebung der Aktivitätsdichte der Vektorpopulationen, der Dichte potentieller Wirtspflanzen, der molekulargenetischen Analyse zur Abschätzung des Infektionsdrucks und letztendlich der Erfassung der Befallshäufigkeit. Der Anteil befallener Reben wurde mit dem Befall in angrenzenden konventionellen Rebanlagen verglichen.

Der Flugverlauf von *Hyalesthes obsoletus* und anderer Zikadenarten wurde im Jahr 2002 von der 23. bis zur 36. Kalenderwoche, also von Anfang Juni bis Anfang September, anhand der Gelbfallenfänge dokumentiert.

Um die Populationsdichte abzuschätzen, sollten mit Insektenaugern Transekte quantitativ abgesammelt werden. Dieses wurde an einem Standort (Nr. 19) exemplarisch durchgeführt und die Daten mit den Gelbfallenfängen verglichen.

Zusätzlich zum bekannten Vektor *Hyalesthes obsoletus* wurden alle Zikadenarten auf den Gelbfallen erfasst. Daher wurde der Fangzeitraum über die Flugzeit des Vektors *H. obsoletus* bis Ende September 2002 ausgedehnt. Im Jahr 2003 wurde der Flugverlauf von der 24. KW bis zur 30. KW kontrolliert.

Durch die Erfassung der Beikrautvegetation der ökologisch bewirtschafteten Weinberge sollten weitere Kenntnisse über mögliche alternative Wirtspflanzen gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurden im Jahr 2002 insgesamt 65 Vegetationsaufnahmen in allen Untersuchungsflächen durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob eine höhere Diversität der Beikrautvegetation ein erhöhtes Risiko hinsichtlich einer Phytoplasmeninfektion der Reben darstellt.

Die Befallsbonituren der Reben wurden sowohl 2002 als auch 2003 in den Monaten September und Oktober durchgeführt.

Zusätzlich zur Dokumentation des Flugverlaufes von *Hyalesthes obsoletus*, wurde ab Oktober 2002 die Tiefe der im Boden lebenden Larven und deren Entwicklungsstadium dokumentiert, um die Bodenbearbeitungsmaßnahmen, die zur Dezimierung der Vektorendichte führen sollten, besser abzustimmen. Damit wurden erstmals Daten über das Überwinterungsverhalten dieses Vektors erarbeitet.

Die Versuche zur Bekämpfung der im Boden lebenden Larven wurden auf zwei Weinbergsflächen durchgeführt, auf denen eine hohe Populationsdichte der Vektoren beobachtet wurde. Bei diesen Flächen handelte es sich einerseits um eine Brachflä-

che in Graach und andererseits um eine ökologisch bewirtschaftete Ertragsanlage in Kesten.

Ein weiterer Ansatz zur Regulation dieser Rebkrankheit war die Bekämpfung der Wirtspflanzen. Im März 2003 wurde daher, auf einer stark mit *Convolvulus arvensis* bewachsenen Brachfläche, ein Begrünungsversuch begonnen, bei dem Ölrettich, Phacelia und Weidelgras eingesetzt wurde. Diese Arten wurden ausgewählt, da sie sich durch rasche Anfangsentwicklung auszeichnen, Nachtfröste bis zu einem bestimmten Grad gut vertragen, den Boden stark beschatten und gegenüber Trockenheit relativ unempfindlich sind. Von diesen Eigenschaften haben wir uns eine nachhaltige Unterdrückung der relativ konkurrenzschwachen Ackerwinde versprochen.

Um die Symptomausprägung erkrankter Reben direkt zu verringern, wurden im Dezember 2002 Rebschnittversuche auf einer stark befallenen Parzelle am Mittelrhein durchgeführt.

Zusätzlich wurde im Jahr 2003 ein Vorversuch begonnen, der die Eignung des entomopathogenen Pilzes *Metarhizium anisopliae* zur Bekämpfung von *Hyalosthes obsoletus* überprüfen sollte. Diese Versuche wurden in enger Zusammenarbeit mit den Universitäten Mainz und Innsbruck durchgeführt.

5. Material und Methoden

5.1. Risikoanalyse

5.1.1. Auswahl der Versuchsfelder

Die Versuche wurden auf privaten Rebflächen ökologischer Weinbaubetriebe durchgeführt. Durch die Beschränkung auf ökologische Betriebe konnten keine Versuchsfelder in traditionellen Befallslagen genutzt werden, jedoch wurden Rebanlagen, auf denen ein Befall durch Phytoplasmosen bereits bekannt war, bevorzugt. Ausschlaggebend für die Auswahl der Versuchsfelder war daneben die Lage in Steil- bzw. Steilstlagen sowie die Art und Intensität der Bodenbegrünung.

Tabelle 1: Übersicht der Untersuchungsflächen im Jahr 2002 mit Ortsangabe, Name der Winzer (* konventionell arbeitender Winzer), Flächen-Nr., Stockzahl und Zahl der Fallenstandorte (jeweils zwei Gelbfallen)

Flächen-Nr.	Ort	Winzer	Stockzahl	Rebsorte	Fallenstandorte
1	Maring-Noviant	Schneider	602	Riesling	2
2	Maring-Noviant	Schneider	143	Riesling	1
3	Maring-Noviant	Dienhart	1147	Riesling	8
4	Maring-Noviant	Dienhart	510	Riesling	2
5	Maring-Noviant	(Brache)			2
6	Monzel	Schweissel	662	Riesling	4
7	Kesten	Schweissel	506	Regent	2
8	Zell	Stülb	2041	Regent	6
9	Reil	Melsheimer	1161	Riesling	4
10	Reil	Steffens-Keß	656	Riesling	4
11	Reil	Steffens-Keß	714	Riesling	4
12 *	Kröv	Müllers	450	Riesling	2
13	Kröv	Wick	653	Riesling	4
14	Kröv	Wick	349	Riesling	4
15	Lehmen	Weber	1594	Prinzipal, Riesling	6
16	Lehmen	Weber	745	Rondo	4
17	Lehmen	Weber	641	Riesling	4
18	Lehmen	Weber	1088	Riesling	4
19	Lehmen	Weber	210	Riesling	4

Die ursprünglich vorgesehene Zahl der Fallenstandorte wurde 2002 in Abhängigkeit von der Flächengröße und der Eignung des Habitats für *Hyalesthes obsoletus* etwas abgeändert.

Ausgehend von den Ergebnissen des ersten Untersuchungsjahres wurden im Jahr 2003 nur die interessantesten Untersuchungsflächen weiter beprobt, bzw. drei neue Standorte hinzugenommen. Die Zahl der Fallenstandorte pro Fläche wurde dafür wesentlich erhöht. Aufgrund der Ergebnisse des Vorjahres wurden an jedem Fallenstandort die Fallen nur noch in der Höhe der krautigen Vegetation exponiert

Tabelle 2: Übersicht der Untersuchungsflächen im Jahr 2003 mit Ortsangabe, Name der Winzer, Flächen-Nr., Stockzahl und Zahl der Fallenstandorte (** Kontrolliert Umweltschonender Weinbau)

Flächen-Nr.	Ort	Winzer	Stockzahl	Rebsorte	Fallenstandorte
2	Maring-Noviant	Schneider	143	Riesling	8
5	Maring-Noviant	(Brache)			16
7	Kesten	Schweissel	506	Regent	16
8	Zell	Stülb	2041	Regent	14
15	Lehmen	Weber	1594	Prinzipal, Riesling	6
17	Lehmen	Weber	641	Riesling	
18	Lehmen	Weber	1256	Riesling	8
19	Lehmen	Weber	210	Riesling	12
20	Graach	(Brache)			16
21 **	Bacharach	Jost	436	Riesling	6
22	Bacharach	Kauer	1541	Riesling	6

5.1.2. Erfassung der Vektoren

Die Dichte der Vektoren und anderer Zikadenarten wurde standardmäßig mit Gelbfallen analysiert, die im Jahr 2002 sowohl in Höhe der krautigen Vegetation als auch in der Laubzone angebracht wurden und wöchentlich ausgewechselt und ausgewertet wurden. Im Jahr 2003 wurden die Fallen nur bodennah angebracht, da der Fangerfolg in der Laubzone sehr gering war. Diese Methode eignet sich allerdings nur zur Erfassung der relativen Dichte.

Um die absolute Populationsdichte abzuschätzen, wurden Transekte mit Insektenaugern quantitativ abgesammelt. Dieses wurde an einem Standort (Nr. 19) exemplarisch durchgeführt und die Daten mit den Gelbfallenfängen verglichen. Es wurde eine Rebzeile von ca. 20 m Länge während der Flugzeit wöchentlich mit einem Insektenauger abgesaugt und alle Zikaden im Labor ausgezählt.

Die Erfolg der Winterbodenbearbeitung wurde durch Bodenphotoektoren ermittelt. Bodenphotoektoren sind schwarze Zeltkegel, die einen Durchmesser von, in unserem Fall, 55 cm haben und den Boden abdunkeln. Am oberen Ende des Zeltkegels befindet sich eine lichtdurchlässige Fangdose. Die aus dem Boden schlüpfenden und zum Licht strebenden Tiere werden in der Fangdose durch eine konservierende Flüssigkeit abgetötet.

Für die molekulargenetischen Untersuchungen wurden lebend gefangene Tiere benötigt, die durch Abkeschern der Wirtspflanzen gezielt gefangen wurden.

5.1.3. Erfassung der potentiellen Wirtspflanzen

Die Erfassung der Vegetation wurde nach der Methode Braun-Blanquet durchgeführt, bei der die Deckung der Pflanzen auf einer mehrstufigen Skala angegeben wird. Eine Vegetationsaufnahme umfasste dabei eine einheitlich bewachsene Fläche von ca. 1 m². Pro Fläche wurden je nach Heterogenität der Vegetation 3-6 Pflanzenaufnahmen durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass alle Strukturtypen erfasst wurden. Ob verschiedene Pflanzen potentielle Wirtspflanzen für die Vektoren sind, kann unter Umständen im Gelände durch Abkessern der Pflanzenbestände erkannt werden. Symptomatisch aussehende Pflanzen wurden molekulargenetisch auf Infektion getestet. Der Test auf Phytoplasmeninfektion der Pflanzen wurde bei verschiedenen Arten mit Hilfe von PCR-Tests durchgeführt.

