

FIZIOLOŠKA ISPITIVANJA IZOLATA *COLLETOTRICHUM* SPP.

SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹, VELJKO GAVRILOVIĆ¹, NENAD TRKULJA¹, DUŠICA DELIĆ², SAŠA STOJANOVIĆ¹

¹Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd

²Institut za zemljište, Beograd

e-mail: zivkovicsvetla@gmail.com

REZIME

U fiziološka ispitivanja su uključena 20 izolata *Colletotrichum* spp. poreklom sa plodova kruške, jabuke, višnje i paradajza, kao i referentni sojevi *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Rezultati ukazuju da pet različitih hranljivih podloga (PDA, CA, OA, MEA, CDA) sedam različitih pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) i temperatura (5^o, 10^o, 15^o, 20^o, 25^o, 30^o, 35^oC) imaju značajan uticaj na razvoj i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp. Sve testirane podloge, izuzev CDA su pogodne za razvoj patogena. Na podlozi PDA moguće je razlikovati pet morfoloških grupa kolonija, što potvrđuje fenotipsku varijabilnost proučavanih kultura. Podloge pH 6 i 7 su najbolje za porast i sporulaciju patogena. Optimalna temperatura za razvoj ispitivanih kolonija je 25°C, a temperature od 20° i 25°C su najpovoljnije za sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Ključne reči: *Colletotrichum* spp., fiziologija, porast micelije, sporulacija

UVOD

Gljive *Colletotrichum* spp. (teleomorf *Glomerella*), su polifagne i kosmopolitske vrste umerenog i tropskog klimatskog područja. U zavisnosti od uslova sredine, osetljivosti biljke domaćina i infekcionog potencijala, pripadnici ovog roda su epifiti, endofiti, saprobi ili patogeni (Liu et al., 2007; Promputtha et al., 2007). Kao biljni paraziti, *Colletotrichum* spp. prouzrokuju ekonomske gubitke na žitaricama, legumi-

nozama, povrtarskim i voćarskim kulturama, šumskom i ukrasnom bilju, kao i vrstama iz spontane flore. Simptomi antraknoze prouzrokovani gljivama *Colletotrichum* spp. se mogu manifestovati na svim podzemnim i nadzemnim biljnim organima: korenovom sistemu, krtolama, stablu, listovima, cvetu i plodu (Bailey et al., 1992).

Faktori životne sredine imaju važnu ulogu u ostvarivanju infekcije i razvoju antraknozno procesa na biljci domaćinu. Intenzitet i dužina

trajanja padavina, temperatura vazduha i disperzija patogena značajno utiču na stepen ispoljenih simptoma (Dodd et al., 1992). Ustanovljeno je da razvoju bolesti u poljskim uslovima pogoduju povišena temperatura (>27°C) i vlažnost vazduha (č80%), (Roberts et al., 2001).

Usled ostvarivanja latentnih infekcija do pojave antraknoze može doći i nakon berbe plodova (Freeman et al., 1998). Sposobnost izazivanja latentne infekcije je primarna karakteristika vrsta roda *Colletotrichum* (Sinclair, 1999). Do manifestacije simptoma dolazi prelaskom gljive na nekrotrofni oblik parazitiranja što je uslovljeno većim brojem faktora. Primarni činioci u procesu transformacije patogena iz biotrofne u nekrotrofnu fazu su povećana temperatura i vlažnost vazduha, kao i hemijske reakcije u tkivu biljke domaćina (Leandro et al., 2003; Peres et al., 2005).

S obzirom da je u našoj zemlji proteklih godina utvrđeno značajno prisustvo gljiva - prouzrokovala antraknoze plodova voća i povrća (Živković, 2011), kao i da su fiziološka proučavanja od velikog značaja za biologiju patogena, cilj ovog rada je ispitati uticaj hranljivih podloga, kiselosti podloge i temperatura na razvoj i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp., poreklom iz Srbije.

MATERIJAL I METODE

Standardnim fitopatološkim metodama iz plodova sa karakterističnim simptomima antraknoze dobijen je veliki broj izolata *Colletotrichum* spp. U fiziološka ispitivanja su uključeni: izolati sa ploda kruške (KC-6, KC-9, KC-12, KC-21, KC-23, KC-82); jabuke (JC-4, JC-5, JC-6 i JC-7); višnje (VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9), paradajza (PC-1, PC-2, PC-3, PC-4, PC-5 i PC-6), kao referentni sojevi *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) i *C. acutatum* (CBS 294.67) iz kolekcije Centraalbu-

reau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Holandija.

Uticaj hranljivih podloga na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Ispitivanje uticaja hranljivih podloga na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp., obavljeno je na: PDA (potato dextrose agar), CA (carrot agar), OA (oatmeal agar), MEA (malt extract agar) i CDA (Czapek-Dox agar) podlozi, (Dhingra and Sinclair, 1986).

U Petri kutije (Ø 90 mm) je razlivano po 20 ml odgovarajuće sterilne hranjive podloge. Zasejavanje podloga je izvršeno nanošenjem fragmenata micelije ispitivanih izolata (Ø 5 mm) iz kultura starih 7 dana, odgajanih na PDA podlozi. Diskovi micelija su postavljeni su u centar Petri kutija, a zasejane podloge su potom inkubirane u termostatu na temperaturi od 25°C. Porast izolata *Colletotrichum* spp. ocenjen je sedmog dana merenjem prečnika kolonije. Prema terminologiji Hawksworth et al. (1995) opisani su: izgled, boja i struktura micelije, ivice kolonije, naličje kulture i pojava zoniranosti.

Intenzitet sporulacije proučavanih izolata određen je dve nedelje nakon zasejavanja. Suspenzije konidija su pripremane od kultura gljiva odgajanih na temperaturi od 25°C. U razvijene kolonije nalivano je 10 ml sterilne vode, nakon čega je micelija odvajana od podloge blagim struganjem pomoću staklenog štapića u cilju oslobađanja formiranih konidija. Suspenzija gljiva je proceđena kroz dva sloja sterilne gaze, a koncentracija spora (10⁶ konidija/ml) izmerna pomoću hemocitometra. Stepenn sporulacije izolata *Colletotrichum* spp. prikazan je prema skali Quesada and Lopez (1980), gde je: + slaba sporulacija (<5.000 konidija/ml); ++ srednja sporulacija (5.000 – 10.000 konidija/ml); +++ obilna sporulacija (>10.000 konidija/ml).

Uticaj kiselosti podloge na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Ispitivanje uticaja kiselosti podloge na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp., obavljeno je na podlozi PDA. Kiselost podloge je podešena pre sterilizacije na pH-metru dodavanjem 1M HCl i 1M NaOH, na sledeće pH vrednosti: 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9. Po završetku sterilizacije pH je proverena u mlakoj, rastopljenoj podlozi pomoću indikator papira (Universalindikator pH 0-14, Merck). Izolati su zasejavani i inkubirani na 25°C tokom 7 dana, a potom je obavljeno merenje prečnika kolonija. Intenzitet sporulacije je određen nakon dve nedelje prema prethodno opisanoj metodi (Quesada and Lopez, 1980).

