

# Diplodia-Triebsterben der Kiefer und endophytischer Nachweis des Erregers *Sphaeropsis sapinea*

Gitta Langer, Ulrich Bressemer und Michael Habermann, Göttingen

Nach starkem Fraß der Kiefernbuschhornblattwespe (*Diprion pini*) in der Letzlinger Heide (Sachsen-Anhalt, 2009) kam es 2010 zum Absterben ganzer Bestände (Abb. 1). Zusätzlich zu den Blattwespen trat das Diplodia-Triebsterben der Kiefer (Erreger: *Sphaeropsis sapinea*) auf, was die Absterbeprozesse maßgeblich verstärkt hat. Bei Untersuchungen zum Vorkommen von *S. sapinea* wurden nicht nur seine Fruchtstadien an geschädigten Kieferntrieben festgestellt. Anhand von Isolaten aus lebenden und augenscheinlich gesunden Kieferntriebabschnitten der Jahre 2008 und 2009 konnte auch nachgewiesen werden, dass *S. sapinea* endophytisch vorkommt. In den lebenden Kieferntrieben wurden weitere forstlich relevante Schlauchpilze nachgewiesen.

*S. sapinea* wurde zunächst in Europa beschrieben und ist mittlerweile weltweit verbreitet, mit bevorzugtem Vorkommen in wärmerem Klima. Massive Schäden in Kiefernplantagen sind seit längerem aus Gebieten der Südhalbkugel bekannt [2, 3, 4, 6]. In Mitteleuropa treten seit den 1980er- und 1990er-Jahren vermehrt Schäden durch *S. sapinea* besonders an Schwarzkiefer und Gemeiner Kiefer auf [14]. Wirtspflanzen sind in unseren Breiten neben der Gemeinen Kiefer zunehmend aber auch Douglasien, Tannen und ande-

re Koniferen (siehe auch Abb. 2). Der Pilz kann bei Vitalitätsverlusten seiner Wirte als Wund- und Schwächeparasit auftreten. Beobachtet wird ein Absterben diesjähriger, im Streckungswachstum befindlicher Triebe, die sich braun verfärben (Abb. 3 und 4). Befallene Triebspitzen reagieren oft mit starkem Harzfluss. Befallen werden alle Altersklassen: Kulturen, Dickungen, Stangenhölzer bis hin zu Baumhölzern.

Neben dem Triebsterben werden auch Rindenschäden, Wipfeldürre und bei sehr starker Schädigung schließlich das Abster-

Dr. G. Langer, Mykologin, ist wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung Waldschutz, Sachgebiet Mykologie und Komplexerkrankungen, bei der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt. Dr. U. Bressemer ist Leiter des Sachgebiets. Dr. M. Habermann ist Leiter der Abteilung.



**Gitta Langer**  
Gitta.Langer@nw-fva.de

ben der Bäume beobachtet. Zudem ist der Pilz ein Bläuerreger im Holz.

Besonders in warmen und trockenen Sommern kann *S. sapinea* in sonnigen Randlagen und in aufgelichteten, wärmeren Bestandteilen pathogene Eigenschaften annehmen und meist junges, noch nicht verholztes Gewebe befallen. Infektionsfördernd sind neben warmer auch feuchte Witterung während der Triebstreckungsphase (April bis Juni) sowie Verletzungen durch Hagelschlag [16] oder starken Insektenfraß (z.B. durch Blattwespen). Schon seit längerer Zeit gibt es Hinweise darauf, dass *S. sapinea* auch zunächst symptomlos im Gewebe (endophytisch) von Nadeln



Abb. 1: Absterbende Bestandesteile nach Blattwespenfraß (*Diprion pini*) und Diplodia-Triebsterben (Erreger: *Sphaeropsis sapinea*) in der Letzlinger Heide  
Foto: NW-FVA

## Diplodia-Triebsterben

**Erreger:** *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton (in: SUTTON (1980): The Coelomycetes (Kew), S. 120)