5.1.4. Befallsbonitur der Reben

Bei der visuellen Bonitur der Schadsymptome wurden alle Stöcke erfasst, die das folgende Schadbild zeigten (s. Faltblatt zur Schwarzholzkrankheit):

- schwarze Pusteln an einjährigen Trieben
- Vergilbung längs der Blattadern
- nach unten gerollte Blätter
- ungleichmäßige Holzreife
- eingeschrumpfte Beeren

5.1.5. Molekulargenetische Analysen

Die Infektionshäufigkeit der Vektor- und Wirtspflanzenpopulationen wurde mittels molekulargenetischer Methoden nachgewiesen. Hier kamen PCR-basierte Methoden und die RFLP-Analyse von PCR-Produkten zur Anwendung. Die Auftrennung erfolgte mit Agarose- bzw. Polyacrylamidgelelektrophorese.

5.1.5.1. DNA-Isolierung aus Zikaden

Aus einzelnen Zikaden wurde DNA isoliert, indem die Tiere in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 400 µl INRA-Puffer zerrieben und bei 65°C 20 Min. inkubiert wurden. Die Lösung wurde mit 400 µl Chloroform/Isoamylalcohol vermischt und 5 Min. bei 6000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand mit der gereinigten DNA-Lösung wurde abgehoben und mit 400 µl eisgekühltem Isopropanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde bei 22000 g 6 Min. abzentrifugiert, getrocknet und mit 150 µl H₂O gelöst. Die erhaltene DNA bestand nun aus einem Gemisch von Zikaden-DNA und (bei infizierten Proben) Phytoplasmen-DNA, die bei den molekulargenetischen Analysen durch spezifische Primer nachgewiesen werden konnte.

<u>INRA-Puffer</u>	
2%	CTAB
1,4 M	NACL
10 mM	EDTA
100mM	Tris-HCl

5.1.5.2. DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Bei unproblematischen Pflanzenproben wie z.B. *Convolvulus arvensis*, *Calystegia sepium* und *Vitis vinifera* konnte ein CTAB-Verdau (Doyle & Doyle 1990) durchgeführt werden. Hier wurden 120 mg Blattadern mit einer Rasierklinge herausgetrennt, zerkleinert und in einer Reibschale mit 1600 µl Doyle-Puffer zerrieben und mit einer Pasteurpipette (2 ml) in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Extrakt wurde für 30 Min. bei 60°C und 1300 U/min⁻¹ im Thermomixer inkubiert und 2 Min. bei 1400 g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 800 µl in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1000 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1/v:v) wurde das Gemisch 5 Min. bei 3200 g abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 500 µl eiskaltes Isopropanol hinzugegeben und die DNA gefällt. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (6 Min. bei 22000 g) wurde die Flüssigkeit dekantiert und das DNA-Pellet getrocknet und mit 1000 µl H₂O aufgenommen.

Doyle-Puffer

pH 8,0 einstellen
2 % CTAB
1,4 M NaCl
10 mM EDTA
100mM Tris-HCl
0,2 % Mercaptoethanol

5.1.5.3. DNA-Isolierung aus *Urtica dioica*

Infizierte Brennnesseln enthalten einen relativ geringen Phytoplasmentiter und eine hohe Menge PCR-störender Substanzen. Daher wurde hier eine Isolierungsmethode gewählt, bei der die Phytoplasmen-DNA in der DNA-Lösung angereichert werden. 700 mg Blattadern wurden im Mörser unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben und 7 ml eisgekühlter Aufschlusspuffer hinzugefügt. Das Homogenat wurde in 10 ml Oak Ridge Zentrifugenröhrchen überführt und in einer Kühlzentrifuge 5 Min bei 5400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Reaktionsgefäße überführt und 30 min. bei 22000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit CTAB Puffer resuspendiert und mit einem Standard-CTAB-Protokoll weiter bearbeitet.

Aufschluss-Puffer

0,25 M K₂HPO₄·3H₂O
0,06 M KH₂PO₄
0,6 M Sucrose
0,3% BSA (fract.V)
4 % PVP-10

5.1.5.4. Durchführung der PCR

Als Standardtest wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewandt. Dabei kamen von uns entwickelte Primer zum Einsatz, deren Zielsequenz im 16s rRNA-Gen liegen. Diese als rStol/fStol bezeichneten Primer sind spezifisch für die Phytoplasmen der Stolbur-Gruppe. Um die Sensitivität zu erhöhen, wurde bei einigen

Proben auch eine „nested-PCR“ durchgeführt. Dabei wird zunächst mit dem Primerpaar Tuf1 ein größeres DNA-Fragment amplifiziert und in einer folgenden PCR mit dem Primerpaar TufAY ein kleineres, innerhalb der Zielsequenz des größeren Fragments liegendes PCR-Produkt vervielfältigt. Dadurch können Phytoplasmentiter nachgewiesen werden, die wesentlich geringer sind, als die nachweisbaren Pathogentiter durch PCR mit dem Primerpaar fStol/rStol.

Alle PCR-Ansätze wurden mit einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt und enthielten jeweils 0,7 Units Polymerase, je 0,5 µM Primer und die vier dNTP's mit jeweils 125 µM.

Das Temperaturprofil für die Primer fStol/rStol bestand aus 60 Sekunden Denaturierung bei 94°C und aus 35 Zyklen, bestehend aus 60 Sekunden Denaturierung, 60 Sekunden Annealing bei 58 °C und 45 Sekunden Primerextension bei 72 °C.

Das Temperaturprofil für die Primer fTuf1/rTuf1 bestand aus 60 Sekunden Denaturierung bei 94°C und aus 35 Zyklen, bestehend aus 30 Sekunden Denaturierung, 30 Sekunden Annealing bei 45 °C und 60 Sekunden Primerextension bei 72 °C.

Das Temperaturprofil für die Primer fTufAY/rTufAY bestand aus 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C und aus 35 Zyklen, bestehend aus 30 Sekunden Denaturierung, 45 Sekunden Annealing bei 53 °C und 60 Sekunden Primerextension bei 72 °C.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primer

Primerbezeichnung	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Quelle
fStol	GCC ATC ATT AAG TTG GGG A	MAIXNER et al. (1995)
rStol	AGA TGT GAC CTA TTT TGG TGG	
fStol4	TTT AGC GAT ATT GGG AGA A	DAIRE et al. (1997)
rStol4	ATC CTT GAA TTC TTT GAC G	
fTuf1	CAC ATT GAC CAC GGT AAA AC	SCHNEIDER et al. (1997)
rTuf1	CCA CCT TCA CGA ATA GAG AAC	
fTufAY	GCT AAA AGT AGA GCT TAT GA	SCHNEIDER et al. (1997)
rTufAY	CGT TGT CAC CTG GCA TTA CC	

5.1.5.5. RFLP-Analyse

Die Variabilität innerhalb der Stolbur-Gruppe ist relativ gering. Bislang waren nur zwei verschiedene RFLP-Typen bekannt (Typ A und B). Zur Unterscheidung der Stolbur-Typen wurde eine RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analyse durchgeführt. Hierzu wurde eine PCR mit dem Primerpaar fStol4/rStol4 vorangestellt und die Amplifikationsprodukte mit dem Restriktionsenzym (DRA I) versehen. Da diese bisher verwendete Methode zur Unterscheidung der Stolbur-Typen bei vielen positiven Proben zu keinem Ergebnis führte, wurden verschiedene Primer/Enzymkombinationen erfolgreich getestet, wodurch die Nachweismethode nicht nur deutlich vereinfacht, sondern auch zuverlässiger wurde. Für den Nachweis der verschiedenen RFLP-Typen wurde die Primer-Enzym Kombination TufAY und Hpa II eingesetzt. Dazu wurden für 20 µl PCR-Produkt 6,6 U Enzym und Puffer zu den Proben gegeben und die DNA mindestens 2 h bei 38°C im Hybridisierungssofen verdaut. Die Fragmente wurden anschließend in einem 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Einfärben mit Ethidiumbromid unter UV Licht detektiert und dokumentiert.

5.2. Lösungsansätze

5.2.1. Untersuchungen zur Biologie der Larven

Die Biologie der im Boden lebenden Larven war zu Beginn der Untersuchung noch relativ wenig bearbeitet. So war z.B. unbekannt, in welcher Tiefe sich die Tiere genau aufhalten. Um dieses herauszufinden, wurden monatlich Bodenprofile aufgedigelt und der Boden entlang der Wurzeln mit Spateln abgetragen. Die Tiefe der Tiere wurden im Feld ausgemessen und ihre Größe im Labor unter dem Binokular ermittelt. Die so erhaltenen Daten waren Grundlage für die Planung der Bodenbearbeitungsmaßnahmen.

5.2.2. Bodenbearbeitung

Auf einer Brachfläche in Graach wurde im August, nach der Flugsaison des Vektors, eine Hälfte der Fläche gegrubbert, die andere Hälfte wurde zur Kontrolle nicht bearbeitet. Zu dieser Zeit befinden sich die Larven in einem für mechanische Störungen empfindlichen Stadium und halten sich noch in der Nähe der Bodenoberfläche auf.

Die Ertragsanlage in Kesten (Fläche Nr. 7) wurde im Dezember bei Einsetzen der ersten Frostperiode gepflügt, um die vorher tief im Boden geschützten Larven dem Frost auszusetzen.

5.2.3. Bodenbegrünung

Im März 2003 wurde auf einer stark mit *Convolvulus arvensis* bewachsenen Brachfläche ein Begrünungsversuch angelegt, bei dem Ölrettich, Phacelia und Weidelgras eingesetzt wurde. Auf einer 0,1 ha großen Versuchsfläche wurde auf der halben Fläche 5 kg Phacelia, 5 kg Ölrettich und 1,5 kg Weidelgras ausgesät. Das Saatbett

wurde vor der Aussaat gegrubbert und nach der Saat gewalzt. Da die Fläche für den Direktzug zu steil war, wurden diese Arbeiten mit dem Seilzug durchgeführt.

5.2.4. Rebschnitt zur Senkung der Symptomausprägung

An vielen infizierten Rebstöcken, die treten die Symptome nur an einem Trieb oder nur auf einer Seite des Stockes auf. Bei Reberziehungsmethoden, bei denen die Rebe auf zwei Bögen gezogen wird und bei denen nur an einem Bogen Symptome festgestellt wurden, wurde das Zielholz für das nachfolgende Jahr nur von der gesunden Seite verwendet.

