

Jan Hinrichs-Berger, Kamilla Zegermacher, Gabi Zgraja

Zum Auftreten von *Athelia rolfsii* an Apfel in Baden-Württemberg

Occurrence of *Athelia rolfsii* on apple in Baden-Wuerttemberg

245

Zusammenfassung

Im Sommer 2017 kam es in einer Apfelanlage bereits drei Monate nach der Pflanzung zu Baumausfällen. Die absterbenden Bäume wiesen eine deutliche Kragenfäule auf, aus der sich der Pilz *Athelia rolfsii* (Curzi) C. C. Tu & Kimbr. (Anamorph: *Sclerotium rolfsii* Sacc.) isolieren ließ. In einem Biotest wurde die Pathogenität des Isolats an neun *Malus* Unterlagen geprüft. Fast alle Unterlagen erwiesen sich als anfällig, wenn die Inokulation in eine Wunde erfolgte. Aus der Fäule ließ sich *A. rolfsii* re-isolieren, womit die Koch'schen Postulate erfüllt sind.

Stichwörter: *Athelia rolfsii*, *Sclerotium rolfsii*, Apfel, *Malus*

Abstract

In summer 2017, a sudden death of apple trees was observed only three months after planting. The trees showed a pronounced collar rot, from which fungi identified as *Athelia rolfsii* (Curzi) C. C. Tu & Kimbr. (anamorph: *Sclerotium rolfsii* Sacc.) were isolated. A pathogenicity test was performed on nine *Malus* rootstock cultivars. Collar rot developed in trees that were inoculated into wounds with *A. rolfsii*, but not in uninjured or mock inoculated control plants. *A. rolfsii* was re-isolated from rots fulfilling Koch's postulates.

Key words: *Athelia rolfsii*, *Sclerotium rolfsii*, apple, *Malus*

Einleitung

Im Sommer und Herbst 2017 kam es in einer Apfelanlage am Bodensee zu einem Ausfall von Bäumen (*Malus domestica* cultivar „SweeTango“ auf Unterlage „M 9“), die im Frühjahr desselben Jahres gepflanzt worden waren. Das Pflanzgut wurde von einer französischen Baumschule bezogen. Als Schadursache wurde der Pilz *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Teleomorph: *Athelia rolfsii* (Curzi) C. C. Tu & Kimbr.) identifiziert (HINRICHS-BERGER UND TRAUTMANN, 2018). Schließlich wurden 23 von 705 Bäumen auf einer Fläche von 0,14 ha aufgrund des Schaderregerbefalls gerodet.

Da *A. rolfsii* niedrige Temperaturen nur schlecht toleriert, ist das natürliche Verbreitungsgebiet dieses Pilzes auf die wärmeren Regionen der Erde beschränkt (XU et al., 2008). Wintertemperaturen unter 0°C gelten als der wichtigste limitierende Faktor, denn Myzel und Sklerotien sind nach mehreren Zyklen von Einfrieren und Auftauen nicht mehr lebensfähig (PUNJA, 1985). In Befallsgebieten kann der Pilz zu sehr hohen Verlusten führen (MULLEN, 2000; KATOR et al., 2015). Der Wirtspflanzenkreis ist mit mehr als 500 mono- und dikotylen Arten, unter denen sich zahlreiche bedeutsame Kulturpflanzen befinden, außerordentlich groß. Angaben zur Wirtsspezifität von *Athelia*-Isolaten deuten darauf hin, dass nur eine geringe Spezifität besteht (GIBSON et al., 2014). Für Apfel liegen diesbezüglich keine Informationen vor.

Über die Symptome an Apfel, den Nachweis des Pilzes und einen Pathogenitätstest wird im Folgenden berichtet.

Institut

Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg, Karlsruhe

Kontaktanschrift

Dr. Jan Hinrichs-Berger, Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg, Neßlerstraße 25, 76227 Karlsruhe, E-Mail: jan.hinrichs-berger@ltz.bwl.de

Zur Veröffentlichung angenommen

15. Juni 2018

Material und Methoden

Isolierung und Identifikation

Von den geschädigten Bäumen wurden im Bereich der Stammbasisfäule jeweils Gewebe, äußerlich sichtbares Myzel und Sklerotien entnommen. Die Explantate wurden unter sterilen Bedingungen auf die Nährmedien PDA (Potato Dextrose Agar; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA) und SNA (spezieller, nährstoffarmer Agar; NIRENBERG, 1976) gegeben und im Kühlbrutschrank bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Die sich entwickelnden Pilze wurden anhand ihrer Wachstumscharakteristika und Morphologie bestimmt.

