

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

mr Tanja P. Vasić

KARAKTERIZACIJA VRSTA RODA
Colletotrichum, PROUZROKOVAČA
ANTRAKNOZE LUCERKE U SRBIJI I
OSETLJIVOST GENOTIPOVA

Doktorska disertacija

BEOGRAD, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Tanja P. Vasić, MsC

CHARACTERIZATION OF *Colletotrichum*
SPECIES, CAUSING THE ANTHRACNOSE
OF ALFALFA IN SERBIA AND GENOTYPE
SUSCEPTIBILITY

Doctoral Dissertation

BELGRADE, 2013.

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentor: dr Aleksandra Bulajić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije: dr Mirko Ivanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Poljoprivredni fakultet

dr Vojislav Trkulja, vanredni profesor
Univerzitet u Banja Luci-Poljoprivredni fakultet

dr Vesna Krnjaja, naučni savetnik
Institut za stočarstvo-Beograd

dr Jasmina Radović, viši naučni saradnik
Institut za krmno bilje-Kruševac

Datum odbrane: _____

Posvećeno uspomeni na moje roditelje

Izuzetnu zahvalnost dugujem prof. dr Aleksandri Bulajić, vanr. prof., za preneto znanje, iskustvo i podršku koju mi je pružila tokom izrade ove doktorske disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Mirku Ivanoviću, red. prof., i dr Vojislavu Trkulji, vanr. prof., na pomoći tokom pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Jasmini Radović i dr Zoranu Lugiću na pomoći i sugestijama tokom planiranja, izvođenja i pisanja doktorske disertacije.

Dugujem zahvalnost dr Vesni Krnjaji, Institut za Stočarstvo, Beograd i dr Darku Jevremoviću, Institut za voćarstvo, Čačak na pomoći tokom realizacije dela istraživanja.

Izuzetnu zahvalnost dugujem dr Christian Huyghe, INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, France, kao i Gabor Jasmini dipl. inž., Poljoprivredni institut dr Petar Drezgić, Sremska Mitrovica za poslat eksperimentalni materijal.

Na pomoći koja mi je bila dragocena tokom izrade doktorske disertacije zahvaljujem se dragim kolegama: dr Ivani Đekić, dr Danijeli Ristić, dr Ani Vučurović, Dušanu Nikoliću dipl. inž., Katarini Milojević dipl. inž., Bojanu Anđelkoviću dipl. biol., i svim kolegama Instituta za krmno bilje iz Kruševca.

Na razumevanju i pruženoj podršci dugujem beskrajnu zahvalnost suprugu Dejanu i deci Sofiji i Pavlu.

KARAKTERIZACIJA VRSTA RODA *Colletotrichum*, PROUZROKOVAČA ANTRAKNOZE LUCERKE U SRBIJI I OSETLJIVOST GENOTIPOVA

Rezime. U periodu 2005.-2010. godine, pregledom 17 lokaliteta gajenja lucerke u Srbiji, zabeležena je pojava intenzivnih simptoma antraknoze na lucerki. Učestalost zaraze u ispitivanim usevima bila je visoka i dostizala je 30%. Sa ciljem da se rasvetli etiologija oboljenja i ispita uticaj gljiva roda *Colletotrichum* obavljena je analiza 150 uzoraka, dobijeno ukupno 80 izolata i 18 odabrano je za morfološku, biološku i molekularnu identifikaciju i analizu vegetativne kompatibilnosti. Na osnovu obavljenih istraživanja ustanovljeno je prisustvo tri vrste roda *Colletotrichum* na lucerki u Srbiji: *C. trifolii*, *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp.-Coll-44. Sve proučavane osobine ispitivanih izolata analizirane su kao mogući taksonomski kriterijum za razlikovanje vrsta roda *Colletotrichum*. Na osnovu dobijenih rezultata, za razvrstavanje vrsta preporučuje se uporedno korišćenje najmanje dva taksonomska kriterijuma, morfoloških osobina i molekularne karakterizacije. Analize nukleotidnih sekvenci tri genomna regiona, ITS region rDNK, intron gena GS i intron gena GPHD, pokazale su različit potencijal za preciznije razdvajanje vrsta roda *Colletotrichum*. Rekonstrukcijom tri filogenetska stabla dat je doprinos u rasvetljavanju filogenetske međupovezanosti vrsta prisutnih u Srbiji sa ostalim vrstama ovog roda iz različitih delova sveta. Proučavanjem genetičkog diverziteta populacija *C. trifolii*, *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp. izolat Coll-44, ukupno 18 monosporijalnih izolata svrstano je u sedam grupa vegetativne kompatibilnosti. Ova istraživanja ukazala su na postojanje genetičke varijabilnosti komercijalnih sorti lucerke u osetljivosti prema ispitivanim izolatima u kontrolisanim uslovima inokulacije, sa prevalentnim vrstama *C. trifolii* i *C. destructivum*. Genotipovi sa najnižim ispoljenim nivoom osetljivosti koristiće se u programima selekcije lucerke na otpornost.

Ključne reči: lucerka, *Colletotrichum trifolii*, *C. destructivum*, morfološke osobine, molekularna karakterizacija, vegetativna kompatibilnost, osetljivost genotipova lucerke

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitopatologija

UDK: 633.31 : 632.4

CHARACTERIZATION OF *Colletotrichum* SPECIES, CAUSING THE ANTHRACNOSE OF ALFALFA IN SERBIA AND GENOTYPE SUSCEPTIBILITY

Abstract: During the period of 2005-2010, a survey was conducted at 17 localities in Serbia and intense occurrence of alfalfa anthracnose was observed. The disease incidence in the tested crops was high and it reached 30%. With the aim to clarify the etiology of the disease and investigate the effect of *Colletotrichum*, 150 samples were analysed. Total of 80 isolates were obtained, among which 18 were selected for morphological, biological and molecular characterization and analysis of vegetative compatibility. The conducted research showed the presence of three species of *Colletotrichum* on alfalfa in Serbia: *C. trifolii*, *C. destructivum* and *Colletotrichum* sp. isolate Coll-44. All studied traits of the tested isolates were analyzed as a possible taxonomic criterion for distinguishing species of the genus *Colletotrichum*. Based on these results, for the identification of species, it is recommended to use at least two parallel taxonomic criteria, morphological traits and molecular characterization. Analysis of nucleotide sequences of the three genome regions, ITS region of rDNA, GS gene intron and GPHD gene intron, showed different potential for more precise *Colletotrichum* species separation. By reconstructing three phylogenetic trees, the contribution was given to the establishing the phylogenetic relationships among species present in Serbia, with other species from different parts of the world. By studying the genetic diversity of populations of *C. trifolii*, *C. destructivum* and *Colletotrichum* sp. isolate Coll-44, 18 monosporial isolates were distributed into seven vegetative compatibility groups. The studies revealed the existence of different levels of susceptibility with in commercial cultivars against tested isolates of prevalent species, *C. trifolii* and *C. destructivum*. Genotypes with the lowest susceptibility will be used in selection programs and improving alfalfa for resistance.

Key words: alfalfa, *Colletotrichum trifolii*, *C. destructivum*, morphology, molecular characterization, vegetative compatibility, genotype susceptibility.

Academic Expertise: Biotechnology Science

Special topics: Phytopathology

UDC: 633.31 : 632.4

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Bolesti lucerke	2
2. PREGLED LITERATURE	6
2.1. Gljive roda <i>Colletotrichum</i> i njihov značaj	6
2.2. Nomenklatura roda i klasifikacija vrsta <i>Colletotrichum</i> spp.	7
2.3.1. Značajne vrste roda <i>Colletotrichum</i> opisane na lucerki u svetu	12
2.3.2. Rasprostranjenost i ekonomski značaj vrsta roda <i>Colletotrichum</i> prouzrokovaca antraknoze na lucerki	13
2.4. Taksonomski status vrsta roda <i>Colletotrichum</i> patogenih za lucerku	15
2.4.1. Najznačajnije <i>Colletotrichum</i> vrste kao patogeni lucerke	17
2.4.2. Varijabilnost vrsta roda <i>Colletotrichum</i> patogenih za lucerku	20
2.5. Načini ostvarivanja infekcije vrsta roda <i>Colletotrichum</i> patogenih za lucerku	21
2.6. Značajne vrste roda <i>Colletotrichum</i> opisane na lucerki u Srbiji	23
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	25
4. MATERIJAL I METODE	26
4.1. Prikupljanje početnog materijala i izolacija gljiva	26
4.2. Dobijanje čistih kultura, monosporijalnih izolata i njihovo čuvanje	27
4.3. Izbor izolata za dalja istraživanja	28
4.4. Proučavanje uporednih patogenih osobina izolata <i>Colletotrichum</i> spp. sa lucerke	29
4.5 Proučavanje eksperimentalnog kruga domaćina ispitivanih izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	31
4.6. Proučavanje morfoloških odlika odabranih izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	32
4.6.1. Makroskopske morfološke odlike	32
4.6.2. Mikroskopske odlike ispitivanih izolata	33
4.6.3. Formiranje teleomorfog stadijuma	34
4.7. Molekularna detekcija i identifikacija	34
4.7.1. Ekstrakcija DNK	35
4.7.2. Lančana reakcija polimeraze	36

4.7.3. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcije	38
4.7.4. Sekvencioniranje dela genoma odabranih izolata	38
4.7.5. Molekularna identifikacija i karakterizacija	39
4.7.6. Detekcija i identifikacija primenom PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	40
4.8. Proučavanje vegetativne kompatibilnosti odabranih izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	41
4.9. Osetljivost različitih genotipova lucerke prema izolatima <i>Colletotrichum</i> spp.	44
5. REZULTATI	46
5.1. Simptomi bolesti na biljkama u polju	46
5.2. Dobijanje čistih kultura, monosporijalnih izolata i njihovo čuvanje	50
5.3. Izbor izolata za dalja istraživanja	50
5.4. Proučavanje patogenih osobina izolata <i>Colletotrichum</i> spp. sa lucerke	51
5.5. Proučavanje kruga eksperimentalnih domaćina ispitivanih izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	57
5.6. Morfološke odlike proučavanih izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	61
5.6.1. Makroskopske morfološke odlike	61
5.6.2. Mikroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata	64
5.6.3. Reproductivni organi teleomorfno stadijuma ispitivanih izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	80
5.7. Molekularna detekcija i identifikacija gljiva	81
5.7.1. Molekularna identifikacija <i>Colletotrichum</i> vrsta detektovanih na lucerki	83
5.7.2. Molekularna karakterizacija vrsta roda <i>Colletotrichum</i> patogena lucerke	88
5.7.3. RFLP-PCR analiza	100
5.8. Proučavanje vegetativne kompatibilnosti odabranih izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	103
5.9. Ocena nivoa otpornosti različitih genotipova lucerke prema testiranim izolatima <i>Colletotrichum</i> spp.	113
6. DISKUSIJA	119
6.1. Simptomi antraknoze na biljkama u polju	119

6.2. Patogene osobine izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	121
6.3. Proučavanje eksperimentalnih domaćina ispitivanih izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	122
6.4. Morfološke osobine izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	124
6.4.1. Makroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	124
6.4.2. Mikroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	125
6.4.3. Formiranje telomornog stadijuma	131
6.5. Molekularna detekcija i identifikacija prouzrokovaca antraknoze na lucerki	131
6.5.1. Molekularna karakterizacija prouzrokovaca antraknoze na lucerki	136
6.5.2. PCR – RFLP analiza	139
6.6. Proučavanje vegetativne kompatibilnosti odabranih izolata <i>Colletotrichum</i> spp.	142
6.7. Osetljivost različitih genotipova lucerke prema ispitivanim izolatima <i>Colletotrichum</i> spp.	147
7. ZAKLJUČAK	153
8. LITERATURA	157
PRILOG	174
BIOGRAFIJA	175
IZJAVE	176

1. UVOD

Među njivskim biljkama za ishranu stoke, lucerka ima najznačajnije mesto, pa je mnogi nazivaju “kraljicom krmnih biljaka”. Stočarstvo je jedna od najznačajnijih poljoprivrednih grana u Srbiji, tako da se odgovarajuća pažnja posvećuje i proizvodnji kvalitetne stočne hrane. Kao jedna od najstarijih i najvažnijih višegodišnjih krmnih biljaka, lucerka daje visok prinos krme odličnog kvaliteta.

Lucerka ima posebno mesto u plodoredu. Sposobnost da u simbiozi sa *Rhizobium meliloti* fiksira atmosferski azot, u velikoj meri smanjuje potrebe za primenom azotnih đubriva kako u lucerištu, tako i u kulturi koja se gaji nakon razoravanja lucerišta, što daje ovoj vrsti i veliki ekološki značaj. Količina fiksiranog azota zavisi od velikog broja faktora i kreće se od 50 do 463 kg ha⁻¹ godišnje (**Vance et al.**, 1988). Nakon razoravanja površina pod lucerkom u zemljištu ostaju velike količine azota i organskih materija, čijim se razlaganjem i mineralizacijom popravljaju fizičke, hemijske i mikrobiološke osobine zemljišta.

Lucerka (*Medicago sativa* L.) pripada redu Fabales (Leguminosae), familiji Fabaceae (Papilionaceae) i rodu *Medicago* (**Kojić**, 1984). Rod *Medicago* broji više od 60 vrsta, od kojih je oko 70% jednogodišnjih (**Quiros and Bauchan**, 1988). Najvažniji predstavnici su:

M. sativa L. - obična lucerka

M. media Pers. - hibridna lucerka

M. falcata L. - žuta lucerka

Koren lucerke je vretenast, veoma dobro razvijen, razgranat, prodire duboko u zemljište i u trećoj i četvrtoj godini života raste u dubinu 4-5 m (**Đukić i Erić**, 1995). Stablo lucerke je zeljasto, mekano i sočno do faze formiranja cvetnih pupoljaka i početka cvetanja, a posle čega očvrzne. Stabla se formiraju iz pupoljaka dajući biljci žbunast izgled. Stabla se formiraju više puta tokom vegetacije, zbog čega lucerka i daje više otkosa. Stablo je razgranato, na poprečnom preseku četvrtasto i šuplje. U povoljnim uslovima dostiže visinu 80-100 cm, a u lošijim 40-70 cm. Stabla su najviša kod biljaka u prvom otkosu, a kasnije visina se smanjuje. List je troper, sastavljen od tri liske jajolikog oblika. Cvet lucerke je leptiraste građe, kao i u ostalih mahunarki. Boja cveta je ljubičasta ili plava. Cvetovi su skupljeni u grozdolike cvasti. U oprašivanju cvetova

najznačajniju ulogu imaju insekti. Plod lucerke je mahuna, spiralno uvijena, u kojoj se formira veći broj semenki. Seme lucerke je sitno, bubrežastog oblika, zeleno-žuto ili žuto-mrke boje (**Đukić i sar.**, 2009).

Lucerka se najčešće gaji samostalno, mada može biti i komponenta travno-leguminoznih smeša. Koristi se za ishranu stoke u raznim oblicima, najčešće kao seno, ali i dehidrirana u obliku briketa, kao silaža, a ređe kao zelena hrana, senaža ili za napasanje. Seno lucerke je bogato proteinima odličnog amino kiselinskog sastava i visoke svarljivosti. Proteini iz sena lucerke su najjeftiniji izvor proteina u stočnoj ishrani (**Ocokojić i sar.**, 1983). U 2007. godini 70% proizvodnih useva lucerke nalazilo se u SAD, Argentini i Rusiji (**Putnam et al.**, 2007). U SAD vodeću ulogu u proizvodnji lucerke ima Kalifornija sa 486000 ha. Ukupan prinos sena lucerke u SAD je 71 milion tona (**USDA**, 2010). U Srbiji, lucerka je najvažnija krmna višegodišnja leguminoza i gaji se na oko 190 000 ha. U godinama pune eksploatacije, lucerka u četiri do pet otkosa godišnje ostvaruje visoke prinose zelene mase (70-90 tha^{-1}) i suvih materije 20 tha^{-1} (**Lugić i Dinić**, 2010) Značajni regioni za njeno gajenje u našoj zemlji su: Vojvodina, posebno Banat (Vršac, Kikinda, Zrenjanin), Bačka (Bečej, Subotica, Sombor, Senta, Kula, Odžaci) i Srem (Sremska Mitrovica, Šid, Ruma, Stara Pazova). U centralnoj Srbiji najznačajnija proizvodnja lucerke je u Posavini sa Mačvom, Pomoravlju, Stigu, Šumadiji i Timočkoj krajini (**Lukić**, 2000).

1.1. Bolesti lucerke

Relativno niski prinosi lucerke u Srbiji posledica su uticaja neadekvatne agrotehnike, ponegde i neodgovarajućeg zemljišta, ali i pojave štetočina i biljnih patogena (**Mijušković**, 1993). Mnoge bolesti karakterišu simptomi u vidu uginuća biljaka, što smanjuje prinos i kvalitet lucerke. Prouzrokovani bolesti napadaju pojedine delove ili celu biljku u raznim fenofazama razvića (**Vučković**, 1999). Duži niz godina, jedan od osnovnih problema u proizvodnji ove krmne biljke širom sveta je smanjena dugovečnost useva lucerke. Oštećenja od mraza, mikoze korena i bakteriozno uvenuća uobičajeni su faktori koji prouzrokuju ovaj problem (**O'Rourke and Millea**, 1966).

U svetu je opisano najmanje 62 parazitske gljive koje prouzrokuju oboljenja lucerke, od toga je kod nas opisano samo 19 vrsta prouzrokovaca bolesti. Prema delu biljke koji prvenstveno ugrožavaju, parazite na lucerki svrstavamo u one koje

naseljavaju nadzemne delove lucerke sa manifestacijom simptoma na lišću i stabljikama i parazite koji naseljavaju prizemni deo stabla, krunicu i koren (**Balaž i Popović**, 2005).

Najrasprostranjenije i najštetnije parazitne gljive koje ugrožavaju nadzemni deo lucerke su: *Colletotrichum trifolii* Bain et Essary, *C. destructivum* O'Gara, *C. truncatum* (Schwein.) Andrus and W.D. Moore i *C. dematium* (Fr.) Grove. - prouzrokovači antraknoze; *Pseudopeziza medicaginis* (Lib.) Sacc. – syn. *P. trifolii* (Biv.-Bern. Ex Fr.) i *Stemphylium botryosum* Wallr. - prouzrokovači pegavosti lista lucerke; *Peronospora trifoliorum* de Bary. – syn. *P. aestivalis* Syd. - prouzrokovač plamenjače lucerke, *Uromyces striatus* J. Schröt. – syn. *U. striatus* var. *medicaginis* (Pass. Arth.) - prouzrokovač rđe lucerke, *Cercospora medicaginis* Ellis and Everh. - prouzrokovač pegavosti lišća; *Leptotrochila medicaginis* (Fucel) - prouzrokovač žutila lišća lucerke (**Boland and Brochu**, 1989; **Stuteville and Erwin**, 1990; **Arsenijević i sar.**, 1996; **O'Neill**, 1996; **Mackie and Irwin**, 1998; **Ivanović i Ivanović**, 2001; **Mackie et al.** 2003; **Ivanović**, 2005). Pojava i agresivnost ovih patogena lista lucerke varira u zavisnosti od područja i meteoroloških uslova. Štete koje su posledica prisustva i razvoja patogenih agenasa iskazuju se kroz smanjenje količine i kvaliteta zelene mase od 10 do čak 70% zavisno od sorte lucerke, vrste patogena, klimatskih i edafskih uslova. Smanjenje asimilacione površine, opadanje lišća, nedozrevanje semena, prisustvo štetnih metabolita patogena takođe su posledice prisustva patogena na listu lucerke (**Graham et al.**, 1976; **Robotić i Klokočar-Šmit**, 1983a, 1983b; **Stuteville and Erwin**, 1990; **Vico i sar.**, 1996; **Ivanović i Ivanović**, 2001; **Ivanović**, 2005; **Krnjaja i sar.**, 2005; **Vasić**, 2007; **Vasić et al.**, 2010; **Vasić et al.**, 2011a, 2011b).

Patogeni koji su prouzrokovači oboljenja prizemnog dela stabla, krunice i korena lucerke mogu naneti velike štete ovoj kulturi. Najštetnije parazitne gljive prizemnog dela stabla, krunice i korena su *C. trifolii* i *C. destructivum* - prouzrokovači antraknoze lucerke; *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* (Weimer) Snyd. and Hans., *Verticillium albo-atrum* Reinke and Berth. i *V. dahliae* Kleb. - prouzrokovači uvenuća lucerke; *Rhizoctonia solani* Kuehn., *R. crocorum* DC. Ex Fr. – syn. *R. violaceae* Tul., *Sclerotinia trifoliorum* Eriks. i *S. rolfsii* Sacc. - prouzrokovači truleži korena i prizemnog dela stabla (**Robotić i Klokočar-Šmit**, 1983a, 1983b; **Milijić i sar.**, 1984, 1986; **Stuteville and Erwin**, 1990; **Ivanović i Ivanović**, 2001; **Krnjaja**, 2005 i **Vasić**, 2007). Pored navedenih patogenih gljiva, trulež korena i krune lucerke prouzrokuju

Phytophthora megasperma Drechs., *Cylindrocarpon ehrenbergii* Wollenweb., *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Dug, *Mycoleptodiscus terrestris* (Gerd.) Ostazeski (Stuteville and Erwin, 1990); *Phoma medicaginis* Malbr. and Roum. - prouzrokovatelj crnila stabla i pegavosti lista lucerke, kao i vrste iz rodova *Pythium* - prouzrokovatelji paleži klijanaca i truleži semena lucerke. Kao prouzrokovatelji truleži korena i korenovog vrata najčešće izolovane *Fusarium* vrste su *F. oxysporum* Schlech., *F. solani* (Mart.) Appel and Wr. i *F. roseum* Lk. ex Emened. Snyd and Hans. - prouzrokovatelji fuzarioznog uvenuća lucerke (Stuteville and Erwin, 1990; Ivanović i Ivanović, 2001). Bolesti krunice i korena izazivaju slabljenje vitalnosti biljke, povećanje osetljivosti prema mrazu, prevremeno propadanje, povećanje zakorovljenosti, a time i smanjenje kvaliteta sena. Štete koje nastaju zbog bolesti korena i krunice korena lucerke, u zavisnosti od edafskih i klimatskih uslova, mogu biti velike. Napad *V. albo-atrum* smanjuje prinos zelene mase od 10-20%, a *C. trifolii* do 5 t/ha zelene mase, a prinos sena može biti smanjen za 30 do 60% (Robotić i Klokočar-Šmit, 1983a). O' Rourke (1976) iznosi podatak da je u Nemačkoj zabeleženo smanjenje prinosa od 30 do 70%, u SAD 25-30%. Vasić (2007) navodi da u Srbiji smanjenje prinosa iznosi do 30%. Boland and Brochu (1989) navode da *C. destructivum* prouzrokuje različite nivoe oštećenja na lucerki i štete su uslovljene vremenskim uslovima. Po istim autorima, štete na lucerki izazvane od *C. destructivum* mnogo su intenzivnije u toplijim i vlažnijim podnebljima Kanade i Severne Amerike. Štete koje *C. destructivum* nanosi lucerki u pomenutim oblastima su do 25% (Boland and Brochu, 1989).

