

## MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE IZOLATA *COLLETOTRICHUM* SPP. - PROUZROKOVAČA ANTRAKNOZE

SVETLANA ŽIVKOVIĆ<sup>1</sup>, SAŠA STOJANOVIĆ<sup>1</sup>, JELICA BALAŽ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

<sup>2</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad  
e-mail: zivkovicsvetla@gmail.com

### REZIME

U morfološka ispitivanja su uključeni izolati *Colletotrichum* spp. poreklom sa plodova kruške, jabuke i višnje, kao i referentni sojevi *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Proučavanjem njihovih morfoloških karakteristika, dobijeni su podaci o izgledu ispitivanih kolonija, odlikama plodonosnog tela, apresorija, veličini i obliku konidija. Na podlozi KDA moguće je razlikovati četiri morfološke grupe kolonija, što potvrđuje fenotipsku varijabilnost proučavanih izolata *Colletotrichum* spp. Većina izolata sa ploda kruške i jabuke (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-7, JC-9) obrazuje prvu morfološku grupu. Izolati sa ploda višnje (VC-3, VC-5, VC-7, VC-9), su izdvojeni u četvrtu morfološku grupu. Veličina i oblik konidija ovih izolata odgovara opisu vrste *C. gloeosporioides*. Hromogeni izolati sa kruške (KC-21, KC-23, KC-82), obrazuju drugu morfološku grupu, a u trećoj morfološkoj grupi je izolat sa ploda jabuke (JC-4). Morfologija konidija ovih izolata odgovara opisu vrste *C. acutatum*. Tokom ovih istraživanja je utvrđeno da svi izolati obrazuju plodonosna tela - acervule. Testirane kulture *Colletotrichum* spp. ne formiraju teleomorfni stadijum. Zbog izražene varijabilnosti, većina ispitanih osobina ne mogu se primeni kao samostalni taksonomski kriterijum. Na osnovu dobijenih rezultata, za klasifikaciju vrsta roda *Colletotrichum*, potrebno je koristiti najmanje dva taksonomska kriterijuma: morfološke karakteristike uporedo sa molekularnom identifikacijom.

**Cljučne reči:** morfologija, antraknoza, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*

### UVOD

Gljive roda *Colletotrichum* - prouzrokovači antraknoze, su kosmopolitske i izrazito agresivne vrste. U zemljama subtropske i tropske klimatske zone mogu prouzrokovati značajne gubitke na velikom broju poljoprivrednih kultura u toku vegetacije, dok su u umerenom klimatskom području pre svega uzročnici truleži i propadanja uskladištenih plodova voća i povrća (Freeman et al., 1998).

Dve ekonomski najznačajnije, i u literaturi svakako najzastupljenije vrste ovog roda su *Colletotrichum gloeosporioides* i *Colletotrichum acutatum*. Do polovine XX veka za vrstu *C. gloeosporioides* je postojao veliki broj sinonima (von Arx, 1957). Varijabilnost *C. gloeosporioides* je uočio i Simmonds (1965), pa je na osnovu izgleda i biometričkih vred-

nosti konidija izvršio prvu podelu na: *C. gloeosporioides* var. *gloeosporioides* i *C. gloeosporioides* var. *minor*. Zbog postojanja velikog broja populacija i raznolikosti morfoloških karaktera, Sutton (1980) je *C. gloeosporioides* označio kao zbirnu vrstu. Ekstremna varijabilnost *C. gloeosporioides* uočena je i od strane drugih autora (Mordue, 1971; Baxter et al., 1983), po kojima se specijalizovane forme mogu razlikovati isključivo kombinovanjem morfoloških, patogenih i odgajivačkih osobina. Analiza DNA sekvenci (rDNA-ITS regiona,  $\beta$ -tubulin gena i gliceraldehid-3fosfat-dehidrogenaza - GDPH gena) omogućila je razdvajanje mnogobrojnih biotipova, varijeteta i *forma specialis* u okviru heterogene vrste (Cannon et al., 2008).

*C. acutatum*, drugu široko rasprostranjenu i izuzetno značajnu vrstu roda *Colletotrichum*, prvi je

pod ovim nazivom opisao Simmonds (1965). Međutim, prema literaturnim podacima najstariji validni naziv vrste *C. acutatum* je *C. fructigenum* (Berk.) Vassilj. Veći broj autora (Southwort, 1891; Stone-man, 1898; Wollenweber and Hochapfel, 1949; Boh-ni, 1949; *loc. cit.* Baxter et al., 1983) su krajem XIX i u prvoj polovini XX veka ustanovili postojanje glji-va - prouzrokovala truleži ploda, za koje je kasnije utvrđeno da pripadaju ovoj vrsti. Gorter je opisao *C. fructigenum* f. sp. *chromogenum* odvajajući je od *C. gloeosporioides* na osnovu vretenastih i na vrhovi-ma zašiljenih konidija, ružičasto obojene kulture, i činjenice da ova vrsta ne formira teleomorfni stadi-jum (Gorter, 1962; *loc. cit.* Baxter et al., 1983). Zbog izrazite heterogenosti i oučenih specifičnosti obav-ljena je diferencijacija *C. acutatum*. Izdvojene su dve specijalizovane forme patogena: *C. acutatum* f. sp. *chromogenum*, na osnovu produkcije karakteristič-nog crveno-ružičastog pigmeta u kulturi (Baxter et al., 1983) i *C. acutatum* f. sp. *pineum*, zbog ispolje-ne patogenosti prema biljkama roda *Pinus* (Dingley and Gilmour, 1972; *log. cit.* Sutton, 1992). Morfološka varijabilnost i genetički diverzitet ove vrste su po-tvrđeni i molekularnim analizama (ap PCR, RFLP). U okviru *C. acutatum* je ustanovljen veliki broj po-dgrupa i sojeva, pa se ona u literaturnim navodima definiše "u širem smislu" kao zbirna - *C. acutatum sensu lato* (Guerber et al., 2003).

S obzirom na ekonomski značaj roda *Colle-totrichum* i činjenice da u našoj zemlji nema poda-taka o komparativnim ispitivanjima ovih patogena poreklom sa različitih domaćina, cilj istraživanja je morfološka karakterizacija izolata sa antraknoznih plodova kruške, jabuke i višnje. U poređnim prouča-vanjem morfoloških osobina dobiće se uvid u tak-sonomsku pripadnost gljiva *Colletotrichum* spp. i postojeću mikofloru antraknoznih plodova voća.

## MATERIJAL I METODE

Standardnim fitopatološkim metodama iz plodova voća sa karakterističnim simptomima an-traknoze dobijen je veliki broj izolata *Colletotri-chum* spp. U morfološka ispitivanja su uključeni: izolati sa ploda kruške (KC-6, KC-9, KC-12, KC-21, KC-23 i KC-82); jabuke (JC-4, JC-5, JC-6 i JC-7); viš-nje (VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9), kao referentni sojevi *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) i *C. acutatum* (CBS 294.67) iz kolekcije Centraalbureau voor Schimmel-cultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Hol-landija.