Sequenzanalyse

Von dem Isolat, das aufgrund seiner Morphologie und Wachstumscharakteristika als *S. rolfsii* identifiziert wurde, wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) die DNA extrahiert. Ein Teilbereich des 28S rRNA-Gens wurde mit den Primern FUN28-A (5'-CCA GAG ACC GAT AGC GCA CA-3') und FUN-28B (5'-TGC GAG CCT CCA CCA GAG TT-3') in der PCR amplifiziert (MULHOLLAND und McEWAN, 2000), anschließend aufgereinigt und auf dem Sequenzer ABI Prism 310 (Life Technologie) sequenziert. Die editierte DNA-Sequenz wurde mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) des NCBI (National Center for Biotechnology Information) analysiert. Die zehn höchsten Übereinstimmungen mit den in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen sind in Tab. 1 dargestellt.

Pathogenitätstest

Das *A. rolfsii*-Isolat wurde auf PDA im Kühlbrutschrank bei 20°C im Dunkeln vermehrt. Für die Inokulation wur-

den mit Myzel und Sklerotien bewachsene Agarstücke (circa 1 cm²) vom Rand von Kulturen entnommen, die etwa zwei Wochen inkubiert worden waren.

Für den Pathogenitätstest wurden folgende zweijährigen *Malus*-Unterlagen in Containern kultiviert: „A 2“, „D 2212“, „M 4“, „M 7“, „M 9“, „M 25“, „M 27“, „MM 106“ und „MM 111“. Für die Inokulation wurde ein Agarstück je Baum an der Stammbasis mittels Parafilm fixiert. In der Variante „*A. rolfsii* mit Verletzung“ wurde die Rinde unmittelbar vor der Inokulation eines mit Myzel bewachsenen Agarstücks mit einem Skalpell verletzt. Bei der Variante „*A. rolfsii* ohne Verletzung“ wurde das Myzelbewachsene Agarstück direkt auf der unverletzten Rinde befestigt. Bei der „Scheininokulation“ wurde ein unbewachsenes Agarstück an der verletzten Stammbasis platziert. Jede der drei Varianten bestand aus drei Bäumen je Unterlage.

Die inokulierten Bäume wurden im Gewächshaus bei 30°C tagsüber und 20°C nachts unter 30 bis 70% relativer Luftfeuchte und Assimilationslicht (6 bis 22 Uhr) kultiviert.

Sechs Wochen nach Inokulation wurden alle Bäume auf Welkeerscheinungen, Stammbasis- und Wurzelfäulen bonitiert. Aus den Faulstellen wurden Gewebestücke entnommen und auf PDA im Kühlbrutschrank bei 20°C im Dunkeln inkubiert.

Ergebnisse

Im Sommer 2017 wiesen in einer Apfelanlage in Baden-Württemberg einige der im Frühjahr desselben Jahres gepflanzten Bäume trotz ausreichender Wasserversor-

Tab. 1. Ergebnisse der BLAST-Analyse der 28S rRNA des *Athelia rolfsii*-Isolats von Apfel (dargestellt sind nur die zehn höchsten Übereinstimmungen)

Beschreibung	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Athelia rolfsii</i> strain VrNY 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	981	981	99%	0.0	99%	JN543692.1
<i>Sclerotium delphinii</i> isolate 25(2) 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	976	976	99%	0.0	99%	KY172989.1
<i>Sclerotium delphinii</i> isolate IVT 17 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	966	966	99%	0.0	99%	KY172990.1
<i>Athelia rolfsii</i> strain SPL16057 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	99%	0.0	99%	KY446380.1
<i>Athelia rolfsii</i> strain SPL16023 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	99%	0.0	99%	KY446379.1
<i>Athelia rolfsii</i> strain SPL16020 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	99%	0.0	99%	KY446378.1
<i>Athelia rolfsii</i> strain SPL16011 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	99%	0.0	99%	KY446377.1
<i>Athelia rolfsii</i> strain SPL16005 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	99%	0.0	99%	KY446375.1
<i>Athelia rolfsii</i> strain SPL16001 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	99%	0.0	99%	KY446374.1
<i>Athelia rolfsii</i> strain SPL15009 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	953	953	99%	0.0	99%	KY446372.1