Pored gljiva, značajne štete u proizvodnji nanose i bakterije na lucerki, među kojima su *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall - syns. *P. medicaginis* (Sackett) E. F. Smith - prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti stable (Arsenijević and Klement, 1969); *Pseudomonas marginalis* pv. *alfalfae* Shinde and Lukezic - prouzrokovatelj bakteriozne truleži korena (Arsenijević, 1997; Balaž i Popović, 2005); *Clavibacter michiganensis* susp. *insidiosum* (McCull.) - syns. *Corynebacterium insidiosum* (McCull.) H. L. Jones - prouzrokovatelj bakterioznog uvenuća (Stuteville and Erwin, 1990); *Xanthomonas campestris* pv. *alfalfae* (Riker et al.) Dye - syns. *X. alfalfae* (Riker et al.) Dowsi - prouzrokovatelj bakteriozne pegavosti lista (Stuteville and Erwin, 1990) i druge.

Na lucerki opisani su i brojni fitopatogeni virusi koji prouzrokuju bolesti, kao što su virus mozaika lucerke (*Alfalfa mosaic virus*) (**Babović and Mijatović, 1985**); virus mozaika krastavca na lucerki (*Cucumber mosaic virus*) (**Stuteville and Erwin, 1990; Šutić, 1995; Jasnić, 2005**), virus žutog mozaika crvene deteline (*Clover yellow mosaic virus*), virus mozaika bele deteline (*White clover mosaic virus*), virus uvijenosti lišća pasulja (*Bean leaf roll virus*), virus žutog mozaika pasulja (*Bean yellow mosaic virus*), virus žutice šećerne repe (*Beet western yellows virus*), virus enacijskog mozaika graška (*Pea enation mosaic virus*), virus mozaika nerava lišća crvene deteline (*Red clover vein mosaic virus*), virus mozaika lubenice (*Watermelon mosaic virus*) (**Babović, 1968; Tapio, 1979; Stuteville and Erwin, 1990; Šutić, 1995**) i drugi.

Tokom šestogodišnjeg perioda praćenja (2005-2010), utvrđeno je da je na pojedinim lokalitetima u Srbiji bilo gubitaka na lucerištima preko 30%, sa ispoljenim tipičnim simptomima antraknoze. Kako kompleks fitopatogenih vrsta iz roda *Colletotrichum*, kao prouzrokovača antraknoze lucerke nije dovoljno proučen u Srbiji, sprovedena su istraživanja u cilju rasvetljavanja etiologije ove bolesti, utvrđivanje vrsta koje učestvuju u kompleksu kao i njihova detaljnija morfološka, patogena, vegetativna i molekularna karakterizacija, a sve u cilju doprinosa iznalaženju adekvatnih mera za njihovo uspešno suzbijanje.

2. PREGLED LITERATURE

2. 1. Gljive roda *Colletotrichum* i njihov značaj

Gljive roda *Colletotrichum*, prouzrokovajući antraknoza su kosmopolitske i izrazito agresivne vrste. U zemljama subtropske i tropske klimatske zone mogu prouzrokovati značajne ekonomske gubitke na velikom broju poljoprivrednih kultura u toku vegetacije, kao i nakon berbe i tokom skladištenja. U umerenom klimatskom području, patogeni *Colletotrichum* spp. su pre svega uzročnici truleži i propadanja uskladištenih plodova voća i povrća (**Freeman et al.**, 1998).

Kao biljni paraziti, gljive *Colletotrichum* spp. mogu prouzrokovati ekonomske gubitke na žitaricama, leguminozama, povrtarskim i voćarskim kulturama. Značajni su patogeni brojnih šumskih i ukrasnih vrsta, a njihovo prisustvo zabeleženo je i na biljkama iz spontane flore (**Bailey and Jeger**, 1992). Simptomi infekcije mogu se javiti na svim podzemnim i nadzemnim biljnim organima: na korenu, krtolama, stablu, listovima, cvetu i plodu. Na napadnutom biljnom tkivu prouzrokuju pojavu kružnih, nekrotičnih udubljenih pega, sa brojnim koncentrično raspoređenim plodonosnim telima, acervulama, iz kojih se, u žutonarandžastom matriksu oslobađaju konidije (**Freeman et al.**, 1998). Ovaj simptom karakterističan je za vrste roda *Colletotrichum* i opisuje se pod nazivom antraknoza. Bolest se može javiti u toku vegetacije, ali je češći slučaj ostvarivanje latentnih infekcija, koje nakon berbe plodova i tokom neadekvatnih uslova čuvanja uništavaju uskladištene plodove (**Than et al.**, 2008).

Vrste roda *Colletotrichum* poznate su kao epifitni, endofitni i saprobitni organizmi. U mikološkoj literaturi postoji veliki broj naučnih radova koje se bave taksonomijom, biologijom, patologijom i epidemiologijom roda *Colletotrichum* (**Sutton**, 1992; **Prusky**, 1996; **Förster and Adaskaveg**, 1999; **Correl et al.**, 2000; **Freeman et al.**, 2001; **Wharton and Uribeondo**, 2004; **Peres et al.**, 2005). **Prihastuti et al.** (2009) iz biljaka kafe izolovali su *C. fructicola* i *C. siamense* koje za ovog domaćina mogu biti patogeni, ali takođe mogu biti samo deo epifitne ili endofitne mikoflore (**Yang et al.** 2009). Prema navodima **Damm et al.** (2009) *C. dematium* se javlja kao endofit ili prouzrokovatelj bolesti, a na određenim supstratima isključivo kao učesnik u procesima razgradnje organske materije. Epifitne vrste iz roda

Colletotrichum, preživljavaju na površini zdravog biljnog tkiva, ostvarujući latentne infekcije (**Damm et al.**, 2009)

Klinička istraživanja pokazala su da neke gljive roda *Colletotrichum* predstavljaju potencijalne humane patogene. Utvrđeno je da *C. coccodes*, *C. crassipes*, *C. dematium*, *C. gloeosporioides* i *C. graminicola*, nakon hiruških intervencija mogu prouzrokovati keratitis, a kod pacijenata sa opštom imunodeficijencijom pojavu sistemskih kožnih infekcija (**Cano et al.**, 2004). **Damm et al.** (2009) iz obolele rožnjače oka uspešno su izolovali vrstu *C. truncatum*, koja može da izazove ozbiljne infekcije oka.

Vrste roda *Colletotrichum* mogu da luče ili proizvode sekundarne metabolite. Utvrđeno je da vrste *C. gloeosporioides* i *C. graminicola* proizvode specifične auto-inhibitorne supstance: fenoksisirćetnu i indolsirćetnu kiselinu, kao i mikosporin-glutamin i mikosporin-glutaminsku kiselinu (**García-Pajón and Collado**, 2003). Osnovna funkcija auto-inhibitornih metabolita je da spreče klijanje sekundarnih konidija, pre njihovog rasejavanja i dalje kolonizacije biljaka. Ovo omogućava produžetak vrste, prilagođavanje i opstanak u prirodi. Iz vrste *C. gloeosporioides* izolovane su fitotoksične supstance, diketopiperazini i ferikrocin za koje je ustanovljeno da poseduju herbicidna svojstva, kao i koleotrihumnska kiselina koja ispoljava antimikrobnu aktivnost prema više vrsta bakterija kao što su: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* i prema fitopatogenoj gljivi *Helmithosporium sativum*. Najpoznatiji biološki agensi iz roda *Colletotrichum* su vrste *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* i *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (**Goodwin**, 2001; **Charudattan**, 2005).

2.2. Nomenklatura roda i klasifikacija vrsta *Colletotrichum* spp.

Rod *Colletotrichum* dobio je ime početkom XIX veka i podrazumeva vrste gljiva koje formiraju karakterističnu "maljavu" konidiomatu u kojoj se obrazuju hijalinske, iskrivljeno-vretenaste konidije (**Corda**, 1831; loc. cit. **Baxter et al.**, 1985). Međutim, prve informacije o vrstama za koje je kasnije ustanovljeno da pripadaju rodu *Colletotrichum* potiču s kraja XVIII veka, kada je dat opis *Vermicularia* spp. (**Tode**, 1790; loc. cit. **Sutton**, 1992). Osnovni kriterijumi na osnovu kojih je obavljena

diferencijacija vrsta su: morfologija konidija, tip konidiomata i sposobnost formiranja seta u kulturi i supstratu.

Vrste sa povijenim konidijama svrstane su u rod *Vermicularia*, a vrste sa pravim konidijama u rod *Colletotrichum* (**Wollenweber and Hochapfel**, 1949; loc. cit. **Sutton**, 1992). Navodno, ustanovljeno je da vrste roda *Vermicularia* obrazuju piknide, dok vrste *Colletotrichum* spp. formiraju acervule (**Negr**, 1960; loc. cit. **Sutton**, 1992) što ih je nadalje razlikovalo.

Razdvajanje ova dva roda je izvršeno i na osnovu sposobnosti da obrazuju sete. Obavezno prisustvo seta smatrano je osnovnim obeležjem roda *Vermicularia*, za razliku od *Colletotrichum* spp. kod kojih je ova osobina fakultativnog karaktera (**Grove**, 1937; loc. cit. **Sutton**, 1992). S obzirom na varijabilnost vrsta i njihovih morfoloških osobina, postojeća diferencijacija rodova *Vermicularia* i *Colletotrichum* pokazala se naučno neutemeljenom. Stoga je nomenklatura statusa roda *Vermicularia* promenjen, a veliki broj vrsta kasnije imenovan kao *Colletotrichum* spp. (**Sutton**, 1992).

Drugi rod u vezi sa kojim postoji nomenklatura konfuzija u odnosu na *Colletotrichum*, je nešto kasnije opisan *Gloeosporium* (**Desmarziers and Montage**, 1849; loc. cit. **Baxter et al.**, 1985). Na osnovu taksonomskih kriterijuma navedenih autora fitopatogene gljive bez seta u konidiomatama svrstavane su u rod *Gloeosporium*, dok su vrste sa setama smatrane pripadnicima roda *Colletotrichum*. Kasnije je od strane većeg broja istraživača ustanovljeno da prisustvo/odsustvo seta predstavlja nepouzdan parametar jer njihovo formiranje zavisi od uslova spoljne sredine (**Shear and Wood**, 1913; loc. cit. **Baxter et al.**, 1985), među kojima je najbitnija atmosferska vlaga (**Frost**, 1964). Brojne vrste koje su u tom periodu opisane kao *Gloeosporium* spp., zapravo pripadaju rodu *Colletotrichum* (**von Arx**, 1970).

Rodovi *Dicladium* i *Ellisiella* takođe su u tesnoj vezi sa razvojem i taksonomskim statusom roda *Colletotrichum*. Rod *Dicladium* definisan je na osnovu samo jedne vrste *D. graminicola* Cesati, koja je zbog varijabilnih morfoloških karaktera, najpre prebačena u rod *Vermicularia*, potom u *Steirochaete* i na kraju u *Colletotrichum* (**Wastendorp**, 1861; **Saccardo** 1886; **Wilson**, 1914; loc. cit. **Sutton**, 1992). Pitanje statusa *Dicladium* spp. ponovo postaje aktuelno sredinom XX veka. Prema ruskim istraživačima ovom rodu svojstven je specifični razvoj konidiomate (**Vassiljevski and Karakulin**, 1950; loc. cit. **Sutton**, 1992), koji je međutim, kasnije

ustanovljen i kod nekih pripadnika *Colletotrichum* spp. (Sutton, 1966). Stoga je prvobitna teorija o izdvajanju vrste i svrstavanja u zasebni rod odbačena, a rod *Colletotrichum* je zadržao primat u odnosu na rod *Dicladium*.

Na osnovu karakterističnog izgleda konidija, rod *Ellisiela* izdvojen je iz roda *Colletotrichum* (Saccardo, 1880; loc. cit. Sutton, 1992). Međutim, koncepcija roda zasnovana isključivo na jednoj vrsti - *E. caudata* Peck. ex Sacc., koja formira apresorije i sete, nije imala naučno utemeljenje. Stoga je Sutton (1966) predložio njeno vraćanje u rod *Colletotrichum*. Rod *Ellisiela* je na taj način formalno ugašen, a vrsta preimenovana u *C. caudatum* (Nag Raj, 1973; loc. cit. Sutton, 1992).

Nedoumice u vezi nomenklaturnog statusa *Colletotrichum* spp. postojala je i kada su u pitanju još neki rodovi gljiva. Prema Sutton (1980) postoji ukupno 17 generičkih sinonima ovog roda, a osim navedenih, u literaturi se najčešće pominju: *Steirochaete* Braun & Caspari, *Gleosporiopsis* Speg., *Colletotrichopsis* Bubak i *Colletostroma* Petrak. Konfuzija je definitivno razjašnjena tek sredinom XX veka, kada je von Arx (1957) zaključio da naziv *Colletotrichum* Corda mora biti sačuvan u odnosu na izvorni, *Vermicularia* Tode ex Fries. Isti autor izvršio je drastičnu reviziju i prvu savremenu sistematizaciju vrsta roda *Colletotrichum*, koristeći morfološke osobine konidijskog stadijuma kao osnovni kriterijum. Broj vrsta je pri tom smanjen sa oko 750, na svega 11 (von Arx, 1957). Međutim, ubrzo su uočeni nedostaci, jer je sistematizacija obavljena na osnovu 30% pregledanog kolekcijskog materijala, a većina predloženih sinonima posedovala je samo literarne opise. Ipak, revolucionarno smanjivanje broja vrsta i morfološki koncept koji isključuje biljku domaćina kao nosioca nomenklaturnog statusa, poslužili su kao matrica za većinu radova u kojima je kasnije obrađivan problem sistematizacije vrsta u okviru roda *Colletotrichum*. Prema Cannon et al. (2000) broj predstavnika roda *Colletotrichum* nakon toga postepeno se povećavao sa uključivanjem detaljnih studija o morfološkim, odgajivačkim i patogenim karakteristikama svakog predstavnika.

Sutton (1980) u svom sistemu klasifikacije navodi 22 vrste, a von Arx (1981) ukupno 25 vrsta roda *Colletotrichum*. Reviziju roda i redukciju broja vrsta obavili su Baxter et al. (1983) konstatujući postojanje 11, a potom 12 vrsta pripadnika roda *Colletotrichum* (Baxter and Washuizen, 1984). U poslednjoj zvaničnoj sistematizaciji *Colletotrichum* spp. priznato je ukupno 39 vrsta (Sutton, 1992), ali i sam autor

napominje da ova lista nije konačna i do kraja definisana. Svi navedeni sistemi klasifikacije zasnovani su na tradicionalnom morfološkom konceptu vrsta, koji zbog velike varijabilnosti i uticaja sredine na stabilnost osnovnih morfoloških karaktera (veličina i oblik konidija, prisustvo/odsustvo seta, boja i brzina porasta kolonije, sposobnost obrazovanja teleomornog stadijuma), ne predstavlja uvek pouzdan okvir za sistematizaciju gljiva roda *Colletotrichum* (**Freeman et al.**, 1998; **Moncalvo**, 2005).

Klasifikacija vrsta *Colletotrichum* spp. zasnovana na biološkom konceptu je teško primenjiva, jer se kod predstavnika ovog roda procesi polne rekombinacije dešavaju veoma retko. Međutim, istraživanja genetičara obavljena u toku poslednjih decenija pružaju izvesne informacije o polnom stadijumu životnog ciklusa gljiva roda *Colletotrichum* (**Johnston and Jones**, 1997; **Correl et al.**, 2000).

Zbog postojanja velikog broja populacija i izrazite varijabilnosti 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; **Ogle et al.**, 1986), po kojima se specijalizovane forme mogu razlikovati isključivo kombinovanjem morfoloških, patogenih i odgajivačkih osobina.

Prema **Sherriff et al.** (1994) najveći napredak u taksonomiji generalno je omogućila primena molekularnih metoda. U ove svrhe je korišćeno više metoda, pre svega RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) i RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA). Takođe, osim ovih metoda veliki značaj u analizi DNK sekvenci ima i AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) metoda. Ova metoda prvo se koristila za genetičko mapiranje biljaka, a njena upotreba u ispitivanju gljiva pokazala je veliki potencijal. Po nekima to je idealna metoda, za detektovanje genetičkih variranja između vrsta i genotipova gljiva (**Sreenivasaprasad et al.**, 1996).

Sheriff et al. (1994) proučavali su srodnost velikog broja morfološki različitih izolata *Colletotrichum* spp. na osnovu sekvenci ITS regiona. Poređenjem sekvenci ispitivanih izolata izdvojile su se dve genetičke grupe. U prvoj grupi našle su se vrste *C. lindemuthianum*, *C. malvacearum*, *C. orbiculare* i *C. trifolii*, a u drugoj samo *C. gloeosporioides*. Stepem homologije sekvenci ispitivanih izolata u okviru prve grupe je bio jako visok i jasno različit od svih izolata *C. gloeosporioides*. Na osnovu velike homologije sekvenci ITS regiona prve grupe, zaključilo se da bi ove četiri vrste trebalo da se spoje u jednu vrstu. Sa druge strane, velika varijabilnost ispitivanih izolata *C.*

gloeosporioides postavila je pitanje da li bi ovu vrstu trebalo podeliti u više različitih *Colletotrichum* vrsta (Takamatsu, 1998).

Savremene metode omogućile su ispitivanje i analizu DNK sekvenci *C. gloeosporioides* (Freeman et al., 1993; Sherriff et al., 1994; Johnston and Jones, 1997; Mackie et al., 2003; Li-Pyung et al., 2003; Photita et al., 2005; Liu et al., 2007; Armour et al., 2008). Prihastuti et al. (2009) koristili su šest genskih regiona, ITS region, deo gena za Actin (ACT), β -tubulin (TUB2), Calmodulin (CAL), Glutamine synthetase (GS) i Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPDH) za utvrđivanje srodnosti između vrsta u okviru roda *Colletotrichum*. Na osnovu morfologije spora, razvoja apresorija, sličnosti rDNA sekvenci i sličnosti u amplifikaciji restrikcionijskih fragmenata RFLP, predloženo je da *C. orbiculare*, *C. trifolii*, *C. lindemuthianum* i *C. malvarum* predstavljaju jednu filogenetsku vrstu *C. orbiculare* (Liu et al., 2007).

Analiza DNA sekvenci (rDNA-ITS regiona, β -tubulin gena i gliceraldehid-3 fosfat-dehidrogenaza-GDPH gena) omogućila je razdvajanje mnogobrojnih biotipova, varijeteta i *forma specialis* u okviru ove zbirne i heterogene vrste *C. gloeosporioides* (Moriwaki et al., 2002; Du et al., 2005; Cannon et al., 2012).

Primena filogenetskog koncepta u sistematizaciji vrsta roda *Colletotrichum* prihvaćena je sa razvojem molekularnih metoda i analizom DNA (Sreenivasaprasad et al., 1996; Johnston et al., 1998; Johnston, 2000). Prvu sveobuhvatnu studiju najvažnijih predstavnika ovog roda dali su Hyde et al. (2009b) i Cannon et al. (2012), dve decenije nakon klasifikacije obavljene od strane Sutton (1992). U radu je dat prikaz i sistematizacija 66 vrsta roda *Colletotrichum*, zasnovana na filogenetskim analizama sekvenci, prisustvu teleomorfog stadijuma i ekonomski najbitnijim biljkama domaćinama (Hyde et al., 2009b). Cannon et al. (2012) filogenetskom analizom roda *Colletotrichum* otkrivaju da obuhvata devet glavnih klastera (acutatum, graminicola, spaethianum, destructivum, dematium, gloeosporioides, boninense, truncatum i orbiculare) kao i veliki broj malih klastera i izolovanih vrsta.

Trenutno ne postoji univerzalno prihvaćen proces za imenovanje klastera i povezivanje sa tradicionalnim taksonomskim kriterijumima. Međunarodni Kodeks nomenklature za alge, gljive i biljke (ICNAFP), iako zasad samo nacrt, predstavlja veliki korak u tom pravcu i favorizuje formalno formiranje klaster sistema klasifikacije. Cannon et al. (2012) analiziraju 119 *Colletotrichum* vrsta, većina njih pripada jednom

od devet glavnih klastera. Pored toga, postoji niz manjih klastera i izolovanih vrsta, za koje veruju da predstavljaju nezavisne evolutivne jedinice, ali koje su nedovoljno poznate da opravdaju formalno taksonomsko priznanje. Očigledno nedostatak ovog sistema je da ne postoji objektivni metod odlučivanja, koji je osnovni taksonomski kriterijum za određivanje pripadnosti određenom klasteru.

Svi navedeni tipovi sistematizacije vrsta iz roda *Colletotrichum* imaju svojih nedostataka. Nepostojanje standardizovanih i međunarodno prihvaćenih sistema i primena različitih koncepta u identifikaciji vrste, dovode do konfuzije i nedoumica. Po mišljenju velikog broja istraživača, situacija je ozbiljna i nameće potrebu nove i detaljne revizije roda *Colletotrichum* čiji su predstavnici ekonomski značajni patogeni velikog broja biljaka.

Varijabilnost izolata takođe se može pratiti primenom vegetativne kompatibilnosti i može imati veliki značaj u taksonomiji ovih gljiva. Vegetativna (heterokarionska) kompatibilnost važna je genetička osobina gljiva koja se zasniva na sposobnosti gljiva da formiraju heterokarione. Mehanizam vegetativne kompatibilnosti veoma je precizan i koristi se za ocenu genetičke srodnosti ili raznovrsnosti među različitim izolatima (patotipovima, sojevima) gljiva (**Katan**, 2000). Na osnovu sposobnosti dva izolata da formiraju heterokarione prilikom dodira njihovih micelija, **Puhalla** (1985) je, kod *F. oxysporum*, razvio metodu vegetativne kompatibilnosti pomoću koje je grupisao izolate u različite grupe vegetativne kompatibilnosti (VCG grupe). Hife genetski sličnih individua, koje dele iste alele u njihovim genima za vegetativnu kompatibilnost (*het* lokusi), sposobne su za fuziju (spajanje) i mešanje, dok različiti aleli u *het* lokusima prouzrokuju ćelijsku smrt pri interakciji hifa (**van der Nest et al.**, 2011).

2.3.1 Značajne vrste roda *Colletotrichum* opisane na lucerki u svetu

U dostupnoj literaturi uočeno je da veliki broj autora, različite izolate gljiva koje prouzrokuju antraknozu na lucerki predstavlja kao *C. trifolii*. Kao prouzrokovajući antraknoze na lucerki obično se navode *C. destructivum*, *C. dematium*, *C. truncatum* i *C. trifolii* (**Devine et al.**, 1971; **Baxter et al.**, 1983; **Boland and Brochum**, 1989; **Frasysinet**, 2008; **Hyde et al.**, 2009b).

O'Neill et al. (1997) izolovali su *C. gleosporioides* na lucerki u SAD, dok ga **Vinijanum et al.** (1987) navode kao patogena lucerke u Australiji. Međutim, podaci o učestalosti i rasprostranjenosti ove vrste u svetu su malobrojni. **Waijd Khan and Singh** (1974); **Stuteville and Erwin** (1990) i **Devine et al.** (1971) navode kao patogene vrste na lucerki u SAD *C. truncatum* i *C. graminicola* Wilson, dok **Boland and Brochum** (1989) navode da u Kanadi u oblasti Ontarija, *C. truncatum* ima sposobnost da izazove značajne ekonomske gubitke usled smanjenja kvaliteta i prinosa sena.

