PROGRESS IN PLANT PROTECTION
55 (3): 364-368, 2015
ISSN 1427-4337

DOI: 10.14199/ppp-2015-062
Published online: 28.05.2015

Received: 14.01.2015 / Accepted: 14.05.2015

Pythium myriotylum as the causal agent of sweet pepper decay in Poland

Pythium myriotylum jako przyczyna zamierania papryki w Polsce

Leszek B. Orlikowski*, Agnieszka Stępowska, Magdalena Ptaszek

Summary

Mycological analysis was conducted on 23 sweet pepper plants, collected from two farms with pepper crops growing under plastic tunnels. All analysed plants showed yellowing and wilting of leaves and necrosis of at least 50% of roots. *Pythium myriotylum* was isolated mainly from affected roots as well as from substratum. Additionally, other pathogen species, including *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum* and *F. solani* were isolated rarely or sporadically. Inoculation of root and stem parts as well as leaf petioles and leaf blades by *P. myriotylum* resulted in their fast colonization. The species colonized also cucumber and tomato plant parts. In greenhouse-test with plants growing in peat substrate inoculated by *P. myriotylum* most of them died within 5-week-growth.

Key words: *Capsicum annuum*; wilt; necrosis; *Pythium myriotylum*; colonization

Streszczenie

Przeprowadzono analizę mikologiczną 23 roślin papryki z objawami przejaśnienia liści i ich więdnięcia pobranych z dwóch gospodarstw z uprawą roślin w tunelach foliowych. Wszystkie rośliny wykazywały symptomy zgnilizny występujące na co najmniej 50% korzeni. Analiza mikologiczna porażonych korzeni wykazała najczęstsze występowanie w porażonych tkankach *Pythium myriotylum.* Gatunek ten stwierdzono również w podłożu. Rzadko lub sporadycznie izolowano *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum* i *F. solani.* Inokulacja korzeni, części łodyg, ogonków liściowych oraz blaszek liściowych papryki przez *P. myriotylum* powodowała szybką ich kolonizację. Omawiany gatunek kolonizował również organy ogórka i pomidora. W testach szklarniowych, w ciągu 5 tygodni uprawy papryki w podłożu zakażonym przez *P. myriotylum*, większość roślin zamarło.

Słowa kluczowe: papryka; więdnięcie; zgnilizna; *Pythium myriotylum*; kolonizacja

Instytut Ogrodnictwa
Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
*corresponding author: leszek.orlikowski@inhort.pl

The Polish Society of Plant Protection
The Institute of Plant Protection – National Research Institute
The Committee of Plant Protection of the Polish Academy of Science

Wstęp / Introduction

Papryka (*Capsicum annuum* L.) jest jednym z najczęściej uprawianych warzyw pod osłonami. Na efektywność jej uprawy bardzo duży wpływ ma zdrowotność rozsady oraz podłoże. Przy corocznym cyklu produkcji na tym samym stanowisku dochodzi na ogół do skażenia podłoża przez czynniki chorobotwórcze wnoszone często z rozsadą produkowaną w zanieczyszczonych mnożarkach. Niewłaściwe przygotowanie gleby do odkażania i brak w pełni skutecznych fumigantów powoduje, że pozostałe w resztkach roślinnych lub zbryleniach formy przetrwalnikowe patogenów, w obecności żywiciela szybko się rozmnażają stanowiąc zagrożenie dla systemu korzeniowego i podstawy pędu (Morris i Gow 1993). Chellemi i wsp. (2000) wyizolowali z porażonych korzeni papryki 10 gatunków *Pythium* oraz grupę tych organizmów formujących zoosporangia, ale nie tworzących organów rozmnażania płciowego. Wśród nich *P. aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *P. heliocoides* i *P. splendens* mogą powodować zahamowanie wzrostu roślin i zgniliznę korzeni. Zdaniem autorów *P. aphanidermatum* i *P. myriotylum* mogą powodować straty w uprawie papryki dochodzące do 62%. W badaniach Stirling i wsp. (2004) nad przyczynami zamierania papryki uprawianej w Australii, spośród 200 izolatów uzyskanych z porażonych korzeni i należących do 4 rodzajów, tylko *P. aphanidermatum* i *P. myriotylum* powodowały zgniliznę korzeni. Owen-Going i wsp. (2003), obok *P. aphanidermatum*, wskazują także na *P. dissotocum* jako przyczynę zamierania korzeni papryki. Z kolei Lamour i wsp. (2011) podają, że gatunek *Phytophthora capsici* wykryty po raz pierwszy na papryce chilli w Meksyku w 1818 roku, jest w Kanadzie patogenem: papryki słodkiej, pomidora, ogórka, melona, kawona, dyni, kolczocha jadalnego, fasoli, aksamitki, papai, makadamii i kakaowca. Gatunek ten występuje również na niektórych chwastach. W Kanadzie i Wielkiej Brytanii przyczyną zgnilizny owoców i łodyg papryki okazał się *Fusarium solani* (Fletcher 1994; Jarvis i wsp. 1994).