Diese Maßnahmen konnten nur an relativ wenigen Stöcken durchgeführt werden, da viele Stöcke auf beiden Seiten Symptome zeigten bzw. auf Grund der Symptome des Vorjahres nur auf einen Bogen gezogen wurden. Der Erfolg wurde im Folgejahr am Befall des Vorjahres gemessen.

5.2.5. Biologische Bekämpfung von *Hyalesthes obsoletus*

Um die Eignung des entomopathogenen Pilzes *Metarhizium anisopilae* zur Bekämpfung von *Hyalesthes obsoletus* zu testen, wurden adulte Tiere mit einer Konidiensuspension besprüht. Der eingesetzte Stamm wurde uns von Herrn Huber, Universität Mainz, zur Verfügung gestellt. Der Versuch bestand aus 2 x 8 Petrischalen, die mit einem Gips-Aktivkohlegemisch ausgegossen waren. Das Gips-Gemisch wurde leicht feucht gehalten. Die Aktivkohle diente dazu, die Tiere besser erkennen zu können, da der Versuch täglich dokumentiert wurde. Die Tiere in acht Petrischalen wurden mit der Suspension besprüht, während acht Petrischalen zur Kontrolle nicht behandelt wurden. In jeder Schale befanden sich 20 Tiere, die nach Geschlecht getrennt wurden. Als Nahrungsquelle diente ein blattloser Windentrieb, der durch die Schale gelegt wurde. Die Durchlässe für den Trieb wurden mit Wachs abgedichtet, um ein Entweichen der Tiere zu verhindern. Die toten Tiere wurden licht- und elektronenmikroskopisch untersucht, um einen Befall mit dem pathogenen Pilz nachzuweisen.

6. Ergebnisse und Diskussion

6.1. Risikoanalyse

6.1.1. Erfassung der Vektoren

Die ersten adulten *Hyalesthes obsoletus* wurden im Jahr 2002 in der 24. KW auf den Fallen registriert, der Flug war nach der 30. KW beendet. In der gesamten Flugzeit wurden 432 *Hyalesthes obsoletus* mit 142 Gelbfallen erfasst. Davon wurden alleine 200 Individuen auf der Fläche in Kesten gezählt. Auf drei der 19 Untersuchungsflächen konnten keine Vektoren festgestellt werden. Auf den restlichen Flächen waren die Fangzahlen in der Regel gering.

Im Jahr 2003 begann der Flug ebenfalls in der 24. KW und endete in der 32. KW. Die letzten Tiere wurden auf Zaunwinde in Kesten festgestellt. Insgesamt wurden 1301 Tiere mit 108 Gelbfallen gefangen. Die hohe Zahl kommt dadurch zustande, dass die Fallen 2003 nur noch in der krautigen Vegetation exponiert wurden und daher mehr bodennahe Fallen pro Fläche ausgewertet wurden. Werden die Standorte miteinander verglichen, die in beiden Jahren untersucht wurden und berücksichtigt man für das Jahr 2002 nur die bodennahen Fallen, ist die Zahl der gefangenen Tiere pro Falle mit 11,86 im Jahr 2002 im Vergleich zu 17,28 Tiere/Falle im Jahr 2003 etwas niedriger.

Tabelle 4: Anzahl der Gelbfallen und Zahl gefangener *Hyalesthes obsoletus*

Flächen-Nr.	Standort	Fallen 2002	H.o.	Fallen 2003	H.o.
1	Maring-Noviant	4	0		
2	Maring-Noviant	2	23	8	71
3	Maring-Noviant	16	3		
4	Maring-Noviant	4	0		
5	Maring-Noviant	4	21	16	39
6	Monzel	8	2		
7	Kesten	4	201	16	459
8	Zell	12	66	14	78
9	Reil	8	16		
10	Reil	8	1		
11	Reil	8	2		
12	Kröv	4	2		
13	Kröv	8	6		
14	Kröv	8	5		
15	Lehmen	12	25	6	65
16	Lehmen	8	6		
17	Lehmen	8	0		
18	Lehmen	8	8	8	49
19	Lehmen	8	45	12	188
20	Graach			16	249
21	Bacharach			6	37
22	Bacharach			6	66
		142	432	108	1301

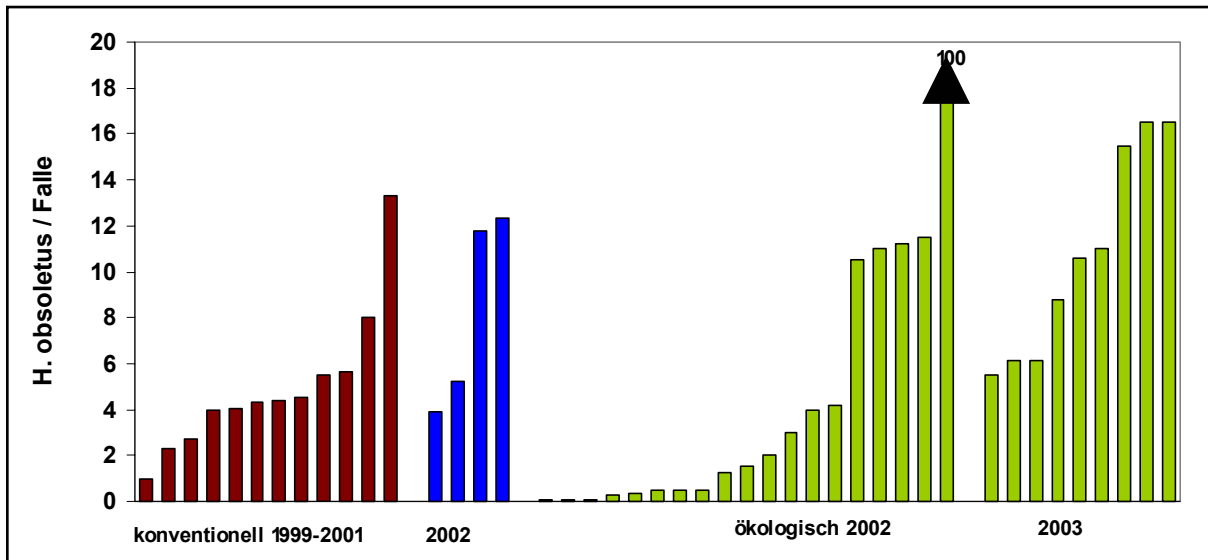


Abbildung 1: Zahl der erfassten *Hyalesthes*/ Gelbfalle im Vergleich zu Fangergebnissen auf konventionellen Flächen

Im Vergleich zu Ergebnissen vorangegangener Jahre auf konventionellen Flächen konnte hinsichtlich der Zahl der erfassten Hyalesthes je Falle kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Anbausystemen festgestellt werden (U-Test: $p=0,107$).

Die Bodenphotoektoren wurden 2002 auf der Untersuchungsfläche Nr. 8 (Zell) aufgestellt, da uns diese für Hyalesthes besonders geeignet erschien. Auf dieser Fläche wurden allerdings auf den Gelbfallen nur wenige und in den Eklektoren keine Tiere registriert. In der Flugsaison 2003 wurden die Eklektoren daher auf der Fläche Nr. 7 (Kesten) aufgestellt, die sich durch besonders hohe Populationsdichten auszeichnete. Sie erwiesen sich als gut geeignet, um den Schlupf adulter *H. obsoletus* zu erfassen.

6.1.2. Erfassung weiterer potentieller Vektorarten

Insgesamt wurden mehr als 6100 Individuen aus 30 verschiedenen Taxa bestimmt (vgl. Tabelle im Anhang). Einige Arten neigten allerdings zu Massenvermehrungen und machten mehr als 80 % der Zikadenfänge aus (z.B. einige Arten der Unterfamilie Typhlocybyinae sowie *Neoaliturus fenestratus*).

6.1.3. Erfassung der Wirtspflanzen

Insgesamt konnten anhand der Vegetationsaufnahmen 58 Pflanzenarten nachgewiesen werden. Zusätzlich geführte Artenlisten haben 23 weitere Arten ergeben.

Insgesamt sind fast alle untersuchten Standorte als extrem artenarm anzusehen. Die Zahl der Pflanzenarten, die unter den trocken-heißen Standortbedingungen der Weinbergssteillagen existieren können, ist naturgemäß eingeschränkt, so variierte die Zahl der Pflanzen pro Vegetationsaufnahme zwischen 2 und 9 Arten.

Pflanzensoziologisch kann man daher nicht von Pflanzengesellschaften sprechen, sondern von Fragmentgesellschaften z.B. des Convolvulo-Agropyron oder *Urtica dioica* – Convolvuletum.

Die Deckung lag in den Untersuchungspartellen zwischen 10% und 90%, bei einem Mittelwert von 64,7 % und einer Standardabweichung von 20,4. Dieses verdeutlicht den hohen Stellenwert der Begrünung im ökologischen Weinbau. Die benachbarten konventionellen Flächen zeichneten sich durch Artenarmut und geringere Vegetationsbedeckung aus, die aufgrund der geringen Deckung allerdings nicht pflanzensoziologisch erfasst werden konnte.

In dieser Untersuchung konnte erstmals die Zaunwinde (*Calystegia sepium*) als Wirtspflanze für Vektoren und Phytoplasmen nachgewiesen werden. Auf der Fläche 19 in Lehmen konnten auch Larven an den Wurzeln gefunden werden und einige Proben positiv getestet werden.

Auf der Fläche 7 in Kesten konnten ebenfalls zahlreiche Tiere an Zaunwinden gefangen werden. Auffallend war hier der deutlich verzögerte Flug der Tiere. Diese zeitliche Verschiebung war bisher nur bei Tieren auf Brennesseln beobachtet worden. Allerdings war dieses Phänomen nur in Kesten und nicht in Lehmen zu

finden. Ebenso wurde ein weiterer Standort gefunden, an dem *Urtica dioica* als Wirtspflanze genutzt wird.

6.1.4. Molekulargenetische Analysen

Im Jahr 2002 wurden mehr als 1000 Proben molekulargenetisch getestet. Für den Routinetest wurde die Primerkombination fStol/rStol eingesetzt.

Die Infektionshäufigkeit der Vektoren variierte stark, allerdings sind nicht auf allen Untersuchungsflächen ausreichend große Stichproben vorhanden, die eine abgesicherte Aussage erlauben. Werden nur die Stichproben mit ≥ 20 getesteten Individuen bewertet, liegt die Infektionshäufigkeit im Jahr 2002 zwischen 27% und 55%. Die Durchseuchung der Vektoren ist damit auf allen Flächen relativ hoch.