C. coccodes se na Novom Zelandu opisuje kao patogena na lucerki (**Lenné**, 1992). **Tu** (1983) navodi *C. lindemuthianum* kao patogena lucerke u Kanadi, kao i **Lenné** (1992) koji navodi ovu vrstu kao značajnog patogena lucerke u Omanu. Istraživanja (**Pavgi and Singh**, 1962; loc. cit **Allen and Lenné**, 1998) opisuju da u Indiji *C. medicaginis* nanosi velike štete na lucerki.

Laviola (1963) u svojim istraživanjima zapaža tri vrste iz roda *Colletotrichum* na lucerki u Italiji i to: *C. dematium*, *C. trifolii* i *C. destructivum*, ali rezultati nisu potvrdili patogenost *C. destructivum*. Na osnovu testova patogenosti je utvrđeno da je *C. trifolii* značajno patogeniji u poređenju sa *C. destructivum* i *C. dematium*. U Velikoj Britaniji *C. dematium* se opisuje kao veoma značajan patogen na lucerki (**Stovold**, 1981).

Poznato je da klimatski uslovi utiču na geografsku rasprostranjenost, raznovrsnost i učestalost izolata *Colletotrichum* vrsta na leguminozama (**Boland and Brochum**, 1989; **Allen and Lenné**, 1998). Tako je konstatovano da *C. trifolii*, s obzirom na temperaturni optimum, preovlađuje u južnim regionima, zbog čega i nosi naziv južna antraknoza, za razliku od *C. destructivum* koji je tolerantniji prema različitim temperaturama što je i razlog njegove veće rasprostranjenosti u hladnijim regionima (**Boland and Brochum**, 1989). Od svih navedenih vrsta ipak najveće ekonomske štete nanose vrste *C. trifolii* i *C. destructivum*.

2.3.2. Rasprostranjenost i ekonomski značaj vrsta roda *Colletotrichum* prouzrokovala antraknoze na lucerki

Antraknozu lucerke prvi put su opisali **Bain et Essary**, 1906. godine u Americi kao bolest lucerke i crvene deteline. Nakon toga veliki broj autora je radio na ovoj problematici tokom niza godina (**Henderson and Smith**, 1948; **Tiffany and Gilman**,

1954; **Barnes et al.**, 1969; **Ostazeski et al.**, 1969; **Devine et al.**, 1971; **Lukezić**, 1974; **Graham et al.**, 1976; **Elgin and Ostazeski**, 1982; **Baxter et al.**, 1983; **Stuteville and Erwin**, 1990). Danas je ovo oboljenje rasprostranjeno u mnogim oblastima gajenja lucerke u SAD (**Barens et al.**, 1969; **Chen et al.**, 2002), Kanadi, Argentini, Australiji (**Irwin**, 1974; **Allen and Lenné**, 1998; **Frasysinet**, 2008), Italiji, Izraelu, Novom Zelandu, Južnoj Africi (**Lamprecht**, 1986), u zemljama bivšeg SSSR i na području bivše Jugoslavije (**Lušina i sar.**, 1971; **Robotić i Klokočar-Šmit**, 1983a, 1983b; **Milijić i sar.**, 1986).

Štete koje nastaju usled prisustva i razvoja fitopatogenih gljiva iz roda *Colletotrichum* posledica su smanjene količine i kvaliteta zelene mase od 10 čak i do 70% u zavisnosti od sorte lucerke, vrste patogena, klimatskih i edafskih uslova (**Stuteville and Erwin**, 1990). **O'Rourke** (1976) navodi da je u hladnijim regionima kao što je severna Evropa, bolest prisutna, ali ekonomski nije značajna.

Barnes et al. (1969) navodi da u SAD infekcija osetljivih genotipova lucerke prouzrokuje gubitak zelene mase od 25 do 30%, a takođe smanjuje vigor i vek iskorišćavanja lucerišta. **Lenné** (1992) navodi da u Australiji dolazi do uvećanja sadržaja celuloze u senu za 45-55% usled infekcije lucerke gljivama koja prouzrokuju antraknozu. **Jones et al.** (1978) u istraživanjima na polju pokazuju da biljke zaražene sa *C. trifolii* i *C. destructivum* pokazuju 22-85% niži nivo preživljavanja, imaju za 7% slabije razvijen korenov sistem, a zaražene biljke u narednoj vegetaciji formiraju oko 29% manje stabljika po biljci.

Smanjenje asimilacione površine, opadanje lišća, nedozrevanje semena, kao i primese štetnih metabolita u lucerki posledica su prisustva vrsta roda *Colletotrichum* na biljkama (**Irwin**, 1974). **Sherwood et al.** (1970) navode da infekcija na lišću, može da ima negativan uticaj na zdravlje gajenih životinja. Bolesti krune i korena izazvane sa *Colletotrichum* spp. prouzrokuju slabljene vitalnosti biljke, povećanje osetljivosti prema mrazu, prevremeno izumiranje, povećanje zakorovljenosti, a sve to utiče i na smanjenje kvaliteta sena (**Lenné**, 1992).

Prema **Lenné** (1992) ekonomske štete nastale kao posledica pojave antraknoze, teško je izraziti u novčanim vrednostima, zato što biljka nije finalni proizvod. Pri proceni šteta od napada antraknoze, pored gubitaka zelene mase i sena lucerke, treba proračunati i gubitke koji se odnose na kvalitet mesa i mleka, kao i zdravlje životinja.

U prvim radovima **Barnes et al.** (1969) u kojima se ispituje otpornost različitih genotipova lucerke prema antraknozi prouzrokovanom *C. trifolii*, pominje se samo rasa 1. U ovim istraživanjima selekcionisane su dve otporne linije lucerke, Cherokee i MSHp6. **Devine et al.** (1975) selekcionisali su prvu sortu lucerke Arc koja je otporna na antraknozu. U narednom periodu, isti autori kreirali su sortu Saranc AR, koja je selekcionisana od populacija koje su pokazivale povećanu otpornost prema *C. trifolii* (Beltsville 1-An4, Beltsville 2-An4, Beltsville 3-An4). Po **Ostazeski et al.** (1979), sorte Arc i Saranc AR pokazivale su izraženu otpornost prema rasi 1 *C. trifolii*.

Elgin and Ostazeski (1982), konstatuju da osim rase 1 *C. trifolii*, postoji i rasa 2 koja je agresivnija prema sorti Arc. **Elgin and Ostazeski** (1985), napominju da je rasa 2 *C. trifolii* otkrivena 1978. godine u Severnoj Karolini gde je nanela ogromne štete upravo na sorti Arc koja je otporna prema rasi 1 *C. trifolii*. Isti autori proučavali su uticaj različitih rasa patogena i testirali su 45 sorti lucerke, koje su pokazivale različitu otpornost prema rasama *C. trifolii*. Osetljivost sorti lucerke prema ovom parazitu u prirodnim i kontrolisanim uslovima ispitivali su takođe i **Barnes et al.** (1969); **Ostazeski et al.** (1969); **Graham et al.** (1976); **Ostazeski and Elgin** (1982).

Prema **Boland and Brochu** (1989) patogenost izolata *C. destructivum* i *C. trifolii*, u odnosu na sorte Saranc, Arc i Saranc AR, koje su determinantne za *C. trifolii*, je različita. Oni su utvrdili da su izolati *C. destructivum* poreklom iz Ontaria, značajno virulentniji u odnosu na referentne izolate iste vrste. Proučavani izolati *C. trifolii* pokazuju različitu reakciju prema testiranim sortama lucerke, u zavisnosti od rase izolata. Pri vlažnom i toplom vremenu *C. destructivum* preuzima ulogu primarnog parazita na lucerki. Simptomi na lucerki izazvani ovom vrstom u vidu su smeđih pega oivičenih tamno braon oreolom, sa tipičnim simptomom pastirske kuke. Tako da u izgledu izazvanih simptoma nema razlike između *C. trifolii* i *C. destructivum* (**Frayssinet**, 2008).

2.4. Taksonomski status vrsta roda *Colletotrichum* patogenih za lucerku

Istraživanja biološke raznovrsnosti gljiva *Colletotrichum* spp. ne mogu se zamisliti bez savremenih taksonomskih podataka, ali i revidiranih tradicionalnih sistema klasifikacije. Postoje mnogobrojni problemi sistematizacije taksona različitog ranga,

posebno potvrđivanja ili revizije pripadnosti pojedinih familija i rodova višim taksonomskim kategorijama. S toga je neophodno uključivanje različitih disciplina i sagledavanje vrste kao osnovne biološke kategorije sa morfološkog, ekološkog, fiziološkog i evoluciono-genetskog stanovišta (**Moncalvo**, 2005).

Tradicionalna sistematizacija gljiva zasnovana je isključivo na primeni morfoloških karakteristika u cilju determinacije vrsta i njihovog uključivanja u odgovarajuće taksone.

Na osnovu navedenih kriterijuma (**Sutton**, 1980), položaj vrsta *C. trifolii* i *C. destructivum* u sistematici gljiva je sledeći:

CARSTVO: Fungi

RAZDEO: Ascomyceta

KLASA: Blastodeuteromycete

PODKLASA: Enteroblastomycetidae

RED: Phialidales

PODRED: Phialostromatineae.

ROD: *Colletotrichum*.

Na osnovu klasifikacije viših taksona fitopatogenih gljiva predložene od strane **Hawkswort et al.** (1995) i **Agrios** (1997), vrsta *C. destructivum* sa teleomorfnim stadijumom *G. glycines* je svrstana u sledeće taksonomske kategorije:

CARSTVO: Fungi

RAZDEO: Ascomycota

KLASA: Pyrenomycetes

RED: Phyllachorales

FAMILIJA: Phyllachoraceae

ROD: *Glomerella*.

Primenom istih taksonomskih kriterijuma (**Hawkswort et al.**, 1995; **Agrios**, 1997), vrsta *C. trifolii* pripada:

CARSTVO: Fungi

RAZDEO: Ascomycota

KLASA: Deuteromycetes

ROD: *Colletotrichum*.

U toku poslednje decenije, sa razvojem molekularnih metoda dobijen je veliki broj podataka vezanih za genetsku strukturu roda *Glomerella/Colletotrichum*. Revizija klasifikacije Pyrenomycetes (Sordariomycetes) obavljena je molekularnom analizom četiri genska regiona (mala nuklearna podjedinica rDNA - nuclear small subunit of rDNA, nSSU rDNA; velika nuklearna podjedinica rDNA - nuclear large subunit nLSU rDNA; translokacioni factor izduživanja 1- α - translation elongation factor 1- α TEF1; druga velika podjedinica RNA polimeraze -second largest subunit of RNA polymerase II, RPB2), dobijeni podaci su statistički analizirani i rekonstruisano je filogenetsko stablo u koje su uključene ispitivane vrste. Familija Phyllachoraceae i red Phyllachorales su isključeni, a kao novi takson uvedena je podklasa Hypocreomycetidae. Rod *Glomerella* sa anamorfnim stadijumom svrstan je u familiju Glomerellaceae. **Zhang et al.** (2006) su na taj način odredili novi taksonomski status *C. destructivum*, odnosno teleomorfa *G. glycines* u sistematici gljiva:

CARSTVO: Fungi

RAZDEO: Ascomycota

PODRAZDEO: Pezizomycotina

KLASA: Sordariomycetes

PODKLASA: Hypocreomycetidae

FAMILIJA: Glomerellaceae

ROD: *Glomerella*.

Na osnovu podataka dobijenih iz svetske baze podataka (**Broad Institute Colletotrichum Genome Database**, 2012; **ARS Fungal Databases**, 2012 i **Index Fungorum**, 2012) rod *Colletotrichum* pripadao bi sledećim taksonomskim jedinicama:

CARSTVO: Fungi

RAZDEO: Ascomycota

KLASA: Sordariomycetes

FAMILIJA: Glomerellaceae

ROD: *Colletotrichum*

2.4.1 Najznačajnije *Colletotrichum* vrste kao patogeni lucerke

Na lucerki kao biljci domaćinu opisan je veći broj vrsta roda *Colletotrichum* koje se razlikuju po brojnim osobinama, kao i značaju i rasprostranjenosti.

Colletotrichum trifolii Bain et Essary prvobitni opis gljive pod imenom *Colletotrichum trifolii* dali su Bain et Essary, 1906. godine, koji su je naveli kao patogena lucerke i crvene deteline (**Tiffany and Gilman**, 1954; **Baxter et al.**, 1983).

Prema **Sutton** (1980), *C. trifolii* je po morfološkim i odgajivačkim osobinama sličan sa *C. lindemuthianum*, koji je patogen velikog broja leguminoznih vrsta. Iz tih razloga **Sutton** (1980) nije uključio *C. trifolii* na svoju listu vrsta roda *Colletotrichum*, ali u nizu domaćina *C. lindemuthianum* navodi i lucerku. Izolati *C. trifolii* u kulturi rastu neznatno brže od izolata *C. lindemuthianum* i obrazuju maslinasto zelene kolonije sa nešto kraćim setama. Dalja ispitivanja morfologije i proučavanja kultura izolata poreklom sa velikog broja domaćina, pokazala su da su *C. trifolii* i *C. lindemuthianum* različiti po specijalizaciji prema domaćinu i da se tako *C. trifolii* ne može smatrati sinonimom ili posebnom formom *C. lindemuthianum*, zbog činjenice da ova vrsta parazitira isključivo lucerku i crvenu detelinu (**Baxter et al.**, 1983).

Kolonije *C. trifolii* na PDA podlozi obrazuju gustu, somotastu miceliju, maslinasto zelene boje u sredini, koja sa starenjem počinje da tamni i prelazi u tamno maslinasto zelenu boju, dok obod kolonije i dalje zadržava beličastu boju. Sa naličja kolonija je prljavo bele boje sa tamno maslinastim centralnim delom. Gljiva se odlikuje širokim, cilindričnim konidijama sa zaobljenim krajevima, veličine 11-12,9 x 3,5-4 µm (**Baxter et al.** (1983). Sete su relativno kratke, često skrivene u blizini blede narandžaste mase konidija. Sete su tamno braon, veličine 55-100 x 4-7 µm u proseku 75 x 4,9 sa 1-3 septe u proseku 2 (**Baxter et al.**, 1983).

Colletotrichum destructivum O`Gara [telomorfni stadijum *Glomerella glycines* Lehman and F.A. Wolf] prvi put se opisuje na lucerki i to kao patogen stabljika i lišća (**Jones and Weimer**, 1940; loc. cit. **Boland and Brochu**, 1989). *C. destructivum* je vrsta koja izaziva ozbiljne štete na lucerki (**Boland and Brochu**, 1989). **Robotić i Klokočar-Šmit** (1983a) navode da *C. destructivum* prouzrokuje značajne štete na lucerki u Evropi. **Troeung and Gosset** (1987) navode ovu vrstu kao patogena lucerke u severnoj Africi, dok **Koch et al.** (1989) ga opisuju kao patogena lucerke u Južnoj Africi. **Graham et al.** (1976) opisuju *C. destructivum* kao sekundarnog parazita na lucerki, dok **Allen et al.** (1982) smatraju da je ova vrsta rasa 3 vrste *C. trifolii*. Međutim, nakon testova patogenosti i na osnovu morfologije **Boland and Brochu** (1989) došli su do zaključka da nije reč o novoj rasi vrste *C. trifolii*, već o posebnoj vrsti *C. destructivum*

koja je ispoljila visoku patogenost prema testiranim sortama lucerke. Pri vlažnom i toplom vremenu *C. destructivum* preuzima ulogu primarnog parazita na lucerki. Simptomi na stablu lucerke su u vidu braon lezija oivičenih tamno braon oreolima, sa tipičnim simptomom "pastirska kuka". Tako da prema simptomima koje izazivaju nema razlike između vrsta *C. trifolii* i *C. destructivum* (**Frayssinet**, 2008).

Kolonija *C. destructivum* na PDA podlozi formira gustu pamučastu miceliju somotasto sive boje do svetlo maslinasto zelene. Ivična zona kolonije je svetlo maslinasto zelena. Naličje kolonije je sa začecima stromatičnih tvorevina. Konidije *C. destructivum* su cilindrične, sužene na jednom kraju i zaobljene na drugom kraju, dimenzija prema **Boland and Brochu** (1989), dimenzija 14,4-18,1 x 3,9-4,1 μm . Sete su prave, često skrivene u blizini blede narandžaste mase konidija, svetlo braon boje dužina varira, 45-195 x 3,5-11 μm u proseku 105 x 5,2 μm sa 2-7 septi u proseku 3 (**Frayssinet**, 2008).

Manandahar et al. (1986) prvi su uspostavili vezu između anamorfa *C. destructivum* i teleomorfa *Glomerella glycines*, dali detaljan opis morfologije i patogenosti *G. glycines*. Takođe, ustanovili su da je veličina apesorija i dužina konidija *C. destructivum* slična sa dimenzijama *C. lindemuthianum*. Međutim, *C. destructivum* i *C. lindemuthianum* razlikuju se na osnovu karakteristika u kulturi, širini konidija i na osnovu osobina teleomorfnog stadijuma.

Baxter et al. (1983) i **Hyde et al.** (2009a) navode da na lucerki nije konstatovan telomorfni stadijum *G. glycines*, izolati nisu formirali peritecije, ni u kulturi niti na biljkama lucerke.

Krug domaćina *C. destructivum* je širok i uključuje leguminoze kao što su *Glycine max*, *Leucaena leucocephala*, *Lotus* spp., *Melilotus albus*, *Phaseolus lathyroides*, *Trifolium* spp., *Vigna unguiculata*, *Coronilla varia*, kao i duvan (*Nicotiana tabacum*), vilinu kosicu (*Cuscuta* spp.) i *Arabidopsis thaliana* (**Baxter et al.**, 1983; **Manandahar et al.**, 1986; **Koch et al.**, 1989; **Latunde-Dada et al.**, 1997; **Lantunde-Dada et al.**, 1999; **Latunde-Dada and Lucas**, 2007; **O'Connell et al.**, 2004; **Shen et al.**, 2001).

O'Connell et al. (2004) su zbog morfološke sličnosti konidija i apesorija, načina ostvarivanja infekcije, i njihovih sekvenci ITS regiona rDNA koristili naziv *C. higginsianum* kao sinonim za *C. destructivum*. **Sun and Zhang** (2009) izolovali su *C.*

higginsianum sa stočnog graška, na osnovu morfololoških karakteristika (izgled kolonije, konidije i apresorije) i ITS sekvenci zaključili su da postoji velika sličnost sa vrstom *C. destructivum*. Međutim, **O'Connell et al.** (2012) na osnovu multilokus filogenetske analize ITS regiona *C. higginsianum* i *C. destructivum*, konstantuju da se radi o dve različite vrste.

Latunde-Dada and Lucas (2007) navode da nukleotidne sekvence ITS regiona rDNK različitih vrsta *C. truncatum*, *C. destructivum* i *C. linicola* imaju veliku sličnost (97-99%), i predložili su radi tačne identifikacije, korišćenje kombinacija filogenetske analize, morfologije i načina ostvarivanja infekcije. Ovo sve ukazuje koliko je status vrste *C. destructivum* nejasan u odnosu na srodne vrste.

Mnoge zabune zasnivaju se na činjenici da *C. destructivum* nije potpuno determinisan i da ne postoji univerzalno prihvaćen način za određivanje taksonomskog statusa vrsta u okviru roda *Colletotrichum* (**Hyde et al.**, 2009a). ITS region rDNA predložen je kao primarni marker za identifikaciju gljiva iz praktičnih razloga, jer je dostupan najveći broj sekvenci ovog regiona (**Cannon et al.**, 2012).

2.4.2. Varijabilnost vrsta roda *Colletotrichum* patogenih za lucerku

Lucerka je stranooplodna autotetraploidna biljka. Sorte lucerke predstavljaju heterogenu genetičku mešavinu sa malim procentom biljaka koje u sebi nose genetički materijal za otpornost prema bolestima. Pokušaji da se stvore tolerantne sorte na antraknozu nisu dali dugotrajne rezultate. Jedan od razloga je postojanje više rasa *C. trifolii*, a za sada su definisane i određene tri rase ove patogene gljive. Rase *C. trifolii* se određuju na osnovu reakcije prema diferencijalnim sortama lucerke Saranc, Arc i Saranc AR (**Ostazeski et al.**, 1979). Sorta Saranc je osetljiva na rasu 1 i 2, dok je sorta Arc otporna na rasu 1 i osetljiva prema rasi 2. Međutim, sorta Saranc AR otporna je na obe rase (**Ostazeski et al.**, 1979; **Elgin and Ostazeski**, 1982; **Elgin and Ostazeski**, 1985; **Boland and Brochu**, 1989; **Mackie et al.** 2003). Kod lucerke otpornost prema rasi 1 i 2 je kontrolisana sa dva dominantna alela An₁ i An₂ (**O'Neill et al.**, 1989). Rasa 1 raširena je u celom svetu, dok je rasa 2 detektovana pojedinim delovima Amerike i Australije (**O'Neill**, 1996; **Mackie et al.**, 2003).

U Oklahomi u SAD 1982. godine izdvojena su tri izolata *C. trifolii* za koje se smatralo da pripadaju rasi 3 (**Allen et al.**, 1982). Međutim, nakon testa patogenosti je

utvrđeno da dobijeni izolati pripadaju vrsti *C. destructivum* (O'Neill, 1996; Mackie and Irwin, 1998).

Rasa 4 *C. trifolii* prvi put je identifikovana u Americi 2003. godine. Okarakterisan je jedan izolat OH-WA-520, koji se od izolata rase 1 i 2 razlikovao samo na osnovu simptoma koje izaziva na diferencijalnim sortama lucerke. Pokazalo se da dobijeni izolat ne ispoljava patogenost prema sortama Saranc i Saranc AR, dok za je sortu Arc virulentan (Ariss and Rhodes, 2007).

2.5. Načini ostvarivanja infekcije vrsta roda *Colletotrichum* patogenih za lucerku

Faktori spoljne sredine imaju važnu ulogu u ostvarivanju infekcije i razvoju antraknoznog procesa na biljci domaćinu. Intenzitet i dužina trajanja padavina, temperatura vazduha, infektivni potencijal 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 (RH~80%), (Roberts et al., 2001).

Primarni izvori inokuluma u prirodi su biljke domaćini sa ispoljenim simptomima antraknoze i formiranim plodonosnim strukturama, ali i epifitne i endofitne forme patogena prisutne na asimptomatičnom biljnom tkivu (Leandro et al., 2001; DeMarsay and Oudemans, 2004). Utvrđeno je da gljive iz roda *Colletotrichum* mogu preživeti na razloženim biljnim ostacima (Norman and Strandberg, 1997).

Osim primarnih domaćina biljke iz spontane flore mogu takođe biti značajne u procesu širenja infekcije kao izvor inokuluma. Uloga alternativnih domaćina u biološkom ciklusu prouzrokovala antraknoza nije u potpunosti rasvetljena, ali je poznato da su korovske vrste *Cuscuta* spp. i *Arabidopsis thaliana* vektori *C. destructivum* u prirodi (Latunde-Dada et al., 1997).

