

Aus dem Institut für Insektenbiotechnologie
Professur für angewandte Entomologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Die Schilf-Glasflügelzikade (*Pentastiridius leporinus* L.)
als Überträger verschiedener Pathogene
in Zuckerrüben und Kartoffeln**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxologie und
Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sarah Christin Behrmann

Gießen, 2023

Mit Genehmigung des Fachbereichs Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter

Professor Dr. Andreas Vilcinskas
Institut für Insektenbiotechnologie
Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter

Professor Dr. Thomas Wilke
Institut für Tierökologie und Spezielle Zoologie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Prüfer

Professor Dr. Steffen U. Pauls
Institut für Insektenbiotechnologie
Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Prüfer

Professor Dr. Dr. Benjamin Lamp
Institut für Virologie
Fachbereich Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

3. Prüferin

Professor Dr. Stefanie Becker
Institut für Parasitologie
Zentrum für Infektionsmedizin
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Erklärung gemäß der Promotionsordnung des Fachbereichs 09 vom 07. Juli 2004 § 17 (2)

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, 23.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	1
Zusammenfassung.....	2
1 Einleitung - Die Schilf-Glasflügelzikade <i>Pentastiridius leporinus</i>	3
<i>P. leporinus</i> als Vektor der Zuckerrübenkrankheit SBR.....	3
Verbreitung von SBR und <i>P. leporinus</i>	4
Charakterisierung der Pathogene.....	4
Morphologie.....	6
Lebenszyklus	7
Wirtspflanzenspektrum	8
Zielsetzung der Arbeit.....	8
2 Überblick über die Ergebnisse.....	10
3 Diskussion.....	14
Das Verbreitungsgebiet der <i>P. leporinus</i> dehnt sich nach Norden aus.....	14
Klimawandel beeinflusst Phänologie der <i>P. leporinus</i>	14
Kartoffel als weitere Wirtspflanze von <i>P. leporinus</i>	15
Studien zur Biologie zeigen Möglichkeiten zur Unterbrechung des Lebenszyklus auf	16
Laborzucht als Grundlage für weitere biotechnologische Studien.....	17
Die Schadwirkung von <i>Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus</i>	18
Die Schadwirkung von <i>Candidatus Phytoplasma solani</i>	18
4 Schlussfolgerungen.....	20
5 Literatur	21
6 Publikationen	28
Publikation I (not peer-reviewed).....	29
Publikation II	39
Publikation III.....	52
Abbildungsverzeichnis	65
Abkürzungsverzeichnis.....	66
Danksagung.....	67
Appendix.....	68

Abstract

Pentastiridius leporinus transmits two bacterial pathogens which trigger the "Syndrome Basses Richesses - SBR" (low sugar content syndrome), leading to yellowing symptoms and sugar content losses in sugar beet. Since 2017, this sugar beet disease has been of economic importance in Germany. The two pathogens are the γ -3-proteobacterium *Candidatus* *Arsenophonus* phytopathogenicus and the stolbur phytoplasma *Candidatus* phytoplasma solani.

Effective control measures for *P. leporinus* are currently not available due to insufficient knowledge of its biology, its long developmental cycle with above- and below-ground stages, the large number of insects over a long flight period, and their annual migration as a result of crop rotation.

Therefore, this thesis focuses on the study of *P. leporinus* and the bacteria it transmits in three topics: the abundance in southwestern Germany, the biology and the damage potential of *P. leporinus*.

For the study of the abundance and flight activity, data previously generated on behalf of our project partner, the Association of Rhineland-Palatonian Sugar Beet Growers e.V. (*Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V.*), were evaluated. As a result, a map of the SBR distribution area from 2017 to 2020 was created. In addition, monitoring data of *P. leporinus* were analyzed and the phenology during the year as well as the spread in the Rhine plain from Mainz to Mannheim were shown.

On the subject of biology, various investigations were carried out in the field, in the greenhouse as well as in the climate chamber. In order to evaluate the success of different control strategies to interrupt the life cycle, investigations on movement patterns of nymphs in the soil and the attractiveness of different host plants were carried out. As a basis for developing bioassays to test entomopathogenic microbes, a rearing method was developed based on which the life cycle and developmental stages were studied. Potato was discovered as a new host plant of *P. leporinus*.

On the topic of damage potential, infection rates of *P. leporinus* with *Candidatus* *Arsenophonus* phytopathogenicus and *Candidatus* phytoplasma solani were determined. As a major result of this work, the new host plant and increased infection of plant hoppers with *Candidatus* phytoplasma solani have to be pointed out. To improve the quality of laboratory results, a standard curve RT-qPCR was developed to quantify the pathogens. Transmission experiments of *Candidatus* *Arsenophonus* phytopathogenicus and *Candidatus* phytoplasma solani to sugar beet and potato were conducted to describe the damaging effects of *P. leporinus*. *Candidatus* *Arsenophonus* phytopathogenicus was detected in potatoes for the first time.

Zusammenfassung

Die Schilf-Glasflügelzikade *Pentastiridius leporinus* L. überträgt zwei bakterielle Krankheitserreger, die das „Syndrome Basses Richesses - SBR“ (Syndrom der niedrigen Zuckergehalte) auslösen, welches zu Vergilbungssymptomen und Zuckergehaltsverlusten in der Zuckerrübe führt. Seit 2017 ist diese Zuckerrübenkrankheit in Deutschland von wirtschaftlicher Bedeutung. Die beiden Erreger sind das γ -3-Proteobakterium *Candidatus* *Arsenophonus* *phytopathogenicus* und das Stolbur Phytoplasma *Candidatus* *phytoplasma solani*.

Eine effektive Kontrolle der Glasflügelzikade ist aufgrund unzureichenden Wissens über ihre Biologie, ihren langen Entwicklungszyklus mit ober- und unterirdischen Stadien, der großen Anzahl von Insekten über einen langen Flugzeitraum und deren jährliche Wanderbewegung in Folge des Fruchtwechsels derzeit nicht möglich.

Diese Arbeit befasst sich daher mit der Erforschung der Schilf-Glasflügelzikade und den von ihr übertragenen Bakterien in drei Themenfeldern: dem Verbreitungsgebiet in Südwest-Deutschland, der Biologie der Schilf-Glasflügelzikade und der Schädigung der Schilf-Glasflügelzikade.

Zur Studie des Verbreitungsgebietes wurden Daten, welche zuvor im Auftrag des Projektpartners dem Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V. generiert wurden, ausgewertet. Als Ergebnis wurde eine Kartierung des SBR-Verbreitungsgebietes von 2017 bis 2020 erstellt. Darüber hinaus wurden Monitoringdaten der Schilf-Glasflügelzikade ausgewertet und die Phänologie im Jahresverlauf sowie die Ausbreitung in der Rheinebene von Mainz bis Mannheim gezeigt.

Auf dem Themenfeld der Biologie wurden verschiedene Untersuchungen im Feld, im Gewächshaus sowie im Klimaschrank durchgeführt. Um den Erfolg verschiedener Kontrollstrategien zur Unterbrechung des Lebenszyklus zu evaluieren, wurden Untersuchungen zu Bewegungsmustern der Nymphen im Boden und der Attraktivität verschiedener Wirtspflanzen durchgeführt. Als Grundlage zur Entwicklung von Bioassays zur Testung entomopathogener Mikroben eine Zuchtmethodik entwickelt, auf deren Basis der Lebenszyklus und die Entwicklungsstadien untersucht wurden.

Auf dem Themenfeld der Schädigung wurden Infektionsraten der Schilf-Glasflügelzikade mit *Candidatus* *Arsenophonus* *phytopathogenicus* und *Candidatus* *phytoplasma solani* ermittelt. Als wesentliches Ergebnis dieser Arbeit sind die Entdeckung der Kartoffel als weitere Wirtspflanze für die Schilf-Glasflügelzikade und die hohe Infektionsrate der Zikaden mit *Candidatus* *phytoplasma solani* hervorzuheben. Zur Qualitätsverbesserung der Laborergebnisse wurde eine RT-qPCR mit Standardkurve zur Quantifizierung der Erreger entwickelt. Um die Schädigung der Schilf-Glasflügelzikade zu beschreiben, wurden Übertragungsversuche von *Candidatus* *Arsenophonus* *phytopathogenicus* und *Candidatus* *phytoplasma solani* auf Zuckerrüben und Kartoffeln durchgeführt. *Candidatus* *Arsenophonus* *phytopathogenicus* wurde erstmals in Kartoffeln nachgewiesen.

1 Einleitung - Die Schilf-Glasflügelzikade *Pentastiridius leporinus*

Die Schilf-Glasflügelzikade *Pentastiridius leporinus* (Linnaeus, 1761) gehört zur Klasse der Insekten (Insecta) in die Ordnung der Schnabelkerfen (Hemiptera) zu den Zikaden (Auchenorrhyncha), in die Gattung der Spitzkopfizikaden (Fulgoromorpha) und in die Familie der Glasflügelzikaden (Cixiidae) (Spinola, 1939). Es sind über 100 Arten der Familie der Glasflügelzikaden in Europa vertreten. Etwa ein Drittel davon sind in Mitteleuropa zu finden, wo die Adulten zumeist polyphag an Bäumen und Sträuchern leben (Holzinger et al., 2003). Seit dem Jahr 2009 ist *P. leporinus* als Hauptvektor der Zuckerrübenkrankheit „Syndrome Basses Richesses“ (SBR) bekannt (Bressan et al., 2009a).

P. leporinus als Vektor der Zuckerrübenkrankheit SBR

In den 1990er- und 2000er-Jahren wurden in Frankreich vergilbte Rüben mit verminderten Zuckererträgen gefunden (Gatineau et al., 2001). Die Symptomatik ist in Abbildung 1 dargestellt und wurde wie folgt detaillierter beschrieben: Ältere Blätter weisen früh in der Vegetationsperiode Vergilbungen auf, gleichzeitig treiben jüngere Blätter lanzettlich, deformiert und vergilbt aus. Nach dem Aufschneiden der Rübenkörper sind verfärbte Leitbündel zu erkennen. Diese Symptome beschreiben das Syndrom, welches mit dem Titel „Syndrome Basses Richesses“ (SBR; zu Deutsch: Syndrom der niedrigen Zuckergehalte) benannt wurde (Gatineau et al., 2002).



Abbildung 1. Deformierte und vergilbte Herzblätter (links) und verbräunte Leitbündel (rechts) einer mit SBR befallenen Zuckerrübe (Südzucker AG, 2023).

Zu Beginn der Ursachensuche in Frankreich wurde eine Infektion der Zuckerrüben mit dem Stolbur Phytoplasma *Candidatus phytoplasma solani* (im Folgenden: Stolbur Phytoplasmen) festgestellt. Stolbur Phytoplasmen lösen ein ähnliches Krankheitsbild aus, welches im südost-europäischen Raum bereits als die „Rubbery taproot disease“ (RTD) bekannt war (Panjan, 1950; Ćurčić et al., 2021). Bei der Durchführung von Übertragungsversuchen zeigten Pflanzen Symptome, in denen keine Stolbur Phytoplasmen nachgewiesen werden konnten. Weitere Untersuchungen identifizierten das γ -3-Proteobakterium *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus* (im Folgenden: Arsenophonus) als weiteres Pathogen der Krankheit SBR (Bressan et al., 2007). Arsenophonus wurde daraufhin in ca. 80 % der untersuchten *P. leporinus* nachgewiesen und fortan als Hauptauslöser für SBR beschrieben (Gatineau et al., 2002; Bressan et al., 2007).

Verbreitung von SBR und *P. leporinus*

Nach der erstmaligen Entdeckung von SBR 1991 dehnte sich das Befallsgebiet im Jahr 2004 auf 1.800 Hektar lokal begrenzt in Ostfrankreich (Burgund und Jura) aus (Sémétey et al., 2007b).

Das erstmalige Auftreten von *P. leporinus* in Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L.) in Deutschland wurde 2009 im Landkreis Heilbronn dokumentiert. Im Jahr 2013 gab es erstmals ein Monitoring der Flugaktivität adulter *P. leporinus* in Baden-Württemberg (Schwaderer, 2014). Anschließend wurde *P. leporinus* 2018 in unterschiedlichen Regionen Deutschlands gefunden (Hinkel-Stallmann, 2019; Pfitzer, 2019). Linksrheinisch wurde die Zikade erstmals 2018 in der Südpfalz nachgewiesen (Pfitzer, 2019; Hinkel-Stallmann, 2019). Hauptbefallsgebiete lagen 2018 und 2019 im Kraichgau und im Rhein-Neckar-Kreis in Baden-Württemberg (Pfitzer et al., 2019). Abbildung 2 zeigt die Karte des SBR-Verbreitungsgebiets im Jahr 2018.

Die Entwicklung der Abundanz im Raum Heilbronn kann anhand der Daten zum Standort Oberbiegelhof im Kraichgau nachvollzogen werden. Im Jahr 2013 wurden am Standort Oberbiegelhof durchschnittlich 7,8 adulte *P. leporinus* pro Leimtafel gefangen (Schwaderer, 2014). Sechs Jahre später, im Jahr 2019, wurden am Oberbiegelhof im gleichen Zeitraum (Mai – Juli) durchschnittlich 98 adulte *P. leporinus* pro Leimtafel gefangen (Behrmann, 2020). Somit ist der Befallsdruck in dieser Region um das Zwölfwache angestiegen. In Süddeutschland wurden Infektionen flächendeckend von Ansbach bis Karlsruhe und von dort nördlich bis Groß-Gerau festgestellt. Im Jahr 2020 konnten in Nordhessen (bei Kassel) keine Infektionen nachgewiesen werden (Zimmermann, 2021). Damit umfasst das SBR-Ausbreitungsgebiet mehr als 40.000 Hektar Rübenanbaugesamt (Fry, 2021). In den deutschen Populärmedien wird seit 2020 stetig über die Ausbreitung und die zunehmende Bedeutung von *P. leporinus* und SBR berichtet (Fry, 2020; Mund, 2022; dpa/lrs, 2023).

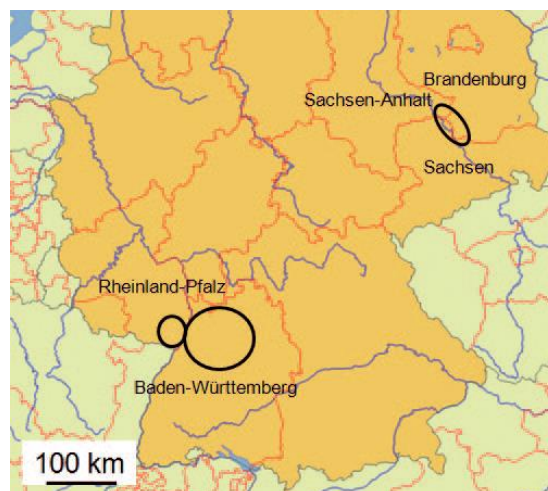


Abbildung 2. SBR-Befallsgebiete 2018 mit starkem Auftreten von SBR-Symptomen in Deutschland (Karte: Stepmap, 2019) (Pfitzer et al., 2019).

2020 wurde ein weiteres SBR-Verbreitungsgebiet außerhalb von Deutschland in der West-Schweiz beschrieben. Hier wurde eine Besiedlung durch *P. leporinus* im Anbaugesamt der Zuckerfabrik Aarberg bei Bern, um die südliche Hälfte des Neuenburger Sees, nachgewiesen (Mahillon et al., 2022).

Charakterisierung der Pathogene

Arsenophonus und Stolbur Phytoplasmen sind obligat biotrophe Pathogene und befinden sich intrazellulär in den Phloem-Siebröhren von Zuckerrüben, häufig in den Siebröhren des Rübenkörpers und der Blattstiele (Sémétey et al., 2007c; Bressan, 2014). Beide Pathogene zeigen ausgeprägte Auswirkungen auf den absoluten Zuckergehalt der Speicherwurzel von Zuckerrüben, wobei Arsenophonus den absoluten Zuckergehalt im Rübenkörper um 3,3 % und Stolbur Phytoplasmen diesen um 4,6 % reduzieren. Die Pflanzenbiomasse wird durch beide Erreger gleich stark um etwa 30 % reduziert (Bressan et al., 2008).

Auswirkungen einer Infektion zeigen sich durch bräunliche Färbungen der Phloemzellen, die Lignifizierung von Zellwänden, einer daraus folgenden Zerstörung der Zellwände und anschließender Nekrose der gesamten Zelle (Gatineau et al., 2002).

Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie wurde *Arsenophonus* sowohl in den Siebporen des Pflanzengewebes der Zuckerrübe als auch in den weiblichen Reproduktionsorganen, Speicheldrüsen und im Abdomen der *P. leporinus* visualisiert (Bressan et al., 2012). Die Bakterien messen $0,28\ \mu\text{m} - 0,32\ \mu\text{m}$ im Durchmesser und $2 - 2,5\ \mu\text{m}$ in der Länge (Gatineau et al., 2002). Die Gattung *Arsenophonus* besiedelt etwa 5 % der bekannten Arthropodenarten (Duron et al., 2008). Hierbei besetzen sie verschiedene ökologische Nischen, beispielsweise als obligate Symbionten (Bové und Garnier, 2003), Entomopathogene (Hansen et al., 2007) oder wie im Fall von *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus*, als Phytopathogene. Innerhalb der Gattung *Arsenophonus* sind zudem Arten bekannt, die das Verhalten ihrer Wirte hinsichtlich ihrer Wirtswahl beeinflussen. Eine Studie zur Tabakmottenschildlaus (*Bemisia tabaci* L.), zeigte eine mit *Arsenophonus* infizierte Population, die vorzugweise Salbei (*Salvia officinalis* L.) anstatt anderer Wirtspflanzen besiedelte (Chiel et al., 2007). Neben dem Bakterium *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus* in Zuckerrüben ist ein weiteres pflanzenpathogenes Bakterium aus der Gattung *Arsenophonus* in Erdbeeren (*Fragaria × ananassa* L.), *Candidatus phlomobacter fragariae*, bekannt. Es wird als „Strawberry marginal chlorosis proteobacterium“ (SMC proteobacterium) bezeichnet und durch die südliche Glasflügelzikade (*Cixius wagneri* L.) übertragen (Danet et al., 2004).

Transmission und Persistenz von *Arsenophonus*

Der Erhalt der Virulenz von *Arsenophonus* über mehrere Generationen resultiert aus der Transmission auf vertikalen und horizontalen Mechanismen innerhalb einer Insektenpopulation. In Übertragungsversuchen mit einzelnen adulten *P. leporinus* wurde die erfolgreiche Übertragung von *Arsenophonus* auf Zuckerrüben innerhalb von drei Tagen gezeigt (Bressan et al., 2008). In der gleichen Studie wiesen Weibchen mit durchschnittlich 21 Tagen eine längere Lebensdauer als Männchen mit 10 Tagen auf und waren mit 64 % Übertragungsrate/-wahrscheinlichkeit effizienter in der Übertragung des Bakteriums gegenüber Männchen mit 24 %. Weibchen konnten über ihre gesamte Lebensspanne *Arsenophonus* mehrfach übertragen. Weiterhin ist die Übertragung von *Arsenophonus* auf Zuckerrüben durch Nymphen gezeigt worden. Nymphen von *P. leporinus* sind in der Lage, innerhalb von 30 Tagen mit einer Übertragungseffizienz von 60 % *Arsenophonus* auf Zuckerrüben zu übertragen (Bressan et al., 2008; Bressan et al., 2009b). Die horizontale Transmission ist von infizierten Pflanzenteilen auf Nymphen möglich, da der Anteil infizierter Nymphen, die an Zuckerrüben saugten, im Vegetationsverlauf anstieg (Bressan et al., 2009b). Dies ist von großer Bedeutung, da die vertikale Übertragung von Weibchen auf die Eier in lediglich 30 % der Nachkommen nachgewiesen wurde und dadurch allein die Persistenz von *Arsenophonus* innerhalb einer Population nicht gesichert wäre (Bressan et al., 2009b; Bressan et al., 2012).

Transmission und Persistenz von Stolbur Phytoplasmen

Phytoplasmen werden vor allem von Insekten der Familien Rundkopf- und Spitzkopffzikaden auf Pflanzen übertragen, wo sie, abhängig von der Wirtspflanze, verschiedene Schadbilder auslösen (Lee et al., 1998). Stolbur Phytoplasmen verursachen Schadbilder im südlichen, östlichen und mittleren Europa. Insbesondere in Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.), Zuckerrüben und Weinreben (*Vitis vinifera* L.) sind Stolbur Phytoplasmen als Erreger von Vergilbungskrankheiten bekannt (Cousin und Smith, 1988; Maixner et al., 1995; Ember et al., 2011). In Kartoffeln treten als Vektoren von Stolbur Phytoplasmen vor allem Zikaden der Familie der Zwergzikaden, bspw. die Wiesenkleezirpe (*Eucelis incisus* Krs.) auf (Girsova et al., 2016). Als Vektorinsekten in Weinreben wurden Arten aus der Familie der Glasflügelzikaden, nämlich die Pfriemen-Glasflügelzikade (*Reptalus quinquecostatus* D.) und Winden-Glasflügelzikade (*Hyalesthes obsoletus* S.) gefunden (Chuche et al., 2016). Übertragungsversuche von Stolbur Phytoplasmen auf Zuckerrüben wurden mit der Winden-Glasflügelzikade *H. obsoletus* durchgeführt, da zum Studienzeitpunkt keine *P. leporinus* mit Stolbur

Phytoplasmen-Infektion auffindbar waren. Diese Versuche zeigten erstmals die Fähigkeit von Glasflügelzikaden, Stolbur Phytoplasmen auf Zuckerrüben zu übertragen und das Schadbild auszulösen (Bressan et al., 2008). Die Aufnahme von Phytoplasmen entsteht während der Saugaktivität im Phloem (Weintraub und Beanland, 2006). Phytoplasmen können in der Hämolymphe zirkulieren, wo sie andere Gewebe wie Speicheldrüsen, Fettkörper oder das Gehirn infizieren können (Lherminier et al., 1990; Lefol et al., 1994; Nakashima und Hayashi, 1995). Es ist nur für wenige Arten bekannt, dass Phytoplasmen über transovariable Übertragung weitergegeben werden können (Alma et al., 1997; Kawakita et al., 2000).

Morphologie

Adulte *P. leporinus* sind zwischen 5 und 9 Millimeter lang, wobei Männchen kleiner sind als Weibchen (Abbildung 3). Die Grundfarbe ist braun, das Mesonotum und der Kopf sind dunkelbraun bis schwarz gefärbt und können einen wachsartigen, weißlichen Überzug aufweisen. Die Vorderflügel sind hyalin bis bräunlich angeraucht und die Adern der Flügel im hinteren Drittel und Pterostigma dunkel gefärbt. Im Gegensatz zu Arten mit der Bezeichnung *Hyalesthes* weisen *Pentastirini* fünf kräftige Mesonotumkiele und einen nicht sichelförmigen Stylus auf. Darüber hinaus besitzen das erste und zweite Glied der Hintertarsen mehr als 12 Dornen.

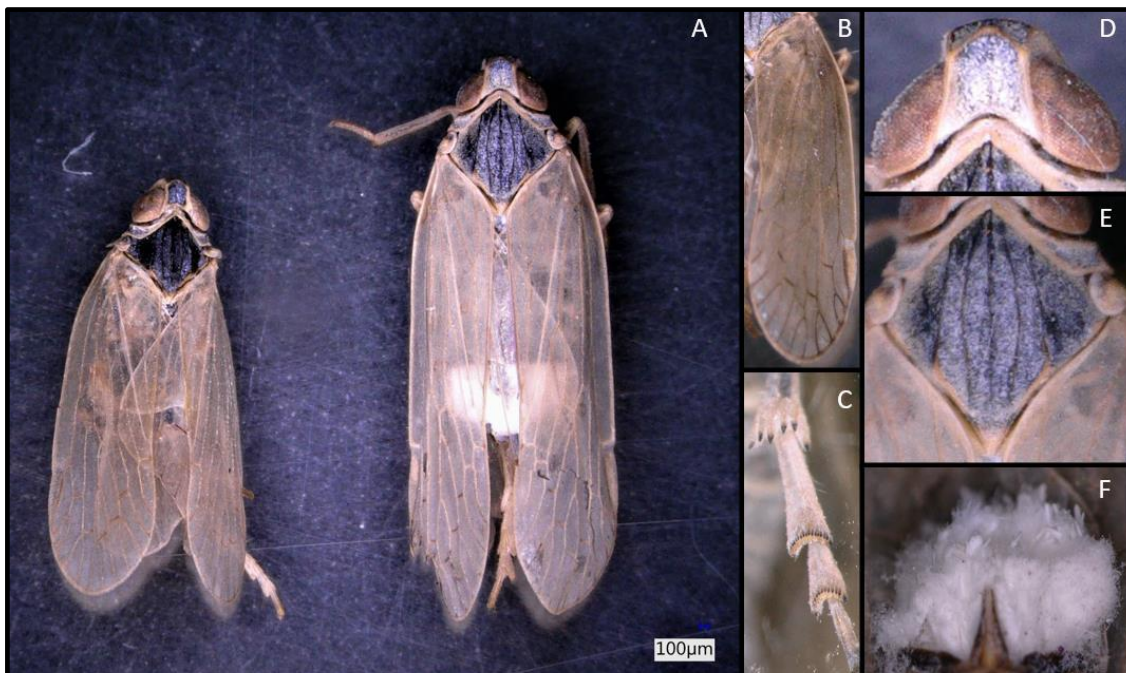


Abbildung 3. Übersicht der Merkmale zur Identifikation der adulten *P. leporinus*. **A** Aufnahme einer männlichen (links) und weiblichen (rechts) adulten Schilf-Glasflügelzikade. **B** Vorderflügel hyalin, leicht bräunlich mit dunkelbraunen Adern an der Flügelspitze und dunklem Pterostigma. **C** Femur mit 6 Dörnchen an der Tibia und mehr als 12 Dörnchen am ersten und zweiten Tarsalglied. **D** Caput mit spitz zulaufenden Vertex. **E** Mesonotum (weiß-pudrig) mit 5 Streifen. **F** Hinterleib einer weiblichen Adulten mit Wachsfäden. (Witzak, 2023)

Innerhalb der Familie gilt der Aedeagus, das spermaübertragende Organ männlicher Insekten, als Identifikationsmerkmal der Männchen. Bei *P. leporinus* ist der lange Dorn des Aedeagus zur Spitze fast rechtwinklig gebogen. Bei der nächstverwandten Art *Pentastiridius beieri* W. (Kiesbank-Glasflügelzikade) ist der Aedeagus im Endteil gleichmäßig rundgebogen. Die Weibchen von *P. leporinus* produzieren eine fädige, wachsartige Substanz, die in feinen Fäden aus dem Hinterleib austritt (Biedermann und Niedringhaus, 2004). Während der Juvenilentwicklung durchläuft *P. leporinus* fünf Stadien. Die hemimetabole Entwicklung der Nymphen im Boden bedingt eine viermalige Häutung. Insgesamt erscheinen alle Nymphen farblos (weiß). Die Nymphen entwickeln ebenfalls Wachsfäden am Abdomen, die kontinuierlich wachsen, deren biologische Funktionen nicht abschließend geklärt sind. Es liegt die Vermutung vor, dass die Wachsfäden

zum Schutz vor Austrocknung und übermäßiger Nässe dienen (Biologiezentrum des OÖ. Landesmuseums, 2002). In den Juvenilstadien sind Männchen und Weibchen morphologisch nicht zu unterscheiden. Zur molekularbiologischen Bestimmung der Art wurden artspezifische Primer entworfen und veröffentlicht (Pfitzer et al., 2022b).

Lebenszyklus

Pentastiridius leporinus durchläuft eine unter- und oberirdische, hemimetabole Entwicklung (Abbildung 4). Bislang wurde angenommen, dass die Art ihre Entwicklung mit einer Generation pro Jahr und einer Diapause während des Winters durchläuft (Holzinger et al., 2003). Der Flugzeitraum adulter *P. leporinus* beginnt im Frühsommer und endet im August. Die Adulten ernähren sich saugend an den Unterseiten der Blattstiele ihrer Wirtspflanze der Zuckerrübe, wo sie ins Phloem der Pflanze einstechen und dort Pflanzensaft saugen (Weintraub und Beanland, 2006). Die Eier werden in der Nähe der Rübenkörper in den Boden abgelegt. Ab August schlüpfen die Nymphen, welche ebenfalls die Zuckerrübe als Wirtspflanze nutzen. Nach der Ernte der Zuckerrüben verbleiben die Nymphen subterran. Typischerweise wird nach der Zuckerrübenernte Winterweizen eingesät, welcher bis Ende der Vegetationsperiode den Reihenschluss erreichen kann und bereits im November Wurzeln in bis zu 50 cm Bodentiefe gebildet hat (Bressan et al., 2011; Thorup-Kristensen et al., 2009). Während ihrer Entwicklungszeit im Boden vollziehen die Nymphen vier Häutungen, bevor sie sich als Adulte an die Bodenoberfläche bewegen. Nymphen besiedeln Bodentiefen von 0 – 30 cm (Bressan et al., 2009a). Vor der Rübenernte im September wurden Nymphen am häufigsten in einer Bodentiefe von 15 cm gefunden. Vor dem Ausflug im Frühjahr konnte eine Wanderbewegung in die oberen 5 cm des Bodens gezeigt werden (Bressan et al., 2009a). Von hieraus fliegt die neue Generation von adulten Schilf-Glasflügelzikaden wieder in die Zuckerrübenbestände aus (Bressan et al., 2011).

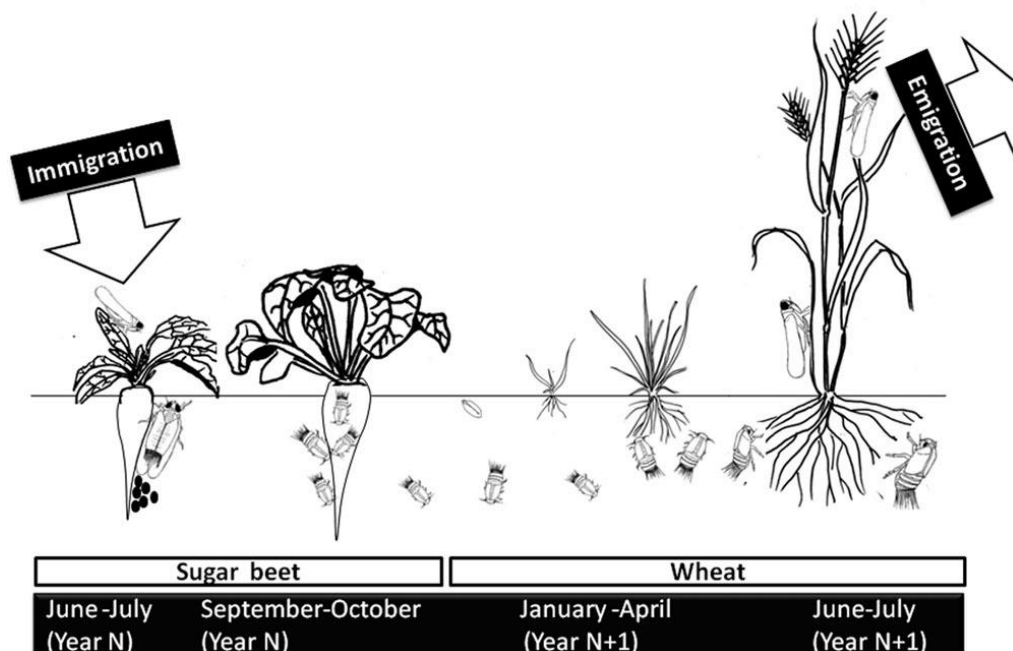


Abbildung 4. Lebenszyklus der Schilf-Glasflügelzikade in der Fruchtfolge von Zuckerrüben und Winterweizen (Bressan et al., 2011).

Laut Studien zum Eiablageverhalten der Weibchen ist diese, unter kontrollierten Bedingungen in Feldboden (lehmiger Ton), im Vergleich zu einem Mix aus Torf und Sand (3:1) und einem Mix aus Torf und naturbelassenem Blähton (3:1), am häufigsten. Die Weibchen von *P. leporinus* legen durchschnittlich 46 Eier pro Ablage in die obere Bodenschicht in Rübennähe. Ein Weibchen kann pro Jahr bis zu acht Eiablagen

produzieren, wobei die meisten Eier in der ersten Eiablage gezählt werden konnten. Bei ca. 50 % der untersuchten Weibchen wurden mehr als zwei Eiablagen beobachtet (Pfitzer et al., 2022c).

Wirtspflanzenspektrum

Laut Bestimmungsliteratur besiedelten adulte *P. leporinus* ursprünglich Schilfrohr (*Phragmites australis* L.) (Holzinger et al., 2003). In dieser Bestimmungsliteratur wurde der Eiablageort als unbekannt angegeben. Im Zusammenhang mit dem Ausbruch von SBR wurde *P. leporinus* erstmals als Adulte und Nymphe an der Zuckerrübe gefunden. Aufgrund der Schwierigkeiten der morphologischen Bestimmung wurde *P. leporinus* an der Zuckerrübe fälschlicherweise zunächst als *P. beieri* beschrieben und erst im Jahr 2009 als *P. leporinus* identifiziert (Gatineau et al., 2001; Bressan et al., 2009a). Darüber hinaus wurden vereinzelt Exemplare in anderen Kulturen wie Sojabohne und Mais gefangen, in welchen aber keine Nymphen gefunden werden konnten (Bressan et al., 2010).

Die Nymphen von *P. leporinus* ernähren sich zunächst von den Wurzeln der Zuckerrübenpflanze. Nach der Ernte wird praxisüblich entweder Winterweizen (im Oktober/November) oder Sommergerste (im März/April des Folgejahres) eingesät. Fruchtfolgeversuche im Feld zeigten, dass die Nymphen sich in den beiden genannten Folgekulturen entwickeln und im nächsten Jahr als Adulte ausfliegen (Bressan et al., 2010; Pfitzer et al., 2022a).

Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit widmet sich der Erforschung der Verbreitung, Biologie und Schadwirkung von *P. leporinus* und damit auch der SBR-Infektion im südwestdeutschen Zuckerrübenanbau. Inhalt dieser Arbeit ist die Beantwortung von Fragestellungen, die durch den Erkenntnisgewinn den Weg zur Entwicklung effizienter Kontrollstrategien ebnen. Diese Arbeit soll aufzeigen, welche Anbauggebiete betroffen sind und wie sich die Verbreitung der Schilf-Glasflügelzikade und SBR über einen Zeitraum von fünf Jahren entwickelte. Darüber hinaus sollen die Erkenntnisse zur Biologie der Schilf-Glasflügelzikade Angriffspunkte im Lebenszyklus von *P. leporinus* zur effektiven Kontrolle liefern. Abschließend betrachtet diese Arbeit die Prävalenz der relevanten Erreger und versucht vertieftes Wissen sowie effiziente Diagnostikmethoden zu erarbeiten. Zu diesem Zweck wurden folgende Themenfelder bearbeitet:

Verbreitungsgebiet der *P. leporinus* und SBR

In Deutschland, insbesondere im Südwesten der Bundesrepublik, wurde die Verbreitung der *P. leporinus* bisher auf Grundlage von einzelnen Abschlussarbeiten verschiedener Universitäten und Hochschulen analysiert. Diese Abschlussarbeiten lieferten Grundlagen zur Einschätzung des Verbreitungsgebietes. Die Auswertung und Kartierung der vorhandenen Daten sollen Erkenntnisse zum Verbreitungsgebiet und dessen Entwicklung liefern. Durch die Akkumulation dieses Wissens wird die Bedeutung der Pflanzenkrankheit und ihres Vektorinsekts verdeutlicht.