Im Jahr 2003 wurden ebenfalls ca. 1000 Proben molekulargenetisch analysiert,

Tabelle 5: Anteil infizierter Hyalesthes in den Jahren 2002 und 2003

Flächen-Nr.	Standort	2002 n	pos. Hya. (%)	2003 n	pos. Hya. (%)
01	Maring-Noviant	1	0,0		
02	Maring-Noviant	99	31,0	71	18,30
03	Maring-Noviant			/	-
04	Maring-Noviant	1	0,0	/	-
05	Maring-Noviant	60	28,0	30	46,60
06	Monzel	10	0,0		
07	Kesten	72	1,0	132	1,51
08	Zell	66	52,0	103	29,12
09	Reil	20	55,0		
10	Reil				
11	Reil	19	37,0		
12	Kröv	1	100,0		
13	Kröv	36	33,0		
14	Kröv	5	20,0		
15	Lehmen	22	27,0	38	18,40
16	Lehmen	30	27,0		
17	Lehmen	4	0,0	53	24,50
18	Lehmen	81	41,0		
19	Lehmen	65	31,0	124	19,35
20	Graach			141	31,20
21	Bacharach			-	-
22	Bacharach			51	13,72

davon ca. 800 Hyalesthes, 115 Zaunwinden, 25 Brennesseln, 30 Reben, und 25 Ackerwinden. Die Proben wurden zunächst standardmäßig mit dem Primerpaar fStol/rStol untersucht. 188 Proben wurden weiterhin mit TufAY analysiert. Ca. 90 Proben konnten daraufhin mit Hilfe einer RFLP Analyse einem der drei bekannten RFLP-Muster zugeordnet werden. 46 Proben wurden Muster A, 27 Muster B und 9 Muster

Neu zugeordnet. Die Verteilung dieser Ergebnisse sagt nichts über die Häufigkeit der verschiedenen Typen aus. Vielmehr ist es ein Ergebnis der Prioritäten hinsichtlich der analysierten Proben. Muster B ist generell das häufigste Muster. Da in der Vergangenheit hauptsächlich Muster B in Zikaden und Ackerwinden gefunden wurde, lag das Hauptaugenmerk in dieser Untersuchung auf Brennessel, Zauwinde und auf Insekten, die auf diesen Wirtspflanzen gefangen wurden. Ziel war es, eine vermutete Wirtspflanzenspezifität der Phytoplasmen und Zikadenpopulationen nachzuweisen.

Die Analyse des spezifischen Risikos des ökologischen Weinbaus ergab erwartungsgemäß ein sehr heterogenes Bild. Die Infektionshäufigkeit der Vektoren lag bei den meisten Untersuchungsflächen zwischen 20 und 50 %, während Untersuchungen auf konventionellen Flächen in den Jahren 1999 bis 2002 eine Infektionshäufigkeit von 30 bis 65 % ergab. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (U-Test, $p=0,029$).

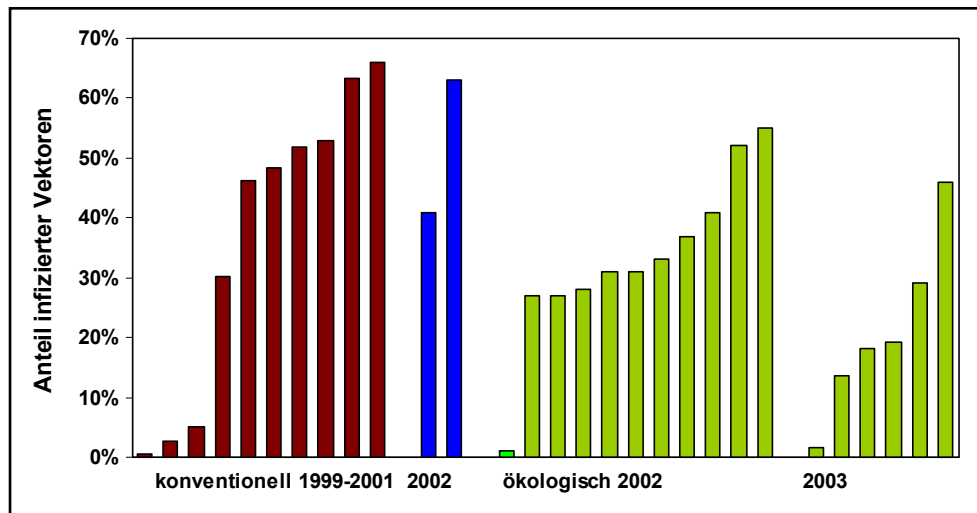


Abbildung 2: Anteil infizierter Vektoren in konventionell und ökologisch bewirtschafteten Weinbergen. Auf den Flächen mit einer Infektionshäufigkeit der Vektoren von 0-5% war *Ranunculus* die vorherrschende Wirtspflanze. In dieser Zusammenstellung wurden nur Flächen dargestellt, auf denen mehr als 19 Individuen lebend gefangen werden konnten.

Dennoch kann aus diesen Daten nicht der Schluss gezogen werden, dass die Durchseuchung der *Hyalesthes*-Populationen generell geringer ist als auf den konventionellen Flächen. Die konventionellen Flächen wurden aufgrund eines hohen Infektionsdrucks ausgewählt, während die Untersuchungsflächen dieser Forschungsarbeit, hinsichtlich des Befalls der Reben und des Infektionsdrucks, unbekannt waren. Auf den Flächen mit dem geringsten Infektionsdruck sind sowohl im ökologischen als auch im konventionellen Anbau *Ranunculus spec.* als Wirtspflanzen zu finden. Anders als *Convolvulus* ist *Ranunculus* zwar eine geeignete Wirtspflanze für *Hyalesthes*, nicht aber für die Phytoplasmen, da *Ranunculus* kurze Zeit nach einer Phytoplasmeninfektion abstirbt und damit nicht als Überwinterungswirt für Pathogen und Vektor dienen kann. Die Durchseuchung der Vektorpopulation wird dadurch wesentlich beeinflusst.

6.1.5. Befallsbonituren der Versuchsflächen

Es wurden im Jahr 2002 insgesamt 21155 Stöcke bonitiert, davon 13449 auf biologisch bewirtschafteten und 7706 auf angrenzenden konventionellen Flächen.

An vielen Standorten konnte deutlich ein geringerer Befall in den ökologischen Weinbergen beobachtet werden. Es wurden in den konventionellen Nachbarflächen teilweise bis zu viermal stärkere Befallszahlen ermittelt (z.B. Flächen-Nr. 6 und 16). An anderen Standorten wurde jedoch auf den konventionellen Flächen geringerer Befall festgestellt, so dass diese Unterschiede nicht signifikant waren (U-Test, $p=0,258$). Auf den ökologisch bewirtschafteten Flächen waren im Mittel 1,7 % der Rebstöcke infiziert. Auf den konventionellen Weinbergen lag der durchschnittliche Befall 2002 bei 2,8 % (vgl. Tabelle). Diese Unterschiede sind möglicherweise auf eine geringere Stickstoffversorgung und Vitalität der Reben zurückzuführen, da nach unseren Beobachtungen gesunde und mit Stickstoff gut versorgte Reben meist deutlichere Symptome zeigen als mangelernährte bzw. durch Krankheiten geschwächte Reben. Hinsichtlich des Befalls zeigen verschiedene Rebsorten unterschiedlich starke Symptome. In der Abbildung 3 wurden daher nur die Flächen gegenübergestellt, die mit Riesling bestockt waren.

Diese Werte der konventionell bewirtschafteten Rebflächen zeigen, dass unsere Untersuchungspartellen nicht in Arealen mit besonders hohem Infektionsdruck liegen, wo auch die Befallshäufigkeiten häufig 30 % deutlich übersteigen.

Im Jahr 2003 wurden 13474 Stöcke bonitiert, davon 9011 auf ökologisch bewirtschafteten Flächen und 4463 auf konventionellen Flächen. Der durchschnittliche Befall war mit 3,1 % auf den ökologischen Flächen etwas niedriger als auf den konventionellen Flächen (3,7%). Der Unterschied zwischen den beiden Anbausystemen war also im Jahr 2003 nicht so groß wie im Jahr 2002. Insgesamt fällt allerdings auf, dass der Befall 2003 im Vergleich zu 2002 doppelt so hoch war. Dieses ist sicher auf die trocken-heiße Witterung der letzten Saison zurückzuführen.

Tabelle 6 : Übersicht über die Boniturdaten 2002 und 2003 der Untersuchungsflächen und angrenzender konventionell bewirtschafteter Weinberge

Flächen-Nr.	Standort	Anbausystem	n	kranke Reben 2002	% Befall 2002	n	kranke Reben 2003	% Befall 2003
1	Maring-Noviant	ökologisch	602					
2	Maring-Noviant	ökologisch	143			143	0	
2b	Maring-Noviant	konventionell	738	7	0,90			
3	Maring-Noviant	ökologisch	1174	7	0,60			
4	Maring-Noviant	ökologisch	510					
4b	Maring-Noviant	konventionell	622					
6	Monzel	ökologisch	662	6	0,90			
6b	Monzel	konventionell	317	12	3,80			
7	Kesten	ökologisch	506			506	0	
7b	Kesten	konventionell	371	1	0,30	382	5	1,30
8	Zell	ökologisch	2041			2041	20	0,90
8b	Zell	konventionell	1178	14	1,10	1178	1	0,08
9	Reil	ökologisch	1161	30	2,60			
9b	Reil	konventionell	636	16	2,50			
10	Reil	ökologisch	656	20	3,00			
10b	Reil	konventionell	480	20	4,20			
11	Reil	ökologisch	714	8	1,10			
11b	Reil	konventionell	276	5	1,80			
12	Kröv	konventionell	450	8	1,80	450	1	
13	Kröv	ökologisch	653	5	0,80	650	14	2,20
13b	Kröv	konventionell				544	36	6,60
14	Kröv	ökologisch	349	9	2,60	216	8	3,70
14b	Kröv	konventionell	509	9	1,70	550	15	
15	Lehmen	ökologisch	1594	33	2,00	1594	20	1,20
16	Lehmen	ökologisch	745	7	0,90			
16b	Lehmen	konventionell	1069	34	3,10			
17	Lehmen	ökologisch	641	84	13,10	641	96	14,90
18	Lehmen	ökologisch	1088	18	1,40	1256	29	2,40
18b	Lehmen	ökologisch	375	44	11,70	213	52	24,40
19	Lehmen	ökologisch	210	6	2,80	210	13	6,10
19b	Lehmen	konventionell	685	45	6,50	712	50	7,00
19c	Lehmen	konventionell				211	17	8,00
21	Bacharach	konventionell				436	41	9,40
22	Bacharach	ökologisch				1541	34	2,20

Da im Jahr 2002 auf verschiedenen Flächen in Lehmen ein besonders starker Befall auf der unteren Terrasse festgestellt wurde, wurde z.B. auf der Fläche 18b im Jahr 2003 nur die untere Terrasse bonitiert. Hier hat der Befall von 14% auf 24,4 % stark zugenommen.