gung Welkesymptome auf. Im weiteren Verlauf färbten sich die Blätter braun, ohne dass es zu einem Blattfall kam. An der Baumbasis war eine Stamm-umfassende Fäule zu finden, die an die *Phytophthora*-Kragenfäule erinnerte (HINRICHS-BERGER und TRAUTMANN, 2018). Im Unterschied zur Kragenfäule war auf der Rinde und dem angrenzenden Boden ein kräftiges, sich flächig ausbreitendes, weißes Myzel zu finden, in dem kleine, hellbraune Sklerotien eingebettet waren (Abb. 1). Der Pilz ließ sich leicht isolieren und bildete sowohl auf SNA als auch auf PDA hyaline, septierte Hyphen ohne Schnallen. Eine Sporulation war nicht zu beobachten. Jedoch bildeten sich auf beiden Nährmedien, vor allem aber auf PDA, rasch in großen Mengen kleine, runde (1–2 mm Durchmesser) Sklerotien, die anfangs weiß, später beige und letztlich bräunlich waren (Abb. 2). Morphologisch wurde der Pilz als *Sclerotium rolfsii* Sacc. identifiziert, die Anamophe von *Athelia rolfsii* (Curzi) C. C. Tu & Kimbr.

Für die molekularbiologische Untersuchung wurde von dem Pilz-Isolat mit den Primern FUN28-A und FUN28-B ein 539 Nukleotide langes Fragment amplifiziert und sequenziert. In der BLAST-Analyse (Tab. 1) wies dieses Fragment die zehn höchsten Übereinstimmungen mit dem 28S rRNA-Gen von verschiedenen *A. rolfsii*-Stämmen auf. Dabei ist die Bezeichnung *Sclerotium delphinii* ein Synonym für *Sclerotium rolfsii* var. *delphinii* mit dem Teleomorph *Athelia rolfsii*. Bei dem *A. rolfsii*-Stamm VrNY (GenBank JN543692.1), das an dem Schwalbenwurz *Vincetoxicum rossicum* pathogen ist (GIBSON et al., 2014), betrug die Sequenzidentität 99,6%. Damit wurde die morphologische Bestimmung als *Athelia rolfsii* bestätigt.

Im Pathogenitätstest wiesen die Bäume der Kontrolle unabhängig von der Unterlage sechs Wochen nach Inokulation keine Stammfäule auf (Tab. 2). Die Verletzung,

die bei der Inokulation durchgeführt wurde, war komplett verheilt (Abb. 3a).

Bei der *Athelia*-Inokulation ohne Verletzung hat sich bei einer von drei Bäumen der Sorte „M 9“ mit bloßem Auge sichtbares Myzel von *A. rolfsii* auf der Rinde entwickelt (Abb. 4). Das unter dem Myzel liegende Gewebe war jedoch nicht erkennbar geschädigt. Ansonsten kam es bei dieser Inokulationsvariante zu keiner Fäule am Stamm oder zu Welkesymptomen (Abb. 3b).

Die *Athelia*-Inokulation in eine frische Rindenverletzung führte sechs Wochen nach der Inokulation bei den meisten Unterlagen zu deutlichen Stammnekrosen an der Inokulationsstelle, die sich recht schnell ausgebreitet haben und bei einigen Unterlagen Stamm umfassend wurden (Abb. 3c). Die Bäume, die durch die Nekrosen geringelt wurden, zeigten deutliche Welkesymptome und starben im weiteren Verlauf ab.

Äußerlich sichtbares Myzel war im Bereich der Nekrosen und darüber hinaus nur sehr selten zu finden. Aus den meisten Stammnekrosen war *A. rolfsii* zu re-isolieren. Lediglich bei der Unterlage „D 2212“ zeigte sich keine Nekrose und die Inokulationsverletzung verheilte vollständig (Tab. 2).

Diskussion

In größerem Umfang trat *A. rolfsii* im Jahr 2017 erstmalig an Apfel in einer Anlage in Baden-Württemberg auf. Da die Anlage erst im Frühjahr 2017 aufgepflanzt wurde, die Bäume aus einer Baumschule in einer wärmeren Region im europäischen Ausland stammten und es bereits vier Monate nach der Pflanzung zu einem Absterben der Bäume kam, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass der Schad-erreger mit dem Pflanzgut mitgeliefert wurde. Im Folgejahr kam es bislang (Stand Juni 2018) zu keinen weiteren *Athelia* bedingten Ausfällen. Das konsequente Roden befallener Bäume im Herbst 2017 in Verbindung mit