**Basionym:** *Sphaeria sapinea* Fr. (in: Syst. Mycol. (Lundae) (1823) 2(2), S. 491)

Für diesen wärmeliebenden Schlauchpilz (Ascomycota) gibt es zahlreiche Synonyme wie z.B. *Diplodia sapinea* (Fr.) Fuckel. Dieses Synonym erklärt auch den verbreiteten Namen „Diplodia-Triebsterben“ als Bezeichnung des Schadbildes an Koniferen. Es handelt sich bei dieser Pilzart um eine Nebenfruchtform (Anamorph) einer bisher unbekanntes *Botryosphaeria*-Art.

und Trieben vitaler Koniferen vorkommen kann, ohne erkennbare Schäden hervorzurufen.

### Untersuchung

Im April, Juli und September 2010 wurden in unterschiedlichen Abteilungen der Letzlinger Heide innerhalb des Blattwespenfraßgebietes des Jahres 2009 Zweigproben von Kiefern (*Pinus sylvestris*) entnommen und unterschieden nach:

- a) geschädigte, z.T. verbrauchte bis abgestorbene Zweige und
- b) augenscheinlich gesunde, grüne Zweige.

Die Zweigproben wurden mit Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die verbrauchten und abgestorbenen Triebe direkt oder nach Inkubation in einer „feuchten Kammer“ okular und lichtmikroskopisch untersucht. Der Nachweis des Pilzes *S. sapinea* erfolgte anhand seiner kugeligen, dunkelbraunen, dickwandigen, im Substrat eingebetteten, einzelnen oder zusammengewachsenen Nebenfruchtformen (*Pyknidien*). Letztere wiesen typischerweise die etwa 30 bis 45 × 10 bis 16 µm großen, dickwandigen, dunkelbraunen, einzelligen bzw. im reifen Zustand einfach septierten Konidien auf (Abb. 5 und 6).

Von den grünen Zweigproben wurden Zweigstücke der Triebjahrgänge 2008 und 2009 entnadelt und in ca. 4 cm lange Stückchen geschnitten. Je Probefläche wurden sechs Zweigstückchen in einer Plastikpetrischale im Kühlschrank aufbewahrt. In der Sterilwerkbank wurde dann jedes Zweigstückchen zur Oberflächensterilisation 1 Minute lang in 70%-igen Alkohol getaucht, anschließend zweimal in sterilem Wasser gespült und auf sterilem Filterpapier trocken getupft. Von jedem Zweigstückchen sind anschließend vier 1 bis 2 mm dünne Scheiben geschnitten worden. Danach wurden die Scheiben zur Pilzisolierung auf unterschiedliche feste Nährböden in Petrischalen übertragen. Zur Anwendung kamen: TAA (Tannina-