W Polsce objawy więdnięcia i zamierania występują na papryce uprawianej w tunelach foliowych od wielu lat. Chorobę stwierdzono również w 2013 roku.

Celem badań było opisanie objawów chorobowych występujących na roślinach, określenie sprawcy choroby oraz jego szkodliwości.

Materiały i metody / Materials and methods

Pobieranie prób chorych roślin i ich analiza mikologiczna

Obiektem badań była więdnąca papryka z objawami zahamowania wzrostu, przejaśnieniami i opadaniem części liści. Objawy widoczne były w drugiej połowie lata w ciepłe i słoneczne dni. W początkowym okresie rozwoju choroby, w czasie pochmurnej pogody rośliny odzyskiwały w części swój normalny wygląd. Jednakże po upływie następnych kilku–kilkunastu dni stopniowo żółkły, a liście zwisały na łodygach i częściowo zamierały. Po wykopaniu chorych roślin i umyciu systemu korzeniowego obserwowano zgniliznę występującą na co najmniej 50% korzeni głównych oraz większości korzeni włośnikowych. Po pociągnięciu głównych korzeni pozostawał po nich tylko białawy walec osiowy. Pierwsze symptomy choroby pojawiały się na roślinach, gdy były już na nich zawiązki owocowe i owoce.

Do badań pobrano jednorazowo rośliny z 2 obiektów usytuowanych w województwach – mazowieckim (16 roślin) i łódzkim (7 roślin). Z każdego z tuneli foliowych rośliny pobierano z różnych miejsc, gdzie występowały objawy więdnięcia. Papryki wraz z podłożem wkładano indywidualnie do worków foliowych i przewożono do laboratorium. Po ich opisaniu z każdej rośliny otrząsano podłoże, które następnie użyto do jego analizy pod kątem występowania patogenów glebowych. Następnie opłukiwano delikatnie system korzeniowy, który później odcinano i suszono między warstwami sterylnej bibuły filtracyjnej. Z każdej rośliny pobierano próbki porażonych korzeni o różnej grubości (po 5–7 sztuk), odkażano je przez przeciągnięcie nad płomieniem palnika i około 5 mm fragmenty wykładano na szalki Petriego o średnicy 90 mm (po 20 sztuk) z pożywką ziemniaczano-glukozową (PDA – Potato Dextrose Agar). W ciągu 72 godzin inkubacji w temperaturze 25°C wyrastające fragmenty strzępek wokół wyłożonych części korzeni, przeszczepiano na skosy z PDA. Po 7 dniach inkubacji przeprowadzono ich selekcję i wybrano kultury reprezentacyjne, które następnie oznaczano do rodzaju i gatunku na podstawie ich cech morfologicznych. Identyfikację potwierdzono sekwencjonując regiony ITS rDNA z wykorzystaniem starterów ITS5 i ITS4 (White i wsp. 1990). Uzyskane sekwencje porównywano z sekwencjami dostępnymi w bazie danych GenBank.