Biologie der *P. leporinus*

Der Lebenszyklus der Schilf-Glasflügelzikade wurde anhand einiger Feldstudien aus Frankreich und anhand von Abschlussarbeiten in Deutschland untersucht. Zur Analyse der Angriffspunkte im Lebenszyklus, beispielsweise durch verschiedene Bodenbearbeitungsverfahren oder die Ausbringung entomopathogener Mikroorganismen, ist Wissen über den Aufenthaltsort und Bewegungsdynamik der Nymphen im Boden notwendig. Um darüber hinaus die Eignung unterschiedlicher Folgefrüchte als Wirtspflanzen zu evaluieren, wurde die Untersuchung verschiedener Wirtspflanzen unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Weiterhin wurde eine neue Wirtspflanze der *P. leporinus* - die Kartoffel - in der Rheinebene zwischen Mainz und Mannheim identifiziert. Zur Studie entomopathogener Organismen, was das Ziel des übergeordneten Projektes „Nachhaltiges Insekten- und Krankheitsmanagement im Zuckerrübenanbau der Zukunft“

(NIKIZ) ist, wird die Beschreibung des Lebenszyklus, die Entwicklung einer Zucht und geeigneter Assays zur Wirkung dieser Organismen erforderlich.

Schadwirkung der Schilf-Glasflügelzikade

Insbesondere in der Rheinebene wurden eine hohe Anzahl an *P. leporinus* und schwere Schadbilder in Zuckerrüben vorgefunden. Bestehende Studien aus Frankreich und den Elbauen in Ostdeutschland zeigten den Zusammenhang von *P. leporinus* mit Stolbur Phytoplasmen auf. Der Fokus auf die weitere Suche nach Ursachen der Schäden durch die Zikaden eröffnet ein erweiterndes Verständnis des Vektor-Wirtspflanzen-Pathogenkomplexes in der Region und bedingte die Durchführung von Übertragungsversuchen und phylogenetischen Untersuchungen der *P. leporinus* und der Erreger. Als Methode der Laboranalytik zur Untersuchung auf eine Infektion mit *Arsenophonus* ist von einer französischen Arbeitsgruppe in den 2000ern eine nested-PCR entwickelt worden. Ziel der Arbeit ist die Entwicklung einer RT-qPCR, welche einen erhöhten Probendurchsatz und die Messung der Erregerkonzentration innerhalb der untersuchten Probe ermöglicht.

2 Überblick über die Ergebnisse

Diese Dissertation wurde begleitend zum EIP-Agri geförderten Projekt „Nachhaltiges Insekten- und Krankheitsmanagement im Zuckerrübenanbau der Zukunft“ (NIKIZ) verfasst. In diesem Projekt wurden mehrere Arbeitspakete an der Justus-Liebig-Universität Gießen bearbeitet. Diese beinhalteten Forschungsarbeiten zu Blattläusen, Drahtwürmern, Rüsselkäfern und Schilf-Glasflügelzikaden. Die Arbeiten zu *P. leporinus* umfasste die Isolation, Bestimmung und Testung entomopathogener Pilze und Bakterien aus Nymphen und Adulten. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit Assays zur Testung der Schadwirkung der Organismen auf *P. leporinus* entwickelt.

Diese Arbeit greift sowohl auf im Vorfeld generierte Daten des Verbandes der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V. als auch auf fortlaufend durchgeführte Feldarbeiten zurück. Die Ergebnisse der Forschungsarbeiten zu den drei untersuchten Themenfeldern wurden in drei Publikationen veröffentlicht. Publikation I ist nicht in einem peer-reviewed Verfahren erschienen, trägt aber wesentlich zum Verständnis des Verbreitungsgebietes von SBR bei, weshalb sie in diese Übersichtsarbeit eingeflossen ist. In der nachfolgenden Abbildung 5 sind die verschiedenen Untersuchungen und deren Zugehörigkeit zu den jeweiligen Themenfeldern und Publikationen dargestellt.

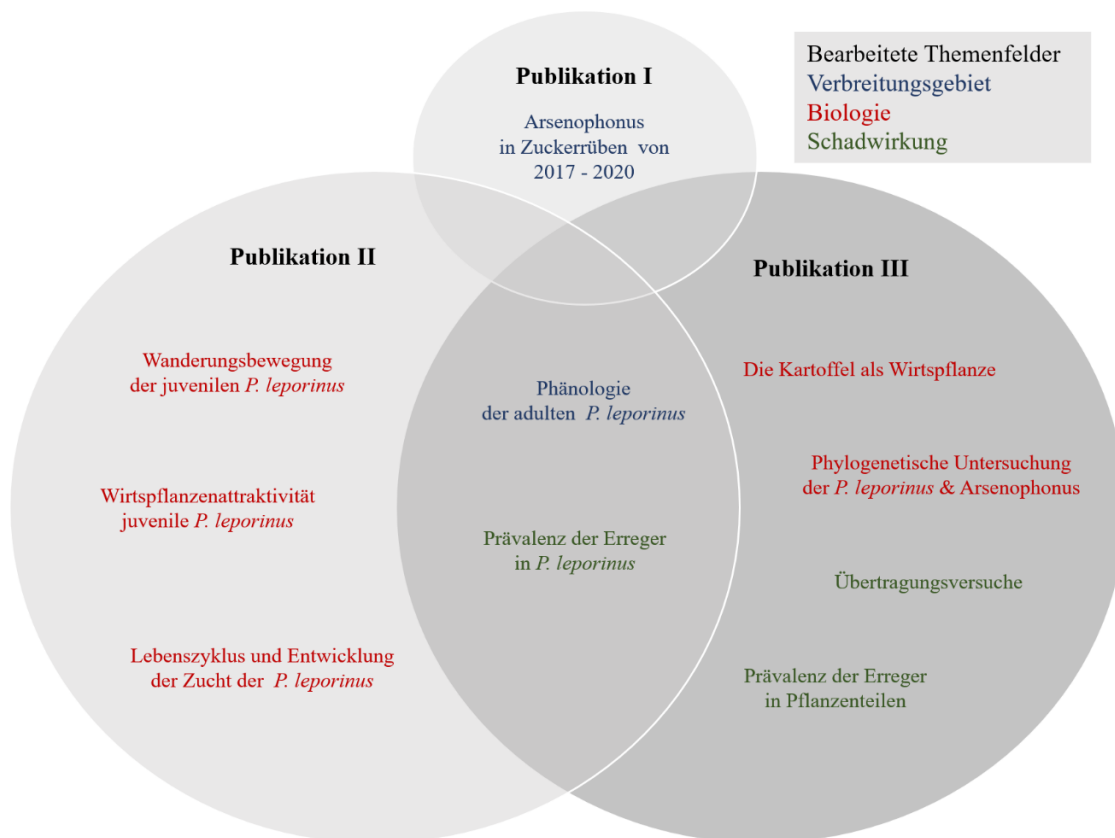


Abbildung 5. Darstellung der durchgeführten Untersuchungen in den Publikationen dieser Dissertation. Die Zuordnung zum jeweiligen Themenfeld ist farblich gekennzeichnet.

Im folgenden Abschnitt werden die Themenfelder anhand der untersuchten Fragestellungen vorgestellt.

Verbreitungsgebiet der *P. leporinus*

Studien zur Verbreitung von SBR in Zuckerrüben. Durch Vorarbeiten des Verbandes der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V. konnte eine Kartierung laboranalytischer Ergebnisse auf SBR von symptomatischen Zuckerrüben von 2017 – 2020 erstellt werden. Publikation I zeigt erstmals das Verbreitungsgebiet von SBR auf Ebene der Landkreise in sechs Bundesländern. In den Karten wird zudem die Befallsstärke der Regionen dargestellt. Weiter erfolgte die Auswertung auf einen Befall mit Vergilbungsviren. Vergilbungsviren in Zuckerrüben werden durch Blattläuse übertragen, welche seit dem Verbot der bisher üblichen Neonikotinoide Beizmittel vermehrt auftreten und Schäden verursachen (Hossain et al., 2021). Letztlich wurde die Ausbreitung von SBR aus dem Kerngebiet im Landkreis Heilbronn nach Osten, Westen und Süden gezeigt. Diese Ergebnisse visualisieren die Befallsstärke, insbesondere im Südwesten Deutschlands. Sie zeigen den Befall der Zuckerrüben mit *Arsenophonus*, haben aber keine Aussagekraft über die Verbreitung von *P. leporinus*.

Untersuchung der Phänologie. Um das Verbreitungsgebiet und das zeitliche Auftreten von *P. leporinus* im Jahresverlauf zu erfassen, wurde innerhalb des NIKIZ-Projektes ein Leimtafelmonitoring in Hessen und Rheinland-Pfalz sowie an ausgewählten Standorten in Baden-Württemberg durchgeführt. In Publikation II und Publikation III wurde das Auftreten der adulten Schilf-Glasflügelzikaden pro Kalenderwoche gezeigt. In Bickenbach, einem Standort, der in beiden Publikationen veröffentlicht wurde, ist ein starker Anstieg der Fangzahlen von 2020 bis 2022 zu beobachten.

Biologie der *P. leporinus*

Das Wissen über die Biologie von *P. leporinus* ist stark auf veraltete Literaturangaben begrenzt. Es existieren keine Studien zum Lebenszyklus. Die vorhandenen Informationen stammen entweder aus der Bestimmungsliteratur, in welcher die *P. leporinus* auf Schilf lebt, oder aus Studien anderer Arten der Familie der Glasflügelzikaden wie etwa *Hyalesthes obsoletus* oder *Reptalus quinquecostatus*. Als SBR in Frankreich auftrat, wurden Versuche zur Unterbrechung des Lebenszyklus durchgeführt. Hierbei wurden unterschiedliche Bodenbearbeitungen und Folgefrüchte auf die Auswirkung der Populationsgröße untersucht. Diese Studien erfordern das Aufstellen von Käfigen zur Zählung und Auswertung der ausfliegenden Adulten, welche extrem heterogen auf den Schlägen verteilt sind und daher viele Wiederholungen benötigen. Da die Flugaktivität der Adulten über mehrere Wochen anhält, bedeutet dies einen ressourcenintensiven Käfigaufbau und anschließend lange Monitoring-Zeiträume. Um aufwandreduziert zu forschen und um unter kontrollierten Bedingungen Ergebnisse ohne Jahreseffekte zu erhalten, wurden verschiedene Versuchsdesigns zur Zucht, zum Lebenszyklus und zur Wirtspflanzenattraktivität unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt und in Publikation II veröffentlicht.

Untersuchungen zur Wanderbewegung der Nymphen im Boden. Zur Bestimmung des Zeitpunktes der wirksamen Bodenbearbeitung zur Unterbrechung des Lebenszyklus wurde untersucht, bei welcher Bodentemperatur sich die Nymphen von *P. leporinus* in der oberen Bodenschicht aufhalten. Diese Erkenntnis bestimmt den optimalen Anwendungszeitpunkt von Bodenbearbeitungen oder entomopathogenen Nematoden. Die Auswertung des Messzeitraumes von über einem Jahr zeigte, dass die Nymphen bei einer mittleren Temperatur von 8,6 °C am häufigsten in der obersten Bodenschicht (0 – 10 cm) auftreten. Bei einer Abkühlung des Oberbodens auf unter 5,6 °C fand eine Abwanderung in die unteren Bodenschichten (11 – 30 cm) statt.

Untersuchungen zu Wirtspflanzen. Nymphen überwintern nach der Ernte der Zuckerrüben im Boden. Der Zeitpunkt nach der Ernte der Zuckerrüben im Herbst bietet so eine Eingriffsmöglichkeit, in dem eine Nicht-Wirtspflanze eingesät wird und die Nymphen ohne Nahrung ausgehungert werden könnten. Auf dieser Hypothese wurde die Eignung von Mais, Winterweizen und Zuckerrübe als Wirtspflanze für Nymphenstadien der Stadien drei bis fünf mit einem speziell für diese Fragestellung konzipierten

Versuchsaufbau untersucht. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einem hydroponischen System. Im Versuchsstand wurden die Nymphen in gleicher Entfernung zu allen Pflanzenarten ausgesetzt und deren Bewegungsrichtung über mehrere Stunden an definierten Zeitpunkten gemessen. Das Ergebnis dieser Untersuchung war, dass die Nymphen eine höhere Präferenz hinsichtlich Mais und Zuckerrüben gegenüber Winterweizen zeigten. Die Attraktivität von Mais und Zuckerrübe unterschied sich im durchgeführten Experiment nicht signifikant. Die Ergebnisse wurden in Publikation II beschrieben.

Beschreibung einer neuen Wirtspflanze. Die Entdeckung der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) als weitere Wirtspflanze von *P. leporinus* ist ein weiterer Baustein für das Verständnis des Pathogen–Vektor–Wirtspflanzenkomplexes. Die Funde wurden bildlich dokumentiert und in Publikation III veröffentlicht. Aus den Erkenntnissen wurde eine neue Grafik zum Lebenszyklus der Schilf-Glasflügelzikade angefertigt.

Molekulare Identifikation der Art. Um die Übereinstimmung der Art und damit die Besiedlung der Kartoffel durch *P. leporinus* nachzuweisen, wurden aus der Literatur bekannte Primerpaare *Barbara* und *Dike* (Simon et al., 2006) zur Amplifikation eines 972 bp-langen Abschnitts der Cytochrom c oxidase Untereinheit I und II mittels PCR amplifiziert. Nach der Aufreinigung mit Exonuclease und Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) erfolgt die Sequenzierung durch Eurofins Genomics (Köln, Deutschland). Die Ergebnisse wurden mit vorhandenen Sequenzen in einem phylogenetischen Stammbaum verglichen und in Publikation III veröffentlicht. Die Sequenzen wurde in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter den Accession numbers OQ420381–OQ420405 zur Verfügung gestellt und in Publikation III veröffentlicht.

Untersuchungen zur Morphologie und zum Lebenszyklus. Bislang sind keine morphometrischen Aufzeichnungen oder Merkmale der einzelnen Entwicklungsstadien bekannt. Markante Identifikationsmerkmale der Stadien sind die Körperlänge und die Kopfbreite der Nymphen. Die Gesamtlänge (lateral) variiert zwischen 936 µm und 4126 µm. Die Kopfbreite liegt zwischen 254 µm und 968 µm. Eine Unterscheidung zwischen den Stadien ist durch die Farbänderung und Verformung des Rückenschildes möglich.

Da keine Daten zu der Entwicklung der Tiere vorlagen, wurden Individuen im Klimaschrank gehalten und deren Entwicklung dokumentiert. Zusätzlich wurden Zeichnungen und Fotoaufnahmen der einzelnen Stadien angefertigt. Die Ergebnisse zum Entwicklungszyklus von *P. leporinus* wurden ebenfalls in Publikation II veröffentlicht.

Entwicklung einer Methode zur Zucht. Die Haltung der Zikaden ist die Grundlage für die Durchführung von Versuchen zur Attraktivität verschiedener Wirtspflanzen, dem Lebenszyklus und zur Testung von entomopathogenen Pilzen, Bakterien und Nematoden. Die Zucht von *P. leporinus* wurde im Gewächshaus in Käfigen durchgeführt. Die Haltung der Adulten erfolgte auf sechs bis acht Wochen alten Zuckerrübenpflanzen der Sorte Annarosa KWS. Die Zuchtbedingungen in der Kammer wurden auf 26 °C und 60 % Luftfeuchte eingestellt. Die Beleuchtung wurde in einem Rhythmus von 16:8 h Licht eingestellt. Eine wichtiger Erfolgsfaktor der Zucht war dabei die Verwendung von Tonkugeln als Pufferzone, um die optimalen Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnisse im Zuchtgefäß zu erreichen. Darüber hinaus konnten die Weibchen unter den Tonkugeln die Eiablage ungestört durchführen. Die Zuchtmethode wurde in Publikation II veröffentlicht.

Schadwirkung der *P. leporinus*

Bakterielle Infektion in *P. leporinus* und Pflanzenteilen. Im südwestdeutschen Monitoring wurden standardmäßig Zuckerrüben auf eine Infektion mit *Arsenophonus* untersucht, da dieser in vorausgegangenen Untersuchungen der vorherrschende Krankheitserreger war. Dabei ist auch darauf hinzuweisen, dass in bisherigen Untersuchungen Proben aus Deutschland vor allem in den Elbauen Stolbur Phytoplasmen in geringem Umfang nachgewiesen wurden (Pfitzer, 2019). Untersuchungen aus dem Jahr 2020 (Publikation I) ergab eine Prävalenz des *Arsenophonus* in *P. leporinus* zwischen 38 und 75 %. Da in

einigen Regionen die Prävalenz von *Arsenophonus* auffallend geringer war als die beobachteten Symptomausprägungen erwarten ließen, wurden die Proben im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich auf das Vorkommen von Stolbur Phytoplasmen analysiert und an einem Standort eine sehr hohe Infektionsrate (> 90 %) der untersuchten Zikaden festgestellt. Die Ergebnisse von vier Standorten wurden in Publikation II veröffentlicht. Mit dem Fund der *P. leporinus* in Kartoffeln wurden Zikaden, Zuckerrüben und vergilbte bzw. abgestorbene Kartoffelpflanzen und ihre Tochterknollen auf *Arsenophonus* und Stolbur Phytoplasmen untersucht. Dies war der erste Fund von *Arsenophonus* in Kartoffeln, welcher in Publikation III veröffentlicht wurde.

Übertragungsversuche der Erreger auf Zuckerrüben und Kartoffeln. Die Übertragung von *Arsenophonus* auf Zuckerrüben wurde bereits durch Versuche mit Adulten und Nymphen der *P. leporinus* gezeigt. Der Nachweis der Transmission von Stolbur Phytoplasmen auf Zuckerrüben wurde mit Winden-Glasflügelzikaden gezeigt. In Publikation III wird die Transmission von *Arsenophonus* durch die *P. leporinus* auf Kartoffeln und die Transmission von Stolbur Phytoplasmen auf Zuckerrüben durch diese beschrieben.

Entwicklung ressourcensparender Labormethoden. Bislang wurde der Nachweis von *Arsenophonus* mittels einer nested PCR erbracht. Das spezifische Primerpaar, Alb1 und Oliv1, wurde zur Identifikation von *Arsenophonus* mittels einer RISA (rDNA internal spacer analysis) entwickelt (Sémétey et al., 2007a). Der Fingerprint ist nach der Gelelektrophorese dieses PCR-Produktes anhand von vier DNA-Fragmenten zwischen 517 und 1018 Basenpaaren lang. Für diese Laboranalytik ist also eine zweifache PCR und eine Gelelektrophorese notwendig.

Um die SBR-Analytik effizienter zu gestalten und Erregerkonzentrationen in Zikaden und Zuckerrüben bestimmen zu können, wurde ein sondenbasiertes, quantitatives Realtime-PCR (qRT-PCR) Verfahren für die Erreger *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus* und *Candidatus phytoplasma solani* entwickelt. Das Target des designten Primerpaares liegt innerhalb der 16S ribosomalen RNA-Sequenzen der beiden Bakterien. Die verwendeten Sonden binden bei der Amplifikation innerhalb der Sequenz unter Abspaltung des Farbstoffs FAM. Als Quencher wurde TAMRA verwendet. Als passiver Referenzfarbstoff im Mastermix wurde ROX eingesetzt. Die Primer wurden zuvor auf Sensitivität und Spezifität für *Arsenophonus* und Stolbur Phytoplasmen getestet.

Zur Quantifizierung der Konzentration wurde eine Standardkurve einer bestimmten Zielsequenz mithilfe von Plasmiden erstellt. Die aufgereinigten Amplikons wurden in einen pGEM®-T Easy Plasmidvektor kloniert und in *Escherichia coli* Bakterien transformiert, welche anschließend auf mit 100 µg/ml Ampicillin versetzten MacConkey Agarplatten und in mit 10 µg/ml Ampicillin versetztem LB-Medium kultiviert wurden. Abschließend wurden die Plasmide aus der Bakterienkultur mittels eines Plasmidaufreinigungskits isoliert (NEB Plasmid Purification Kit). Die DNA-Konzentration wurde durch Spektralphotometrie gemessen und anhand der Plasmidsequenz die Anzahl der Plasmide bestimmt und eine entsprechende Verdünnungsreihe hergestellt. Zusätzlich wurde innerhalb der Arbeitsgruppe ein verbessertes Protokoll zur DNA-Extraktion mittels CTAB erarbeitet (Doyle und Doyle, 1987; Rinklef, 2022).

3 Diskussion

Das Verbreitungsgebiet der *P. leporinus* dehnt sich nach Norden aus

Seit der ersten Untersuchung zum Verbreitungsgebiet von *P. leporinus* in deutschen Zuckerrüben in Baden-Württemberg im Jahr 2013 wurde die Verbreitung in unterschiedlichen Abschlussarbeiten und seit 2020 im NIKIZ-Projekt untersucht (Schwaderer, 2014; Hinkel-Stallmann, 2019; Rinklef, 2019; Häuser, 2019; Pfitzer et al., 2019; Behrmann, 2020; NIKIZ-Projekt, 2023).

Im Jahr 2013 wurde ein Monitoring auf sechs Schlägen im Landkreis Heilbronn durchgeführt, wobei pro Leimtafel 6,5 *P. leporinus* gefangen wurden (Schwaderer, 2014). Die im Jahr 2018 erfolgten Untersuchungen zeigten Fangergebnisse des zwanzigfachen an adulten Zikaden (Pfitzer, 2019; Hinkel-Stallmann, 2019). Das Ausbreitungsgebiet hatte sich zudem von Heilbronn bis in die Südpfalz (Rheinland-Pfalz) ausgedehnt. Im Jahr 2018 wurden keine Zikaden im Landkreis Alzey-Worms und Mainz-Bingen gefangen (Hinkel-Stallmann, 2019). Im Jahr 2020 wurden im Rahmen des NIKIZ-Projektes an einem Standort in Riedstadt im Landkreis Bergstraße (Hessen) durchschnittlich 4,4 *P. leporinus* / Leimtafel gefangen, damit war die Zahl vergleichbar mit dem Befallsdruck in Baden-Württemberg 2013. Im Jahr 2022 hat sich die Fangzahl in Riedstadt, exemplarisch für die Region, verdoppelt. Die in Publikation II gezeigte ansteigende Zahl der Befallszahlen vom Jahr 2020 auf 2021 im Raum Alzey-Worms und Bergstraße (Hessen) wurde im Jahr 2022 fortgesetzt. Insbesondere am Standort Dexheim ist die Ausbreitung der *P. leporinus* erkennbar. Im Jahr 2020 wurde hier in einem Flugzeitraum von 9 Wochen (Untersuchungszeitraum 22 Wochen) 1,1 *P. leporinus* / Leimtafel gefangen. Waren es im Jahr 2022 in einem Flugzeitraum von 14 Wochen (Untersuchungszeitraum 22 Wochen) 8,3 *P. leporinus* / Leimtafel.

Im Rhein-Main-Gebiet wurden im Auswertungszeitraum von Mai bis September 2022 rund 600 Zikaden pro Leimtafel gefangen. Damit war der Befallsdruck in dieser Region etwa 76-mal so hoch, wie 2013 im Kraichgau (Hinkel-Stallmann, 2019; Rinklef, 2022). In Baden-Württemberg (Heilbronn) blieb der Befallsdruck mit etwa 66 -133 Zikaden pro Jahr auf ähnlich hohem Niveau wie 2019.

Abschließend konnte im Rahmen dieser Arbeit die Ausbreitung von SBR in Zuckerrüben im Zeitraum von 2017 bis 2020 gezeigt werden. Weiterhin wurde im NIKIZ-Projekt und dieser Arbeit die Ausbreitung der *P. leporinus* in Rheinland-Pfalz und Südhessen, insbesondere nach Norden, dokumentiert.

Klimawandel beeinflusst Phänologie der *P. leporinus*

Arten in der Familie der Glasflügelzikaden wie *P. leporinus* sind in der Regel univoltin, d. h. sie reproduzieren sich pro Jahr mit einer Generation (Biedermann und Niedringhaus, 2004). Die erste Veröffentlichung von Flugaktivitäten von *P. leporinus* in Zuckerrüben stammen aus den Jahren 1999 und 2000 in Frankreich (Bressan et al., 2009a). Hier wurden erste *P. leporinus* in Zuckerrüben Ende Juni gefangen, der Flugzeitraum endete Ende Juli. In den ersten deutschen Untersuchungen im Jahr 2018 wurde der Flugbeginn auf Ende Mai datiert (Pfitzer, 2019). Die Untersuchung von Klebefallen in Publikation III zeigen keinen früheren Flugbeginn, aber einen verlängerten Flugzeitraum mit einem zweiten Flughöhepunkt Ende August. In dieser Woche wurden erneut über 60 adulte *P. leporinus* pro Klebefalle gefunden. Seit 2018 konnten Untersuchungen zwar einzelne Individuen (< 20 *P. leporinus* / Standort) Ende August oder im September fangen (Publikation II), der zweite Flughöhepunkt einer zweiten Generation wie er 2022 in Bickenbach gemessen wurde (Publikation III) ist das zweite Mal in fünf Jahren nachgewiesen worden (Pfitzer et al., 2019).

Obwohl die Veränderung des Voltinismus einer Art durch mehrere Faktoren, wie beispielsweise fehlenden Niederschlag (Bonafant et al., 2015) oder die an Anpassung an veränderte photoperiodische Signale (Urbanski et al., 2012), eingeleitet werden kann, ist es am häufigsten die Anpassung an veränderte Temperaturen (Buckley, 2022; Gutiérrez und Wilson, 2021; Baker et al., 2015). Der Rheingraben zählt zu den wärmsten

Regionen Deutschlands (Deutscher Wetterdienst, 2023b). Insbesondere im Sommer 2022 waren die Temperaturen in Mannheim + 2,3 °C höher als im Jahresmittel von 1991- 2020 (Deutscher Wetterdienst, 2023a). Unter diesen Bedingungen bildeten die *P. leporinus* in Bickenbach sowie beispielsweise der Buchdruckerkäfer (*Ips typographus*) in Nordeuropa oder der Maisbohler (*Chilo partellus*) in Afrika zwei statt einer Generation aus (Jönsson et al., 2009; Khadioli et al., 2014).

Diese Erkenntnis ist von großer Bedeutung, da Kontrollstrategien durch die zweite Generation ein erhöhtes Zikadenaufkommen, nicht nur Mitte Juni (Kalenderwoche 25) (Publikation II), sondern zusätzlich ein Aufkommen Ende August (Kalenderwoche 35) (Publikation III) berücksichtigen sollten. In einer 50-jährigen Studie über das Migrationsverhalten von Blattläusen konnten die Phänologie anhand der akkumulierten Tagtemperaturen über 16 °C und der „North Atlantic Oscillation“ (NAO) modelliert werden (Bell et al., 2015). Um die Entwicklung der *P. leporinus* und damit Bekämpfungszeitpunkte zielsicher einzuschätzen, könnte ein Modell zur Einschätzung der Phänologie entwickelt werden. Die Auswirkungen dieser Veränderungen im Voltinismus der *P. leporinus* ist heute ungewiss. Während eine zweite Generation die Anzahl der Individuen und damit auch den Krankheitsdruck erhöhen kann (Bentz et al., 2010), ist es ebenso möglich, dass die zweite Generation negative Auswirkungen auf die Populationsgröße hat. Bedingt durch die späte Eiablage, könnten die Insekten daran gehindert werden das kältetolerante Stadium zu erreichen, welches relevant für die Überwinterung ist (Chinellato et al., 2014).

Kartoffel als weitere Wirtspflanze von *P. leporinus*

Als ursprüngliche Wirtspflanze von *P. leporinus* wurde das Schilfrohr (*Phragmites australis*) beschrieben. Bis heute sind die Umstände des Wechsels vom Schilfrohr zur Zuckerrübe unklar (Bressan et al., 2009a). Um mehr über die evolutionsbiologischen Entwicklungssprünge der *P. leporinus* herauszufinden, wäre es interessant, nach *P. leporinus*-Stämmen zu suchen, die noch im aquatischen oder semiaquatischen Schilfrohr endemisch sind, und sie mit Stämmen zu vergleichen, die sich an die Zuckerrübe und Kartoffel angepasst haben.

Die Entdeckung der Erweiterung des Wirtspflanzenkreises von *P. leporinus* auf die Kartoffel erhöht das Schädspotenzial für Zuckerrüben, da Kartoffeln auch Wirtspflanzen für Stolbur Phytoplasmen sind. Die Besiedlung von Kartoffeln durch *P. leporinus* wurden durch Probenahmen an Knollen und Kescherfängen im Feld, sowie die Saugaktivität und die Eiablage der adulten *P. leporinus* sowie das Schlüpfen und Überleben der Nymphen an Kartoffelpflanzen bzw. -knollen im Gewächshaus gezeigt (Publikation III). Um zu zeigen, dass es sich bei den gefundenen Insekten in Kartoffeln und Zuckerrüben um *P. leporinus* handelt, wurde ein phylogenetischer Stammbaum mit Abschnitten der COI und COII-Sequenzen und Referenzsequenzen von *P. leporinus*, *H. obsoletus* und *Cixius* sp. verglichen (Publikation III) und festgestellt, dass es sich bei den gefundenen Individuen um *P. leporinus* handelt.

Basierend auf unseren Erkenntnissen, haben wir den Lebenszyklus für in Deutschland vorkommende *P. leporinus* aktualisiert (Abbildung 6) und zusätzlich zur Zuckerrübe die neue Wirtspflanze Kartoffel für Nymphen und Adulte im Sommer als auch die mögliche Reproduktion in einer zweiten Generation dargestellt. Darüber hinaus werden dort Informationen zum Eiablageverhalten und zur Bewegung der Nymphen im Boden bei unterschiedlichen Temperaturen gegeben.

Derzeit liegen keine Veröffentlichungen über Stolbur Phytoplasmen in deutschen Kartoffel-Anbaugebieten vor. Daher stellen sich folgende Leitfragen, die in zukünftigen Forschungsarbeiten beantwortet werden sollten: Welche der Wirtspflanzen besiedelt die Schilf-Glasflügelzikade bevorzugt? Wird die Entwicklungsgeschwindigkeit durch die höheren Temperaturen und feuchten Bedingungen im Kartoffeldamm beeinflusst? Um die Eignung von Zuckerrüben und Kartoffeln als Wirtspflanzen zu vergleichen, sind Langzeitversuche zum Lebenszyklus erforderlich, um die Phänologie von *P. leporinus* in Kartoffeln genauer zu beschreiben.

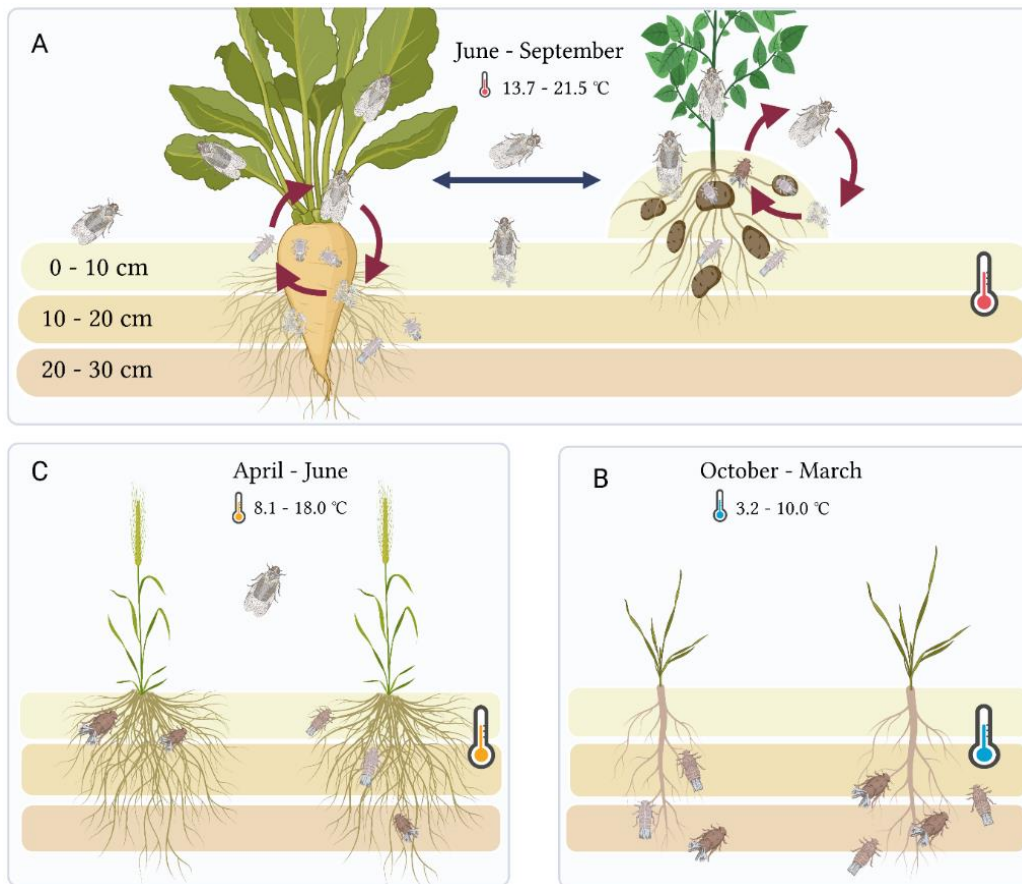


Abbildung 6. Aktualisierter Lebenszyklus von in Deutschland vorkommenden *P. leporinus* anhand der Forschungsergebnisse dieser Dissertation (Publikation III).

Studien zur Biologie zeigen Möglichkeiten zur Unterbrechung des Lebenszyklus auf

Um potenzielle Schwachstellen im Lebenszyklus von *P. leporinus* zu identifizieren, ist das Wissen um den Entwicklungszyklus im Feld von hoher Wichtigkeit. Die mit zwei bis drei Monaten lange Flugzeit von *P. leporinus* ist die größte Herausforderung bei der Suche nach geeigneten Bekämpfungsstrategien, da eine Applikation chemischer Insektizide keine Langzeitwirkung aufweist und in ihrer Applikationszahl gesetzlich begrenzt ist (Behrmann, 2020).

Bisherige Kontrollansätze basieren beispielsweise auf der Unterbrechung des Lebenszyklus der Nymphen im Boden. Hierfür wurden unterschiedliche Bearbeitungsmethoden nach der Ernte der Zuckerrüben untersucht. In den Studien wurde in Feldversuchen der Einsatz von Grubber und Pflug direkt nach der Ernte der Zuckerrüben sowie im Frühjahr nach der Winterpause studiert (Bressan, 2009; Pfitzer et al., 2022a). Durch die Bearbeitung des Bodens soll der Lebensraum gestört und damit der Entwicklungszyklus unterbrochen werden. Um zunächst ein geeignetes Zeitfenster zur Bodenbearbeitung zu bestimmen, wurde eine Untersuchung zur Lokalisierung der Nymphen in Abhängigkeit von der Bodentemperatur durchgeführt. Zuvor wurde anhand von Probenahmen im September, vor der Zuckerrübenernte, und im Mai, kurz vor dem Auftreten der adulten Tiere, gezeigt, dass sich die Nymphen von *P. leporinus* unterirdisch entwickeln und sich durch verschiedene Bodenschichten bewegen (Bressan et al., 2009a). Unsere Ergebnisse der wöchentlichen Probenahmen zeigen, dass die Nymphen in den Oberboden (0-10 cm) wandern, wenn die Temperatur durchschnittlich 8,6 °C erreicht, was die Möglichkeit bietet, das Pflügen als Mittel zur Unterbrechung des Lebenszyklus im Rahmen eines integrierten Schädlingsbekämpfungsprogramms einzusetzen. Die Zuckerrüben werden zwischen September und November geerntet, wenn die Bodentemperatur in unseren Untersuchungsgebieten von durchschnittlich 13,7 °C auf 6,6 °C sinkt, so dass

das Pflügen in 20 cm Tiefe kurz nach der Ernte eine praktikable Strategie darstellen könnte, um die Entwicklung der Nymphen zu adulten Insekten zu unterbrechen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Nymphen selbst dann noch aktiv waren, wenn die Bodentemperatur in 10 cm Tiefe auf 0 °C sank, ähnlich wie bei anderen fulgoromorphen Arten wie *Hyalesthes obsoletus* (Sforza et al., 1999).

