

UTICAJ JEDINJENJA UGLJENIKA I AZOTA NA PORAST IZOLATA *COLLETOTRICHUM* SPP.

SVETLANA ŽIVKOVIĆ*, SAŠA STOJANOVIĆ, NENAD TRKULJA,
NENAD DOLOVAC, TATJANA POPOVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ

Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, Srbija

*e-mail: zivkovicsvetla@gmail.com

U Srbiji je tokom poslednjih godina zabeležena pojava antraknoze ploda kruške, jabuke, višnje i paradajza. Iz obolelih plodova su izolovane gljive roda *Colletotrichum*. Za komparativna istraživanja je odabrano 20 monosporijalnih izolata, kao i referentni sojevi *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) koji su predstavljali kontrolu. Fiziološka proučavanja su obuhvatila i određivanja uticaja različitih izvora ugljenika i azota na porast kultura *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*. Rezultati su pokazali da je karboksimetilceluloza najadekvatniji izvor ugljenika za rast izolata *Colletotrichum* spp. Od tri proučavana izvora azota, najveći porast svih testiranih gljiva zabeležen je na podlogama sa kazeinhidrolizatom.

Ključne reči: *Colletotrichum* spp., ugljenik, azot, porast.

UVOD

Gljive roda *Colletotrichum* (teleomorf *Glomerella*), su kosmopolitske vrste umerenog i tropskog klimatskog područja, prisutne na velikom broju domaćina: voću, povrću, leguminozama, žitaricama, šumskom i ukrasnom bilju (Bailey et al., 1992). Na biljkama mogu prouzrokovati nekrozu korena i stabla, pegavost i uvijenost lista, defolijaciju, palež i nekrozu cvasti, kao i antraknozu i trulež plodova (Wharton and Uribeondo, 2004). Simptomi se manifestuju tokom vegetacije, ali je češći slučaj ostvarivanja latentnih infekcija koje nakon berbe plodova

i tokom naadekvatnih uslova skladištenja kulminiraju pojavom nekroze i truleži (Freeman et al., 1998). Gubici nastali usled truljenja antraknoznih plodova voća i povrtarskih kultura mogu iznositi od 10 do 80%, što u nekim zemljama u razvoju ozbiljno ugrožava tržišnu ekonomiju (Than et al., 2008).

U Srbiji su poslednjih godina sa atraknoznih plodova voća i povrća izolovana, a potom morfološki i molekularno identifikovana dva, ekonomski najznačajna patogena roda *Colletotrichum*: *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* (Ivanović et al., 2007; Živković i sar., 2008, 2009, 2010; Živković, 2011).

Ugljenik i azot predstavljaju esencijalne komponente neophodne za sintezu proteina, rast ćelija i razmnožavanje gljiva (Oritsejafor, 1986). Međutim, poznato je da svi izvori ugljenika i azota ne manifestuju podjednako stimulativan efekat na razvoj i sporulaciju, kao i da neke gljive poseduju veću afinitet prema određenim jedinjenjima ovih elemenata. S obzirom da su vrstama *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, kao i ostalim fitopatogenim gljivama za odvijanje normalnih metaboličkih i reproduktivnih funkcija neophodni ugljenik i azot, od velikog je značaja utvrditi u kom obliku se ovi elementi mogu najefikasnije iskoristiti.

Osnovni cilj rada je ispitivanje uticaja različitih izvora ugljenika i azota na rast izolata *Colletotrichum* spp. Dobijene informacije o nutritivnim zahtevima gljiva roda *Colletotrichum* su od značaja za sagledavanje odnosa patogen – biljka, jer su infektivni potencijal patogena i osetljivost biljke domaćina u direktnoj zavisnosti od raspoloživih izvora ugljenika i azota.

MATERIJAL I METODE

Ispitivanje usvajanja jedinjenja ugljenika i azota. Za ispitivanje nutritivnog efekta ugljenika i azota, odabrano je 20 izolata *Colletotrichum* spp. poreklom sa različitih domaćina (Tabela 1). U komparativna proučavanja su uključena i dva referentna soja: *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) iz kolekcije Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Holandija. Sve kulture su gajene su na osnovnoj podlozi obogaćenoj sa 10 g/l ugljenika, odnosno 2 g/l azota (Paterson and Bridge, 1994). Kao izvori ugljenika korišćeni su: karboksimetilceluloza (KMC), skrob i pektin, a od izvora azota: kazeinhidrolizat (KH), natrijumnitrat (NaNO_3) i amonijumdihrogenfosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Zasejavanje podloga je izvršeno nanošenjem fragmenata ispitivanih izolata iz kultura starih 7 dana, odgajenih na krompir-dekstroznom agaru (KDA). Diskovi micelija su postavljeni su u centar Petri kutija, a zasejane podloge su potom inkubirane u termostatu na temperaturi od 25°C. Ogled je izveden u 3 ponavljanja. Porast izolata *Colletotrichum* spp. ocenjen je sedmog dana merenjem prečnika kolonije, a dobijene vrednosti su preračunate u procenite poređenjem sa vrednostima porasta izolata na osnovnoj podlozi (bez dodatih jedinjenja ugljenika i azota).

