# 196 | Kurzmitteilung

Julia Zugschwerdt<sup>1\*</sup>, Kamilla Zegermacher<sup>1\*</sup>, Gabriele Zgraja<sup>1\*</sup>, Gritta Schrader<sup>2</sup>, Clovis Douanla-Meli<sup>2</sup>, Jan Hinrichs-Berger<sup>1</sup>

# Diversität und Verbreitung von *Diplodia* spp. – dem Erreger des Schwarzen Rindenbrandes an Kernobst – in Deutschland

Diversity and distribution of *Diplodia* spp. – causative agent of black canker on pome fruit trees – in Germany

#### Affiliationen

- \*haben zu gleichen Teilen beigetragen
- <sup>1</sup>Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg (LTZ), Karlsruhe.
- <sup>2</sup>Julius Kühn-Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit, Braunschweig.

#### Kontaktanschrift

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

## Zusammenfassung

Der Schwarze Rindenbrand, der von Pilzen aus der Gattung *Diplodia* hervorgerufen wird, stellt eine zunehmende Bedrohung für den Kernobstanbau in Deutschland dar. Um die Verbreitung der Erkrankung im Bundesgebiet zu ermitteln, wurden in einem nicht repräsentativen Monitoring 423 Rindenproben mit verdächtigen Symptomen aus allen Bundesländern untersucht. In 62 % der untersuchten Proben waren Pilze aus der Gattung *Diplodia* zu isolieren, wobei die Art *D. bulgarica* mit 56,6 %, gefolgt von *D. seriata* mit 28,3 % das *Diplodia*-Artenspektrum dominiert haben. *D. malorum* (7,8 %), *D. mutila* (4,9 %), *D. juglandis* (1,6 %) und *D. intermedia* (0,8 %) traten dagegen relativ selten auf, wobei die beiden letztgenannten Arten Erstnachweise an Apfel in Deutschland sind.

#### Stichwörter

Schwarzer Rindenbrand, Kernobst, Apfel, Malus, Diplodia

#### **Abstract**

Black canker, caused by fungi of the genus *Diplodia*, poses an increasing threat to pome fruit production in Germany. In order to determine the spread of the disease in Germany, 423 bark samples with suspicious symptoms from all federal states were examined in a non-representative monitoring. In 62% of the samples examined, fungi of the genus *Diplodia* were isolated, with the species *D. bulgarica* dominating the *Diplodia* species spectrum with 56.6%, followed by *D. seriata* with 28.3%. *D. malorum* (7.8%), *D. mutila* (4.9%), *D. juglandis* (1.6%) and *D. intermedia* (0.8%), on the other hand, took up only a small part of the *Diplodia* species spectrum, with the latter two species being first records on apple in Germany.

## Keywords

black canker, pome fruit trees, apple, Malus, Diplodia

## Einleitung

Beim Schwarzen Rindenbrand handelt es sich um eine Erkrankung des Kernobstes, die von pilzlichen Schaderregern aus der Gattung Diplodia hervorgerufen wird. Bis Anfang der 2000er Jahre war das Auftreten des Schwarzen Rindenbrandes an Kernobst ein sporadisches Ereignis, das gelegentlich im Streuobst sowie im Haus- und Kleingarten beobachtet wurde. In den Folgejahren des Hitzesommers 2003 waren zahlreiche Bäume auf vielen Streuobstwiesen in Baden-Württemberg und Hessen betroffen, wo es *Diplodia*-bedingt zu erheblichen Baumausfällen kam (Hinrichs-Berger, 2006; Braun, 2012). Danach war der Schwarze Rindenbrand nur unterschwellig im Streuobst vorhanden bis er seit 2018 nicht nur auf Streuobstwiesen, sondern auch in ökologisch bewirtschafteten Apfelund Birnenerwerbsanlagen im Mittleren Neckarraum und in Baden massiv in Erscheinung trat und bei anfälligen Sorten (z. B. 'Novembra', 'Topaz') zur Rodung ganzer Anlagen geführt hat (Abb. 1a; Hinrichs-Berger, 2020).

Allerdings hat Ficke (1981) bereits Anfang der 1980er Jahre vor dem "Schwarzen Krebs", hervorgerufen durch *D. malorum* als "mögliche Gefahr für den Kernobstanbau" in der DDR gewarnt, obwohl er dort zu dem Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen worden war.