Neben der Lokalisation der Nymphen im Boden sind auch Studien zur Wirtspflanzenpräferenz der Nymphen für die Entwicklung von Kontrollstrategien und der Zucht von Bedeutung. Für die Zucht ist es von Relevanz, dass Zuckerrüben für Nymphen attraktiver sind als Winterweizen, sodass es nicht notwendig ist, unterschiedliches Wirtspflanzenmaterial bereitzustellen. Im Zuge der Untersuchungen zur Unterbrechung des Lebenszyklus wurden auch unterschiedliche Wirtspflanzen als Folgefrucht im Feld untersucht. Diese Studien zeigten, dass die Einsaat von Mais, im Mai des nach der Ernte folgenden Jahres, die Population von ausfliegenden Adulten reduzieren kann (Pfitzer et al., 2022a). Kombiniert mit unseren Erkenntnissen bedeutet dies, dass nicht die Einsaat von Mais als Folgefrucht die Ursache für die Reduktion der Population ist, sondern die lange Brache des Bodens von Oktober bis Mai. Die Nymphen scheinen nicht in der Lage zu sein, ohne Wirtspflanze im Frühjahr die Entwicklung zu Adulten vollziehen zu können. Der Anbau von Nachfrüchten ist jedoch ratsam, da durch die Bodenbedeckung und Durchwurzelung über den Winter die Nitratauswaschung um bis zu 70 % vermindert wird (Tonitto et al., 2006). Um ein größeres Spektrum an möglichen Wirts- und Feindpflanzen zu untersuchen, könnte eine Festphasen-Mikroextraktion-Gaschromatographie-Massenspektrometrie in Kombination mit einer Elektroantennografie durchgeführt werden (Robert et al., 2012; Barata et al., 2000), um Lock- beziehungsweise Repellentwirkungen der Zikade auf unterschiedliche Kulturpflanzen zu untersuchen.

Laborzucht als Grundlage für weitere biotechnologische Studien

Für zwei Arten der Familie der Glasflügelzikaden (Cixiidae) wurden bereits Protokolle zur Laborzucht veröffentlicht. Erstes Beispiel hierfür ist *H. obsoletus* welche seit Mitte des letzten Jahrhunderts als ein Vektor von Stolbur Phytoplasmen in Nachtschattengewächsen, insbesondere Kartoffeln bekannt ist (Suchov, K.C. & Vovk, A.M., 1948). Darüber hinaus wurde *H. obsoletus* in Deutschland in den 2000er Jahren als Vektor der Schwarzholzkrankheit (Bois noir), einer der bedeutendsten Krankheiten im Weinbau, bestätigt. Die Schwarzholzkrankheit wird ebenfalls durch Phytoplasmen verursacht und zeigt eine Schadwirkung durch Vergilbung und Rotverfärbung der Blätter (Maixner et al., 1995). Derzeit ist die Schwarzholzkrankheit eine weitverbreitete Pflanzenkrankheit in serbischen Weinanbaugebieten (Kosovac et al., 2019). Genauso wie *P. leporinus* ist *H. obsoletus* in der Lage sich von unterschiedlichen Wirtspflanzen, wie Brennnessel, Lavendel, Ackerwinde oder Weinrebe, zu ernähren (Johannesen et al., 2008). Im Rahmen der Erforschung zur Bekämpfung von *H. obsoletus* in Lavendel wurde ein Protokoll zur Zucht unter kontrollierten Bedingungen veröffentlicht (Sforza et al., 1999). Die zweite Art der Glasflügelzikaden, für die ein Protokoll zur Zucht entwickelt wurde, ist die tropische Glasflügelzikade *Haplaxius crudus* (Beltran-Aldana et al., 2020), welche das Phytoplasma *Candidatus Phytoplasma asteris* überträgt und damit die letale Vergilbungs- und Wiltkrankheit der Ölpalmen (lethal wilt of oil palm) auslöst (Alvarez et al., 2014).

Die in dieser Dissertation entwickelten Protokolle für die Laborzucht von *P. leporinus* erleichterten nicht nur die hier beschriebenen Studien zum Lebenszyklus, sondern werden auch zukünftig die Analyse von Merkmalsparametern ermöglichen, die zur Modellierung der Ausbreitung und der Phänologie der Schilf-Glasflügelzikade genutzt werden können. Darüber hinaus ist die kontrollierte Aufzucht unter Labor- und Gewächshausbedingungen von *P. leporinus* notwendig, um Bioassays für die Entwicklung biologischer und umweltfreundlicher Bekämpfungsmethoden durchzuführen. Wie auch in der Literatur für *H. obsoletus* beschrieben, benötigt *P. leporinus* einen sicheren Eiablageort (Sforza et al., 1999). Unsere Methode weist diesen durch die Verwendung von Tonkugeln als deckende Schicht im Rübentopf auf.

Die Schadwirkung von *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus*

Die den frühen 1990er Jahren durchgeführte Studien zeigten, dass eine Infektion von Zuckerrüben mit *Arsenophonus* einen geringeren Zuckergehalt bedeutete (Gatineau et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass dieses Bakterium durch *P. leporinus* auf Immergrün (*Vinca minor* L.) und Zuckerrüben übertragen werden kann. Die phylogenetische Analyse dieses Bakteriums zeigte eine enge Verwandtschaft zu *Phlomobacter fragariae* (Sémétey et al., 2007c). *P. fragariae* ist die derzeit einzige andere bekannte Art aus dem Genus *Arsenophonus* mit phytopathogenen Eigenschaften. Das Krankheitsbild, welches durch *P. fragariae* ausgelöst wird, heißt „Marginal chlorosis disease of strawberry“ und spielt in West-Frankreich seit den späten 1980er Jahren und in jüngerer Vergangenheit auch in Japan eine bedeutende Rolle (Nourrisseau, 1993; Tanaka et al., 2006). Das Vektorinsekt für *P. fragariae* in Frankreich ist die Pflanzenglasflügelzikade *Cixius wagneri* (Danet et al., 2003; Danet et al., 2004).

Sowohl Untersuchungen aus Frankreich (Bressan et al., 2008) als auch unsere Studien aus den Jahren 2020, 2021 und 2022 (Publikation II und Publikation III) zeigen, dass mindestens 60 % der untersuchten *P. leporinus* eine Infektion mit *Arsenophonus* aufwiesen. Hervorzuheben ist, dass die Weitergabe des Bakteriums auf Nachkommen infizierter Weibchen möglich ist, es also zu einer vertikalen Transmission kommt (Bressan et al., 2009b). Hier bildet *A. phytopathogenicus* keine Ausnahme, da mehrere *Arsenophonus*-Symbionten hauptsächlich mütterlicherseits weitergegeben werden (Wilkes et al., 2011). Adulte Männchen und Weibchen, genauso wie Nymphen, können über ihre gesamte Lebensspanne *Arsenophonus* auf Zuckerrübensämlinge übertragen (Bressan et al., 2009b). Eine Übertragung von *Arsenophonus* durch *P. leporinus* auf Kartoffeln ist möglich (Publikation III).

90 % der untersuchten Kartoffel- und Zuckerrübenproben wurden positiv auf *Arsenophonus* getestet (Publikation III). Es wurden zunächst die Wurzelspitzen von Zuckerrüben und Kartoffelknollen untersucht. Die Probenahme der Kartoffelknollen erfolgte im September, also am Ende der Vegetationsperiode. Sämtliche Proben zeigten symptomatische Gummiknollen. Gummiartigkeit ist bei Rüben eines der bekannten Symptome des Befalls mit Stolbur Phytoplasmen (Ćurčić et al., 2021). Studien zur Charakterisierung der Symptome und Quantifizierung verursachten Schäden durch *Arsenophonus* in Kartoffeln sind erforderlich, um das Schadpotenzial einschätzen zu können.

Die Prävalenz von *Arsenophonus* in anderen Kartoffelanbauregionen ist unbekannt und sollte untersucht werden, um geeignete Eindämmungsmaßnahmen zu ermöglichen. Die Kultivierung der Bakterienart in Nährmedien wäre sinnvoll, um das Krankheitsbild in Zuckerrüben und die Schadwirkungen von *Arsenophonus* auf das Wachstum von Kartoffeln erforschen zu können, und um die Henle-Koch'schen Postulate zu erfüllen. Dies gelang für eine verwandte Art aus dem Genus *Arsenophonus*, *Arsenophonus arthropodicus* (Dale et al., 2006). Weiterhin müssen die Auswirkungen der Besiedlung der Kartoffel untersucht werden. Hier stellen sich folgende Leitfragen: Wie wirkt sich eine Infektion mit *Arsenophonus* auf die Ertragsmenge und -qualität der Kartoffeln aus? Welche weiteren Vektoren infizieren sich gegebenenfalls in der Kartoffelkultur?

Darüber hinaus bleibt die Frage offen, ob *Arsenophonus* in Kartoffeln über das Pflanzgut übertragbar ist. Dieses ist bei Stolbur Phytoplasmen der Fall (Crosslin et al., 2011). Die Übertragbarkeit über Pflanzgut stellt eine Gefahr für die Verschleppung der Infektion in andere Regionen dar und ist somit eines der dringlichen Folgeprojekte auf diesem Gebiet.

Die Schadwirkung von *Candidatus Phytoplasma solani*

Phytoplasmen verursachen in zahlreichen europäischen Gemüsekulturen große wirtschaftliche Schäden (Girsova et al., 2016; Gaudin et al., 2011; Crosslin et al., 2011; Carraro et al., 2008). In Zuckerrüben spielen Stolbur Phytoplasmen vor allem in Serbien eine bedeutende Rolle (Ćurčić et al., 2021). Vor kurzem wurde

die Entdeckung der letalen Auswirkungen des gemeinsamen Auftretens von *Candidatus phytoplasma solani* und des bodenbürtigen Pilzes *Macrophomina phaseolina* in Zuckerrüben veröffentlicht (Duduk et al., 2023). In Südwest-Deutschland wurden im Jahr 2021 Stolbur Phytoplasmen erstmals in mehr als 15 % einer *P. leporinus*-Population, nämlich in über 90 % der untersuchten Zikaden gefunden (Behrmann, 2020; Pfitzer et al., 2019). Die Infektion der Rüben mit Stolbur Phytoplasmen ist deshalb von Bedeutung, weil die Reduktion von Zuckergehalt (Brix) und mittlerer Pfahlwurzelbiomasse der Zuckerrüben bei einer Infektion mit Stolbur Phytoplasmen stärker ausgeprägt sind als bei einem Befall mit *Arsenophonus* (Bressan et al., 2008). In den deutschlandweiten Untersuchungen der Rüben von 2017 – 2020 (Publikation I) wurde ausschließlich das Vorkommen von *Arsenophonus* untersucht. Seit der Veröffentlichung von Publikation II erfolgte eine Änderung der bisherigen Praxis, da symptomatische Zuckerrüben bisher ausschließlich auf eine Infektion mit *Arsenophonus* getestet wurden.

Die Übertragung von Stolbur Phytoplasmen durch *P. leporinus* auf Pflanzen wurde bisher nicht untersucht. In vorhergehenden Studien wurde *H. obsoletus* verwendet, um die Übertragung von Stolbur Phytoplasmen auf Zuckerrüben zu bestätigen, da zum Studienzeitpunkt keine mit Stolbur Phytoplasmen infizierten Exemplare von *P. leporinus* zur Verfügung standen (Bressan et al., 2008). Um zu untersuchen, ob *P. leporinus* Zuckerrüben mit Stolbur Phytoplasmen infizieren können, wurden Übertragungsversuche durchgeführt. Nymphen der *P. leporinus* übertrugen binnen 64 Tagen Stolbur Phytoplasmen auf Zuckerrüben (Publikation III). Die Übertragung von Stolbur Phytoplasmen innerhalb der Insektenpopulation hängt in vielen Fällen, anders als die Übertragung von *Arsenophonus*, von der horizontalen Übertragung durch Vektorinsekten ab (Bressan et al., 2008; Hogenhout et al., 2008). Dennoch sind auch Arten bekannt, bei denen das Stolbur Phytoplasma transovariell weitergegeben wird (Alma et al., 1997). Untersuchungen zur Lokalisation der Stolbur Phytoplasmen in regional auftretenden Arten der Glasflügelzikaden, wie *H. obsoletus* oder *P. leporinus*, sind dringliche Folgeprojekt, um das Schadpotenzial in Kartoffeln einschätzen zu können.

Es wäre weiterhin wichtig zu untersuchen, ob die Saugaktivität der Nymphen an infizierten Pflanzen vor dem Winter ausreicht, um Stolbur Phytoplasmen aufzunehmen, und ob die Latenzperiode bis zum Ausflug im nächsten Frühjahr anhält. Weiterhin wäre es möglich, dass eine Aufnahme des Bakteriums von einer Reservoir-Pflanze zu Beginn der Vegetationsperiode erforderlich ist. Als Reservoir-Pflanzen für Stolbur Phytoplasmen sind Ackerbeikräuter wie Ackerwinde (*Convolvus arvensis* L.), Brennessel (*Urtica dioica* L.), Ackerkratzdisteln (*Cirsium arvense* L.) oder Wilde Mohrenhirse (*Sorghum halepense* L.) bekannt (Riolo et al., 2007; Navrátil et al., 2009; Jović et al., 2009). Insbesondere im Zusammenhang mit der Winden-Glasflügelzikade spielen Brennesseln und Ackerwinden eine wichtige Rolle. An der Wurzel dieser Pflanzenarten wurden Nymphen der Winden-Glasflügelzikade gefunden. Es wurde beobachtet, dass durch die Erweiterung des Wirtspflanzenkreises von *Hyalesthes obsoletus* auf Brennesseln und Ackerwinde die Verbreitung des Stolbur Phytoplasmen und damit das Krankheitsbild *Bois noir* in deutschen und französischen Weinbaugebieten voranschritt (Johannesen et al., 2008). Die Studie dieser Beikrautarten als Zwischenwirte für die Schilf-Glasflügelzikade könnte erklären, wie es zu dem sprunghaften Anstieg der Stolbur Phytoplasmen in der Rheinebene kam.

Stolbur Phytoplasmen sind in Kartoffeln mehrfach als Auslöser von Krankheitsbildern nachgewiesen worden (Jović et al., 2011; Mori et al., 2013; Mitrović et al., 2015). Infektionen mit jeweils beiden Phytopathogenen konnten sowohl in *P. leporinus*, Zuckerrüben als auch Kartoffeln nachgewiesen werden (Publikation II und Publikation III). Es liegen bisher keine Daten über die Auswirkungen von Doppelinfektionen auf Zuckerrübenerträge und Kartoffelqualitäten vor. Weitere Studien sind erforderlich, um die Wechselwirkungen zwischen diesen Krankheitserregern, Vektorinsekten und den Wirtspflanzen zu verstehen.

4 Schlussfolgerungen

Die Schilf-Glasflügelzikade (*Pentastiridius leporinus*) gewinnt als Schädling von Zuckerrübe und Kartoffel im Zuge des Klimawandels immer stärker an Bedeutung. Da das Wissen um die Biologie und Ökologie dieser Art unzureichend war, leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag, Wissenslücken hinsichtlich der Biologie und Ökologie der Zikade zu schließen. Die wichtigsten Ergebnisse sind in Abbildung 7 zusammengefasst. Es wurden eine Kartierung des SBR-Verbreitungsgebietes von 2017 - 2020 vorgenommen und die Ausbreitung der Schilf-Glasflügelzikade in der Rheinebene von Mainz bis Mannheim in den Jahren 2020 bis 2022 gezeigt.

Es wurden Untersuchungen veröffentlicht, die wesentlich zum Verständnis der Biologie hinsichtlich Lebens- und Entwicklungszyklus, Phänologie, Wirtspflanzen und übertragenen Erreger beitragen.



Abbildung 7. Zusammenfassung der Forschungsergebnisse aus dieser Arbeit. Die wichtigsten Ergebnisse sind unter den jeweiligen Themenfeldern zusammengefasst.

Die Erforschung der Schilf-Glasflügelzikade und der von ihr übertragenen Erreger Arsenophonus und Stolbur Phytoplasmen sowie deren Wirtspflanzen sind im Zuge des Klimawandels weiterhin von hoher Relevanz. Ohne eine wirksame und umweltfreundliche Bekämpfungsstrategie sind hohe ökonomische Verluste in den betroffenen Kulturen zu erwarten. Daher konnten weitere Forschungsprojekte wie z.B. das EIP-Agri-geförderte Projekt „Sortenwahl für Nachhaltigkeit und Resistenz (SONAR)“ des Verbandes der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V. im Sommer 2022 begonnen werden. Die Justus-Liebig-Universität Gießen und das Fraunhofer IME sind Projektpartner und bearbeiten ein Arbeitspaket zur Attraktivität unterschiedlicher Zuckerrübensorten in Gewächshausversuchen. Darüber hinaus ist das Fraunhofer IME im EntoProg-Projekt, finanziert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), und unter der Projektleitung der Zentralstelle der Länder für EDV-gestützte Entscheidungshilfen und Programme im Pflanzenschutz (ZEPP) beteiligt. Hier werden in Rahmen einer Dissertation Fragestellungen zum Lebenszyklus der Schilf-Glasflügelzikade in verschiedenen Umgebungen weiter untersucht.

Größte Bedeutung haben die Ergebnisse zur Biologie der Schilf-Glasflügelzikade sowie die Besiedlung der Kartoffeln durch die Schilf-Glasflügelzikade. Die erarbeiteten Methoden und Bioassays können zukünftig an der Justus-Liebig-Universität genutzt werden, um weiter an der Schilf-Glasflügelzikade zu forschen.

5 Literatur

- Alma, A., D. Bosco, A. Danielli, A. Bertaccini, M. Vibio, A. Arzone (1997): Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* 6, 2/1997, S. 115–121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1997.tb00079.x>.
- Alvarez, E., J. F. Mejía, N. Contaldo, S. Paltrinieri, B. Duduk, A. Bertaccini (2014): 'Candidatus Phytoplasma asteris' Strains Associated with Oil Palm Lethal Wilt in Colombia. *Plant Disease* 98, 3/2014, S. 311–318. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1182-RE>.
- Baker, M. B., P. D. Venugopal, W. O. Lamp (2015): Climate Change and Phenology: *Empoasca fabae* (Hemiptera: Cicadellidae) Migration and Severity of Impact. *PloS one* 10, 5/2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124915>.
- Barata, E. N., J. A. Pickett, L. J. Wadhams, C. M. Woodcock, H. Mustaparta (2000): Identification of Host and Nonhost Semiochemicals of Eucalyptus Woodborer *Phoracantha semipunctata* by Gas Chromatography–Electroantennography. *Journal of Chemical Ecology* 26, 8/2000, S. 1877–1895. <https://doi.org/10.1023/A:1005548824429>.
- Behrmann, S.-C. (2020): Regulierung der Schilf-Glasflügelzikade (*Pentastiridius leporinus* Linnaeus) – Überträger des Syndroms Basses Richesses (SBR). Master-Thesis, Humboldt-Universität zu Berlin, Deutschland.
- Bell, J. R., L. Alderson, D. Izera, T. Kruger, S. Parker, J. Pickup, C. R. Shortall, M. S. Taylor, P. Verrier, R. Harrington (2015): Long-term phenological trends, species accumulation rates, aphid traits and climate: five decades of change in migrating aphids. *The Journal of Animal Ecology* 84, 1/2015, S. 21–34. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12282>.
- Beltran-Aldana, I. J., A. E. Bustillo-Pardey, A. Morales-Rodriguez (2020): Mass Rearing of *Haplaxius crudus* (Hemiptera: Cixiidae), an Important Insect Pest in the Palm Oil Industry of Colombia. *American Journal of Entomology* 4, 2/2020, S. 39–44. doi: 10.11648/j.aje.20200402.13.
- Bentz, B. J., J. Régnière, C. J. Fettig, E. M. Hansen, J. L. Hayes, J. A. Hicke, R. G. Kelsey, J. F. Negrón, S. J. Seybold (2010): Climate Change and Bark Beetles of the Western United States and Canada: Direct and Indirect Effects. *BioScience* 60, 8/2010, S. 602–613. <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.8.6>.
- Biedermann, R., R. Niedringhaus (2004): Die Zikaden Deutschlands. Bestimmungstabellen für alle Arten. Wissenschaftlich-Akademischer-Buchvertrieb, Schönebeck, Germany. ISBN: 3000128069.
- Biologiezentrum des OÖ. Landesmuseums (Hrsg.) (2002): Zikaden. Leafhoppers, Planthoppers and Cicadas (Insecta: Hemiptera: Auchenorrhyncha). The family Cixiidae Spinola 1839 (Hemiptera: Fulgoromorpha) - a Review. Oberösterreichisches Landesmuseum, Linz, Österreich. ISBN: 9783854740773.
- Bonal, R., M. Hernández, J. M. Espelta, A. Muñoz, J. M. Aparicio (2015): Unexpected consequences of a drier world: evidence that delay in late summer rains biases the population sex ratio of an insect. *Royal Society Open Science* 2, 9/2015, S. 150–198. <https://doi.org/10.1098/rsos.150198>.
- Bové, J., M. Garnier (2003): Phloem- and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Science* 163, 3/2002, S. 1083–1098.
- Bressan, A. (2014): Emergence and evolution of *Arsenophonus* bacteria as insect-vectored plant pathogens. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 22, 2014, S. 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.004>.
- Bressan, A. (2009): Agronomic practices as potential sustainable options for the management of *Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae) in sugar beet crops. *Journal of Applied Entomology* 133, 9-10/2009, S. 760–766. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01407.x>.
- Bressan, A., W.-E. Holzinger, B. Nusillard, O. Sémétey, F. Gatineau, M. Simonato, E. Boudon-Padieu (2009a): Identification and biological traits of a planthopper from the genus *Pentastiridius* (Hemiptera:

- Cixiidae) adapted to an annual cropping rotation. *European Journal of Entomology* 106, 3/2009, S. 405–413.
- Bressan, A., F. J. Moral García, E. Boudon-Padieu (2011): The prevalence of '*Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus*' infecting the planthopper *Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae) increase nonlinearly with the population abundance in sugar beet fields. *Environmental Entomology* 40, 6/2011, S. 1345–1352. <https://doi.org/10.1603/EN10257>.
- Bressan, A., F. J. Moral García, O. Sémétey, E. Boudon-Padieu (2010): Spatio-temporal pattern of *Pentastiridius leporinus* migration in an ephemeral cropping system. *Agricultural and Forest Entomology* 12, 1/2010, S. 59–68. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2009.00450.x>.
- Bressan, A., O. Sémétey, J. Arneodo, J. Lherminier, E. Boudon-Padieu (2009b): Vector transmission of a plant-pathogenic bacterium in the Arsenophonus clade sharing ecological traits with facultative insect endosymbionts. *Phytopathology* 99, 11/2009, S. 1289–1296. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-11-1289>.
- Bressan, A., O. Sémétey, B. Nusillard, E. Boudon-Padieu (2007): The syndrome "basses richesses" of sugar beet in France is associated with different pathogen types and insect vectors. *Bulletin of Insectology* 60, 2/2007, S. 395–396.
- Bressan, A., O. Sémétey, B. Nusillard, D. Clair, E. Boudon-Padieu (2008): Insect Vectors (Hemiptera: Cixiidae) and Pathogens Associated with the Disease Syndrome "Basses Richesses" of Sugar Beet in France. *Plant Disease* 92, 1/2008, S. 113–119. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-1-0113>.
- Bressan, A., F. Terlizzi, R. Credi (2012): Independent origins of vectored plant pathogenic bacteria from arthropod-associated Arsenophonus endosymbionts. *Microbial Ecology* 63, 3/2012, S. 628–638. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9933-5>.
- Buckley, L. B. (2022): Temperature-sensitive development shapes insect phenological responses to climate change. *Current Opinion in Insect Science* 52, 2022, S. 100–897. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2022.100897>.
- Carraro, L., F. Ferrini, M. Martini, P. Ermacora, N. Loi (2008): A serious epidemic of stolbur on celery. *Journal of Plant Pathology* 90, 1/2008, S. 131–135.
- Chiel, E., Y. Gottlieb, E. Zchori-Fein, N. Mozes-Daube, N. Katzir, M. Inbar, M. Ghanim (2007): Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. *Bulletin of Entomological Research* 97, 4/2007, S. 407–413. <https://doi.org/10.1017/S0007485307005159>.
- Chinellato, F., A. Battisti, V. Finozzi, M. Faccoli (2014): Better today but worse tomorrow: how warm summers affect breeding performance of a Scots pine pest. *Agrochimica: International Journal of Plant Chemistry, Soil Science and Plant Nutrition of the University of Pisa* 58, Special Issue/2014. DOI: 10.1400/226737.
- Chuche, J., J.-L. Danet, P. Salar, X. Foissac, D. Thiéry (2016): Transmission of '*Candidatus Phytoplasma solani*' by *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera: Cixiidae). *Annals of Applied Biology* 169, 2/2016, S. 214–223. <https://doi.org/10.1111/aab.12291>.
- Cousin, M. T., I. M. Smith (1988): *European Handbook of Plant Diseases. The aster yellows complex*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. ISBN: 9781444314182.
- Crosslin, J.-M., L.-L. Hamlin, J.-L. Buchman, J.-E. Munyaneza (2011): Transmission of Potato Purple Top Phytoplasma to Potato Tubers and Daughter Plants. *American Journal of Potato Research* 88, 4/2011, S. 339–345. <https://doi.org/10.1007/s12230-011-9199-y>.
- Ćurčić, Ž., J. Stepanović, C. Zübert, K. Taški-Ajduković, A. Kosovac, E. Rekanović, M. Kube, B. Duduk (2021): Rubbery Taproot Disease of Sugar Beet in Serbia Associated with '*Candidatus Phytoplasma solani*'. *Plant Disease* 105, 2/2021, S. 255–263. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-20-1602-RE>.
- Dale, C., M. Beeton, C. Harbison, T. Jones, M. Pontes (2006): Isolation, pure culture, and characterization of "*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*," an intracellular secondary endosymbiont from the

- hippoboscid louse fly *Pseudolynchia canariensis*. Applied and Environmental Microbiology 72, 4/2006, S. 2997–3004. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2997-3004.2006>.
- Danet, J. L., P. Salar, B. Batailler, X. Foissac, M. Garnier (2004): Marginal chlorosis of strawberry: transmission of "*Candidatus phlomobacter fragariae*" to periwinkle by the planthopper *Cixius wagneri* (China) and characterization of the isolate. Acta Horticulturae, 656/2004, S. 87–92. DOI: 10.17660/ActaHortic.2004.656.12.
- Danet, J.-L., X. Foissac, L. Zreik, P. Salar, E. Verdin, J.-G. Nourrisseau, M. Garnier (2003): "*Candidatus Phlomobacter fragariae*" Is the Prevalent Agent of Marginal Chlorosis of Strawberry in French Production Fields and Is Transmitted by the Planthopper *Cixius wagneri* (China). Phytopathology 93, 6/2003, S. 644–649. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.644>.
- Deutscher Wetterdienst (2023a): Temperaturmittel in Deutschland Sommer 2022. Abrufbar unter <https://www.wetterkontor.de/de/wetter/deutschland/monatswerte-temperatur.asp?y=2022&m=15>.
- Deutscher Wetterdienst (2023b): Temperaturmittel in Deutschland. Abrufbar unter <https://www.wetterkontor.de/de/wetter/deutschland/monatswerte-temperatur.asp>.
- Doyle, J. J., J. L. Doyle (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 1987.
- dpa/lrs (2023): Steigender Zikaden-Befall im Kartoffelbau. proplanta.de, 2023.
- Duduk, N., I. Vico, A. Kosovac, J. Stepanović, Ž. Čurčić, N. Vučković, E. Rekanović, B. Duduk (2023): A biotroph sets the stage for a necrotroph to play: '*Candidatus Phytoplasma solani*' infection of sugar beet facilitated *Macrophomina phaseolina* root rot. Frontiers in Microbiology 14, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1164035>. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1164035>.
- Duron, O., D. Bouchon, S. Boutin, L. Bellamy, L. Zhou, J. Engelstädter, G. D. Hurst (2008): The diversity of reproductive parasites among arthropods: Wolbachia do not walk alone. BMC Biology 6, 2008, S. 27. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-27>.
- Ember, I., Z. Acs, J. E. Munyaneza, J. Crosslin, M. Kolber (2011): Survey and molecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia. European Journal of Plant Pathology 130, 3/2011, S. 367–377. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9759-5>.
- Fry, J. (2021): SBR-Krankheit: Befallene Rübenfläche verdoppelt. agrarheute Magazin, 2021.
- Fry, J. (2020): 20.000 ha geschädigt: Neue Krankheit SBR befällt Rüben im Südwesten. agrarheute Magazin, 2020.
- Gatineau, F., N. Jacob, S. Vautrin, J. Larrue, J. Lherminier, M. Richard-Molard, E. Boudon-Padieu (2002): Association with the Syndrome "Basses Richesses" of Sugar Beet of a Phytoplasma and a Bacterium-Like Organism Transmitted by a *Pentastiridius* sp. Phytopathology 92, 4/2002, S. 384–392. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.4.384>.
- Gatineau, F., J. Larrue, D. Clair, F. Lorton, M. Richard-Molard, E. Boudon-Padieu (2001): A New Natural Planthopper Vector of Stolbur Phytoplasma in the Genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). European Journal of Plant Pathology 107, 3/2001, S. 263–271. <https://doi.org/10.1023/A:1011209229335>.
- Gaudin, J., O. Sémétey, X. Foissac, S. Eveillard (2011): Phytoplasma titer in diseased lavender is not correlated to lavender tolerance to stolbur phytoplasma. Bulletin of Insectology, 64/2011, S. 179–180.
- Girsova, N. V., K. D. Bottner-Parker, D. Z. Bogoutdinov, Y. I. Meshkov, K. A. Mozhaeva, T. B. Kastalyeva, I. M. Lee (2016): Diverse phytoplasmas associated with potato stolbur and other related potato diseases in Russia. European Journal of Plant Pathology 145, 1/2016, S. 139–153. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0824-3>.
- Gutiérrez, D., R. J. Wilson (2021): Intra- and interspecific variation in the responses of insect phenology to climate. The Journal of Animal Ecology 90, 1/2021, S. 248–259. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13348>.

- Hansen, A. K., G. Jeong, T. D. Paine, R. Stouthamer (2007): Frequency of secondary symbiont infection in an invasive psyllid relates to parasitism pressure on a geographic scale in California. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 23/2007, S. 7531–7535. <https://doi.org/10.1128/AEM.01672-07>.
- Häuser, T. (2019): Untersuchung zur Kontrolle von Syndrome des basses richesses (SBR) durch Fruchtfolge und Bodenbearbeitung. Bachelor-Thesis, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland.
- Hinkel-Stallmann, O. (2019): Monitoring von Vergilbungsviren und SBR in Zuckerrüben und mögliche Managementstrategien – eine Übersicht. Master-Thesis, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland.
- Hogenhout, S. A., K. Oshima, E.-D. Ammar, S. Kakizawa, H. N. Kingdom, S. Namba (2008): Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9, 4/2008, S. 403–423. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00472.x>.
- Holzinger, W.-E., I. Kammerlander, H. Nickel (2003): The Auchenorrhyncha of Central Europe. Die Zikaden Mitteleuropas. Volume 1: Fulgoromorpha, Cicadomorpha excl. Cicadellidae. BRILL, Leiden, The Netherlands. ISBN 9789004128958.
- Hossain, R., W. Menzel, C. Lachmann, M. Varrelmann (2021): New insights into virus yellows distribution in Europe and effects of beet yellows virus, beet mild yellowing virus, and beet chlorosis virus on sugar beet yield following field inoculation. *Plant Pathology* 70, 3/2021, S. 584–593. <https://doi.org/10.1111/ppa.13306>.
- Johannesen, J., B. Lux, K. Michel, A. Seitz, M. Maixner (2008): Invasion biology and host specificity of the grapevine yellows disease vector *Hyalesthes obsoletus* in Europe. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 126, 3/2008, S. 217–227. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2007.00655.x>.
- Jönsson, A. M., G. Appelberg, S. Harding, L. Barring (2009): Spatio-temporal impact of climate change on the activity and voltinism of the spruce bark beetle, *Ips typographus*. *Global Change Biology* 15, 2/2009, S. 486–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01742.x>.
- Jović, J., T. Cvrković, M. Mitrović, S. Krnjajić, A. Petrović, M. G. Redinbaugh, R. C. Pratt, S. A. Hogenhout, I. Tosevski (2009): Stolbur phytoplasma transmission to maize by *Reptalus panzeri* and the disease cycle of maize redness in Serbia. *Phytopathology* 99, 9/2009, S. 1053–1061. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-9-1053>.
- Jović, J., I. Ember, M. Mitrović, T. Cvrković, O. Krstić, S. Krnjajić, Z. Acs, M. Kölber, I. Toševski (2011): Molecular detection of potato stolbur phytoplasma in Serbia. *Bulletin of Insectology*, 64/2011, S. 83–84.
- Kawakita, H., T. Saiki, W. Wei, W. Mitsuhashi, K. Watanabe, M. Sato (2000): Identification of Mulberry Dwarf Phytoplasmas in the Genital Organs and Eggs of Leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology* 90, 8/2000, S. 909–914. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.8.909>.
- Khadioli, N., Z. E. H. Tonnang, E. Muchugu, G. Ong'amo, T. Achia, I. Kipchirchir, J. Kroschel, B. Le Ru (2014): Effect of temperature on the phenology of *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera, Crambidae); simulation and visualization of the potential future distribution of *C. partellus* in Africa under warmer temperatures through the development of life-table parameters. *Bulletin of Entomological Research* 104, 6/2014, S. 809–822. DOI: 10.1017/S0007485314000601.
- Kosovac, A., M. Jakovljević, O. Krstić, T. Cvrković, M. Mitrović, I. Toševski, J. Jović (2019): Role of plant-specialized *Hyalesthes obsoletus* associated with *Convolvulus arvensis* and *Crepis foetida* in the transmission of ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’-inflicted bois noir disease of grapevine in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 153, 1/2019, S. 183–195. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1553-1>.
- Lee, I. M., D. E. Gundersen-Rindal, A. Bertaccini (1998): Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88, 12/1998, S. 1359–1366. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1359>.