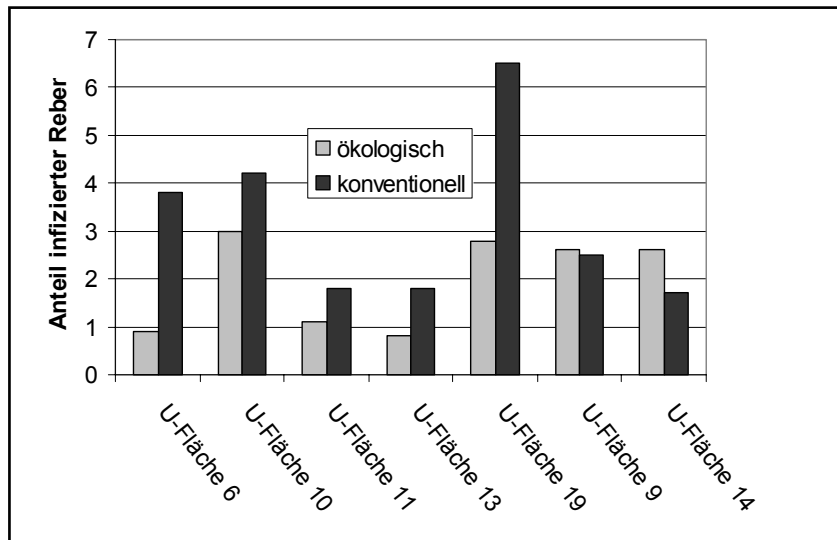


Abbildung 3: Anteil infizierter Reben in verschiedenen, mit Riesling bestockten, Untersuchungsflächen (ökologisch) und direkt benachbarten Flächen. Flächen, die mit anderen Rebsorten bestockt waren, wurden hier nicht dargestellt. Ebenso weggelassen wurden Flächen, die keine direkt benachbarte Ertragsanlage hatten.

Viele Rebsorten zeigen eine schwächere Symptomausprägung als z.B. der Riesling, obwohl auch sie infiziert werden können. Dennoch sind gegen Phytoplasmen resistente Rebsorten bisher nicht bekannt. Die geringe Symptomausprägung der Sorte Spätburgunder ist seit langem hinreichend bekannt, bei den interspezifischen Sorten Regent und Rondo lagen bisher keine Erfahrungen vor. An einem Standort am Mittelrhein zeigte die Rebsorte Regent relativ starke Symptome.

6.1.6. Infektionsdruck

Ob es einen statistischen Zusammenhang zwischen Infektion der Reben und dem Anteil infizierter Zikaden gibt, wurde mit einer Regressionsanalyse untersucht.

Grundsätzlich ist natürlich nicht nur der Anteil infizierter Vektoren von Bedeutung, sondern auch die Zahl der infizierten Tiere, der Ernährungszustand der Reben, die Rebsorte, die Bewirtschaftung während des Fluges und der Infektionsdruck vorangegangener Jahre.

Auf den Untersuchungsflächen konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Anteil der infizierten Reben und der Anzahl infizierter Hyalesthes je Gelbfalle nachgewiesen werden ($R^2=0,879$, $p=0,002$). Hierzu wurden die Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse mit den Fangzahlen der Gelbfallen in Beziehung gesetzt. Hinsichtlich des Infektionsrisikos sind zwei Faktoren ausschlaggebend: der Anteil infizierter Tiere in der Population und die Populationsdichte (angegeben als relative Abundanz).

Abbildung 4 zeigt die grafische Darstellung der Ergebnisse der Regressionsanalyse. In diese Analyse sind nur die Flächen eingegangen, für die eine ausreichend gute Datenbasis hinsichtlich der infizierten Vektoren gegeben war ($n \geq 20$).

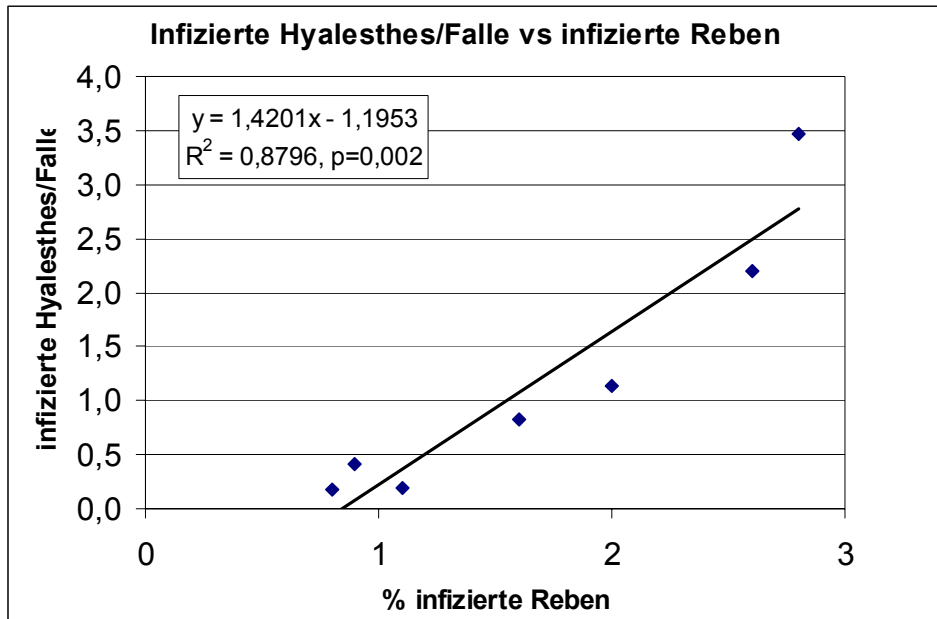


Abbildung 4: Lineare Regression zwischen der Anzahl infizierter *Hyalesthes obsoletus* je Gelbfalle und dem Anteil infizierter Reben

Diese Korrelation zwischen Infektionsdruck und Infektionshäufigkeit der Reben war überraschend, da frühere Ergebnisse dieses so deutlich nicht gezeigt haben. Die Infektion der Reben kann unter Umständen mehrere Jahre zurückliegen, so dass der aktuelle Befallsdruck die Infektionshäufigkeit nicht immer so deutlich wiedergibt. Im Fall der untersuchten biologisch bewirtschafteten Flächen ist dieser Zusammenhang möglicherweise so deutlich, da die Flächen meist jünger als zehn Jahre sind und die Windenbekämpfung in vielen Fällen nicht so effektiv ist wie im konventionellen Weinbau.

6.1.7. Differenzierung der BN-Phytoplasmen

Die RFLP-Analyse, die Aufschluss über den Typ der Stolbur-Phytoplasmen geben sollte, hat interessante neue Erkenntnisse hervorgebracht.

Die übliche Unterscheidung der zwei bekannten Typen des Stolbur-Phytoplasmas mit dem Primer Stol4 und der Restriktionsendonuclease DRA I hatte ergeben, dass beide Typen (Typ A und Typ B) am Standort Lehmen (Fläche Nr. 19) vorhanden sind. Dieses allein war schon ungewöhnlich, da der Typ A bisher nur in der Pfalz an Brennessel gefunden wurde. Da die beschriebene Methode (Stol4/DRA I) bei vielen positiven Proben keine Ergebnisse liefert, wurde nach einer besseren Möglichkeit zur Unterscheidung beider Typen gesucht. Wir sind dabei auf die Kombination des Primers TufAY mit dem Restriktionsenzym HPA II gestoßen, die die Bestimmung deutlich vereinfacht. Weiterer Vorteil ist, dass die Proben nun auch mit einer LM-Spezial-Agarose identifiziert werden können und die Auftrennung mit PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nicht mehr unbedingt erforderlich ist.

Bei weiterer Analyse der Proben wurde in *Calystegia sepium* ein bisher unbekannter Typ der Stolbur-Gruppe gefunden (Abbildung 5). Da an Standort 19 ebenfalls erstmalig der Nachweis erbracht wurde, dass *Calystegia sepium* eine Wirtspflanze für Phytoplasmen und Hyalesthes sein kann, testen wir zurzeit, ob es einen Zusammenhang zwischen Wirtspflanze und Phytoplasmentyp gibt. Typ A wurde bisher nur an *Urtica dioica* gefunden und war in Deutschland nur von einer ökologisch bewirtschafteten Fläche in der Pfalz bekannt. Auf der Untersuchungsfläche 19 in Lehmen, wurde erstmalig der Typ A, an der Mosel gefunden. Da die entsprechenden Vektoren ebenfalls an Brennessel gefangen wurden, vermuten wir, dass es sich hier um wirtspflanzenspezifische Typen handelt.

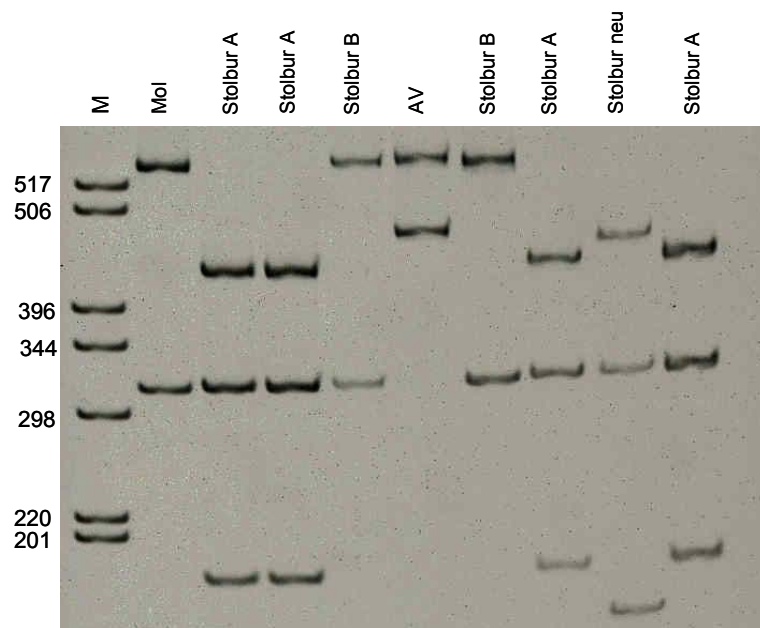


Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung eines Polyacrylamidgels zur Unterscheidung der Stolbur-Typen A (*H. obsoletus* von Brennessel gefangen), B (aus Acker- und Zaunwinde bzw. *H. obsoletus*) und des neuen Typs ‚Stolbur neu‘ (aus Zaunwinde bzw. *H. obsoletus*). Der Stolbur-Typ Moliere (Mol) kann mit dieser Primer/Enzymkombination nicht von Stolbur B unterschieden werden. AV, zum Vergleich, ist ein Isolat aus der Aster-Yellows-Gruppe, die bisher nur in Italien in Reben gefunden wurde.