Morfološke karakteristike vegetativnih i re-produktivnih organa reprezentativnih izolata *Colle-totrichum* spp., proučavane su u uslovima *in vivo* i

*in vitro*, prema kriterijumima Baxter et al. (1983). Merenja i fotografisanja reproduktivnih organa glji-va obavljena su na scanning elektronskom mikro-skopu i mikroskopu Olympus BX51 (uvećanja x40 i x100).

### Morfolologija vegetativnih organa

Proučavanje morfolologije vegetativnih organa obuhvatilo je praćenje razvoja i ocenu fenotipskih karakteristika *Colletotrichum* spp. (izgled, boja, zo-niranost lica i naličja kulture) na krompir dekstro-znoj agaru (KDA), kao i ispitivanje mikroskopskih osobina micelije pravljenjem privremenih prepara-ta.

### Morfolologija reproduktivnih organa

Ispitivanje morfoloških osobina reproduktiv-nih organa podrazumevalo je: praćenje formiranja plodonosnog tela gljive; prisustvo/odsustvo seta; način obrazovanja i veličinu konidiofora i konidio-genih ćelija; boju, oblik, dimenzije i morfologiju kli-janja konidija; oblik, strukturu i veličinu apresorija i obrazovanje teleomorfno stadijuma gljive.

### Morfolologija plodonosnog tela i prisustvo/odsustvo seta

Od morfoloških karakteristika plodonosnog tela, proučavani su izgled, dimenzije i način njihovog formiranja na prirodnom supstratu (veštački inokulisanim plodovima), kao i na kulturama gaje-ninim na KDA, sintetičkoj hranljivoj podlozi sa filter papirom (SNA), podlozi sa fragmentima kore jabuke (JKA) i podlozi sa fragmentima kore pomorandže (PMA), (Baxter et al., 1983). Biometrijske vrednosti konidiomate su dobijene merenjem njihovog preč-nika (po 20 acervula sa plodova i hranljivih podlo-ga).

Prisustvo/odsustvo seta je određeno prema metodi Smith and Black (1990), mikroskopiranjem kultura odabranih izolata starosti 15 dana, odgaje-nih na KDA, u termostatu na temperaturi od 25°C. Obrazovanje seta na veštački inokulisanom biljnom materijalu obavljeno je mikroskopskim pregledom epidermalne površine nekrotičnih pega.

### Morfolologija konidiofora i konidiogenih ćelija

Mikroskopskim pregledom privremenih pre-parata utvrđena je morfolologija konidiofora i konidi-ogenih ćelija: oblik, veličina, boja i način njihovog formiranja.

## Morfologija konidija

Konidije su uzete sa kultura starosti 15 dana, odgajenih na KDA i temperaturi od 25°C. Na osnovu kriterijuma Smith and Black (1990) ispitivani su: boja konidija je određena posmatranjem mase konidija na beloj keramičkoj podlozi; oblik konidija je utvrđen mikroskopskim pregledom preparata. Konidije su svrstane u dve kategorije: (1) vretenaste (fusiformne), zaoštrene na oba kraja; i (2) cilindrične, zaoštrene na jednom kraju i zaobljene na drugom kraju; ili cilindrične, zaobljene na oba kraja. Veličina konidija je određena merenjem dužine i širine po 100 slučajno odabranih konidija svakog izolata. Dimenzije su date kao minimalne – (prosečne) – maksimalne vrednosti, a izračunat je i odnos dužina/širina. Morfologija klijanja je određena naklijavanjem konidija u kapi destilovane vode. Nakon 24 h obavljena su merenja dužine inicijalnih hifa i formiranih sekundarnih konidija, a dobijene vrednosti predstavljene su kao minimalne – (prosečne) – maksimalne vrednosti 50 merenja.

## Morfologija apresorija

Proučavanje morfologije apresorija izolata *Colletotrichum* spp. je obavljeno prema metodi Johnston and Jones (1997). U prazne Petri kutije su stavljeni isečci KDA podloge (10 mm<sup>2</sup>), a potom je na površinu agara dodata jedna kap suspenzije konidija. Inokulisani isečci KDA su pokriveni sterilnom pokrovnom ljusticom i ostavljeni u termostatu na temperaturi od 25°C. Nakon 5 dana mikroskopskim pregledom pokrovnih ljustica, proučeni su oblik, veličina, boja i struktura 50 formiranih apresorija. Dimenzije apresorija su prikazane u obliku minimalnih – (prosečnih) – maksimalnih vrednosti.

## Obrazovanje teleomornog stadijuma

Sposobnost obrazovanja teleomornog stadijuma je praćena na svim hranljivim podlogama korišćenim za ispitivanje odgajivačkih karakteristika i utvrđivanje morfologije reproduktivnih organa izolata *Colletotrichum* spp. Kulture gljiva su gajene u termostatu na temperaturi od 25°C, a formiranje peritecija je posmatrano nakon mesec dana. Pojava savršenog stadijuma gljive praćena je i na veštački inokulisanim plodovima.

## REZULTATI

### Morfologija vegetativnih organa

Svi izolati *Colletotrichum* spp. na KDA podlo-

zi, 24 h nakon zasejavanja, obrazuju začetak micelije, bele boje, vazdušastog izgleda, prečnika č 2 mm. Nakon par dana dolazi do promena u konzistenciji i obojenosti kultura, a primetan je i neujednačen porast ispitivanih izolata. Na osnovu ispoljenih karakteristika, kolonije gljiva *Colletotrichum* spp. se mogu svrstati u 4 morfološke grupe.

Prvu grupu čine izolati poreklom sa ploda kruške i jabuke (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7), koji su po fenotipskim karakteristikama micelije i brzini porasta najbliži referentnom izolatu *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Kolonije ovih izolata su ispoljile brz i ravnomeran porast na podlozi KDA. Starenjem kulture postaju tamnosivo-maslinaste (Slika 1), a sa naličja se u većini slučajeva uočava formiranje koncentričnih prstenova svetlije i tamnije boje.

Drugoj, izrazito specifičnoj grupi pripadaju izolati sa ploda kruške (KC-21, KC-23, KC-82). Kulture ovih gljiva su intenzivnog porasta i karakteristične ružičaste boje. Razvojem kolonija dolazi do pojave zoniranosti i formiranja koncentrično raspoređenih ili nepravilno razbacanih acervula iz kojih se u žutonaranđastom matriksu oslobađaju konidije. Obilna sporulacija u kulturi je svojstvena ovoj grupi izolata (Slika 2).

U okviru treće grupe je izolat sa jabuke (JC-4), koji po makroskopskim osobinama micelije najviše odgovara referentnom izolatu *C. acutatum* (CBS 294.67). Kolonije su svetlo do tamno sive, umerenog porasta, nepravilnih ivica (Slika 3), a sa naličja je uočljiva pojava naranžastih i svetlomrkih kružnih zona. Starenjem na površini kultura dolazi do sporulacije i oslobađanja konidija.