- Lefol, C., J. Lherminier, E. Boudon-Padieu, J. Larrue, C. Louis, A. Caudwell (1994): Propagation of Flavescence dorée MLO (Mycoplasma-like Organism) in the Leafhopper Vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *Journal of Invertebrate Pathology* 63, 3/1994, S. 285–293.
<https://doi.org/10.1006/jjpa.1994.1053>.
- Lherminier, J., G. Prensier, E. Boudon-Padieu, A. Caudwell (1990): Immunolabeling of Grapevine Flavescence Dorée MLO in Salivary Glands of *Euscelidius variegatus*: A Light and Electron Microscopy Study. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 38, 1/1990, S. 79–85.
- Mahillon, M., R. Groux, F. Bussereau, J. Brodard, C. Debonneville, S. Demal, I. Kellenberger, M. Peter, T. Steinger, O. Schumpp (2022): Virus Yellows and Syndrome "Basses Richesses" in Western Switzerland: A Dramatic 2020 Season Calls for Urgent Control Measures. *Pathogens* 11, 8/2022.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11080885>.
- Maixner, M., U. Ahrens, E. Seemüller (1995): Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology* 101, 3/1995, S. 241–250. <https://doi.org/10.1007/BF01874780>.
- Mitrović, M., V. Trivellone, J. Jović, T. Cvrković, M. Jakovljević, A. Kosovac, O. Krstić, I. Toševski (2015): Potential Hemipteran vectors of “stolbur” phytoplasma in potato fields in Serbia. *Phytopathogenic Mollicutes* 5, 1/2015, 49. DOI: 10.5958/2249-4677.2015.00020.1.
- Mori, N., J. Mitrović, M. Smiljković, N. Duduk, S. Paltrinieri, A. Bertaccini, B. Duduk (2013): *Hyalesthes obsoletus* in Serbia and its role in the epidemiology of corn reddening. *Bulletin of Insectology* 66, 2/2013, S. 245–250.
- Mund, F. (2022): Vergilbte Rüben durch Zikaden: Hoffnung für Landwirte? SBR-Krankheit/Viröse Vergilbung. top agrar online, 2022.
- Nakashima, K., T. Hayashi (1995): Multiplication and Distribution of Rice Yellow Dwarf Phytoplasma in Infected Tissues of Rice and Green Rice Leafhopper *Nephotettix cincticeps*. *Japanese Journal of Phytopathology* 61, 5/1995, S. 451–455.
- Navrátil, M., P. Válová, R. Fialová, P. Lauterer, D. Šafařová, M. Starý (2009): The incidence of stolbur disease and associated yield losses in vegetable crops in South Moravia (Czech Republic). *Crop Protection* 28, 10/2009, S. 898–904. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.05.008>.
- NIKIZ-Projekt (2023): Auftreten der Schilf-Glasflügelzikade. Abrufbar unter <https://nikiz.de/aktuelles/>.
- Nourrisseau, J. G. (1993): Marginal Chlorosis, a New Disease of Strawberries Associated with a Bacteriumlike Organism. *Plant Disease* 77, 10/1993, S. 1055.
- Panjan, M. (1950): Reserches sur stolbur des Solanaceae et le mode de lutte. *Plant Protection*, 2/1950, S. 49–58.
- Pfitzer, R. (2019): Untersuchung zur Verbreitung und Kontrolle von SBR in Zuckerrüben. Master-Thesis, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland.
- Pfitzer, R., M. Rostás, P. Häußermann, T. Häuser, A. Rinklef, K. Schrameyer, R. T. Voegelé, J. Maier, M. Varrelmann (2022a): Effects of crop rotation and soil tillage on suppressing the syndrome “basses richesses” vector *Pentastiridius leporinus* in sugar beet. *Research Square*, 2022.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1956648/v1>
- Pfitzer, R., K. Schrameyer, R.-T. Voegelé, J. Maier, C. Lang, M. Varrelmann (2019): Causes and effects of the occurrence of „Syndrome Basses Richesses“ in German sugar beet growing areas. *Sugar Industry*, 144/2019, S. 70–80.
- Pfitzer, R., M. Varrelmann, G. Hesse, O. Eini (2022b): Molecular Detection of *Pentastiridius leporinus*, the Main Vector of the Syndrome 'Basses Richesses' in Sugar Beet. *Insects* 13, 11/2022.
<https://doi.org/10.3390/insects13110992>.
- Pfitzer, R., M. Varrelmann, K. Schrameyer, M. Rostás (2022c): Life history traits and a method for continuous mass rearing of the planthopper *Pentastiridius leporinus*, a vector of the causal agent of

- syndrome 'basses richesses' in sugar beet. *Pest Management Science* 78, 11/2022, S. 4700–4708.
<https://doi.org/10.1002/ps.7090>.
- Rinklef, A. (2022): Quantifizierung von *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus* mittels Real-Time PCR zur Bestimmung der SBR-Befallsstärke in verschiedenen Genotypen von *Beta vulgaris*. Master-Thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.
- Rinklef, A. (2019): Untersuchung zur Reduktion von Syndrome basses richesses (SBR) durch Fruchtfolge und Beizung. Bachelor-Thesis, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland.
- Riolo, P., N. Isidoro, L. Landi (2007): Relationships among *Hyalesthes obsoletus*, its herbaceous host plants and “bois noir” phytoplasma strains in vineyard ecosystems in the Marche region (central-eastern Italy). *Bulletin of Insectology* 60, 2/2007, S. 353–354.
- Robert, C., M. Erb, M. Duployer, C. Zwahlen, G. R. Doyen, T. Turlings (2012): Herbivore-induced plant volatiles mediate host selection by a root herbivore. *The New Phytologist* 194, 4/2012, S. 1061–1069.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04127.x>.
- Schwaderer, C. (2014): Untersuchungen zu SBR („Syndrome basses richesses“), eine in Süddeutschland neu aufgetretene Zuckerrübenkrankheit. Bachelor-Thesis, Hochschule für Wirtschaft und Umwelt Nürtingen-Geislingen, Deutschland.
- Sémétey, O., A. Bressan, F. Gatineau, E. Boudon-Padiou (2007a): Development of a specific assay using RISA for detection of the bacterial agent of "basses richesses" syndrome of sugar beet and confirmation of a *Pentastiridius* sp. (Fulgoromopha, Cixiidae) as the economic vector. *Plant Pathology* 56, 5/2007, S. 797–804. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01693.x>.
- Sémétey, O., A. Bressan, M. Richard-Molard, E. Boudon-Padiou (2007b): Monitoring of proteobacteria and phytoplasma in sugar beets naturally or experimentally affected by the disease syndrome ‘Basses richesses’. *European Journal of Plant Pathology* 117, 2/2007, S. 187–196.
<https://doi.org/10.1007/s10658-006-9087-3>.
- Sémétey, O., F. Gatineau, A. Bressan, E. Boudon-Padiou (2007c): Characterization of a gamma-3 Proteobacteria Responsible for the Syndrome "Basses Richesses" of Sugar Beet Transmitted by *Pentastiridius* sp. (Hemiptera, Cixiidae). *Phytopathology* 97, 1/2007, S. 72–78.
<https://doi.org/10.1094/PHTO-97-0072>.
- Sforza, R., Bourgoin T., S. W. Wilson, E. Boudon-Padiou (1999): Field observations, laboratory rearing and descriptions of immatures of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae). *European Journal of Entomology* 96, 1999, S. 409–418.
- Simon, C., T. R. Buckley, F. Frati, J.-B. Stewart, A.-T. Beckenbach (2006): Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37, 1/2006, S. 545–579. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110018>.
- Suchov, K.C. & Vovk, A.M. (1948): Biology of the leafhopper *Hyalesthes obsoletus* Signoret, vector of the stolbur virus. *Trudy Inst. Gen.*, 15/1948, 193–202 (auf Russisch).
- Südzucker AG (2023): Syndrome Basses Richesses (SBR). Abrufbar unter <https://bisz.suedzucker.de/pflanzenschutz/blatt-krankheiten/syndrome-basses-richesses/>.
- Tanaka, M., M. Nao, T. Usugi (2006): Occurrence of strawberry marginal chlorosis caused by “*Candidatus Phlomobacter fragariae*” in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 72, 6/2006, S. 374–377.
<https://doi.org/10.1007/s10327-006-0308-6>.
- Thorup-Kristensen, K., M. Salmerón Cortasa, R. Loges (2009): Winter wheat roots grow twice as deep as spring wheat roots, is this important for N uptake and N leaching losses? *Plant and Soil* 322, 2009, S. 101–114. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9898-z>.

- Tonitto, C., M. B. David, L. E. Drinkwater (2006): Replacing bare fallows with cover crops in fertilizer-intensive cropping systems: A meta-analysis of crop yield and N dynamics. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 112, 1/2006, S. 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.07.003>.
- Urbanski, J., M. Mogi, D. O'Donnell, M. DeCotiis, T. Toma, P. Armbruster (2012): Rapid adaptive evolution of photoperiodic response during invasion and range expansion across a climatic gradient. *The American Naturalist* 179, 4/2012, S. 490–500. <https://doi.org/10.1086/664709>.
- Weintraub, P. G., L. Beanland (2006): Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51, 2006, S. 91–111. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>.
- Wilkes, T., O. Duron, A. C. Darby (Hrsg.) (2011): *The genus Arsenophonus*, Boca Raton, Florida. S. 225–244.
- Witczak, N. (2023): Die Schilf-Glasflügelzikade (*Pentastiridius leporinus*) - Entomologische Untersuchung zur Zucht, Entwicklungszyklus und Wirtsattraktivität. Bachelor-Thesis, Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.
- Zimmermann, M. F. (2021): Auftreten der Schilf-Glasflügelzikade als Vektor von SBR (Syndrome des basses richesses) in Zuckerrüben. Erhebung im Einzugsgebiet der Zuckerfabrik Wabern. Bachelor-Thesis, Hochschule Anhalt, Bernburg (Saale), Deutschland.

6 Publikationen

Publikation I (not peer-reviewed)

Spread of bacterial and virus yellowing diseases of sugar beet in South and Central Germany from 2017–2020

Sarah C. Behrmann, Mareike Schwind, Manuela Schieler, Andreas Vilcinskis, Oliver Martinez, Kwang-Zin Lee & Christian Lang

Sugar Industry (2021), Vol. 146, No. 8. DOI: 10.36961/si27343.

Publikation II

Biology and Rearing of an Emerging Sugar Beet Pest: The Planthopper *Pentastiridius leporinus*

Sarah C. Behrmann, Natasha Witzak, Christian Lang, Manuela Schieler, Anna Dettweiler, Benno Kleinhenz, Mareike Schwind, Andreas Vilcinskis & Kwang-Zin Lee

Insects (2022), Vol. 13, No. 7. DOI: 10.3390/insects13070656.

Publikation III

Potato (*Solanum tuberosum*) as a New Host for *Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae) and *Candidatus Arsenophonus* Phytopathogenicus

Sarah C. Behrmann, André Rinklef, Christian Lang, Andreas Vilcinskis & Kwang-Zin Lee

Insects (2023), Vol. 14, No. 3. DOI: 10.3390/insects14030281.

Publikation I (not peer-reviewed)

476 Agriculture/Landwirtschaft

DOI: 10.36961/si27343

Sarah Behrmann; Mareike Schwind; Manuela Schieler; Andreas Vilcinskas; Oliver Martinez; Kwang-Zin Lee; Christian Lang

Ausbreitung von bakteriellen und virösen Vergilbungskrankheiten der Zuckerrübe in Süd- und Mitteldeutschland von 2017–2020

Spread of bacterial and virus yellowing diseases of sugar beet in South and Central Germany from 2017–2020

In den Jahren 2017 bis 2020 wurde in Süd- und Mitteldeutschland ein umfangreiches Monitoring auf bakterielle und viröse Vergilbungskrankheiten durchgeführt. Das Monitoring erfasste erstmals den Befall der Zuckerrüben mit Vergilbungsviren und der Krankheit „Syndrome Basses Richesses“ (SBR). Um den Vergilbungsvirenbefall abbilden zu können, wurden die Proben auf das Vorhandensein mehrerer Virusspezies (BYV, BtMV, Poleroviren) untersucht. Die Krankheit SBR wurde in dieser Untersuchung anhand des häufiger vorkommenden γ -3-Proteobakteriums *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus* untersucht. Es erfolgte die Untersuchung von Verdachtsproben. Die Koordination der Probenahme wurde vom Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e. V. übernommen. Die Ergebnisse zeigen deutlich die Ausdehnung des Starkbefallsgebietes von SBR. Die Ausbreitung von SBR ist durch die Weiterverbreitung und Wanderung der Schilf-Glasflügelzikade (*Pentastiridius leporinus*) erklärbar. Außerdem wurde erstmals die regionale und parallele Ausbreitung von Mischinfektionen beider Vergilbungskrankheiten gezeigt, welche wahrscheinlich die in der Praxis beobachteten, starken Zuckerertragsverluste mitverursachen und weiterer Erforschung bedürfen. Über den vierjährigen Untersuchungszeitraum konnte sowohl eine kontinuierliche Zunahme der SBR-Infektion als auch eine jahresabhängige, stark schwankende Infektion mit Vergilbungsviren festgestellt werden. Daher ist der Entwicklungsbedarf geeigneter Managementsysteme zur Kontrolle von SBR besonders hoch.

Schlüsselwörter: Vergilbungsviren, Syndrome basses richesses, SBR, Vergilbungskrankheiten, Schilf-Glasflügelzikade (*Pentastiridius leporinus*), sugar beet, *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus*, *Beta vulgaris*

1 Einleitung

Die bakteriellen und virösen Vergilbungskrankheiten der Zuckerrübe gewinnen in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung. Die bakterielle Vergilbungskrankheit „Syndrome Basses Richesses“ (weiterhin: SBR) wurde das erste Mal 1991 in Burgund (Frankreich) nachgewiesen, wo sich das Befallsgebiet in den Jahren bis 2004 auf 1800 ha ausdehnte (Sémétey et al. 2007b). Der erste Erregernachweis in Deutschland

From 2017 to 2020 an extensive monitoring for bacterial and viral yellowing diseases was carried out in southern and central Germany. The monitoring recorded for the first time the infestation of sugar beets with yellowing viruses and the disease „Syndrome Basses Richesses“ (SBR). To map the yellowing virus infestation, samples were examined for the presence of several virus species (BYV, BtMV, poleroviruses). The disease SBR was investigated in this study using the more common γ -3 proteobacterium "*Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus*". In this study samples were chosen, which showed yellowing symptoms. The coordination of the sampling was carried out by the Association of Hessian-Palatinate Sugar Beet Growers. Results clearly show the extent of the heavily infested area from SBR to southern Hesse, Rhine-Hesse and Franconia. The spread of SBR can be explained by the migration of the leafhopper *Pentastiridius leporinus*. Furthermore, the regional and parallel spread of mixed infections of both yellowing diseases was shown for the first time, which probably contributed to the strong sugar yield losses observed in practice. Causes and effects of mixed infections of both yellowing diseases require further research. Over the four-year study period, a continuous increase in SBR infections was observed. Therefore, the need for development of appropriate management systems to control SBR is very high.

Key words: virus yellowing, yellowing diseases, syndrome basses richesses, SBR, *Pentastiridius leporinus*, sugar beet, *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus*, *Beta vulgaris*

wurde 2009 im Landkreis Heilbronn erbracht (Schröder et al. 2012). Die SBR-Befallsgebiete in 2018 zeigten eine ausgeprägte Infektion ganzer Anbauregionen in Baden-Württemberg (20 000 ha) und der Elbaue (10 268 ha) sowie ein beginnender Befallsdruck in der Südpfalz (Rheinland-Pfalz; 200 ha) (Pfitzer et al. 2019).

SBR kann durch zwei unterschiedliche Krankheitserreger ausgelöst werden. In Deutschland wurde das γ -3-Proteobakterium *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus* (Sémétey et al.

2007c; Bressan et al. 2012) als vorherrschender Krankheits-erreger nachgewiesen (Pfitzer et al. 2019). Dieses Proteobakterium wurde in Phloemzellen (Siebelementen) gefunden (Gatineau et al. 2002). Das Stolbur-Phytoplasma (16SrXII) *Candidatus Phytoplasma solani* (Gatineau et al. 2001) konnte nur in geringem Umfang in Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg nachgewiesen werden (Pfitzer et al. 2019). Beide Erreger verursachen eine Bildung von Nekrosen, eine Lignifizierung der Zellwände und die Verbräunung der Leitbündel im Rübenkörper (Gatineau et al. 2001). Daraus resultieren im Spätsommer Symptome wie vergilbte Blätter, Deformation der jungen Blätter und ein verringerter Zuckergehalt des Rübenkörpers.

Die Übertragung der Phytopathogene erfolgt über den Hauptvektor, die Schilf-Glasflügelzikade (*Pentastiridius leporinus*) (Bressan et al. 2009a). Die Schilf-Glasflügelzikade (Familie: Cixiidae) kommt in der Zuckerrübe häufig und durchläuft ihren Lebenszyklus in Zuckerrübenflächen mit Weizen als Folgefrucht (Bressan et al. 2011). Das Proteobakterium wurde innerhalb einzelner Organe wie den Speichel- und Keimdrüsen nachgewiesen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die adulten Zikaden über mehrere Tage infektiös blieben und in der Lage waren, mehrere Zuckerrüben zu infizieren (Bressan 2014; Bressan et al. 2009b). Darüber hinaus wurde das Proteobakterium durch infizierte Weibchen an ihre Nachkommen weitergegeben, so dass die schlüpfenden Nymphen bereits in der Lage sind, das Proteobakterium zu übertragen (Bressan et al. 2009b).

Die Auswirkungen einer SBR-Infektion auf den Zuckergehalt und die Frischmasse der Zuckerrüben können immens hoch sein (Bressan et al. 2012; Sémétey et al. 2007b; Bressan et al. 2008). Daher stellt SBR eine der bedeutendsten Krankheiten im Zuckerrübenanbau dar und wurde seit 2017 durch umfangreiche Monitoringaktivitäten untersucht, sodass die Ausbreitung dieser Vergilbungs-krankheit dargestellt werden kann. Sémétey et al. (2007b) zeigten Zuckergehaltsverluste von bis zu 5 % absolut bei einer Infektion mit SBR.

Ein weiteres bedeutungsvolles und wiederauftretendes Schadbild wird durch Vergilbungsviren verursacht. Zu den wichtigsten Vergilbungsviren an Zuckerrüben zählen nach Stevens et al. (2004) und Hossain et al. (2021) das Beet chlorosis virus (BChV) und das Beet mild yellowing virus (BMYV), welche beide zu den Poloroviren gehören, die persistent übertragen werden (Brault et al. 2007). Es wird von den Blattläusen in den Verdauungstrakt aufgenommen und wird bis zum Ableben dieser übertragen. Die Virusaufnahme und Übertragung dauern mehrere Stunden (Dijkstra und Jager 1998). Das Beet yellow virus (BYV) gehört zur Gattung der Closteroviren und wird semi-persistent übertragen (Sylvester 1956). Bei dieser Übertragung reichen kurze Saugzeiten, um das Virus weiterzugeben. Die Viruspartikel haften an den äußeren Mundwerkzeugen, wodurch die Blattläuse nur wenige Tage infektiös bleiben (Dijkstra und Jager 1998).

Das Beet mosaic virus (BtMV) gehört zu den Potyviren und tritt in Deutschland derzeit nur vereinzelt auf (Hossain et al. 2021). Es ist bekannt, dass Infektionen mit dieser Virusart eine Reduktion der Wurzelmasse um bis zu 20 % verursachen können (Watson und Watson 1953). Das BtMV wird nicht persistent übertragen und nach einer kurzen Saugzeit

an infizierten Pflanzen aufgenommen. Die Blattläuse bleiben nur eine kurze Zeit infektiös, da sie das Virus z. B. durch Saugen an gesunden Pflanzen wieder verlieren (Watson 1946). Hierdurch wird eine schnelle Verbreitung dieser Viruspezies ausgeschlossen.

Die Infektion mit Vergilbungsviren wird von Blattläusen, wie *Myzus persicae* und *Aphis fabae*, verursacht. Watson et al. (1951) zeigten, dass die Virusinfektionen mit der Anwesenheit von *M. persicae* stiegen. Es wird davon ausgegangen, dass dies vor allem daran liegt, dass *A. fabae* im Gegensatz zu *M. persicae* sehr standorttreu ist. Nach Limburg et al. (1997) ist *M. persicae* mit 60 % doppelt so effizient in der Übertragung von BYV wie *A. fabae* mit 34 %.

Nach der Übertragung der Vergilbungsviren zeigen sich erste Symptome nach drei bis fünf Wochen (Watson et al. 1951). Smith und Hallsworth (1990) zeigten Ertragsverluste von 29 % bei BMYV und bis zu 47 % bei BYV, bei einer frühen oder mittelfrühen Infektion. Bei einer Infektion im Mai kann der Ertrag um 27 % niedriger liegen. Bei einer späten Infektion mit BChV liegt der Ertragsverlust bei 4–15 %. In Versuchen von Watson et al. (1946) konnte eine Zuckergehaltsreduktion von 1–2 % (absolut) bei einer Infektion mit Vergilbungsviren ermittelt werden. Diese Versuche zeigten weiterhin, dass eine späte Saat anfälliger für eine natürliche Infektion ist als früh gesäte Bestände. Mit Vergilbungsviren infizierte Zuckerrüben zeigen je nach Viruspezies Vergilbungen mit teils rötlichen Nekrosen an den Blättern, außerdem werden die Blätter dick und spröde (Smith und Hallsworth 1990). Eine Infektion mit BYV hat keinen Einfluss auf die Wasseraufnahme der Zuckerrübe aus tieferen Bodenschichten. Die Wachstumsverringering der Zuckerrüben ist vor allem auf die Reduktion der Photosyntheseleistung zurückzuführen (Clover et al. 1999).

2 Untersuchungen auf Zuckerrübenpathogene

Das Beprobungsschema in den Jahren 2017 bis 2020 war identisch. Im Zeitraum von September bis Oktober wurden von den beprobten Standorten Rübenköpfe und erdfreie, vergilbte Blätter entnommen. Diese Rüben zeigten verschiedene Vergilbungs- und SBR-Symptome, wie Vergilbungen mit Nekrosen, Aufhellungen, Mosaikmuster, dicke ledrige Blätter, lanzettliche oder verformte Herzblätter. Die Probenahme wurde durch den Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer koordiniert und von der Arbeitsgemeinschaft für Versuchswesen und Beratung im Zuckerrübenanbau in Baden-Württemberg, Hessen und Rheinland-Pfalz (ARGE Südwest), den Mitarbeitern der Officialberatungen, dem Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer, dem NIKIZ¹-Team sowie den Rohstoffabteilungen der Südzucker AG mithilfe der SRS (Südzuckerrohstoffservice) Landwirte gezogen.

Die Laboruntersuchungen auf SBR wurden 2017 am Landwirtschaftlichen Technologiezentrum Augustenberg (LTZ) in Karlsruhe und am Institut für Zuckerrübenforschung (IfZ) in Göttingen nach derselben Methode durchgeführt. Im Jahr 2018 wurden die Laboruntersuchungen auf SBR am Dienst-

¹ Nachhaltiges Insekten- und Krankheitsmanagement im Zuckerrübenanbau der Zukunft zur Sicherung von Anbau und Verarbeitungsstandort in Rheinland-Pfalz (NIKIZ).

leistungszentrum Ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück (DLR) in Bad Kreuznach und am IfZ in Göttingen durchgeführt. Im Jahr 2017 wurden die untersuchten Proben auf Poleroviren und BYV mittels PCR bei der SESVanderHave N.V./S.A. in Tienen (Belgien) untersucht. Die Virusproben im Jahr 2018 wurden teilweise mittels PCR bei der SES in Tienen auf Poleroviren und BYV und teilweise über das immunologische Nachweisverfahren ELISA am DLR auf BYV, Poleroviren und BtMV, durchgeführt. 2019 wurden alle Analysen am DLR durchgeführt. Im Jahr 2020 wurde das Monitoring im Rahmen des EIP-Agri geförderten Projektes NIKIZ erweitert. Sämtliche Laboruntersuchungen auf Viren- und SBR-Befall wurden am DLR durchgeführt. Die Analyse des Befalls mit Vergilbungsviren wurden durch das immunologische Nachweisverfahren ELISA untersucht. Der Nachweis des SBR-*Proteobacterium* erfolgte mit einer nested-PCR. Das angewandte Verfahren erfolgte nach Séméty et al. (2007a) mit den Primern Fra5 und L1r sowie Alb1 und Oliv1.

2.1 Standorte

Über den vierjährigen Zeitraum wurden insgesamt 3411 Blatt- und Rübenproben untersucht. Die Anzahl der beprobten Standorte pro Bundesland unterschieden sich zwischen den Jahren, da die Untersuchungskapazitäten der Labore über die Jahre aufgestockt werden konnten. Die Anzahl der untersuchten Standorte des jeweiligen Bundeslandes und Jahres sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Anzahl der untersuchten Standorte nach Jahr und Bundesland. 2017 wurden die Proben auf BYV und Poleroviren, ab 2018 zusätzlich auf BtMV untersucht.

Bundesland	2017		2018		2019		2020	
	Viren	SBR	Viren	SBR	Viren	SBR	Viren	SBR
BW	20	19	22	23	9	22	101	97
BY	2	0	0	0	7	16	33	21
HE	2	2	24	25	11	24	133	109
NI	0	0	0	0	0	0	1	1
NW	0	0	0	0	0	0	5	1
RP	31	23	67	69	11	25	214	208
SN	0	0	0	0	0	0	14	10
ST	0	0	0	0	0	0	4	3
TH	0	0	0	0	1	1	2	0
Summe	55	44	113	117	39	88	507	450

Bei der Beprobung wurde die Entnahme von fünf Rübenproben pro Standort angestrebt. Aufgrund der unterschiedlichen Probennehmer und Zeitpunkte sowie Transportschäden wurden eine bis fünf Proben pro Standort untersucht. Auf SBR wurden durchschnittlich 4 Rüben pro Standort untersucht. Auf Vergilbungsviren wurden im Zeitraum von 2017 bis 2020 durchschnittlich 4 Rüben pro Standort untersucht.

2.2 Auswertung der Daten

Zur Auswertung der Daten wurden die Standorte nach Bundesländern und Landkreisen unterteilt. Wurde an einem Standort eine positive Probe detektiert, handelt es sich um einen positiv

befallenen Standort. Zur Auswertung der Mischinfektionen im Jahr 2017 und 2020 wurden nur Standorte herangezogen, welche auf SBR und Vergilbungsviren untersucht wurden. Für 2017 waren es 45 Standorte in 18 Landkreisen in 4 Bundesländern. Für 2020 konnten 449 Standorte in 55 Landkreisen in 7 Bundesländern in die Auswertung aufgenommen werden. Für die Auswertung wurden die einzelnen Standorte je nach Untersuchungsergebnis in die Kategorien SBR-Infektion, Vireninfektion und Mischinfektion (SBR- und Vireninfektion) eingeteilt. Anschließend wurde der Landkreis dem häufigsten Infektionstyp entsprechend der prozentualen Anteile zugeordnet. Die Karten (s. Abb. 1, 2 und 4) wurden mit ArcGIS Pro 2.4.2 erstellt, die Länder- und Kreisgrenzen entstammen dem Bundesamt für Kartographie und Geodäsie (BKG 2018).

3 Ergebnisse

3.1 Ausbreitung des SBR-Befalls

Das Vorkommen von SBR hat über den vierjährigen Untersuchungszeitraum zugenommen. Im Jahr 2017 wurden Proben aus den Bundesländern Baden-Württemberg, Hessen und Rheinland-Pfalz auf SBR untersucht. Hier waren 74 %, 0 % und 30 % der Standorte mit SBR befallen (Abb. 1, oben links). Im Jahr 2018 wurden Proben aus den gleichen Bundesländern untersucht. In Baden-Württemberg waren 74 %, in Hessen 48 % und in Rheinland-Pfalz 58 % der Standorte befallen. Damit wurde 2018 der erste Nachweis für SBR in Hessen erbracht (Abb. 1, oben rechts).

Der Anteil befallener Standorte in Baden-Württemberg blieb 2019 hoch (68 %). In Hessen und Rheinland-Pfalz wurden auf 17 % und 48 % der untersuchten Standorte eine Infektion mit SBR nachgewiesen. Darüber hinaus wurde 2019 eine SBR-Infektion (6 %) im Landkreis Dingolfing-Landau in Bayern nachgewiesen (Abb. 1, unten links).

2020 erfolgte die Untersuchung auf SBR in Proben aus den Bundesländern Baden-Württemberg, Bayern, Hessen, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Rheinland-Pfalz, Sachsen und Sachsen-Anhalt. In Baden-Württemberg hatte sich der auftretende Befall noch einmal verstärkt, auf 88 % der beprobten Standorte wurde eine SBR-Infektion nachgewiesen (Abb. 1, unten rechts). Zum ersten Mal wurde das *Proteobacterium* in dem bisher befallsfreien Landkreis Böblingen (Sindelfingen) nachgewiesen.

Genauso stieg der Anteil befallener Standorte in Bayern (Franken und Niederbayern) auf 62 %. In Hessen und Rheinland-Pfalz zeigte sich eine mittlere Befallssituation mit 33 % befallener Standorte in Hessen und 49 % befallener Standorte in Rheinland-Pfalz. Auf 5 von 10 untersuchten Standorten in Sachsen (50 %) konnte ein SBR-Befall nachgewiesen werden. In Sachsen-Anhalt wurden alle beprobten Standorte positiv getestet. In Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen konnte kein Befall durch das SBR nachgewiesen werden.

3.2 Ausbreitung der Vergilbungsviren

Das Vorkommen von Vergilbungsviren in Zuckerrüben unterlag starken, jährlichen Schwankungen. Im vierjährigen Unter-

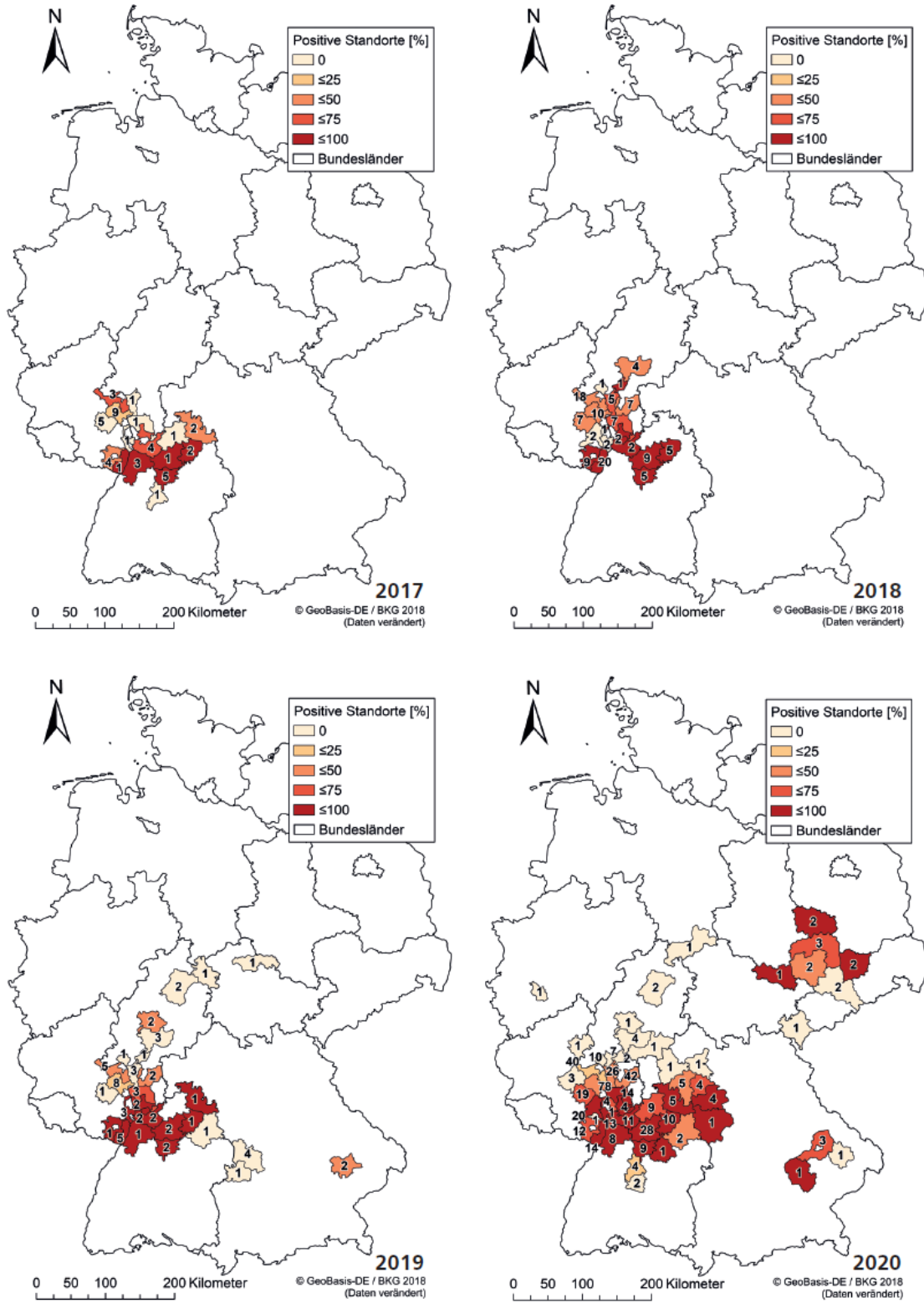


Abb. 1: Verbreitungskarten von SBR 2017–2020. Die Zahlen in den Landkreisen entsprechen den untersuchten Standorten. Die Untersuchungen erfolgten auf das SBR-Proteobakterium (Quelle Bundesländer- und Kreisgrenzen: © GeoBasis-DE / BKG 2018 (Daten verändert)).

suchungszeitraum wurden 2017 und 2020 hohe Befallszahlen nachgewiesen. Im Jahr 2017 wurden insgesamt 52 der 55 untersuchten Standorte (95 %) positiv auf eine Art der Vergilbungsviren getestet (Abb. 2, oben links). In Bayern und Hessen wurde auf allen untersuchten Standorten Viren nachgewiesen. In Baden-Württemberg (95 %) und Rheinland-Pfalz (94 %) konnte an jeweils einem Standort keine Infektion gefunden werden.

Im Jahr 2018 wurde an insgesamt fünf von 116 Standorten (4 %) eine Virusinfektion gezeigt. Der Virusbefall trat im Rhein-Neckar-Kreis (BW), Kreis Bergstraße (HE), Donnersbergkreis (RP), Germersheim (RP) und Mainz-Bingen (RP) auf (Abb. 2, oben rechts). Im Jahr 2019 wurden an zwei von 37 Standorten (Gießen, HE und Alzey-Worms, RP) Vergilbungsviren nachgewiesen (Abb. 2, unten links). Im Jahr 2020 wurde auf 261 von 507 untersuchten Standorten (52 %) ein Befall mit Vergilbungsviren detektiert (Abb. 2, unten rechts). Mehr als die Hälfte der untersuchten Standorte in Bayern (67 %), Baden-Württemberg (63 %), Nordrhein-Westfalen (60 %) und Hessen (59 %) wies eine Infektion mit Vergilbungsviren auf. In Rheinland-Pfalz waren 93 von 214 Standorten (44 %) mit Viren befallen. In den Proben aus Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen konnte keine Infektion nachgewiesen werden. In den Proben von einem niedersächsischen Standort konnte eine Virusinfektion gezeigt werden.

3.3 Prävalenz der Phytopathogene

Um das Auftreten der einzelnen untersuchten Erreger zeigen zu können, wurde die Prävalenz dieser in den Jahren 2017 und 2020 an untersuchten Standorten in verschiedenen Bundesländern ausgewertet und in Abbildung 3 dargestellt. 2017 wurden 98 Proben auf eine Infektion mit Poleroviren und BYV untersucht, auf das SBR-Proteobakterium wurden 94 Proben untersucht. 2017 kamen Poleroviren am häufigsten vor. Eine Infektion mit Poleroviren konnte dreimal häufiger nachgewiesen werden als eine Infektion mit dem BYV. 2020 wurden insgesamt 2316 Proben auf Vergilbungsviren und 2103 Proben auf das SBR-Proteobakterium untersucht. Hierbei wurden 40 % der untersuchten Rüben positiv auf SBR untersucht, während 25 % der Untersuchungen der Blattproben positiv ausfielen. Das Proteobakterium wurde in den Bundesländern Baden-Württemberg, Bayern, Rheinland-Pfalz, Sachsen und Sachsen-Anhalt am häufigsten gefunden.

2020 wurden die Proben auf die drei Virenspezies Poleroviren, BYV und BtMV untersucht. Am häufigsten wurde eine Infektion mit Poleroviren festgestellt, das BYV trat weniger häufig auf, war aber immer noch in fünf der neun untersuchten Bundesländer zu finden. Die Virusspezies BtMV wurden 2020 in insgesamt 66 Proben gefunden, der Nachweis wurde in den Bundesländern Baden-Württemberg, Hessen und Rheinland-Pfalz erbracht.

Darüber hinaus traten Mischinfektionen der Virenspezies auf einem Standort auf. Die häufigste Mischinfektion von Poleroviren und BYV konnte auf 56 Standorten festgestellt werden. Eine Mischinfektion mit BtMV und Poleroviren konnte an 10 Standorten diagnostiziert werden. Auf sechs Standorten konnte eine Infektion mit jeder untersuchten Virusspezies

(Dreifachinfektion) nachgewiesen werden. Auf fünf dieser Standorte wurde zusätzlich das SBR-Proteobakterium nachgewiesen (Vierfachinfektion). 2020 war SBR das häufigste Phytopathogen.

3.4 Mischinfektionen mit SBR und Vergilbungsviren

Beide Vergilbungskrankheiten waren 2017 und 2020 im Untersuchungsgebiet verbreitet (Abb. 4). Im Jahr 2017 waren die untersuchten Landkreise in Bayern, Hessen und Rheinland-Pfalz (außer Germersheim/Südliche Weinstraße) dominant mit Vergilbungsviren befallen. Im Rhein-Neckar-Kreis lagen vermehrt Standorte mit einer SBR-Infektion vor, so dass hier SBR das vorherrschende Phytopathogen war. Darüber hinaus waren in Baden-Württemberg vier von acht Landkreisen mit SBR und Vergilbungsviren befallen, sodass kein dominanter Schaderreger ausgemacht werden konnte. Im Landkreis Heilbronn und Hohenlohe wurden jeweils an allen Standorten SBR- und Virusinfektionen nachgewiesen.