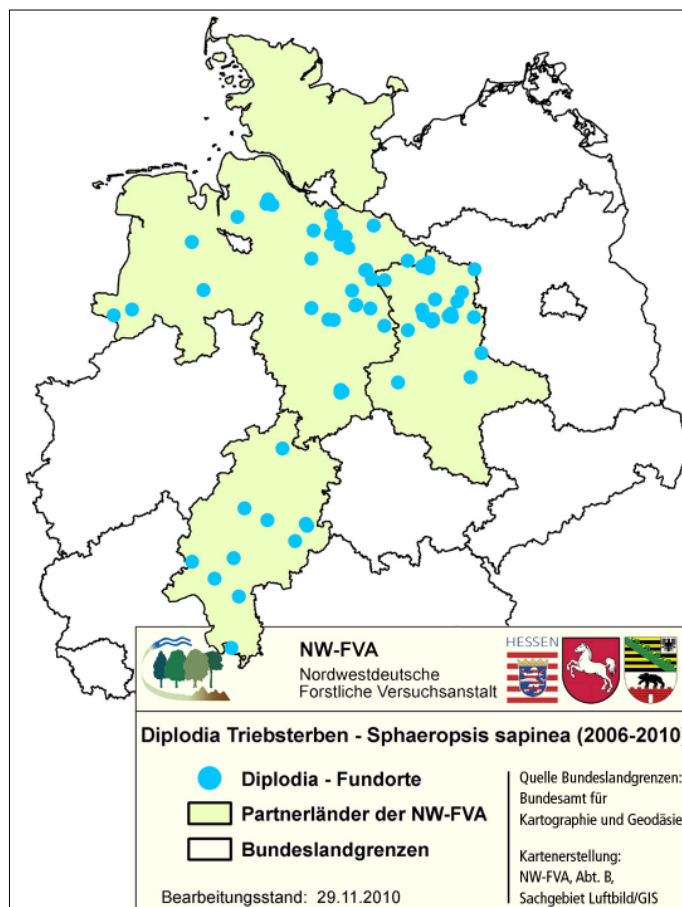


Abb. 2: Gemeldete Fundorte von *Sphaeropsis sapinea* im Zuständigkeitsbereich der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt (NW-FVA), Periode 2006 bis 2010

Tab. 1: Blattwespen-Fraßgebiete 2009 in der Letzlinger Heide, Untersuchungen in verschiedenen Abteilungen an drei Untersuchungsterminen;

- a) Nachweise von *Sphaeropsis sapinea* durch okulare, lichtmikroskopische Untersuchung an geschädigten Kiefernzweigen,
- b) Nachweise von *S. sapinea* als Endophyt in grünen Zweigen

Befunde: 0 = negativ/fehlend; 1 = positiv/vorhanden

Abteilung	Nadelverlust	a) geschädigte Zweige: okulare und lichtmikroskopische Untersuchung			b) <i>S. sapinea</i> -Nachweis als Endophyt		<i>S. sapinea</i> -Nachweis insgesamt
		Hagel-schaden	Borken-käfer	<i>S. sapinea</i>	Zweige 2008	Zweige 2009	
April 2010							
1228	10 - 100 %	1	0	0	0	0	negativ
1229	40 - 100 %	1	0	0	0	0	negativ
1232	10 - 40 %	1	0	1	1	0	positiv
1406	10 - 100 %	0	0	1	0	0	positiv
1423	70 - 100 %	1	0	1	0	0	positiv
2109	70 - 100 %	1	1	1	1	1	positiv
2120	10 - 100 %	1	1	0	0	0	negativ
2207	40 - 70 %	1	1	0	0	1	positiv
Juli 2010							
2207	40 - 70 %	1	1	1	1	1	positiv
2209	70 - 100 %	1	1	1	1	1	positiv
September 2010							
1242	70 - 100 %	0	1	0	1	0	positiv
1243	70 - 100 %	0	0	0	0	0	negativ
1248	70 - 100 %	0	0	0	1	1	positiv

Tab. 2: Blattwespen-Fraßgebiete 2009 in der Letzlinger Heide: Zusammenfassender Vergleich der *Sphaeropsis sapinea*-Nachweise in den Abt. 2207 (mittelstarke Nadelverluste) und 2109/2209 (starke Nadelverluste)

Untersuchung Letzlingen					
	Abt. 2207	Abt. 2109 / 2209			
Nadelverluste 2009	40-70 %	70-100 %			
Vorschädigung durch Hagel	ja	ja			
Borkenkäferbefall	ja	ja			
April 2010					
	Triebe 2008	Triebe 2009	Triebe 2008	Triebe 2009	
a) <i>S. sapinea</i> -Pyknidien aus geschädigten, braunen Zweigen	negativ		positiv		
b) <i>S. sapinea</i> endophytisch aus gesunden, grünen Zweigen	negativ	positiv	positiv	positiv	
Juli 2010					
a) <i>S. sapinea</i> -Pyknidien aus geschädigten, braunen Zweigen	Punkt A/1	positiv	positiv		
	Punkt 2	positiv	negativ		
	Punkt 3	positiv	positiv		
	Punkt 4	positiv	positiv		
	Punkt 5	positiv	positiv		
b) <i>S. sapinea</i> endophytisch aus gesunden, grünen Zweigen	Punkt A/1	pos. 20 %	negativ	pos. 70 %	pos. 30 %
	Punkt 2	pos. 60 %	pos. 60%	pos. 40 %	pos. 80 %
	Punkt 3	negativ	pos. 20%	pos. 40 %	pos. 40 %
	Punkt 4	negativ	negativ	pos. 80 %	pos. 60 %
	Punkt 5	pos. 20 %	negativ	pos. 20 %	pos. 20 %