Abb. 1. Sklerotien und flächiges Myzel von *Athelia rolfsii* an Apfel-Unterlage

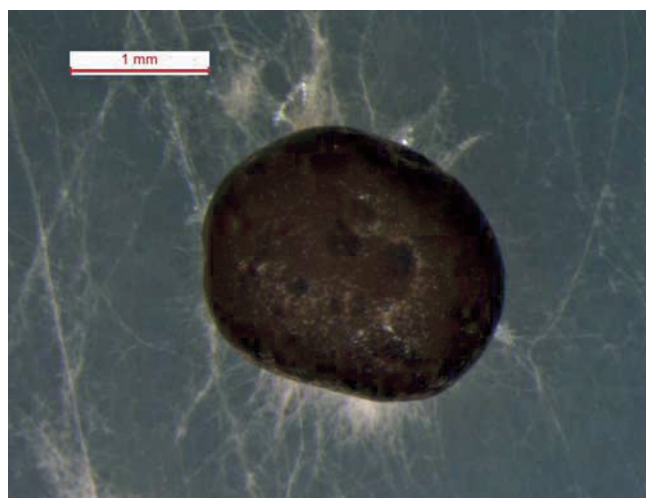


Abb. 2. Myzel und Sklerotium von *A. rolfsii* auf dem Nährmedium PDA



Abb. 3. Apfelunterlagen sechs Wochen nach Scheininokulation (a), Inokulation von *Athelia rolfsii* ohne (b) und mit (c) Verletzung. Bei dem weißlichen Belag an den Stammbasen handelt es sich um Kalkablagerungen des Gießwassers

Tab. 2. Anzahl Bäume mit Stammbasisfäule sechs Wochen nach Inokulation mit *Athelia rolfsii* beziehungsweise Scheininokulation mit oder ohne Verletzung der Rinde. Inokuliert wurden jeweils drei Bäume. Die Anzahl Bäume mit Stamm umfassender Fäule ist in Klammern angeben

Unterlage	Anzahl Bäume mit Stammbasisfäule		
	<i>A. rolfsii</i> mit Verletzung	<i>A. rolfsii</i> ohne Verletzung	Scheininokulation mit Verletzung
A 2	3 (1) *	0	0
D 2212	0	0	0
M 4	2	0	0
M 7	3 *	0	0
M 9	3 *	0 *	0
M 25	3 (3) *	0	0
M 27	3 (1) *	0	0
MM 106	2 (1) *	0	0
MM 111	3 (2) *	0	0

* *Athelia rolfsii* wurde re-isoliert



Abb. 4. Flächiges Myzel auf Rindenoberfläche nach Inokulation von *A. rolfsii* ohne Verletzung

einem Bodenaustausch und die frostigen Wintertemperaturen haben die weitere Ausbreitung wahrscheinlich gestoppt.

In einem Pathogenitätstest mit neun Apfelunterlagen erwiesen sich acht als anfällig (Tab. 2). Sie entwickelten an der Inokulationsstelle sehr schnell Stammnekrosen, die bei einigen Bäumen innerhalb von sechs Wochen Stamm umfassend wurden. Dadurch wurde der Baum geringelt, was zu einem Absterben führte.

Für eine Infektion war in dem Pathogenitätstest zwingend eine Verletzung der Rinde erforderlich. Zum Eindringen in das Wirtsgewebe scheidet *A. rolfsii* in großen Mengen Oxalsäure und Zellwand abbauende Polygalacturonasen und Cellulasen aus (PUNJA et al., 1985). Stark lignifiziertes Gewebe wie die Baumrinde stellt für diese Substanzen eine Barriere dar, so dass es vermutlich deshalb nicht zu einer Infektion gekommen ist. Auf der Rinde kann sich *A. rolfsii* lediglich saprophytisch entwickeln.

Da dafür eine sehr hohe Luftfeuchtigkeit erforderlich ist, die in dem Pathogenitätstest nicht gegeben war, war nur in einem Fall ein Pilzmyzel auf dem Baum erkennbar.

An der Unterlage „D 2212“ kam es trotz Verletzung bei der Inokulation nicht zu einer Infektion. Ob bei ihr eine Resistenz vorliegt, wäre in weiteren Versuchen mit einer größeren Anzahl an Bäumen zu klären. Allerdings sind bislang an den gängigen Wirtspflanzen keine Sorten mit einem hohen Resistenzniveau bekannt (SHARMA et al., 2006).