Im Jahr 2020 zeigte sich ein verändertes Bild. In Baden-Württemberg waren 3 der 13 Landkreise dominant mit Vergilbungsviren befallen. In jeweils fünf Landkreisen lagen hauptsächlich SBR- und Mischinfektionen vor. Auch in Bayern zeigte sich ein gemischtes Bild mit Landkreisen in denen SBR dominierte (vier von neun Landkreisen). In Hessen, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen spielte SBR eine untergeordnete Rolle, hier wurden Infektionen mit Vergilbungsviren vorherrschend festgestellt. In Rheinland-Pfalz dominierte SBR in den Landkreisen Bad Dürkheim, Frankenthal, Rhein-Pfalz-Kreis und Südliche Weinstraße. Mischinfektionen lagen im Donnersbergkreis, Germersheim und Speyer vor. In allen untersuchten Proben aus Sachsen konnte ausschließlich SBR nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung und weitere Verbreitung der bakteriellen und virösen Vergilbungskrankheiten an Zuckerrüben. Mit der Durchführung der kontinuierlichen jährlichen Monitorings konnte die jährliche Schwankung der Virusinfektionen und die Entwicklung des SBR-Befalls gezeigt werden.

4.1 Entwicklungen und Auswirkungen des SBR-Befalls

Im Kernbefallsgebiet Baden-Württemberg ist das Auftreten des Proteobakteriums seit 2009 im Landkreis Heilbronn nachgewiesen worden. Das stärkste Auftreten des Schadbildes von SBR wurde im Jahr 2011 bemerkt. Dort wurden Schilf-Glasflügelzikaden gefunden, die zu 50 % mit dem Proteobakterium beladen waren (Schröder et al. 2012). In den folgenden Jahren muss sich die Zikadenpopulation und damit die SBR-Infektion schleichend ausgebreitet haben, denn in den Jahren 2017 und 2018 wurden weite Teile Baden-Württembergs, der Elbauen und der Südpfalz als SBR-Starkbefallsgebiete benannt (Pfitzer et al. 2019).

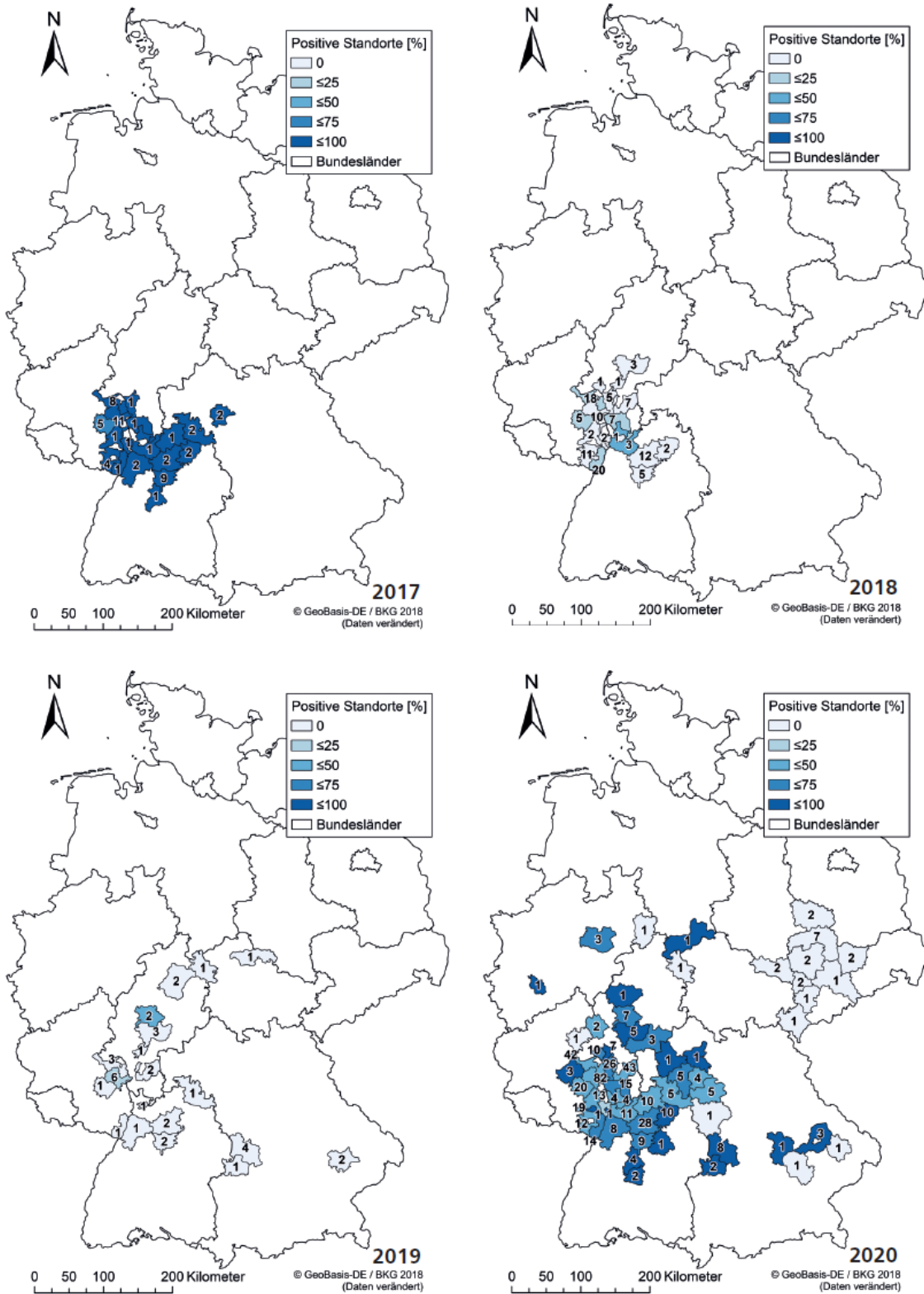


Abb. 2: Verbreitungskarten der Vergilbungsviren 2017–2020. Die Zahlen in den Landkreisen entsprechen den untersuchten Standorten. Untersuchungen erfolgten 2017 auf BYV und Poleroviren; 2018–2020 erfolgten die Untersuchungen auf BtMV, BYV und Poleroviren (Quelle Bundesländer- und Kreisgrenzen: © GeoBasis-DE / BKG 2018 (Daten verändert)).

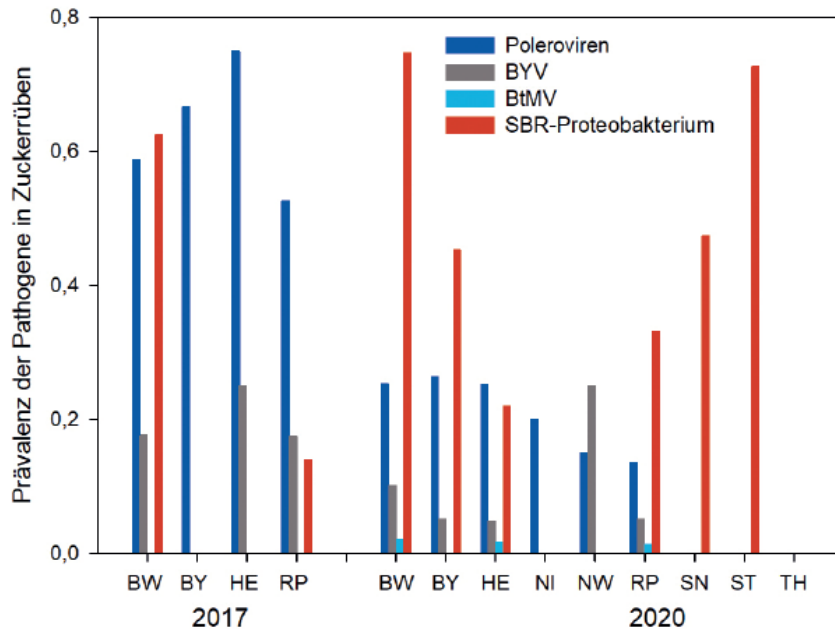


Abb. 3: Prävalenz 2017 und 2020: Häufigkeit des Auftretens der Schaderreger in untersuchten Rüben nach Bundesländern aus den Jahren 2017 und 2020. 2017 98 untersuchte Rübenproben auf Vergilbungsviren, 94 Rübenproben untersucht auf SBR. 2020 2316 untersuchte Rübenproben auf Vergilbungsviren, 2103 Rübenproben untersucht auf SBR.

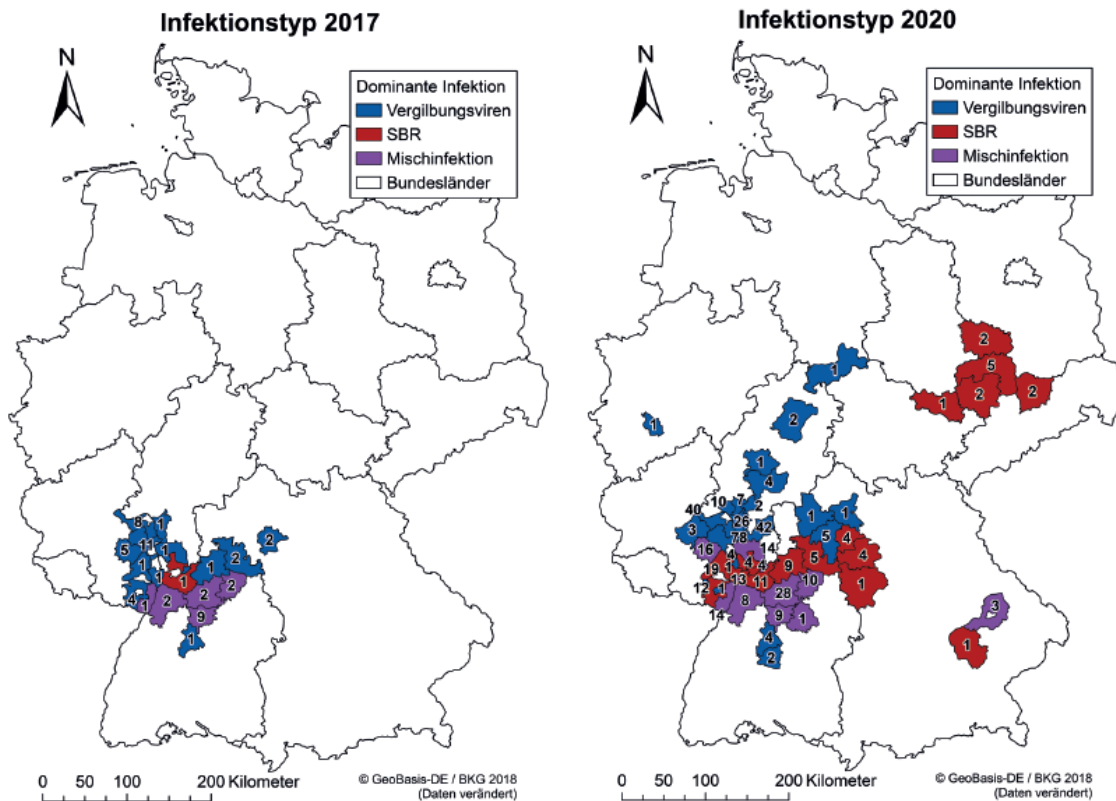


Abb. 4: Vorkommen von SBR und Vergilbungsviren an den untersuchten Standorte 2017 (45 Standorte) und 2020 (449 Standorte). Einzelstandorte wurden nach Untersuchungsergebnis kategorisiert. Landkreis wurde entsprechend dem häufigsten Infektionstyp eingefärbt (Quelle Bundesländer- und Kreisgrenzen: © GeoBasis-DE / BKG 2018 (Daten verändert)).

Die Ergebnisse der Untersuchung der baden-württembergischen Rübenproben auf das Proteobakterium im Jahr 2017 und 2018 zeigten den nahezu flächendeckenden Befall der untersuchten Landkreise mit Ausnahme von Böblingen und dem Neckar-Odenwald-Kreis (Abb. 1). Bressan et al. (2007) korrelierten das Vorkommen von SBR mit dem Vorkommen der Schilf-Glasflügelzikade und benannten diese als Hauptvektor des Proteobakteriums. 2018 erfolgte der Nachweis eines ausgeprägten Zikadenfluges in den Landkreisen Heilbronn, Karlsruhe und Heidelberg (Pfitzer et al. 2019).

Im Jahr 2019 wurden sämtliche Rübenproben positiv auf SBR getestet, lediglich der untersuchte Standort im Landkreis Schwäbisch-Hall blieb befallsfrei (Abb. 1). Es wurden keine Proben aus dem Landkreis Neckar-Odenwald, Tübingen und Böblingen untersucht, so dass über den Befall keine Aussage getroffen werden kann. Für 2019 wurden die Monitoring-Aktivitäten der Schilf-Glasflügelzikade durch das LTZ Augustenberg ausgedehnt. Hier gelang es, den Flug der Schilf-Glasflügelzikade in Baden-Württemberg von Simmringen (Main-Tauber-Kreis) im Osten bis Marbach (Ludwigsburg) im Süden, sowie Karlsruhe und Heidelberg in nördlicher und westlicher Richtung nachzuweisen (Betz 2020). Schwäbisch-Hall war der einzige der untersuchten Landkreise in dem keine SBR-Infektion nachgewiesen werden konnte. Hier wurden 2019 auf dem Monitoring-Standort Ilshofen vom LTZ Augustenberg Schilf-Glasflügelzikaden nachgewiesen.

Im Jahr 2020 wurde der erste SBR-Befall in Zuckerrüben in den Landkreisen Schwäbisch-Hall und Böblingen nachgewiesen. Auch in diesen Landkreisen sollten zukünftig Monitoring-Daten zum Zikadenvorkommen erhoben werden, um die Entwicklung des Infektionsdruckes feststellen zu können.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden in Bayern ab 2019 Proben auf das SBR-Proteobakterium untersucht. Im ersten Untersuchungsjahr wurde eine SBR-Infektion an einem Standort im Landkreis Dingolfing-Landau nachgewiesen. Im Jahr 2020 wurden deutlich mehr Landkreise und Standorte in verschiedenen Regionen Bayerns untersucht. Es konnten in den Landkreisen Ansbach, Kitzingen, Landshut, Neustadt an der Aisch, Straubing-Bogen und Würzburg SBR-Infektionen nachgewiesen werden.

Die SBR-Infektion in der Südpfalz (Germersheim und Südliche Weinstraße) ist seit 2017 bekannt. 2018 wurde ein Leimtafel-Monitoring der Schilf-Glasflügelzikade in den Landkreisen Alzey-Worms, Bad Dürkheim, Germersheim und Mainz-Bingen in Rheinland-Pfalz durchgeführt. Die Schilf-Glasflügelzikade wurde zahlreich an Standorten in Germersheim (RP) (>100 Tiere) gefunden. In Obrigheim im Landkreis Bad Dürkheim konnten drei Individuen gefangen werden. In den Landkreisen Alzey-Worms und Mainz-Bingen wurden keine Zikaden gefunden (Hinkel-Stallmann 2019). Die Verknüpfung der Ergebnisse des Monitorings der Zikaden und den Ergebnissen der Laboranalysen im Jahr 2018 zeigte, das aufgrund der Verdachtsproben eher ein Befall detektiert werden konnte als durch ein Gelbtafelmonitoring. Im Jahr 2018 wurden 4 von 10 (40 %) Standorten in Alzey-Worms und 6 von 18 (33 %) Standorten im Landkreis Mainz-Bingen positiv auf SBR getestet. 2019 änderte sich der SBR-Infektionsdruck in Rheinland-Pfalz nicht, in den Analysen wurde der Befall, der im Vorjahr befallenen Standorte bestätigt. Im Jahr 2020 wurde ein hoher

Anteil SBR-Infektionen in den Landkreisen Bad Dürkheim, Donnersbergkreis und Alzey-Worms festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich das Befallsgebiet von SBR im Jahr 2020 nordwärts nach Rheinhessen ausgedehnt hat.

In Hessen wurde 2017 an keinem der beprobten Standorte SBR nachgewiesen. 2018 wurden die ersten SBR-Nachweise in den hessischen Landkreisen Darmstadt-Dieburg, Frankfurt, Groß-Gerau, Bergstraße und im Wetteraukreis erbracht. Hier wurden im Mittel 49 % der beprobten Standorte pro Landkreis positiv getestet. 2018 wurde im Kreis Bergstraße der Flug der Schilf-Glasflügelzikade (Viernheim >400 Zikaden) nachgewiesen (Hinkel-Stallmann 2019). Im Jahr 2019 wurde der Flug der Zikade auch in Bickenbach (Bergstraße) nachgewiesen (Lutat 2019). Einzelne Individuen wurden an den Standorten Trebur und Niedererlenbach (Frankfurt) nachgewiesen. In Nieder-Wöllstadt und Büdingen (Wetteraukreis) konnten 2019 keine Schilf-Glasflügelzikaden nachgewiesen werden (Lutat 2019). Die Beprobung der Flächen zeigte, dass neben der Bestätigung einer SBR-Verbreitung in den Landkreisen Bergstraße und Darmstadt-Dieburg auch ein einzelner Standort im Kreis Gießen positiv auf SBR getestet wurde.

Die Analysen 2020 zeigten eine Zunahme der Befallsintensität in nördlicher Richtung vom Kreis Bergstraße (93 % befallener Standorte) nach Darmstadt-Dieburg (36 %) und Groß-Gerau (31 %). Die Verbreitung von SBR in den Anbaugebieten der Elbaue in Sachsen und Sachsen-Anhalt konnte anhand der Analyse auf das Proteobakterium im Jahr 2020 erneut bestätigt werden.

4.2 Jährliche Verbreitung der Vergilbungskrankheiten

2017 traten die Vergilbungsviren sehr häufig auf und konnten auf 94,5 % der untersuchten Standorte nachgewiesen werden. In diesem Jahr wurde kein Monitoring der Vektorinsekten durchgeführt, da die neonikotinoide Beize der Zuckerrübensamen angewendet wurde, dennoch kam es 2017 zu hohen Infektionszahlen. An der Wetterstation in Offstein konnten im Jahr 2017 nur im Januar Frosttage aufgezeichnet werden (Agrarmeteorologie Rheinland-Pfalz 2021). Dadurch konnten sich die Blattlauspopulationen in den darauffolgenden Monaten gut entwickelt haben. Eine späte Infektion nach Bestandschluss kann trotz der neonikotinoiden Beize nicht ausgeschlossen werden. Die Symptome werden Watson et al. (1951) zufolge drei bis fünf Wochen nach der Infektion sichtbar. Die Probenahme symptomatischer Rüben wurde 2017 Ende Oktober durchgeführt, was auf eine späte Infektion der Rüben im September schließen lässt. Nach Smith and Hallsworth (1990) haben Infektionen nach Ende Juli keinen relevanten Einfluss mehr auf den Ertrag. Demnach konnten 2017 keine nennenswerten Ertragsverluste auf den mit Virus befallenen Flächen festgestellt werden.

Im Jahr 2018 fielen nur einzelne Proben verschiedener Standorte aus den Bundesländern Baden-Württemberg, Hessen und Rheinland-Pfalz positiv aus. Kälteperioden im Februar und März 2018 mit Dauerfrost sowie Frosttage im April (Agrarmeteorologie Rheinland-Pfalz 2021) könnten die Entwicklung und Vermehrung der Blattläuse geschwächt haben, so dass es 2018 zu einer geringen Virusinfektion der Zuckerrüben kam.

Die neonicotinoide Beize, die seit mehreren Jahrzehnten zugelassen war, wurde ab 2019 verboten. Folglich wurde 2019 die erste Saat ohne eine neonicotinoide Beize vorgenommen. 2019 traten im Januar und Februar Frosttage auf, so dass sich die Population aus dem Vorjahr wahrscheinlich nicht maßgeblich aufbauen konnte, um flächendeckende Virusinfektionen auszulösen. Durch das flächendeckende Monitoring der Virusvektoren konnte die Flächenbehandlung mit Insektiziden punktgenau durchgeführt werden. Dies könnte zusätzlich dazu beigetragen haben, dass nur wenige Infektionen stattgefunden haben.

Dagegen stellte sich im Jahr 2020 eine völlig veränderte Lage dar. Die Blattläuse konnten ohne nennenswerte Frostereignisse als adulte Tiere überwintern und somit kontinuierlich in großer Anzahl virusbeladen in die Zuckerrübenbestände einwandern. Hierdurch kam es zu massiven Vermehrungen und in Folge zu frühen Virusinfektionen mit deutlich sichtbaren Vergilbungssymptomen bereits Ende Juli, trotz flächiger Behandlung nach Bekämpfungsrichtwert. Das war der Auslöser für das bisher größte Virus- und SBR-Monitoring in Europa.

4.3 Prävalenz der Phytopathogene

SBR wurde von 2017 bis 2020 zunehmend häufiger nachgewiesen. 2020 waren regionale Unterschiede in der Auftretshäufigkeit von SBR feststellbar. Vergilbungsviren zeigten sich in den Befallsjahren in regionalen Ausprägungen. Die Ausbreitung der Virenspezies wurde wie folgt beobachtet: Poleroviren traten am häufigsten auf, gefolgt vom BYV. BtMV konnte nicht überall nachgewiesen werden (Hossain et al. 2021). Im Jahr 2020 wurde gezeigt, dass SBR als häufigstes Phytopathogen auftrat. Es ist dennoch von Bedeutung, dass in 919 Rüben von 2300 Rüben mit Symptomen keine Infektion mit einem der diskutierten Erreger nachgewiesen werden konnte. Vergilbungssymptome können durch andere biotische und abiotische Faktoren ausgelöst werden, z.B. Nährstoffversorgung (Reinhardt et al. 1989). Die Tatsache das eine Probenahme von symptomatischen Rüben erfolgte, zeigt die Schwierigkeiten der Diagnose von Vergilbungskrankheiten im Feld. Daher ist es wichtig, Monitoring- und Laborkapazitäten auszubauen, um eine sichere Einschätzung des regionalen Auftretens der Vektorinsekten und Vergilbungskrankheiten geben zu können. Nur durch eine Laboranalyse können Managementsysteme erarbeitet und evaluiert werden, die den nachhaltigen und effizienten Zuckerrübenanbau sicherstellen.

4.4 Mischinfektionen von Viren und SBR

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden 2017 an 45 Standorten und 2020 an 449 Standorten Infektionen mit bakteriellen und virösen Vergilbungskrankheiten gefunden. Die Abbildung 4 zeigt in welchen Regionen, welcher Erreger vorwiegend einzeln oder in Kombination auftrat.

2017 wurden in einigen Landkreisen in Baden-Württemberg sowie in Gernersheim (RP) und im Donnersbergkreis (RP) überwiegend Standorte mit einer Mischinfektion vorgefun-

den. Eine alleinige Infektion mit Vergilbungsviren führt zu Zuckergehalts- und Ertragsverlusten, wobei der Ertragsverlust größer ist (Watson et al. 1946). Kommt es zu einer Mischinfektion verschiedener Viren, werden nicht nur schlechtere Wuchseigenschaften, sondern auch eine schnellere Entwicklung der Vergilbungssymptome beobachtet (Wintermantel 2005). SBR hingegen verursacht durch die Verbräunung der Leitbündel hohe Zuckergehaltsverluste, bis zu 5 % absolut (Sémétey et al. 2007b).

2020 wurden auf 28 % aller untersuchten Standorte Mischinfektionen von Vergilbungsviren und SBR nachgewiesen, insbesondere in Baden-Württemberg waren es 57 %. Diese Mischinfektion könnte eine starke Reduktion des Rüben- und Zuckerertrags in den betroffenen Regionen verursacht haben. Weitere Untersuchungen zu Wirkungen von Mischinfektionen auf den Zuckerertrag und die Verbreitung der Vergilbungsviren und -bakterien sind dringend erforderlich.

5 Fazit

Anhand der gezeigten Daten von 2017 bis 2020 ist die kontinuierliche Weiterverbreitung der Schilf-Glasflügelzikade und SBR nachgewiesen worden. Während die Viruserkrankungen in Abhängigkeit von Jahreswitterung, der dadurch bedingten Entwicklung der Blattlauspopulation und Regionen deutlich schwanken können, dehnt sich das SBR-Befallsgebiet mit der offenbar durch die Anpassung an die Zuckerrübenkultur ermöglichten starken Vermehrung und Wanderung der Zikade aus. Die Jahreswitterung scheint durch die vorwiegend unterirdische Lebensweise eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die zunehmende Erwärmung durch den Klimawandel könnte begünstigend auf die Verbreitung der Zikaden wirken. Derzeit gibt es keine Prognosemodelle, die eine Abschätzung der Befallswahrscheinlichkeit oder gar der weiteren Ausbreitung erlauben. Außerdem fehlen geeignete Verfahren zum Management der Schilf-Glasflügelzikade.

Erste Ansätze für beides werden im Projekt NIKIZ entwickelt. Die physiologischen Reaktionen der Zuckerrüben und die damit verbundene Reduktion der Erträge und Zuckergehalte könnten durch Mischinfektionen deutlich verstärkt werden, woraus sich ein erhöhter Forschungsbedarf in diesem Bereich ableitet. Der Schwerpunkt von Forschung und Entwicklung sollte jedoch auf der Erarbeitung verbesserter Managementmethoden für die Kontrolle der Vektoren liegen.

Danksagung

Ein großer Dank geht an die Officialberatungen der Länder Rheinland-Pfalz, Hessen und Baden-Württemberg sowie an die mitwirkenden Landwirte, die Rohstoffabteilungen der Südzucker AG, das Kuratorium für Versuchswesen und Beratung, Mannheim, und das NIKIZ-Team für die erfolgreiche und enge Zusammenarbeit über die vier Jahre. Insbesondere sei *Judith Ginsberg* vom DLR R-N-H in Bad Kreuznach für die Koordinierung und Durchführung der zahlreichen Laboranalysen gedankt. Abschließend bedanken sich die Autoren bei *Sina Bauer* von der ZEPP für die Hilfe bei der Kartenerstellung.

Die Arbeiten werden gefördert durch die Stiftung Südwestdeutscher Zuckerrübenanbau.

Das Projekt NIKIZ wird im Rahmen des Entwicklungsprogramms EULLE unter Beteiligung der Europäischen Union und des Landes Rheinland-Pfalz, vertreten durch das Ministerium für Wirtschaft, Verkehr, Landwirtschaft und Weinbau, gefördert.

Literatur

- Agrarmeteorologie Rheinland-Pfalz (2021): Wetterstation Offstein. Hg. v. DLR RP. Online verfügbar unter <https://www.dlr.rlp.de/Agrarmeteorologie/Wetterdaten/Alphabetisch/AM103>, zuletzt geprüft am 25.07.2021.
- Betz, D. (2020): LTZ Augustenberg, Karlsruhe. Projekt: „Vektoren im Ackerbau“ – Sonderprogramm zur Stärkung der biologischen Vielfalt (MLR Baden-Württemberg), pers. Mitteilung.
- Braut, V.; Herrbach, E.; Reinbold, C. (2007): Electron microscopy studies on luteovirus transmission by aphids. In: *Micron (Oxford, England: 1993)* 38 (3), S. 302–312. DOI: 10.1016/j.micron.2006.04.005.
- Bressan, A. (2014): Emergence and evolution of *Arsenophonus* bacteria as insect-vectored plant pathogens. In: *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 22, S. 81–90. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.01.004.
- Bressan, A.; Holzinger, W. E.; Nusillard, B.; Séméty, O.; Gattineau, F.; Simonato, M.; Boudon-Padiou, E. (2009a): Identification and biological traits of a planthopper from the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae) adapted to an annual cropping rotation. In: *Eur. J. Entomol.* 106 (3), S. 405–413. DOI: 10.14411/eje.2009.052.
- Bressan, A.; Moral Garcia, F. J.; Boudon-Padiou, E. (2011): The prevalence of *Candidatus Arsenophonus* phytopathogenicus infecting the planthopper *Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae) increase nonlinearly with the population abundance in sugar beet fields. In: *Environmental entomology* 40 (6), S. 1345–1352. DOI: 10.1603/EN10257.
- Bressan, A.; Séméty, O.; Arneodo, J.; Lherminier, J.; Boudon-Padiou, E. (2009b): Vector transmission of a plant-pathogenic bacterium in the *Arsenophonus* clade sharing ecological traits with facultative insect endosymbionts. In: *Phytopathology* 99 (11), S. 1289–1296. DOI: 10.1094/PHYTO-99-11-1289.
- Bressan, A.; Séméty, O.; Nusillard, B.; Boudon-Padiou, E. (2007): The syndrome “basses richesses” of sugar beet in France is associated with different pathogen types and insect vectors. In: *Bulletin of Insectology* 60 (2), S. 395–396.
- Bressan, A.; Séméty, O.; Nusillard, B.; Clair, D.; Boudon-Padiou, E. (2008): Insect Vectors (Hemiptera: Cixiidae) and Pathogens Associated with the Disease Syndrome “Basses Richesses” of Sugar Beet in France. In: *Plant disease* 92 (1), S. 113–119. DOI: 10.1094/PDIS-92-1-0113.
- Bressan, A.; Terlizzi, F.; Credi, R. (2012): Independent origins of vectored plant pathogenic bacteria from arthropod-associated *Arsenophonus* endosymbionts. In: *Microbial ecology* 63 (3), S. 628–638. DOI: 10.1007/s00248-011-9933-5.
- Bundesamt für Kartographie und Geodäsie (BKG) (2018): URL <http://www.bkg.bund.de>
- Clover, G.R.G.; Azam-Ali, S. N.; Jaggard, K. W.; Smith, H. G. (1999): The effects of beet yellows virus on the growth and physiology of sugar beet (*Beta vulgaris*). In: *Plant Pathology* 48 (1), S. 129–138. DOI: 10.1046/j.1365-3059.1999.00307.x.
- Dijkstra, J.; Jager, C. P. de (1998): Virus transmission by Aphids. In: *Practical Plant Virology. Protocols and Exercises. Springer Lab Manual, Berlin*, S. 148–158. DOI: 10.1007/978-3-642-72030-7_28.
- Gattineau, F.; Jacob, N.; Vautrin, S.; Larrue, J.; Lherminier, J.; Richard-Molard, M.; Boudon-Padiou, E. (2002): Association with the Syndrome “Basses Richesses” of Sugar Beet of a Phytoplasma and a Bacterium-Like Organism Transmitted by a *Pentastiridius* sp. In: *Phytopathology* 92 (4), S. 384–392. DOI: 10.1094/PHYTO.2002.92.4.384.
- Gattineau, F.; Larrue, J.; Clair, D.; Lorton, F.; Richard-Molard, M.; Boudon-Padiou, E. (2001): A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). In: *Eur J Plant Pathol* 107 (3), S. 263–271. DOI: 10.1023/A:1011209229335.
- Hinkel-Stallmann, O. (2019): Monitoring von Vergilbungsviren und SBR in Zuckerrüben und mögliche Managementstrategien – eine Übersicht. Master-Thesis. Universität Hohenheim, Hohenheim. Insitut für Phytomedizin.
- Hossain, R.; Menzel, W.; Lachmann, C.; Varrelmann, M. (2021): New insights into virus yellows distribution in Europe and effects of beet yellows virus, beet mild yellowing virus, and beet chlorosis virus on sugar beet yield following field inoculation. In: *Plant Pathology* 70 (3), S. 584–593. DOI: 10.1111/ppa.13306.
- Limburg, D. D.; Mauk, P. A.; Godfrey, L. D. (1997): Characteristics of Beet Yellows Closterovirus Transmission to Sugar Beets by *Aphis fabae*. In: *Phytopathology* 87 (7), S. 766–771. DOI: 10.1094/PHYTO.1997.87.7.766.
- Lutat, D. (2019): Regional and seasonal extension of *Pentastiridius leporinus* as a carrier of syndrome basses richesses in *Beta vulgaris*. Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen. Institut für Phytopathologie.
- Pfitzer, R.; Schrameyer, K.; Voegelé, R. T.; Maier, J.; Lang, C.; Varrelmann, M. (2019): Ursachen und Auswirkungen des Auftretens von „Syndrome Basses Richesses“ in deutschen Zuckerrübenanbaubereichen. In: *Sugar Industry* 144 (Sonderheft 14. Göttinger Zuckerrübenagung), S. 70–80. DOI: 10.36961/si24263.
- Reinhardt, I.; Richter, K.; Wiesner, K.; Krause, M.; Richter, J. (1989): Vergleichende Untersuchungen zur Beurteilung der virösen Vergilbung an Zuchtmaterial der Zuckerrübe mit Hilfe von Symptomatologie und Serologie. In: *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* 25 (4), S. 319–324. DOI: 10.1080/03235408909438884.
- Schröder, M.; Rissler, M.; Schrameyer, K. (2012): „Syndrome des Basses Richesses“ (SBR) – erstmaliges Auftreten an Zuckerrübe in Deutschland. In: *Journal für Kulturpflanzen* 64 (10), S. 392–398. Online verfügbar unter https://ojs.openagrar.de/volltexte/Kulturpflanzenjournal/2012/Heft10/XML/Webdaten/04_mitteilungen/mitteilungen.html, zuletzt geprüft am 25.07.2021.
- Séméty, O.; Bressan, A.; Gattineau, F.; Boudon-Padiou, E. (2007a): Development of a specific assay using RISA for detection of the bacterial agent of ‘basses richesses’ syndrome of sugar beet and confirmation of a *Pentastiridius* sp. (*Fulgoromorpha*, *Cixiidae*) as the economic vector. In: *Plant Pathology* 56 (5), S. 797–804. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2007.01693.x.
- Séméty, O.; Bressan, A.; Richard-Molard, M.; Boudon-Padiou, E. (2007b): Monitoring of proteobacteria and phytoplasma in sugar beets naturally or experimentally affected by the disease syndrome ‘Basses richesses’. In: *European Journal of Plant Pathology* 117 (2), S. 187–196. DOI: 10.1007/s10658-006-9087-3.
- Séméty, O.; Gattineau, F.; Bressan, A.; Boudon-Padiou, E. (2007c): Characterization of a gamma-3 Proteobacteria Responsible for the Syndrome “Basses Richesses” of Sugar Beet Transmitted by *Pentastiridius* sp. (Hemiptera, Cixiidae). In: *Phytopathology* 97 (1), S. 72–78. DOI: 10.1094/PHYTO-97-0072.
- Smith, H. G.; Hallsworth, P. B. (1990): The effects of yellowing viruses on yield of sugar beet in field trials, 1985 and 1987. In: *Ann Applied Biology* 116 (3), S. 503–511. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1990.tb06633.x.
- Stevens, M.; Hallsworth, P. B.; Smith, H. G. (2004): The effects of Beet mild yellowing virus and Beet chlorosis virus on the yield of UK field-grown sugar beet in 1997, 1999 and 2000. In: *Ann Applied Biology* 144 (1), S. 113–119. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2004.tb00323.x.
- Sylvester, E. S. (1956): Beet Yellows Virus Transmission by the Green Peach Aphid. In: *Journal of Economic Entomology* 49 (6), S. 789–800. DOI: 10.1093/jee/49.6.789.
- Watson, D. J.; Watson, M. A. (1953): Comparative physiological studies on the growth of field crop. In: *Ann Applied Biology* 40 (1), S. 1–37. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1953.tb02364.x.
- Watson, M. A. (1946): The transmission of beet mosaic and beet yellows viruses by aphides; a comparative study of a nonpersistent and a persistent virus having host plants and vectors in common. In: *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 133, S. 200–219. DOI: 10.1098/rspb.1946.0009.
- Watson, M. A.; Hull, R.; Blencowe, J. W.; Hamlyn, B.M.G. (1951): The spread of beet yellows and beet mosaic viruses in the sugar-beet root crop I. field observations on the virus diseases of sugar beet and their vectors *Myzus persicae* sulz. and *Aphis fabae* Koch. In: *Ann Applied Biology* 38 (4), S. 743–764. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1951.tb07847.x.
- Watson, M. A.; Watson, D. J.; Hull, R. (1946): Factors affecting the loss of yield of sugar beet caused by beet yellows virus: I. Rate and date of infection; date of sowing and harvesting. In: *J. Agric. Sci.* 36 (3), S. 151–166. DOI: 10.1017/S0021859600012041.
- Wintermantel, W. M. (2005): Co-infection of Beet mosaic virus with Beet Yellowing Viruses Leads to Increased Symptom Expression on Sugar Beet. In: *Plant disease* 89 (3), S. 325–331. DOI: 10.1094/PD-89-0325.