Statistička obrada rezultata. Statistička obrada rezultata obavljena je upotrebom paketa STATISTICA v. 6. Analiza uticaja dva faktora je izvršena primenom parametarskog modela analize varijanse (ANOVA/MANOVA). Provera adekvatnosti ovog modela za konkretnu analizu sprovedena je na osnovu vrednosti koeficijenata varijacije (Cv) i Leveneovog testa za homogenost varijansi. Pojedinačna poređenja tretmana sprovedena su na bazi Duncan multiple range testa. Nakon obrade rezultata svi ispitivani izolati *Colletotrichum* spp. grupisani su modelom klaster analize, baziranoj na Euklidskoj distanci i kompletnom povezivanju.

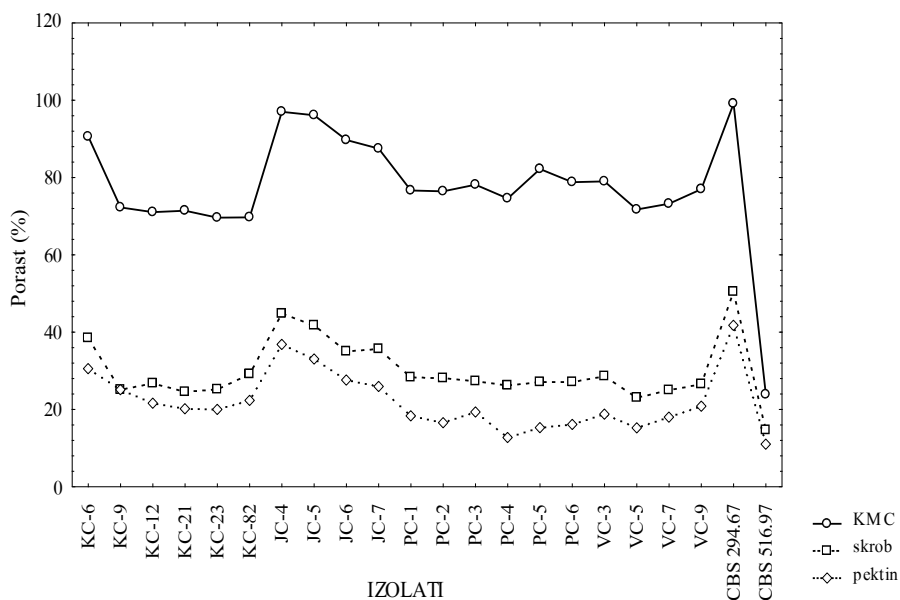
Tabela 1 - Izolati *Colletotrichum* spp.

Table 1 - Isolates of *Colletotrichum* spp.

Izolat Isolate	Vrsta Species	Domaćin Host	Godina izolacije Year of isolation
KC-6	<i>C. gloeosporioides</i>	kruška/pear	2005
KC-9	<i>C. gloeosporioides</i>	kruška/pear	2005
KC-12	<i>C. gloeosporioides</i>	kruška/pear	2005
KC-21	<i>C. acutatum</i>	kruška/pear	2006
KC-23	<i>C. acutatum</i>	kruška/pear	2006
KC-82	<i>C. acutatum</i>	kruška/pear	2007
JC-4	<i>C. acutatum</i>	jabuka/apple	2007
JC-5	<i>C. gloeosporioides</i>	jabuka/apple	2007
JC-6	<i>C. gloeosporioides</i>	jabuka/apple	2008
JC-7	<i>C. gloeosporioides</i>	jabuka/apple	2008
VC-3	<i>C. gloeosporioides</i>	višnja sour cherry	2008
VC-5	<i>C. gloeosporioides</i>	višnja sour cherry	2008
VC-7	<i>C. gloeosporioides</i>	višnja sour cherry	2008
VC-9	<i>C. gloeosporioides</i>	višnja sour cherry	2008
PC-1	<i>C. acutatum</i>	paradajz/tomato	2008
PC-2	<i>C. acutatum</i>	paradajz/tomato	2008
PC-3	<i>C. acutatum</i>	paradajz/tomato	2007
PC-4	<i>C. acutatum</i>	paradajz/tomato	2007
PC-5	<i>C. acutatum</i>	paradajz/tomato	2008
PC-6	<i>C. acutatum</i>	paradajz/tomato	2008

REZULTATI

Ispitivanje usvajanja jedinjenja ugljenika. Od tri testirana izvora ugljenika, izolati *Colletotrichum* spp. najveći porast ostvaruju na podlozi sa KMC (69,70-97,01%), značajno manji na supstratu obogaćenom skrobom (23,04-38,50%), dok je najmanji porast zabeležen u prisustvu pektina (12,70-36,82%), (Graf. 1). Referentni sojevi *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* veoma specifično reaguju na prisustvo jedinjenja ugljenika u podlozi. Za *C. acutatum* (CBS 294.67) je karakteristično da u najvećem procentu usvaja sva tri izvora ugljenika, za razliku od referentnog soja *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) koji je gotovo indiferentan na prisustvo ovih jedinjenja i izdvaja se od ostalih po veoma slabom porastu na podlozi sa KMC-om (23,85%), skrobom (14,68%) i pektinom (11,01%).