Uticaj temperature na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Ispitivanje uticaja temperature na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp. obavljeno je na sledećim temperaturama: 5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30° i 35°C. Ispitivani izolati su zasejavani na PDA podlogu, inkubirani u termostatu 7 dana, a nakon toga obavljeno je merenje prečnika kolonija. Po isteku dve nedelje, prema navedenoj metodi (Quesada and Lopez, 1980), određen je intenzitet sporulacije izolata *Colletotrichum* spp.

Statistička obrada rezultata

Fiziološka ispitivanja izolata *Colletotrichum* spp. izvedena su u tri ponavljanja. Analiza uticaja dva faktora obavljena je primenom parametarskog modela analize varijanse (ANOVA/MANOVA), a provera adekvatnosti ovog modela za svaku konkretnu analizu sprovedena je na osnovu vrednosti Leveneovog testa za homogenost varijansi. Ispitivani izolati *Colletotrichum* spp. grupisani su modelom klaster analize, baziranoj na Euklidskoj distanci i kompletnom povezivanju. Statistička obrada rezultata obavljena

je upotrebom paketa STATISTICA v. 6 (StatSoft, Inc.).

REZULTATI

Uticaj hranljivih podloga na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Rezultati ispitivanja pokazuju da hranljive podloge značajano utiču na izgled i brzinu porasta micelije, kao i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

PDA podloga predstavlja generalno najpovoljniji supstrat za većinu ispitivanih izolata (Sl. 1.B). Na ovoj podlozi proučavane kulture formiraju pet jasno diferenciranih morfoloških grupa. Prvu grupu čine izolati *Colletotrichum* spp. 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 najbližiji referentnom izolatu *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). Starenjem kulture postaju tamno-sivo-maslinaste, 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), intenzivnog porasta i karakteristične ružičaste boje. Razvojem kolonija dolazi do pojave zoniranosti i formiranja koncentrično raspoređenih ili nepravilno razbacanih acervula iz kojih se u žutonarandžastom matriksu oslobađaju konidije. 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 sveto do tamno sive, umerenog porasta, nepravilnih ivica, a sa naličja je uočena pojava naranžastih i svetlomrkih koncentričnih zona. 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. Starenjem kulture poprimaju karakterističan

zonirani izgled. Na osnovu morfoloških osobina izolati sa paradajza (PC-1, PC-2, PC-3, PC-4, PC-5, PC-6) su izdvojeni u posebnu, petu grupu. Kolonije su znatno svetlije boje, rastresite konzistencije, umerenog porasta i po ovom obeležju su bliski trećoj grupi izolata, kojoj pripada i referentni *C. acutatum* (CBC 294.67). Na PDA supstratu većina ispitivanih patogena izrazito dobro sporuliše (Tabela 1). Slabu fruktifikaciju na ovoj podlozi manifestuju samo izolati poreklom sa ploda višnje (VC-3, VC-5, VC-7, VC-9).

Na CA podlozi izolati *Colletotrichum* spp. najčešće formiraju supstratnu miceliju, u većini slučajeva karakterističnog izgleda. Hromogeni izolati sa kruške (KC-21, KC-23 i KC-82) su nešto intenzivnije, tamno ružičaste boje i svetlije centralne zone, a izolat JC-4 sa ploda jabuke, obrazuje kompaktnu tamnosivu koloniju sa jasno izdiferenciranim perifernim prstenom, svetlonarandžaste boje. Ivice kolonija svih proučavanih izolata su ravne, pravilne (osim izolata VC-9) i blago utonule u supstrat. Sa naličja kultura nije utvrđeno formiranje stromatičnih tvorevina. Na CA podlozi kod svih izolata je konstatovana umerena do obilna fruktifikacija (Tabela 1).

Na podlozi OA većina izolata *Colletotrichum* spp. obrazuje bujnu, vunastu miceliju, svetlijeg kolorita (hromogeni izolati su izrazito svetloružičasti, a ostali svetlosive do beličastosive boje), (Sl. 1.C). Izolat sa paradajza, PC-3 obrazuje koncentrične zone vazdušaste i supstratne micelije, a karakterističnu svetlonarandžastu koloniju na OA supstratu formira referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67). Ivice kultura su pravilne i cele, osim kod referentnog *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) čije se periferna zona zrakasto širi. Sa naličja, zbog gustine supstrata obojenost kultura nije jasno izdiferencirana, a takođe nije uočeno obrazovanje stromatičnih struktura. Za većinu izolata ovo je izrazito pogodna sredina za sporulaciju (Tabela 1).

Izolati *Colletotrichum* spp. na MEA podlozi formiraju izrazito svetle, kompaktne kolonije, pravilnih ili blago talasastih ivica. Izolati KC-6, KC-9 i KC-12, kao i svi patogeni sa jabuke, višnje i paradajza su gotovo identične beličastosive boje i pamučaste teksture. Hromogeni izolati KC-21, KC-23 i KC-82 su blede ružičasti, a referentni soj *C. acutatum* svetlonarandžaste boje i supstratne micelije. Sa naličja sve kolonije zadržavaju svoj karakterističan izgled, a u većini slučajeva nakon dve nedelje dolazi do formiranja začetaka stromatičnim tvorevina. Isključujući izolate poreklom sa višnje, ostale kulture *Colletotrichum* spp. manifestuju umerenu sporulaciju na MEA podlozi (Tabela 1).

Na podlozi CDA svi ispitivani patogeni *Colletotrichum* spp. obrazuju miceliju slabe bujnosti i brašnaste teksture (Sl. 1.A). Izolati KC-6 i KC-9 su sive boje, a ostali (osim grupe hromogenih izolata sa kruške) prljavobeli do snežno beličasti. Izolati KC-21, KC-23 i KC-82 na CDA podlozi formiraju kolonije tamnonarandžasto boje. Periferna zona svih izolata je blago režnjevita ili nepravilna, a sa naličja nije uočeno obrazovanje stromatičnih struktura. CDA podloga je veoma nepovoljna za sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp. (Tabela 1).

Pored morfoloških osobina i različitog stepena sporulacije, izolati *Colletotrichum* spp. manifestuju i različitu brzinu porasta na ispitivanim hranljivim podlogama (Sl. 2). U proseku, najpovoljnija podloga za porast proučavanih izolata je PDA. Na ovom supstratu slab porast ispoljavaju samo patogeni poreklom sa višnje i izolat JC-4. Na podlogama CA i OA najveći prečnik kolonije, sedam dana nakon zasejavanja formirali su izolati KC-9, KC-12, KC-21, KC-23 i KC-82, sa ploda kruške. Od svih testiranih hranljivih podloga OA se pokazala najpovoljnijom za porast patogena VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9. Na MEA ispitivani izolati su ispoljili gotovo ujednačen porast. Ovaj

supstrat je najnepovoljniji za razvoj referentnog soja *C. acutatum* (CBS 294.67). Najslabiji porast svih proučavanih kultura *Colletotrichum* spp. je zabeležen na CDA podlozi. Referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) u poređenju sa ostalim izolatima, manifestuje izrazito brz porast na svih hranljivim supstratima.