Eingegangen am 26. Juli 2021.


Anschriften der Autor*innen: Sarah Christin Behrmann¹, Mareike Schwind², Manuela Schieler³, Oliver Martinez⁴, Andreas Vilcinskas^{1,5}, Kwang-Zin Lee⁵, Christian Lang²

- Institut für Insektenbiotechnologie, Justus-Liebig-Universität, Heinrich-Buff-Ring 26–32, 35392 Gießen, Deutschland
- Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V., Rathenaustraße 10, 67547 Worms, Deutschland
- Zentralstelle der Länder für EDV-gestützte Entscheidungshilfen und Programme im Pflanzenschutz (ZEPP), Rüdeshheimer Str. 60–68, 55545 Bad Kreuznach, Deutschland
- Abteilung Agrarwirtschaft, Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinhessen-Nahe-Hunsrück, Rüdeshheimer Str. 60–68, 55545 Bad Kreuznach, Deutschland
- Abteilung Bioressourcen, Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Ohlebergsweg 12, 35392 Gießen, Deutschland



Article

Biology and Rearing of an Emerging Sugar Beet Pest: The Planthopper *Pentastiridius leporinus*

Sarah Christin Behrmann¹, Natasha Witzcak^{1,2}, Christian Lang³, Manuela Schieler⁴, Anna Dettweiler³, Benno Kleinhenz⁴, Mareike Schwind³, Andreas Vilcinskas^{1,2}  and Kwang-Zin Lee^{2,*}

- ¹ Department of Insect Biotechnology, Justus Liebig University of Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26, D-35392 Giessen, Germany; sarah-christine.behrmann@ag.uni-giessen.de (S.C.B.); natasha.witzcak@umwelt.uni-giessen.de (N.W.); andreas.vilcinskas@agr.uni-giessen.de (A.V.)
 - ² Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Ohlebergsweg 12, D-35394 Giessen, Germany
 - ³ Association of Hessian-Palatinate Sugar Beet Growers e.V., Rathenaustraße 10, D-67547 Worms, Germany; lang@ruebe.info (C.L.); dettweiler@ruebe.info (A.D.); schwind@ruebe.info (M.S.)
 - ⁴ Central Institute for Decision Support Systems in Crop Protection (ZEPP), Rüdeshheimer Straße 60, D-55545 Bad Kreuznach, Germany; manuela.schieler@dlr.rlp.de (M.S.); benno.kleinhenz@dlr.rlp.de (B.K.)
- * Correspondence: kwang-zin.lee@ime.fraunhofer.de; Tel.: +49-641-97-219150



Citation: Behrmann, S.C.; Witzcak, N.; Lang, C.; Schieler, M.; Dettweiler, A.; Kleinhenz, B.; Schwind, M.; Vilcinskas, A.; Lee, K.-Z. Biology and Rearing of an Emerging Sugar Beet Pest: The Planthopper *Pentastiridius leporinus*. *Insects* **2022**, *13*, 656. <https://doi.org/10.3390/insects13070656>

Academic Editors: Muhammad Haseeb and Lambert H.B. Kanga

Received: 20 June 2022

Accepted: 20 July 2022

Published: 21 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Syndrome des Basses Richesses (SBR) is a bacterial yellowing disease of sugar beet (*Beta vulgaris*) that reduces the sugar content of the root tissue significantly. There is currently neither a cure for the disease nor effective control measures for the main insect vector, the Cixiid planthopper *Pentastiridius leporinus*. SBR is therefore spreading in Germany and has caused substantial yield losses in recent years. The development of effective control measures requires a better understanding of *P. leporinus* biology, including its life cycle and feeding behavior. We therefore established methods for the continuous mass rearing of *P. leporinus*. In host plant choice experiments, we found that the nymphs are polyphagous when offered sugar beet, winter wheat or maize. Life cycle data indicated that adult planthoppers emerge 170 days after hatching, having passed through five larval instar stages. We developed a state-of-the-art qRT-PCR protocol using TaqMan probes to study the prevalence of two bona fide SBR pathogens: *Candidatus* *Arsenophonus* phytopathogenicus (Gammaproteobacteria) and *Candidatus* *Phytoplasma solani* (stolbur phytoplasma). These were identified during field studies in newly-infected regions of Rhineland-Palatinate and south Hesse, Germany, where we also observed insect mobility patterns in two consecutive years, including the abundance of adults at four locations and soil-depth monitoring of nymphs. We documented the spread of *P. leporinus* northward and eastward in Germany, accompanied by an increase in the number of SBR-carrying planthoppers. Interestingly, *P. leporinus* does not appear to hibernate during winter. Stolbur phytoplasma has a significant impact on SBR pathology in sugar beet.

Abstract: The rapid spread of the bacterial yellowing disease Syndrome des Basses Richesses (SBR) has a major impact on sugar beet (*Beta vulgaris*) cultivation in Germany, resulting in significant yield losses. SBR-causing bacteria are transmitted by insects, mainly the Cixiid planthopper *Pentastiridius leporinus*. However, little is known about the biology of this emerging vector, including its life cycle, oviposition, developmental stages, diapauses, and feeding behavior. Continuous mass rearing is required for the comprehensive analysis of this insect. Here we describe the development of mass rearing techniques for *P. leporinus*, allowing us to investigate life cycle and ecological traits, such as host plant choice, in order to design agronomic measures that can interrupt the life cycle of nymphs in the soil. We also conducted field studies in recently-infected regions of Rhineland-Palatinate and south Hesse, Germany, to study insect mobility patterns and abundance at four locations during two consecutive years. The soil-depth monitoring of nymphs revealed the movement of the instars through different soil layers. Finally, we determined the prevalence of SBR-causing bacteria by designing TaqMan probes specific for two bona fide SBR pathogens: *Candidatus* *Arsenophonus* phytopathogenicus (Gammaproteobacteria) and *Candidatus* *Phytoplasma solani* (stolbur phytoplasma). Our data suggest that *P. leporinus* is spreading northward and eastward in Germany, additionally,

the abundance of SBR-carrying planthoppers is increasing. Interestingly, *P. leporinus* does not appear to hibernate during winter, and is polyphagous as a nymph. Stolbur phytoplasma has a significant impact on SBR pathology in sugar beet.

Keywords: SBR; *Pentastiridius leporinus*; sugar beet; Cixiidae; rearing; monitoring; *Beta vulgaris*; stolbur phytoplasma; proteobacteria

1. Introduction

The planthopper *Pentastiridius leporinus* belongs to the family Cixiidae in the infraorder Fulgoromorpha. Cixiid species are small hemipterans that feed as adult stages on above-ground plant material, whereas their nymph stages feed below the ground on root sap. Many cixiid species are economically important because they transmit bacterial pathogens to plants. *P. leporinus* is a vector of the bacterial yellowing disease Syndrome des Basses Richesses (SBR) in sugar beet (*Beta vulgaris*), and large populations of this insect are found in sugar beet crops [1]. The symptoms of SBR include yellowing of older leaves, lancet-shaped leaf deformations, and necrosis of the vascular tissue, which significantly reduces the sugar content of root tissue and results in lower yields. SBR was first identified in France [2,3] but is now spreading rapidly in southern and eastern Germany, threatening the profitability of the sugar beet industry [4].

In central Europe, *P. leporinus* produces one generation per year. After mating at the end of June, beginning of July, the females deposit their egg mass in the soil and the nymphs continue to develop in the topsoil. Adult females and nymphs produce filamentous wax structures that protect them and the eggs from predation [5]. Sugar beet is harvested in fall, and winter wheat is sown shortly afterwards, providing the *P. leporinus* nymphs with an overwinter/spring food source until they emerge as adults and seek a new sugar beet crop [6].

SBR is associated with two different bacterial pathogens, *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus* and *Candidatus Phytoplasma solani*, both of which are transmitted by insect vectors and limited to the phloem [7,8]. *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus* (phylum Gammaproteobacteria), hereafter abbreviated to SBRars, is an intracellular bacterium that is transmitted vertically from *P. leporinus* females to their offspring with an efficiency of ~30%, and with a lower efficiency by males due to the presence of fewer bacteria in the male salivary gland [9]. *Candidatus Phytoplasma solani*, hereafter abbreviated to SBRps, is commonly known as stolbur phytoplasma. Phytoplasmas are bacterial pathogens (family *Acholeplasmataceae*) that lack a cell wall and colonize the phloem sieve tubes of plants, resulting in various economically important crop diseases [10]. In Serbia, stolbur phytoplasma is also associated with a different disease of sugar beet, known as rubbery tap root disease [11].

There are currently no effective measures against either of the SBR pathogens or the insect vector. Effective vector control requires a comprehensive knowledge of the distribution and behavior of *P. leporinus*, but the lack of mass breeding protocols makes it difficult to assess life cycle and life history traits in order to model the spread of the disease and test biological and environmentally safe alternative control measures in the laboratory and greenhouse. We therefore set out to develop the first mass rearing methods for this insect species. Furthermore, we gathered information on the flight behavior of the planthopper in different regions to determine the most suitable application period for any new control measures and investigated the subterranean movement of nymphs as a function of soil temperature in order to design strategies that interrupt the *P. leporinus* life cycle in the soil. Finally, we screened for both SBR pathogens at four sites in Rhineland-Palatinate and Hesse to monitor the spread of the disease in Germany. A better understanding of *P. leporinus* biology and the SBR pathogens will facilitate the development of environmentally friendly control strategies and assist with pest management decisions to control the spread of SBR.

2. Materials and Methods

2.1. Field Collection of Adults

We collected *P. leporinus* adults from commercial sugar beet fields during July 2020 in Biblis (49°41'52.6" N 8°27'12.8" E) and during June and July 2021 in Bickenbach (49°45'46.0" N 8°33'36.2" E). Both fields are located in the Rhine Valley close to the border of the Odenwald (89 m above sea level) in Hesse. Adults were collected using a sweep net and were immediately transferred to the greenhouse for rearing.

2.2. Rearing

Field-collected *P. leporinus* adults were placed directly on 8-week-old sugar beet plants (KWS Annarosa) growing in Göttinger 3-L pots (Lamprecht-Verpackungen, Göttingen, Germany) filled with Frühstorfer potting soil LD 80 (Heinrichs, Ingelheim, Germany) and covered with expanded clay (Floragard, Oldenburg, Germany). The insects were kept in groups of ~400 in a Cavea PopUp size M net cage (Howitec, Bolsward, Netherlands). The sugar beet plant in the cage was changed every 7 days. Plants were watered moderately twice weekly. The temperature in the greenhouse chamber was set to 22/16 °C day/night with a 16 h photoperiod.

In 2020, egg clusters were left inside the pot, allowing the nymphs to develop on the sugar beet roots. When the plant wilted (due to SBR infection), the nymphs were transferred to a new sugar beet plant. In 2021, sugar beet plants from the adult cages were carefully screened for eggs, which were transferred to a climate chamber (continuous 22 °C and 60% relative humidity, 16 h photoperiod). Mass rearing was carried out in GODMORGEN plastic boxes (IKEA Deutschland, München, Germany) filled with the granular soil additive GeoHumus (GeoHumus, Frankfurt/Main, Germany) to maintain humidity. Young sugar beet plants were placed in the boxes as a food source and were replaced weekly.

2.3. Life Cycle Data

Solitary nymphs were maintained in 60 mM Petri dishes with GeoHumus substrate and 1 × 1 × 1 cm cubes of young sugar beet roots as nutrition. The developmental stages were documented and measured using a VHX-5000 digital microscope (Keyence Deutschland, Neu-Isenburg, Germany) on a weekly basis for 34 weeks. The body size of individual nymphs was measured along the lateral axis [12] and the pigmentation of the nymphs was used for further characterization.

2.4. Host Plant Choice Experiments

Sugar beet, wheat and maize were presented to *P. leporinus* nymphs (the first progeny of field-collected adults) to determine their host plant preference. The host choice experiments were carried out using five replicate cohorts of 30 nymphs. The number of nymphs on each host plant was assessed after 1, 3, 6, 12, 24 and 48 h. The experimental setup consisted of four areas; a central area created by a plastic container (8 × 10.5 × 9 cm) from which three transparent plastic pipes (1.7 cm diameter) led to three separate plastic containers holding the different plants. The nymphs were released to the central area. The stalks of the plants were wrapped with 2 cm foam strips and fixed in the perforated lids of the containers, to make the roots available for the nymphs.

The host plants were grown in a hydroponic system. Maize and wheat seeds were transferred to a sandwich culture [13] and grown in 1 mM CaSO₄, whereas sugar beet seed was grown in 1 mM CaSO₄ containing 10 µM boric acid. Before germination, all cultures were coated with the seed treatment Maxim XL (Syngenta, Basel, Switzerland) containing the fungicides mefenoxam and fludioxonil. Sandwich cultures were grown under controlled conditions from day 4 (26/18 °C day/night, 16-h photoperiod). On day 8, the seedlings were transferred to 2.5-L containers filled with semi-concentrated nutrient solution containing the following nutrient salts: calcium nitrate tetrahydrate, potassium sulfate, magnesium sulfate heptahydrate, calcium chloride dihydrate, monobasic potassium phosphate, ferric EDTA, boric acid, manganese(II) sulfate monohydrate, zinc sulfate solution, copper(II) sulfate pentahydrate, ammonium heptamolybdate tetrahydrate and nickel(II) sulfate hexahydrate [14]. The containers were maintained under controlled conditions for a further 4 days (21/16 °C day/night, 16 h photoperiod). The stalks of the seedlings were then wrapped with 2 cm foam strips and fixed in the perforated lids of the containers, into which aeration tubes were inserted. An Osaga LK 60-piston compressor (Osaga, Buchholz, Germany) was used to circulate air in the nutrient solutions. On day 12, the plants were refreshed with fully-concentrated nutrient solution, which was changed weekly. The host choice experiments were initiated when the plants reached BBCH stage 15 (sugar beet and maize) or 31 (wheat).

2.5. Abundance of Adults in the Field

To measure the abundance of *P. leporinus*, 10 × 25 cm yellow sticky traps (Aeraxon, Waiblingen, Germany) were set up at four locations in Rhineland-Palatinate and south Hesse in the summer of 2020 and 2021. The sites were commercial sugar beet fields in Riedstadt (2020, 49°51'20.34" N 8°23'47.67" E; 2021, 49°52'18.2" N 8°24'53.1" E), Bickenbach (2020, 49°46'04.4" N 8°33'30.9" E; 2021, 49°46'03.2" N 8°33'33.0" E), Monsheim (2020, 49°37'59.2" N 8°14'02.0" E; 2021, 49°38'15.1" N 8°14'42.9" E) and Steinweiler (2020, 49°07'07.0" N 8°09'03.6" E; 2021, 49°06'29.8" N 8°09'29.6" E). Three traps were set up per site at a distance of 10, 30 and 50 m from the edge of the field on a pole at a height of 10 cm above the sugar beet vegetation. The panels were set up in the first week of May and the sampling was finished after two continuous weeks without catches. The sticky traps were replaced weekly and the number of adult *P. leporinus* on each trap was determined.

2.6. Subterranean Nymph Movement

From mid-November 2020 until June 2021, we excavated soil from winter wheat fields following a heavily SBR-infested sugar beet crop (2020, 49°37'06.4" N 8°07'45.5" E). After the adult planthoppers had left the field in June 2021, the study was continued in a nearby sugar beet field (2021, 49°37'51.2" N 8°07'00.3" E) until March 2022, where peas were sown in spring after the sugar beet harvest. Once a week, six soil samples (25 × 25 × 25 cm) were taken at marked points to determine the whereabouts of nymphs during the course of the year. Each soil sample was sliced in 5 cm increments and the number of *P. leporinus* nymphs per slice was counted. After each survey, the sampling points were moved 1 m in different directions on six sampling lines. The study was conducted for 66 weeks in total. The soil temperature was recorded using a Tinytag Plus 2 TPG-4017 (Gemini Data Loggers, Chichester, UK) at 5–10 cm depth.

2.7. Detection of SBRars and SBRps by qRT-PCR

Trapped *P. leporinus* specimens were tested for infection with SBRars and SBRps in 2020 and 2021 by examining 343 and 296 planthoppers, respectively. In the flight monitoring, up to 10 planthoppers per week collected from four sites were transferred to Eppendorf tubes containing 70% ethanol, and DNA was extracted using the Blood&Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The detection of SBRars and SBRps was determined by qRT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For SBRars, we used primers SBRars_qRTforKL437 (5'-CAC AAG CGG TGG AGC ATG TG-3') and SBRars_qRTrevKL438 (5'-ACT CCC ATG

GTG TGA CGG-3') with the FAM/TAMRA-labeled probe SBRars_qRTprobeKL457 (5'-FAM-TCT CAA TTA CTC ATA GTG AGA T-TamRa-3'). For SBRps, we used primers SBRps_qRTforKL464 (5'-TGG AGG TTA TCA GAA GCA CAG-3') and SBRps_qRTrevKL465 (5'-TGC TAA AGT CCC CAA CTT AAT G-3') with the FAM/TAMRA-labeled probe SBRps_qRTprobeKL466 (5'-FAM-ATG TTG GGT TAA GTC CCG CAA CGA GCG CAA CC-TamRa-3'). Targets were amplified using the Luna Universal Probe qPCR master mix kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The total DNA amount of the samples was adjusted to 10 ng/ μ L. A plasmid carrying the SBRars and SBRps target was used to prepare a standard curve including 10-fold dilution series. The samples were heated to 55 °C for 10 min, then 95 °C for 1 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s and 60 °C for 30 s in the amplification and fluorescence detection steps, respectively. The bacterial load was calculated against the standard curve using ABI 7500 System SDS Software (Applied Biosystems). In brief, we considered a threshold of 10 copies for SBRars and a threshold of 3 copies for SBRps, or for both cases a CT value higher than 35 as negative results.

2.8. Statistical Analysis

For growth rate analysis, a linear model was fitted to the lateral length data plotted against the number of days after hatching. Molting events were determined by observing the shed cuticle remnants, called exuviae, and were assigned to one of five developmental transitions based on the characteristic physical attributes of the nymphs. Host plant choice data were analyzed in GraphPad Prism v9.1.2 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) using Friedman's test followed by Dunn's multiple comparisons test. Subterranean nymph movement data were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparisons test, also in GraphPad Prism. Adult abundance data were analyzed in R v4.1.2 (R Core Team, Vienna, Austria, 2021) using a Mann-Whitney U-test and a Kruskal-Wallis test for data with non-normal distribution.

3. Results

3.1. Successful Mass Rearing of *P. leporinus* Facilitates Life Cycle Data Analysis

The rearing of *P. leporinus* was successful in two different settings. In 2020, we observed oviposition by caught adults (P0) and the development of nymphs in a climate chamber. The second generation of adults (F1) started molting after three months under climate-controlled conditions in August 2020 and continued emerging until January 2021. During this period, 905 adults emerged and deposited eggs (F2). Nymphs from the second generation hatched in sugar beet pots and were transferred to the climate chamber for use in other projects.

From the initial *P. leporinus* population (collected in the field in summer 2021) we studied two successive generations under climate chamber conditions (Figure 1). Under climate-controlled conditions, a growth curve with molting events was prepared based on the data from 60 individuals over 34 weeks (Figure 2). The mean molting time points (M1–M5, dark gray vertical lines) were at 32, 44, 77, 90 and 170 days after hatching, respectively. The mean size of first instar was $1053 \pm 30 \mu\text{m}$, increasing to $1600 \pm 34 \mu\text{m}$ for the second instar, $2300 \pm 60 \mu\text{m}$ for the third, $3320 \pm 83 \mu\text{m}$ for the fourth, and $4270 \pm 43 \mu\text{m}$ for the fifth. The mean size of adult specimens was $5028 \pm 372 \mu\text{m}$. Waxy filaments were produced by all five instars. We observed no morphological differences between male and female specimens at any nymph developmental stage.

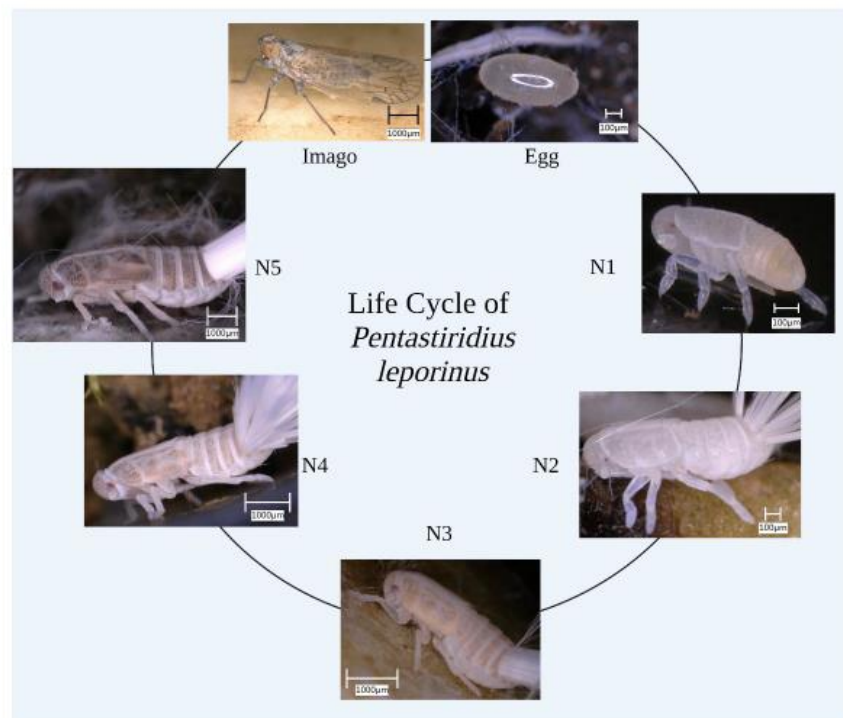


Figure 1. The life cycle of *Pentastiridius leporinus*. Development from the egg to the adult imago proceeds through five instar nymphs (N1–N5).

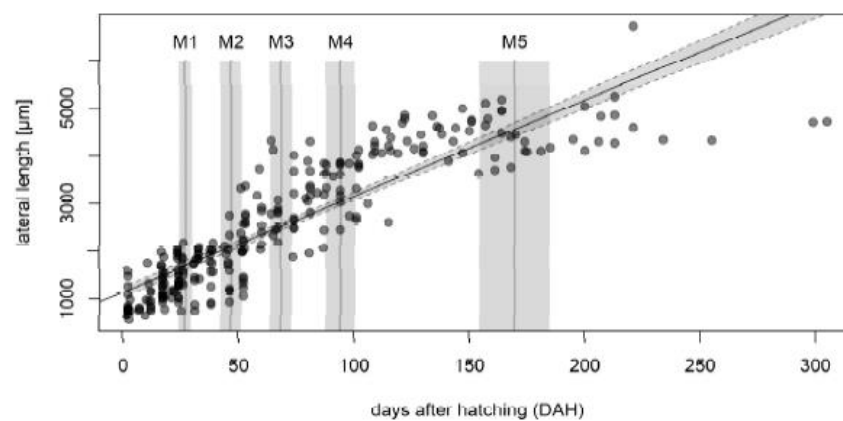


Figure 2. Growth rate of *Pentastiridius leporinus*. The body length (shown as lateral length in μm on the y -axis) was determined for $n = 60$ nymphs over a period of 34 weeks. Light gray intervals around molting time points (dark gray bars) represent \pm one standard error of the mean. A linear regression yielded the function $y = 20.6x + 1176.4$, which is displayed as a solid black line with gray dashed lines indicating the 95% confidence interval.

3.2. *P. leporinus* Nymphs Are Polyphagous with Weak Host Preferences

The ability of *P. leporinus* to survive for several months in the absence of a sugar beet crop suggests that the nymphs feed on alternate hosts. We therefore carried out host choice tests in which nymphs were offered sugar beet and two typical crops planted after the sugar beet harvest: winter wheat and maize. We found that significantly greater numbers of nymphs were attracted to sugar beet and maize than to wheat and the central area, but sugar beet and maize were equally attractive (Figure 3).

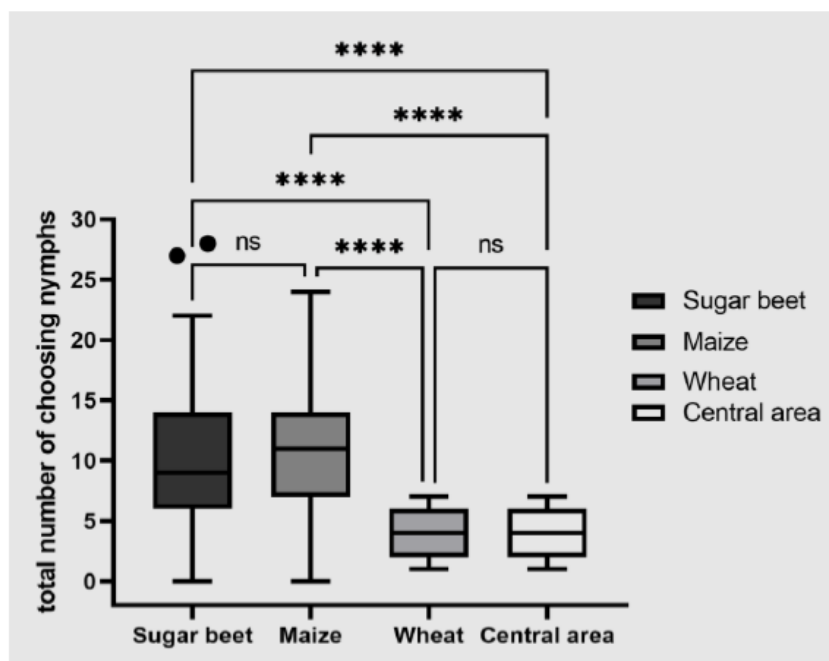


Figure 3. Host choice experiment in which *Pentastiridius leporinus* nymphs were placed in the central area and given a free choice of three alternative hosts. The number of nymphs found in the four areas of the test was counted after 1, 3, 6, 12, 24 and 48 h. The box plot shows the distribution of nymphs in all four areas averaged over all time points. Data were analyzed using a Friedman test. Boxes span the 25th to 75th percentiles, and the horizontal line in the box represents the median. The whiskers and outliers are plotted using Tukey's method. Outliers are plotted as individual points. Each experiment was carried out with five sets of 30 nymphs. Statistical significance: **** $p \leq 0.0001$; ns, not significant.

3.3. Subterranean *P. leporinus* Nymphs Show Temperature-Dependent Movement

Field studies revealed that nymphs are present in the soil throughout the year, and they do not hibernate over winter. However, the movement of individual nymphs is limited by the colder temperatures. In 2021, the first oviposition was observed on July 6th in Bubenheim (49°37'51.2" N 8°07'00.3" E). From November 2020 to March 2022, 488 individuals were found. The number of nymphs per sampling point and soil layer varied between 1 and 36, with an average of 2.6 ± 3.94 . Nymphs were found in the topsoil layer (0–10 cm) at a mean temperature of 8.6 °C. When the temperature in the topsoil dropped below 5.6 °C, nymph abundance increased significantly in the next deeper layer (10–20 cm) and in the subsoil (20–30 cm) (Figure 4).

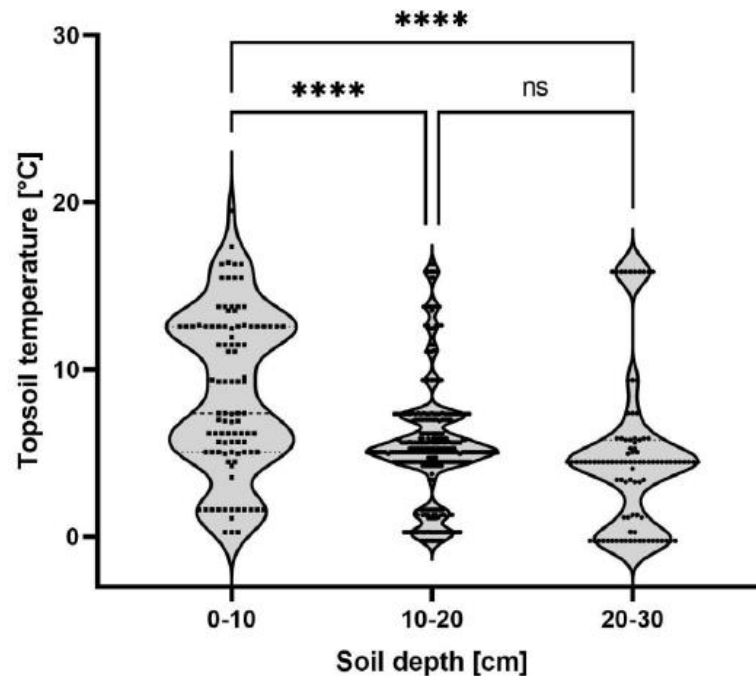


Figure 4. Subterranean *Pentastiridius leporinus* nymph movement. The topsoil temperature at which individual nymphs between November 2020 and March 2022 were found is plotted against the soil depth. In June, the site was changed due to the emergence of *P. leporinus* adults. Sample sizes per group: 0–10 cm ($n = 95$), 10–20 cm ($n = 298$), 20–30 cm ($n = 95$). Each data point represents one nymph. Data were analyzed by one-way ANOVA. Violin plots indicate the frequency distribution of the nymph movement; lines indicate median and quartiles. Statistical significance: **** $p \leq 0.0001$; ns, not significant.

3.4. Abundance of Adults of *P. leporinus* and Prevalence of SBR Pathogens

In 2020, we caught 800 *P. leporinus* individuals at all sites using yellow sticky traps, 95% of which were males. In 2021, the number of trapped individuals was 2022. The longest flight activity was tracked in Bickenbach. The 2020 flight period lasted from calendar week 21 (mid-May) until calendar week 38 (late September). In 2021, the flight period in Bickenbach was shorter, from calendar week 23 (mid-June) until calendar week 33 (mid-August). In order to compare the abundance of *P. leporinus* between the years, we defined the main flight period starting from calendar week 23 and lasting until week 31, when planthoppers were present at all sites. In Bickenbach, Steinweiler and Monsheim a significantly greater number of adults was caught in 2021 than 2020. In Riedstadt, there was no significant difference between the numbers of adults trapped in these two years (Table 1).

Table 1. Abundance of *Pentastiridius leporinus* in Rhineland-Palatinate (RP) and south Hesse (SH) in 2020 and 2021 during the main flight period (calendar weeks 23–31).

Site	2020	2021	Significance
Bickenbach (SH)	10.4 ± 7.1 ¹	35.8 ± 28.7	$p < 0.01$ ²
Steinweiler (RP)	5.7 ± 5.4	22.6 ± 25.8	$p < 0.05$
Monsheim (RP)	6.4 ± 6.0	11.5 ± 8.5	$p < 0.05$
Riedstadt (SH)	4.3 ± 4.5	4.7 ± 4.6	$p = 0.6$

¹ Data are means \pm standard deviation. ² Mann-Whitney U-test.

Figure 5 shows the adult abundance data, as well as the prevalence of both SBR pathogens during each calendar week, indicating a strong increase in adult abundance and the SBR infection rate between 2020 (Figure 5A) and 2021 (Figure 5B). Interestingly, in 2021, we recorded a substantial increase of individuals infected with both pathogens, coinciding with the elevated abundance of *P. leporinus* from calendar week 26 onwards (Figure 5B).

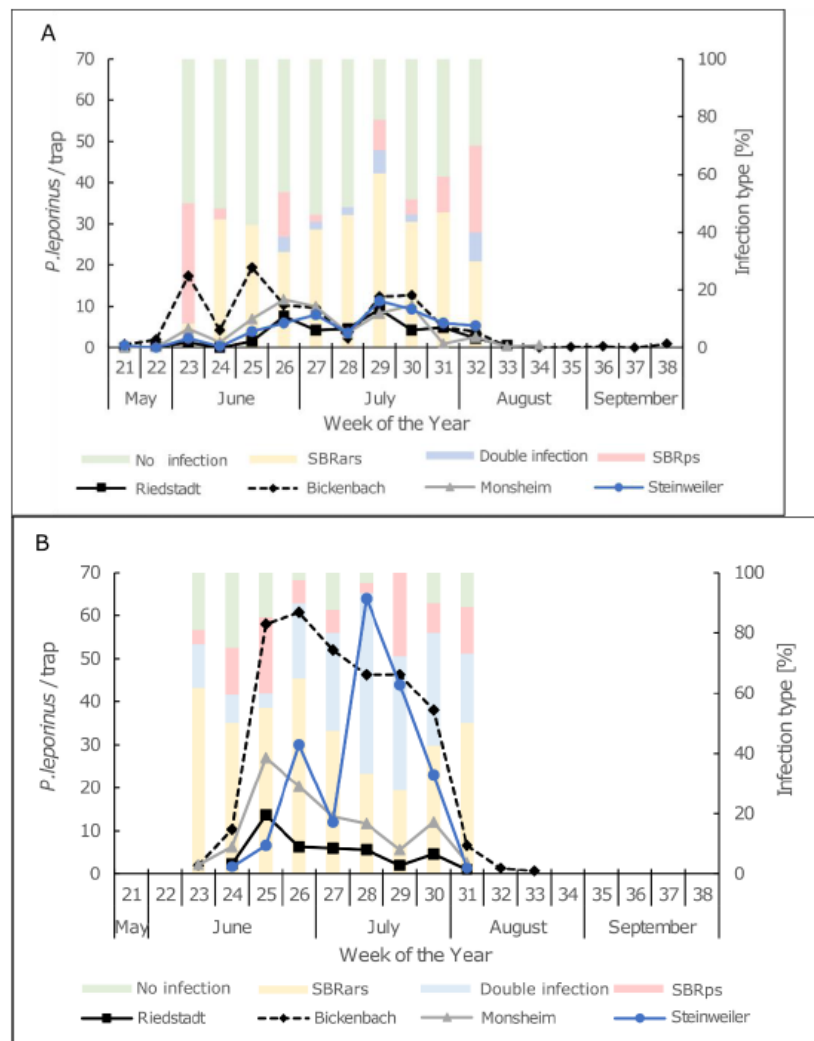


Figure 5. Adult abundance (lines) and infection rates (columns) of adult *P. leporinus* at four different locations in Rhineland-Palatinate and Hesse. The numbers representing adult abundance are means of three sticky traps for (A) 2020 and (B) 2021. The number of adult samples per week for the analysis of SBRars + SBRps infection rates was (A) 10–40 for 2020 and (B) 7–40 for 2021.

A closer look at the infection profiles at each site reveals interesting differences (Figure 6). In 2020, the proportion of uninfected planthoppers was 20.5–85.1% depending on the site. However, in 2021 this had fallen to 2.9–20.0%. When comparing the means of all four sites, 53.4% *P. leporinus* were singly or doubly infected in 2020 whereas this had risen to 89.4% in 2021.

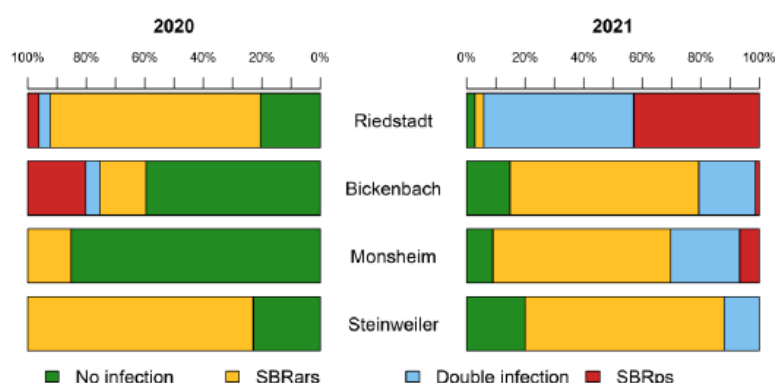


Figure 6. Analysis of *Pentastiridius leporinus* adults by qRT-PCR for the prevalence of the SBR pathogens *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus* (SBRars) and *Candidatus Phytolasma solani* (SBRps) in 2020 (left) and 2021 (right). The number of samples tested varied per site, but 349 adults in total were tested in 2020 and 296 in 2021.