Širenje gljiva *Colletotrichum* vrsta najčešće se ostvaruje uz pomoć kišnih kapi i vetra (Ntahimpera et al., 1999), a primarnu funkciju u širenju infekcije imaju konidije formirane na biljkama domaćinima sa pegama od antraknoze.

Na površini biljke konidije patogena *Colletotrichum* spp. klijuju, obrazujući specifične strukture–apresorije čija je primarna funkcija mehanički prodor kroz kutikulu i ostvarivanje infekcije (Perfekt et al., 1999). U ređim slučajevima, proces razgradnje

kutikule i penetracija patogena u unutrašnjost biljnog tkiva ostvaruje se uz pomoć enzima za degradaciju kutikule-kutinaze (**Bailey and Jeger, 1992**).

Nakon prodora u subkutikularni prostor većina vrsta roda *Colletotrichum* obavlja kolonizaciju epidermalnih ćelija preko primarnih intracelularnih hifa. U ovoj etapi infektivnog procesa nema vidljivih znakova oboljenja, niti promena na biljci domaćinu. Do nekroze ćelija dolazi formiranjem sekundarnih nekrotrofnih hifa.

Patogeni koji na ovaj način ostvaruju infekciju pripadaju intracelularnim hemibiotrofima ili fakultativnim biotrofima (**Kim et al., 2004**). Drugi tip kolonizacije biljnog tkiva ostvaruje se isključivo uz pomoć subkutikularnih nekrotrofnih hifa. Prelazna biotrofna faza kod ovog načina ostvarivanja infekcije ne postoji, a nekroza ćelija epidermisa i mezofila nastupa brzo (**Bailey and Jeger, 1992**).

Latunde-Dada and Lucas (2007) konstatuju da je u interakciji *C. destructivum*– domaćin najčešće zastupljena hemibiotrofna faza, a **Peres et al. (2005)** navode da se u zavisnosti od biljne vrste mogu razlikovati četiri osnovna načina ostvarivanja infekcije vrsta *C. trifolii* i *C. destructivum*.

(1) Biotrofni razvoj gljive sa formiranjem apresorije na površini biljnog tkiva i primarnih infektivnih hifa u unutrašnjosti epidermalnih ćelija. Sekundarne konidije se obrazuju direktno iz apresorija i preko njih se ostvaruje dalje širenje patogena u prirodi. Na ovaj način u prirodi *C. trifolii* ostvaruje infekciju na biljkama lucerke (**Bailey and Jeger, 1992**).

(2) Subkutikularni nekrotrofni oblik parazitiranja sa formiranjem apresorije na površini biljnog tkiva i razvojem sekundarnih nekrotrofnih hifa neposredno ispod kutikule. Daljim napredovanjem infektivnog procesa sekundarne hife prodiru u unutarćelijski prostor i dovode do nekroze. Na ovaj način *C. trifolii* i *C. destructivum* ostvaruju infekcije u prirodi (**Latunde-Dada et al., 1997**).

(3) Hemibiotrofni razvoj gljive sa apresorijom na površini i obrazovanjem primarnih infektivnih i sekundarnih nekrotrofnih hifa u unutrašnjosti epidermalnih ćelija. Ovaj vid infekcije predstavlja kombinaciju biotrofnog i nekrotrofnog načina parazitiranja. *C. destructivum* ostvaruje infekciju tako što u inicijalnoj biotrofnoj fazi, unutarćelijske osnovne hife ograničavaju pojedine epidermalne ćelije, a u sledećoj nekrofilnoj fazi, sekundarne hife napadaju susedne ćelije, na isti način kao kod *C. higginsianum*

poreklom sa biljaka familije kupusnjača (Brassicaceae) i *C. linicola* poreklom sa lana (O'Connell et al., 2004; Latunde-Dada and Lucas, 2007).

(4) Kombinovani, hemibiotrofni i subkutikularni nekrotrofni oblik parazitiranja sa formiranjem apresorije na površini i obrazovanjem infekcione vezikule u unutrašnjosti biljnog tkiva. Na ovaj način vrste *C. truncatum*, *C. linicola*, *C. destructivum* i *C. higginsianum* ostvaruju infekcije biljaka domaćina u prirodi (O'Connell et al., 2004; Latunde-Dada and Lucas, 2007).

Za vrste *C. destructivum* i *C. trifolii*, kao prouzrokovaoče antraknoze leguminoza, veoma je značajna mogućnost ostvarivanja latentnih infekcija u toku vegetacionog perioda. Latentna zaraza predstavlja vid prilagođavanja gljive na preživljavanje u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine. Razvoj gljive u zelenim biljnim organima ograničen je usled nedostatka hranljivih i energetskih izvora (Wharton and Uribeondo, 2004). Gljiva-potencijalni patogen prolazi kroz period mirovanja u cilju prevazilaženja toksičnog efekta formiranih fitoaleksina, kao odbrambenih mehanizama biljke domaćina. Istovremeno usled smanjene produkcije enzima pektinesteraze i drugih koji dovode do degradacije tkiva, izostaje pojava simptoma i vidljiva manifestacija prisustva patogena. Ovaj vid infekcije jedan je od najviših oblika parazitiranja, s obzirom da biljka i patogen egzistiraju zajedno, a da pri tome gljiva ne izaziva promene na svom domaćinu.

Sposobnost izazivanja latentne infekcije primarna je karakteristika vrsta iz roda *Colletotrichum* (Sinclair, 1999). Eventualna pojava vidljivih simptoma bolesti nastaje 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., 2003a, 2003b; Peres et al., 2005).

2.6. Značajne vrste roda *Colletotrichum* opisane na lucerki u Srbiji

U Srbiji pojava antraknoze lucerke prvi put je zabeležena u julu 1980. godine u okolini Subotice. **Robotić i Klokočar-Šmit** (1983a) navode da su se gubici u lucerištima kretali do 30%. Proučavanjem osetljivosti devet stranih i osam domaćih sorti lucerke prema *C. trifolii* i *C. destructivum*, utvrđeno da su skoro sve sorte

podjednako osetljive, dok su se jedino domaća sorta Vuka, i strana Liberti, pokazale kao srednje osetljive (**Robotić i sar.**, 1983b).

Međutim, prisustvo patogena *C. trifolii* i *C. destructivum* potvrđeno je i narednih godina i na drugim lokalitetima. **Milijić i sar.** (1986) konstatuju da se *C. trifolii* i *C. destructivum* pojavljuju u Timočkoj krajini, Valjevu, Užicu, Požegi i Čačku.

Isto tako, **Milijić i sar.** (1984, 1986) registruju *C. trifolii*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* spp., *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* i *Alternaria* spp.. Ove gljive su prouzrokovale sušenje i trulež biljaka lucerke. Od svih izolovanih gljiva najzastupljenija je bila *C. trifolii* u svim ispitivanim lokalitetima.

U istraživanjima **Vasić** (2007) koja su sprovedena na više lokaliteta u Srbiji (Zrenjanin, Aleksinac, Kruševac, Čuprija, Varvarin) utvrđeno je prisustvo patogene gljive *C. trifolii*. Štete na lucerištu se kreću do 30%. U ovaj procenat nisu uračunate štete koje nastaju u narednoj godini usled proređivanja i propadanja lucerišta. **Vasić et al.** (2009) proučavajući osetljivost četiri sorte lucerke: K-28, NS Mediana, Affinity + Z i Alfagraze prema prouzrokovaču antraknoze *C. trifolii*, konstatuju značajnu osetljivost istipitivanih genotipova lucerke.

Takođe, **Vasić et al.** (2010) proučavaju osetljivost pet sorti crvene deteline (K-39, Manuela, Margot, K-32 i L-50) prema *C. trifolii* i dolazi do zaključka da su testirane sorte crvene deteline veoma osetljive prema prouzrokovaču antraknoze. **Vasić et al.** (2011b) PCR metodom identifikovali su izolate sa lucerke koji pripadaju rodu *Colletotrichum*. Dobijeni rezultati amplifikacije ukazuju da izolati poseduju osobine koje odgovaraju vrsti *C. trifolii*.

Usled nedovoljne proučenosti kompleksa vrsta iz roda *Colletotrichum* prouzrokovača antraknoza na lucerki, neophodna su dalja istraživanja u cilju rasvetljavanja etiologije ove bolesti, utvrđivanje vrsta koje učestvuju u kompleksu kao i njihova detaljna karakterizacija, a sve u cilju iznalaženja adekvatnih mera za njihovo suzbijanje.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije obuhvatila su utvrđivanje prisustva i rasprostranjenosti gljiva iz roda *Colletotrichum* patogena na lucerki (*Medicago sativa* L.) u Srbiji. Mada su vrste iz roda *Colletotrichum* na različitim kulturama već proučavane, o kompleksu vrsta patogenih za lucerku u Srbiji nema dovoljno informacija, naročito o njihovoj varijabilnosti i patogenosti.

Osnovni cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je rasvetljavanje etiologije antraknoze lucerke u Srbiji, identifikacija vrsta koje sačinjavaju kompleks prouzrokovaca, kao i pouzdana identifikacija i karakterizacija izolovanih gljiva do nivoa vrste, ispitivanjem patogenih i morfoloških osobina, vegetativne kompatibilnosti, kao i primenom molekularnih metoda. Razvijanje i primena protokola za molekularnu identifikaciju prouzrokovaca pruža osnovu za brzu i preciznu identifikaciju, kao i određivanje tačne taksonomske pozicije prouzrokovaca kroz rekonstrukciju filogenetskih stabala na osnovu više gena uključenih u ispitivanja. Od velikog značaja je i to što će dobijeni rezultati predstavljati uvod u bližu genetičku karakterizaciju, kao i brzo i lako razlikovanje morfološki sličnih izolata i vrsta roda *Colletotrichum*. Sekvencioniranje više odgovarajućih delova genoma izolata, njihovo međusobno poređenje i određivanje filogenetskog međuodnosa sa drugim izolatima u svetu, doprinose poznavanju strukture populacije vrsta roda *Colletotrichum*, a kroz to doprinose razvijanju uspešne strategije suzbijanja ovih veoma štetnih patogena. U ovom radu je dat pregled vegetativne kompatibilnosti, u cilju dodatnog determinisanja i utvrđivanja genetičke varijabilnosti više izolata u okviru populacije vrsta *Colletotrichum* detektovanih u Srbiji.

Veoma značajan cilj ispitivanja u okviru ove disertacije bio je i određivanja postojanja različitog nivoa osetljivosti komercijalnih sorti lucerke prema prevalentnim vrstama *Colletotrichum* spp., koji će se dalje koristiti u programima selekcije lucerke na otpornost.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. Prikupljanje početnog materijala i izolacija gljiva

Ispitivani izolati u ovom radu, dobijeni su iz obolelih biljaka lucerke i crvene deteline koje su prikupljene u periodu 2005-2010. godine. Prikupljanje uzoraka obavljeno je u glavnim proizvodnim područjima oba useva na teritoriji Republike Srbije uključujući ukupno 17 lokaliteta: Čurug, Ašanja (južno bački okrug), Srpska Crnja, Farkaždin (južno banatski okrug), Trnavci (nišavski okrug), Vraneši (raški okrug), Banatsko Karađorđevo, Aleksandrovo (srednje banatski okrug), Banovci (sremski okrug), Markovac (podunavski okrug), Selo Varvarin, Kobilje, Globoder, Bela Voda (rasinski okrug), Kloka (šumadijski okrug), Davidovac (pčinjski okrug) i Dobričevo (pomoravski okrug).

Sakupljanje uzoraka obavljeno je posle prvog otkosa tokom meseca jula, u poljima lucerke i crvene deteline starosti dve i više godina. Prilikom prikupljanja uzoraka obolelih biljaka na terenu uzimani su izdanci sa simptomima hloroze i uvelih vrhova povijenih na dole u vidu pastirske kuke. Takođe, uzimani su uzorci korena i krune obolelih biljaka. Svi uzorci su stavljeni u papirne kese i tako dopremani do fitopatološke Laboratorije Instituta za krmno bilje, Kruševac. Ukupno je sakupljeno i analizirano 80 uzoraka.

Izolacija patogena obavljena je sa stabla, korenovog vrata i korena lucerke i crvene deteline. Po donošenju uzoraka u laboratoriju uzorci su najpre ispirani tekućom vodom, a zatim je primenom standardnih fitopatoloških metoda vršena izolacija gljiva. Delovi stabla, korena i korenovog vrata ispirani su tekućom vodom 2 h, a zatim isečeni na fragmente dužine 1 cm. Fragmenti stabla su isečeni na prelazu nekrotičnog i zdravog tkiva, površinski dezinfikovani pet minuta u 5% rastvoru natrijum hipohlorita (NaOCl) (14% NaOCl, cat. No. 0221007, Centro-hem, Superlab, Beograd) i isprani tri puta po pet minuta u sterilnoj destilovanoj vodi. Fragmenti su preneti na sterilan filter papir, da se odstrani višak tečnosti i postavljeni na hranljivu podlogu. Za izolaciju patogena korišćena je podloga krompir dekstrozni agar (potato dextrose agar, PDA) oplemenjen sa 300 µl/l gentamicin sulfata. Ova podloga je pripremljena od 200 g krompira, 17-20 g dekstroze (dextrose, Torlak, Institut za imunologiju i virusologiju, Beograd), 17-20 g agara (agar-agar, Torlak, Institut za imunologiju i virusologiju, Beograd) i 1 l

destilovane vode (**Dhingra and Sinclair, 1995**). Zasejane Petri kutije inkubirane su u termostatu na temperaturi od $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, u mraku do razvoja kolonija gljiva oko fragmenata.

4.2. Dobijanje čistih kultura, monosporijalnih izolata i njihovo čuvanje

Izdvajanje čistih kultura gljiva koje su se razvile prilikom izolacije iz različitih biljnih delova izvršeno je presejavanjem fragmenata podloge i kolonije na svežu podlogu, 3-5 dana posle zasejavanja. Za presejavanje odabrane su kolonije koje su po mikroskopskim osobinama formiranja kolonije odgovarale opisu kolonijama koje formiraju vrste roda *Colletotrichum*. Nakon izdvajanja kultura svih izolata pristupilo se dobijanju monosporijalnih izolata koji su korišćeni za dalja ispitivanja.

Monosporijalni izolati ispitivanih gljiva dobijeni su od čistih kultura starih 7 dana odgajenih na PDA u termostatu pri temperaturi od $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, u mraku. U razvijene čiste kulture gljiva za dobijanje monosporijalnih izolata, dodato je oko 10 ml sterilne vode i blagim trljanjem staklenim štapićem izvršeno je oslobađanje micelije i konidija od podloge. Tako dobijena suspenzija filtrirana je, u sterilnim uslovima kroz dva sloja gaze, da bi se odstranila micelija, razređivana u nekoliko koraka po 10 puta i od svakog razređenja odvajan je po 1ml suspenzije konidija i zasejan na vodeni agar (WA, water agar). Vodeni agar pripreman je od 17g agara i 1l destilovane vode (**Dhingra and Sinclair, 1995**). Nakon inkubacije u trajanju od 4-6 sati, mikroskopiranjem su obeležene i izdvojene pojedinačne proklijale konidije svakog izolata, a zatim prebacivane na svežu PDA. Inkubacija je obavljena na $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, u mraku. Razvojem ovako presejanih pojedinačnih klijalih konidija dobijeno je više monosporijalnih kultura od svakog pojedinačnog izolata. Dobijeni monosporijalni izolati presejani su u epruvete sa zakošenom PDA i gajeni 7 dana u termostatu na 25°C . Nakon odgovarajućeg razvoja izolata na zakošenoj PDA podlozi, epruvete su pakovane u plastične kese i čuvane u frižideru na 4°C u vidu kolekcije. Ponovno presejavanje ovako formirane kolekcije izolata obavljano je svakih 6 meseci.

4.3. Izbor izolata za dalja istraživanja

Nakon dobijanja izolata *Colletotrichum* spp. iz biljaka sa simptomima u polju, svi izolati su izdvojeni u vidu monosporijalnih kultura i njihova patogenost proverena je tako što je suspenzija konidija nanošena prskanjem na klijance lucerke (**Mould et al., 1992**). Klijanci lucerke odgajeni su u stakleniku Instituta za krmno bilje u Kruševcu i u fazi razvoja 3-4 lista, prskani su suspenzijom spora (koncentracije 10^4 konidija/ml). Suspenzija konidija pripremljena je od kultura starih 10 dana, odgajenih na PDA, u mraku pri temperaturi od 25°C. U razvijene kolonije nalivena je potrebna količina sterilne vode i micelija je odvajana od podloge staklenim štapićem u cilju oslobađanja formiranih konidija. Koncentracija dobijene suspenzije konidija određivana je i podešavana na željenu koncentraciju hemocitometrom kako preporučuje **Muntanola-Cvetković (1987)**.

Inokulisane biljke održavane su u uslovima staklenika. U cilju obezbeđenja uslova povišene vlažnosti, biljke su po inokulaciji pokrивene plastičnim kesama koje su 2 dana nakon inokulacije uklonjene. Pojava simptoma posmatrana je dve nedelje od inokulacije. Sa biljaka na kojima su se razvili simptomi, izvršena je reizolacija i dobijene su monosporijalne kulture reizolata korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji. Dalji rad nastavljen je sa reizolatima.

Nakon potvrđivanja njihove patogenosti na klijancima lucerke, pristupilo se izboru izolata čije će osobine biti detaljnije proučavane i na osnovu čega će biti obavljena njihova identifikacija. Izolati su grupisani prema osnovnim morfološkim kriterijumima (izgledu i boji kolonije, brzini porasta na PDA podlozi i obliku konidija). Za dalja ispitivanja patogenih, morfoloških, molekularnih osobina i vegetativne kompatibilnosti ukupno je odabrano 18 izolata *Colletotrichum* spp. različitog porekla (tabela 1).

Tabela 1. Pregled izolata vrsta iz roda *Colletotrichum* odabranih za dalja istraživanja

Lokaliteti	Okruzi	Godina izola.	Biljka domaćin	Sorte	Oznaka izolata
Kobilje	Rasinski okrug	2005.	Lucerka	K-23	Coll-3
S. Varvarin	Rasinski okrug	2005.	Lucerka	K-28	Coll-4
Vraneši	Raški okrug	2005.	Lucerka	K-28	Coll-8
Globoder	Rasinski okrug	2005.	Lucerka	K-28	Coll-9
B. Voda	Rasinski okrug	2006.	Lucerka	K-28	Coll-10
B.Karađorđev	Srednje banatskiokrug	2006.	Lucerka	Mediana	Coll-11
Trnavci	Niški okrug	2007.	Lucerka	K-23	Coll-18
Dolovo	Podunavski okrug	2008.	Lucerka	K-28	Coll-29
Aleksandrovo	Srednje banatskiokrug	2008.	Lucerka	K-28	Coll-32
Farkaždin	Južno banatski okrug	2009.	Lucerka	K-28	Coll-35
Kloka	Šumadijski okrug	2009.	Lucerka	K-23	Coll-37
Markovac	Podunavski okrug	2009.	Lucerka	K-28	Coll-38
Srpska Crnja	Južno banatski okrug	2009.	Lucerka	K-28	Coll-44
Dobričevo	Pomoravski okrug	2010.	Lucerka	K-23	Coll-48
Davidovac	Pčinjski okrug	2010.	Lucerka	K-28	Coll-68
Čurug	Južno bački okrug	2010.	Lucerka	Mediana	Coll-75
Ašanja	Južno bački okrug	2010.	C. detelina	K-39	Coll-Aš
Banovci	Sremski okrug	2010.	C. detelina	K-39	Coll-Bk

U komparativna proučavanja uključena su i tri referentna izolata: *C. trifolii* (C-82-2 rasa 1) (kolekcija INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, France), *C. trifolii* (CBS 158.83) (kolekcija CBS Culture Collection of Fungi, Yeast, Bacteria, Plasmids and Phages, Netherlands) i *C. destructivum* (CC657) (Poljoprivredni institut dr Petar Drezgić, Sremska Mitrovica, nabavljen iz kolekcije CBS Culture Collection of Fungi, Yeast, Bacteria, Plasmids and Phages, Netherlands).

4.4. Proučavanje uporednih patogenih osobina izolata *Colletotrichum* spp. sa lucerke

U cilju utvrđivanja detaljnijih patogenih osobina 18 odabranih monosporijalnih izolata dobijenih iz zaraženog stabla lucerke i crvene deteline urađene su veštačke inokulacije biljke domaćina. Određivanje patogenosti odabranih izolata obavljeno je primenom dve metode inokulacijam klijanaca lucerke u Petri kutiji **Chi et al.** (1964), kao i inokulacijom isečaka korena lucerke (**Krnjaja**, 2005). Oba testa sprovedena su u *in vitro* uslovima, u cilju određivanja pogodnijeg. Takođe, u oba testa kao test biljka korišćena je lucerka sorta K-28, iz Instituta za krmno bilje, Kruševac.

Inokulacija korena klijanca. Prvi način provere patogenosti obavljen je inokulacijom korena klijanca lucerke. Seme lucerke je prvo površinski dezinfikovano u

95 % etanolu u trajanju od 10 sekundi, zatim u rastvoru 7 % natrijum hipohlorita u trajanju 10 minuta, isprano u sterilnoj vodi i prosušeno na sobnoj temperaturi. Isečak kolonije proučavanog izolata prečnika 5 mm², starosti 10 dana, postavljen je u centar Petri kutije sa PDA podlogom. Oko isečaka kolonije na rastojanju od 2 cm u prečniku, raspoređeno je 15 semena lucerke. Potom su Petri kutije inkubirane pri temperaturi od 25°C. Ogled je postavljen u tri ponavljanja. Dva dana posle zasejavanja ispitivani izolati formirali su primarni koren. Sterilnom pincetom, primarni korenovi raspoređeni su tako da im vrhovi dodiruju ivicu kolonije gljive. Kao negativna kontrola poslužilo je seme lucerke postavljeno na podlogu bez inokuluma. Nakon 10 dana, od postavljanja oglada ocenjivan je stepen patogenosti (virulentnosti) izolata vizuelnim pregledom nekrotičnih površina prema skali:

- avirulentan - nema nekrotičnih površina na korenu;
- + slabo virulentan - nekroza pri vrhu korena;
- ++ srednje virulentan - koren i prizemni deo stabaoaca su nekrotirani, dok su liske u gornjem delu stabaoaca nisu zahvaćeni nekrozom ili micelijom gljive;
- +++ jaka virulentnost - koren, stabaoaca i liske u potpunosti zahvaćeni nekrozom ili micelijom gljive, a u nekim slučajevima došlo je do tzv. "topljenja" klijanaca.

Inokulacija isečaka korena lucerke. U drugom testu patogenosti korišćeni su fragmenti korena zdravih biljaka lucerke. Seme lucerke posejano je u plastične kontejnere dubine 5 cm u sterilni supstrat 1 (Klasman - višenamenski supstrat za setvu) i gajeno u uslovima staklenika. U vreme inokulacije biljke su bile starosti 7 nedelja.