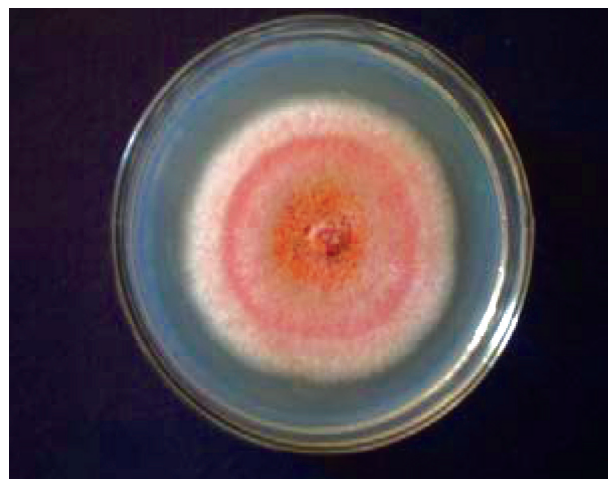
Četvrtu grupu čine isključivo izolati poreklom sa ploda višnje (VC-3, VC-5, VC-7, VC-9), koji su po obojenosti i strukturi micelije veoma slični prvoj grupi, ali su istovremeno i specifični po usporenom porastu na KDA podlozi (Slika 4). Razvojem, kulture poprimaju karakterističan zonirani izgled.

Mikroskopskim pregledom kolonija izolata *Colletotrichum* spp., gajenih na KDA podlozi i temperaturi od 25°C tokom 7 dana, uočeno je da ne postoje značajne razlike u morfološkim osobinama micelije. Mlade hife su razgranate, hijalinske i granuliranog ćelijskog sadržaja. Zidovi hifa su tanki, a vrhovi zaobljeni. Starije hife u centru kolonije su šire, debljih zidova i tamnije boje, često sa proširenim vrhovima i sa izraženim poprečnim pregradama. Prečnik hifa većine izolata iznosi 2,5 - 3,5 μm. Starenjem kultura, dolazi do grupisanja hifa i stvaranja tamnih stromatičnih zadebljanja. U zavisnosti od izolata ove strukture su evoluirale u acervule ili ostale sterilne.





**Slika 1.** Izolat JC-7 na KDA (I morfološka grupa).  
**Figure 1.** Isolate JC-7 on PDA (I morphological group).



**Slika 2.** Izolat KC-82 na KDA (II morfološka grupa).  
**Figure 2.** Isolate KC-82 on PDA (II morphological group).



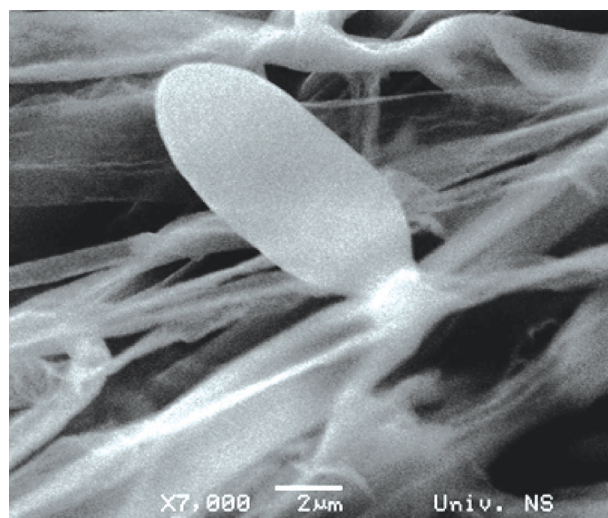
**Slika 3.** Izolat JC-4 na KDA (III morfološka grupa).  
**Figure 3.** Isolate JC-4 on PDA (III morphological group).



**Slika 4.** Izolat VC-9 na KDA (IV morfološka grupa).  
**Figure 4.** Isolate VC-9 on PDA (IV morphological group).

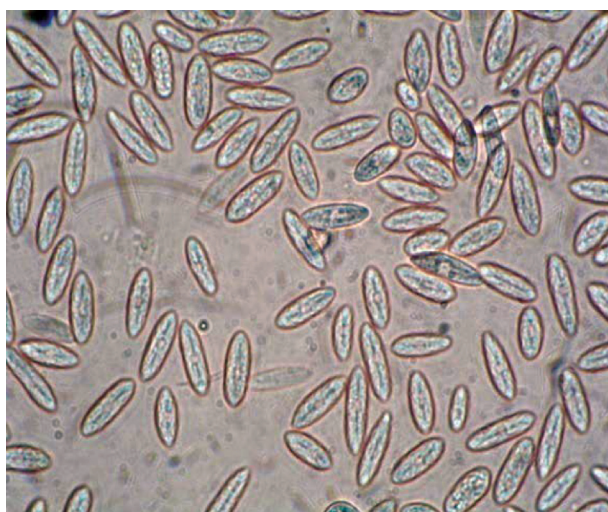


**Slika 5.** Acervuli na KDA u koncentričnim prstevima sa narandžastim konidijskim eksudatom (izolati KC-21, KC-23, KC-82).  
**Figure 5.** Acervuli on PDA in concentric rings with orange conidial exudate (isolates KC-21, KC-23, KC-82).



**Slika 6.** Konidija formirana na miceliji (scanning electron micrograph, izolat KC-23).  
**Figure 6.** Conidium formed on mycelium (scanning electron micrograph, isolate KC-23).





**Slika 7.** Morfologija konidija, izolat KC-23 (vretenaste).  
**Figure 7.** Morphology of conidia, isolate KC-23 (fusiform).



**Slika 8.** Morfologija konidija, izolat KC-12 (cilindrične).  
**Figure 8.** Morphology of conidia, isolate KC-12 (cylindrical).



**Slika 9.** Klijanje konidija (izolat JC-4)  
**Figure 9.** Germination of conidia (isolate JC-4).



**Slika 10.** Apresorije u nizu (izolat JC-7)  
**Figure 10.** Appressoria in a series (isolate JC-7).

### Morfologija reproduktivnih organa

#### Morfologija plodonosnog tela i prisustvo/odsustvo seta

Na obolelim plodovima acervule se formiraju 7-10 dana nakon obavljenih inokulacija i mogu biti raspoređene u vidu koncentričnih prstenova ili razbacane po centralnoj i perifernoj zoni antraknoznih površina. Plodonosna tela svih proučavanih izolata *Colletotrichum* spp. su morfološki veoma slična: kružnog ili nepravilnog oblika, crne ili tamnomrke boje i najčešće bez seta. Acervuli se obrazuju subepidermalno, na stromi sastavljenoj od gustog sloja ćelija. Bazalni deo acervule je pokriven fjalidičnim konidioforama, na kojima se formiraju konidije. Porastom plodonosnog tela epidermis puca, vršni deo acervule izbiha na površinu ploda i u uslovima povećane vlage dolazi do oslobađanja konidija u žutonarandžastoj želatinoznoj masi – matriksu.

Na svim ispitivanim hranljivim podlogama, *Colletotrichum* spp. obrazuju acervule crne ili mrke boje, 10-15 dana nakon zasejavanja izolata. Plodonosna tela mogu biti grupisana u centru kulture, nepravilno razbacana ili koncentrično raspoređena. Starenjem kultura iz acervula dolazi do oslobađanja konidijskog eksudata, karakteristične žutonarandžaste boje (Slika 5). Kod jedne grupe izolata (KC-9, KC-12, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) konidiomate su često prisutne u stromatičnim strukturama i utonule u podlogu.