In both years, and at all sites except Riedstadt in 2021, SBRars was the dominant pathogen. Interestingly, 94.3% of the planthoppers examined in Riedstadt, tested positive for infection with SBRps.

4. Discussion

The development of *P. leporinus* mass rearing protocols not only facilitated the life cycle studies described herein but will also allow the analysis of trait parameters that can be used to predict the future spreading and behavior of this pest. Furthermore, the mass rearing of *P. leporinus* is necessary to establish bioassays for the development of biological and environmentally friendly control methods. We developed a *P. leporinus* mass rearing method that was satisfactory in two different settings: a climate-controlled cabinet and greenhouse. Rearing in the climate-controlled cabinet required more effort than the greenhouse, but made it easier to collect adults and nymphs, and to trace them through their developmental stages. A key factor underpinning the success of rearing was the moderate and stringent watering regime and the use of GeoHumus or expanded clay to provide hiding places for oviposition and molting. The absence of an obligate diapause during the development of *P. leporinus* was in line with the field studies, where nymphs at different soil depths remained active even at low temperatures during winter.

The results of the host plant preference tests were important for several reasons. First, they showed that sugar beet is an attractive host for nymphs as well as adults, so there is no need to provide different host plant material during mass rearing. Second, they confirmed that nymphs are polyphagous, and indeed show no preference when offered a choice between sugar beet and maize. Winter wheat is the most common following crop after sugar beets, and it has been hypothesized that winter wheat might be a suitable host plant for *P. leporinus* nymphs. However, our host plant preference test did not confirm a high attractiveness of winter wheat. One reason for the lack of attractiveness of wheat could be the amount and composition of volatiles released by the single plants. For further evaluation of the attractiveness for *P. leporinus* nymphs solid-phase micro-extraction-gas chromatography-mass spectrometry could be performed [15].

The initial host plant of *P. leporinus* was the common reed *Phragmites australis*, but the circumstances surrounding the switch from reed to sugar beet are unclear [16]. It would be interesting to check for *P. leporinus* strains that are still endemic in aquatic or semi-aquatic *P. australis* and to compare them with strains that have adapted to sugar beet. Planthoppers have colonized subterranean habitats, as exemplified by the cavern-dwelling genus *Oliarus*, and might serve as a model for rapid subterranean speciation [17,18].

Nymph nutrition and movement are important factors to consider when evaluating pest control strategies based on limiting the food supply of insect pests or the use of agronomic practices that disrupt their life cycle [19]. We found that the nymphs are not restricted to sugar beet, only showing a weak preference for sugar beet over winter wheat and no preference between sugar beet and maize. The suggestion to switch from winter wheat to maize as a post-beet crop is therefore unlikely to inhibit *P. leporinus* development. In terms of movement, it was shown that *P. leporinus* nymphs develop underground and move through different soil layers based on sampling carried out in September, before sugar beet harvesting, and in May, just before adult emergence [1]. Our results from weekly sampling show that nymphs migrate to the topsoil (0–10 cm) when the temperature reaches an average of 8.6 °C, providing an opportunity to use ploughing as a means to disrupt the life cycle as part of an integrated pest management program. Sugar beet is harvested between September and November, when the soil temperature in our study areas falls from an average of 13.7 °C to 6.6 °C, so ploughing soon after harvest would seem a feasible strategy to interfere with *P. leporinus* movement. However, we also found that nymphs remained active even when the soil temperature dropped to 0 °C, similar to other fulgoromorph species such as *Hyalesthes obsoletus* larvae found on lavender [20].

We have provided the first experimental observations of *P. leporinus* movement patterns in south Hesse and Rhineland-Palatinate. SBR was first detected in sugar beet roots in Heilbronn, Baden-Württemberg, in 2010 [20], and the Palatinate has been infested with SBR since 2018 [21]. No SBR infection was detected in the Riedstadt district of Groß-Gerau during yellowing disease monitoring in 2018 and 2019 [4]. Infected sugar beet roots were first detected in the district of Groß-Gerau (south Hesse) in 2020 [4]. The significant increase in the *P. leporinus* population in south Hesse and the Palatinate between 2020 and 2021 may indicate the recent colonization of sugar beet crops in this area. Our field studies revealed that stolbur phytoplasma infection increased significantly between 2020 and 2021. To our knowledge, this is the first time a phytoplasma infection has exceeded 15% of a *P. leporinus* population, which is alarming due to the key role of phytoplasma in SBR-induced damage to sugar beet, especially in south Hesse. Further studies are needed to understand the interactions between these pathogens and their host plant and insect vector. Including phytoplasma in future monitoring activity could help to predict the mass movement of *P. leporinus* and thus prevent the spread of SBR by allowing the deployment of appropriate countermeasures. Another possibility is that the habitat is already infested the stolbur phytoplasma. *Candidatus* Phytoplasma solani is also transmitted by *H. obsoletus* in potato [22]. In 2021, stolbur phytoplasma caused tremendous damage in south Hesse and the Palatinate by reducing the marketability of potato tubers (Michael Lenz, Regierungspräsidium Hessen, personal communication). The cross-infestation of potato and sugar beet by vector insects has yet to be investigated.

The movement pattern we observed was similar to that reported in Baden-Württemberg [21] and Burgundy/Franche-Comté [1]. The emergence of adults is subject to annual fluctuations. The main flight period is calendar weeks 23–31 with a peak during week 25. The long flight period of *P. leporinus* is the main challenge when seeking control strategies. *P. leporinus* females carrying SBRars were shown to remain infectious over their entire adult lifespan of 30 days [9], whereas SBRps transmission assays by the same group were carried out using *H. obsoletus* because no infected *P. leporinus* could be found at the time of their study [23]. The two pathogens affected sugar beet plants in different ways, with the sugar content (Brix) of the roots and the mean tap root biomass as a proportion of total plant biomass affected more severely by SBRps than SBRars [24]. No data are yet available showing the effect of dual infections on sugar beet yields, but this information would facilitate the development of suitable SBR control measures.

5. Conclusions

We have established mass rearing techniques for *P. leporinus* allowing us to study life cycle and ecological traits that will facilitate the development of control strategies, including agronomic practices such as tilling and biological control methods. We found that *P. leporinus* nymphs do not appear to hibernate overwinter and move to the topsoil when the average temperature is -9°C . Host-choice experiments indicated a broad host range. Furthermore, we conducted field studies in recently infested regions of Germany to better understand the movement patterns of this insect. The results indicate that *P. leporinus* is spreading rapidly in Germany. Finally, we developed an accurate and sensitive protocol to detect the two *bona fide* SBR pathogens *Candidatus Arsenophonus* phytopathogenicus and *Candidatus* Phytoplasma solani, showing that the number of infected *P. leporinus* increased during the 2-year course of our study.

Author Contributions: Conceptualization, K.-Z.L., S.C.B. and A.V.; Investigation, S.C.B., N.W., M.S. (Mareike Schwind), A.D. and M.S. (Manuela Schieler); Writing—original draft preparation, S.C.B., N.W., K.-Z.L. and A.V.; Writing—review and editing, S.C.B., K.-Z.L. and A.V.; Supervision, K.-Z.L., C.L., B.K. and A.V.; Funding Acquisition, A.V., C.L. and B.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the excellence initiative of the Hessian Ministry of Higher Education, Research, Science, and the Arts (HMWK) via the LOEWE Centre for Insect Biotechnology and Bioresources, and by the NIKIZ project, part of the development program EULLE with the participation of the European Union and the state of Rhineland-Palatinate, represented by the ministry for business, transport, agriculture and viticulture. S.C.B. was funded by the Foundation Southwest German Sugar Beet Cultivation (Stiftung Südwestdeutscher Zuckerrübenanbau, Worms, Germany), N.W. was funded by the endowment fund Stiftungsfonds Weick of the Fraunhofer Future Foundation to support the scientific work to elucidate the biology of the vector of SBR disease in sugar beet.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank Christina Gemmer and André Rinklef for technical support and Helen Pfitzner, Stefanie Alexander, Eva Therhaag, Felix Anicker, Birgit Breckheimer and Jana auf der Landwehr for support in field work. The authors thank Richard Twyman for professional editing of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Bressan, A.; Holzinger, W.E.; Nusillard, B.; Sémétey, O.; Gatineau, F.; Simonato, M.; Boudon-Padieu, E. Identification and biological traits of a planthopper from the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae) adapted to an annual cropping rotation. *Eur. J. Entomol.* **2009**, *106*, 405–413. [CrossRef]
2. Gatineau, F.; Larrue, J.; Clair, D.; Lorton, F.; Richard-Molard, M.; Boudon-Padieu, E. A New Natural Planthopper Vector of Stolbur Phytoplasma in the Genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). *Eur. J. Plant Pathol.* **2001**, *107*, 263–271. [CrossRef]
3. Gatineau, F.; Jacob, N.; Vautrin, S.; Larrue, J.; Lherminier, J.; Richard-Molard, M.; Boudon-Padieu, E. Association with the Syndrome “Basses Richesses” of Sugar Beet of a Phytoplasma and a Bacterium-Like Organism Transmitted by a *Pentastiridius* sp. *Phytopathology* **2002**, *92*, 384–392. [CrossRef] [PubMed]
4. Behrmann, S.; Schwind, M.; Schieler, M.; Vilcinskas, A.; Martinez, O.; Lee, K.-Z.; Lang, C. Spread of bacterial and virus yellowing diseases of sugar beet in South and Central Germany from 2017–2020. *Sugar Ind.* **2021**, *146*, 476–485. [CrossRef]
5. Stone, F.D.; Howarth, F.G.; Hoch, H.; Asche, M. Root Communities in Lava Tubes. *Encycl. Caves* **2012**, 658–664. [CrossRef]
6. Bressan, A. Emergence and evolution of *Arsenophonus* bacteria as insect-vectored plant pathogens. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *22*, 81–90. [CrossRef]

7. Bressan, A.; Moral García, F.J.; Boudon-Padieu, E. The Prevalence of ‘*Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus*’ Infecting the Planthopper *Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae) Increase Nonlinearly with the Population Abundance in Sugar Beet Fields. *Environ. Entomol.* **2011**, *40*, 1345–1352. [[CrossRef](#)]
8. Weintraub, P.G.; Beanland, L. Insect Vectors of Phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* **2006**, *51*, 91–111. [[CrossRef](#)]
9. Bressan, A.; Sémétey, O.; Arneodo, J.; Lherminier, J.; Boudon-Padieu, E. Vector Transmission of a Plant-Pathogenic Bacterium in the *Arsenophonus* Clade Sharing Ecological Traits with Facultative Insect Endosymbionts. *Phytopathology* **2009**, *99*, 1289–1296. [[CrossRef](#)]
10. Bertaccini, A.; Duduk, B.; Paltrinieri, S.; Contaldo, N. Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *Am. J. Plant Sci.* **2014**, *5*, 1763–1788. [[CrossRef](#)]
11. Ćurčić, Ž.; Kosovac, A.; Stepanović, J.; Rekanović, E.; Kube, M.; Duduk, B. Multilocus Genotyping of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ Associated with Rubbery Taproot Disease of Sugar Beet in the Pannonian Plain. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Guglielmino, A.; Virla, E. Postembryonic development and biology of *Psammotettix alienus* (Dahlbom) (Homoptera, Cicadellidae) under laboratory conditions. *Boll. Zool. Agrar. Bachicoltura.* **1997**, *29*, 65–80.
13. Hütsch, B.W.; He, W.; Schubert, S. Nitrogen nutritional status of young maize plants (*Zea mays*) is not limited by NaCl stress. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **2016**, *179*, 775–783. [[CrossRef](#)]
14. Wakeel, A.; Asif, A.R.; Pitann, B.; Schubert, S. Proteome analysis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) elucidates constitutive adaptation during the first phase of salt stress. *J. Plant Physiol.* **2011**, *168*, 519–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Robert, C.A.M.; Erb, M.; Duployer, M.; Zwahlen, C.; Doyen, G.R.; Turlings, T.C.J. Herbivore-induced plant volatiles mediate host selection by a root herbivore. *New Phytol.* **2012**, *194*, 1061–1069. [[CrossRef](#)]
16. Biedermann, R.; Niedringhaus, R. *Die Zikaden Deutschlands Bestimmungstabellen Für Alle Arten*; WABV: Scheessel, Germany, 2004.
17. Hoch, H.; Howarth, F.G. Multiple cave invasions by species of the planthopper genus *Oliarus* in Hawaii (Homoptera: Fulgoroidea: Cixiidae). *Zool. J. Linn. Soc.* **1999**, *127*, 453–475. [[CrossRef](#)]
18. Hoch, H. The Hawaiian cave planthoppers (Homoptera: Fulgoroidea: Cixiidae)—A model for rapid subterranean speciation? *Int. J. Speleol.* **1997**, *26*, 21–31. [[CrossRef](#)]
19. Bressan, A. Agronomic practices as potential sustainable options for the management of *Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae) in sugar beet crops. *J. Appl. Entomol.* **2009**, *133*, 760–766. [[CrossRef](#)]
20. Sforza, R.; Bourgoïn, T.; Wilson, S.W.; Boudon-Padieu, E. Field observations, laboratory rearing and descriptions of immatures of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae). *Eur. J. Entomol.* **1999**, *96*, 409–418.
21. Schröder, M.; Rissler, D.; Schrameyer, K. “Syndrome des Basses Richesses” (SBR)—Erstmaliges Auftreten an Zuckerrübe in Deutschland. *J. Kult.* **2012**, *64*, 392–398.
22. Lang, C.; Maier, J.; Schrameyer, K.; Varrelmann, M.; Voegele, R.T.; Pfitzer, R. Causes and effects of the occurrence of “Syndrome des basses richesses” in German sugar beet growing areas. *Sugar Ind.* **2020**, *145*, 234–244. [[CrossRef](#)]
23. Mitrović, M.; Jakovljević, M.; Jović, J.; Krstić, O.; Kosovac, A.; Trivellone, V.; Jermini, M.; Toševski, I.; Cvrković, T. *Candidatus phytoplasma solani* genotypes associated with potato stolbur in Serbia and the role of *Hyalesthes obsoletus* and *Reptalus panzeri* (hemiptera, cixiidae) as natural vectors. *Eur. J. Plant Pathol.* **2019**, *144*, 619–630. [[CrossRef](#)]
24. Bressan, A.; Sémétey, O.; Nusillard, B.; Clair, D.; Boudon-Padieu, E. Insect Vectors (Hemiptera: Cixiidae) and Pathogens Associated with the Disease Syndrome “Basses Richesses” of Sugar Beet in France. *Plant Dis.* **2008**, *92*, 113–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

Potato (*Solanum tuberosum*) as a New Host for *Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae) and *Candidatus Arsenophonus Phytopathogenicus*

Sarah Christin Behrmann¹, André Rinklef², Christian Lang³, Andreas Vilcinskas^{1,2} and Kwang-Zin Lee^{2,*}

¹ Institute for Insect Biotechnology, Justus Liebig University of Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26, D-35392 Giessen, Germany

² Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Ohlebergsweg 12, D-35394 Giessen, Germany

³ Association of Hessian-Palatinate Sugar Beet Growers e.V., Rathenaustrasse 10, D-67547 Worms, Germany

* Correspondence: kwang-zin.lee@ime.fraunhofer.de; Tel.: +49-641-97219150

Simple Summary: *Pentastiridius leporinus* is a planthopper that transmits two bacterial pathogens to sugar beet plants: *Arsenophonus* and *Stolbur*. These bacteria cause an economically important disease known as syndrome basses richesses (SBR), characterized by deformed yellow leaves and low beet yields. Having observed potato fields in Germany infested with planthoppers and showing signs of leaf yellowing, we set out to identify the planthoppers and any transmitted pathogens. We identified *P. leporinus* by comparisons of COI and COII partial sequences and detected both bacterial pathogens in planthoppers, as well as in beet and potato plants. We found that *P. leporinus* nymphs and adults can transmit the bacteria and that long, warm summers allow two generations of planthoppers to breed, probably increasing the population size and threat of disease transmission in the following year. We conclude that the planthopper *P. leporinus* has expanded its host range to potato, and that further studies are needed, to facilitate the development of control strategies that minimize losses in sugar beet and potato crops.



Citation: Behrmann, S.C.; Rinklef, A.; Lang, C.; Vilcinskas, A.; Lee, K.-Z. Potato (*Solanum tuberosum*) as a New Host for *Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae) and *Candidatus Arsenophonus Phytopathogenicus*. *Insects* **2023**, *14*, 281. <https://doi.org/10.3390/insects14030281>

Academic Editor: Maurizio Francesco Brivio

Received: 13 February 2023

Revised: 8 March 2023

Accepted: 10 March 2023

Published: 13 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Pentastiridius leporinus* is a planthopper (Hemiptera: Cixiidae) that vectors two phloem-restricted bacterial pathogens to sugar beet (*Beta vulgaris* (L.)): the γ -proteobacterium *Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus* and the stolbur phytoplasma *Candidatus Phytoplasma solani*. These bacteria cause an economically important disease known as syndrome basses richesses (SBR), characterized by yellowing, deformed leaves and low beet yields. Having observed potato fields in Germany infested with cixiid planthoppers and showing signs of leaf yellowing, we used morphological criteria and COI and COII as molecular markers, to identify the planthoppers (adults and nymphs) primarily as *P. leporinus*. We analyzed planthoppers, potato tubers, and sugar beet roots and detected both pathogens in all sample types, confirming that *P. leporinus* adults and nymphs can transmit the bacteria. This is the first time that *P. leporinus* has been shown to transmit *Arsenophonus* to potato plants. We also found that two generations of *P. leporinus* were produced in the warm summer of 2022, which will probably increase the pest population size (and thus the prevalence of SBR) in 2023. We conclude that *P. leporinus* has expanded its host range to potato, and can now utilize both host plants during its developmental cycle, a finding that will facilitate the development of more efficient control strategies.

Keywords: Cixiidae; host shift; bivoltine; Solanaceae; Hemiptera; proteobacteria; life cycle; field data; phylogeny; cytochrome oxidase I

1. Introduction

The planthopper *Pentastiridius leporinus* (Linnaeus) belongs to the family Cixiidae (Hemiptera: Fulgoromorpha), and has been known to colonize sugar beet plants

(*Beta vulgaris* L.) since the early 2000s [1–3]. Before this, the adults were known to feed on reed grass (*Phragmites australis* (Cav.)), in moist or wet sites along rivers or in ruderal and brackish ecosystems, but the host plant for the nymphs was unknown [4]. The recent host shift has enabled *P. leporinus* to complete its life cycle on sugar beet (adult feeding, oviposition, hatching, and nymphal feeding). After the harvesting of sugar beet in autumn, nymphs overwinter on subsequent crops, typically winter wheat (*Triticum aestivum* (L.)) or barley (*Hordeum vulgare* (L.)) [5]. The adult planthoppers begin to emerge the following May and show flight activity usually until August, and sometimes until September if the summer is hot and dry [6]. Oviposition takes place at the beginning of July. Laboratory assays showed that the time from the first larval stage until adult emergence, under controlled conditions, is >100 days, without an induced diapause [6].

Pentastiridius leporinus is the main insect vector of the bacterial disease of sugar beet known as syndrome basses richesses (SBR), in Germany and Switzerland [7–9]. Symptoms of SBR include the yellowing of older leaves, lancet-shaped leaf deformations, and necrosis of the vascular tissue, which reduces the sugar content of the beet roots [10]. The syndrome is associated with two different bacterial pathogens: the γ -proteobacterium *Candidatus* Arsenophonus phytopathogenicus (hereafter described as Arsenophonus) and the stolbur phytoplasma *Candidatus* *Phytoplasma solani* (hereafter described as stolbur) [10]. Arsenophonus has been more abundant in sugar beet over the last five years, based on monitoring activities in Germany [7,11].

Bacteria of the clade Arsenophonus typically associate with insects as mutualists or parasites, but they are also pathogens of sugar beet and strawberry, where they cause marginal chlorosis disease [5]. Arsenophonus is transmitted by both adults and nymphs of *P. leporinus* [10,12]. An inoculation access period (IAP) of three days was tested in adults, revealing that females lived longer and were better vectors than males, with 64% and 24% efficiency of transmission, respectively [10]. Nymphs were hosted for 30 days on sugar beet seedlings, and Arsenophonus transmission was successful in four of six replicates [12]. The bacteria were also vertically transmitted to the offspring [12]. Arsenophonus was abundant in most internal organs of *P. leporinus*, with the highest bacterial load in the salivary glands and gonads of adults [12].

Stolbur is responsible for rubbery tap root disease (RTD) in sugar beet in Southeast Europe [13], and was first observed in Serbia in the 1950s [14]. Stolbur is also known to cause bois noir in grapevines (*Vitis vinifera* L.) [15]. This is transmitted by *Hyalesthes obsoletus* (Signoret), another cicadid planthopper known for its ability to complete its life cycle on different host plants, such as the nettle *Urtica dioica* (L.) and bindweed *Convolvulus arvensis* (L.) [16]. Several other crops are damaged by *H. obsoletus*, including celery, lavender, maize, and salvia [17–20]. Recently, we detected a high abundance of stolbur 16sR-XII in *P. leporinus* captured in sugar beet fields in Rhineland-Palatinate and South Hesse [6]. The same insects were also carrying Arsenophonus.

In potato (*Solanum tuberosum* (L.)), stolbur is known to cause diverse symptoms including reddening, aerial tubers, leaf discoloration, shortened internodes, and upward rolling of the top leaf, resulting in severe yield losses [21]. The identified main vector insect of stolbur in potato was *Hyalesthes obsoletus* [22]. *P. leporinus* had neither been found in potato nor transmitting stolbur. The detection of stolbur in sugar beet in 2020 and 2021 drew our attention to nearby potato fields, that started to show yellowing symptoms. The aim of this study was to identify the planthopper associated with wilting potato plants, and to characterize the pathogens responsible for this novel syndrome.

2. Materials and Methods

2.1. Field Collection of *P. leporinus* from Potato Tubers and Sugar Beet Roots

P. leporinus samples were collected from three locations (Table 1) on neighboring sugar beet and potato fields (<300 m apart), in September 2022. Adults were collected using a sweep net. Nymphs were collected by digging them out from between potato tubers, or by using a beet fork to collect them from along the beet roots. Field-collected nymphs

were transferred individually to microcentrifuge tubes or Petri dishes for further analysis in the laboratory. Field-collected adults were transferred to a 2-week-old potted potato plant var. Jule (Solana, Windeby, Germany), for egg deposition and hatching of first-instar nymphs. Plants were kept in the greenhouse in single cages (Cavea PopUp size M net cage (Howitec, Bolsward, The Netherlands)). The temperature of the chamber was set to 22/16 °C day/night, with a 16 h photoperiod. Images of field-collected and freshly-hatched nymphs were captured using a VHX-5000 digital microscope (Keyence Deutschland, Neu-Isenburg, Germany), and measured using the VHX-5000 communication software.

Table 1. Sampling locations.

Location	State	Crops	Coordinates
Eich	Rhineland-Palatinate	Potato, sugar beet	49.765428, 8.393707
Ibersheim	Rhineland-Palatinate	Potato, sugar beet	49.726559, 8.393205
Lampertheim	Hesse	Potato	49.610846, 8.465391
Bickenbach	Hesse	Sugar beet	49.758758, 8.577285

Potato tubers expressing stolbur-like symptoms, characterized by the formation of side shoots, wilting, and rubbery tubers, were collected from the same locations. In the Eich and Ibersheim locations, we also collected 15 sugar beet samples with SBR symptoms, characterized by yellowing leaves, deformed young leaves, and necrosis of the vascular tissue and root tips.

2.2. Identification of Nymphs and Adults

To confirm the species, adults were morphologically examined [23] and DNA was extracted from nymphs and adults representing each location using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A single fragment of the partial cytochrome oxidase subunit I and II (COI and COII) genes was amplified, as previously described [8], using primer pair C1J2441/C2N3661 [24]. The amplicons were purified with Exonuclease and SAP (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), followed by sequencing (Eurofins Genomics, Cologne, Germany). In total, seventeen adults were analyzed: for potato, four from Eich, seven from Lampertheim and five from Ibersheim; and for sugar beet, one from Ibersheim. As for the nymphs, nine were analyzed, one from potato in Eich, two from potato in Ibersheim, four from potato in Lampertheim, one from sugar beet in Eich, and one from sugar beet in Ibersheim. COI/COII sequences from three *P. leporinus* nymphs, collected from potato fields, one adult, collected from a sugar beet field, and reference sequences FN179288–FN179291 from *P. leporinus* and *Hyalesthes obsoletus*, were compared [8]. COI and COII sequences were trimmed to 972 bp and aligned using MUSCLE [25], and a phylogenetic tree was created using the neighbor-joining method and Geneious v10.2 (Biomatters, Auckland, New Zealand). Bootstrap analysis was conducted using 10,000 replications. The COI/COII sequences were submitted to Genbank, under accession numbers with sequential numbering from OQ420381 to OQ420405.

2.3. Abundance of *P. leporinus* in 2022

The abundance of *P. leporinus* was evaluated using transparent, sticky “cloak” traps (PAL, CSALAMON Group, Budapest, Hungary), 25 × 35 cm. The traps were set up at one location in Hesse (coordinates 49.758758, 8.577285). The site was a commercial sugar beet field, 13.2 km away from the examined potato field in Eich (Table 1). Three traps were placed at distances of 10, 30, and 50 m from the edge of the field, on a pole at a height of 10 cm above the sugar beet vegetation. The sampling period started in May and ended in September, after two continuous weeks without catches. The traps were replaced weekly and the number of adults was determined. To evaluate the ability of *P. leporinus* nymphs to develop on potato plants, the head capsule width and dorsal length of 100 field-collected nymphs were measured, using a VHX-5000 digital microscope.

2.4. Transmission Assays with Nymphs

The ability of *P. leporinus* nymphs to transmit *Arsenophonus* and stolbur to uninfected potato plants, was tested by releasing five field-collected nymphs (third to fifth instar) onto twelve potato plants and three sugar beet plants, followed by feeding for an IAP of 66 days. The control group consisted of three potato plants without nymphs. Field-collected *P. leporinus* nymphs were placed directly onto 3-week-old sugar beet plants (KWS Annarosa, Einbeck, Germany) and 5-day-old potato plants (Colomba HZPC, Joure, The Netherlands), growing in Göttinger 3 L pots (Lamprecht-Verpackungen, Göttingen, Germany), filled with Frühstorfer potting soil LD 80 (Heinrichs, Ingelheim, Germany) and covered with expanded clay (Floragard, Oldenburg, Germany). Plants were kept in single cage, in a Cavea PopUp size M net cage (Howitec, Bolsward, The Netherlands), and watered moderately twice weekly. The temperature in the greenhouse chamber was set to 22/16 °C day/night, with a 16 h photoperiod.

After 66 days, nymphs were collected from plants and pooled by plant origin for DNA extraction, as described above. Potato plants were divided into leaves, upper stem, midsection, lower stem, tubers, and roots. Sugar beet plants were divided into leaves, leaf stems, upper root, midsection of root, root tip, and tender roots. DNA extracts from plants were prepared from 0.1 g samples according to a modified CTAB procedure [26], followed by qRT-PCR (Section 2.6).

2.5. Comparison of *Arsenophonus* Isolated from Potato Tubers, Beet Roots, and *P. leporinus*

Nested PCR with primer pairs Fra5/rP1 and Alb1/Oliv1, was carried out to amplify the *Arsenophonus* 16S ITS sequence [3]. The products were separated by 2% agarose gel electrophoresis and stained with 0.1 µL/ml SYBR-Safe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), followed by visualization under UV light. The products were then cleaned up and sequenced as described above. Multiple sequences were aligned with MUSCLE, using Geneious v10.2, as described above. The *Arsenophonus* sequences were submitted to Genbank, under accession numbers with sequential numbering from OQ411083 to OQ411090.

2.6. Analysis of *Arsenophonus* and Stolbur Infections

Ninety-one individual insects, from three locations, were analyzed: thirty-six adults and thirty-six nymphs from potato fields, as well as nine adults and ten nymphs from sugar beet fields. Following DNA extraction, as described above, TaqMan qRT-PCR was performed using Luna Universal qRT-PCR Master Mix (New England Biolabs, Frankfurt, Germany), 25 ng of template DNA, and primer pairs KL437/438 and KL464/465, for the detection of *Arsenophonus* and stolbur, respectively [7]. The number of target copies was determined using absolute standard curves. Samples with a CT value > 35 were considered negative, which is equivalent to 22 copies for *Arsenophonus* and 14 copies for stolbur.

To assess the abundance of infected potato and sugar beet plants in two locations, 30 symptomatic sugar beet root samples and 45 symptomatic potato tuber samples were collected, from three locations, and tested for *Arsenophonus* and stolbur. DNA extracts were prepared from 0.1 g tuber or sugar beet root samples, using a modified CTAB method [26] followed by qRT-PCR, as described above.

3. Results

3.1. Identification and Morphometric Analysis of *P. leporinus* on Potato Plants

A recent increase in wilting syndromes in potato fields in Southwest Germany, was accompanied by the observation of hitherto unknown planthoppers in those affected fields. We identified the species as *P. leporinus*, based on morphological traits in potatoes (*Solanum tuberosum* var. Juventa). We found symptomatic potatoes colonized by nymphs, filamentous residues reminiscent of the characteristic wax structures of egg clutches, and hatching *P. leporinus* adults (Figure 1).

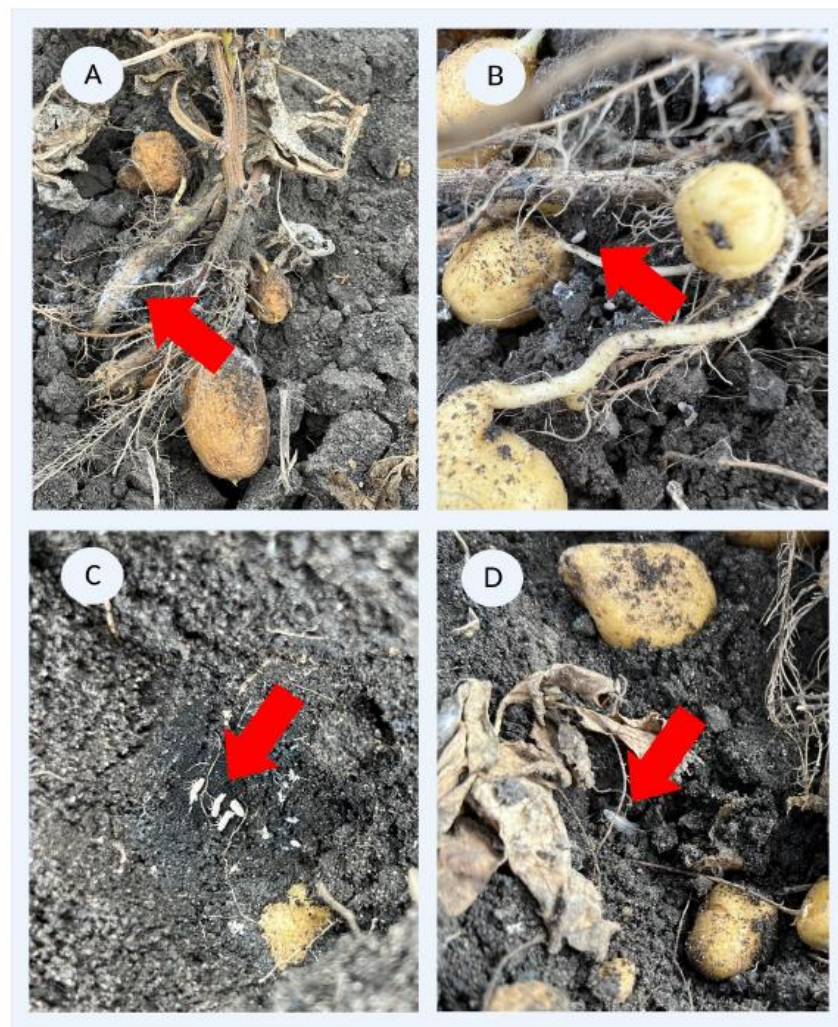


Figure 1. *Pentastiridius leporinus* found on potato plants in Ibersheim, September 2022. (A) Subterranean colonization of roots and tubers by nymphs, characterized by white, waxy filamentous residues. (B) Nymphs on the potato tubers and roots. (C) Colony of nymphs at different developmental stages and residues of molting, hidden under potato tubers. (D) Adult *P. leporinus* found in the soil. Red arrows indicate nymphs (A–C) and adults (D).

Morphometric analysis was carried out on 100 of the field-collected nymphs (Table S1).

3.2. Molecular Identification of *P. leporinus*

We analyzed 23 individual nymphs and adults from potato and sugar beet fields, all of which (except one nymph) were identified as *P. leporinus*. The one exception, collected from sugar beet, was identified as *Cixius* sp., another planthopper in the family Cixiidae. Evolutionary relationships among the planthoppers and some reference specimens from other years and locations, were checked on the basis of COI and COII sequence similarity, resulting in the phylogenetic tree shown in Figure 2.

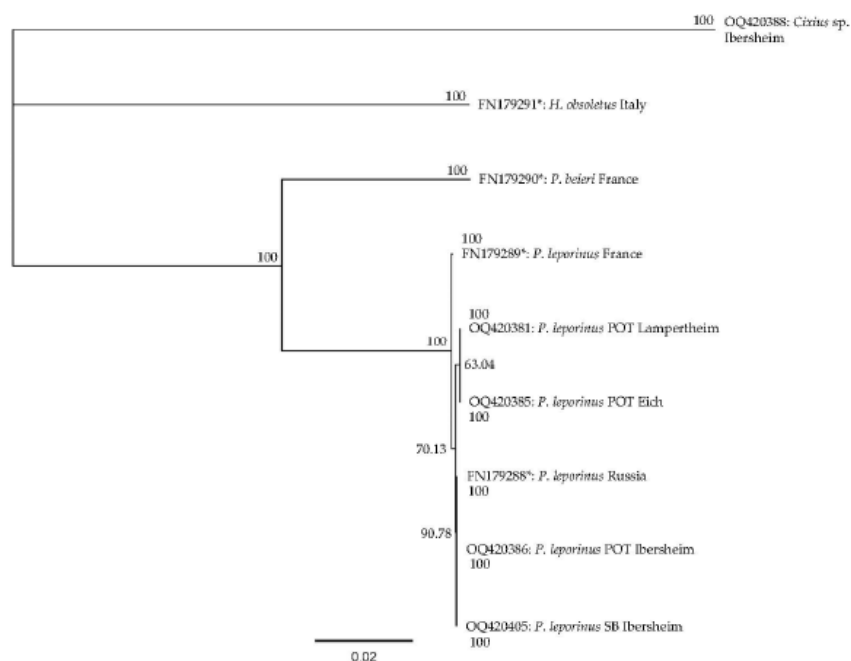


Figure 2. Phylogenetic relationship between cytochrome oxidase subunits I and II (COI and COII) sequences from collected *Pentastiridius leporinus*, *Hyalesthes obsoletus*, and *Cixius* sp. Specimens, and sequences of planthoppers from earlier studies (marked with *) [8]. The tree was constructed using the neighbor-joining method, based on a MUSCLE alignment of COI and COII sequences. The bar indicates the number of substitutions per site. Bootstrap values (10,000 replications) are included as numbers at the branches. POT: found in potato, SB: found in sugar beet.

Based on COI and COII sequences, the planthoppers found in potato and sugar beet showed a closer genetic relationship to *P. leporinus* than the two known references from France and Russia. The nearest related species (*P. beieri*), as well as the more distantly related *H. obsoletus* and *Cixius* sp. specimens, showed clear sequence differences.