Na osnovu Leveneovog testa konstatovana je nehomogenost varijansi patogenih kultura *Colletotrichum* spp. ($F=4,919$; $p=0,000$). Dobijeni rezultati su obrađeni analizom varijanse (MANOVA), kao dvofaktorijalni ogled. Vrednosti MANOVE ukazuju da između izolata, hranljivih podloga i njihovih interakcija postoje statistički veoma značajne razlike (Tabela 2).

Na osnovu ispoljenih sličnosti/razlika u pogledu porasta izolata *Colletotrichum* spp. na pet hranljivih podloga, urađen je dendogram baziran na Euklidskoj distanci i kompletnom povezivanju (Sl. 3). Svi ispitivani izolati su svrstani u tri klastera. Najveću razliku u pogledu porasta na različitim hranljivim supstratima ispoljava referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) i on formira prvi klaster. Drugi klaster je obrazovan od dva subklastera. Izolati poreklom sa ploda paradajza su svrstani u prvi subklaster, a patogeni poreklom sa višnje i izolat JC-4 pripadaju drugom subklasteru. U okviru trećeg klastera se nalaze dva subklastera. Prvi subklaster čine izolati KC-82, KC-21, KC-12, KC-23, a drugi referentni *C. acutatum*, patogene kulture sa jabuke i izolat KC-6. Klaster analiza je potvrdila heterogenost ispitivanih populacija *Colletotrichum* spp. Najmanje razlike u porastu na različitim hranljivim podlogama u većini slučajeva manifestuju izolati poreklom sa istog domaćina.

Uticaj kiselosti podloge na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Većina izolata nije značajno varirala u morfološkim osobinama kolonija koje su formi-

rane na različitim pH vrednostima. Na podlozi pH 3, svi izolati obrazuju kompaktnu sivo beličastu miceliju, izrazito slabe bujnosti (Sl. 4.A). Ivične zone su pravilne ili blago talasaste, a sa naličja kultura nisu konstatovani začeci formiranja stromatičnih tvorevina. Sporulacija izolata *Colletotrichum* spp. na podlozi ove kiselosti je izrazito slaba (Tabela 3).

PDA podloga kiselosti pH 4 je znatno povoljnija za razvoj ispitivanih izolata. Sve kulture (uključujući i hromogene izolate sa ploda kruške) su u centralnoj zoni svetlo do tamno sive boje, a micelija je kompaktna i brašnastog izgleda. Ivice kolonija su ravne, pravilne i blago uto-nule u supstrat. Sa naličja kultura nije utvrđeno formiranje stromatičnih struktura. Na pH 4 svi izolati *Colletotrichum* spp. manifestuju fruktifikaciju slabog ili umerenog intenziteta (Tabela 3).

Na podlogama pH 5, 6, 7 i 8 svi proučavani izolati obrazuju kolonije karakterističnog izgleda: svetlo do tamnosive (izolati poreklom sa jabuke, višnje, paradajza i nehromogeni izolati sa ploda kruške) i ružičaste boje (hromogeni izolati sa ploda kruške), (Sl. 4.B). U centralnom delu micelija je homogena, vunasta, a u perifernoj zoni vazdušasta i rastrestita. Na PDA pH 5, 6 i 7 kulture su intenzivne bujnosti i ujednačenih fenotipskih karakteristika, a sa naličja je zabeležena pojava stromatičnih tvorevina. Sporulacija izolata je umerena ili obilna. Podloga sa pH vrednošću 8 je nešto nepovoljnija za razvoj ispitivanih kultura *Colletotrichum* spp. Na naličju nisu konstatovane stromatične tvorevine, a fruktifikacija najvećeg broja izolata je umerena (Tabela 3).

Na podlozi pH 9 sve formirane kolonije *Colletotrichum* spp. su slabije bujnosti, sa svetlo obojenom micelijom, pamučaste strukture (Sl. 4.C). Ivična zona je cela ili blago nepravilna. Sa naličja nije uočeno obrazovanje stroma. Bazna sredina nije pogodovala za sporulaciju, pa većina

ispitivanih izolata (osim KC-21, KC-23 i KC-82), fruktificira veoma slabo (Tabela 3).

Osim morfoloških karakteristika i različitog stepena sporulacije, izolati *Colletotrichum* spp. manifestuju i neujednačen porast na PDA podlozi različite kiselosti (Sl. 5). Za većinu izolata najpovoljnija pH vrednost hranljivog supstrata je 6. Na podlozi ove kiselosti najveći prečnik kolonije formiraju patogeni KC-6, KC-9, KC-12, svi izolati sa ploda jabuke i paradajza, kao i referentni soj *C. acutatum* CBS 294.67. PDA kiselosti 7 je najpovoljniji za porast hromogenih izolata sa kruške (KC-21, KC-23 i KC-82), za razliku od kultura poreklom sa antraknoznih plodova višnje (VC-3, VC-5, VC-7 i VC-9) kojima više pogoduje kiselijska sredina, vrednosti pH 5. Na podlozi pH 8 gotovo svi izolati znatno brže obrazuju kolonije, nego na PDA kiselosti 4. Takođe, ekstremno bazna sredina, pH 9 je znatno povoljnija za porast svih ispitivanih kultura od podloge pH vrednosti 3. Za razvoj referentnog soja *C. gloeosporioides* CBS 516.97 podjednako su dobri hranljivi supstrati čija je pH 5, 6 i 7.

Leveneovim testom utvrđena je nehomogenost varijansi kultura *Colletotrichum* spp. ($F=5,395$; $p=0,000$). Rezultati obrađeni analizom varijanse (MANOVA) kao dvofaktorijski ogled ukazuju da između izolata, pH vrednosti podloge i njihovih interakcija postoje statistički veoma značajne razlike (Tabela 4).

Na osnovu ispoljenih sličnosti/razlika u pogledu porasta izolata *Colletotrichum* spp. na sedam različitih pH vrednosti PDA podloge, urađen je dendrogram baziran na Euklidskoj distanci i kompletnom povezivanju (Sl. 6). Svi ispitivani izolati su svrstani u tri klastera. Najveću razliku u pogledu porasta na različitim pH vrednostima ispoljava referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) i on formira prvi klaster. Drugi klaster sačinjavaju dva subklastera sa po 11 izolata

Colletotrichum spp. Patogeni poreklom sa ploda paradajza i izolat JC-4 sa ploda jabuke svrstani su u prvi, a patogeni poreklom sa višnje u drugi subklaster. Treći klaster takođe grade dva subklastera, od kojih prvi čine izolati poreklom sa ploda kruške (KC-82, KC-23, KC-21, KC-12, KC-9 i KC-6) i referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67), a drugi patogene kulture sa jabuke (JC-5, JC-6 i JC-7). Klaster analiza urađena na osnovu porasta kultura na PDA podlozi različite kiselosti je potvrdila heterogenost ispitivanih populacija *Colletotrichum* spp.