Graf. 1 - Porast izolata *Colletotrichum* spp. na različitim izvorima ugljenika.

Chart 1 - Growth of isolates of *Colletotrichum* spp. on different sources of carbon.

Leveneovim testom utvrđena je nehomogenost varijansi izolata *Colletotrichum* spp. ($F=1,752$; $p=0,003$). Rezultati obrađeni analizom varijanse (MANOVA) kao dvofaktorijalni ogled ukazuju da između izolata, izvora ugljenika i njihovih interakcija postoje statistički veoma značajne razlike (Tabela 2).

Tabela 2 - Analiza varijanse porasta *Colletotrichum* spp. na različitim izvorima ugljenika.**Table 2** - Analysis of variance of mycelial growth of *Colletotrichum* spp. on different sources of carbon.

Izvori varijacije Source of variation	Stepeni slobode df	Sredine kvadrata MS	Količnik F	Nivo značajnosti p-level
izolati/isolates	21	0,08	466,12	0,000**
izvori C/sources of C	2	5,93	32605,76	0,000**
izolati x izvori C isolates x sources of C	42	0,01	59,12	0,000**
greška/error	132	0,00	-	-

** Statistički veoma značajna razlika ($p < 0,01$).

** Statistically very significant difference ($p < 0,01$).

Na osnovu Duncanovog testa određeni su nivoi značajnosti porasta izolata *Colletotrichum* spp. na svakom ispitivanom izvoru ugljenika (Tabela 3).

Na podlozi sa KMC-om izolati sa ploda kruške (osim KC-6) u međusobnim poređenjima ne manifestuju statistički značajne razlike. Takođe, razlike u porastu ne postoje ni između ovih kultura i izolata VC-5 i VC-7. Parnim poređenjima patogena JC-4 i JC-5, kao i JC-6 i JC-7 nisu konstatovane statistički značajne razlike u pogledu porasta kultura na supstratu sa KMC-om. Duncanovim testom nisu utvrđene značajne razlike ni između izolata sa paradajza i većine izolata poreklom sa višnje. Referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67) na podlozi sa KMC-om nije statistički značajno različit jedino od patogena JC-4 i JC-5, a *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) je po izrazito slabom porastu na ovom izvoru ugljenika, statistički značajno različit od ostalih ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Na podlozi obogaćenju škrobom nisu konstatovane statistički značajne razlike u porastu izolata KC-9, KC-12 i KC-21. Ove kulture se istovremeno ne razlikuju od većine izolata sa paradajza i višnje. Hromogeni izolati KC-23 i KC-82, na osnovu porasta na podlozi sa škrobom, takođe nisu statistički značajno različiti. Patogeni *Colletotrichum* spp. sa paradajza u međusobnim poređenjima ne manifestuju značajne razlike, a takođe ni u poređenjima sa izolatima VC-7 i VC-9. Referentni sojevi CBS 294.67 i CBS 516.97, su po svom porastu na podlozi sa škrobom statistički značajno različiti od ostalih izolata *Colletotrichum* spp.

Tabela 3 - Uticaj različitih izvora ugljenika na porast izolata *Colletotrichum* spp.

Table 3 - Effect of different carbon sources on growth of *Colletotrichum* spp.