Tabelle 7: RFLP-Profile der Stolbur-Phytoplasmen aus Catharantus-Isolaten oder natürlichen Wirtspflanzen und Vektoren in Weinbergsarealen

VK-Typ	RFLP Profil		Phytoplasma-Quelle	Verbreitung in Deutschland
	Stol4 / Dral	tufAY / Hpal		
I	A	a	<i>Vitis vinifera</i> <i>Urtica dioica</i> (Deutschland, Frankreich ¹) <i>Hyalesthes obsoletus</i> from <i>Urtica dioica</i> (<i>Catharantus roseus</i> : SA-1, SA-2, VK1925)	Baden, Bergstrasse, Mosel, Nahe, Pfalz
II	B	b	<i>Vitis vinifera</i> <i>Convolvulus arvensis</i> <i>Hyalesthes obsoletus</i> from <i>C. arvensis</i> <i>Calystegia sepium</i> , <i>Prunus spinosa</i> , <i>Solanum nigrum</i> (<i>Catharantus roseus</i> : CH-1, CA-1, GGY, Stol, StolF)	Alle Weinbaugebiete mit VK
III	B	c	<i>Calystegia sepium</i> <i>Hyalesthes obsoletus</i> from <i>C. sepium</i>	Mosel
-*	C	b	(<i>Catharantus roseus</i> : DEP)	

*nicht in Reben Proben 1) von E. Boudon-Padieu, Dijon

6.2. Lösungsansätze

6.2.1. Regulation der Vektoren durch Bodenbearbeitung

Zusätzlich zur Dokumentation des Flugverlaufes, wurde ab Oktober 2002 die Tiefe der im Boden lebenden Larven und deren Entwicklungsstadium dokumentiert, um die Bodenbearbeitungsmaßnahmen, die zur Dezimierung der Vektorendichte führen sollte, besser abzustimmen. Damit wurden erstmals Daten über das Überwinterungsverhalten dieses Vektors erarbeitet.

Tabelle 8: Zahl der erfassten Larvalstadien von *Hyalesthes obsoletus*, deren mittlere Tiefe im Boden und Körpergröße

Datum	Bodentiefe	Körpergröße	n
29.10.2002	11,62±2,35	1,54±0,206	24
21.11.2002	11,46±1,65	1,54±0,198	25
18.12.2002	18,00±4,97	1,45±0,127	25
27.01.2003	14,77±2,48	1,37±0,126	22
11.02.2003	16,04±4,19	1,50±0,103	23
24.03.2003	15,64±3,45	1,26±0,160	25
08.05.2003	9,00±1,34		12

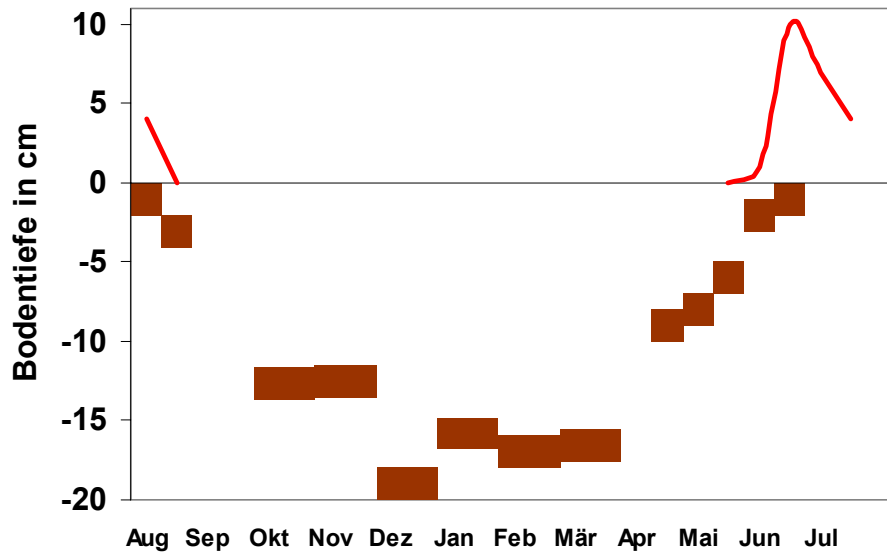


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bodentiefe, in der sich die Larven von *Hyalothetes obsoletus* von Oktober bis März aufhalten. (die Daten von Mai bis September stammen von Untersuchungen vorangegangener Jahre). Die Kurve stellt den Flugverlauf der adulten Tiere dar.

Da die Tiere im Winter bis zu einer Tiefe von ca. 20 cm zu finden waren, konnten sie durch Pflügen an die Oberfläche befördert und dem Frost ausgesetzt werden.

Feldbeobachtungen nach dem Winterpflügen haben schon gezeigt, dass wenige Tage nach der Bearbeitung nur noch tote Larven gefunden werden konnten.

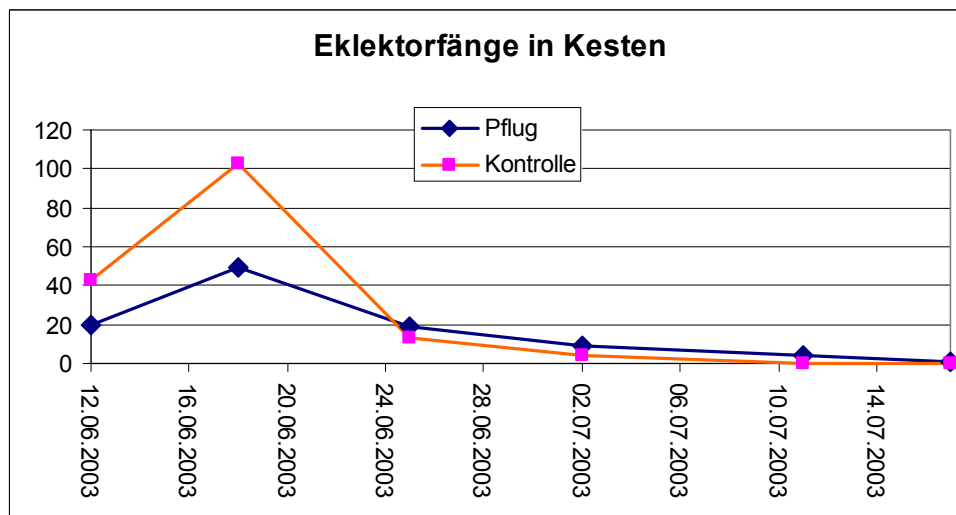


Abbildung 7: Ergebnisse der Eklektorfänge auf der Fläche Kesten. Dargestellt sind die Fangzahlen in der gepflügten Variante im Vergleich zur unbearbeiteten Kontrollfläche

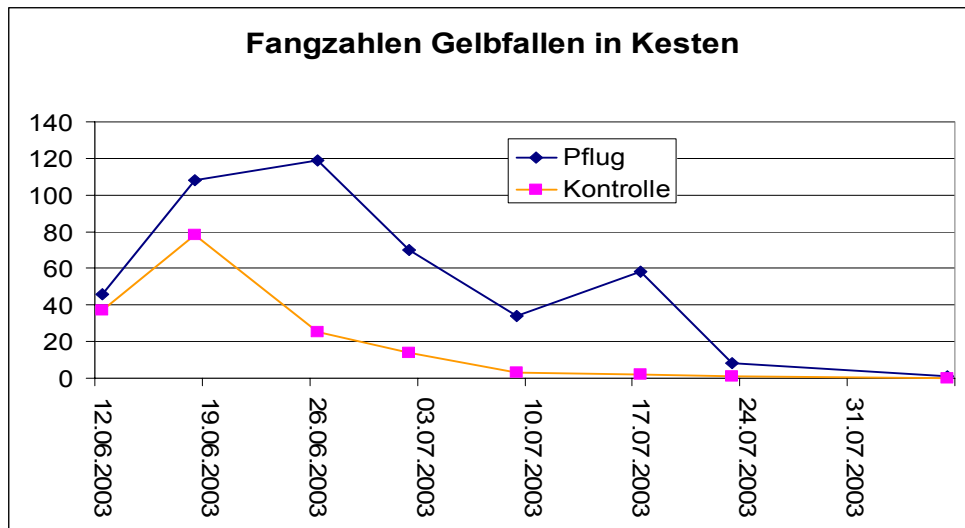


Abbildung 8: Gelbfallenfänge von *Hyalesthes obsoletus* auf der gepflügten und unbearbeiteten Variante

Die Ekletorfänge zeigen, dass die Zahl der aus dem Boden schlüpfenden Tiere um ca. 40 % verringert werden konnte. Im Vergleich dazu zeigen die Fallenfänge ein völlig anderes Bild. Hier liegt die Zahl der Tiere in der gepflügten Variante höher als in der Kontrollvariante. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Erfolgskontrolle mit Gelbfallen nicht sinnvoll ist, da es zu einem seitlichen Zuflug von der Kontrollfläche zur gepflügten Fläche kommen muss. Es ist auch möglich, dass sich die überlebenden Tiere nun im Unter-Stock-Bereich konzentrieren, da dort die *Ranunculus*-Wirtspflanzen durch das Pflügen nicht beeinträchtigt wurden. Im Unter-Stock-Bereich waren auch die Gelbfallen angebracht.

Die Zahl der Gelbfallenfänge hat sich trotz Verachtfachung der bodennah angebrachten Fallen nur verdoppelt, was zum einen ein Effekt der Bodenbearbeitung sein kann, aber auch durch die starke Entnahme von Individuen im Vorjahr zurückzuführen sein kann.