Uticaj temperature na porast i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Rezultati ispitivanja pokazuju da sve temperature značajno utiču na morfološke karakteristike, brzinu porasta micelije i sporulaciju izolata *Colletotrichum* spp.

Temperatura od 5°C je najpovoljnija za razvoj svih ispitivanih izolata. Sedam dana nakon zasejavanja, oko nanetih fragmenata gljive formiraju se nežni, prozračni začeci hifa (Sl. 7A). Na ovoj temperaturi nivo sporulacije je izrazito nizak, a kod pojedinih izolata *Colletotrichum* spp. fruktifikacija nije konstatovana (KC-6, KC-9, KC-12, CBS 294.67 i CBS 516.97), (Tabela 5).

Ograničavajući faktor rasta većine proučavanih izolata je i temperatura od 10°C. Svi izolati na ovoj temperaturi obrazuju miceliju beličast-sive boje, vazdušastu i prozračnu, bez jasnih granica između centralne i periferne zone. Kulture *Colletotrichum* spp. poreklom sa ploda kruške, izolati sa jabuke, kao i referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) manifestuju nešto veći porast na ovoj temperaturi. Na 10°C sporulacija svih izolata je slaba (Tabela 5), a na naličju nije uočeno formiranje stromatičnih struktura.

Na temperaturama od 15°, 20° i 25°C, proučavani patogeni obrazuju kolonije karakterističnog izgleda, (Sl. 7B). Hromogeni izolati sa ploda

kruške (KC-21, KC-23 i KC-82) su ružičaste boje i bujne micelije, pravilnih ivica, a sa naličja je konstatovano formiranje stromatičnih struktura. Kolonije ostalih izolata su bečičastosive do sivo-maslinaste, pamučaste ili vunaste strukture i u većini slučajeva sa jasno izdiferenciranim svetlo obojenim perifernim prstenom. Na ovim temperaturama sporulacija izolata *Colletotrichum* spp. je umerena do obilna (Tabela 5).

Temperatura od 30°C je znatno nepovoljnija za porast i formiranje kolonija proučavanih patogeni. Micelija je slabe bujnosti, pamučasta i kompaktna, sa ivicama koje su blago utonule u supstrat. Svi izolati zadržavaju karakterističnu obojenost, ali sa naličja kultura nije konstatovano formiranje stromatičnih tvorevina. Referentni sojevi *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) su dobre bujnosti i za razliku od ostalih ispitivanih patogeni manifestuju visok stepen sporulacije (Tabela 5).

Na temperaturi od 35°C gotovo svi izolati obrazuju kolonije izrazito slabe bujnosti, tamnomrke boje, kompaktne, brašnaste teksture, sa prozračnom perifernom zonom, potpuno utonulom u supstrat (Sl. 7C). Na ovoj temperaturi micelija referentnog soja *C. gloeosporioides* (CBS 516.97) je bujna, karakterističnog izgleda i kolorita i umerenog nivoa sporulacije. Svi ostali izolati *Colletotrichum* spp. na 35°C fruktificiraju izrazito slabo (Tabela 5).

Pored morfoloških osobina i različitog stepena sporulacije, izolati *Colletotrichum* spp. ispoljavaju i različitu brzinu porasta na ispitivanim temperaturama (Sl. 8). Osim izolata JC-4 koji najveći porast manifestuje na 20°C, svi ostali patogeni najveći prečnik kolonija formiraju na temperaturi od 25°C. Eksperimentom je utvrđeno da su minimalne i maksimalne vrednosti temperatura za porast proučavanih izolata *Colletotrichum* spp., ispod 5°C, odnosno preko 35°C. Niske temperature su pogodnije za većinu pa-

togena, osim za referentne sojeve *C. acutatum* (CBS 294.67) i *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). S obzirom da su u pitanju izolati poreklom iz Australije i Novog Zelanda, porast ovih kultura je intenzivniji na višim temperaturama.

Leveneovim testom je utvrđena nehomogenost varijansi patogenih kultura *Colletotrichum* spp. ($F=2,221$; $p=0,000$), a rezultati su obrađeni analizom varijanse (MANOVA) kao dvofaktorijalni ogled. Utvrđeno je da između izolata, temperatura i njihovih interakcija postoje statistički veoma značajne razlike (Tabela 6).

Na osnovu ispoljenih sličnosti/razlika u pogledu porasta izolata *Colletotrichum* spp. na sedam različitih temperatura, urađen je dendrogram baziran na Euklidskoj distanci i kompletnom povezivanju (Sl. 9). Svi ispitivani izolati su svrstani u tri klastera. Najveću razliku u pogledu porasta na različitim temperaturnim vrednostima manifestuje referentni soj *C. gloeosporioides* (CBS 516.97), koji formira prvi zasebni klaster. Drugom klasteru pripada referentni soj *C. acutatum* (CBS 294.67). Treći klaster obrazuju dva subklastera sa preostalih 20 izolata *Colletotrichum* spp. U okviru prvog subklastera izdvaja se izolat JC-4 sa ploda jabuke, a patogeni poreklom sa ploda paradajza i višnje grupisani su i formiraju dva zasebna podklastera. Drugi subklaster u okviru trećeg klastera takođe grade dva manja podklastera, od kojih prvi čine hromogeni izolati poreklom sa ploda kruške (KC-82, KC-23, KC-21), a drugi patogene kulture sa jabuke (JC-5, JC-6 i JC-7) i nehromogeni izolati sa kruške (KC-12, KC-9 i KC-6). Klaster analiza urađena na osnovu porasta kultura na različitim temperaturama, ukazuje na izrazitu varijabilnost i heterogenost ispitivanih populacija *Colletotrichum* spp.

Tabela 1. Sporulacija izolata *Colletotrichum* spp. na različitim hranljivim podlogama.
Table 1. Sporulation of isolates of *Colletotrichum* spp. on different culture media.

Izolat Isolate	Hranljiva podloga Culture medium				
	PDA	CA	OA	MEA	CDA
KC-6	+++	++	+++	++	+
KC-9	+++	++	+++	++	+
KC-12	+++	++	+++	++	+
KC-21	+++	+++	+++	++	+
KC-23	+++	+++	+++	++	+
KC-82	+++	+++	+++	++	+
JC-4	+++	++	+++	++	+
JC-5	+++	++	++	++	+
JC-6	+++	++	++	++	+
JC-7	+++	++	++	++	+
PC-1	+++	++	+++	++	+
PC-2	+++	++	+++	++	+
PC-3	+++	++	+++	++	+
PC-4	+++	++	+++	++	+
PC-5	+++	++	+++	++	+
PC-6	+++	++	+++	++	+
VC-3	+	++	++	+	+
VC-5	+	++	++	+	+
VC-7	+	++	++	+	+
VC-9	+	++	++	+	+
CBS 294.67	+++	++	+++	++	+
CBS 516.97	+++	++	+++	++	+

Tabela 2. Analiza varijanse porasta micelije izolata *Colletotrichum* spp. na različitim podlogama.
Table 2. Analysis of variance of mycelial growth of isolates of *Colletotrichum* spp. on different media.