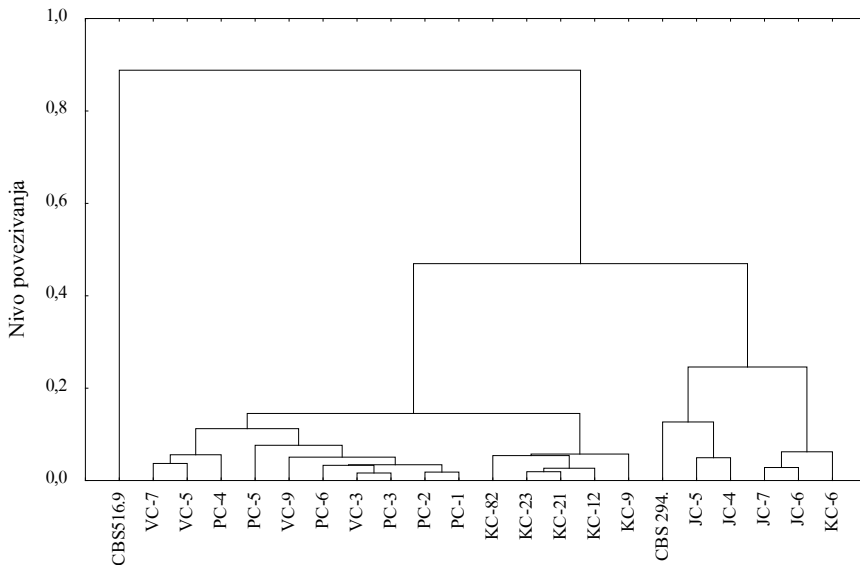
Izolat Isolate	Izvori ugljenika Sources of carbon					
	KMC KMC		Skrob Starch		Pektin Pectin	
KC-6	90.61	a*	38.50	p	30.52	m
KC-9	72.28	b	25.09	a	25.09	a
KC-12	71.06	bc	26.74	ab	21.61	b
KC-21	71.43	bcd	24.54	abc	20.15	bc
KC-23	69.63	bcde	25.19	abcd	20.00	bd
KC-82	69.70	bcdef	29.17	be	22.35	b
JC-4	97.01	g	44.78	r	36.82	n
JC-5	96.12	g	41.75	s	33.01	o
JC-6	89.72	ah	35.05	f	27.57	e
JC-7	87.50	h	35.65	f	25.93	ae
PC-1	76.67	i	28.33	beg	18.33	cdf
PC-2	76.45	ij	28.10	begh	16.53	fg
PC-3	78.15	ijk	27.31	abdeghi	19.33	cdfh
PC-4	74.59	bijl	26.23	abcdghij	12.70	i
PC-5	82.20	p	27.12	abcdeghijk	15.25	gj
PC-6	78.81	ijklm	27.12	abcdeghijkl	16.10	gjk
VC-3	79.02	ijkmn	28.57	beghijklm	18.75	cdfhl
VC-5	71.74	bcdefo	23.04	acdn	15.22	gjk
VC-7	73.25	bcdlno	25.00	abcdijklno	17.98	cdf-ghkl
VC-9	76.99	ijklm	26.55	abcdeghij-klmo	20.80	bcdhl
CBS 294.67	99.13	g	50.43	t	41.74	p
CBS 516.97	23.85	r	14.68	u	11.01	i

* Vrednosti u koloni označene istim slovom nisu statistički značajno različite na osnovu Duncan multiple range testa ($p < 0.05$).

* Means in column followed by the same letter are not statistically significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Na podlozi sa pektinom većina ispitivanih izolata su statistički značajno različiti. Izolati sa ploda kruške, KC-12, KC-21 i KC-23 u prisustvu pektina manifestuju porast koji nije statistički značajno različit. Ovi patogeni nisu značajno različiti ni od izolata PC-1, PC-3, VC-3, VC-7 i VC-9. Izolati JC-6 i JC-7, po porastu na podlozi obogaćenju pektinom, takođe nisu statistički značajno različiti. Većina patogena poreklom sa ploda paradajza i višnje formira kolonije koje po veličini nisu međusobno statistički značajno različite. Referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67) se na ovom ispitivanom izvoru ugljenika statistički značajno razlikuje od svih ostalih kultura *Colletotrichum* spp., a porast referentnog soja *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) nije značajno različit jedino od izolata PC-4.

Na osnovu ispoljenih sličnosti/razlika u pogledu porasta izolata *Colletotrichum* spp. na tri različita izvora ugljenika, urađen je dendrogram baziran na Euklidskoj distanci i kompletnom povezivanju (Graf. 2). Svi ispitivani izolati su svrstani u tri klastera. S obzirom na izrazito slabo usvajanje ispitivanih



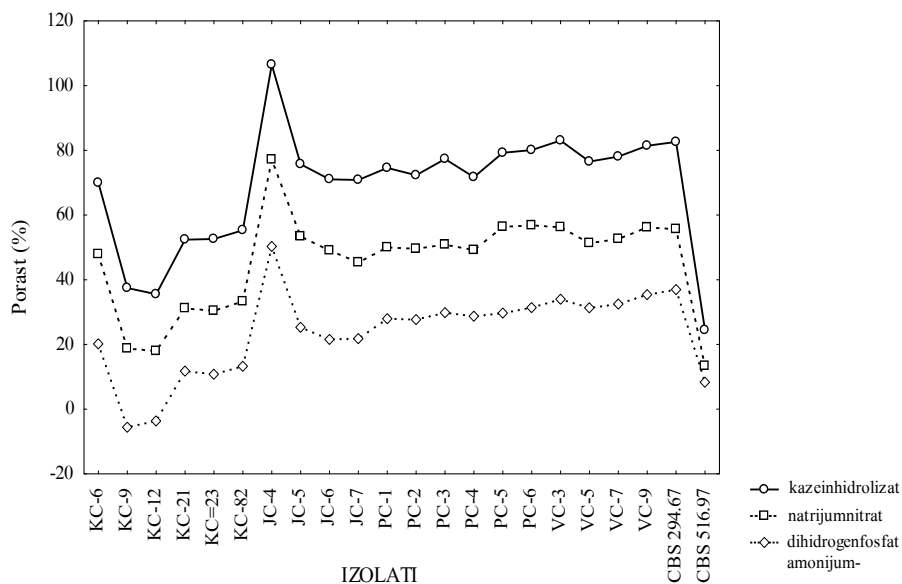
Graf. 2 - Dendrogram izolata *Colletotrichum* spp. na osnovu usvajanja različitih izvora ugljenika.