Korenovi su prvo dobro oprani pod mlazom česmenske vode kako bi se uklonile čestice supstrata sa njihove površine. Zatim su sterilnim žiletom isečeni na fragmente dužine 1.5 cm. Isečeni fragmenti površinski su dezinfikovani u 5 % rastvoru natrijum hipohlorita u trajanju 5 minuta, isprani u sterilnoj vodi, višak tečnosti je uklonjen i fragmenti korena su zabodeni u kulture ispitivanih izolata starih 10 dana, odgajene na PDA pri temperaturi od 25°C, u mraku. Postavljeno je po 10 isečaka korena po svakom izolatu. Ogled je izveden u 3 ponavljanja. Zasejane Petri kutije inkubirane su na sobnoj temperaturi od 21-25°C.

Posle 8 dana od zasejavanja merena je dužina nekroze na uzdužnom preseku isečaka korena. Sa korenova na kojima su se razvili simptomi, izvršena je reizolacija korišćenjem istih metoda kao pri izolaciji.

Rezultati dobijeni u drugom testu patogenosti statistički su obrađeni jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) po potpuno sličajnom planu sa po 30 isečaka po izolatu, odnosno tri ponavljanja. Značajnosti razlika između pojedinih vrednosti podataka utvrđene su korišćenjem Duncan-ovog testa, pri $p=0.05$.

4.5. Proučavanje eksperimentalnog kruga domaćina ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Inokulacijama u kontrolisanim uslovima ispitivana je patogenost proučavanih izolata *Colletotrichum* spp. prema različitim biljnim vrstama, odnosno određivan je eksperimentalni niz domaćina. U tu svrhu inokulisano je ukupno 15 biljnih vrsta iz 6 botaničkih familija:

- Fam. Fabaceae: lucerka (*Medicago sativa* L.), crvena detelina (*Trifolium repens* L.), žuti zvezdan (*Lotus corniculatus* L.), grahorica (*Vicia sativa* L.), pasulj (*Phaseolus vulgaris* L.), grašak (*Pisum sativum* L.), soja (*Glycine hispida* Max.) i esparzeta (*Onobrychis sativa* Lam.);

- Fam. Brassicaceae: perko (*Brassica napus* L.);

- Fam. Poaceae: mačiji rep (*Phleum pretense* L.), ježevica (*Dactylis glomerata* L.) i bela rosulja (*Agrostis alba* L.);

- Fam. Solanaceae paprika (*Capsicum annuum* L.);

- Fam. Convolvulaceae poponac (*Convolvulus arvensis* L.) i

- Fam. Linaceae lan (*Linum usitatissimum* L.).

U ogled je uključeno po deset biljaka lucerke, žutog zvezdana, crvene deteline, soje, graška, pasulja, poponca, lana, grahorice, esparzete, perka i paprike, po izolatu. Biljke su inokulisane ubodom i nanošenjem delova kolonije ispitivanih izolata na mesto uboda. Pre inokulacije biljke su sterilisane prskanjem stabala 96% etil alkoholom u trajanju od jednog minuta, a zatim su pomoću špric boce isprane sterilnom vodom. Nakon inokulacije, biljke su držane u vlažnoj komori na temperaturi od 25°C u periodu od 72 sata, u uslovima stalnog mraka. Kao kontrola korišćene su ozleđene, ali neinokulisane biljke, koje su držane u istim uslovima.

Po deset biljaka po izolatu mačijeg repa, ježevice, bele rosulje je inokulisano prskanjem suspenzijom spora testiranih izolata u koncentraciji $4-6 \times 10^4$ konidija/ml (Mould et al., 1992). Koncentracija konidija je određena pomoću hemocitometra po

Tomu. Biljke starosti 6-7 nedelja su pre inokulacije pokošene, a nakon toga prskane suspenzijom konidija ispitivanih izolata.

Za ovaj ogled korišćeno je osam izolata i to: Coll-4 koji je okarakterisan kao *C. trifolii* i referentni izolat CBS 158.83 i izolati Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68 i Coll-75 koji su okarakterisani kao *C. destructivum* i njihov kontrolni izolat CC657.

Osim ovih izolata korišćen je i izolat Coll-44, koji po svojim morfološkim osobinama ne odgovara ni jednoj od napred navedenih vrsta. Izolati su odabrani na osnovu njihovih morfoloških karakteristika. Sve inokulacije su obavljene inokulumom iz kultura gljiva starih deset dana i odgajenih na PDA podlozi. Nastanak promena praćen je svakodnevno, u trajanju od 15 dana.

4.6. Proučavanje morfoloških odlika odabranih izolata *Colletotrichum* spp.

Proučavane su makroskopske i mikroskopske morfološke odlike deset odabranih izolata (Coll-4, CBS158.83, Coll- 8, Coll-9, Coll-18, Coll- 48, Coll-68, Coll-75, CC657 i Coll-44). Makroskopski pregled podrazumevao je opis osnovnih karakteristika kolonija (izgled, boja i zoniranost lica i naličja kulture) (**Muntanola-Cvetković**, 1987).

Od mikroskopskih morfoloških karakteristika proučavani su vegetativni organi (micelija, apresorija), reproduktivni organi anamorfa (konidija, acervula, konidiofora) i reproduktivni organi teleomorfa (peritecija, askus, askospora).

4.6.1. Makroskopske morfološke odlike

Makroskopske morfološke odlike 10 odabranih izolata *Colletotrichum* spp. proučavane su na PDA podlozi, prema metodi **Baxter et al.** (1983). Posmatran je izgled, boja i zoniranost lica i naličja kulture. Proučavanje morfologije vegetativnih organa, obuhvatilo je praćenje razvoja i ocenu fenotipskih karakteristika kolonija *Colletotrichum* spp. na PDA podlozi kao i vreme sporulacije i formiranje tvorevina za razmnožavanje.

Na PDA podlozi proučavan je izgled, struktura, boja i porast micelije ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. Zasejavanje proučavanih izolata gljive na podloge vršeno je aseptičnim nanošenjem okruglih fragmenata kolonija čistih kultura proučavanih izolata

prečnika 10 mm, u centar Petri kutija pomoću kopljaste igle. Zasejane Petri kutije potom su gajene u termostatu na temperaturi od 25°C, bez prisustva svetlosti.

4.6.2. Mikroskopske odlike ispitivanih izolata

Mikroskopske morfološke odlike odabranih izolata *Colletotrichum* spp. proučavane su na podlogama PDA i CLA prema metodi **Baxter et al.** (1983), posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom izgleda hifa i reproduktivnih organa parazita. Privremeni mikroskopski preparati pripremani su nanošenjem fragmenata micelije u kap destilovane vode na površinu predmetnog stakla. Na taj način nanet materijal je prekriven pokrovnom ljusticom i nakon toga mikroskopiran. Podloga sa fragmentima lista karanfila (Carnation Leaf-piece Agar, CLA), pripremljena je od 20 grama agara i 1000 ml destilovane vode, u koju je dodat po jedan fragment lista karanfila na 2 ml podloge (**Waller et al.** 1998).

Proučavanje izgleda hifa obavljeno je prema metodi **Baxter et al.** (1983), na PDA podlozi i u višećoj kapi na predmetnom staklu po metodi **Hawksworth** (1974). Metoda po **Hawksworth** (1974) podrazumeva nanošenje nekoliko kapi konidijske suspenzije konidija na sterilne mikroskopske pločice. Pločice su tokom 5 dana držane u Petri kutijama, koje su služile kao vlažne komore, nakon čega je formiranje hifa posmatrano pod mikroskopom.

Kod morfoloških karakteristika plodonosnog tela – acervule, proučavani su izgled, dimenzije i način njihovog formiranja na prirodnom supstratu (veštački inokulisanim biljkama lucerke), kao i na kulturama gajenim na PDA (**Baxter et al.**, 1983). Veličina konidiomate određena je merenjem prečnika (10 potpuno formiranih acervula na PDA) i izračunavanjem prosečnih vrednosti. Prisustvo ili odsustvo seta u kulturi ili acervulama određeno je prema metodi **Smith and Black** (1990), posmatranjem pomoću svetlosnog mikroskopa 7 do 10 dana starih kultura, deset poučavanih izolata gajenih na PDA i podlozi od karanfila CLA.

Kod odabranih izolata *Colletotrichum* spp. proučavani su oblik i dimenzije konidija. Proučavanje oblika konidija obavljeno je tako što je iz kultura ispitivanih izolata starih 10 dana posmatrano po 30 potpuno razvijenih slučajno izabranih konidija koje su, na osnovu oblika, prema **Smith and Black** (1990), svrstane u jednu od tri grupe: 1) cilindrične, zaobljene na oba kraja; 2) cilindrične, sužene na jednom kraju i

zaobljene na drugom kraju, i 3) elipsoidne, sušene prema vrhovima oba kraja ("fusiformne").

Prosečne dimenzije konidija određene su merenjem dužine i širine 30 slučajno izabranih konidija proučavanih izolata, gajenih na PDA, pomoću svetlosnog mikroskopa (Olimpus CX41) pri ukupnom direktnom uvećanju 400x. Dobijeni rezultati statistički su obrađeni jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) po potpuno sličajnom planu sa po 30 konidija po izolatu. Značajnosti razlike između pojedinih vrednosti podataka utvrđene su korišćenjem Duncan-ovog testa, pri $p=0.05$.

Morfološke karakteristike apresorija proučavanih izolata određene su korišćenjem modifikovane metode **Hawksworth** (1974), koja podrazumeva stavljanje kapi ohlađenog vodenog agara (WA) na sterilne mikroskopske pločice i nanošenje nekoliko kapi suspenzije konidija svakog proučavanog izolata na podlogu. Preko ovako zasejane podloge postavljena je sterilna ljušpica, tako da su pločice tokom 5 dana držane u Petri kutijama, koje su služile kao vlažne komore, nakon čega je formiranje apresorija u dodiru sa ljušpicom posmatrano pod mikroskopom. Kod 10 odabranih izolata *Colletotrichum* spp. proučavani su oblik, boja i dimenzije apresorija. Posmatrano je i mereno 25 apresorija po izolatu. Za svaki izolat izračunate su prosečne dimenzije apresorija.

4.6.3. Formiranje teleomorfog stadijuma

Za praćenje formiranja teleomorfog stadijuma 10 proučavanih izolata *Colletotrichum* spp. gajeno je na PDA. Kulture su gajene na temperaturi od 25°C pri smeni dana i noći, a formiranje peritecija je posmatrano u tri navrata, nakon 30 dana, nakon 6 meseci i nakon 12 meseci. Kulture gljiva, namenjene posmatranju nakon 6 i 12 meseci, čuvane su u staklenim Petri kutijama (prečnika 100mm) u koje je naliveno po 40 ml podloge. Petri kutije su u debljem sloju obmotane parafilm trakom i čuvane u termostatu na temperaturi od 25°C. Ogled je postavljen u 10 ponavljanja.

4.7. Molekularna detekcija i identifikacija

Detekcija i delimična molekularna karakterizacija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. obavljena je na osnovu građe njihovog genoma primenom metode lančane reakcije polimeraze (polymerase chain reaction, PCR). Ispitivani izolati

odgajeni su po proceduri za ekstrakciju DNK, izvršena je ekstrakcija njihove DNK, primenjen je PCR sa tri para prajmera, obavljena je vizuelizacija dobijenih produkata elektroforetskim razdvajanjem u agaroznom gelu i dobijeni produkti su sekvencionirani. Takođe primenjen je i testiran protocol za brzu detekciju vrsta u okviru roda *Colletotrichum* korišćenjem RFLP metode (Restriction Fragment Length Polymorphism), gde su PCR proizvodi podvrgnuti digestiji sa dve kombinacije restrikcionih enzima.

Za molekularnu identifikaciju odabran je ukupno 21 monosporijalni izolat od toga je 18 izolata *Colletotrichum* spp. poreklom iz Srbije: Coll-3, Coll-4, Coll-8, Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-32, Coll-35, Coll-37, Coll-38, Coll-44, Coll-48, Coll-AŠ, Coll-BK, Coll-68, Coll-75, i tri referentna izolata CC657 (*C. destructivum*), C-86-2 (*C. trifolii*) i CBS158.83 (*C. trifolii*).

4.7.1. Ekstrakcija DNK

Kolonije ispitivanih izolata gajene su na PDA u mraku, pri temperaturi od 25°C u trajanju od 7 dana. Ekstrakcija DNK je urađena po metodi koju su opisali **Day and Shattock** (1997). U prvom koraku, micelije ispitivanih izolata sterilnom špatulom je nagrebana sa površine podloge i nanete u 2.0 ml tubice sa tečnim azotom. Po isparenju tečnog azota, u tubicu je naliveno 800 µl 2% CTAB pufera i inkubirano 1 h na 65°C. Tokom inkubacije, na svakih 15 min sadržaj tubice je snažno promućkan.

Po inkubaciji, u svaku mikrotubu naliveno je 800 µl hloroforma i vorteksovano, a zatim centrifugirano 10 min na 11 000 rpm u centrifugi na 4°C (centrifuga Eppendorf 5804 R, Nemačka). Dobijeni supernatant (oko 700 µl) pipetiranjem je prebačen u novu 1.5 ml tubicu, dodato je 0.6 zapremine (oko 420 µl) izopropanola i centrifugirano 15 min na 11 000 rpm na 4°C. Po centrifugiranju, supernatant je pažljivo odliven i tubice su isprane sa 1 ml ledeno-hladnog 70% etanola. Otvorene mikrotube su ostavljene 10-15 min na sobnoj temperaturi. Po sušenju, DNK talog resuspendovan je u 100 µl TE pufera.

4.7.2. Lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Za detekciju ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. primenjena je PCR metoda sa tri para prajmera: ITS1-ITS4 koji umnožavaju ITS region rDNK Eucariota, GSF1-GSR1 koji omogućava amplifikaciju dela gena za glutamin sintetazu (GS) i GDF1-GDR1 amplifikuje fragment koji obuhvata region intron gena za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GPDH). U tabeli 2. navedene su sekvence prajmera i očekivane veličine amplikona korišćenih prajmera.

Univerzalni prajmeri ITS1-ITS4. Ovaj par univerzalnih prajmera omogućava umnožavanje i kasnije sekvencioniranje ITS regiona ribozomalne DNK Eucariota koji obuhvata ITS1, ITS2 i 5.8S rDNK gen. ITS region je visoko varijabilan između različitih vrsta i sa druge strane konzervativan na nivou vrste i kod mnogih rodova fitopatogenih gljiva koristi se za identifikaciju i filogenetske analize. Kako je ITS1-ITS4 par prajmera koji može da amplifikuje ITS region svih Eucariota, može da se koristi za proveru uspešnosti ekstrakcije DNK ispitivanih izolata (Freeman et al., 2000a).

Tabela 2. Pregled prajmera primenjenih za detekciju i identifikaciju *Colletotrichum* spp.

Ciljana sekvenca	Naziv prajmera	Sekvence 5'-3'	Veličina fragmenta	Literani izvor
ITS Eucariota	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	~495 bp	Freeman et al. (2000a)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	~495 bp	Freeman et al. (2000a)
GS	GSF1	ATGGCCGATACATCTGG	~900 bp	Liu et al. (2007)
	GSR1	GAACCGTCGAAGTTCCAC	~900 bp	Liu et al. (2007)
GPDH	GDF1	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	~200 bp	Liu et al. (2007)
	GDR1	GGGTGGAGTCGTA CTTGAGCATGT	~200 bp	Liu et al. (2007)

Pripremanje PCR miks zapremine 25 µl koji je sadržao: 2,5 µl 10xPCR buffer, 0,5 µl 10mM dNTPs, 2 µl 25mM MgCl₂, 15,4 µl sdH₂O, 0,2 µl (5U/ µl) rTaq DNA

Polymerase (GE Healthcare, Velika Britanija), po 1,2 µl 10 mM ITS1 i ITS4 prajmera i 2 µl ciljane DNK.

PCR amplifikacija dobijenih uzoraka izvedena je u termosajkleru Tpersonal, (Biometra, Germany) prema sledećem programu:

- Početna denaturacija na 94°C u trajanju od 5 minuta.
- 30 ciklusa (denaturacija na 94°C u trajanju od 45 s; vezivanje prajmera na 52°C u trajanju od 45 s i izduživanje prajmera na 72°C u trajanju od 1 min)
- Finalno izduživanje na 72°C u trajanju od 5 min.

Pozitivnom reakcijom smatrana je pojava traka produkata očekivane veličine od oko 495bp.

Par prajmera GSF1-GSR1 koji omogućava amplifikaciju dela gena za glutamin sintetazu (GS), odnosno koji umnožava fragment od oko 900 bp koji obuhvata region introna ovog gena (tabela 3). Odabrani genski region pokazuje visok polimorfizam sekvenci između blisko srodnih vrsta, tj. sekvenca ovog dela genoma smatra se visoko informativnom na nivou vrste za ceo rod *Colletotrichum* (Liu et al., 2007; Cai et al., 2009).

Par prajmera GDF1-GDR1 amplifikuje fragment od oko 200 bp koji obuhvata region intron gena za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GPDH) (tabela 3). Ovi prajmeri omogućavaju amplifikaciju introma gena za gliceraldehid-3 fosfat dehidrogenazu (GPHD). Ovaj region smatra se visoko informativnim za vrste u okviru roda *Colletotrichum* (Liu et al., 2007; Cai et al., 2009; Cannon et al., 2012; Damm et al., 2012a, 2012b).

Amplifikacija je obavljena sa PCR miksom zapremine 25 µl koji je sadržao: 2,5 µl 10xPCR buffer, 2,5 µl 2,5mM dNTPs, 1,5 µl 25mM MgCl₂, 15,75 µl sdH₂O, 0,25 µl (5U/ µl) rTaq DNA Polymerase (GE Healthcare, Velika Britanija), po 0,25 µl 10 mM prajmera (GDF1-GDR1 ili GSF1-GSR1) i 2 µl DNK.

PCR amplifikacija uzoraka je izvedena u termosajkleru Tpersonal, Biometra, Nemačka prema sledećem programu:

- Početna denaturacija na 94°C u trajanju od 1 minut
- 30 ciklusa (denaturacija na 94°C u trajanju od 1 min; vezivanje prajmera na 60°C u trajanju od 1 min i elongacija prajmera na 72°C u trajanju od 1,5 min)
- Finalna elongacija na 72°C u trajanju od 5 min.

Kao negativna kontrola u svim PCR reakcijama sa svim korišćenim prajmerima upotrebljena je PCR clean voda (PCR smeša sa RNase-free vodom), tako što je pripremljena reakciona smeša na isti način kao za uzorke a potom je umesto ciljane DNK uzorka dodata PCR čista voda.

4.7.3. Vizuelizacija i analiza produkata PCR reakcije

Analiza dobijenih PCR proizvoda urađena je nakon elektroforetskog razdvajanja dobijenih produkata u 1,5% agaroznom gelu i 0,5X TBE puferu. Agarozni gel pripremljen je rastvaranjem odgovarajuće količine agaroze (USB Corporation, SAD) u 0,5X TBE puferu i zagrevanjem do temperature ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Nakon kratkog hlađenja, gel je razliven u kalupe aparata za horizontalnu elektroforezu (Hoefler, SAD). U gel je uronjen češalj postavljanjem u odgovarajuća ležišta kalupa. Po očvršćivanju gela češalj je izvađen i kalup sa gelom je postavljen u aparat za elektroforezu. U aparat je nasut 0,5X TBE pufer do nivoa kada je gel potpuno potopljen u pufer.

Pre unošenja 5 μ l svakog uzorka je pomešano sa 1,5 μ l boje za nalivanje (Loading dye, MBI fermentas, Lithuania). Pri elektroforezi korišćen je marker 100 bp ladder (Amersham Biosciences, SAD), radi određivanja veličine produkata poređenjem sa očekivanom veličinom DNK fragmenata markera.

Elektroforeza je obavljena pri naponu od 100 V tokom 30 minuta. Bojenje je urađeno potapanjem agaroznog gela u 0,5 μ g/ml rastvora etidijum-bromida u trajanju od 15 minuta. Amplifikovani fragmenti u gelu posmatrani su pod UV svetlom pomoću transiluminatora (Biometra, UK).

4.7.4. Sekvencioniranje dela genoma odabranih izolata

Za sekvencioniranje različitih delova genoma odabrano je 12 izolata. Za sekvencioniranja fragmenta koji obuhvata ITS1, ITS2 i 5.8S rDNK region genoma odabrano je 5 izolata: Coll-44, Coll-48, Coll-18, Coll-75 i CC657. Za sekvencioniranje fragmenta koji je umnožen setom prajmera GSF1-GSR1 odabrano je 4 izolata: Coll-4, Coll-9, Coll-68 i Coll-AŠ. Za sekvencioniranje fragmenta koji je umnožen parom prajmera GDF1-GDR1 odabrano je 8 izolata: Coll-4, Coll-10, Coll-29, Coll-32, Coll-48, Coll-68, Coll-75 i Coll-44.

Nakon PCR umnožavanja i dobijanja jednog amplicona bez nespecifičnih traka, svi dobijeni ampliconi poslani su na uslužno sekvencioniranje u Macrogenu (Amsterdam, Holandija Evropa). Sekvencioniranje je obavljeno sa istim prajmerima kao i PCR amplifikacija, a obavljeno je u oba pravca, radi povećanja sigurnosti dobijene reakcije.

4.7.5. Molekularna identifikacija i karakterizacija

Molekularna identifikacija odabranih izolata *Colletotrichum* spp., poreklom iz Srbije obavljena je, nakon sekvencioniranja tri nuklearna dela genoma, višestrukim uparivanjem sa sekvencama drugih gljiva dostupnih u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti. Nakon dobijanja sekvenci gena za GS (Coll-4, Coll-9, Coll-18 i Coll-Aš), sekvenci ITS genomnog regiona četiri ispitivana izolata (Coll-44, Coll-48, Coll-68, Coll-75 i CC657) i osam ispitivanih izolata (Coll-4, Coll-10, Coll-29, Coll-32, Coll-44, Coll-48, Coll-68 i Coll-75) za gen GPDH, kao i njihova obrade, međusobno su upoređivane sa odgovarajućim sekvencama koje su dostupne u internacionalnoj GenBank bazi podataka (National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Nakon dobijanja sekvenci odabranih izolata vrste su obrađene u programu Bioedit sequence alignment editor (version 7.0.5.3) (Hall, 1999). Nakon toga primenom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analize i višestrukim poređenjem dobijenih sekvenci sa dostupnim sekvencama odgovarajućih genomnih delova u GenBank bazi podataka pomoću CLUSTAL W programa (Thompson et al., 1994), obavljena je potvrda identifikacije dobijenih sekvenci. Za proračun genetičke udaljenosti i najviši stepen nukleotidne sličnosti i međusobno poređenje sekvenci izolata iz Srbije kao i njihovo poređenje sa izolatima iz drugih delova sveta deponovanih u GenBank bazu podataka, upotrebljen je softverski paket MEGA verzija 5.0. (Tamura et al., 2011). Proračun je obavljen nakon trimovanja svih sekvenci na dužinu najkraće.

Filogenetska stabla rekonstruisana su pomoću odgovarajućih metoda korišćenjem distance-matrix metode (neighbor-joining - NJ), a za proveru pouzdanosti rekonstruisanog filogenetskog stabla sproveden je bootstrap test od 1000 ponavljanja.

Dalja molekularna karakterizacija ispitivanih izolata obavljena rekonstrukcijom filogenetskih stabala koja pokazuju evolutivnu međupovezanost ispitivanih izolata *Colletotrichum* vrsta iz Srbije sa izolatima iz drugih delova sveta.