3.3. Second Generation of Adults in Bickenbach, 2022

In 2022, 1336 *P. leporinus* adults were caught in a sugar beet field in Bickenbach, Hesse using transparent, sticky traps (Figure 3). The flight period lasted from calendar week 20 (mid-May) until calendar week 39 (end of September). At this location, 92.4% of the captured individuals were males.

Surprisingly, two peaks of abundance were observed. The first occurred at the beginning of July (calendar week 27), followed by a decline until the end of July (calendar week 30), at which point the mean capture rate per trap fell to a low of 0.3 insects. Afterwards, the number of captured adults rose again, reaching a second peak at the end of August (calendar week 35). One insect was trapped at the end of September (calendar week 39).

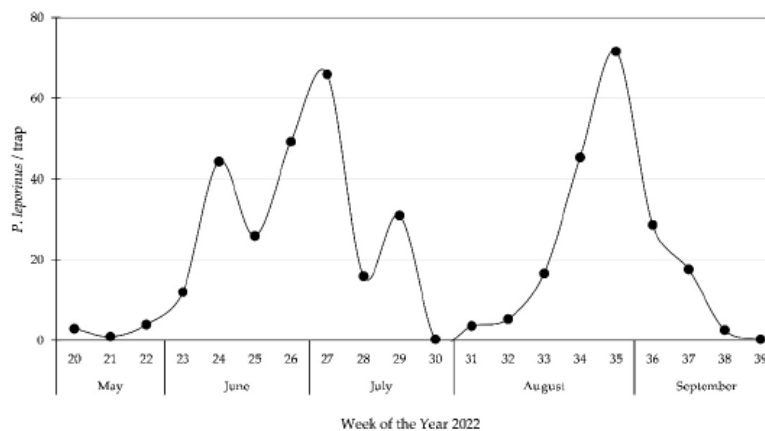


Figure 3. Abundance of adult *Pentastiridius leporinus* in Bickenbach, Hesse, 2022. The numbers represent means of three sticky traps per week.

3.4. Transmission Assay

The detection of *Arsenophonus* and stolbur in nymphs and plants, by qRT-PCR, is summarized in Table 2. All groups of nymphs tested positive for *Arsenophonus*, but only one of fifteen groups tested positive for stolbur. Three of twelve potato plants tested positive for *Arsenophonus*, whereas stolbur was not detected in any potato plants. In the first potato plant, *Arsenophonus* was detected in the tubers with 45 copies. In the second plant, 141 copies were found in the roots. The third potato plant was more severely infected, with 85,635 copies in the lower stem, 5341 in the roots, 172 copies in the leaves, and 93 in the tubers. *Arsenophonus* and stolbur were both detected in one of the three sugar beet plants, which contained 23 copies of *Arsenophonus* and 1416 copies of stolbur in the root tip. Neither pathogen was found in the control group.

Table 2. Detection of *Candidatus Arsenophonus* phytopathogenicus (*Arsenophonus*) and *Candidatus Phytoplasma solani* (stolbur) in *P. leporinus* nymphs, as well as potato and sugar beet plants, after inoculation with field-collected third-to-fifth-instar nymphs for 66 days. Control were potato plants without nymphs.

Plant Species	Plants		Group of Nymphs	
	<i>Arsenophonus</i>	Stolbur	<i>Arsenophonus</i>	Stolbur
Potato	3/12	0/12	12/12	0/12
Sugar beet	1/3	1/3	3/3	1/3
Potato (Control)	0/3	0/3	-	-

3.5. Similarity of *Arsenophonus* in All Organisms

The *Arsenophonus* qRT-PCR results were verified by nested PCR followed by agarose gel electrophoresis [3]. Infected potato tubers showed the same characteristic banding pattern as infected sugar beet and planthopper samples (Figure S1). No bands were observed in the negative control. Two *Arsenophonus* amplicons from planthoppers, one from sugar beet, and four from potato plants were sequenced, revealing 100% identity with the *Arsenophonus* 16S ITS sequence DQ834353.1 (positions 80–419 bp) submitted by [3].

3.6. Prevalence of *Arsenophonus* and Stolbur in *P. leporinus* and Plant Material

We tested 91 *P. leporinus* adults and nymphs for *Arsenophonus* and stolbur, 69.2% of which were positive for *Arsenophonus* and 2.2% of which were positive for stolbur. Each adult positive for stolbur was also positive for *Arsenophonus* (Figure 4).

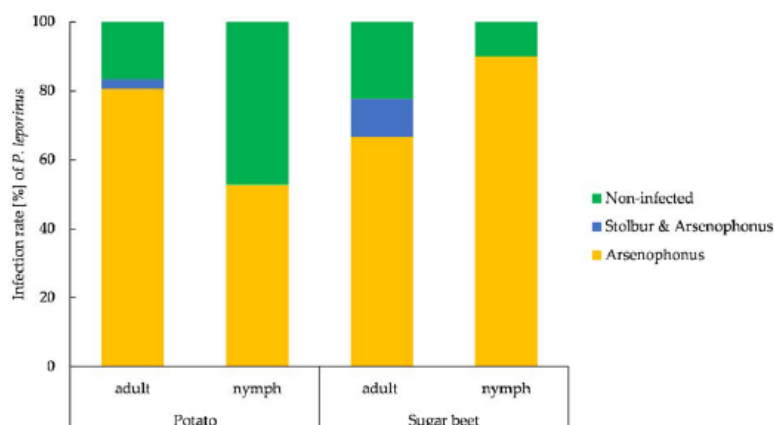


Figure 4. Prevalence of *Candidatus Arsenophonus* phytopathogenicus (Arsenophonus) and *Candidatus Phytoplasma solani* (stolbur) in *Pentastiridius leporinus* adults (n = 36) and nymphs (n = 36) on potato, and adults (n = 9) and nymphs (n = 10) on sugar beet plants, as determined by qRT-PCR. Nymphs and adults were collected in September 2022.

The prevalence of Arsenophonus in both plant species was high: 95% of the sugar beet roots and 100% of the potato tuber samples were positive for this species. In addition, stolbur was detected in 20% of the potato tubers and 45% of the beet root samples (Figure 5).

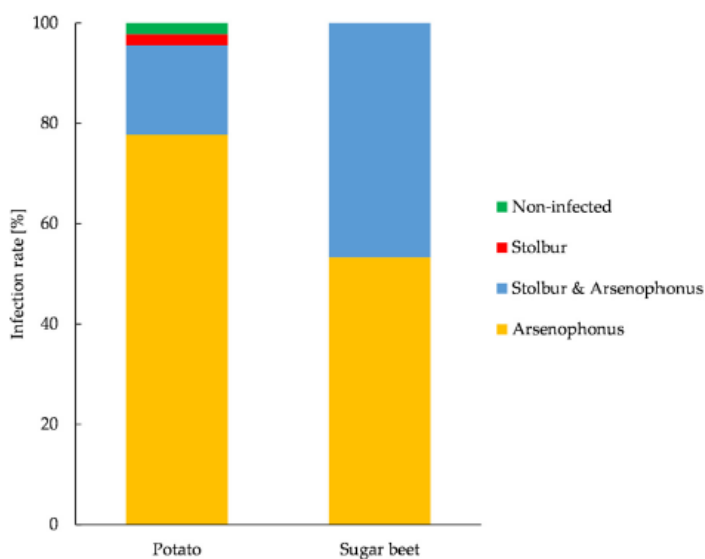


Figure 5. Prevalence of *Candidatus Arsenophonus* phytopathogenicus (Arsenophonus) and *Candidatus Phytoplasma solani* (stolbur) in symptomatic potato tubers (n = 45) and sugar beet roots (n = 30), in September 2022.

We analyzed forty-five potato tuber samples in total. Among the fifteen samples from Eich, all were positive only for Arsenophonus, except a single uninfected sample. Among the fifteen samples from Ibersheim, seven were positive only for Arsenophonus, seven were positive for both pathogens and one was positive only for stolbur. Among the fifteen samples from Lampertheim, fourteen were positive for Arsenophonus alone and one sample was positive for both pathogens. We analyzed thirty sugar beet samples

in total, all of which were positive for *Arsenophonus* or a double infection. Among the fifteen samples from Eich, seven were positive for *Arsenophonus* and eight were positive for both pathogens. Among the fifteen samples from Ibersheim, nine were positive for *Arsenophonus* and six were positive for both pathogens.

4. Discussion

Several species of planthoppers and psyllids cause serious damage to potato crops by direct feeding and/or by transmitting pathogens, especially phytoplasmas, bacteria, and viruses [27]. Many planthopper species associated with potato fields belong to the family Cixiidae, including *H. obsoletus*, *Reptalus quinquecostatus* (Dufour) and *R. panzeri* (L ow) [22]. Our study presents the first molecular evidence that potato plants are colonized by *P. leporinus*. We also confirmed adult feeding, egg laying, hatching, and nymphal feeding on potato plants and tubers. Our data therefore suggest that *P. leporinus* can move between sugar beet and potato host plants, as represented in an updated life cycle diagram (Figure 6). To compare the suitability of sugar beet and potato as hosts, long-term life cycle trials are needed to understand the dynamics of *P. leporinus* developmental biology. To compare these host interactions, suitable protocols for some host plants under controlled conditions have already been established by [6].

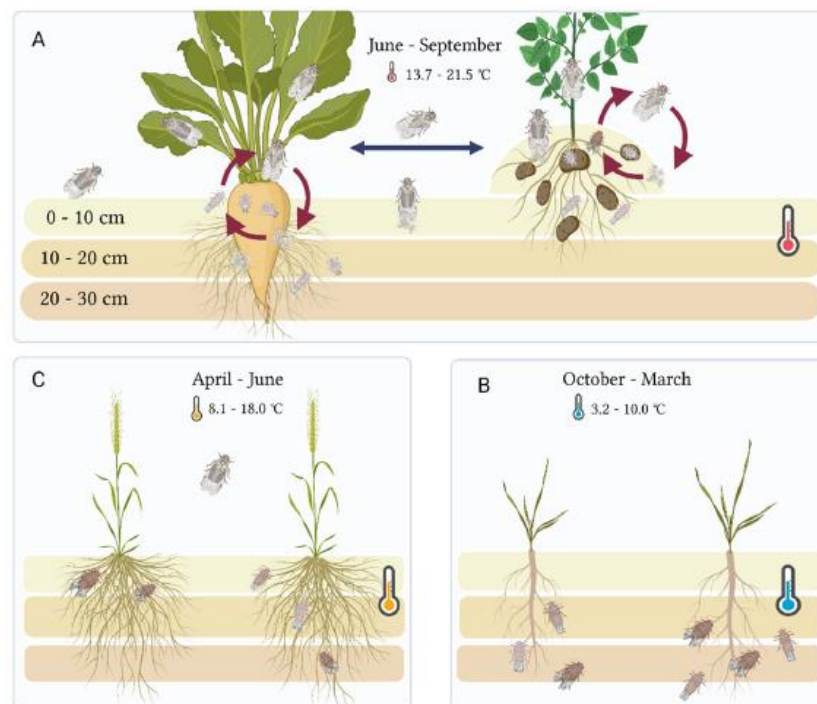


Figure 6. The life cycle of *P. leporinus* with two different host plants, including data [6]. (A) *P. leporinus* adults lay eggs, which give rise to nymphs, on sugar beet and potato plants between June and September. Under favorable conditions, a second generation of adults develops in the summer, depicted by red arrows. The blue arrow demonstrates the ability of adults to move between host plants. (B) Nymph distribution and temperature-dependent movement between October and March. After harvesting, the subsequent crop is usually winter wheat. (C) Nymph distribution and temperature-dependent movement between April and June. Thermometer symbols indicate minimum and maximum temperatures.

The identification of species was not possible based on morphological characteristics alone during the nymphal stages, so we sequenced COI amplicons to provide species-dependent molecular markers. We found that the nymphs and adults on sugar beet and potato plants were 100% identical to the *P. leporinus* reference sequences, which differed from the *H. obsoletus* and *Cixius* sp. amplicons. However, further genomic analysis of planthoppers is necessary to identify potential differences between populations.

Cixiid species such as *P. leporinus* are typically univoltine—they produce a single generation per year [4]. However, the examination of sticky traps and soil samples provided convincing evidence that the hot and dry summer in 2022 enabled *P. leporinus* to produce a second generation of adults in September, which were able to lay eggs. Under field conditions in 2020 and 2021, there was no clear evidence of bivoltine development, whereas a second generation of adults was also evident, from the monitoring of sticky traps, in 2018 [28]. The ability to produce two generations in 2022 is likely to increase the number of adults in the region in 2023. This enhances the threat of economic damage caused by *P. leporinus*, in regions where potato and sugar beet are cultivated in the same rotation. Rising temperatures, caused by climate change, are predicted to reduce crop yields, by encouraging the growth of pest insect populations [29], and projections in staple cereals such as rice, maize, and wheat indicate a yield loss of up to 25% per degree Celsius increase. Our data show a real-time change in voltinism in *P. leporinus*, probably due to the increase in temperatures.

During our field study in September, we found one *Cixius* sp. nymph on sugar beet in Eich (Rhineland-Palatinate). *Cixius wagneri* (China) is known to transmit *Candidatus Phlomobacter fragariae*, which causes marginal chlorosis in strawberries [30]. In France, *C. wagneri* in heavily-infested sugar beets, were shown to carry and transmit *Arsenophonus* [10]. We found one *Cixius* sp. nymph on sugar beet, but no adults in the sticky traps. Further studies monitoring cixiid species in sugar beet and potato crops, should also include *Cixius* species as potential *Arsenophonus* vectors in Southwest Germany. The recent finding of stolbur in sugar beet [6], and the observed host shift of *P. leporinus* to potato, may also influence the disease pressure in this region. In Ibersheim, two *H. obsoletus* individuals were found on sticky traps in sugar beet crops (data not shown). Further studies are needed to clarify the population density of *H. obsoletus* and identify which bacteria are carried. Interactions between sugar beet, potato, and vine plants could lead to an outbreak of stolbur in Rhineland-Palatinate's vineyards and should therefore be investigated in a timely manner [15].

We conducted transmission assays to determine whether *P. leporinus* can vector *Arsenophonus* and/or stolbur to potato plants. Transmission from adults to sugar beet seedlings was previously reported [10,12], and was possible within an IAP of 3 days and occurred over a period of 33 days. Transmission assays from nymphs to sugar beet seedlings were also conducted previously for an IAP of 30 days, revealing a transmission frequency of 60%, based on PCR detection [12]. We provided quantitative data confirming that *P. leporinus* nymphs were able to transmit *Arsenophonus* to the stem, tender roots, and tubers of potato plants, after 66 days, as well as the first evidence of stolbur transmission from *P. leporinus* nymphs to sugar beet. Stolbur depends on horizontal transmission via insect vectors [31,32]. *H. obsoletus* was previously used to confirm the transmission of stolbur to sugar beet seedlings, because no stolbur-infected specimens of *P. leporinus* were available at that time [10].

We detected *Arsenophonus* in *P. leporinus*, as well as sugar beet root tips and potato tubers from the field. We found that 90% of all potato and sugar beet samples tested positive for *Arsenophonus*. The qRT-PCR results were confirmed by endpoint PCR, using the primer pairs Fra5/rP1 and Alb1/Oliv1 [3]. All potato, sugar beet, and planthopper samples showed the same band pattern. Furthermore, *Arsenophonus* 16S ITS sequences from different samples were identical, showing that all isolated strains shared a close genetic relationship. Further sequencing of these strains should be carried out, to determine if there is a genetic basis for the host shift from sugar beet to potato.

In our study, only rubbery potato tubers and yellowing sugar beets were collected for analysis. Stolbur was detected in 20% of potato samples, significantly lower than the prevalence of *Arsenophonus*. The symptoms of *Arsenophonus* in sugar beet and strawberry plants are convergent with those of phytoplasmas [5]. We conclude that stolbur-like symptoms in potato can also be triggered by *Arsenophonus*, and 80% of the examined potato tubers were infected with *Arsenophonus* alone.

More studies examining the relationship between *Arsenophonus*, potato plants, and planthopper vectors are urgently needed, because we currently lack an in-depth characterization of symptoms and the quantification of damage caused by these pathogens, under controlled conditions. It is also unclear where, inside the plant, *Arsenophonus* localizes, accumulates, and propagates. The prevalence of both pathogens in different regions of Germany is still unknown and must be assessed to facilitate appropriate containment measures. Seed potatoes could potentially spread both diseases [33]. Potential control strategies could include population suppression in *P. leporinus* and the modification of crop rotations to avoid consecutive crops of potato and sugar beet.

5. Conclusions

Sugar beet and potato are important root crops, with a significant socioeconomic value in the Rhine Valley. In Rhineland-Palatinate, both crops together covered more than 23,000 ha (6.0% of total arable land) in 2022 [34]. In this study, we present evidence that the planthopper *P. leporinus* has expanded its host range to potato, which will help in the development of control strategies to prevent the loss of sugar beet and potato crops. Phylogenetic analysis suggested that the planthoppers found in potato and sugar beet from different locations in Southwest Germany had a common origin. Most of the potato plants with disease symptoms such as side shoots, wilting, and rubbery tubers were colonized by *Arsenophonus*, in the absence of stolbur. We confirmed the ability of *P. leporinus* nymphs to transmit *Arsenophonus* to potato and stolbur to sugar beet. Our field data also provide evidence that *P. leporinus* can produce a second generation per year, under favorable conditions.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/insects14030281/s1>, Table S1: morphometric measurements; Figure S1: gel electrophoresis.

Author Contributions: Conceptualization, S.C.B. and K.-Z.L.; investigation, S.C.B. and A.R.; writing—original draft preparation, S.C.B., A.R. and K.-Z.L.; writing—review and editing, S.C.B., K.-Z.L., C.L. and A.V.; supervision, K.-Z.L., C.L. and A.V.; funding acquisition, A.V. and C.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the excellence initiative of the Hessian Ministry of Higher Education, Research and the Arts (HMWK) 11:11 insects-2248745, via the LOEWE Centre for Insect Biotechnology and Bioresources, and by the NIKIZ project, part of the development program EULLE with the participation of the European Union and the state of Rhineland-Palatinate, represented by the Ministry of Economic Affairs, Transport, Agriculture and Viticulture. S.C.B. was funded by the Foundation Southwest German Sugar Beet Cultivation (Stiftung Südwestdeutscher Zuckerrübenanbau).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank Jana Thiel and Sardhar Ganesh Hukumathi Venkata for technical support and David Löffler, Helen Pfitzner, Johannes Knab, Manuela Schieler, and Anna Dettweiler for support with the field work. The authors thank Richard M Twyman for professional editing of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Gatineau, F.; Larrue, J.; Clair, D.; Lorton, E.; Richard-Molard, M.; Boudon-Padieu, E. A New Natural Planthopper Vector of Stolbur Phytoplasma in the Genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). *Eur. J. Plant Pathol.* **2001**, *107*, 263–271. [\[CrossRef\]](#)
- Gatineau, F.; Jacob, N.; Vautrin, S.; Larrue, J.; Lherminier, J.; Richard-Molard, M.; Boudon-Padieu, E. Association with the Syndrome “Basses Richesses” of Sugar Beet of a Phytoplasma and a Bacterium-Like Organism Transmitted by a *Pentastiridius* sp. *Phytopathology* **2002**, *92*, 384–392. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sémétey, O.; Bressan, A.; Gatineau, F.; Boudon-Padieu, E. Development of a specific assay using RISA for detection of the bacterial agent of “basses richesses” syndrome of sugar beet and confirmation of a *Pentastiridius* sp. (*Fulgoromorpha*, Cixiidae) as the economic vector. *Plant Pathol.* **2007**, *56*, 797–804. [\[CrossRef\]](#)
- Biedermann, R.; Niedringhaus, R. *Die Zikaden Deutschlands: Bestimmungstabellen für alle Arten*; Wissenschaftlich-Akademischer-Buchvertrieb: Schönefeld, Germany, 2004; ISBN 978-3-939202-00-4.
- Bressan, A. Emergence and evolution of Arsenophonus bacteria as insect-vectored plant pathogens. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *22*, 81–90. [\[CrossRef\]](#)
- Behrmann, S.-C.; Witzcak, N.; Lang, C.; Schieler, M.; Dettweiler, A.; Kleinhenz, B.; Schwind, M.; Vilcinskas, A.; Lee, K.-Z. Biology and Rearing of an Emerging Sugar Beet Pest: The Planthopper *Pentastiridius leporinus*. *Insects* **2022**, *13*, 656. [\[CrossRef\]](#)
- Behrmann, S.-C.; Schwind, M.; Schieler, M.; Vilcinskas, A.; Martinez, O.; Lee, K.-Z.; Lang, C. Spread of bacterial and virus yellowing diseases of sugar beet in South and Central Germany from 2017–2020. *Sugar Ind.* **2021**, *146*, 476–485. [\[CrossRef\]](#)
- Bressan, A.; Holzinger, W.-E.; Nusillard, B.; Sémétey, O.; Gatineau, F.; Simonato, M.; Boudon-Padieu, E. Identification and biological traits of a planthopper from the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae) adapted to an annual cropping rotation. *Eur. J. Entomol.* **2009**, *106*, 405–413. [\[CrossRef\]](#)
- Mahillon, M.; Groux, R.; Bussereau, F.; Brodard, J.; Debonneville, C.; Demal, S.; Kellenberger, I.; Peter, M.; Steinger, T.; Schumpff, O. Virus Yellows and Syndrome “Basses Richesses” in Western Switzerland: A Dramatic 2020 Season Calls for Urgent Control Measures. *Pathogens* **2022**, *11*, 885. [\[CrossRef\]](#)
- Bressan, A.; Sémétey, O.; Nusillard, B.; Clair, D.; Boudon-Padieu, E. Insect Vectors (Hemiptera: Cixiidae) and Pathogens Associated with the Disease Syndrome “Basses Richesses” of Sugar Beet in France. *Plant Dis.* **2008**, *92*, 113–119. [\[CrossRef\]](#)
- Pfitzer, R.; Schrameyer, K.; Voegelé, R.-T.; Maier, J.; Lang, C.; Varrelmann, M. Causes and effects of the occurrence of “Syndrome Basses Richesses” in German sugar beet growing areas. *Sugar Ind.* **2019**, *145*, 70–80.
- Bressan, A.; Sémétey, O.; Ameodo, J.; Lherminier, J.; Boudon-Padieu, E. Vector transmission of a plant-pathogenic bacterium in the Arsenophonus clade sharing ecological traits with facultative insect endosymbionts. *Phytopathology* **2009**, *99*, 1289–1296. [\[CrossRef\]](#)
- Čurčić, Ž.; Stepanović, J.; Zübert, C.; Taški-Ajduković, K.; Kosovac, A.; Rekanović, E.; Kube, M.; Duduk, B. Rubbery Taproot Disease of Sugar Beet in Serbia Associated with ‘Candidatus *Phytoplasma solani*’. *Plant Dis.* **2021**, *105*, 255–263. [\[CrossRef\]](#)
- Panjan, M. Reserches sur stolbur des Solanaceae et le mode de lutte. *Plant Prot.* **1950**, *2*, 49–58.
- Maixner, M.; Ahrens, U.; Seemüller, E. Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Eur. J. Plant Pathol.* **1995**, *101*, 241–250. [\[CrossRef\]](#)
- Johannesen, J.; Lux, B.; Michel, K.; Seitz, A.; Maixner, M. Invasion biology and host specificity of the grapevine yellows disease vector *Hyalesthes obsoletus* in Europe. *Entomol. Exp. Appl.* **2008**, *126*, 217–227. [\[CrossRef\]](#)
- Carraro, L.; Ferrini, F.; Martini, M.; Ermacora, P.; Loi, N. A serious epidemic of stolbur on celery. *J. Plant Pathol.* **2008**, *90*, 131–135.
- Gaudin, J.; Sémétey, O.; Foissac, X.; Eveillard, S. Phytoplasma titer in diseased lavender is not correlated to lavender tolerance to stolbur phytoplasma. *Bull. Insectology* **2011**, *64*, 179–180.
- Mori, N.; Mitrović, J.; Smiljković, M.; Duduk, N.; Paltrinieri, S.; Bertaccini, A.; Duduk, B. *Hyalesthes obsoletus* in Serbia and its role in the epidemiology of corn reddening. *Bull. Insectology* **2013**, *66*, 245–250.
- Chuche, J.; Danet, J.-L.; Rivoal, J.-B.; Arricau-Bouvery, N.; Thiéry, D. Minor cultures as hosts for vectors of extensive crop diseases: Does *Salvia sclarea* act as a pathogen and vector reservoir for lavender decline? *J. Pest Sci.* **2018**, *91*, 145–155. [\[CrossRef\]](#)
- Jović, J.; Ember, I.; Mitrović, M.; Cvrković, T.; Krstić, O.; Krnjajić, S.; Acs, Z.; Kölber, M.; Toševski, I. Molecular detection of potato stolbur phytoplasma in Serbia. *Bull. Insectology* **2011**, *64*, 83–84.
- Mitrović, M.; Trivellone, V.; Jović, J.; Cvrković, T.; Jakovljević, M.; Kosovac, A.; Krstić, O.; Toševski, I. Potential Hemipteran vectors of “stolbur” phytoplasma in potato fields in Serbia. *Phyt. Moll.* **2015**, *5*, 49. [\[CrossRef\]](#)
- Holzinger, W.-E.; Kammerlander, I.; Nickel, H. *The Auchenorrhyncha of Central Europe. Die Zikaden Mitteleuropas: Volume 1: Fulgoromorpha, Cicadomorpha excl. Cicadellidae*; BRILL: Leiden, The Netherlands, 2003; ISBN 9789004128958.
- Simon, C.; Buckley, T.R.; Frati, F.; Stewart, J.-B.; Beckenbach, A.-T. Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **2006**, *37*, 545–579. [\[CrossRef\]](#)
- Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792–1797. [\[CrossRef\]](#)
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **1987**, *19*, 11–15.
- Munyanza, J.-E.; Henne, D.-C. Leafhopper and psyllid pests of potato. In *Insect Pests of Potato*; San Diego, A.P., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp. 65–102, ISBN 9780123868954.
- Pfitzer, R. Untersuchung zur Verbreitung und Kontrolle von SBR in Zuckerrüben. Master’s Thesis, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany, 1 February 2019.

29. Deutsch, C.A.; Tewksbury, J.J.; Tigchelaar, M.; Battisti, D.S.; Merrill, S.C.; Huey, R.B.; Naylor, R.L. Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. *Science* **2018**, *361*, 916–919. [CrossRef]
30. Danet, J.-L.; Foissac, X.; Zreik, L.; Salar, P.; Verdin, E.; Nourrisseau, J.-G.; Garnier, M. “Candidatus *Phlomobacter fragariae*” Is the Prevalent Agent of Marginal Chlorosis of Strawberry in French Production Fields and Is Transmitted by the Planthopper *Cixius wagneri* (China). *Phytopathology* **2003**, *93*, 644–649. [CrossRef]
31. Weintraub, P.G.; Beanland, L. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* **2006**, *51*, 91–111. [CrossRef]
32. Hogenhout, S.A.; Oshima, K.; Ammar, E.-D.; Kakizawa, S.; Kingdom, H.N.; Namba, S. Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* **2008**, *9*, 403–423. [CrossRef]
33. Crosslin, J.-M.; Hamlin, L.-L.; Buchman, J.-L.; Munyaneza, J.-E. Transmission of Potato Purple Top Phytoplasma to Potato Tubers and Daughter Plants. *Am. J. Potato Res.* **2011**, *88*, 339–345. [CrossRef]
34. Statistical Office of the Federal State of Rhineland-Palatinate. Utilised Agricultural Area from 1960 until 2022 for Selected Crops. Available online: <https://www.statistik.rlp.de/de/wirtschaftsbereiche/landwirtschaft/zeitreihen-land/tabelle-2/> (accessed on 5 February 2023).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Deformierte und vergilbte Herzblätter (links) und verbräunte Leitbündel (rechts) einer mit SBR befallenen Zuckerrübe (Südzucker AG, 2023).....	3
Abbildung 2. SBR-Befallsgebiete 2018 mit starkem Auftreten von SBR-Symptomen in Deutschland (Karte: Stepmap, 2019) (Pfitzer et al., 2019).....	4
Abbildung 3. Übersicht der Merkmale zur Identifikation der adulten <i>P. leporinus</i> . A Aufnahme einer männlichen (links) und weiblichen (rechts) adulten Schilf-Glasflügelzikade. B Vorderflügel hyalin, leicht bräunlich mit dunkelbraunen Adern an der Flügelspitze und dunklem Pterostigma. C Femur mit 6 Dörnchen an der Tibia und mehr als 12 Dörnchen am ersten und zweiten Tarsalglied. D Caput mit spitz zulaufenden Vertex. E Mesonotum (weiß-pudrig) mit 5 Streifen. F Hinterleib einer weiblichen Adulten mit Wachsfäden. (Witzak, 2023).....	6
Abbildung 4. Lebenszyklus der Schilf-Glasflügelzikade in der Fruchtfolge von Zuckerrüben und Winterweizen (Bressan et al., 2011).....	7
Abbildung 5. Darstellung der durchgeführten Untersuchungen in den Publikationen dieser Dissertation. Die Zuordnung zum jeweiligen Themenfeld ist farblich gekennzeichnet.....	10
Abbildung 6. Aktualisierter Lebenszyklus von in Deutschland vorkommenden <i>P. leporinus</i> anhand der Forschungsergebnisse dieser Dissertation (Publikation III).....	16
Abbildung 7. Zusammenfassung der Forschungsergebnisse aus dieser Arbeit. Die wichtigsten Ergebnisse sind unter den jeweiligen Themenfeldern zusammengefasst.....	20

Abkürzungsverzeichnis

Arsenophonus	=	<i>Candidatus</i> Arsenophonus phytopathogenicus
BMEL	=	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
COI	=	Cytochrome c Oxidase I
COII	=	Cytochrome c Oxidase II
CTAB	=	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
EntoProg	=	Entwicklung digitaler Prognosemodelle und Entscheidungshilfen im Pflanzenschutz zur Abschätzung des Befalls von Schadinsekten in Raps, Zuckerrübe und Mais, gefördert durch das BMEL
FAM	=	Phosphoramidit-Derivat des 6-Carboxyfluorescein
Fraunhofer IME	=	Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME Institutsteil Bioressourcen
LB-Medium	=	lysogeny broth-Medium
NCBI	=	National Center of Biotechnology Information
NIKIZ	=	Nachhaltiges Insekten- und Krankheitsmanagement im Zuckerrübenanbau der Zukunft, gefördert durch die Innovationspartnerschaft Landwirtschaftliche Produktivität und Nachhaltigkeit
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
rDNA	=	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
RNA	=	Ribonukleinsäure
ROX	=	5-Carboxy-Rhodamin-X
RTD	=	Rubbery Tap Root Disease
RT-qPCR	=	Realtime-quantitative PCR
SAP	=	Shrimp Alkaline Phosphatase
SBR	=	Syndrome basses richesse
SMC proteobacterium	=	Strawberry marginal chlorosis proteobacterium
SONAR	=	Sortenwahl für Nachhaltigkeit und Resilienz, gefördert durch die Innovationspartnerschaft Landwirtschaftliche Produktivität und Nachhaltigkeit
Stolbur Phytoplasmen	=	<i>Candidatus</i> phytoplasma solani
TAMRA	=	5-Carboxy-tetramethylrhodamin

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Erstgutachter und Professor Dr. Andreas Vilcinskas für die Betreuung meiner Arbeit bedanken. Es war mir eine Freude an Deinem Institut zu forschen und die großartigen Ressourcen der Justus-Liebig-Universität und des Fraunhofer Instituts IME in Gießen nutzen zu können.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Thomas Wilke für die Übernahme der Zweitbetreuung und den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission für Ihre Unterstützung.

Ich danke Dr. Richard Twyman für seine Unterstützung bei der Erstellung der Publikationen und meinen Korrekturlesern für Ihre Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Kwang-Zin Lee. Es war mir eine Freude Teil Deiner Arbeitsgruppe zu sein. Herzlichen Dank für die Unterstützung, Motivation und dass Du stets Deinen Humor bewahrt hast, auch wenn das Gewächshaus mal wieder Nerven gekostet hat. Durch unsere Zusammenarbeit konnten die tollen Ergebnisse erst erzielt und veröffentlicht werden. Ich werde stets dankbar sein, dass Du zugehört hast, wenn es wichtig war und mich bestärkt hast, wenn es notwendig war. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Christian Lang bedanken. Sie haben mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und den Kontakt zu den Landwirten ermöglicht. Ohne den heißen Draht zur Praxis, wären die großen Erkenntnisse dieser Arbeit vermutlich verborgen geblieben.

Dem Verband der hessisch-pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V., dessen Vorstand, Mitarbeitern und Mitgliedern danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Motivation an der Lösung des Problems zu arbeiten.

Ich möchte insbesondere meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Insektenbiotechnologie von ganzem Herzen danken. Vielen Dank Christina Gemmer, Jana Thiel, Natasha Witzak und Dr. Antje Steinbrink. Besonders bedanken möchte ich mich bei André Rinklef. AR, es war mir eine Freude mit Dir zu arbeiten. Ich wünsche Dir viel Erfolg für Deine Promotion.

Für die Unterstützung im Feld möchte ich allen Mitarbeitern des NIKIZ-Projektes sowie des SONAR-Projektes und den engagierten Landwirten danken. Mein besonderer Dank geht an Mareike Schwind, Anna Dettweiler, Helen Pfitzner, Manuela Schieler, David Löffler und Eva Therhaag. Darüber hinaus möchte ich mich bei Michael Lenz vom Regierungspräsidium Gießen bedanken. Vielen Dank, dass Du Deine wertvolle Erfahrung aus der Arbeit beim Pflanzenschutzdienst gerne mit mir geteilt hast.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit bedanke ich mich bei der Stiftung südwestdeutscher Zuckerrübenanbau. Ohne das Vertrauen in mich und die Übernahme des Stipendiums wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Als letztes möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Insbesondere danke ich meinem Partner Philipp Knothe sowie meinen Eltern Inge und Hans-Joachim Behrmann für die liebevolle, lücken- und bedingungslose Unterstützung.

Appendix

Beitrag zu den Publikationen

Die Arbeiten zur Erforschung der Schilf-Glasflügelzikade wurden in einem südwest-deutschen Forschungsnetzwerk aus unterschiedlichen Institutionen und Einrichtungen erstellt. Es waren Kolleginnen und Kollegen aus dem Verband der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V., der Justus-Liebig-Universität, dem Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück, der Zentralstelle der Länder für EDV-gestützte Entscheidungshilfen und Programme im Pflanzenschutz und dem Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME Institutsteil Bioressourcen beteiligt. Unten wird ein Überblick über die durchgeführten Arbeiten im Hinblick auf meine Beteiligung gegeben:

Publikation I

CL und MarS haben die Datensammlung geleitet. Ich habe die Datenauswertung vorgenommen. ManS hat die Kartierung erstellt. Ich und MarS haben das Manuskript verfasst.

Publikation II

Ich habe die Studien zusammen mit KL designt. Ich habe das System zur Zucht erarbeitet. Ich habe die Auswertung und Darstellung der Bewegung der Nymphen im Boden, die Auswertung der Abundanz, die Laborarbeiten und Auswertung der Prävalenz übernommen. Ich habe NW bei der Durchführung der Versuche zum Lebenszyklus und zur Wirtspflanzenattraktivität betreut. Ich habe NW bei der Darstellung des Lebenszyklus unterstützt. Die Feldarbeiten zur Untersuchung der Abundanz und zur Untersuchung der Nymphen wurde größtenteils durch MarS, AD und ManS übernommen. Ich habe das Manuskript mit Unterstützung von NW und KL verfasst.

Publikation III

Ich habe die Studien zusammen mit KL designt. Ich habe die Laborarbeiten mit Unterstützung von AR durchgeführt. Ich habe die Feldarbeiten mit Unterstützung des Verbandes der Hessisch-Pfälzischen Zuckerrübenanbauer e.V. und die Übertragungsversuche durchgeführt. Ich habe Datenauswertung der Abundanz, Prävalenz und Übertragungsversuche übernommen sowie die Abbildung zum Lebenszyklus erstellt. Ich habe mit Unterstützung durch AR und KL das Manuskript verfasst.