Dimenzije acervula *Colletotrichum* spp. variraju u zavisnosti od supstrata. Konidiomate formirane na inokulisanim plodovima su nešto većeg prečnika, od 250 do 550 µm, dok su na ispitivanim podlogama sitnije i kreću se u granicama od 100 do 450 µm. S obzirom na preklapanja biometričkih vrednosti, dimenzije acervula ne mogu biti korišćene kao pouzdan taksonomski kriterijum za diferencijaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Prilikom ispitivanja morfoloških karakteristika

**Tabela 1.** Morfologija konidija *Colletotrichum* spp. – izolata sa voća.  
**Table 1.** Morphology of conidia of *Colletotrichum* spp. – isolates from fruits.

Izolati Isolate	Oblik Shape	Dužina (µm) Length (µm)		Širina (µm) Width (µm)		Dužina/Širina Length/Width
		min-(mean)-max		min-(mean)-max		
KC-6	C*	12,8-(16,8)-19,5		3,2-(4,2)-4,8		4,00
KC-9	C	13,8-(17,6)-20,8		3,2-(4,4)-4,8		4,00
KC-12	C	13,8-(17,5)-19,5		2,4-(4,2)-4,8		4,17
KC-21	F	12,8-(13,9)-16,6		2,4-(3,5)-4,0		3,97
KC-23	F	12,8-(14,2)-16,0		3,2-(3,6)-4,0		3,94
KC-82	F	12,8-(14,0)-16,6		2,4-(3,7)-4,0		3,78
JC-4	F	12,8-(13,7)-16,6		3,2-(3,6)-4,0		3,81
JC-5	C	12,8-(17,2)-19,5		3,2-(4,2)-4,8		4,09
JC-6	C	13,0-(17,3)-19,5		3,2-(4,3)-4,8		4,02
JC-7	C	12,8-(17,5)-19,6		3,2-(4,1)-4,8		4,16
VC-3	C	12,8-(17,4)-19,5		3,2-(4,3)-4,8		4,04
VC-5	C	13,8-(17,6)-20,8		3,2-(4,3)-4,8		4,09
VC-7	C	13,8-(17,2)-19,5		3,2-(4,1)-4,8		4,20
VC-9	C	13,8-(17,6)-20,8		3,2-(4,2)-4,8		4,19
CBS 294.67	F	11,2-(13,9)-15,2		3,2-(3,5)-4,8		3,97
CBS 516.97	C	12,8-(17,9)-19,2		3,2-(4,3)-4,8		4,16

\*C – cilindričan/cylindrical/; F – vretenast/fusiform.

**Tabela 2.** Morfologija inicijalnih hifa, apresorija i sek. konidija izolata *Colletotrichum* spp.  
**Table 2.** Morphology of g. tube, appressoria, and sec. conidia of isolates of *Colletotrichum* spp.

Izolati Isolate	Dužina i.hifa (µm) Length (µm) min-(mean)-max	O* Sh*	Apresorije Appressoria		Sekundarne konidije Sec. conidia	
			dužina x širina (µm) length x width (µm) min-(mean)-max		dužina x širina (µm) length x width (µm) min-(mean)-max	
KC-6	112-(124,5)-160	I	9,6-(11,5)-14,4 x 6,4-(6,8)-7,2	10,5-(16,8)-15,5 x 2,8-(3,1)-3,2		
KC-9	112-(135,8)-160	C	8,0-(12,3)-12,4 x 6,4-(7,5)-8,8	10,8-(11,6)-13,5 x 2,8-(3,1)-3,2		
KC-12	112-(127,6)-152	C	9,6-(11,7)-12,4 x 6,4-(7,9)-8,8	10,5-(11,6)-13,5 x 1,6-(3,1)-3,2		
KC-21	48-(73,5)-120	O	8,0-(8,9)- 9,6 x 4,8-(5,5)-7,2	–		
KC-23	64-(75,5)-120	O	8,0-(9,2)-10,4 x 4,8-(5,5)-7,2	–		
KC-82	48-(77,3)-112	O	6,4-(7,5)-9,6 x 5,6-(6,5)-7,2	–		
JC-4	64-(104)-120	O	8,0-(8,8)-9,6 x 5,6-(6,7)-7,2	–		
JC-5	80-(105,5)-152	I	9,6-(12,3)-14,4 x 6,4-(7,8)-8,8	10,8-(13,5)-13,5 x 1,6-(2,6)-3,2		
JC-6	96-(122,5)-160	C	8,0-(11,5)-12,4 x 6,4-(7,8)-8,8	9,8-(12,5)-14,5 x 1,6-(2,8)-3,2		
JC-7	112-(125,5)-152	C	8,0-(12,5)-14,4 x 6,4-(7,8)-8,8	10,8-(13,5)-15,5 x 1,6-(2,9)-3,2		
VC-3	96-(136,8)-176	C	8,0-(9,5)-10,4 x 5,6-(6,7)-7,2	10,8-(14,4)-16,5 x 2,8-(2,9)-3,2		
VC-5	112-(133,5)-160	C	8,0-(9,8)-12,4 x 6,4-(7,2)-8,8	9,8-(13,7)-17,5 x 1,6-(2,7)-3,2		
VC-7	96-(136,8)-160	C	8,0-(8,5)-10,4 x 5,6-(6,5)-7,2	10,8-(12,5)-15,5 x 2,8-(3,0)-3,2		
VC-9	96-(130,3)-176	I	6,4-(12,3)-14,4 x 6,4-(7,9)-8,8	10,8-(13,4)-16,5 x 2,8-(2,9)-3,2		
CBS 294.67	48-(71,5)-112	O	6,4-(8,1)-9,6 x 5,6-(5,8)-6,4	–		
CBS 516.97	112-(127,2)-160	I	9,6-(12,3)-14,4 x 6,4-(7,9)-8,8	12,8-(14,5)-16,5 x 2,8-(3,0)-3,2		

\*O/Sh-oblik/shape: C – oblik palice/clavate; O – okruglast/ovate; I – nepravilan/irregular.

konidiomata u kulturi, nije utvrđeno prisustvo seta ni kod jednog izolata *Colletotrichum* spp., kao ni kod referentnih sojeva *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Mikroskopskim pregledom epidermalnih površina inokuliranih plodova, konstatovano je formiranje seta kod dva izolata poreklom sa jabuke, JC-7 i JC-9. Obrazovane sete su u osnovi proširene, smeđe boje, prave ili blago povijene, sa svetlim vrhovima i mogu biti septirane (1-3). Dimenzije seta su neujednačene i iznose 65 - 130 x 3,2 - 4,8 µm. Kod oba izolata na vrhovima seta je zabeleženo formiranje konidija (1-4).

### Morfologija konidiofora i konidiogenih ćelija

U bazalnom delu konidiomata obrazovanih na KDA podlozi, svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp., kao i referentni *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) obrazuju konidiofore koje su izduženo cilindričnog oblika, hijalinske ili svetlosmeđe, blago povijene, veličine 20,8 - 32 x 3,2 - 4,8 µm. Konidiogene ćelije su glatke, cilindrične, hijalinske i formiraju se u konidiomatama, ali se mogu javiti i na miceliji i tada se teško razlikuju od sterilnih hifa. Dimenzije konidiogenih ćelija ispitivanih izolata su skoro uniformne i iznose 6,4 - 40 x 1,6 - 4,8 µm.