Filogenetska analiza vrsta u okviru roda *Colletotrichum* obavljena je na osnovu kombinacije DNK sekvenci ITS regiona. Za ova ispitivanja odabrane su sekvence izolata koje su identifikovane kao *C. destructivum* Coll-48, Coll-68, Coll-75, CC657 i izolat *Colletotrichum* sp. takson Coll-44 identifikovan do nivoa roda. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu DNK sekvenci ITS regiona uključilo je 33 izolata različitih vrsta iz roda *Colletotrichum*, poreklom iz različitih delova sveta. Korišćenjem Maximum Parsimony metode konstruisano je filogenetsko stablo, integrisano unutar programa MEGA verzija 5.0 i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja.

Za filogenetsku analizu sekvenci regiona introna gena za GS, odabrane su sekvence izolata identifikovanog kao *C. trifolii* Coll-4 i sekvence izolata Coll-9, Coll-18 i Coll-Aš identifikovanih kao *C. destructivum*. Upoređivanje je vršeno sa 25 dostupnih sekvenci *Colletotrichum* vrsta (Liu et al., 2007). Filogenetsko stablo konstruisano je korišćenjem Maximum Parsimony metode, integrisane unutar programa MEGA verzija 5.0 i bootstrap analize sa 1000 ponavljanja.

Upotrebom softverskog programa MEGA verzija 5.0 (Tamura et al., 2011), obavljena je Maximum Parsimony filogenetska analiza region intron gena za GPDH. Za ova istraživanja odabrane su sekvence izolata Coll-10, Coll-29, Coll-32, Coll-48, Coll-68, Coll-75 identifikovanih kao *C. destructivum*, izolat Coll-4 identifikovan kao *C. trifolii* i izolat *Colletotrichum* sp. Coll-44 takson identifikovan do nivoa roda. Za filogenetsku analizu na osnovu sekvenci regiona introna gena za GPDH uključeno je 34 sekvence izolata vrsta roda *Colletotrichum*, poreklom iz različitih delova sveta (Liu et al., 2007).

4.7.6. Detekcija i identifikacija primenom PCR-RFLP

PCR produkti reakcije sa parom prajmera GSF1-GSR1 dalje su analizirani digestijom sa restrikcionim enzimima u cilju specifične detekcije na osnovu specifičnih profila koje formiraju različite vrste (Liu et al., 2007). Primenom metode PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PCR proizvodi tretirani su sa dve kombinacije restrikcionih enzima: (a) *HindIII* + *HinfI* + *HaeIII* i (b) *HindIII* + *HinfI* +

MspI. PCR produktima u zapremini od 25 µl dodato je 2 µl 10x Fast Digest Buffer-a i po 1 µl svakog od tri restrikciona enzima u obe kombinacije uključene u ispitivanja. Dobijena mešavina inkubirana je u termosajkleru na 37°C u trajanju od 60 min. RFLP-PCR proizvodi analizirani su elektroforezom u 5% poliakrilamidnom gelu na 150 V tokom 2,5 sata i bojenjem srebro-nitratom po metodi **Schumacher et al.** (1986). Elektroforeza je urađena u aparatu za vertikalnu elektroforezu (Hoefer, SAD), a restrikcioni fragmenti posmatrani su na transiluminatoru pod belom svetlošću. Dobijeni profili koji odgovaraju profilu pozitivne kontrole u vidu poznate i prethodno identifikovane vrste, smatrano je pozitivnom reakcijom.

4.8. Proučavanje vegetativne kompatibilnosti odabranih izolata *Colletotrichum* spp.

Prema metodi vegetativne kompatibilnosti (VCG metoda) koju su opisali **Puhalla** (1985) i **Correll et al.** (1987) urađeno je proučavanjem prisustva različitih vegetativno kompatibilnih grupa (Vegetative Compatibility Groups, VCGs) kod odabranih 18 monosporijalnih izolata *Colletotrichum* spp izolovanih sa lucerke i crvene deteline u Srbiji. Primenom VCG metode iz monosporijalnih izolata izoluju se auksotrofni mutanti koji ne koriste nitrate (nitrate nonutilizing mutants), tzv. *nit* mutanti. Dobijeni *nit* mutanti su izolati koji imaju mutacije u procesu asimilacije nitrata odnosno ne poseduju enzim nitrat reduktazu. Ako auksotrofni *nit* mutanti poreklom od različitih monosporijalnih izolata prilikom uparivanja na minimalnoj podlozi, na mestu dodira kolonija (spajanja micelija), formiraju prototrofne heterokarione, što se manifestuje porastom divljeg-tipa micelije, tj. micelije robustnog izgleda, znači da pripadaju istoj vegetativno kompatibilnoj grupi, odnosno da su genetički srodni (**Leslie and Summerell**, 2006).

VCG metoda primenjena je kod ispitivanih izolata iz roda *Colletotrichum* koji su svrstani na osnovu morfoloških karakteristika u tri grupe: I morfološka grupa *C. trifolii* (Coll-4, C-86-2, CBS 158.83), II morfološka grupa *C. destructivum* (Coll-3, Coll-8, Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-32, Coll-35, Coll-37, Coll-38, Coll-48, Coll-68, Coll-75, Coll-AŠ, Coll-BK i CC657) i III morfološka grupa gde je svrstan izolat *Colletotrichum* sp. takson Coll-44 identifikovan do nivoa roda.

U ovim ispitivanjima korišćene su sledeće podloge: osnovna podloga (BM), minimalna ili nitratna podloga (MM), minimalna podloga sa hloratom (MMC), nitritna i hipoksantin podloga.

- Osnovna podloga (BM) sadrži: 30 g saharoze, 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KCl, 10 mg $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g agara, 0,2 ml stok mikroelemenata i 1 l destilovane vode.

- Stok mikroelemenata sadrži: 5 g limunske kiseline, 5 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 50 mg H_3BO_3 , 50 mg $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ i 95 ml destilovne vode (**Puhalla**, 1985).

- MMC podloga priprema se dodavanjem 2 g NaNO_3 , 15 g– 60 g KClO_3 i 1,6 g L-asparagina u jedan litar osnovne podloge (BM).

- nitratna/minimalna podloga (MM): 2 g NaNO_3 /l osnovne podloge (BM+ NaNO_3)

- nitritna podloga: 0,5 g NaNO_2 /l osnovne podloge (BM+ NaNO_2)

- hipoksantin podloga: 0,2 g hipoksantina/l osnovne podloge (BM+Hipoksantin)

VCG metoda izvedena je u tri osnovne faza:

(1) izolacija *nit* mutanata

(2) identifikacija *nit* mutanata

(3) testovi kompatibilnosti između *nit* mutanata

Izolacija *nit* mutanata. Isečak kolonije proučavanog izolata, odgajen na PDA podlozi u mraku na 25°C, presejan je u centar Petri kutije (Ø 100 mm) sa 15 ml MMC podloge. Za svaki monosporijalni izolat zasejano je po 10 Petri kutija, koje su zatim inkubirane pri sobnoj temperaturi od 25°C.

Za izolate koji na ovoj podlozi nisu formirali rastresite i razgranate sektore koji su indikacija otpornosti prema hloratu, povećana je koncentracija KClO_3 za 3-6 %. Proces zasejavanja izolata na MMC podlogu ponavljan je sve do dobijanja potrebnih hlorat-rezistentnih sektora iz kojih su kasnije izolovani *nit* mutanti. Hlorat-rezistentni sektori odlikuju se intenzivnim porastom u jednom delu kolonije u kojem je porast micelije rastresit i razgranat. Iz razvijenih sektora odabran je isečak micelije prečnika 3-4 mm² I presejan na minimalnu ili nitratnu podlogu (MM) na kojoj je identifikovana vrsta *nit* mutanta posle sedam dana.

Identifikacija fenotipa *nit* mutanata rađena je u skladu sa metodom po **Correll et al.** (1987). Isečci kolonije odabranih izolata prečnika 3-4 mm², uzeti su sa ruba hlorat-rezistentnog sektora i preneti u centar Petri kutije sa MM, nitritnom i hipoksantin podlogom i inkubirani 7-14 dana na temperaturi od 25°C.

Na osnovu porasta i izgleda micelije na supstratima sa različitim izvorom azota, izvršena je identifikacija mutanata *nit1*, NitM i *nit3* (tabela 3). Mutant *nit1* se najčešće izoluje, dok se mutant NitM izoluje ređe, ali je neophodan u komplementarnim testovima jer je najstabilniji od svih poznatih vrsta *nit* mutanata. Mutant *nit3* takođe se izoluje retko i u malom procentu. Posle identifikacije *nit* mutanti se čuvaju ili umnožavaju, za dalja ispitivanja, na MM podlozi, a za duži vremenski period čuvaju se na kosoj PDA podlozi. Pored *nit* mutanata u testovima vegetativne kompatibilnosti često se razvijaju *crn* mutanti koji imaju divlji porast na MM podlozi iako su izolovani iz hlorat rezistentnih sektora. Ovi mutanti se odbacuju, jer se ne mogu koristiti za određivanje komplementarnosti.

Tabela 3. Fiziološki fenotip izolata divljeg tipa, *nit* i *crn* mutanata na podlogama sa različitim izvorima azota

Izolat	Hranljive podloge		
	BM+NaNO ₃ (MM) (Nitrat)	BM+NaNO ₂ (Nitrit)	BM+hipoksantin (Hipoksantin)
Divlji tip	+	+	+
<i>nit1</i>	-	+	+
NitM	-	+	-
<i>nit3</i>	-	-	+
<i>crn</i>	+	+	+

Legenda: + bujan vazdušni porast micelije; - rastresit i nevazdušni porast micelije

Uparivanje *nit* mutanata. Za testove komplementarnosti vršeno je uparivanje između dve vrste mutanata, *nit1* x NitM ili *nit1* x *nit3*. Uparivanja između ove dve vrste *nit* mutanata vršena su na nitratnoj/minimalnoj podlozi (MM). U ovim testovima za svaki proučavani izolat korišćen je po jedan *nit1* i NitM mutant. U slučaju kada se mutant razvio u divlji tip micelije vršena je zamena tog mutanta sa drugim mutantom iste vrste od istog izolata. Zbog toga je neophodno, posle izolacije i identifikacije *nit* mutanata, sačuvati najmanje po dva mutanta istog tipa za komplementarne testove. U centar Petri kutije sa 15 ml MM podloge zasejan je isečak mutanta NitM svakog ispitivanog monosporijalnog izolata. Oko njega postavljeni su na rastojanju od 2 cm

najviše po 4 isečka *nit1* mutanta prečnika 3-4 mm², s tim što je jedan od *nit1* mutanata od istog monosporijalnog izolata kao mutant NitM (test autokompatibilnosti ili samokompatibilnosti), a ostali *nit1* mutanti od različitih monosporijalnih izolata (test kompatibilnosti). Test uparivanja mutanata urađen je u dva ponavljanja, za svaki proučavani izolat. Zasejane Petri kutije inkubirane su pri sobnoj temperaturi, a ocena komplementarnosti (autokompatibilnosti i kompatibilnosti) među izolatima očitana je posle sedam do 14 dana. Na osnovu dobijenih rezultata kompatibilnosti u testovima ukrštanja, ispitivani izolati svrstani su u odgovarajući broj grupa vegetativne kompatibilnosti.

4.9. Osetljivost različitih genotipova lucerke prema izolatima *Colletotrichum* spp.

U cilju iznalaženja potencijalnih izvora otpornosti lucerke na vrste roda *Colletotrichum*, u uslovima različitih inokulacija određena je reakcija ukupno 10 komercijalnih sorti lucerke, različitog porekla. U ispitivanja su uključene četiri domaće komercijalne sorte lucerke (Kruševačka-1 (K-1), Kruševačka-28 (K-28), Zaječarska 83 i NS Slavija), kao i dve sorte iz bliže (Osječka 12 i Banja Luka), prema antraknozi u kontrolisanim eksperimentalnim uslovima, uslovima staklenika. U ogled su takođe uključene i referentne američke komercijalne sorte (Affinity 401 + Z (HR), Florida 77 (MR), Vernal S (S) i Perry (LR)) koje su opisane da pokazuju različite nivoe otpornosti prema vrstama roda *Colletotrichum* (O'Neill, 1996, Gray et al., 2003). Affinity 401 + Z se opisuje kao visoko otporna sorta (Gray et al., 2003), Vernal S kao osetljiva (Ostazeski et al., 1969, Elgin and Ostazeski, 1982), dok se Florida 77 navodi kao srednje otporna i Perry kao osetljiva sorta (O'Neill, 1996; Gray et al., 2003).

Izolati za ova istraživanja su odabrani na osnovu morfoloških i molekularnih osobina, kao i na osnovu ispitivane vegetativne kompatibilnosti. U ispitivanja je uključeno 8 izolata poreklom iz Srbije i dva referentna izolata za vrste *C. trifolii* (C-86-2 rasa 1) i *C. destructivum* (CC657). Izolati poreklom iz Srbije svrstani su u tri morfološke grupe: izolat Coll-4 (I morfološka grupa) identifikovan kao *C. trifolii*, izolati (Coll-3, Coll-8, Coll-9, Coll-10, Coll-18 i Coll-75) identifikovani kao *C. destructivum* (II morfološka grupa) i *Colletotrichum* sp. izolat Coll-44 različit takson identifikovan do nivoa roda (III morfološka grupa).

Ogled je postavljen u proleće 2010. godine u uslovima staklenika Instituta za krmno bilje, Kruševac, kao dvofaktorijalni ogled, gde su jedan faktor bili genotipovi lucerke, a drugi ispitivani izolati. Seme lucerke posejano je u plastične kontejnere na dubini od 2 cm u sterilni supstrat (Klasman 1). U kontejnerima biljke lucerke gajene su četiri nedelje i nakon toga rasađene u veće saksije. Tri nedelje po rasađivanju, biljke su inokulisane. U vreme inokulacije biljke su bile starosti sedam nedelja. Suspenzija konidija pripremljena je od kultura ispitivanih izolata, koje su gajene 10 dana na PDA podlozi pri temperaturi od 25°C, u mraku. Koncentracija spora određena je pomoću hemocitometra po Thom-u i iznosila je $4-6 \times 10^{-4}$ spora/ml. Biljke lucerke povređene su kosidbom i prskane suspenzijom spora. Ogled je postavljen u deset ponavljanja po izolatu i po sorti, a kao negativna kontrola poslužile su biljke lucerke inokulisane sterilnom vodom.

Osetljivost različitih genotipova lucerke prema ispitivanim izolatima *Colletotrichum* spp. određivana je po modifikovanoj metodi **Ostazeski et al.** (1969), prema skali od 0-5.

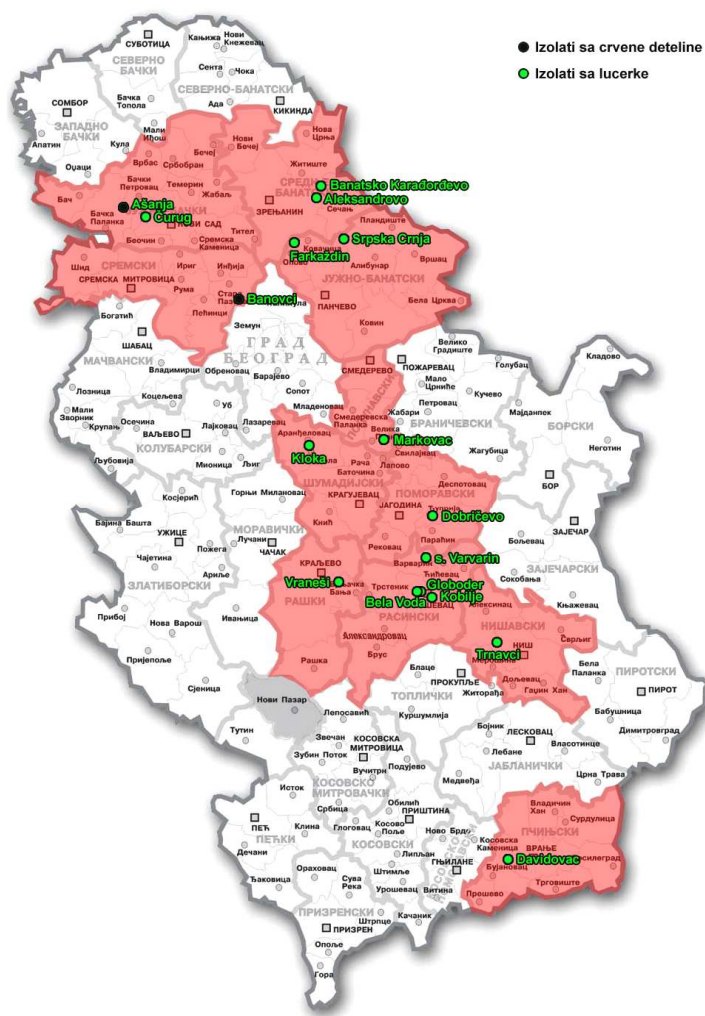
- 0- Biljke bez simptoma,
- 1- Pojedinačne vodenaste pege u osnovi,
- 2- Prisutne udubljene lezije,
- 3- Pojava lezija duž stabla,
- 4- Nekroza celog stabla,
- 5- Uvenueće i sušenje celih stabala.

Dobijeni podaci obrađeni su primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA) i dobijena je *p* vrednost.

5. REZULTATI

5.1. Simptomi bolesti na biljkama u polju

Pregledom useva lucerke i crvene deteline u više lokaliteta gajenja lucerke u našoj zemlji tokom svih šest godina istraživanja, uočeni su simptomi uvenuća. Biljke sa simptomima sakupljene su na 17 lokaliteta (slika 1) u Srbiji.



Slika 1. Lokaliteti gajenja lucerke i crvene deteline uključeni u istraživanja u Srbiji (okruzi obojeni u crveno - uključeni u istraživanja)

Pregledani lokaliteti: Čurug, Ašanja (južno bački okrug), Srpska Crnja, Farkaždin (južno banatski okrug), Trnavci (nišavski okrug), Vraneši (raški okrug), Banatsko Karadorđevo, Aleksandrovo (srednje banatski okrug), Banovci (sremski okrug), Markovac (podunavski okrug), Selo Varvarin, Kobilje, Globoder, Bela Voda

(rasinski okrug), Kloka (šumadijski okrug), Davidovac (pčinjski okrug) i Dobričevo (pomoravski okrug) ustanovljeno je da se u toku cele vegetacije, pojavljuju obolele biljke sa karakterističnim simptomima antraknoze.

Najčešći tip uočenih simptoma uočava se na zaraženim biljkama tako što po nekoliko stabala dobija slamno žutu do sedefastu boju, nakon čega venu obolele biljke ispoljavaju povijen vrh na dole, što je simptom koji se označava kao "pastirska kuka" (slika 2).



Slika 2. Simptom antraknoze lucerke "pastirska kuka", na biljkama lucerke (levo) i crvene deteline (desno)

Simptomi antraknoze najviše su se javljali posle drugog otkosa (tokom mesec jula) u svih šest godina istraživanja bez obzira na vremenske uslove. Bolest se širila na susedne biljke i u poljima lucerke i crvene deteline ubrzo su mogle da se vide površine sa prošaranim zonama sa žuto-sedefastim biljkama. Zaostajanje biljaka u porastu posle košenja takođe je bio jedan od karakterističnih simptoma antraknoze na biljkama lucerke i crvene deteline. U istraživanja su uključena zasadi starosti jedne, dve, tri i više godina. Bolest je najšećće najjače izražena u zasadima koji su u drugoj i trećoj godini iskorišćavanja. Uočeno je da u godini setve nije dolazilo do pojave simptoma u agroekološkim uslovima Srbije, dok već od druge godine raste učestalost pojave simptoma. Na zaraženim biljakama zapažene su lezije u prizemnom delu stabla, najčešće na donjoj trećini, svetlo do tamno braon boje, nepravilnog oblika, sa tamno braon ivicama (slika 3).



Slika 3. Lezije na stablu lucerke izazvane prouzročivačima iz roda *Colletotrichum*

Na stabljikama obolelih biljaka, u centru pega najčešće uočavaju sitna crna plodnosna tela gljive - acervuli. Pege se često proširuju i prstenasto zahvataju stabljiku, naročito blizu osnove pa se tu biljka veoma često lomi. Vrhovi stabljike su karakteristično povijeni na dole, liske se suše, postaju žute, a zatim ružičaste boje, što pri jakom napadu celom polju daje ružičast izgled. Na gornjem delu stabljika pri jačim infekcijama javljaju se pege, uglavnom mnogo sitnije i često bez sporulacije.

Tokom perioda od 2005. do 2010. godine vršene su redovne kontrole na površinama pod lucerkom i crvenom detelinom u Srbiji, posebno u lokalitetima gde je intenzivna semenska proizvodnja. Prvi pregled obavljen je u periodu pre prvog otkosa (maj/jun). U tom periodu uglavnom nije bilo pojave vidljivih simptoma antraknoze. Međutim, posle drugog otkosa (sredina jula meseca) na svim lokalitetima simptomi su prisutni u velikoj učestalosti.



Slika 4. Simptomi antraknoze lucerke na kruni korena

Uočeno je da infekcija krune može biti sa ili bez lezija na stabljici (slika 4). U centralnom delu korena, neposredno ispod korenovog vrata, uočene su svetlosmeđe zone obolelog tkiva. Ove promene širile su se od korenovog vrata i prema vršnom delu korena. Parazitirana tkiva veoma često izumiru, dolazi do pucanja korena i sušenja celih biljaka. Na obolelom korenu zapažaju se zone tamne ili crvenkasto-smeđe boje. Obolele biljke uglavnom su propadale u toku vegetacione sezone ili kao značajno oslabiljene, često podlegnu izmrzavanju tokom zime.



Slika 5. Simptomi antraknoznog uvenuća lucerke u polju

Pojava simptoma praćena uvenućem biljaka i lako i brzo širenje inokuluma dovodi do proređivanja lucerišta, usled čega se smanjuje i period iskorišćavanja useva. Prema procenama tokom ovih istraživanja lucerišta zaražena antraknozom (slika 5) u četvrtoj godini toliko su proređena da nije ekonomski isplativo da se usev gaji za semensku proizvodnju, niti za senažu.

5.2. Dobijanje čistih kultura, monosporijalnih izolata i njihovo ćuvanje

Iz biljaka lucerke i crvene deteline sa simptomima antraknoze, obavljena je izolacija patogena primenom standardnih fitopatoloških metoda. Tokom šest godina istraživanja sa 17 lokaliteta ukupno je sakupljeno i analizirano 150 uzoraka. Za izolaciju su odabrani fragmenti biljnog tkiva sa prelaza između zdravog i obolelog, koji su površinski sterilisani i postavljeni na PDA. Posle inkubacije od 3-5 dana, oko fragmenata razvile su se kolonije gljiva, odabrane su kolonije koje ispoljavaju tip porasta karakteristićan za *Colletotrichum* spp. i potom su presejavane na PDA podlogu i poslužile su za dobijanje monosporijalnih izolata.

Iz početnog materijala biljaka sa simptomoma ukupno je izdvojeno 80 izolata *Colletotrichum* spp. i to: 65 poreklom sa lucerke i 15 poreklom sa crvene deteline.