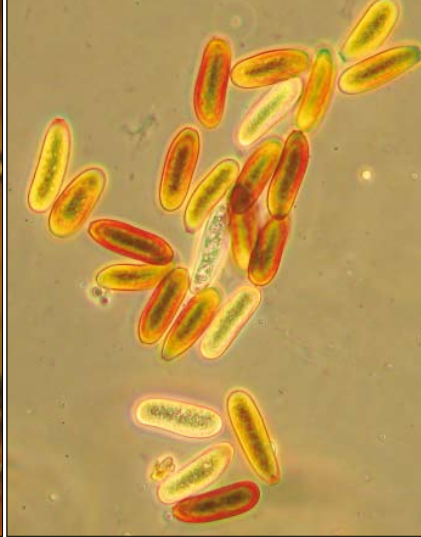
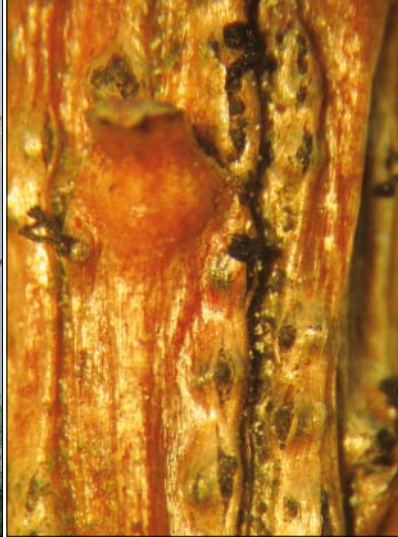


Abb. 3 und 4: Absterben diesjähriger Triebe an Gemeiner Kiefer durch Befall mit *Sphaeropsis sapinea*

Fotos: NW-FVA

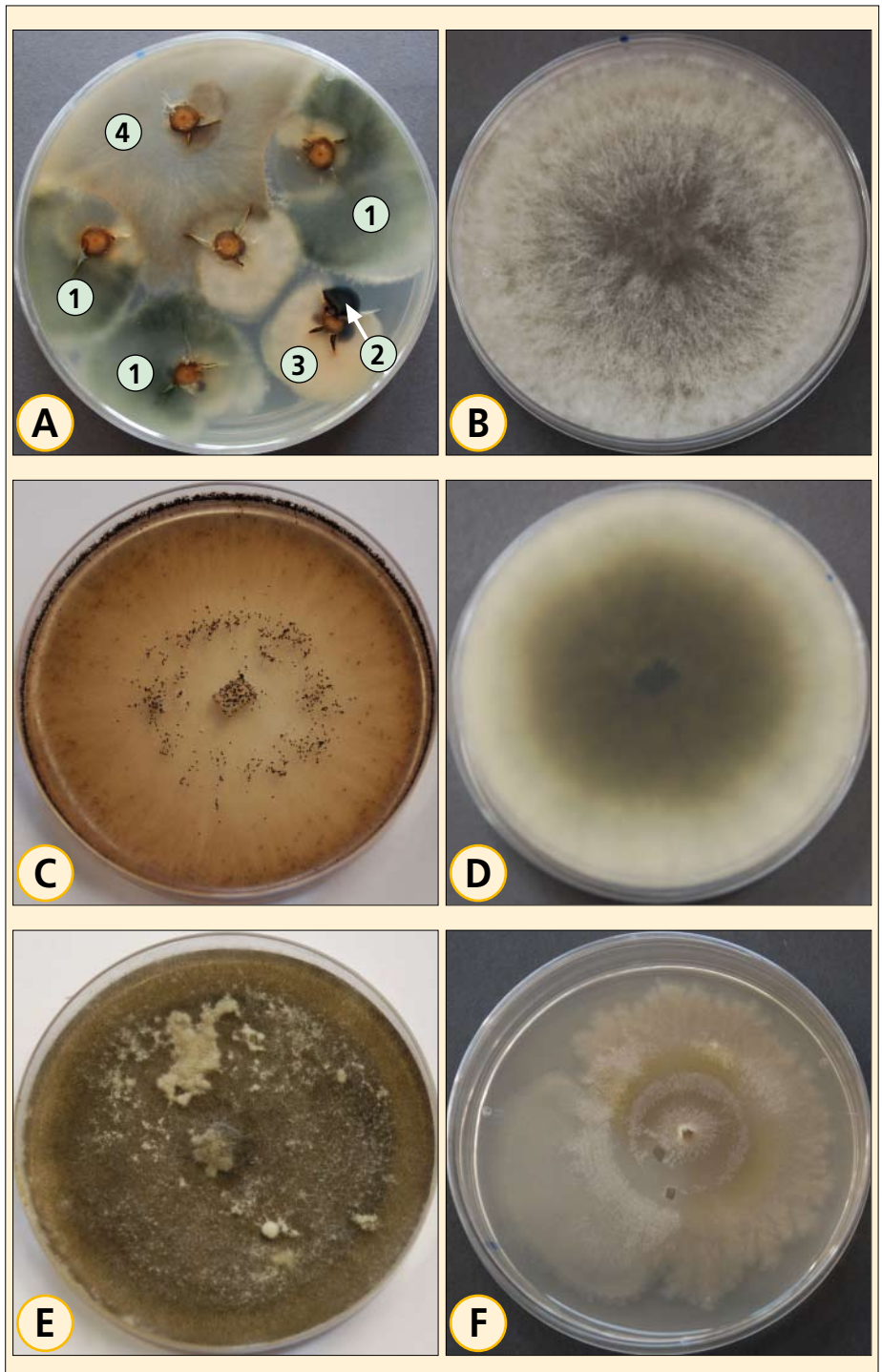
Abb. 5 und 6: Fruchtstadien (Pyknidien; links) und Konidiosporen (Sporengröße ca.: 30-45 x 10-16 µm; rechts) von *Sphaeropsis sapinea*