Izvori varijacije Sources of variation	Stepeni slobode	Sredine kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	df	MS	F	p
Izolati Isolates	21	746,201	1366,139	0,000**
Podloge Media	4	3267,485	5982,081	0,000**
Izolati x podloge Isolates x media	84	47,888	87,674	0,000**
Greška Error	220	0,546	-	-

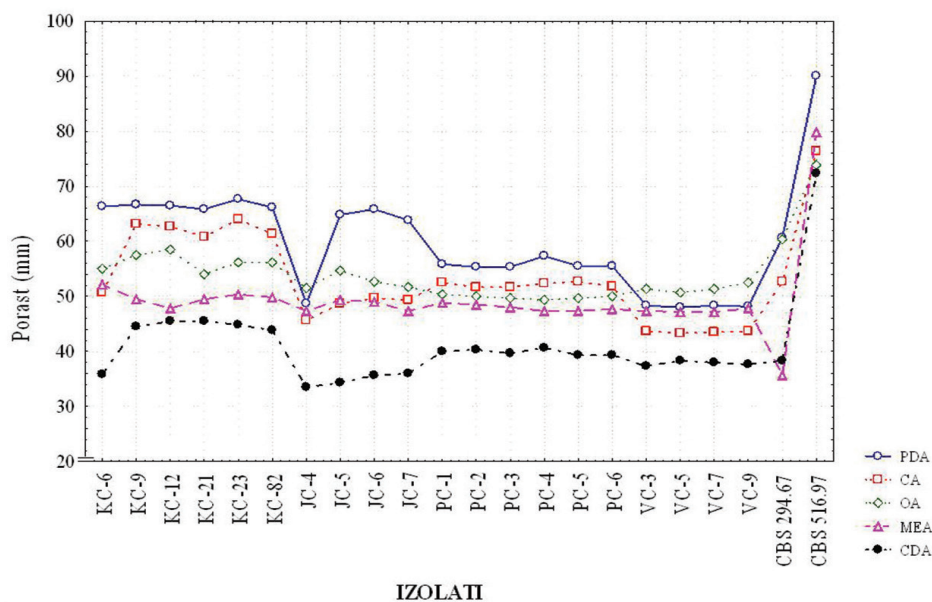
** Statistički veoma značajna razlika, $p < 0,01$;

** Statistically very significant difference, $p < 0.01$.



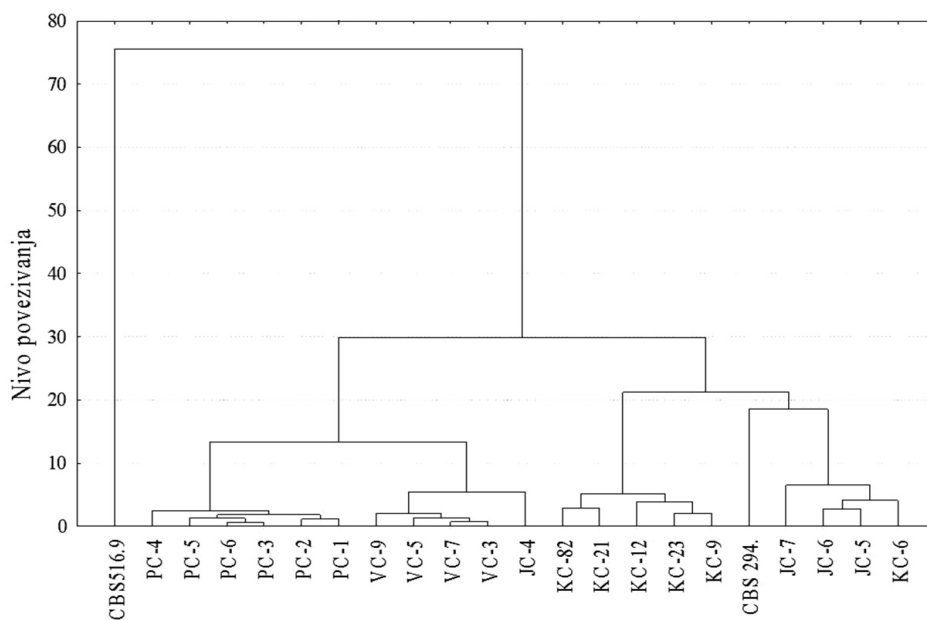
Sl. 1. Izolati *Colletotrichum* spp. na hranljivim podlogama: A. CDA; B. PDA; C. OA; (s leva na desno gornji red: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; sredina: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; donji red: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).

Fig. 1. Isolates of *Colletotrichum* spp. on culture media: A. CDA; B. PDA; C. OA; (from left to right top row: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; middle: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; bottom row: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).



Sl. 2. Porast micelije izolata *Colletotrichum* spp. na različitim hranljivim podlogama.

Fig. 2. Mycelial growth of isolates *Colletotrichum* spp. on different culture media.



Sl. 3. Dendrogram izolata *Colletotrichum* spp. na osnovu porasta micelije na različitim hranljivim podlogama.

Fig. 3. Dendrogram of isolates of *Colletotrichum* spp. based of mycelial growth on different culture media.

Tabela 3. Sporulacija izolata *Colletotrichum* spp. na različitim pH podloge.
Table 3. Sporulation of isolates of *Colletotrichum* spp. on different medium pH.

Izolat Isolate	pH						
	3	4	5	6	7	8	9
KC-6	+	+	++	+++	+++	++	+
KC-9	+	+	++	+++	+++	++	+
KC-12	+	+	++	+++	+++	++	+
KC-21	+	++	+++	+++	+++	++	++
KC-23	+	++	+++	+++	+++	++	++
KC-82	+	++	+++	+++	+++	++	++
JC-4	+	++	+++	+++	+++	++	+
JC-5	+	+	+++	+++	+++	++	+
JC-6	+	+	+++	+++	+++	++	+
JC-7	+	+	+++	+++	+++	++	+
PC-1	+	++	+++	+++	+++	++	+
PC-2	+	++	+++	+++	+++	++	+
PC-3	+	++	+++	+++	+++	++	+
PC-4	+	++	+++	+++	+++	++	+
PC-5	+	++	+++	+++	+++	++	+
PC-6	+	++	+++	+++	+++	++	+
VC-3	+	+	++	++	++	++	+
VC-5	+	+	++	++	++	++	+
VC-7	+	+	++	++	++	++	+
VC-9	+	+	++	++	++	++	+
CBS 294.67	+	++	+++	+++	+++	++	+
CBS 516.97	+	++	+++	+++	+++	++	+

Tabela 4. Analiza varijanse porasta micelije izolata *Colletotrichum* spp. na podlozi različite pH.
Table 4. Analysis of variance of mycelial growth of isolates of *Colletotrichum* spp. on different medium pH.