Der Schwarze Rindenbrand beginnt mit einer schwarzen bis dunkelbrauen Verfärbung, unter der die Rinde leicht einsinkt. Oft befinden sich Rindenrisse oder Verletzungen in der Nähe (Abb. 1b). Im weiteren Verlauf entwickeln sich auf der Rinde Warzen, die schließlich aufreißen (Abb. 1c) und schwarze, runde Fruchtkörper des Pilzes sichtbar werden lassen. In einigen Fällen löst sich danach die Borke komplett ab, sodass







Abb. 1. Der Schwarze Rindenbrand (*Diplodia* spp.) an Apfel. A) Rindenbrand-Symptome an fast allen Bäumen in einer Anlage. B) Anfangssymptome entlang Rindenriss. C) Ausgeprägtes *Diplodia*-Rindenbrandsymptom.

der Holzteil freiliegt und schlecht überwallt. Das Holz ist dann meist schwarz verfärbt und weist manchmal eine würfelartige Struktur auf, die an durch offenes Feuer verbranntes Holz erinnert. Im Stammquerschnitt ist in diesen Fällen eine sogenannte Schwarzfäule sichtbar. Wird der Rindenbrand stammumfassend, was vor allem bei jüngeren Bäumen der Fall ist, sterben die Bäume ab.

Die Gattung Diplodia ist ausgesprochen artenreich und umfasst mehr als 1.200 Arten (www.indexfungorum.org), worunter sicherlich etliche Synonyme sind. Das Wirtsspektrum der Gattung ist sehr groß und reicht von monokotylen, einjährigen wie Mais (Zea mays) bis dikotylen, ausdauernden Pflanzen wie Kiefern (Pinus spp., Farr & Rossman, 2023). An Kernobst sind bislang 16 Arten beschrieben (Farr & Rossman, 2023). Davon wurden in Baden-Württemberg bislang fünf Arten an Kernobst nachgewiesen (Zugschwerdt et al., 2021). Aufgrund der ersten Funde in Baden-Württemberg (Hinrichs-Berger et al., 2021) wurde vom Julius Kühn-Institut eine pflanzengesundheitliche Risikoanalyse durchgeführt, in der festgestellt wurde, dass eine Erhebung des Status der Verbreitung von D. bulgarica in Deutschland helfen würde, befallsfreie Gebiete zu identifizieren und damit einen Eindruck zu bekommen, wie weit die Erreger des Schwarzen Rindenbrandes in Deutschland bereits verbreitet sind, um gegebenenfalls entsprechende Vorsorgemaßnahmen für die weitere Ausbreitung des Pilzes treffen zu können (Schrader et al., 2021).

#### Material und Methoden

Das bundesweite Monitoring erfolgte in dem Zeitraum vom 25.11.2021 bis 30.09.2022. Dafür wurden Aufrufe zur Einsendung verdächtiger Pflanzenproben an die Landespflan-

zenschutzdienststellen der Bundesländer versandt sowie in Fachzeitschriften (Hinrichs-Berger, 2021a; 2021b; 2021c; Hinrichs-Berger & Zugschwerdt, 2022a; 2022b), Verbände (NABU, Hochstamm Deutschland, Bundesverband Deutscher Gartenfreunde etc.) und über das Internet (https://ltz.landwirtschaftbw.de/pb/,Lde/Startseite/Kulturpflanzen/Schwarzer+Rindenbrand?QUERYSTRING=diplodia) veröffentlicht.

Die eingehenden Proben wurden visuell unter einer Stereolupe bei 6,4- bis 40-facher Vergrößerung auf Symptome des Schwarzen Rindenbrandes untersucht. Waren dabei bereits Fruchtkörper (Pyknidien) mit den für die Gattung *Diplodia* typischen Konidien zu beobachten, wurden diese (meistens zehn Pyknidien je Probe) aus dem Gewebe präpariert und auf SNA- und PDA-Medien ohne Antibiotika-Zusatz bei 20 °C im Kühlbrutschrank unter Schwarzlicht für sieben bis 14 Tage inkubiert. Auf den genannten Medien neu gebildete Pyknidien wurden auf frische PDA-Medien transferiert und nach ein paar Tagen die sich entwickelnden Hyphenspitzen entnommen und auf frischem PDA-Medium subkultiviert (Hinrichs-Berger et al., 2021).