Patogenost i dobijenih monosporijalnih izolata, proverena je veštaćkim inokulacijama klijanaca lucerke. Patogenim izolatima smatrani su oni izolati koji su izazvali pojavu nekrotićnih pega na inokulisanim sejancima. Pege su se pojavljivale posle 7-10 dana od inokulacije.

5.3. Izbor izolata za dalja istraživanja

Izolacijom fitopatogenih gljiva iz zaraženih biljaka lucerke i crvene deteline u polju, izdvojeno je ukupno 80 izolata *Colletotrichum* spp. kojima je potvrđena patogenost veštaćkim inokulacijama klijanaca lucerke. Tokom izolacije i proverom patogenosti uoćene su izvesne morfološke osobine (izgled i boja kolonije, brzina porasta na PDA podlozi i oblik konidija) koje su bile zajednićke za pojedine izolate, na osnovu čega su oni grupisani. Kako dalje proućavanje nije bilo moguće izvesti sa svim izolatima zbog njihovog velikog broja, pristupilo se odabiru pojedinih koji su razvrstani po slićnosti sa standardnim izolatima poreklom iz Holandije (CBS 158.83) i Francuske

(C-86-2) u tri morfološke grupe: *Colletotrichum* spp. grupa I (Coll-4), *Colletotrichum* spp. grupa II sa 16 izolata (Coll-3, Coll-8, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-32, Coll-35, Coll-37, Coll-38, Coll-48, Coll-68 i Coll-75) i *Colletotrichum* spp. grupa III izolat (Coll-44). Odabrani izolati međusobno su upoređivani na osnovu patogenih, morfoloških i molekularnih osobina u cilju pravilne identifikacije.

5.4. Proučavanje patogenih osobina izolata *Colletotrichum* spp. sa lucerke

Patogenost dobijenih izolata proverena je primenom dve različite metode: inokulacijom klijanaca i inokulacijom korena. U prvom načinu provere patogenosti, inokulacijom klijanaca lucerke (genotip K-28) u laboratorijskim uslovima utvrđeno je da su svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp. ispoljili izraženu patogenost. Patogenost 12 izolata, koji su bili svrstani u sve tri morfološke grupe ocenjena je kao izražena, dok je preostalih devet izolata iz prve i druge morfološke grupe ispoljilo srednju patogenost (tabela 4). Izolata sa slabijom patogenošću prema odabranoj sorti lucerke nije bilo. Dva dana posle kontakta korena sa kolonijom gljive pojavila se nekroza na vrhovima korena kod svih proučavanih izolata. Nekroza se potom uzdužno širila, i kod jako virulentnih izolata posle 10 dana u potpunosti je zahvatila koren, mlada stabaoca i listove klijanaca.

Ova reakcija posebno je bila izražena kod izolata Coll-4 (*C. trifolii*), Coll-3, Coll-9, Coll-10, Coll-29, Coll-32, Coll-35, Coll-38, Coll-48, Coll-68 (*C. destructivum*) i Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) i u ovim slučajevima prouzrokovala topljenje klijanaca (slika 6). Nekrotično tkivo korena bilo je trulo i raspadnuto. Zeljasti delovi klijanca, koji nisu bili zahvaćeni nekrozom, prilikom vađenja iz substrata lako su se kidali i odvajali od dezintegrisanog i razmekšanog tkiva korena kod izolata koji nisu prouzrokovali širenje nekroze dalje od korena.

Tabela 4. Patogenost *Colletotrichum* spp. izolata na klijance lucerke u laboratorijskim uslovima

Grupe	Izolati	Ocena patogenosti	Kontrola
I	Coll-4	+++	-
	CBS158.83	++	-
	CC-86-2	++	-
II	Coll-3	+++	-
	Coll-8	++	-
	Coll-9	+++	-
	Coll-10	+++	-
	Coll-11	++	-
	Coll-18	+++	-
	Coll-29	+++	-
	Coll-32	+++	-
	Coll-35	+++	-
	Coll-37	++	-
	Coll-38	+++	-
	Coll-48	+++	-
	Coll-68	+++	-
	Coll-75	++	-
	Coll-Aš	++	-
Coll-Bk	++	-	
CC657	++	-	
III	Coll-44	+++	-

Legenda: - avirulentni; + slabo virulentan; ++ srednje virulentan; +++ jako virulentan



Slika 6. *Colletotrichum* spp.: Topljenje i nekroza klijanaca lucerke nakon veštačkih inokulacija izolatom Coll-68



Slika 7. *Colletotrichum* spp.: Izgled nekrotičnih klijanaca lucerke, izolat Coll-8

Reakcija inokulisanih klijanaca ogledala se u promeni boje nekrotičnih delova korena u svetlo smeđu, smeđu ili izrazito crnu boju (slika 7). Na klijancima koji su poslužili kao negativna kontrola koji su postavljeni na sterilnu PDA podlogu, nije došlo do pojave simptoma.

Drugi način ocene patogenosti odabranih izolata inokulacijom isečaka korena lucerke (sorta K-28) pokazao je da su svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp. ispoljili patogenost u vidu pojave nekrotičnih zona na isečcima korena. Zaraženo tkivo korena ispoljilo je nekrozu smeđe, crvenosmeđe ili tamno smeđe boje. Kod izolata Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-32, Coll-37 (*C. destructivum*), Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) i C-86-2 (referentni izolat *C. trifolii* rasa 1) nekroza je potpuno zahvatila isečke. Ovakvi isecci su mekog i dezintegrisanog tkiva sa simptomima vlažne truleži (slika 8).



Slika 8. *Colletotrichum* spp: nekroza isečaka korena izazvana ispitivanim izolatima različite patogenosti Coll-4 izraženije patogenosti (levo) i Coll-8 slabije patogenosti (desno)

Na uzdužnom preseku isečaka intenzivnija nekroza zapažena je u centralnom tkivu korena. Kod manje virulentnih izolata Coll-4 (*C. trifolii*), Coll-3, Coll-75 (*C. destructivum*) nekroza je ograničena na donji deo isečka koji je bio u dodiru sa kolonijom ispitivane gljive. Posle osam dana od postavljanja isečaka na koloniju proučavanog izolata merena je dužina nekroze (tabela 5).

Tabela 5. Prosečna ocena reakcije nekroze na isečcima korena inokulisanim ispitivanim izolatima *Colletotrichum* spp.

Vrsta	Izolati	Prosečna dužina nekrotične zone
<i>C. trifolii</i>	Coll-4	0.5333
	CBS158.83	0.9333
	C-86-2	1.0333
<i>C. destructivum</i>	Coll-3	0.9333
	Coll-8	0.3667
	Coll-9	1.1333
	Coll-10	1.0667
	Coll-11	1.0667
	Coll-18	1.2333
	Coll-29	1.0333
	Coll-32	1.0000
	Coll-35	0.9000
	Coll-37	1.0000
	Coll-38	0.8333
	Coll-48	0.8000
	Coll-68	0.8000
	Coll-75	0.5333
	Coll-Aš	0.9333
	Coll-Bk	0.8333
	CC657	0.8333
<i>Colletotrichum</i> sp. Coll-44	Coll-44	1.1333

Kod izolata II grupe Coll-8 i Coll-75 ispoljili su statistički značajno manji intezitet nekroze u odnosu na druge ispitivane izolate iste grupe. U drugoj grupi izolata najveći intezitet nekroze ispoljili su izolati Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-32 i Coll-37.

Tabela 6. Rezultati jednofaktorijalne analize varijanse ANOVA za vrstu *C. destructivum*

Izvor varijacije	Sume kvadrata	Stepeni slobode	Varijansa	F- količnik	<i>p</i> -vrednost
Između grupa	2.140	16	0.134	5.684	0.000
U grupi	0.800	34	0.24		
Ukupno	2.940	50			

Rezultati jednofaktorijalne analize varijanse ANOVA prikazani su u tabeli 6. Dobijena *p* vrednost manja je od 0.01 (*p* 0.000) što ukazuje da na prosečnu vrednost dužine nekroze utiče izolat.

Tabela 7. Homogene grupe za dužinu nekroze ispitivanih izolata za vrstu *C. destructivum*

Izolati	Homogene grupe (dužina nekroze)				
	1	2	3	4	5
Coll-8	0.3667				
Coll-75	0.5333	0.5333			
Coll-48		0.8000	0.8000		
Coll-68		0.8000	0.8000		
Coll-38		0.8333	0.8333	0.8333	
Coll-Bk		0.8333	0.8333	0.8333	
CC657		0.8333	0.8333	0.8333	
Coll-35			0.9000	0.9000	
Coll-3			0.9333	0.9333	0.9333
Coll-Aš			0.9333	0.9333	0.9333
Coll-32			1.0000	1.0000	1.0000
Coll-37			1.0000	1.0000	1.0000
Coll-29			1.0333	1.0333	1.0333
Coll-10			1.0667	1.0667	1.0667
Coll-11			1.0667	1.0667	1.0667
Coll-9				1.1333	1.1333
Coll-18					1.2333
<i>p</i> vrednost	0.192	0.051	0.082	0.051	0.114

Parna poređenja dužine nekroze ispitivanih izolata vrste *C. destructivum* pokazala su izdvajanje pet homogenih grupa koje su se statistički značajno razlikovale (tabela7).

Među proučavanim izolatima I grupe Coll-4 (*C. trifolii*) je ispoljio statistički značajno manji intenzitet nekroze, odnosno manju virulentnost u odnosu na ostale proučavane izolate I grupe CBS 158.83 i C-86-2, koji su ispoljili statistički značajno veći intezitet nekroze (tabele 8 i 10). Parna poređenja dužine nekroze ispitivanih izolata

vrste *C. trifolii* pokazala su izdvajanje dve homogene grupe koje su se statistički značajno razlikovale (tabela 8).

Tabela 8. Rezultati jednofaktorijalne analize varijanse ANOVA za vrstu *C. trifolii*

Izvor varijacije	Sume kvadrata	Stepeni slobode	Varijansa	F- količnik	p-vrednost
Između grupa	0.420	2	0.210	7.875	0.021
U grupi	0.160	6	0.027		
Ukupno	0.580	8			

Tabela 9. Homogene grupe za dužinu nekroze ispitivanih izolata za vrstu *C. trifolii*

Izolati	Homogene grupe (dužina nekroze)	
	1	2
Coll-4	0.5333	
CBS 158.83		0.9333
C-86-2		1.0333
p vrednost	1.000	0.482

Treća grupa koju čini izolat Coll-4 (*Colletotrichum* sp.) je ispoljio statistički značajno veći intezitet nekroze u odnosu na izolate druge dve grupe (tabela 10).

Parnim poređenjem dužine nekroze ispitivanih vrsta *C. trifolii*, *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp. Coll-4 pokazano je izdvajanje dve homogene grupe koje su se statistički značajno razlikovale. U prvu homogenu grupu svrstane su vrste *C. trifolii* i *C. destructivum*, dok drugu homogenu grupu čini izolat *Colletotrichum* sp. Coll-4.

Tabela 10. Homogene grupe za dužinu nekroze proučavanih izolata vrsta *Colletotrichum* spp.

Vrsta	Homogene grupe (dužina nekroze)	
	1	2
<i>C. trifolii</i>	0.83333	
<i>C. destructivum</i>	0.9000	
<i>Colletotrichum</i> sp. Coll-44		1.1333
p vrednosti	0.460	1.000

Reizolacija patogena sa svih veštački inokulisanih biljaka na kojima su reprodukovani simptomi, obavljena je istim metodama kao i pri izolaciji, čime su zadovoljeni osnovni Kohovi postulati. Dobijeni reizolati po izgledu micelije i morfologiji reproduktivnih organa u potpunosti odgovaraju izvornim izolatima.

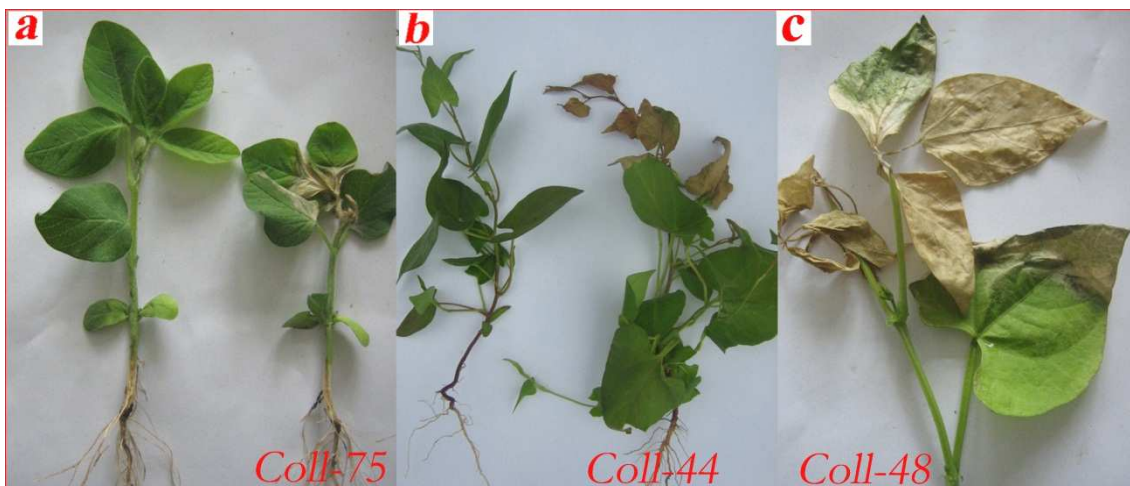
5.5. Proučavanje kruga eksperimentalnih domaćina ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Ispitivanje kruga eksperimentalnih domaćina 10 izolata fitopatogenih gljiva iz roda *Colletotrichum* spp. svrstanih u tri morfološke grupe obuhvatilo je ukupno 15 biljnih vrsta iz šest botaničkih familija. Tako je patogenost 10 proučavanih izolata *Colletotrichum* spp., osim na biljkama lucerke, crvene deteline, žutog zvezdana i soje koje su opisane kao prirodni domaćini vrsta *C. trifolii* i *C. destructivum*, proučavana i na grahorici, esparzeti, mačijem repu, perku, ježevici, beloj rosulji, pasulju, grašku, paprici, poponcu i lanu.

Reakcije na inokulisanim biljkama koje su se pokazale kao eksperimentalni domaćini ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. (lucerka, crvena detelina) uglavnom su bile ujednačene. Oko inokulisanog mesta razlikovale su se udubljene nekrotične pege svetlo braon do tamno braon boje. Posle pet dana, uočavale su se promene u vidu nekroze listova i sušenja vršnih biljaka delova inokulisanih izolatima Coll-4 i CBS 158.83 koji pripadaju vrsti *C. trifolii* i sa izolatima Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68, Coll-75, CC576 koji pripadaju vrsti *C. destructivum*. Slično su reagovala i biljke inokulisane sa izolatom Coll-44 koji je identifikovan kao *Colletotrichum* sp. (tabela 11).

Od ispitivanih vrsta koje su reagovala na inokulaciju, soja se može izdvojiti kao neosetljiva prema vrstama *C. trifolii* (Coll-4 i CBS 158.83) i *Colletotrichum* sp. (Coll-44). Međutim, ova biljna vrsta je ispoljila veliku osetljivost prema izolatima *C. destructivum* (Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68, Coll-75 i CC576) (slika 9abc). Na biljkama soje oko mesta inokulacije formirale su se udubljene nekrotične pege tamno braon do skoro crne boje. Posle 15 dana od inokulacije, sve testirane biljke, inokulisane izolatima *C. destructivum* ispoljile su uvenuće i potpuno propanje.

Kod biljaka žutog zvezdana pozitivnu reakciju su izazvali izolati Coll-8, Coll-48, Coll-68, Coll-75 i CC657 koji pripadaju vrsti *C. destructivum* ili II morfološkoj grupi. Međutim izolati iste vrste Coll-9 i Coll-18 nisu izazvali nikakve promene na testiranoj biljnoj vrsti, iako pripadaju vrsti *C. destructivum*. Izolat Coll-4 koji pripada vrsti *C. trifolii* i izolat Coll-44 koji je identifikovan kao *Colletotrichum* sp. nisu uspeli da ostvare zarazu žutog zvezdana.



Slika 9. *Colletotrichum* spp.: soja zaražena izolatima Coll-75 (kontrola - levo, zaražena biljka – desno) (a), poponac zaražen izolatima Coll-44 (kontrola - levo, zaražena biljka – desno) (b), pasulj zaražen izolatima Coll-48 (c)

Esparzeta kao eksperimentalni domaćin, nije mogla biti zaražena testiranim izolatima Coll-4 (*C. trifolii*) i Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) i oni nisu izazvali pojavu simptoma. Nakon inokulacije sa izolatima Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68, Coll-75 i CC657 (*C. destructivum*) na biljkama esparzete došlo je do razvoja simptoma slabije izraženosti što ukazuje da ispitivani izolati nisu ispoljili uobičajenu agresivnost. Nekroza tkiva oko mesta inokulacije bila je slabije izražena, sporije se razvijala i posle izvesnog vremena potpuno je zaustavljena.

Biljke grahorice, nisu mogle biti zaražene ni jednim od proučavanih izolata *C. destructivum*. Međutim, izolati Coll-4 (*C. trifolii*) i Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) ispoljili su patogenost i ostvarili su zarazu biljne vrste. Referentni izolat *C. trifolii* CBS 158.83 nije ispoljio patogenost na grahorici, ukazujući na razlike između, izolata iste vrste u pogledu patogenosti.

Tabela 11. Patogenost *Colletotrichum* spp. poreklom sa lucerke i crvene deteline prema različitim biljkama pri veštačkoj inokulaciji

Morfološke grupe	<i>C. trifolii</i>		<i>C. destructivum</i>							<i>Colletotrichum</i> sp.	d
	Coll-4	CBS 158.83	Coll-8	Coll-9	Coll-18	Coll-48	Coll-68	Coll-75	CC 657	Coll-44	
Izolati											
Biljke											
<i>Medicago sativa</i>	+ ^a (10) ^e	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	-
<i>Trifolium repens</i>	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	-
<i>Lotus corniculatus</i>	- ^b	-	+ (7)	-	-	+ (6)	+ (8)	+ (8)	+ (7)	-	-
<i>Vicia sativa</i>	+ (6)	-	-	-	-	-	-	-	-	+ (10)	-
<i>Onobrychis sativa</i>	-	-	+/- ^c (10)	+/- (10)	+/- (10)	+/- (10)	+/- (10)	+/- (10)	+/- (10)	-	-
<i>Phleum pratense</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dactylis glomerata.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Agrostis alba</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brassica napus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	-	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	-	-
<i>Pisum sativum</i>	+ (8)	+ (8)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	-	-
<i>Glycine hispida</i>	-	-	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	+ (10)	-	-
<i>Capsicum annuum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Convolvulus arvensis.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ (10)	-
<i>Linum usitatissimum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ (10)	-

a - pozitivna reakcija

b - negativna reakcija

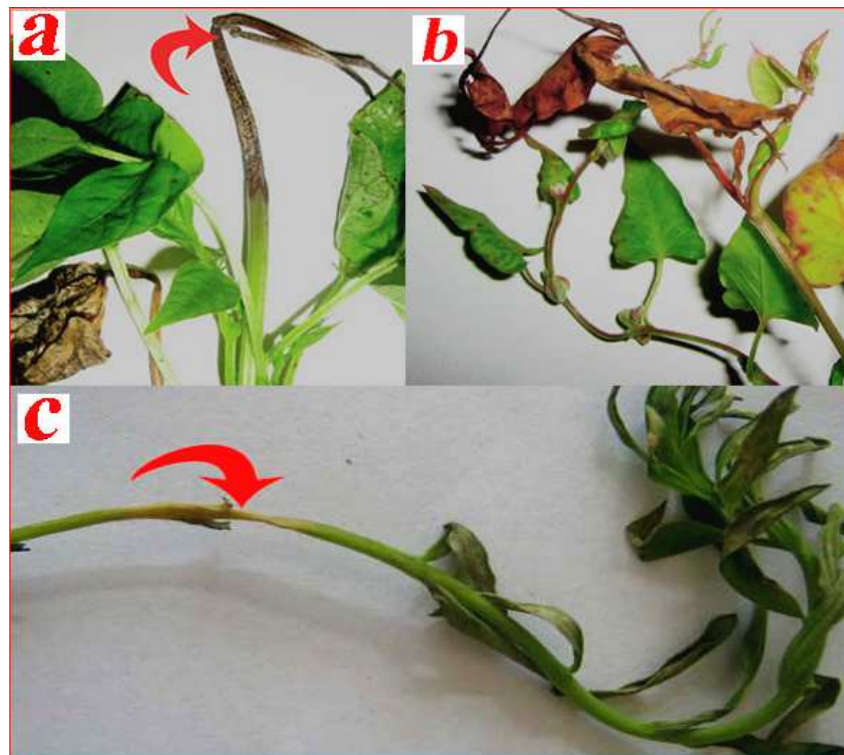
c - hipersenzitivna reakcija

d - kontrola

e - broj biljka sa simptomima od 10 inokulisanih

Grašak se pokazao osetljiv prema izolatima vrsta *C. trifolii* (Coll-4 i CBS 158.83) i *C. destructivum* (Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68, Coll-75, CC657). Oko inokulisanog mesta dolazilo je do nastanka udubljenih nekrotičnih pega svetlo braon do tamno braon boje. Veoma brzo nakon inokulacije i pojave nekrotičnih pega oko mesta inokulacije uočavale su se promene na vršnom delu biljke u vidu nekroze listova i sušenja vršnih delova biljaka.

Izolati *C. destructivum* (Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68, Coll-75 i CC657) pokazali su se patogenim za biljke pasulja (slika 10c). Nakon četiri nedelje od inokulacije, formirala su se crna plodonosna tela-acervule (slika 10a). Međutim, izolati *C. trifolii* (Coll-4 i CBS 158.83) nisu izazvali nikakve promene na pasulju, kao i izolat *Colletotrichum* spp. (Coll-44).



Slika 10. *Colletotrichum* spp. simptomi na: pasulju (pojava acervula) izolat Coll-9 (*C. destructivum*) (a), poponcu izolat Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) (b), posle četiri nedelje i simptomi na lanu (nekroza) četiri dana posle inokulacije, izolat Coll-44 (*Colletotrichum* spp.) (c)

Poponac i lan reagovali su pojavom simptoma jedino nakon izolacije sa izolatom Coll-44 *Colletotrichum* sp. (slika 10bc), dok ostali proučavani izolati nisu uspeli da izazovu nikakvu reakciju na ovim biljnim vrstama. Izolat Coll-44, na inokulisanim

biljkama lana i poponca, posle četiri nedelje od inokulacije nije formirao acervule. Na inokuliranim biljkama mačijeg repa, perka, ježevice, bele rosulje i paprike nije došlo do promena i razvoja simptoma nakon veštačkih inokulacija. Izolati ni jedne od tri ispitivane vrste iz roda *Colletotrichum* nisu bili u stanju da zaraze ni jednu od ispitivanih biljaka.