Izvori varijacije Sources of variation	Stepeni slobode df	Sredine kvadrata MS	Količnik F	Nivo značajnosti p
Izolati Isolates	21	1168,71	2221,99	0,000**
pH	6	13324,46	25332,92	0,000**
Izolati x pH Isolates x pH	126	61,11	116,18	0,000**
Greška Error	308	0,52	-	-

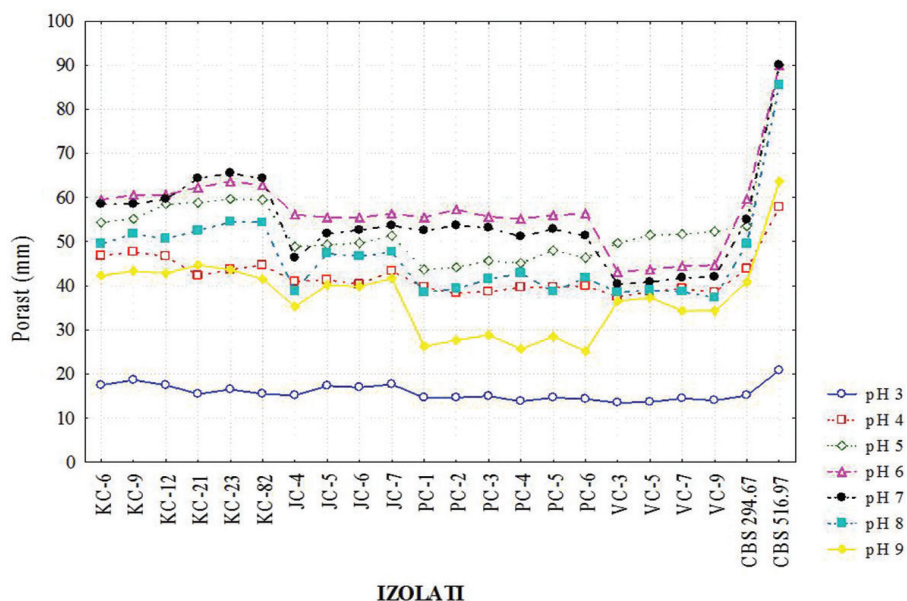
** Statistički veoma značajna razlika $p < 0,01$;

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



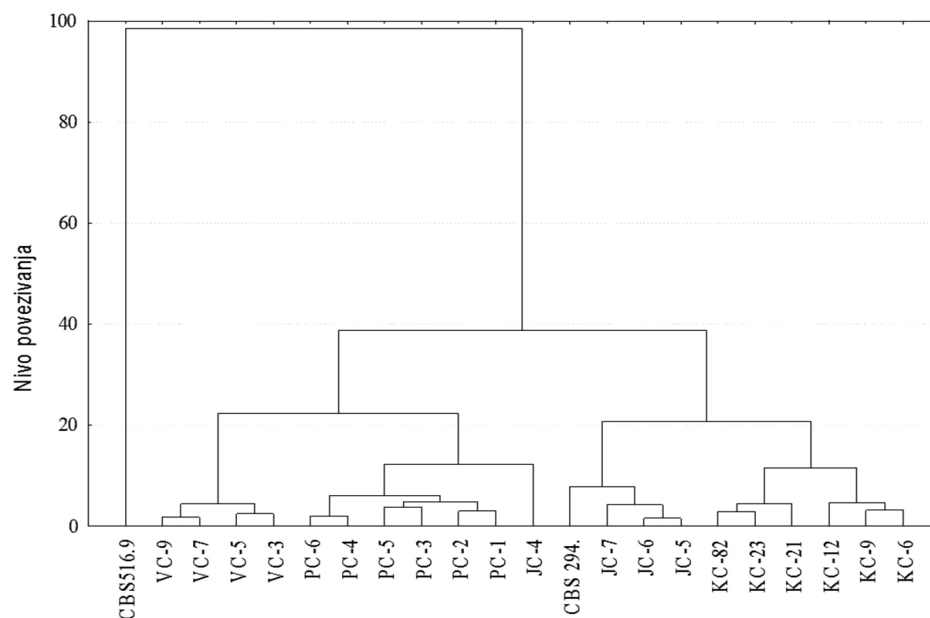
Sl. 4. Izolati *Colletotrichum* spp. na: A. pH3; B. pH6; C. pH9. (s leva na desno gornji red: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; sredina: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; donji red: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).

Fig. 4. Isolates of *Colletotrichum* spp. on: A. pH3; B. pH6; C. pH9. (from left to right top row: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; middle: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; bottom row: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).



Sl. 5. Porast micelije izolata *Colletotrichum* spp. na različitim pH.

Fig. 5. Mycelial growth of isolates *Colletotrichum* spp. on different pH.



Sl. 6. Dendrogram izolata *Colletotrichum* spp. na osnovu porasta micelije na različitim pH.

Fig. 6. Dendrogram of isolates of *Colletotrichum* spp. based of mycelial growth on different pH.

Tabela 5. Sporulacija izolata *Colletotrichum* spp. na različitim temperaturama.
Table 5. Sporulation of isolates of *Colletotrichum* spp. on different temperatures.

Izolat Isolate	Temperatura Temperature						
	5°	10°	15°	20°	25°	30°	35°
KC-6	-	+	++	+++	+++	+	+
KC-9	-	+	++	+++	+++	+	+
KC-12	-	+	++	+++	+++	+	+
KC-21	+	+	+++	+++	+++	++	+
KC-23	+	+	+++	+++	+++	++	+
KC-82	+	+	+++	+++	+++	++	+
JC-4	+	+	++	+++	+++	+	+
JC-5	+	+	++	+++	+++	+	+
JC-6	+	+	++	+++	+++	+	+
JC-7	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-1	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-2	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-3	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-4	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-5	+	+	++	+++	+++	+	+
PC-6	+	+	++	+++	+++	+	+
VC-3	+	+	++	++	++	+	+
VC-5	+	+	++	++	++	+	+
VC-7	+	+	++	++	++	+	+
VC-9	+	+	++	++	++	+	+
CBS 294.67	-	+	++	+++	+++	+++	+
CBS 516.97	-	+	++	+++	+++	+++	++

Tabela 6. Analiza varijanse porasta micelije izolata *Colletotrichum* spp. na različitim temperaturama.
Table 6. Analysis of variance of mycelial growth of isolates of *Colletotrichum* spp. on different temperatures.