Analizę mikologiczną podłoża spod chorych roślin przeprowadzono stosując metodę pułapkową (Orlikowski i wsp. 2011). Około 0,5 dm^3 podłoża wsypywano do kuwet i zalewano wodą destylowaną tak, aby jej poziom utrzymywał się około 1 cm nad próbką. Następnie do każdej z kuwet wkładano po 8 liści różanecznika odmiany Nova Zembla i okrywano szczelnie folią. Po 4 dniach inkubacji w temperaturze 22–24°C liście wyjmowano, opłukiwano pod wodą wodociągową i określano na nich liczbę nekrotycznych plam. Po ich odkażeniu, około 5 mm skrawki nekrotycznych plam wykładano na szalki z pożywką PDA. Dalszy sposób postępowania był podobny, jak przy analizie mikologicznej korzeni.

Ocena chorobotwórczości *Pythium myriotylum*

Ocenę chorobotwórczości przeprowadzono głównie na organach papryki oraz na ogórkach i pomidorach stosując metodę opisaną przez Orlikowskiego i Szkutę (2001). Części korzeni, łodyg, ogonki i blaszki liściowe wykładano do kuwet wyłożonych wilgotną, sterylną bibułą filtracyjną, przykrytą cienką siatką nylonową. Na inokulowane organy nanoszono następnie 3 mm krążki pożywki PDA przerośnięte strzępkami patogena, pobrane z 7-dniowych kultur *P. myriotylum*. Kuwety okrywano szczelnie folią i inkubowano w temperaturze 22–24°C na stołach laboratoryjnych. Po 3 i 5 dniach mierzono długość lub średnicę nekrozy.

W doświadczeniu szklarniowym siewki papryki o wysokości około 70 mm sadzono do doniczek o pojemności

0,6 dm^3 napełnionych substratem torfowym zakażonym przez *P. myriotylum* zgodnie z metodyką opisaną przez Orlikowskiego (1999) i ustawiono na parapecie w szklarni. Rośliny kontrolne uprawiano w substracie wolnym od *P. myriotylum*. W ciągu 5-tygodniowego okresu wzrostu w temperaturze 19–26°C obserwowano zdrowotność rozsady.

Doświadczenia laboratoryjne założono w układzie całkowicie losowym, a szklarniowe w układzie bloków losowanych, w 4 powtórzeniach po 5 fragmentów roślin lub siewek i powtórzono 2-krotnie w odstępie 2-tygodniowym. Wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Istotność różnic pomiędzy średnimi (α = 0,05) oceniono testem Duncana.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Z wyłożonych korzeni uzyskano 116 izolatów, spośród których 53 oznaczono jako *P. myriotylum* Drechsler (tab. 1). Gatunek ten uzyskano z większości analizowanych roślin pochodzących z pierwszego gospodarstwa i ze wszystkich chorych papryk z drugiego gospodarstwa. Wśród pozostałych izolatów stwierdzono *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Clonostachys rosea*, *Fusarium avenaceum* i *F. solani* oraz przedstawicieli rodzajów *Mucor* i *Trichoderma* (tab. 1). Stosując pułapki z liści różanecznika, we wszystkich analizowanych próbach podłoża stwierdzono występowanie *P. myriotylum*. W zależności od próby podłoża liczba nekrotycznych plam na liść pułapkowy wahała się od 5 do 24. Sporadycznie stwierdzano również *F. solani*.

Biorąc pod uwagę częstotliwość izolacji mikroorganizmów z porażonych korzeni, do testów nad chorobotwórczością wybrano *F. solani* i *P. myriotylum*. Pierwszy z gatunków powodował bardzo powolny rozwój nekrozy na zainokulowanych korzeniach w przeciwieństwie do drugiego z gatunków i stąd wyłączono go z dalszych badań.

Badania chorobotwórczości *P. myriotylum* w stosunku do papryki wykazały kolonizację przez ten gatunek wszystkich analizowanych organów. Objawy widoczne były już po 3 dniach od inokulacji z istotnie najszybszym rozwojem zgnilizny na blaszkach i ogonkach liściowych, a najwolniejszym na korzeniach (tab. 2). Po następnych 2 dniach badany gatunek kolonizował istotnie najszybciej blaszki (rozwój około 13 mm/dobę), a następnie ogonki liściowe. Stwierdzono, że badany gatunek kolonizował korzenie około 9 mm/dobę. Najwolniej nekroza rozwijała się na częściach łodyg (tab. 2).