gar), MEA (Biomalzagar), MYP (Malt Yeast Pepton-Agar; Malz-Hefe Pepton-Agar) und ein Selektivmedium (Malzagar mit Rose Bengal und Benodanil) [verändert nach 1, 7, 15]. In den Beprobungsreihen vom Juli und September 2010 wurde ausschließlich MYP verwendet. Die Isolationsschalen wurden bei Raumtemperatur bis zu 28° C inkubiert. Die auswachsenden Pilze wurden isoliert, okular Morphotypen zugeordnet und molekular gestützt [5, 10] identifiziert.

### Ergebnisse

In sechs der zwölf untersuchten Abteilungen (Abt.) im Blattwespenfraßgebiet wurde *S. sapinea* lichtmikroskopisch nachgewiesen (Tab. 1). Daneben wurde *S. sapinea* endophytisch aus Kiefertrieben der Jahrgänge 2008 und 2009 in sechs der untersuchten Abteilungen isoliert (Tab. 1). Insgesamt wurde in acht der zwölf untersuchten Abteilungen *S. sapinea* festgestellt.

Die Abt. 2109 war so stark durch Nadelverluste (70 bis 100 %) und *Diplodia*-Triebsterben geschädigt, dass sie im Verlauf des Jahres 2010 abgetrieben wurde, bevor weitere Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Die vergleichbare und benachbarte Abt. 2209 wurde stattdessen weiter untersucht und mit einer weniger geschädigten Abteilung verglichen (Abt. 2207; Nadelverluste 40 bis 70 %; Tab. 2). In der Abt. 2209 (starker Nadelverlust) zeigte sich



► Abb. 7: A Repräsentative Kulturschale mit den ausgelegten, oberflächensterilisierten Kiefertriebscheibchen, Jahrgang 2008 aus der Abt. 2209, Isolation 2209-3\_1\_08, Reisolation 1 = *S. sapinea*; Reisolation 2 = *Hypoxyylon fragiforme*, Reisolation 3 = *Alternaria* sp., Reisolation 4 = *Sordaria fimicola*; B, D: Reisolation NW-FVA 0325, Abt. 2109\_Z8\_3-4 vom Trieb 2008 = *Sphaeropsis sapinea*, Reinkultur auf MYP, 1 Woche alt, inkubiert bei Raumtemperatur bis 28,5 °C; C: *Sordaria fimicola*; E: *Alternaria* sp.; F: *Pestalotiopsis cf. citrina*