### Morfologija konidija

Izolati *Colletotrichum* spp., poreklom sa antraknoznih plodova kruške, jabuke i višnje obilno formiraju konidije na konidiogenim ćelijama u konidiomati. Iz acervula na veštački inokuliranim plodovima i u kulturi, konidije se oslobađaju u vidu sluzastog želatinoznog matriksa. Osim u konidiomati, konidije se mogu formirati i na fjalidičnim konidiogenim ćelijama lociranim na bočnim granama micelije (Slika 6).

Boja konidija svih ispitivanih izolata u masi je narandžasta do svetloružičasta i ne može biti korišćena kao kriterijum za diferencijaciju vrsta roda *Colletotrichum*.

Oblik konidija je određen na osnovu navedenih kriterijuma, a konidije izolata gajenih na KDA tokom 15 dana svrstane su u fusiformne, zaoštrene na oba kraja (Slika 7); cilindrične, zaoštrene na jednom kraju i zaobljene na drugom kraju; i cilindrične, zaobljene na oba kraja (Slika 8).

Izgled konidija nehromogenih izolata (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) poreklom sa plodova jabuke, kruške i višnje, odgovaraju opisu konidija referentnog soja *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). U pitanju su jednoćelijske, hijalinske, glatke, konidije sa sitnim granuliranim sadržajem, prave ili blago povijene, cilindrične, i u preko 90% slu-

čajeva zaobljene na oba kraja. Preostale konidije ove grupe izolata (č10%) su prelaznih formi, uglavnom sa jednim zaoštrenim vrhom ili elipsoidne. Konidije hromogenih izolata (KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4), dobijenih sa antraknoznih plodova kruške i jabuke, uklapaju se u opis konidija referentnog soja *C. acutatum* (CBS 294.67). One su jednoćelijske, hijalinske, glatke, prave, sitno granuliranog sadržaja i dominantno fusiformnog oblika.

Veličina konidija i njihovo međusobno poređenje ukazuju da između ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. postoje izvesna variranja, naročito kada su u pitanju ekstremne vrednosti dužine konidija (Tabela 1). Prosečne dužine konidija izolata KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9, iznose 17,4 µm i poklapaju se sa biometričkom vrednošću ove dimenzije referentnog soja *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Dužine konidija izolata KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4, su prilično uniformne, u proseku 13,9 µm i u potpunosti odgovaraju prosečnoj dužini konidija referentnog soja *C. acutatum* (CBS 294.67).

Ekstremne vrednosti širine konidija svih proučavanih kultura gljiva su ujednačene (Tabela 1). Međusobnim poređenjem izolata mogu se konstatovati razlike u prosečnim vrednostima širine konidija. Kao i u prethodnom slučaju, rezultati dobijeni merenjem širine konidija ukazuju na grupisanje izolata u dve osnovne kategorije. Prvu grupu čine KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9, kod kojih prosečna širina konidija iznosi 4,23 µm, što odgovara vrsti *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). U okviru druge grupe su izolati KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4, sa prosečnom širinom konidija od 3,69 µm. Dobijena vrednost se skoro podudara sa prosečnom širinom konidija referentnog soja *C. acutatum* (CBS 294.67).

Rezultati dobijeni izračunavanjem količnika, tj. odnosa dužine/širine konidija su takođe ukazali na postojanje dve grupe izolata (Tabela 1). Kod kultura koje se na osnovu oblika i veličine konidija mogu smatrati pripadnicima vrste *C. gloeosporioides*, odnos dužine i širine konidija iznosi od 3,60 do 3,97. Izolati koji morfološki odgovaraju vrsti *C. acutatum* poseduju konidije kod kojih je odnos dužina/širina u intervalu od 4,0 do 4,19. U oba slučaja i referentni sojevi *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* imaju konidije sa istim odnosom ovih dimenzija. Na osnovu navedenog, može se konstatovati da granice numeričkih vrednosti dužine i širine konidija i njihovog količnika nisu jasno izdiferencirane, kao i da u pojedinačnim slučajevima postoje izvesna preklapanja u dimenzijama i obliku ispitivanih izolata. Međutim, ova dva morfološka kriterijuma uz izvesna ograničenja mogu poslužiti u diferencijaciji gljiva *Colletotrichum* spp. do nivoa vrste.

Morfologija klijanja konidija ispitivanih izolata



je prosek koji bez obzira na vrstu, započinje na identičan način. Prvi korak je bubrenje konidija, koje vremenom gube granulirani sadržaj i postaju prozirne. U ekvatorijalnom delu konidija izolata KC-21, KC-23, KC-82, JC-5, JC-6 i JC-7 dolazi do obrazovanje jedne, ili ređe 2-3 septe (Slika 9). Produkti klijanja konidija su inicijalne hife, apresorije i sekundarne konidije. U zavisnosti od izolata konidije formiraju jednu ili dve, a ponekad i do 4 inicijalne hife. Do klijanja najčešće dolazi na jednom ili oba vrha konidije - temeno klijanje. Znatno ređe konidije kličaju temeno-bočno ili bočno i to u slučajevima kada se obrazuju više od dve inicijalne hife. U procesu klijanja konidija ispitivanih izolata bez obzira na poreklo i vrstu, često dolazi do anastomoze inicijalnih hifa. Ovo je naročito izraženo u situacijama kada su konidije blizu jedna drugoj ili su inicijalne hife u paralelnoj poziciji. Kod izolata JC-4, kraća inicijalna hifa iz jedne konidije se može spojiti sa susednom konidijom koja je u fazi bubrenja. Uočena je takođe i pojava anastomoze dve kličajuće konidije koje su u neposrednoj blizini. Na vrhovima iskljajalnih inicijalnih hifa ili njihovih ogranaka, u zavisnosti od izolata dolazi do obrazovanja sekundarnih konidija i/ili apresorija. Sekundarne konidije su po obliku slične primarnim, ali su tanjih zidova i nešto manjih dimenzija. Kod izolata poreklom sa ploda višnje (VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) do obrazovanja sekundarnih konidija dolazi direktno na vrhovima majčinskih konidija, za razliku od izolata sa ploda kruške (KC-6, KC-9 i KC-12) kod kojih se sekundarne konidije formiraju na krajevima inicijalnih hifa.

Rezultati merenja dužine inicijalnih hifa i biometričke vrednosti sekundarnih konidija, 24 h nakon naklijavanja, ukazuju na postojanje dve vrste roda *Colletotrichum* (Tabela 2). Izolati KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9, koji su uslovno determinisani kao *C. gloeosporioides* mogu se izdvojiti u posebnu grupu, po nešto dužim inicijalnim hifama i obilnom formiranju sekundarnih konidija. Konidije izolata KC-21, KC-23, KC-82, JC-4 i referentni soj *C. acutatum* u procesu klijanja ne obrazuju sekundarne spore, a prosečna dužina inicijalnih hifa u odnosu na prethodnu grupu je nešto manja.