Analizowany gatunek kolonizował również korzenie, łodygi i liście ogórka i pomidora (tab. 3). Nekroza rozwijała się wolniej na zainokulowanych korzeniach i łodygach ogórka aniżeli pomidora (tab. 3). W przypadku blaszek liściowych, wielkości nekrotycznych plam na ogórku i pomidorze były niemalże takie same (tab. 3).

Tabela 1. Grzyby i organizmy grzybopodobne wyizolowane z korzeni papryki z objawami zgnilizny; liczba roślin, z których izolowano mikroorganizmy (a) i liczba uzyskanych izolatów (b)
Table 1. Fungi and fungal-like organisms isolated from rotted roots of sweet paper; number of plants affected by microorganisms (a) and number of obtained isolates (b)

Rodzaj/gatunek Genera/species	Gospodarstwa – Farms			
	I (16 roślin – plants)		II (7 roślin – plants)	
	a	b	a	b
Alternaria alternata Nees	3	7	–	–
Botrytis cinerea Pers.	4	11	1	3
Clonostachys rosea (Link) Schroers. Samuels, Seifert & W. Gams	2	3	–	–
Fusarium avenaceum (Cda) Sacc.	3	5	2	4
Fusarium solani (Mart.) Sny. et Hans.	4	6	1	3
Mucor spp.	4	6	3	5
Pythium myriotylum Drechsler	14	38	7	15
Trichoderma spp.	3	5	2	5

Tabela 2. Kolonizacja organów papryki przez *Pythium myriotylum*; długość/średnica nekrozy [mm]
Table 2. Colonisation of sweet pepper plants parts by *Pythium myriotylum*; length/diameter of necrosis [mm]

Organy rośliny Plant parts	Dni inkubacji – Incubation days	
	3	5
Korzenie – Roots	5,2 a	43,2 b
Części łodyg – Stem parts	9,9 b	33,0 a
Ogonki liściowe – Leaf petioles	20,3 c	46,0 b
Liście – Leaves	36,8 d	63,8 c

Średnie w kolumnach, oznaczone tę samą literą, nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncana
Means in columns, followed by the same letter, do not differ according to Duncan's multiple range test

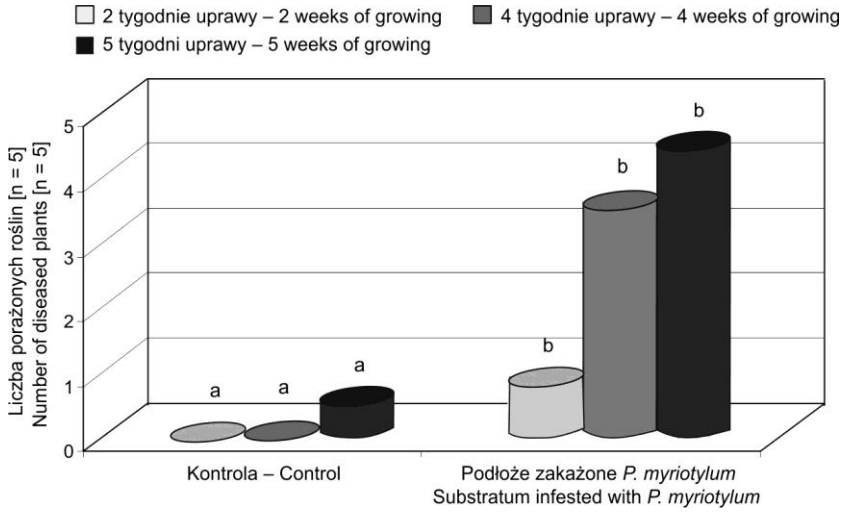
Tabela 3. Kolonizacja organów pomidora i ogórka przez *Pythium myriotylum* po 5 dniach od inokulacji
Table 3. Colonisation of plant parts of cucumber and tomato by *Pythium myriotylum* 5 days after inoculation