**Tab. 3: Die häufigsten Endophyten aus Kiefernzweigen der Blattwespen-Fraßgebiete 2009 der Letzlinger Heide;**  
Befunde: 0 = negativ/fehlend; 1 = positiv/vorhanden

Abteilung	Beprobungszeit 2010	Trieb	<i>Sphaeropsis sapinea</i>	<i>Hypoxylon fragiforme</i>	<i>Alternaria sp.</i>	<i>Sordaria fimicola</i>	<i>Pestalotiopsis cf. citrina</i>	<i>Ulocladium sp.</i>
2207	Juli	2008	1	1	1	1	1	1
2207	Juli	2009	1	1	1	1	1	1
2209	Juli	2008	1	1	1	1	1	1
2209	Juli	2009	1	1	1	1	1	1
1242	Sept.	2008	1	1	0	1	1	0
1242	Sept.	2009	0	1	1	1	1	0
1243	Sept.	2008	0	1	0	1	1	0
1243	Sept.	2009	0	1	1	1	1	0
1248	Sept.	2008	1	1	1	1	1	0
1248	Sept.	2009	1	1	1	1	1	0

im Vergleich zur Abt. 2207 (mittelstarker Nadelverlust) eine stärkere endophytische Besiedlung der Triebe mit *S. sapinea*.

Zahlreiche andere Pilze wurden ebenfalls aus den oberflächensterilisierten grünen Zweigproben isoliert. Dabei waren folgende Schlauchpilze der Endophyten-gesellschaft [9, 12] der Kiefer sehr häufig (Tab. 3, Abb. 7): *Hypoxylon fragiforme* (Rötliche Kohlenbeere), *Alternaria sp.* (ein Schwärzepilz), *Sordaria fimicola*, *Pestalotiopsis cf. citrina* und *Ulocladium sp.* (ein Schwärzepilz). Kohlenbeeren-Arten, insbesondere *Hypoxylon fragiforme* als typischer Besiedler von Buchenästen, sind schon längere Zeit als Bestandteil der Endophyten-gesellschaft von Kiefer bekannt [9, 11, 12, 13, 14].

## Bewertung und Folgerungen

Mit Fraßschäden der Kieferngroßschädlinge und der Nonne ist im norddeutschen Flachland regelmäßig zu rechnen. Die Abschätzung der Gefährdung für die betroffenen Waldflächen beruht auf jahrzehntelanger Erfahrung mit diesen Insektenarten. Die schweren aktuellen Schäden, die im Wesentlichen auf die Beteiligung des *Diplodia*-Triebsterbens im Fraßgebiet der Kiefernbuschhornblattwespe zurückgeführt werden, zwingen zu einer grundsätzlichen Neubewertung der Fraßtoleranz von Kiefernbeständen. Der Pilz *Sphaeropsis sapinea* kann unter Stressbedingungen für die Kiefer als sekundäres gefährliches Pathogen eingestuft werden. Da der Pilz in Nadeln und Trieben der Kiefern auch symptomlos lebt, kann er direkt nach Schwächung des Wirtes (z.B. durch Blattwespenfraß) in eine parasitische und anschließend saprobe Phase übergehen und Nadeln, Triebe und ganze Bäume abtöten. Grundsätzlich ergibt sich daraus die dringende Notwendigkeit, über Bekämpfungs- und Schadschwellen neu nachzudenken, insbesondere für den Wirtschaftswald.