### Morfologija apresorija

Apresorije se formiraju na krajevima inicijalnih hifa kod izolata KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4 i bočno na kratkim hifama izolata JC-5, JC-6 i JC-7. Svi izolati poreklom sa ploda višnje, kao i izolati KC-6, KC-9 i KC-12 retko formiraju apresorije. U većini slučajeva do njihovog obrazovanja dolazi direktno na konidijama. Najčešće, spora produkuje jednu ili dve apresorije, ali je kod JC-5, JC-7 i JC-9 konstatovano formiranje ovih struk-

tura u nizu (Slika 10). Mlade apresorije su kod svih izolata hijalinske ili svetlo pigmetirane. Sazrevanjem dolazi do razvoja višeslojnog ćelijskog zida i produkcije melanina, pa apresorije poprimaju tamnomrku ili crnu boju. Izgled i veličina obrazovanih apresorija je prilično varijabilan. Kod većine izolata koji su na osnovu morfologije i veličine konidija okarakterisani kao pripadnici vrste *C. gloeosporioides* (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) apresorije su sferičnog, ovalnog ili nepravilnog oblika, zadebljalih zidova i izrazito melanizirane. Izolati koji po opisu odgovaraju vrsti *C. acutatum* (KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4) formiraju apresorije sferičnog, ovalnog ili okruglastog izgleda, tamnomrke boje i manje naboranih ivica. Biometrijske vrednosti apresorija su neujednačene i kod većine ispitivanih izolata se preklapaju, pa stoga ovaj morfološki kriterijum nije pouzdan u identifikaciji i diferencijaciji vrsta *C. gloeosporioides* i *C. acutatum* (Tabela 2).

### Obrazovanje teleomorfno stadijuma

Izolati *Colletotrichum* spp. poreklom sa antraknozih plodova kruške, jabuke, višnje i paradajza, kao i referentni sojevi *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.67) ne formiraju teleomorfni stadijum *Glomerella* spp. Obrazovanje peritecija je izostalo na svim veštački inokulisanim plodovima, kao i u kulturama koje su u tu svrhu čuvane do potpunog iscrpljivanja.

### DISKUSIJA

Na osnovu fenotipskih odlika može se zaključiti da nijedan od izolata identifikovanih kao *C. gloeosporioides* (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7, VC-9), ne formira kolonije sa crvenom pigmentacijom. Kolonije KC-21, KC-23 i KC-82, sa antraknozih plodova kruške su karakteristične ružičaste do rumenocrvene boje, na osnovu čega se svrstavaju u grupu hromogenih izolata. Mada se boja kolonije ne može koristiti kao zaseban i pouzdan taksonomski kriterijum za diferencijaciju vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, naši rezultati, kao i rezultati drugih istraživača (Shi et al., 1996; Freeman et al., 1998; Trkulja, 2004; Gonzales and Sutton, 2004; Peres et al., 2005; Whitewal-Weckert et al., 2007) ukazuju da hromogeni tipovi pripadaju vrsti *C. acutatum*. Baxter et al. (1983) su prema ovoj fenotipskoj karakteristici sve hromogene izolate izdvojili u zasebnu formu *specialis* i imenovali kao *C. acutatum* f. sp. *hromogenum* (Gorter) Baxter, van der Weshuizen et Eicker. Izolat JC-4 sa ploda jabuke, kao i referentni soj CBS 294.67, formiraju kolonije svetlo do tamnosive



pigmentacije i pripadaju nehromogenom tipu vrste *C. acutatum*.

Svi proučavani izolati *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* u uslovima *in vivo* i *in vitro* obrazuju plodnosna tela – acervule, kružnog ili nepravilnog oblika, crne do tamnomrke boje. Morfologija i biometričke vrednosti acervula slažu se sa literaturnim podacima (Mordue, 1971; Trkulja, 2004), ali s obzirom na preklapanja biometričkih vrednosti ispitivanih izolata, u konkretnom slučaju ovo nije pouzdan taksonomski kriterijum za diferencijaciju vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*.

Konidije vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* se oslobađaju iz acervula u lepljivoj, želatinoznoj masi ili matriksu, svetlonarandžaste boje. U pitanju je složena mešavina polisaharida i glikoproteina, sa manjim sadržajem drugih komponenata, pre svega enzima. Pri sazrevanju acervula, matriks se transformiše u "ljuspastu" izlučevinu, sa masom slepljenih konidija. Disperzija konidija iz mladih acervula se odvija vodenim kapima, a širenje spora iz zrelih acervula se odvija uz pomoć vetra (Nicholson and Morales, 1980).

Tokom proučavanja morfoloških karakteristika konidiomata u kulturi, nije utvrđeno prisustvo seta ni kod jednog izolata *Colletotrichum* spp., kao ni kod referentnih sojeva *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Formiranje seta je zabeleženo samo na površini plodova, veštački inokulisanih izolatima JC-7 i JC-9. Formiranje seta u kulturi nisu utvrdili Stojanović (1997, 2002) i Lewis et al. (2004), za razliku od drugih istraživača koji napominju da njihovo obrazovanje pre svega zavisi od izolata, ali i od ekoloških uslova i hranljive podloge (von Arx, 1970; Quimio, 1977; Baxter et al., 1983; Photita et al., 2005).

Svi proučavani izolati *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* u bazalnom delu konidiomata obrazuju konidiofore koje su izduženo cilindričnog oblika, hijalinske ili svetlosmeđe i blago povijene. Konidiogene ćelije su glatke, cilindrične i hijalinske. Izgled i veličina konidiofora i konidiogenih ćelija ispitivanih izolata odgovaraju opisima drugih autora (Baxter et al., 1983; Trkulja, 2004), a osim hijalinskih u literaturi postoje podaci i o konidioforama maslinastozelene ili smeđe boje (von Arx, 1970; Mordue, 1971; Vučinić and Latinović, 1999).

Morfološkim proučavanjem konidija konstatovane su razlike u obliku i dimenzijama, na osnovu čega je obavljena diferencijacija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. Ovaj taksonomski kriterijum se u velikoj meri pokazao kao zadovoljavajući za međusobno diferenciranje vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Konidije nehromogenih izolata (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-6, JC-7, VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) su jednoćelijske, hijalinske, glatke, sa sitnim granulira-

nim sadržajem, prave ili blago povijene i cilindrične. Biometrijske vrednosti konidija navedenih izolata odgovaraju opisima vrste *C. gloeosporioides* poreklom sa različitih domaćina: 12-21 x 3,5-6 µm (von Arx, 1970); 9-24 x 3-6 µm (Mordue, 1971); 9-24 x 3-4,5 µm (Sutton, 1980); 9,5-20 x 3-6,5 µm (Baxter et al., 1983); 12,5-18,5 x 3,9-5 µm (Ivanović i Ivanović, 1992); 13-21 x 3,5-5 µm (Gunnell and Gubler, 1992); 12,3-14,8 x 4,6-5,5 µm (Berstein et al., 1995); 12-22 x 3,9-5,5 µm (Trkulja, 2004); 15,7 x 4,1 µm (Whitewal-Weckert et al., 2007). Konidije izolata KC-21, KC-23, KC-82 i JC-4, su jednoćelijske, hijalinske, glatke, prave, sitno granuliranog sadržaja, dominantno fusiformnog oblika. Oblik i veličina konidija navedenih izolata odgovaraju kriterijumima koji važe za vrstu *C. acutatum*: 8-16 x 2,5-4 µm (Dyko and Mordue, 1979); 8,5-16,5 x 2,5-4 µm (Sutton, 1980); 13-17 x 3,5-4,5 µm (Baxter et al., 1983); 13-19 x 3,5-5 µm (Gunnell and Gubler, 1992); 8,1-15,3 x 3,5-5,2 µm (Berstein et al., 1995); 13-17,5 x 3,5-4,5 µm (Trkulja, 2004); 14,7 x 3,8 µm (Lewis et al., 2004); 10,8-13,5 x 2,9-3,6 µm (Whitewal-Weckert et al., 2007).