Das Pflügen der Weinberge im Herbst und Frühjahr war früher in den Steillagen eine Maßnahme zur Beikrautregulation und zum Schutz des Rebstammes vor Frost. Aus arbeitswirtschaftlichen Gründen ist es heute nicht mehr üblich. Wie unsere Versuchsergebnisse zeigen, kann durch diese Maßnahme auch die Populationsdichte der Phytoplasmavektoren vermindert werden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass der Verzicht auf eine regelmäßige Bodenbearbeitung mit zu der starken Zunahme der Phytoplasmosen beigetragen hat.

6.2.2. Regulation der Ackerwinde durch Begrünung

Die Aussaatmischung bestand aus Phacelia, Weidelgras und Ölrettich und wurde Ende März nach leichten Niederschlägen ausgebracht. Da die folgenden drei Wochen kein Niederschlag fiel, war das Auflaufen der Aussaat deutlich verspätet und verringert. Der Effekt, der erzielt werden sollte, war ein Überwuchern der Ackerwinde. Dieses konnte, auch durch die anhaltende Trockenheit und Hitze des Sommers, nicht erreicht werden. Die Dichte der Ackerwinde blieb weitgehend unverändert. Dennoch hat sich eine deutliche Verringerung der Gelbfallenfänge gezeigt, was wir

als weiteren Hinweis darauf deuten, dass Begrünung die (Zu-)Flugaktivität und damit auch das Infektionsrisiko senken kann.

6.2.3. Biologische Bekämpfung von *Hyalesthes obsoletus*

Von den 320 Tieren, die auf die 16 Petrischalen verteilt wurden, sind 181 Tiere in die Auswertung eingegangen. Die restlichen Tiere klebten entweder an der Dichtmasse oder an Kondenswassertropfen bzw. sind durch kleine Spalten zwischen Schale und Deckel entwichen. Die 99 ausgewerteten Tiere im Metarhiziumversuch hatten eine durchschnittliche Lebensdauer von 4,41 Tagen (SE+/- 0,181, während die 82 ausgewerteten Kontroll-Tiere eine durchschnittliche Überlebensdauer von 5,53 Tagen (SE+/-0,163) hatten. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war statistisch signifikant (U-Test: $p < 0,001$). Es zeigte sich bei der elektronenmikroskopischen Auswertung, dass ca. 70% der behandelten Tiere im Versuch mit Metarhizium befallen waren. Dieses deuten wir als einen guten Erfolg, der es rechtfertigt, in Zukunft weitere Untersuchungen und Freilandtests durchzuführen.

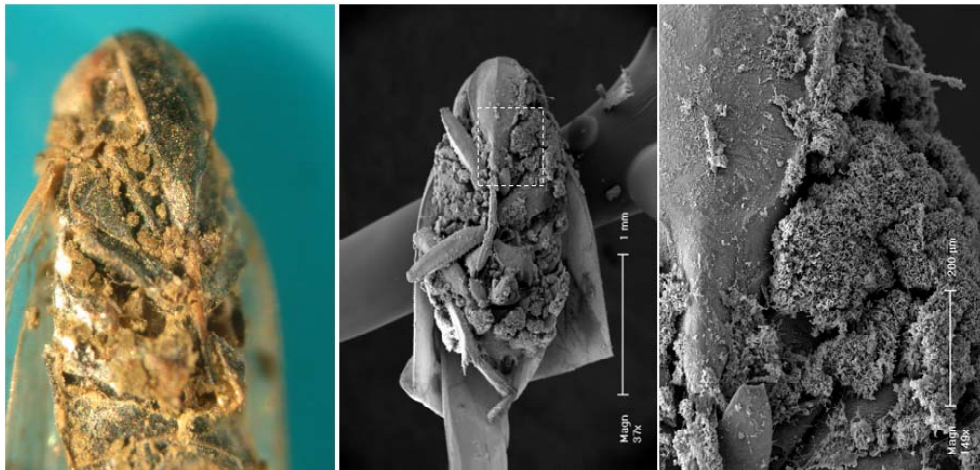


Abbildung 9 . Licht- (links) und rasterelektronenmikroskopische (mitte u. rechts) Kontrolle des Befalls von *H. obsoletus* durch *Metarhizium anisopilae*.

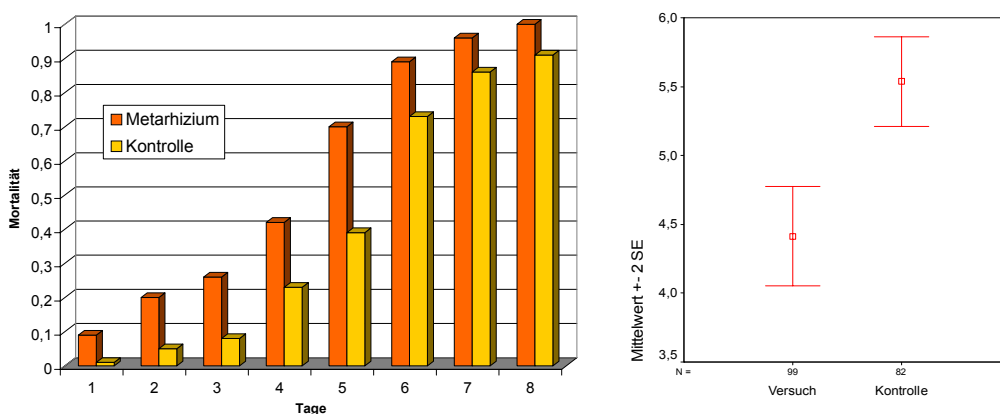


Abbildung 10: Überlebensdauer der behandelten Tiere und der Kontrolltiere im Metarhiziumversuch (links) und der Mittelwert/ Standardfehler beider Gruppen (rechts).

6.2.4. Rebschnittversuche zur Verminderung des Schadens

Die Rebschnittversuche zielten darauf, bei einseitig befallenen Rebstöcken, den befallenen Bogen vollständig zu entfernen, um damit das Inokulum zu eliminieren. 13 Stöcke konnten ausgewertet werden. Im Jahr 2003 zeigten sechs Stöcke keine Symptome, drei nur Symptome an einem Trieb und drei zeigten Symptome an mehr als einem Trieb. Die Ergebnisse sind aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht aussagekräftig. Hier müssten für Folgeuntersuchungen Flächen gefunden werden, die eine geeignete Erziehungsmethode aufweisen und wo gleichzeitig viele Stöcke mit einseitigen Symptomen gefunden werden können. Der Befall in der diesjährigen Untersuchungsfläche war dafür deutlich zu hoch.

7. Resumee

Das spezifische Risiko des ökologischen Weinbaus hinsichtlich der Phytoplasmosen war zu Beginn dieser Studie unbekannt. Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass die Befallsstärke und -häufigkeit nicht erhöht ist. Sie liegt in vielen Fällen sogar deutlich unter der Befallshäufigkeit benachbarter konventioneller Weinberge. Dieses kann möglicherweise mit einer geringeren Stickstoffversorgung der Reben auf den ökologischen Flächen zusammenhängen. Die Arbeit ergab jedoch auch Hinweise darauf, dass die höhere Vegetationsbedeckung das Anfliegen der Vektoren auf die Reben reduziert, daher ist ein hoher Deckungsgrad der Weinbergsvegetation durchaus positiv zu bewerten.

Andererseits wurde in dieser Untersuchung auch ein neues Stolbur-Isolat gefunden, das in der Zaunwinde, einer bisher unbekanntes Wirtspflanzenart, zu finden ist. Zudem wurde auf mehreren Versuchsflächen der Erreger auch in Brennnesseln nachgewiesen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass mit einer höheren Artendiversität der Begrünpflanzen auch das potentielle Risiko einer Phytoplasmeninfektion steigt und die genetische Variabilität der Erreger in den Rebflächen zunimmt.

Die Dichte der Vektoren und die Durchseuchung der Vektorpopulationen lagen in den ökologisch bewirtschafteten Anlagen in einer zum konventionellen Weinbau vergleichbaren Größenordnung. In den Weinbergssteillagen sind auch die ökologisch bewirtschafteten Rebflächen nicht vollständig begrünt, sondern mit einer - je nach Wasserversorgung - mehr oder weniger dichten Spontanvegetation bewachsen. Bei einer Ausweitung des ökologischen Weinbaus in solche traditionellen Befallslagen ist daher nicht auszuschließen, dass sich auf diesen Rebflächen ein besonders hoher Infektionsdruck entwickelt. Dem muss durch geeignete Bodenmanagementverfahren entgegengewirkt werden.

Die Begrünpflanzungsversuche zur Zurückdrängung der Ackerwinde als wichtigstem Glied im Übertragungszyklus der Schwarzholzkrankheit verliefen aufgrund der Trockenheit nicht zufrieden stellend. Solche Maßnahmen sind dennoch sinnvoll, um das Infektionspotential zu senken. Sollte die Bedeutung der Zaunwinde und der Brennnessel als Alternativwirte des Phytoplasmas zunehmen, müssen zusätzliche Strategien entwickelt werden.

Durch die Untersuchung der unterirdischen Lebensweise der Larven von *Hyaletthes obsoletus* ergaben sich Ansätze für eine Bekämpfung des Vektors durch Bodenbearbeitungsmaßnahmen. Insbesondere das früher übliche Pflügen im Winter erwies sich als wirksam zur Verminderung der Populationsdichte der Zikade.

8. Kommunikation der Ergebnisse

Nach wie vor stellt die mangelnde Kenntnis der Praktiker über die Phytoplasmosen, ihre Krankheitssymptome, Ursachen, Verbreitung und Gegenmaßnahmen ein Problem dar. Häufig ist der Befall den Winzern bekannt, ohne dass sie über die Natur der Krankheit Bescheid wissen. Der Kommunikation der bereits vorhandenen Informationen und der im Verlauf des Forschungsprojekts zu erwartenden Ergebnisse kommt daher ein hoher Stellenwert zu. Im Rahmen dieses Projektes wurde daher eine Informationsbroschüre entwickelt, die den Praktikern die erforderlichen Informationen kompakt aber wissenschaftlich fundiert vermittelt (siehe Anhang). Darüber hinaus wurden die Ergebnisse des Projektes durch Vorträge, Veröffentlichungen und Internetangebote kommuniziert.