Bei Vorliegen von Reinkulturen wurde die DNA mittels Qiagen DNeasy Plant Pro-Kit isoliert und die ITS-Region mit den Primern ITS4/ITS5 in einer PCR amplifiziert (White et al., 1990). Die Sequenzierung erfolgte auf dem Applied Biosystems Seq Studio Genetic Analyzer (Thermo Fischer Scientific). Die ITS-Sequenzen wurden mit der Lasergene Software (DNASTAR) prozessiert und mit den in der NCBI Genbank hinterlegten Sequenzen mit der BLAST-Funktion verglichen.

Waren bei Probeneingang noch keine Pilz-Fruchtkörper zu finden, wurde die Probe in einer Feuchten Kammer bei Raumtemperatur und indirektem Tageslicht für ein bis zwei Wochen inkubiert. In den Fällen, in denen danach immer noch keine

## 198 | Kurzmitteilung

Fruchtkörper zu finden waren, wurde die Probe als nicht mit Pilzen aus der Gattung *Diplodia* befallen klassifiziert. Haben sich hingegen Fruchtkörper gebildet, wurden diese wie oben beschrieben präpariert und sequenziert.

Parallel zu den molekularbiologischen Untersuchungen wurden die sich in den Fruchtkörpern entwickelnden Konidien unter einem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung morphologisch bestimmt (Phillips et al., 2012; 2013).

#### **Ergebnisse**

Aus allen Bundesländern wurden insgesamt 423 Kernobst-Proben mit Verdacht auf einen *Diplodia*-Befall eingesandt (Tab. 1). Von diesen Proben wurden "verdächtige" Pilze auf Nährmedien isoliert. Die Artbestimmung erfolgte für jedes Isolat morphologisch und molekularbiologisch.

Als Proben wurden vor allem Rindenstücke, aber auch Äste, Triebe, Stammteile, Blätter, Früchte und Fruchtmumien eingesandt. Nachgewiesen wurden dabei Pilze aus der Gattung Diplodia an folgenden Arten: Ahorn (Acer spp.), Apfel (Malus domestica), Birne (Pyrus communis), Heidelbeere (Vaccinium myrtillus), Quitte (Cydonia oblonga) und Rote Johannisbeere (Ribes rubrum). Der größte Anteil der Einsendungen stammte von Apfelbäumen.

Bis auf Bremen, von wo allerdings auch nur eine Probe eingegangen ist, waren der Schwarze Rindenbrand und Pilze aus

der Gattung Diplodia in jedem Bundesland an Kernobst zu finden (Abb. 2). Es wurden an 261 bzw. 62 % aller eingegangenen Proben Pilze aus der Gattung Diplodia nachgewiesen (Tab. 1), wobei sechs verschiedene *Diplodia*-Arten identifiziert werden konnten. Eine Artbestimmung war bei 7 % der mit Diplodia befallenen Einsendungen auf Grund von zu wenig oder ungeeignetem Probenmaterial nicht möglich. Bei den 244 eindeutig bestimmten Diplodia-Arten hat insgesamt D. bulgarica (56,6 %) dominiert (Abb. 3), gefolgt von D. seriata (28,3 %), D. malorum (7,8 %), D. mutila (4,9 %), D. juglandis (1,6 %) und D. intermedia (0,8 %). Bei einer Probe konnten zwei Arten (D. juglandis und D. bulgarica) isoliert werden. Je Probe wurde in der Regel ein Isolat ausgewählt. Wenn sich die Isolate einer Probe morphologisch sehr unterschieden, erfolgte bei zwei Isolaten eine Artbestimmung. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich in einer Probe mehr als eine Diplodia-Art befindet, kann anhand dieser Untersuchung nicht angegeben werden.

In fast allen Bundesländern hat unter den nachgewiesenen *Diplodia*-Arten die Art *D. bulgarica* dominiert (Tab. 1), nur in den nördlichen Bundesländern (Schleswig-Holstein, Hamburg, Bremen, Mecklenburg-Vorpommern) wurde diese Art überhaupt nicht nachgewiesen. Allerdings wurden aus diesen Ländern auch nur sehr wenige Proben zur Untersuchung eingereicht.