Rezultati dobijeni izračunavanjem količnika, tj. odnosa dužine/širine konidija takođe ukazuju na postojanje dve grupe izolata. Adaskaveg and Hartin (1997) su proučavajući biometrijske vrednosti konidija prouzrokovala antraknoze ploda badema, citrusa, papaje, jagode i breskve, utvrdili da odnos dužine/širine konidija izolata *C. acutatum* iznosi 2,6-3,8, a konidija *C. gloeosporioides* 3,2-3,5.

Produkti klijanja konidija ispitivanih izolata *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* su inicijalne hife, apresorije i sekundarne konidije. Klijanja je najčešće temeno, a znatno ređe temeno-bočno ili bočno. Potpuno bočno klijanje je uočeno samo u slučajevima kada dolazi do formiranja više od dve inicijalne hife, što su u svojim radovima konstatovali Stojanović (1997), Latinović (1999) i Trkulja (2004). O'Connell et al. (1992), takođe napominju da vrste roda *Colletotrichum* obrazuju jednu ili više inicijalnih hifa i apresorija prilikom naklijavanja konidija u destilovanoj vodi na različitim veštačkim površinama: staklu, nitroceluloznoj membrani, polistirenu i dr. Na ovaj način formirane hife i apresorije su identične onima koje se obrazuju *in vivo*, tokom infekcionog procesa na biljci domaćinu.

Kod ispitivanih izolata *C. gloeosporioides* utvrđeno je obilno formiranje sekundarnih konidija direktno na vrhovima majčinskih konidija ili na krajevima inicijalnih hifa. U skladu sa rezultatima Stojanović (1997) i Latinović (1999), konstatovano je da sekundarne konidije retko klijavu dok su na materskoj konidiji, a nakon odvajanja klijavu obrazujući inicijalnu hifu.

Klijanjem konidija izolata *Colletotrichum* spp. dolazi do formiranja apresorija, direktno na sporama ili na krajevima kraćih i dužih inicijalnih hifa. Prema Sutton-u (1968) apresorije se mogu obrazovati i na vrhovima vegetativnih hifa, odnosno direktno na micelijima, ali ova pojava u našem eksperimentu nije utvrđena. Formirane apresorije ispitivanih izolata *C. acutatum* su tamnomrke do crne boje, sferične ili ovalne, a izolata identifikovanih kao *C. gloeosporioides* nepravilnog ili sferičnog oblika. Dobijeni rezultati se poklapaju sa biometrijskim vrednostima apresorija koje se u literaturi navode za vrste *C. acutatum*: 7,5-15 x 5-8 µm (Baxter et al., 1983); 6,5-10,5 x 4,5-6 µm (Trkulja, 2004) i *C. gloeosporioides*: 6-20 x 4-12 µm (Mordue, 1971; Sutton, 1980); 6-20 x 4,5-9 µm (Baxter et al., 1983); 7,5-17,5 x 5,5-8,5 µm (Trkulja, 2004).

Formiranje apresorija pri klijanju konidija je primarna karakteristika gljiva roda *Colletotrichum* (von Arx, 1970). Ovi organi u prvom stadijumu infekcije imaju prevashodnu ulogu u vezivanju parazita za površinu domaćina, a prema navodima Purkayastha and Sen Gupta (1973) njihovo obrazovanje je uslovljeno različitim faktorima, kao što su kontaktni stimulansi, priroda supstrata, prisustvo difuznih biljnih metabolita i spoljni faktori. U toku sazrevanja apresorija, prema Bailey-u et al. (1992) dolazi do razvoja debelog višeslojnog ćelijskog zida, potom sekrecije tankog sloja ekstracelularne, mucilaginozne mase i formiranja pore u ventralnom zidu koji je u kontaktu sa supstratom. Značaj mucilaginozne mase je u zaštiti apresorija od ekstremnih temperatura, a dokazano je i da pomaže u adheziji, tj. procesu prijanjanja gljive za površinu biljke domaćina.

Tokom naših istraživanja izolati *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, kao i referentni sojevi ovih vrsta, nisu formirali teleomorfni stadijum *Glomerella* spp. Prisustvo peritecija nije uočeno na veštački inokuliranim plodovima, kao ni na površini kultura koje su u tu svrhu čuvane do potpunog iscrpljivanja. Izostanak obrazovanja savršenog stadijuma *Glomerella* u svojim eksperimentima navode Freeman et al. (1998), Vučinić and Latinović (1999) i Trkulja (2004). Na hranljivim podlogama Baxter et al. (1983) i Sto-

janović (1997) su konstatovani samo sterilne začetak askomata, što je česta odlika vrste *C. gloeosporioides*. Prema Mordue-u (1971) formiranje peritecija je mnogo izraženije na starijim kulturama gljiva i one su u većini slučajeva znatno grupnije od peritecija formiranih na prirodnom supstratu. Shi et al. (1996) u inventarizaciji vrsta *Colletotrichum*, prouzročivača antraknoze ploda jabuke, naglašavaju da izolati *C. acutatum* ne obrazuju peritecije, a da je kod manje od polovine svih kultura *C. gloeosporioides* utvrđeno obrazovanje *G. cingulata*. Guerber and Correll (2001) su u laboratorijskim uslovima prvi utvrdili formiranje *G. acutatum*, savršene forme konidijskog stadijuma *C. acutatum*. Mali značaj teleomorfa u epidemiologiji vrsta roda *Colletotrichum* utvrdili su Fitzell and Peak (1984). Na osnovu poljskih oglada, ovi autori su zaključili da se uloga askospora u infektivnom procesu gljive ne može pouzdano dokazati, jer iako su peritecije bile formirane, prisustvo askospora u vazduhu nije utvrđeno. S druge strane, vrste *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* su pre svega patogeni subtropskih i tropskih predela, pa je u takvim klimatskim uslovima smanjena realna potreba formiranja teleomorfa, kao stadijuma za prezimljavanje.

Tradicionalne metode identifikacije gljiva roda *Colletotrichum*, zasnovane su na morfološkim karakteristikama: boji kolonije, obliku i veličini konidija, acervula i apresorija, prisustvu/odsustvu seta i eventualnom formiranju teleomorfog stadijuma *Glomerella* spp. (Freeman et al., 1998). S obzirom na veliki broj intermedijarnih formi, navedeni kriterijumi nisu uvek adekvatni za diferencijaciju vrsta *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Morfološka karakterizacija izolata *Colletotrichum* spp. poreklom sa antraknoznih plodova voća, kao i njihova morfološka identifikacija do nivoa vrste, pokazala se u izvesnoj meri pouzdanom, što je potvrđeno i molekularnom analizom (Živković, 2011).

#### ZAHVALNICA

Ova istraživanja su finansirana sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Projekat TR 31018.