Chart 2 - Dendrogram of isolates of *Colletotrichum* spp. based on utilization of different sources of carbon.

jedinjenja ugljenika, referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) je izdvojen i formira prvi zasebni klaster. Drugi klaster je sačinjen od dva subklastera, sa 15 izolata poreklom sa različitih domaćina. Prvi subklaster obrazuju izolati porek-

lom sa višnje i paradajza, a drugom subklasteru osim hromogenih izolata pripada i KC-12, takođe sa ploda kruške. Treći klaster, takođe grade dva subklastera. Prvom suklasteru pripada referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67) i izolati JC-4 i JC-5. Drugi subklaster obrazuju preostala dva patogena poreklom sa jabuke (JC-6 i JC-7) i izolat KC-6 sa kruške. Osim izrazite specifičnosti referentnog soja *C. gloeosporioides*, ostale kulture *Colletotrichum* spp. su na formiranom dendogramu u većini slučajeva grupisane prema poreklu, odnosno biljci domaćinu.

Ispitivanje usvajanja jedinjenja azota. Od tri testirana jedinjenja azota, izolati *Colletotrichum* spp. u najvećem procentu usvajaju kazeinhidrolizat (24,42-100%), potom NaNO_3 (13,36-77,11%), a znatno manje $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (8,29-50,25%), (Graf. 3). Referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) na podlogama sa ispitivanim izvorima azota, kao i na podlogama sa ugljenikom, reaguje veoma specifično i u veoma niskim procentima usvaja navedena jedinjenja. Izolat JC-4 sa ploda jabuke, od svih ispitivanih kultura manifestuje najveći porast na podlogama sa kazeinhidrolizatom, NaNO_3 i $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Porast kultura KC-9 i KC-12 na osnovnoj podlozi sa $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ je za 5,62, odnosno 3,66% manji nego na kontrolnoj podlozi bez prisustva jedinjenja azota.



Graf. 3 - Porast izolata *Colletotrichum* spp. na različitim izvorima azota.

Chart 3 - Growth of isolates of *Colletotrichum* spp. on different sources of nitrogen.

Leveneovim testom utvrđena je homogenost varijansi izolata *Colletotrichum* spp. ($F=1,406$; $p=0,051$). Rezultati obrađeni analizom varijanse (MANOVA) kao dvofaktorijalni ogled ukazuju da između izolata, izvora azota i njihovih interakcija postoje statistički veoma značajne razlike (Tabela 4).

Tabela 4 - Analiza varijanse porasta *Colletotrichum* spp. na različitim izvorima azota.

Table 4 - Analysis of variance of mycelial growth of *Colletotrichum* spp. on different sources of nitrogen.

Izvori varijacije Source of variation	Stepeni slobode df	Sredine kvadrata MS	Količnik F	Nivo značajnosti p-level
izolati/isolates	21	0,21	1055,926	0,000**
izvori N/sources of N	2	3,34	16139,052	0,000**
izolati x izvori N isolates x sources of N	42	0,01	22,872	0,000**
greška/error	132	0,00	-	-

** Statistički veoma značajna razlika ($p<0,01$).

**Statistically very significant difference ($p<0,01$).

Na osnovu Duncanovog testa određeni su nivoi značajnosti porasta izolata *Colletotrichum* spp. na svim ispitivanim izvorima azota (Tabela 5).

Na podlozi obogaćenju kazeinhidrolizatom, nisu utvrđene statistički značajne razlike u međusobnim poređenjima izolata KC-6 i patogena JC-6 i JC-7, poreklom sa jabuke i PC-2 i PC-4 sa ploda paradajza. Takođe, parnim poređenjima porasta kultura KC-9 i KC-12, kao i hromogenih izolata KC-21 i KC-23, nisu utvrđene značajne razlike. Izolati sa jabuke (JC-5, JC-6 i JC-7) u pojedinim kombinacijama sa izolatima sa paradajza, ali i izolati sa ovog domaćina u poređenjima sa kulturama poreklom sa ploda višnje, ne manifestuju razlike koje su statistički značajne. Referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) je značajno različit u odnosu na ostale ispitivane izolate, a *C. acutatum* (CBS 294.67) se po porastu na podlozi sa kazeinhidrolizatom statistički ne razlikuje od PC-6, VC-3 i VC-9.