Es gibt eine deutlich positive Korrelation zwischen der Sklerotiendichte im Boden und dem Anteil befallener Bäume auf der Fläche. Die Infektionswahrscheinlichkeit nimmt dabei mit der Entfernung der Sklerotien von der Wirtspflanze ab, wobei Entfernungen von mehr als 3 cm nicht mehr zu einer Infektion führen (TOMASINO und CONWAY, 1987). Damit ist die Ausbreitungswahrscheinlichkeit aufgrund der höheren Pflanzdichte in einer Baumschule größer als in einer Obstanlage.

A. rolfsii ist nach unserer Erkenntnis in Deutschland noch nicht als Pathogen an Obstbäumen beschrieben. Ein Befall an Apfel wurde 2017 in der Schweiz beobachtet (PERREN, Agroscope, persönliche Mitteilung). In den USA ist er vor allem in Baumschulen an Apfel zu finden (BROWN und HENDRIX, 1980). Aus Italien und Tunesien gibt es Berichte über Ausfälle in Apfelanlagen (CORAZZA et al., 1999; KALAI-GRAMI et al., 2013).

Da es sich um einen Wärme liebenden Schaderreger handelt, ist trotz seines großen Wirtspflanzenkreises nicht von einer Etablierung in Deutschland auszugehen. Mit einem gelegentlichen Auftreten ist jedoch im Zuge des intensiven Pflanzenhandels zu rechnen.

Danksagung

Wir bedanken uns sehr herzlich bei Martin Trautmann (KOB Bavendorf) für die tatkräftige Unterstützung bei der Probennahme.

Literatur

- BROWN, E.A.II, F.F. HENDRIX, 1980: Distribution and control of *Sclerotium rolfsii* on apple. *Plant Disease* **64**, 205-206.
- CORAZZA, L., A. BELISARIO, E. FORTI, 1999: First report of root and collar rot by *Sclerotium rolfsii* on apple trees in Italy. *Plant Disease* **83**, 695.
- GIBSON, D.M., R.H. VAUGHAN, J. BIAZZO, L.R. MILBRATH, 2014: Exploring the feasibility of *Sclerotium rolfsii* VrNY as a potential bioherbicide for control of swallowworts (*Vincetoxicum* spp.). *Invasive Plant Science and Management* **7**, 320-327.
- HINRICHS-BERGER, J., M. TRAUTMANN, 2018: Die Sklerotienkrankheit des Apfels. *Obstbau* **43**, 15-17.
- KALAI-GRAMI, L., M. MNARI-HATTAB, R. TERRES, M. DRIDI, M.R. HAJLAOUI, 2013: First report of apple collar rot incited by *Sclerotium rolfsii* in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* **95**, S4. 71.
- KATOR, L., Z.Y. HOSEA, O.D. OCHE, 2015: *Sclerotium rolfsii*; causative organism of southern blight, stem rot, white mold and sclerotia rot disease. *Annals of Biological Research* **6**, 78-89.
- MULHOLLAND, V., M. MCEWAN, M., 2000: PCR-based diagnostics of *Microdochium nivale* and *Tilletia tritici* infecting winter wheat seeds. *EPP0 Bulletin* **30**, 543-547.
- MULLEN, J., 2000: Southern blight, southern stem blight, white mold. *The Plant Health Instructor*, DOI: 10.1094/PHI-I-2001-0104-01.
- NIRENBERG, H., 1976: Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem **169**, 117 S.
- PUNJA, Z.K., 1985: The biology, ecology, and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Review of Phytopathology* **23**, 97-127.
- PUNJA, Z.K., J.-S. HUANG, S.F. JENKINS, 1985: Relationship of mycelial growth and production of oxalic acid and cell wall degrading enzymes to virulence in *Sclerotium rolfsii*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **7**, 109-117.
- SHARMA, S.K., D.K. KISHORE, K.K. PRAMANICK, 2006: Utilization of indigenous crab apples for the management of foliar and soil borne diseases. *Proceedings of the national symposium on production, utilization and export of underutilized fruits with commercial potentialities*. Bidhan Chandra Krishi Viswavidyalaya, West Bengal, 205-208.
- TOMASINO, S.F., K.E. CONWAY, 1987: Spatial pattern, inoculum density-disease incidence relationship, and population dynamics of *Sclerotium rolfsii* on apple rootstock. *Plant Disease* **71**, 719-724.
- XU, Z., M.L. GLEASON, D.S. MUELLER, P.D. ESKER, C.A. BRADLEY, J.W. BUCK, D.M. BENSON, P.M. DIXON, J.E.B.A. MONTEIRO, 2008: Overwintering of *Sclerotium rolfsii* and *S. rolfsii* var. *delphinii* in different latitudes of the United States. *Plant Disease* **92**, 719-724.