#### LITERATURA

- Adaskaveg, J.E. and Hartin, R.J. (1997): Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, 87: 979-987.
- Arx, J.A. von (1957): Die Arten der Gattung *Colletotrichum*. *Cda Phytopath. Z.*, 29: 413-4468.
- Arx, J.A. von (1970): A revision of the fungi classified as *Gloeosporium*. J. Cramer, Lehre.

- Bailey, J.A., O'Connell, R.J., Pring, R.J., Nash, C. (1992): Infection Strategies of *Colletotrichum* species. In *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (eds J.A. Bailey and M.J. Jeger), CAB Internacional, Wallingford, UK., pp. 88-120.
- Baxter A.P., van der Westhuizen, G.C.A., Eicker, A. (1983): Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. *South African. J. Bot.*, 2: 259-289.
- Bernstein, B., Zehr, E.I., Dean, R.A., Shabi, E. (1995): Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. *Plant Disease*, 79: 478-482.
- Cannon, P.F., Buddie, A.G., Bridge, P.D. (2008): The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon*, 104: 189-204.
- Dyko, B.J. and Mordue, J.E.M. (1979): *Colletotrichum acutatum*. CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 630. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Gonzales, E. and Sutton, T.B. (2004): Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apples in three orchards in North Carolina. *Plant Disease*, 88: 1335-1340.
- Gunnell, P.S. and Gubler, W.D. (1992): Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Mycologia*, 84: 157-165.
- Guerber, J.C. and Correll, J.C. (2001): Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. *Mycologia*, 93: 216-229.
- Guerber, J.C., Liu, B., Correll, J.C., Johnston, R.P. (2003): Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*, 95: 872-895.
- Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. (1998): Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits. *Plant Disease*, 82: 596-605.
- Fitzell, R.D. and Peak, C.M. (1984): The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum source, spore production and dispersal. *Ann. App. Biol.*, 104: 53-59.
- Ivanović, M. i Ivanović, D. (2001): Mikoze i pseudomikoze bilja. TND Produkt doo, Zemun.
- Johnston, P.R. and Jones D. (1997): Relationship among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia*, 89: 420-430.
- Latinović, J. (1999): Morfološke karakteristike klijanja konidija *C.gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., uzročnika antraknoze masline. *Micologia Montenegrina*, 1: 121-125.
- Lewis, I.M.L., Nava-Diaz, C., Miller, S.A. (2004): Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers. *Plant Disease*, 88: 1198-1204.
- Mordue, J.E.M. (1971): *Glomerella cingulata*. CMI Descriptions of Pathogenic fungi and Bacteria, No. 315. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Nicholson, R.L. and Morales, W.B.C (1980): Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of spore matrix. *Phytopathology*, 70: 255-261.
- O'Connell, R.J., Nash, C., Bailey, J.A. (1992): Lectin citochemistry: A new approach to understanding cell differentiation, pathogenesis and taxonomy in *Colletotrichum*. In *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (eds J.A. Bailey and M.J. Jeger), CAB Internacional, Wallingford, UK., pp. 67-87.



- Peres, N.A., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E., Correll, J.C. (2005): Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease, 89: 784-796.
- Photita, W., Taylor, P.W.J., Ford, R., Hyde, K.D., Lumyong, S. (2005): Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. Fungal diversity, 18: 117-133.
- Purkayastha, R.P. and Sen Gupta, M. (1973): Studies on conidial germination and appressoria formation in *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causing anthracnose of jute (*Corchorus olerarius* L.). Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 80: 718-724.
- Shi, Y., Correll, J.C., Guerber, J.C., Rom, C.R. (1996): Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. Plant Disease, 80: 692-696.
- Simmonds, J.H. (1965): A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rot in Queensland. Qld. J. Agric. Anim. Sci., 22: 437-459.
- Smith, B.J. and Black, L.L. (1990): Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Disease, 74: 69-76.
- Stojanović, S. (1997): Epidemiološka i ekološka proučavanja *Colletotrichum gloeosporioides*, superparazita stroma *Polystigma rubrum*. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Stojanović, S., Gavrilović, V., Starović, M., Pavlović, S., Živković, S. (2002): Novi domaćini gljiva iz roda *Colletotrichum* u Srbiji. Zaštita bilja, 243: 171-179.
- Sutton, B.C. (1968): The appressoria of *Colletotrichum graminicola* and *C. falcatum*. Canadian Journal of Botany, 46: 873-876.
- Sutton, B.C. (1980): The *Coelomycetes* – Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. CMI, Kew, Surrey, England.
- Sutton, B.C. (1992): The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger), CAB International, Wallingford, UK, pp. 1-26.
- Trkulja, V. (2004): Patogene, morfološke i odgajivačke odlike *Colletotrichum* spp. prouzrokovala gorke truleži ploda jabuke. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Quimio, T.H. (1977): Species of *Colletotrichum* in Philippines. Nova Hedwigia, 28: 543-553.
- Vučinić, Z. and Latinović, J. (1999): *Colletotrichum gloeosporioides*, a new olive (*Olea europea* L.) parasite in Yugoslavia. Acta Horticulturae, 474: 577-579.
- Whitelaw-Weckert, M.A., Curtin, S.J., Huang, R., Steel, C.C., Blanchard C.L., Roffey, P.E. (2007): Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. Plant Pathology, 56: 448-463.
- Živković, S. (2011): Usporedna proučavanja izolata *Colletotrichum* spp. prouzrokovala antraknoze. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad.

(Primljeno: 12.11.2014.)  
(Prihvaćeno: 09.12.2014.)

## MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ISOLATES OF *COLLETOTRICHUM* SPP. – CAUSAL AGENTS OF ANTHRACNOSE

SVETLANA ŽIVKOVIĆ<sup>1</sup>, SAŠA STOJANOVIĆ<sup>1</sup>, JELICA BALAŽ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

<sup>2</sup>University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Novi Sad  
e-mail: zivkovicsvetla@gmail.com

### SUMMARY

In the morphological studies were included isolates of *Colletotrichum* spp. originating from pear, apple and sour cherry fruits, as well as reference strains of *C. acutatum* (CBS 294.67) and *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). The colony characteristics, appearance, shape and size of conidioma, appressoria, and conidia of isolates of *Colletotrichum* spp. were studied. The four morphological groups of colonies on PDA were observed, confirming the great phenotypic variability of isolates of *Colletotrichum* spp. Most isolates from apple and pear fruits (KC-6, KC-9, KC-12, JC-5, JC-7, JC-9), formed the first morphological group. The isolates from sour cherry (VC-3, VC-5, VC-7, VC-9) are separated in the fourth morphological group. The size and shape of conidia from these isolates fit the description of *C. gloeosporioides*. The chromogenic isolates from pear (KC-21, KC-23, KC-82) formed the second morphological group, and in the third morphological group is isolate (JC-4) from apple fruit. The morphology of conidia from these isolates fit the description of *C. acutatum*. During this research were evident that all isolates formed conidioma – acervuli. The tested cultures of *Colletotrichum* spp. did not form teleomorph. Because of outstanding variability, most of the studied characteristics cannot be independently applied as taxonomic criteria. Obtained results showed that, for *Colletotrichum* species classification, at least two taxonomic criteria should be used: morphological features combined with molecular identification.

**Key words:** morphology, anthracnose, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*

(Received: 12.11.2014.)

(Accepted: 09.12.2014.)