Möglicherweise hat auch der zunehmende internationale Handel zu einer Verschärfung der Lage beigetragen, denn in der südlichen Hemisphäre sind unterschiedlich aggressive Typen von *S. sapinea* bekannt [8]. Ob die Einschleppung solcher aggressiveren Pathotypen ursächlich an der aktuellen Verschärfung der Waldschutzlage in unseren Breiten beteiligt ist, kann derzeit noch nicht beurteilt werden. Herauszustreichen ist jedoch: das *Diplodia*-Triebsterben wurde im norddeutschen Tiefland in den letzten Jahren verstärkt an Kiefern und auch an Douglasien festgestellt.

## Literaturhinweise:

- [1] BLODGETT, J. T.; BONELLO, P.; STANOSZ, G. R. (2003): An effective medium for isolating *Sphaeropsis sapinea* from asymptomatic pines. *Forest Pathology*, 33. (6), S. 395-404.
- [2] BURGESS, T. I.; GORDON T. R.; WINGFIELD M. J.; WINGFIELD, B. D. (2004): Geographic isolation of *Diplodia scrobiculata* and its association with native *Pinus radiata*. *Mycol Res.*, 108 (12), S. 1399-406.
- [3] BURGESS, T.; WINGFIELD M. J.; WINGFIELD, B. D. (2001): Simple Sequence Repeat Markers Distinguish among Morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (1), S. 354-362.
- [4] CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J.; SWART, W. J. (1990): Shoot and Needle Diseases of *Pinus* spp. in South Africa. *South African Forestry Journal*, 154, S. 60-66.
- [5] DE WET, J.; BURGESS, T.; SLIPPERS, B.; PREISIG, O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. (2003): Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research*, 107 (5), S. 557-566; doi:10.1017/S0953756203007706.
- [6] DE WET, J.; WINGFIELD, B. D.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D. (2000): Characterization of *Sphaeropsis sapinea* Isolates from South Africa, Mexico, and Indonesia. *Plant Disease*, 84 (2), S. 151-156.
- [7] LANGER, G. (1994): Die Gattung *Botryobasidium* DONK (Corticaceae, Basidiomycetes). *Bibliotheca Mycologica*, Band 158, 459 S.
- [8] LEGESSE, W. B.; SLIPPERS, B.; BURGESS, T.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. (2010): Population genetic analysis of South African *Diplodia pinea* isolates reveals high levels of diversity and cryptic sex. 9th International Mycological Congress in IMC9: The Biology of Fungi, Edinburgh, Abstract [P1.92].
- [9] LIANG-DONG GUO; GUO-RUI HUANG; YU WANG (2008): Seasonal and Tissue Age Influences on Endophytic Fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (8), S. 997-1003.
- [10] National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [11] PERŠOH, D.; MELCHERA, M.; FLESSAA, F.; RAMBOLD, G. (2010): First fungal community analyses of endophytic ascomycetes associated with *Viscum album* ssp. *austriacum* and its host *Pinus sylvestris*. *Fungal Biology*, 114 (7), S. 585-596.
- [12] SIEBER, T. N.; RYS, J.; HÖLDENRIEDER, O. (1999): Mycobiota in symptomless needles of *Pinus mugo* ssp. *uncinata*. *Mycological Research*, 103 (3), S. 306-310.
- [13] SONG, R.; GAO, H. (2009): Antifungal activities and stability of extracts from culture liquid of *Hypoxylon perforatum* to *Sphaeropsis sapinea*, *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 49 (7), S. 910-917.
- [14] SWART, W. J.; WINGFIELD, M. J. (1991): Biology and Control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* Species in South Africa. *Plant Disease*, 84 (2), S. 151-156.
- [15] SWART, W. J.; WINGFIELD, M. J.; KNOX-DAVIES, P. S. (1987): Selective Medium for Isolating *Sphaeropsis sapinea*. *Phytopathology*, 77 (10), S. 1387-1389.
- [16] WANG YU; GUO LIANG-DONG (2004). Endophytic fungi II. New records from pine in China. *Mycosystema*, 23, S. 24-27.
- [17] ZWOLINSKI, J. B.; SWART, W. J.; WINGFIELD, M. J. (1990): Economic impact of a post-hail outbreak of dieback induced by *Sphaeropsis sapinea*. *European Journal of Forest Pathology*, 75 (8), S. 761-766.