An 163 Proben bzw. 38 % aller eingegangenen Proben waren keine *Diplodia*-typischen Fruchtkörper nachweisbar. Besonders häufig wurden bei diesen Proben stattdessen Pilze aus

Tab. 1. Übersicht der eingegangenen Proben von Kernobstbäumen

Bundesland	Probenanzahl gesamt	D. bulgarica	D. malorum	D. seriata	D. mutlia	D. juglandis	D. intermedia	D. juglandis + D. bulgarica	<i>Diplodia-</i> Art nicht bestimmbar	kein <i>Diplodia-</i> Nachweis
Baden-Württemberg	183	68	11	24	4	2		1	5	68
Bayern	19	8			1		1		2	7
Berlin	5	1	1	1						2
Brandenburg	7	3	1							3
Bremen	1									1
Hamburg	5			2					3	0
Hessen	43	21	1	7	1	1			3	9
Mecklenburg-Vorpommern	1			1						0
Niedersachsen	23	8	1	3	2					9
Nordrhein-Westfalen	22	7		5	1					9
Rheinland-Pfalz	37	9	1	16	1		1		1	8
Saarland	10	1			1				1	7
Sachsen	37	4	3	2	1				2	25
Sachsen-Anhalt	8	1		1						6
Schleswig-Holstein	7			2						5
Thüringen	16	6		5					1	4
Summe	424	137	19	69	12	3	2	1	18	163

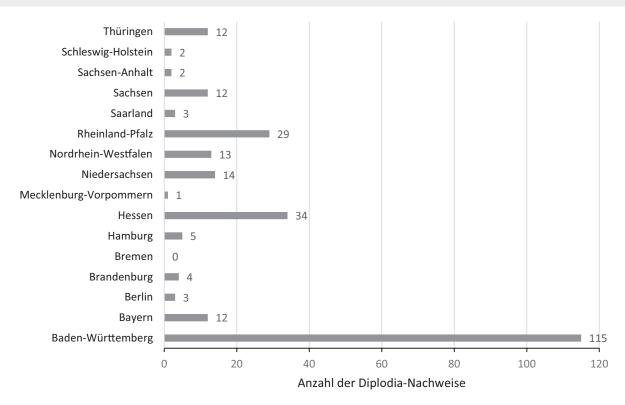


Abb. 2. Anzahl der nachweislich mit Pilzen aus der Gattung Diplodia befallenen Proben je Bundesland

den Gattungen *Phomopsis, Cytospora* und *Neofabraea* identifiziert. Darüber hinaus waren oft sogenannte Schwärzepilze aus verschiedenen Gattungen (z. B. *Cladosporium, Alternaria, Epicoccum*) auf den Proben zu finden.

#### **Diskussion**

Die Probenahme erfolgte im Allgemeinen durch die Einsender der Proben. Nur in Ausnahmefällen wurde sie vom LTZ Augustenberg vorgenommen. Daher hatte das LTZ generell keinen Einfluss auf die Art und Weise der Probenahme und auf die Auswahl der Pflanzen, von denen Proben eingesandt worden sind. Somit war die Probenahme in keiner Weise repräsentativ. Eine statistische Auswertung zur Verbreitung des Schwarzen Rindenbrandes in Deutschland ist anhand der erhobenen Daten nicht möglich. So kamen aus den einzelnen Bundesländern eine sehr unterschiedliche Anzahl von Proben (Tab. 1): beispielsweise eine Probe aus dem Flächenbundesland Mecklenburg-Vorpommern gegenüber 183 aus Baden-Württemberg. Diese unterschiedliche Verteilung spiegelt in etwa die Verbreitung der Streuobstwiesen in Deutschland wider. Auch wenn in den nördlichen Bundesländern (Bremen, Hamburg, Mecklenburg-Vorpommern, Schleswig-Holstein) bislang D. bulgarica nicht nachweisbar war, lässt sich aufgrund der geringen Probenanzahl aus diesen Ländern nicht auf eine Befallsfreiheit schließen.

In Südafrika war *D. seriata* die häufigste Art (56 % aller Isolate), die in Apfel und Birne mit Absterbeerscheinungen nachgewiesen wurden (Cloete et al., 2011). Koch et al. (2022) haben in Hessen aus sechs Apfelbäumen mit Rindenbrand-Symptomen unter anderem die *Diplodia*-Arten *D. bulgarica*, *D. malorum* und *D. seriata* isolieren können. Das sind die Arten, die auch bei der hier vorliegenden Untersuchung das Arten-

spektrum dominiert haben (Abb. 3). Darüber hinaus wurden die Arten *D. mutila* sowie *D. juglandis* und *D. intermedia* identifiziert. *D. juglandis* wurde nach unserer Literaturrecherche bisher noch nie an Apfel nachgewiesen und ein Nachweis von *D. intermedia* erfolgte nach unseren Informationen bislang nur an Apfel und Quitte in Portugal (Farr & Rossman, 2023). Sie traten nur in relativ geringem Umfang in Erscheinung.