Tabela 5 - Uticaj različitih izvora azota na porast izolata *Colletotrichum* spp.**Table 5** - Effect of different nitrogen sources on growth of *Colletotrichum* spp.

Izolat Isolate	Izvori azota Sources of nitrogen					
	KH		NaNO ₃		NH ₄ H ₂ PO ₄	
KC-6	69.95	a*	47.89	a	20.19	a
KC-9	37.45	b	18.73	b	-5.62	b
KC-12	35.53	b	17.95	b	-3.66	b
KC-21	52.38	c	31.14	c	11.72	c
KC-23	52.59	c	30.37	c	10.74	cd
KC-82	55.30	p	33.33	p	13.26	cd
JC-4	106.47	r	77.11	r	50.25	r
JC-5	75.73	d	53.40	d	25.24	e
JC-6	71.03	ae	49.07	a,e	21.50	af
JC-7	70.83	aef	45.37	s	21.76	af
PC-1	74.58	dg	50.00	aef	27.92	g
PC-2	72.31	aefgh	49.59	aefg	27.69	egh
PC-3	77.31	di	50.84	efgh	29.83	ghi
PC-4	71.72	aefh	49.18	aefghi	28.69	ghij
PC-5	79.24	ij	56.36	j	29.66	ghij
PC-6	80.08	jl	56.78	jl	31.36	ijlm
VC-3	83.04	m	56.25	jlm	33.93	mn
VC-5	76.52	dgijn	51.30	defghin	31.30	ijlmno
VC-7	78.07	dijln	52.63	dhn	32.46	imno
VC-9	81.42	jlmo	56.19	jlmo	35.40	np
CBS 294.67	82.61	lmo	55.65	jlmo	36.96	p
CBS 516.97	24.42	s	13.36	t	8.29	d

* Vrednosti u koloni označene istim slovom nisu statistički značajno različite na osnovu Duncan multiple range testa ($p < 0.05$).

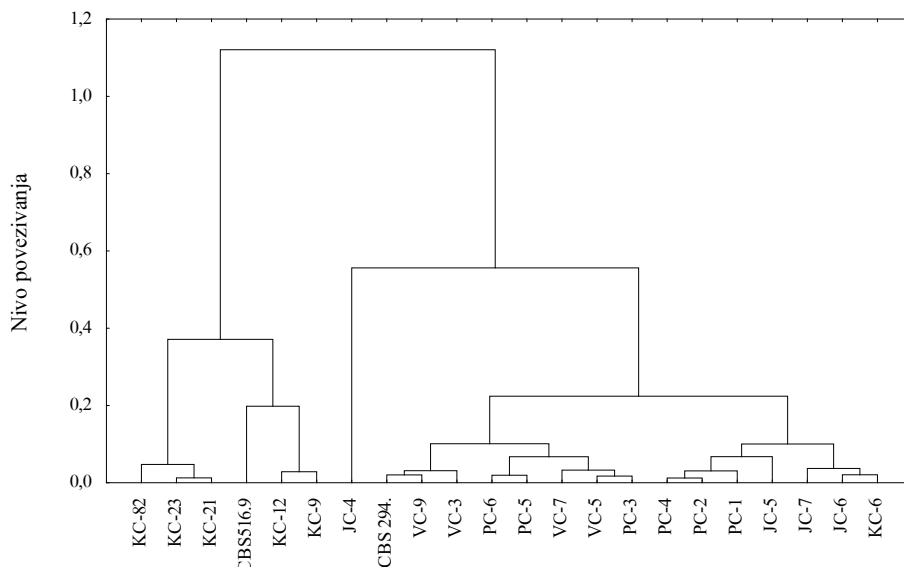
* Means in column followed by the same letter are not statistically significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Na podlozi sa NaNO₃ ne postoje statistički značajne razlike u porastu izolata KC-6, JC-6 i tri izolata sa paradajza, PC-1, PC-2 i PC-4. Statistički se značajno ne razlikuju ni hromogeni izolati KC-21 i KC-23. Patogen JC-5, sa ploda jabuke

se na podlozi obogaćenju ovim azotnim jedinjenjem značajno ne razlikuje od kultura sa višnje (VC-5 i VC-7), a izolat JC-6 od većine kultura *Colletotrichum* spp. sa paradajza (PC-1, PC-2, PC-3 i PC-4). Ova četiri izolata sa paradajza u međusobnim poređenjima ne manifestuju statistički značajne razlike, a razlike nisu konstatovane ni između ovih kultura i izolata VC-5. Takođe, porast kultura PC-5 i PC-6 nije statistički značajno različit od porasta izolata VC-7 i VC-9. Referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67) se na osnovu porasta na podlozi sa NaNO_3 značajno ne razlikuje od izolata PC-5, PC-6, VC-3 i VC-9, za razliku od *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) koji je na ovoj podlozi statistički značajno različit od izolata *Colletotrichum* spp.