8.1. Veröffentlichungen

- Langer, M., Darimont, H., Maixner, M. (2003). Control of phytoplasma vectors in organic viticulture. Integrated Protection and Production in Viticulture, IOBC/wprs Bulletin 26 (8) 2003, 197-202.
- Langer, M., Darimont, H., Maixner, M. (2003). Characterization of isolates of Vergilbungskrankheit phytoplasma by RFLP-analysis and their association with grapevine, herbaceous host plants and vectors. Extended Abstracts 14th Meeting ICVG, Locorotondo (Bari), Italy, 11. - 18. September 2003, 66-67.
- Langer, M., Maixner, M. (2003). Schwarzholzkrankheit der Rebe (Bois noir) - Symptome und Regulationsmöglichkeiten. Informationsblatt der BBA, November 2003.

8.2. Vorträge

- Phytoplasmosen im ökologischen Weinbau - ein Problem? (Langer und Maixner). Fachreferentenbesprechung "Rebschutz", 21. bis 22. August 2002.
- Control of Phytoplasma Vectors in Organic Viticulture (Langer und Maixner) IOBC/wprs working group "Integrated production in viticulture", Volos, Griechenland, 18.-22. März 2003.
- Regulation von Phytoplasmosen im ökologischen Weinbau (Langer, Maixner) BBA-Arbeitsgruppentreffen „Bundesprogramm Ökologischer Weinbau“ in Kleinmachnow, 09.04.2003.
- Regulation von Phytoplasmosen im ökologischen Weinbau (Langer, Maixner) 42. Arbeitstagung des Forschungsrings des Deutschen Weinbaues, Weinsberg, 7.-8. Mai 2003.
- Regulierung von Phytoplasmosen im ökologischen Weinbau - Risikoanalyse und Lösungsansätze. Symposium „Aktuelle Probleme im Ökologischen Weinbau“, Bernkastel-Kues, 16. Mai 2003.

Characterization of isolates of Vergilbungskrankheit phytoplasma by RFLP-analysis and their association with grapevine, herbaceous host plants and vectors.

(Langer, Darimont, Maixner)

14th Meeting ICVG, Locorotondo (Bari), Italien, 11. - 18. September 2003.

Regulation von Phytoplasmosen im ökologischen Weinbau (Langer, Maixner)

Seminar. Vortragsveranstaltung des Bundesprogramms Ökologischer Landbau, Berlin, 8. bis 9. Oktober 2003.

8.3. Internetangebote

Langer, M., Maixner, M. (2003). Regulation von Phytoplasmosen im ökologischen Weinbau - Risikoanalyse und Lösungsansätze.

http://www.bba.de/inst/w/poster/oekologischen_weinbau.pdf

Maixner, M., Langer, M. (2003). Die Schwarzholzkrankheit und Möglichkeiten ihrer Bekämpfung. <http://www.bba.de/inst/w/poster/schwarzholzkrankheit.pdf>

Langer, M., Maixner, M. (2003). Regulierung von Phytoplasmosen im ökologischen Weinbau - Risikoanalyse und Lösungsansätze.

<http://www.bba.de/oekoland/dateien/projergeb/projekt20.htm>

9. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden 19 ökologisch bewirtschaftete Weinbergflächen ausgewählt, auf denen Flugverlauf und Aktivitätsdichte der Vektorart *Hyalesthes obsoletus* erfasst wurde. Darüber hinaus wurden auf jeder Fläche Vegetationsaufnahmen und Befallsbonituren durchgeführt. Die Vektoren und Wirtspflanzen wurden molekulargenetisch auf Befall getestet.

Die Infektionshäufigkeit der Vektoren war signifikant geringer als die Infektionshäufigkeiten von Zikadenpopulationen, die in vorangegangenen Jahren in konventionell bewirtschafteten Flächen untersucht wurden. Hier spielt jedoch auch das Versuchsdesign eine Rolle, da die konventionellen Flächen gezielt aufgrund deutlichen Befalls ausgewählt wurden.

Der Befall der Reben war ebenfalls auf vielen ökologisch bewirtschafteten Flächen geringer als auf benachbarten konventionellen Flächen. Dieses kann allerdings auch auf den allgemeinen Gesundheitszustand, die Nährstoffversorgung der Reben und das Angebot an krautigen Pflanzen zurückzuführen sein.

Molekulargenetische Tests haben ergeben, dass es drei, anstatt der bislang bekannten zwei Phytoplasmen-Typen der Stolbur-Gruppe gibt. Der RFLP-Typ A wurde bisher nur in Brennesseln, Vektoren und Reben nachgewiesen, der Typ B in verschiedenen alternativen Wirtspflanzen, wie Ackerwinde, Zaunwinde und in Vektoren und Reben. Der in dieser Untersuchung erstmals nachgewiesene Typ Neu wurden nur in der Zaunwinde, in Vektoren und in Reben gefunden. Typ A und Neu zeigen bei den alternativen Wirtspflanzen bisher eine deutliche Spezifität.

Die Winterbodenbearbeitung hat eine deutliche Reduktion der aus dem Boden schlüpfenden Tiere ergeben. Es besteht aber noch weiterer Verbesserungsbedarf hinsichtlich Tiefe und Häufigkeit der Anwendung. Die Begrünung zur Reduktion der Ackerwinde hat durch die extreme Trockenheit des Jahres 2003 nicht den

entsprechenden Erfolg erzielt. Es hat sich allerdings gezeigt, dass die Fangzahlen auf den Gelbfallen deutlich zurückgegangen sind. Da die Populationsdichte wahrscheinlich nicht zurückgegangen ist, werden die Ergebnisse dahingehend gedeutet, dass durch die verbesserte Nahrungssituation der Vektoren, die Aktivität der Tiere reduziert wurde. Diese verringerte Aktivität hat indirekt eine Verringerung des Infektionsdrucks zur Folge. Zusammen mit den Ergebnissen der Risikoanalyse sehen wir in einer dichten Begrünung eine gute Möglichkeit, den Flug der Vektoren auf die Reben zu verringern.

Der *Metarhizium*-Versuch hat in der Laborphase gute Ergebnisse gezeigt. Hier müsste durch anschließende Versuche eine Übertragung in das Freiland erprobt werden.

10. Anhang

Liste der Zikadenarten	Liste der Pflanzenarten	
<i>Agallia consobrina</i> *	<i>Achillea millefolium</i>	<i>Poa annua</i>
<i>Agallia ribauti</i> *	<i>Amarantus hybridus</i>	<i>Poa spec.</i>
<i>Alebra spec.</i>	<i>Anagallis arvensis</i>	<i>Polygonum arviculare</i>
<i>Allygus spec.*</i>	<i>Anchusa officinalis</i>	<i>Polygoum persicaria</i>
<i>Alnetoidia alneti</i>	<i>Arrhenaterum elatius</i>	<i>Polypodium</i>
<i>Aphrodes albifrons</i> *	<i>Artemisia vulgaris</i>	<i>Potentilla repens</i>
<i>Aphrodes makarovi</i> *	<i>Calystegia sepium</i>	<i>Quercus robur</i>
<i>Aphrophora salicina</i>	<i>Campanula spec.</i>	<i>Ranunculus repens</i>
<i>Arthaldeus pascuellus</i>	<i>Cardamine hirsuta</i>	<i>Reseda lutea</i>
<i>Asiraca clavicornis</i>	<i>Cardamine hirsuta</i>	<i>Rispenhirse</i>
<i>Cercopis spec.</i>	<i>Chenopodium album</i>	<i>Rosa canina</i>
<i>Chloriona spec.</i>	<i>Cirsium arvensis</i>	<i>Rubus fruticosus</i>
<i>Cicadella viridis</i>	<i>Cirsium oleraceus</i>	<i>Rumex scutulatus</i>
<i>Cicadula quadrinotata</i>	<i>Convolvulus arvensis</i>	<i>Sedum album</i>
<i>Cixius spec.</i>	<i>Conyza canadensis</i>	<i>Senecio jacobeeae</i>
<i>Edwardsiana spec.</i>	<i>Crepis biennis</i>	<i>Senecio vulgaris</i>
<i>Errastunus ocellaris</i>	<i>Dactylus glomerata</i>	<i>Sideritis montana</i>
<i>Eupterix spec.</i>	<i>Daucus carota</i>	<i>Sinapis arvensis</i>
<i>Euscelidius schenckii</i> *	<i>Digitaria sanguinalis</i>	<i>Solanum nigrum</i>
<i>Euscelis spec.</i>	<i>Epilobium angustifolium</i>	<i>Sonchus asper</i>
<i>Fagocyba spec.</i>	<i>Epilobium mittel</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>
<i>Fieberiella septentrionalis</i>	<i>Epilobium parviflora</i>	<i>Stachys spec.</i>
<i>Graphocephala fennahi</i>	<i>Epilobium schmal</i>	<i>Symphytum officinalis</i>
<i>Idiocerus stigmatalis</i>	<i>Euphorbia helioscopis</i>	<i>Tanacetum vulgare</i>
<i>Jassus lanio</i>	<i>Festuca ovina</i>	<i>Taraxacum off.</i>
<i>Javesella pellucida</i>	<i>Fragaria vesca</i>	<i>Trifolium album</i>
<i>Macropsis spec.*</i>	<i>Galeopsis angustifolia</i>	<i>Tussilago fafare</i>
<i>Macrosteles sexnotatus</i> *	<i>Galium mollugo</i>	<i>Urtica dioica</i>
<i>Macustus griseus</i>	<i>Galium verum</i>	<i>Veronica chamaedrys</i>
<i>Mocydia spec.</i>	<i>Geranium robertianum</i>	<i>Veronica hederifolia</i>
<i>Mocydiopsis spec.</i>	<i>Geum urbanum</i>	<i>Vicia cracca</i>
<i>Neoliturus fenestratus</i> *	<i>Hedera helix</i>	<i>Vicia sepium</i>
<i>Ophiola russeola</i>	<i>Hieracium pilosella</i>	
<i>Penthimia nigra</i>	<i>Holcus lanatus</i>	
<i>Philaenus spumarius</i>	<i>Hypericum perforatum</i>	
<i>Psammotettix confirmis</i>	<i>Lactuca helioscopis</i>	
<i>Ribautiana spec.</i>	<i>Lamium purpurea</i>	
<i>Ribautodelphax spec.</i>	<i>Linaria vulgaris</i>	
<i>Stenocranus minutus</i>	<i>Malva neglecta</i>	
<i>Tachycixius pilosus</i>	<i>Medicago lupulina</i>	
<i>Thamnotettix dilutior</i>	<i>Myosotis arvensis</i>	
* potentielle Vektor-Gattungen	<i>Plantago major</i>	