Erstaunlich ist, dass die Art *D. bulgarica*, die 2018 erstmalig in Deutschland nachgewiesen wurde (Hinrichs-Berger et al., 2021) und deren Vorkommen bislang nur in wenigen Staaten (Bulgarien, Iran, Indien, Türkei, Serbien) beschrieben wurde (Phillips et al., 2012; Abdollahzadeh, 2015; Nabi et al., 2020; Eken, 2021; Vučković et al., 2022), nach den hier vorgelegten Erhebungen die dominierende Art in Deutschland ist. Diese Art und der Schwarze Rindenbrand insgesamt stellen eine zunehmende Bedrohung für den Kernobstanbau in Deutschland dar. So wurde diese Krankheit im vergangenen Jahr zunehmend in integriert bewirtschafteten Apfel-Anlagen im deutschen Bodenseeraum nachgewiesen und hat dort bereits zu Baumausfällen geführt (unveröffentlicht).

Aufgrund der weiten Verbreitung des Schwarzen Rindenbrandes in Deutschland erscheinen Maßnahmen, um die weitere Ausbreitung der Schaderreger zu unterbinden, weder sinnvoll noch umsetzbar.

#### **Fazit**

Der Schwarze Rindenbrand an Kernobst tritt praktisch im gesamten Bundesgebiet auf (Abb. 2), bevorzugt jedoch in Regionen, die relativ heiß und trocken sind und in denen der Streuobstbau noch eine gewisse Bedeutung hat (Baden-Württemberg, Hessen, Rheinland-Pfalz). In den norddeutschen

## 200 | Kurzmitteilung

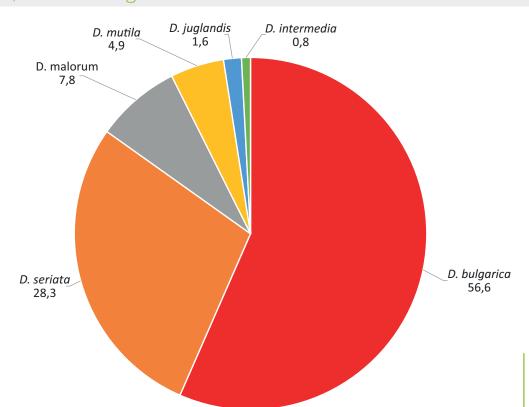


Abb. 3. Relativer Anteil (%) der *Diplodia*-Arten an den nachweislich mit *Diplodia* befallenen Proben

Bundesländern wurde er im Rahmen dieses Monitorings nur selten nachgewiesen, was an der geringen Probenanzahl aus diesen Ländern gelegen haben mag.

## **Danksagung**

Wir bedanken uns bei allen Einsenderinnen und Einsendern von Proben im Rahmen dieser Untersuchung. Die Arbeiten wurden vom Ministerium für Ernährung, Ländlichen Raum und Verbraucherschutz Baden-Württemberg und vom Julius Kühn-Institut, Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit finanziert.

# Erklärung zu Interessenskonflikten

Die Autorinnen und Autoren erklären, dass keine Interessenskonflikte vorliegen.

#### Literatur

**Abdollahzadeh, J., 2015:** *Diplodia bulgarica*, as a new pathogen and potential threat to the apple industry in Iran. Phytopathologia Mediterranea **54** (1), 128–132, DOI: 10.14601/Phytopathol Mediterr-14686.

**Braun, P., 2012:** Pilzkrankheiten bei Streuobstbäumen. Rindenbrand. Obst & Garten **131** (6), 216–218.

Cloete, M., P.H. Fourie, U. Damm, P.W. Crous, L. Mostert, 2011: Fungi associated with die-back symptoms of apple and pear trees, a possible inoculum source of grapevine trunk disease pathogens. Phytopathologia Mediterranea 50 (Supplement), S176-S190.