Na osnovu porasta na podlozi obogaćenju sa $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, izolati KC-6, JC-6 i JC-7, zatim KC-9 i KC-12, kao i svi hromogeni izolati sa ploda kruške, nisu statistički značajno različiti. Takođe, značajnih razlika nema ni između izolata JC-6 i JC-7 i kultura *Colletotrichum* spp. sa paradajza. Izolati VC-3, VC-5 i VC-7 poreklom sa višnje, u međusobnim poređenjima ne manifestuju statistički značajne razlike, a izolat VC-9 po porastu na podlozi sa $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ nije značajno različit od referentnog soja *C. acutatum* (CBS 294.67). Porast referentnog *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) u prisustvu ovog jedinjenja azota, nije statistički značajno različit jedino od izolata KC-23, sa ploda kruške.

Na osnovu ispoljenih sličnosti/razlika u pogledu porasta izolata *Colletotrichum* spp. na tri različita izvora azota, urađen je dendrogram baziran na Euklidskoj distanci i kompletnom povezivanju (Graf. 4). Svi ispitivani izolati su svrstani u četiri klastera. Prvi klaster grade dva subklastera sa ukupno 6 izolata *Colletotrichum* spp. Hromogeni izolati, KC-21, KC-23 i KC-82 su u okviru prvog subklastera, a referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) i izolati KC-9 i KC-12 za koje je karakterističan veoma slab porast na podlogama obogaćenim jedinjenjima azota, pripadaju drugom subklasteru. S obzirom na izrazito visok procenat usvajanja sva tri izvora azota treći, zasebni klaster gradi izolat JC-4. Preostalih 15 izolata, uključujući i referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67) pripada četvrtom klasteru. U okviru ovog klastera formirana su dva subklastera sa izolatima koji se u većini slučajeva po porastu na podlogama sa azotom, statistički značajno ne razlikuju. Prvi subklaster obrazuju CBS 294.67, svi izolati sa ploda višnje i tri izolata sa paradajza (PC-3, PC-5 i PC-6). Drugom subklasteru pripadaju preostali izolati sa paradajza, jabuke i kruške. Kao i u prethodnom eksperimentu, klaster analiza je potvrdila heterogenost ispitivanih populacija *Colletotrichum* spp.



Graf. 4 - Dendrogram izolata *Colletotrichum* spp. na osnovu usvajanja različitih izvora azota.

Chart 4 - Dendrogram of isolates of *Colletotrichum* spp. based on utilization of different sources of nitrogen.

DISKUSIJA

Najznačajniji energetske izvori neophodni za rast i razmnožavanje gljiva su soli neorganskog porekla: kalcijumnitrat, natrijumnitrat i amonijumnhlorid; različita organska jedinjenja: kazein, kvašičev ekstrakt, malc ekstrakt i urea; ugljeni hidrati u obliku monosaharida (glukoza, fruktoza, galaktoza), disaharida (maltoza i saharoza), polisaharida (skrob i rafinoza), kao i alkoholi manitol i glicerol (Adejoye et al., 2006; Omanor et al., 2008). Navedena jedinjenja su primarni snabdevači ćelija ugljenikom i azotom, a od stepena njihove iskoristivosti zavisi vitalnost i infektivni potencijal patogena.

U našim istraživanjima kulture *Colletotrichum* spp. na podlogama obogaćenim sa tri različita jedinjenja ugljenika, u najvećem procentu usvajaju KMC, potom skrob, a znatno manje pektin. Referentni sojevi *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* se veoma specifično ponašaju u prisustvu testiranih izvora ugljenika. U poređenju sa ostalim izolatima, referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67) na supstratima sa KMC-om, skrobom i pektinom formira kolonije najvećeg prečnika. S druge strane, *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) je gotovo indiferentan

i izdvaja se od ostalih kultura po veoma niskim procentima usvajanja navedenih jedinjenja ugljenika.

Od tri jedinjenja azota, ispitivani izolati *Colletotrichum* spp. u najvećem procentu usvajaju kazeinhidrolizat, potom NaNO_3 , a znatno manje $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Prečnik kolonija izolata KC-9 i KC-12 (*C. gloeosporioides*) na osnovnoj podlozi obogaćenoj sa $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ je manji, nego na kontrolnoj podlozi bez prisustva ovog jedinjenja, pa se može govoriti o genetskoj varijabilnosti i netolerantnosti ovih kultura prema $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima autora koji su ispitivali uticaj različitih izvora ugljenika i azota na porast izolata *Colletotrichum* spp. Swart (1999) ističe da od testiranih izvora ugljenika izolati *C. gloeosporioides* procentualno najviše usvajaju KMC, potom skrob, pektin, manitol i sorbitol; a od jedinjenja azota kazeinhidrolizat i NaNO_3 , zatim NaNO_2 , a znatno manje $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ i ureu. Sangeetha and Rawal (2008), konstatuju da izolati *C. gloeosporioides* od više testiranih jedinjenja ugljenika u najvećem obimu usvajaju manitol, fruktozu i saharozu, a azot najčešće u formi nitratnih soli.