Organy roślin Part of plant	Ogórek Cucumber	Pomidor Tomato
Korzenie – Roots	3,8 a	10,8 b
Części łodyg – Stem parts	2,4 a	5,7 b
Liście – Leaves	10,4 a	10,1 a

Średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncana
Means in columns, followed by the same letter, do not differ according to Duncan's multiple range test

W doświadczeniu szklarniowym z produkcją rozsady papryki w substracie torfowym, zakażonym przez *P. myriotylum*, gatunek ten powodował stopniowy rozwój choroby na roślinach. W podłożu zakażonym rozwój roślin był bardzo silnie hamowany, gdyż nie stwierdzono przyrostu pędów, a ich liście były jaśniejsze. W ciągu 2 tygodni część blaszek zmieniło zabarwienie na żółtozielone, a następnie jasnobrązowe. Pierwsze symptomy więdnięcia stwierdzono na około 1/5 roślin po 2 tygodniach uprawy (rys. 1). Po następnych 14 dniach objawy więdnięcia i załamywania się pędów u nasady widoczne były na około 3/5 roślin. Po 5 tygodniach 4/5 roślin zamarło lub wykazywało symptomy więdnięcia (rys. 1). U nasady pędów niektórych siewek widoczne były białawe strzępki *P. myriotylum*. Z porażonych tkanek podstawy pędów chorych roślin reizolowano *P. myriotylum.*

Przeprowadzona analiza więdnącej papryki wykazała występowanie na zamierających korzeniach *P. myriotylum* jako dominującego gatunku w 2 analizowanych gospodarstwach. Inne gatunki występowały rzadko lub sporadycznie stąd nie zajmowano się nimi w dalszych badaniach. Uzyskane wyniki nad rozwojem zgnilizny korzeni na papryce potwierdzają dane uzyskane przez Stirlinga i wsp. (2004), którzy wykazali, że objawy zmiany zabarwienia liści i więdnięcia papryki pojawiają się wówczas, gdy na roślinie pojawiają się zawiązki owoców i sporadycznie dojrzałe już owoce. W badaniach własnych, pobierane do badań rośliny miały jasnozielone, więdnące liście i część wykształconych już owoców. Zarówno Chellemi i wsp. (2000), jak i Stirling i wsp. (2004) wskazują na gatunek *P. myriotylum*, obok *P. aphanidermatum* i *P. dissotocum*, jako jednego z najgroźniejszych patogenów papryki. Kolonizują one korzenie włośnikowe i stopniowo rozszerzają się na starsze ich partie. W badaniach autorów liczba porażonych korzeni wahała się od kilku do 94% i była związana z ich szybką kolonizacją przez *P. myriotylum*. W niniejszych badaniach w ciągu 5 dni gatunek *P. myriotylum* powodował rozwój zgnilizny średnio na długości około 8 mm korzenia przy inkubacji w temperaturze około 23°C. W temperaturze optymalnej dla rozwoju tego patogenu, tj. około 35°C proces ten przebiega znacznie szybciej (Stirling i wsp. 2004). W badaniach Chellemi i wsp. (2000) największe ograniczenie rozwoju papryki stwierdzono w temperaturze 28°C. Dane uzyskane nad kolonizacją innych organów papryki przez badany gatunek wskazują, że więdnące, opadające na podłoże liście papryki mogą być równie szybko kolonizowane jak korzenie, co może sprzyjać wzrostowi



Średnie w słupkach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie (5%) według testu Duncana
Means in columns, followed by the same letter, do not differ according to Duncan's multiple range test