**Eken, C., 2021:** *Diplodia bulgarica,* a new record for Turkey. Mycotaxon **136** (3), 669–673, DOI: 10.5248/136.669.

**Farr, D.F., A.Y. Rossman, 2023:** Fungal Databases, U. S. National Fungus Collections, ARS, USDA. URL: https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/. Aufgerufen am 02.03.2023.

**Ficke, W., 1981:** Schwarzer Krebs – eine mögliche Gefahr für den Kernobstbau. Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR **35** (4), 74–75.

Hinrichs-Berger, J., 2006: Rindenkrankheiten an Obstgehölzen. Obst & Garten 125 (1), 12–17.

**Hinrichs-Berger, J., 2020:** Auf dem Sprung in Erwerbsanlagen: Der Schwarze Rindenbrand an Kernobst. Obstbau **45** (5), 286–287.

**Hinrichs-Berger, J., 2021a:** Der Schwarze Rindenbrand im Obstbau. Naturland Nachrichten (2), 26–27.

**Hinrichs-Berger, J., 2021b:** LTZ Augustenberg bittet um Unterstützung. Der Schwarze Rindenbrand. Obst & Garten **140** (3), 4.

Hinrichs-Berger, J., 2021c: Schwarzer Rindenbrand an Kernobst. Agrargewerbe intern 6 (2), 18–19.

Hinrichs-Berger, J., K. Zegermacher, G. Zgraja, 2021: First report of *Diplodia bulgarica* causing black canker on apple (*Malus domestica*) and pear (*Pyrus communis*) in Germany. New Disease Reports 43 (1), e12004, 1–3, DOI: 10.1002/ndr2.12004.

Hinrichs-Berger, J., J. Zugschwerdt, 2022a: Der Schwarze Rindenbrand an Kernobst. Obstbau 47 (1), 18.

# Kurzmitteilung | 201

**Hinrichs-Berger, J., J. Zugschwerdt, 2022b:** Der Schwarze Rindenbrand des Kernobstes. Das LTZ Augustenberg bittet um Unterstützung. Unser Garten **67** (1), 15.

Koch, E., P. Zink, A. Linkies, 2022: Isolierung und Charakterisierung von pilzlichen Erregern des Schwarzen Rindenbrandes an Apfelbäumen mit Hilfe des "Apfeltests". Journal für Kulturpflanzen 74 (07-08), 176–184, DOI: 10.5073/jfk.2022.07-08.03.

Nabi, S. U., W.H. Raja, J.I. Mir, O.C. Sharma, D.B. Singh, M.A. Sheikh, N. Yousuf, D. Kamil, 2020: First report of *Diplodia bulgarica* a new species causing canker disease of apple (*Malus domestica* Borkh) in India. Journal of Plant Pathology 102, 128, DOI: 10.1007/s42161-019-00445-w.

Phillips, A.J.L., A. Alves, J. Abdollahzadeh, B. Slippers, M.J. Wingfield, J.Z. Groenewald, P.W. Crous, 2013: The Botryos-phaeriaceae: genera and species known from culture. Studies in Mycology **76** (1), 51–167, DOI: 10.3114/sim0021.

Phillips, A.J.L., J. Lopes, J. Abdollahzadeh, S. Bobev, A. Alves, 2012: Resolving the *Diplodia* complex on apple and oth-

er Rosaceae hosts. Persoonia **29**, 29–38, DOI: 10.3767/003158512X658899.

Schrader, G., C. Douanla-Meli, E. Pfeilstetter, K. Kaminski, J. Hinrichs-Berger, 2021: Express-PRA zu *Diplodia bulgarica*. Risikoanalysen zu Pflanzenschädlingen. Julius Kühn-Institut, Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit. Online verfügbar: https://pflanzengesundheit.julius-kuehn.de/dokumente/upload/Diplodia-bulgarica\_exprPRA.pdf. Aufgerufen am 25.04.2023.

**Vučković, N., I. Vico, B. Duduk, N. Duduk, 2022:** Diversity of Botryosphaeriaceae and *Diaporthe s*pecies associated with postharvest apple fruit decay in Serbia. Phytopathology **112** (4), 929–943, DOI: 10.1094/PHYTO-07-21-0304-R.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, J. Taylor, 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 315–322.

Zugschwerdt, J., J. Brenner, K. Zegermacher, J. Hinrichs-Berger, 2021: Brandgefährlich: Schwarzer Rindenbrand an Kernobst. Julius-Kühn-Archiv 467, 255–256.