Iako su gljive roda *Colletotrichum*, a naročito *C. acutatum* i *C. gloeosporioides*, genetski veoma varijabilni i heterogeni organizmi, u ovim istraživanjima nisu konstatovane značajne razlike između ove dve vrste kada je u pitanju njihov razvoj na supstratima sa različitim izvorima ugljenika i azota.

ZAHVALNICA

Rad je realizovan u okviru Projekta TP 31018 Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije.

LITERATURA

- Adejoye O. D., Adebayo-Tayo B. C., Ogunjobi A. A., Olaoye O. A., Fadahunsi F. I. (2006): Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Pleurotus florida*, a Nigeria edible mushroom. African Journal of Biotechnology, 5 (14): 1355-1359.
- Bailey J.A., O Connell, R.J., Pring, R.J., Nash, C. (1992): *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. J.A. Bailey and M.J. Jeger, eds. CAB Int., Wallingford, UK.
- Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. (1998): Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits. Plant Disease, 82: 596-605.
- Ivanović, M., Duduk, B., Ivanović, M., Ivanović, M. (2007): Anthracnose – a new strawberry disease in Serbia and its control by fungicides. Proc. Nat. Sci. Matica Srpska, 113: 71-81.

- Omanor, I. B., Eziashi, E. I., Adekunle, A. A. (2008): Carbon nutrition in relation to growth of three *Monascus* species isolated from decaying date fruits. African Journal of Microbiology Research, Vol.(2): 153-155.
- Oritsejafor, J.J. (1986). Carbon and nitrogen nutrition in relation to growth and sporulation of *Fusarium oxysporium* f.sp. *elaedis*. Trans. Brit. Mycol Soc. 87(4): 519–524.
- Paterson, R.R.M., Bridge, P.D. (1994): Biochemical techniques for filamentous fungi. IMI Technical Handbooks No.1. CAB International, Wallingford.
- Swart, M.G. (1999): Comparative study of *Colletotrichum gloeosporioides* from avocado and mango. Thesis Ph.D., University of Pretoria, South Africa. <http://www.scielo.org>.
- Sangeetha, C.G., Rawal, R.D. (2008): Nutritional studies of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. The incitant of mango anthracnose. World Journal of Agricultural Sciences, 4 (6): 717-720.
- Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O., Taylor, P.W.J. (2008): Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. Plant Pathology, 57: 562-572.
- Wharton, P.S., Uribeondo J.D. (2004): The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del Jardín Botánico de Madrid, 61: 3-22.
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Balaž, J. (2008): *Colletotrichum acutatum* – prouzročivač antraknoze paradajza. IX Savetovanje o zaštiti bilja, Zlatibor, 24-28.11.2008., Zbornik rezimea: 85-86.
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Balaž, J. (2009): Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum* species from pear. IV Congress of the Serbian Genetic Society, Tara, June 1-5, 2009., Book of Abstracts: 251.
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Trkulja, N., Dolovac, N., Aleksić, G., Balaž, J. (2010): Morphological and molecular identification of *Colletotrichum acutatum* from tomato fruit. Pesticidi i fitomedicina, 25(3): 231-239.
- Živković, S. (2011): Uperedna proučavanja izolata *Colletotrichum* spp. prouzročivača antraknoze. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

(Primljeno: 30.09.2011.)

(Prihvaćeno: 10.11.2011.)

**EFFECT OF CARBON AND NUTRIGEN SOURCES
ON GROWTH OF *COLLETOTRICHUM* SPP.**

SVETLANA ŽIVKOVIĆ *, SAŠA STOJANOVIĆ, NENAD TRKULJA,
NENAD DOLOVAC, TATJANA POPOVIĆ, ŽARKO IVANOVIĆ
Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade, Serbia
*e-mail: zivkovicsvetla@gmail.com

SUMMARY

In Serbia, the occurrence of anthracnose on pear, apple, sour cherry, and tomato fruits has been recorded during the last several years. *Colletotrichum* spp. were isolated from all diseased fruits. Twenty monoconidial isolates were selected for comparative studies, and the reference strains of *C. acutatum* (CBS 294.67) and *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) were used as a control. The physiological studies have included the investigation of the effect of different sources of carbon and nitrogen on growth of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*. The results indicated that carboxymethyl cellulose was the most appropriate source of carbon for the growth of isolates of *Colletotrichum* spp. Of the three nitrogen sources studied, the best growth of all tested fungi was recorded on the media with casein hydrolysate.

Key words: *Colletotrichum* spp., carbon, nitrogen, growth.

(Received: 30.09.2011.)

(Accepted: 10.11.2011.)