Rys. 1. Wpływ okresu uprawy na rozwój zgnilizny korzeni rozsady papryki powodowanej przez *Pythium myriotylum*
Fig. 1. Influence of growing period on the development of root rot of sweet pepper seedlings caused by *Pythium myriotylum*

liczebności patogenu w podłożu. W ślad za rozwojem zgnilizny korzeni dochodzi do zahamowania wzrostu roślin. Według wymienionych badaczy biomasa roślin porażonych przez *P. myriotylum* spadała od 84 do 95%. Potwierdzają to wyniki badań własnych wskazujące na brak przyrostu papryki posadzonej do zakażonego podłoża. Badania McCarter i Littrell (1970) oraz Robertsa i Ursa (1999) wykazały chorobotwórczość *P. myriotylum* dla pomidorów. Patogen kolonizował korzenie tych roślin, jak również powodował objawy na łodygach i liściach. Potwierdzają to również wyniki uzyskane z badań własnych. Wykazano, że obok pomidorów, gatunek ten kolonizował również tkanki ogórka, ale zgnilizna rozwijała się kilkukrotnie wolniej niż na organach papryki. Uprawa tych roślin w płodozmianie z papryką może utrzymywać wysoki poziom populacji *P. myriotylum* w podłożu. Niniejsze wyniki są pierwszymi w kraju wskazującymi na *P. myriotylum* jako jednego z najgroźniejszych patogenów papryki uprawianej pod osłonami.

Wnioski / Conclusions

1. Wśród izolatów grzybów i organizmów grzybopodobnych, wyizolowanych z porażonych korzeni papryki, dominował gatunek *P. myriotylum*.
2. Inokulacja korzeni, części łodyg i liści papryki przez *P. myriotylum* powodowała szybką kolonizację tych organów.
3. W doświadczeniach szklarniowych *P. myriotylum* powodował hamowanie rozwoju roślin, a następnie zmianę zabarwienia liści i zgniliznę podstawy pędu.
4. Uzyskane dane wskazują na *P. myriotylum* jako najgroźniejszego patogena papryki w uprawie tej rośliny pod osłonami.

Literatura / References

Chellemi D.O., Mitchell D.J., Kannwischer-Mitchell M.E., Rayside P.A., Rosskopf E.N. 2000. *Pythium* spp. associated with bell pepper production in Florida. Plant Disease 84 (12): 1271–1274.

Fletcher J.T. 1994. Fusarium stem and fruit rot of sweet pepper in the glasshouse. Plant Pathology 43: 225–227.

Jarvis W.R., Khosla S.K., Barrie S.D. 1994. Fusarium stem and root rot of sweet pepper in Ontario greenhouses. Canadian Plant Disease Survey 74 (2): 131–134.

Lamour K.H., Stam R., Jupe J., Huitema E. 2011. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. Molecular Plant Pathology 13 (4): 329–337.

McCarter S.M., Littrell R.H. 1970. Comparative pathogenicity of *Pythium aphanidermatum* and *Pythium myriotylum* to twelve plant species and intraspecific variation in virulence. Phytopathology 60: 264–268.

Morris P.F., Gow N.A.R. 1993. Mechanism of electrotaxis of zoospores of phytopathogenic fungi. Phytopathology 83: 877–882.

Orlikowski L.B. 1999. Selective medium for the evaluation of biocontrol agent efficacy in the control of soil-borne pathogens. Bulletin of the Polish Academy of Sciences 47 (2–4): 167–172.

Orlikowski L.B., Ptaszek M., Trzewik A., Orlikowska T. 2011. Przydatność pułapek liściowych do detekcji *Phytophthora* z wody. Sylwan 155 (7): 493–499.

Orlikowski L.B., Szkuta G. 2001. Dieback of *Pieris japonica* caused by *Phytophthora citrophthora*. Acta Mycologica 36 (2): 251–256.

Owen-Going N., Sutton J.C., Grodzinski B. 2003. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. Canadian Journal of Plant Pathology 25 (2): 155–167.

Roberts P.D., Urs R. 1999. First report of aerial blight caused by *Pyhtium myriotylum* on tomato in Florida. Plant Disease 83 (3), p. 301.

Stirling G.R., Eden L.M., Ashley M.G. 2004. Sudden wilt of capsicum in tropical and subtropical Australia: a severe form of Pythium root rot exacerbated by high soil temperatures. Australasian Plant Pathology 33: 357–366.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p. 315–322. In: "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, eds.). Academic Press, San Diego, California, USA.