Izvori varijacije Sources of variation	Stepeni slobode	Sredine kvadrata	Količnik	Nivo značajnosti
	df	MS	F	p
Izolati Isolates	21	704,11	2133,12	0,000**
Temperature Temperatures	6	31800,54	96340,01	0,000**
Izolati x temperature Isolates x temperatures	126	107,14	324,58	0,000**
Greška Error	308	0,33	-	-

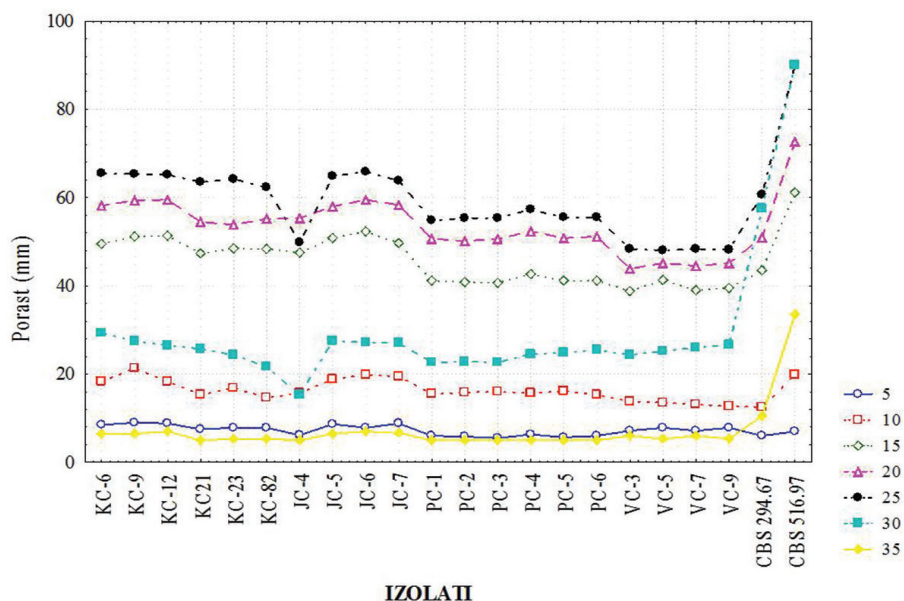
** Statistički veoma značajna razlika, $p < 0,01$;

** Statistically very significant difference, $p < 0.01$.



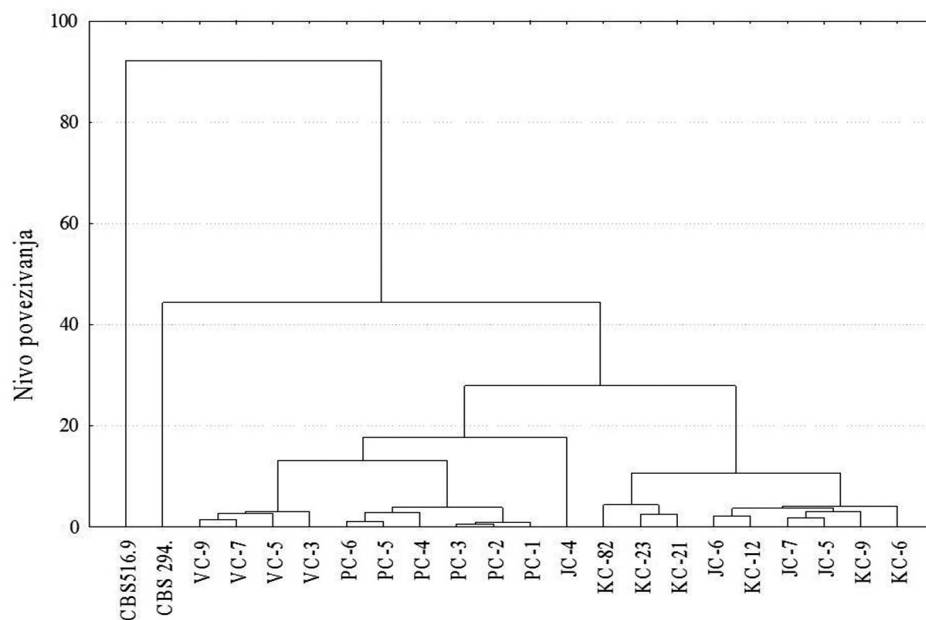
Sl. 7. Izolati *Colletotrichum* spp. na temperaturama: A. 5°C; B. 25°C; C. 35°C; (s leva na desno gornji red: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; sredina: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; donji red: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).

Fig. 7. Isolates of *Colletotrichum* spp. on temperatures: A. 5°C; B. 25°C; C. 35°C; (from left to right top row: KC-9, KC-12, KC-21, KC-23; middle: KC-82, JC-4, J-7, PC-3; bottom row: VC-7, VC-9, CBS 294.67, CBS 516.97).



Sl. 8. Porast micelije izolata *Colletotrichum* spp. na različitim temperaturama.

Fig. 8. Mycelial growth of isolates *Colletotrichum* spp. on different temperatures.



Sl. 9. Dendrogram izolata *Colletotrichum* spp. na osnovu porasta micelije na različitim temperaturama.

Fig. 9. Dendrogram of isolates of *Colletotrichum* spp. based of mycelial growth on different temperatures.

DISKUSIJA

Izolati *Colletotrichum* spp. poreklom sa plodova kruške, jabuke, višnje i paradajza, formiraju kolonije i sporulišu gotovo na svim hranljivim podlogama, pH vrednostima i temperaturama koje su bile uključene u ispitivanja.

Dobijeni rezultati pokazuju da se kolonije dobro razvijaju na većini ispitivanih supstrata. Svi izolati najveći porast ostvaruju na PDA podlozi, zatim na OA, CA i MEA, a najnepovoljniji podloga je CDA. U mnogobrojnim istraživanjima, PDA podloga se pokazala najboljom za razvoj patogena *Colletotrichum* spp., poreklom sa antraknoznih plodova voća (Stretch and Cappellini, 1963; Ivanović i Ivanović, 1992; Stojanović, 1997; Trkulja, 2004). Na PDA i OA supstratu većina ispitivanih patogena izrazito dobro sporuliše, na CA i MEA podlozi fruktifikacija je umerenog intenziteta, a na CDA sve proučavane kulture izrazito slabo sporulišu. Za razliku od naših rezultata, Miller and Baxter (1970) i Stojanović (1997) najveći stepen fruktifikacije izolata *Colletotrichum* spp., konstatuju na CA, OA i CDA podlozi. Pojedinačni izolati *Colletotrichum* spp. na različitim hranljivim podlogama obrazuju crne, stromatične tvorevine bez izdiferenciranog sadržaja, što ukazuje na homotaličnu prirodu ovih gljiva. Varijabilnost u kulturi je dobro poznata karakteristika vrste *C. gloeosporioides* (Vermeulen et al., 1984).

Podloga pH 7 je najpovoljnija za porast hromogenih izolata sa kruške, za razliku od kultura poreklom sa ploda višnje kojima više pogoduje kisela sredina, vrednosti pH 5. Za sve ostale kulture *Colletotrichum* spp. optimalna pH je 6. Ekstremno kisela sredina, pH 3 je izrazito nepovoljna za razvoj svih ispitivanih izolata. Sporulacija svih proučavanih izolata na podlogama kiselosti 5, 6 i 7 je umerena do obilna, a na pH 3 i pH 9 izrazito slabog intenziteta. Dobijeni

rezultati ne odstupaju značajno od podataka koji se odnose na uticaj pH podloge na porast izolata *Colletotrichum* spp. poreklom sa različitih domaćina. Ivanović i Ivanović (1992), konstatuju da izolati sa višnje dobro rastu na pH 5-8, a Miller and Baxter (1970) i Quesada and Lopez (1980) tvrde da su za porast i sporulaciju gljiva roda *Colletotrichum* povoljniji kiseliji supstrati, pH vrednosti 5-6. Prema Trkulji (2004) optimalan pH za razvoj izolata *C. acutatum* i *C. gloeosporioides* je pH 6.

Minimalne i maksimalne temperature za porast proučavanih kultura *Colletotrichum* spp., su ispod 5°C, odnosno preko 35°C. Osim izolata JC-4, sa ploda jabuke koji najveći porast manifestuje na 20°C, za ostale ispitivane kulture najpovoljnija je temperatura od 25°C. Najobilnija sporulacija svih izolata utvrđena je na temperaturama od 20 i 25°C. Prema brojnim literaturnim navodima temperature od 25° do 28°C su optimalne za razvoj kultura *C. gloeosporioides* sa borovnice i jabuke (Stretch and Cappellini, 1963), višnje (Ivanović i Ivanović, 1992), avokada i manga (Swart, 1999; Sangeetha and Rawal, 2007), jabuke (Trkulja, 2004) i paprike (Kim et al., 2008). Istovremeno, ovaj temperaturni opseg je najpovoljniji i za porast izolata *C. acutatum* poreklom sa različitih domaćina (Baxter et al., 1983; Smith and Black, 1990; Adaskaveg and Hartin, 1997; Trkulja, 2004). Proučavajući izolate *C. acutatum* sa ploda jagode, Wilson et al. (1990) su utvrdili da je optimalan razvoj kultura *in vitro* na temperaturama od 10°-25°C, a da su vrednosti od 5° i 35°C ograničavajući faktor razvoja. U skladu sa našim rezultatima su i istraživanja Mello et al. (2004), koji konstatuju da gljive roda *Colletotrichum* najobilniju sporulaciju postižu na 20°-24°C, dok temperature od >30°C imaju inhibitorni efekat na process fruktifikacije.

Ispitivanja fizioloških osobina izolata *Colletotrichum* spp., prouzrokovala antraknoze

plodova kruške, jabuke, višnje i paradajza, pokazala su da patogeni ovog roda osim varijabilnosti, manifestuju i visok stepen adaptibilnosti prema različitim uslovima sredine, što je osnovni preduslov njihovog opstanka i diverziteta u prirodi.

ZAHVALNICA

Rad je realizovan u okviru Projekta TR 31018 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

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.
- 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.
- 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.
- Dhingra, O., and Sinclair, J. (1986): *Basic Plant Pathology Methods* (second edition). CRS Press. Inc. Lewis Publishers.
- Dodd, J.C., Estrada, A., Jeger, M.J. (1992): Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in the tropics. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger), pp. 308-325. CAB Internacional, Wallingford, UK.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N. (1995): *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. CAB International, Wallingford, Oxon, 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. i Ivanović, D. (1992): Proučavanje *Colletotrichum gloeosporioides*, prouzrokovala antraknoze višnje i delovanje nekih fungicida na gljivu *in vitro*. *Zaštita bilja*, 201: 211-218.
- Kim, T.J., Park, S.Y., Choi, W., Lee, Y.H., Kim, H.T. (2008): Characterization of *Colletotrichum* isolates causing anthracnose of pepper in Korea. *Plant Pathol. J.*, 24: 17-23.
- Leandro, L.F.S., Gleason, M.L., Nutter, F.W., Wegulo, S.N., Dixon, P.M. (2003): Influence of temperature and wetness duration on conidia and appresoria of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Phytopathology*, 95: 513-520.
- Liu, X.Y., Duan, J.X., Xie, X.M. (2007): *Colletotrichum yunnanense* sp. nov., a new endophytic species from *Buxus* sp. *Mycotaxon*, 100: 137-144.
- Mello, S.F.A., Machado, Z.C.A., Bedendo, P.I. (2004): Development of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from green pepper in different culture media, temperatures and light regimes. *Sci. Agric. (Piracicaba Braz.)*, 5: 542-544.
- Miller, L.W., and Baxter, S.C.J. (1970): Some factors influencing asexual sporulation in a strain of *Glomerella cingulata* pathogenic to camellias. *Phytopathology*, 60: 743-744.
- Peres, N.A., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E., Correll, J.C. (2005): Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 89: 784-796.

- Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaren, V., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., Jeewon, R. (2007): A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*, 53: 579-590.
- Roberts, P.D., Pernezny, K., Kucharek, T.A. (2001): Anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. on pepper. *Journal of University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences*, PP-178. <http://edis.ifas.ufl.edu/PP104>.
- Sangeetha, C.G., and Rawal, R.D. (2007): Nutritional studies of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. The incitant of mango anthracnose. *American-Eurasian of Sustainable Agriculture*, 1: 37-41.
- Sinclair, J.B. (1999): Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Disease*, 75: 220-224.
- 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.
- Stretch, A.W., and Cappellini, R.A. (1963): Effect of various factors on the growth and sporulation of *Glomerella cingulata*. *Phytopathology*, 53: 352.
- 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>.
- Trkulja, V. (2004): Patogene, morfološke i odgajivačke odlike *Colletotrichum* spp. prouzrokovala gorke truleži ploda jabuke. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Quesada, G.L., and Lopez, H.E. (1980): Forma sexually medios de cultivo para *Colletotrichum gloeosporioides*, patogeno del mango en Cuba. *Ciencias de la Agricultura*, 7: 11-17.
- Vermeulen, H., De Ferrante, B., Gielink, A.J. (1984): Genetic and morphological diversity of monospore isolates of *Glomerella cingulata* with coffee berry disease. *Neth.J. Pl. Path.*, 90: 213-223.
- Wilson, L.L., Madden, L.V., Ellis, M.A. (1990): Influence of temperature and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, 80: 111-116.
- Živković S. (2011): Uperedna proučavanja izolata *Colletotrichum* spp. prouzrokovala antraknoze. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

(Primljeno: 07.09.2012.)

(Prihvaćeno: 28.09.2012.)

PHYSIOLOGICAL STUDIES OF ISOLATES OF *COLLETOTRICHUM* SPP.

SVETLANA ŽIVKOVIĆ¹, VELJKO GAVRILOVIĆ¹, NENAD TRKULJA¹, DUŠICA DELIĆ², SAŠA STOJANOVIĆ¹

¹Institute for Plant Protection and Environment, Belgrade

²Institute of Soil Science, Belgrade

e-mail: zivkovicsvetla@gmail.com

SUMMARY

In the physiological studies were included 20 isolates of *Colletotrichum* spp. originating from pear, apple, sour cherry and tomato fruits, as well as reference strains of *C. acutatum* (CBS 294.67) and *C. gloeosporioides* (CBS 516.97). The results indicated that five different culture media (PDA, CA, OA, MEA, CDA), seven different pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), and temperatures (5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°C) have significant influence on growth and sporulation of isolates of *Colletotrichum* spp. All tested media, except CDA, were suitable for pathogens development. Five morphological groups of colonies on PDA were observed, confirming the great phenotypic variability of isolates. The best media pH for pathogens growth and sporulation were pH 6 and 7. The optimum temperature for colonies development was 25°C, and temperatures of 20° and 25°C were the most favorable for sporulation of isolates of *Colletotrichum* spp.

Key words: *Colletotrichum* spp., physiology, mycelial growth, sporulation

(Received: 07.09.2012.)

(Accepted: 28.09.2012.)