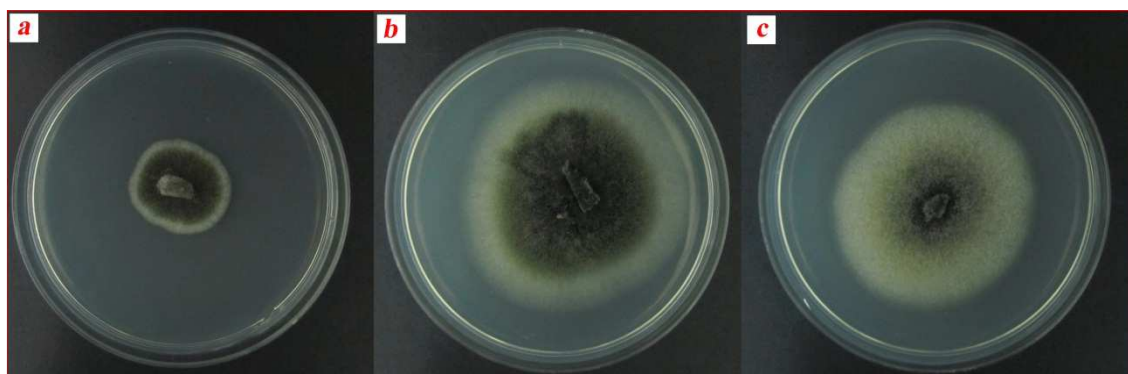
5.6. Morfološke odlike proučavanih izolata *Colletotrichum* spp.

U okviru ovih istraživanja ispitivane su makroskopske i mikroskopske morfološke karakteristike deset ispitivanih izolata razvrstanih u tri morfološke grupe.

Od makroskopskih morfoloških osobina proučavane su osnovne karakteristike kolonija (izgled, struktura i boja) a određena je i brzina porasta micelije. Od mikroskopskih morfoloških karakteristika proučen je izgled vegetativnih organa – micelije i apresorija i reproduktivnih tvorevina anamorfa (acervula, konidiofora, konidija) i određene su njihove dimenzije. Formiranje reproduktivnih organa teleomorfa (peritecija, askusa, askospora) ispitivanih izolata u uslovima postavljenih istraživanja nije zabeleženo.

5.6.1. Makroskopske morfološke odlike

Svi izolati *Colletotrichum* spp. na PDA podlozi, 24 h nakon zasejavanja, obrazuju začetak micelije, bele boje i vazdušastog izgleda, prečnika oko 3-4 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 tri morfološke grupe (slika 11).



Slika 11. *Colletotrichum* spp.: Izgled kolonije izolata I grupe Coll-4 (a); II grupe Coll-18 (b); i III grupe Coll-44 (c) starih sedam dana na PDA podlozi

Prva grupa izolata (Coll-4, CBS 158.83 identifikovani kao *C. trifolii*) na PDA podlozi, već prvog dana od zasejavanja, obrazuje začetak beličaste micelije, sa prečnikom kolonije 3-4 mm oko mesta zasejavanja. Dan kasnije micelija ima prečnik oko 10 mm, bela je i vazdušasta. Kad kolonija dostigne 40 mm u prečniku (što se dešava četvrtog ili petog dana), u sredini počinje da tamni i prelazi u maslinasto zelenu boju, dok obod kolonije i dalje zadržava beličastu boju (slika 11a). Ivice kolonija su cele, blago talasaste. Ivična zona je bela do prljavo bela. Centralna zona kolonije je tamno maslinasto zelene do sive boje. Sa naličja kolonije ivična zona je prljavo bele boje sa tamno maslinastim centralnim delom. Nema formiranja stromatičnih tvorevina. Lice kolonija je izbrazdano, micelija somotasta. Sa naličja kolonija izbrazdana.

Druga grupa izolata (Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68, Coll-75, CC657) takođe, već prvog dana od zasejavanja formira beličastu miceliju 5 mm, oko mesta zasejavanja i ima nešto brži tempo porasta. Posle petog dana kolonije dostižu 55 mm u prečniku, u sredini počinju da tamne. Ivice kolonije su blago fibrozne. Ivične zone su prljavo bele boje. Centralni deo kolonije je pamučast, od somotasto sive boje do svetlo maslinasto zelene (slika 11b). Ivična zona naličja kolonije je svetlo maslinasto zelena dok je centar svetlije maslinasto zelen, sa začecima stromatičnih tvorevina.

Treća grupa izolata već od prvog dana od zasejavanja formira beličastu miceliju oko mesta zasejavanja prečnika 4-5 mm (Coll-44). Posle petog dana od zasejavanja kolonije dostižu 50 mm u prečniku i u sredini počinju da tamne. Ivice kolonija su blago fibrozne. Micelija je pamučasta sa tamnijim centrom koji je sive do svetlo maslinasto zelene boje (slika 11c). Naličje kolonija je maslinasto zeleno sa centralnim delom tamno maslinasto zelene boje. Jedino kod ove grupe izolata uočeno je formiranje stromatičnih tvorevina.

Na PDA i CLA podlogama izolati sve tri morfološke gupe počinju da sporulišu posle sedam dana od zasejavanja (tabela 12). Takođe, svi proučavani izolati posle sedam dana od zasejavanja obrazuju plodonosno telo konidiomatu.

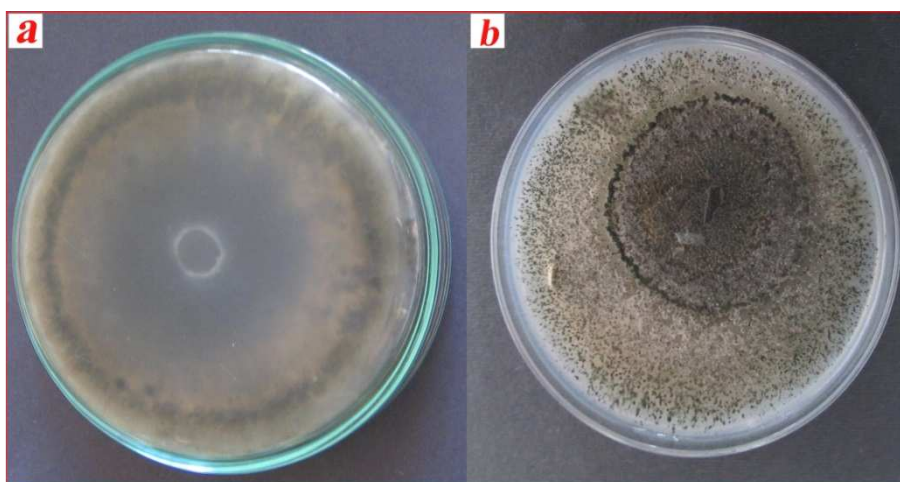
Tabela 12. Grupisanje ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. na osnovu makroskopskih morfoloških osobina

Gr.	Podl.	PDA				CLA			
	Ozn. izol.	Opis kolonija	Tip porasta	Sporulacija	Obilnost i raspored konidionata	Opis kolonija	Tip porasta	Sporulacija	Obilnost i raspored konidionata
I	Coll-4	Somotasta, tamno maslinasto zelene boje	Porast spor i ravnomeran	Obilna 7. dana od zasejavanja	Obilno, nepravilno raspoređene	Vazdušasta maslinasto zelene boje	Slab porast	Obilna 7. dana od zasejavanja	Obilno nepravilno raspoređene
	CBS 158.83*								
II	Coll-8	Pamučasta, svetlomaslinasto do maslinasto zelene boje	Porast brz i ravnomeran	Obilna 7. dana od zasejavanja	Obilna, koncentričan raspored	Vazdušasta maslinasto do zelene boje	Brzi porast	Obilna 7. dana od zasejavanja	Obilno nepravilno raspoređene
	Coll-9								
	Coll-18								
	Coll-48								
	Coll-68								
	Coll-75								
CC657*									
III	Coll-44	Pamučasta micelija krem do maslinasto zelena	Porast srednje brz i ravnomeran	Obilna 7. dana od zasejavanja	Obilno, razbacane	Vazdušasta maslinasto do zelene boje	Srednje brz porast	Obilna 7. dana od zasejavanja	Obilno nepravilno raspoređene

*Referentni izolati *Colletotrichum* spp.

Jasno su uočene razlike u obilnosti i rasporedu acervula na PDA i CLA podlogama kod sve tri proučavane morfološke grupe, izolata. Kod izolata I morfološke grupe okarakterisanih kao *C. trifolii* na obe proučavane podloge konidiomate su nepravilno raspoređene. Izolati II morfološke grupe okarakterisani kao *C. destructivum*, na PDA podlozi obilno formiraju konidiomate i one su koncentrično raspoređene. Na CLA podlozi konidiomate su nepravilno raspoređene kod svih proučavanih izolata ove grupe. Izolat III morfološke grupe okarakterisan kao *Colletotrichum* sp. Coll-44 na obe proučavane podloge obilno formira konidiomate koje su nepravilno raspoređene.

Kod svih proučavanih izolata posle deset dana od zasejavanja brojne hife stvaraju tamna, stromatična zadebljanja, koja kasnije evoluiraju u acervule ili pak, ostaju u obliku nepravilnih stromatičnih tvorevina u kojima ne dolazi do stvaranja reproduktivnih organa (slika 12).



Slika 12. Izgled tamnih stromatičnih tvorevina formiranih od micelije koje se uočavaju sa naličja kolonija izolata Coll-18 (a) i lica kolonija izolata Coll-18 (b) na PDA podlozi, starih 10 dana

5.6.2. Mikroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata

Mikroskopskim pregledom kolonija izolata *Colletotrichum* spp., gajenih na PDA i CLA podlogama pri 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 (slika 13a). Starije hife u centru kolonije su šire, debljih zidova i tamnije boje (slika 13b), često sa proširenim vrhovima i sa izraženim poprečnim pregradama.



Slika 13. *Colletotrichum* spp.: Hife na miceliji izolata Coll-44, starih 7 dana (a) i Coll-18, starih 14 dana (b)

Dužina somatskih ćelija u hifi, odnosno udaljenost između dve septe je od 7,5 μm do 20 μm , u proseku 12,5 μm . Širina hifa se kreće od 2,75-5 μm , u proseku 3,83 μm (tabela 13). Širina hifa, kao i dužina ćelija u hifama veoma je slična za sve ispitivane izolate.

Tabela 13. Dimenzije hifa proučavanih izolata *Colletotrichum* spp.

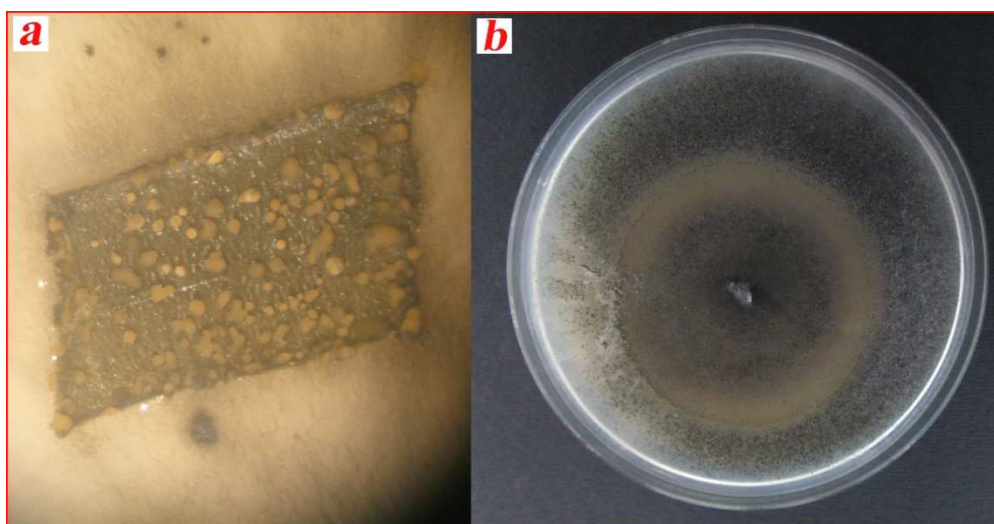
Grupa/Vrsta	Izolati	Dužina hifa (μm)	Širina hifa (μm)
I (<i>C. trifolii</i>)	Coll-4	7.5 ^a	3.75
	CBS 158.83	12.5	3.75
II (<i>C. destructivum</i>)	Coll-8	10	3.75
	Coll-9	20	5
	Coll-18	12.5	3
	Coll-48	15	3.75
	Coll-68	17.5	5
	Coll-75	12.5	3.75
	CC657	7.5	3.75
III (<i>Colletotrichum</i> sp.)	Coll-44	10	2.75

a - prosečna vrednost iz 30 ponavljanja (merjenja)

U uslovima postavljenog eksperimenta, prilikom proučavanja razvoja hifa odabranih izolata *Colletotrichum* spp. iz konidija u visećoj kapi, ustanovljeno je da način porasta hifa zavisi od položaja spore u kapi vode. Ukoliko se hife razvijaju u uslovima tankog sloja vode, onda je njihov porast brži, a hife se izdužuju i postaju tanje. U takvim uslovima one se granaju i na vrhovima ogranaka često se obrazuju mlade

konidije. Hife se obično normalno razvijaju dok svojim vrhom ne dođu u dodir sa staklom, što izaziva stvaranje apresorija. Ako se hife slobodno razvijaju u kapi vode one se posle izvesnog vremena granaju, posle čega se ovi ogranci mogu završiti apresorijom ili se na njihovim vrhovima mogu formirati mlade konidije. Svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp. pokazali su sličnost u pogledu načina formiranja hifa, tako da se ova osobina ne može koristiti kao taksonomski kriterijum za razlikovanje vrsta unutar ovoga roda.

Plodonosno telo (konidiomata). Svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp. obrazuju plodonosna tela – acervule, koje se formiraju kako na obolelim biljkama lucerke tako i u kulturi. Na obolelim biljkama lucerke acervule se formiraju u vidu koncentričnih krugova ili su razbacane u centralnom ili perifernom delu nekrotične pege. Raspored acervula na biljnom materijalu nije zavisio od vrste izolata. Acervule proučavanih izolata su sitne, nepravilnog do okruglog oblika, blede do tamno smeđe, skoro crne boje, formirane na stromi. Veličina acervula varirala je kod sve tri ispitivane vrste od 100-280 μm sa razbacanim setama. U zavisnosti od izolata acervule se obično obrazuju subepidermalno, na stromi, sastavljenoj od nekoliko do više gustih slojeva ćelija, a delom izbijaju na površinu. Bazalni deo acervula prekriven je fialidnim konidioforama na kojima se formiraju konidije.



Slika 14. Kapljice matriksa izolata Coll-4 na podlozi CLA (a), kapljice matriksa izolata Coll-9 na PDA podlozi (b), kulture stare deset dana

Proučavani izolati *Colletotrichum* spp. pri gajenju na podlogama u kulturi takođe formiraju acervule 7 dana nakon zasejavanja, koje u okviru kolonija mogu biti grupisane u centralnom delu, razbacane ili koncentrično raspoređene.

Acervule formirane u kulturi su crne boje, jako zadebljelih zidova. Svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp. u kulturi obrazuju stromatična zadebljanja iz kojih se kod svih izolata oslobađaju konidije u vidu guste, u obliku kapljice ili razlivenne želatinozne mase (matriksa) narandžaste do bledoružičaste boje (slika 14).

Tabela 14. Prečnik acervula ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. na PDA podlozi (µm)

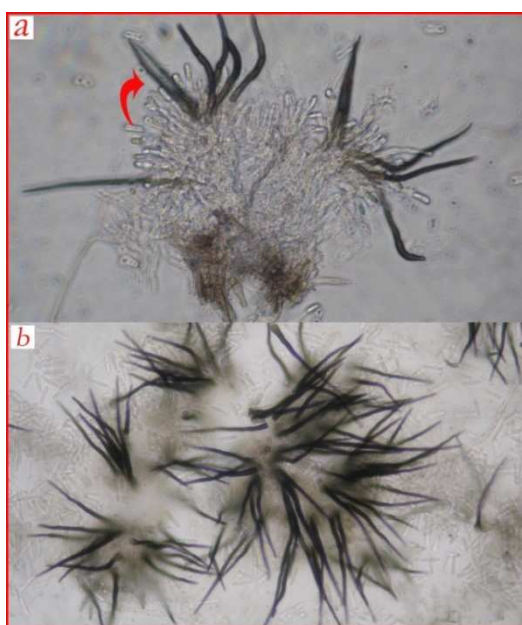
Grupe/ Vrsta	Izolati	min.	max.	prosek
I (<i>C. trifolii</i>)	Coll-4	100	250	200 ^a
	CBS 158.83	100	300	250
II (<i>C. destructivum</i>)	Coll-8	110	210	160
	Coll-9	80	200	100
	Coll-18	100	300	250
	Coll-48	100	300	200
	Coll-68	110	350	250
	Coll-75	100	450	280
	CC657	100	350	280
III (<i>Colletotrichum</i> sp.)	Coll-44	100	300	200

a – prosečna vrednost iz 10 merenja

Prosečne vrednosti veličine acervula ispitivanih izolata iz sve tri morfološke grupe prikazani su u tabeli 14. Uzimajući u obzir na preklapanja vrednosti, dimenzije acervula ne mogu biti korišćene kao pouzdan taksonomski kriterijum za diferencijaciju ispitivanih izolata.

Morfologija seta osam odabranih izolata *Colletotrichum* spp., poreklom sa lucerke i crvene deteline iz Srbije, gajeni u kulturi i njihovim upoređivanjem sa kontrolnim identifikovanim izolatima *C. trifolii* (CBS158.83) i *C. destructivum* (CC657), utvrđeno je da se sete morfološki razlikuju kod izolata svrstanih u različite morfološke grupe. Nije zapažena fertilnost seta, odnosno pojava da se na njihovom vrhu formiraju konidije. Ova osobina nije zapažena ni kod jednog od proučavanih izolata *Colletotrichum* spp. Pored toga, utvrđeno je da dimenzije seta mogu da se koriste kao veoma značajan morfološki kriterijum, za razlikovanje tri ispitivane morfološke grupe, odnosno vrste.

Kod I grupe proučavanih izolata (Coll-4, CBS 158.83) u okviru konidiomata formiraju se brojne sete u kulturi na hranljivim podlogama pri temperaturi od 25°C, u uslovima stalnog mraka. Sete se formiraju posle sedam dana od zasejavanja kod oba izolata ove vrste. Sete su svetlo do tamnije braon boje, blago nakrivljene, glatke ili blago naborane površine često proširene u osnovi, zašiljene i nešto tamnije na vrhu. Na setama se uočavaju 1-3 septe u proseku 2, sa dimenzijama od 75-100 x 2,5 µm u proseku 91,1 x 2,5 µm (slika 15a). Sete su često skrivene u blizini svetlo narandžaste do blede roze mase konidija.



Slika 15. *Colletotrichum* spp.: Izgled seta u kulturama starim 7 dana odgajenim na PDA podlozi, izolati Coll-4 (a) i Coll-18 (b)

II grupa proučavanih izolata (Coll- 8, Coll-9, Coll-18, Coll- 48, Coll-68, Coll-75, CC657) u okviru konidiomata posle pet dana od zasejavanja formiraju brojne sete, koje imaju smeđu boju, nešto su tamnije pri osnovi i svetlije prema vrhu, septirane su imaju od 1-7 septe u proseku 3, prave su ili nešto povijene, sa glatkom ili naboranom površinom (slika 15b). Sete *C. destructivum* mogu se koristiti kao taksonomski kriterijum, na osnovu dimenzija, oblika i broja septe za determinaciju vrsta *Colletotrichum*. Proučavani izolati obilno formiraju sete u konidiomati, dimenzija od 50-150 x 2,5-7,5 µm u proseku 118,9 x 5,2 µm.

Treća grupa izolata roda *Colletotrichum* (Coll-44) u kulturi posle pet dana od zasejavanja formira brojne sete, koje su pri osnovi nešto tamnije a pri vrhu, septirane i

imaju 1-3 septe u proseku 2. Dimenzije seta su od 100-185,5 x 2,5-5 μm u proseku 160,9 x 3,12 μm .

Konidiogene ćelije. U bazalnom delu konidiomata, formiranih na hranljivim podlogama obrazuju se konidiofore koje su izduženog cilindričnog oblika, prave ili blago povijene, hijaline ili svetlosmeđe boje, glatke, jednostavne ili retko razgranate blizu osnove. U kulturi se fialidne konidiogene ćelije, osim u konidiomatama, formiraju i na miceliji kao bočne grane i tada su cilindrične, hijaline do svetlosmeđe i teško se razlikuju od sterilnih hifa. Njihove dimenzije su od 17-25 x 4-4,5 μm u proseku 21,5 x 4,1 μm , za sve proučavane izolate nema razlike u dimenzijama.

Formiranje konidija - Proučavani izolati *Colletotrichum* spp. u kulturi formirali su konidije na konidiogenim ćelijama u konidiomati. Konidije se formiraju i na fialidnim konidiogenim ćelijama formiranim na bočnim granama micelije.

Iz acervula, kod svih proučavanih vrsta konidije se oslobađaju u sluzavoj masi (matriksu), koji je bledonarandžaste do kremružičaste boje. Do početka formiranja konidija kod svih proučavanih izolata dolazi nakon sedam dana na svim hranljivim podlogama uključenim u istraživanjima. Ispitivane hranljive podloge nisu imale uticaj na sporulaciju ispitivanih izolata. Posle toga konidije, osim u acervulama, stvaraju se i na vrhovima bočnih ogranaka micelije, ali i na njihovom vršnom delu. Primećeno je da se one veoma lako oslobađaju sa fialidnih konidiogenih ćelija formiranih na ograncima micelije, na kojima su nastale.

Morfologija konidija - Na osnovu morfologije konidija svih proučavanih izolata *Colletotrichum* vrste izolovane iz lucerke i crvene deteline svrstane su u tri grupe i to:

Prvu grupu čine izolati Coll-4 i CBS 158.83 čije su konidije cilindrične i zaobljene na oba kraja. Morfologija konidija izolata Coll-4, kao i kontrolnog izolata CBS 158.83, odgovara opisu konidija *C. trifolii* (slika 16a). Kod oba izolata prevladavale su jednoćelijske, glatke, bezbojne sa sitno granuliranim sadržajem, cilindrične konidije, zaobljene na oba kraja.

Drugu grupu čine izolati Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68, Coll-75, CC657 čije su konidije cilindrične i zaoštrene na jednom kraju, a zaobljene na drugom. Tako se morfološki izgled konidija proučavanih izolata uklapa u opis konidija za vrstu *C. destructivum*. Kod svih proučavanih izolata prevladavale su jednoćelijske, glatke,

bezbojne, prave, cilindrične konidije, sa sitno granuliranim sadržajem, zaobljene na jednom kraju, a na drugom blago sužene (slika 16b).

Treću grupu čini samo jedan izolat Coll-44 identifikovan do nivoa roda *Colletotrichum* sp., čije su konidije prave cilindrične na jednom kraju zaobljene a na drugom blago zaoštrene. Morfologija konidija ovog izolata Coll-44 razlikuje se od prethodne dve vrste kao i od ostalih vrsta opisanih na lucerki u svetu. Ovaj izgled konidija morfološki preliminarno odgovara vrsti *C. linicola*. Konidije su jednoćelijske, glatke, bezbojne, sa sitno granuliranim sadržajem, prave, cilindrične blago sužene na jednom kraju a na drugom sužene (slika 16c).



Slika 16. Oblik konidija izolata Coll-4 (*C. trifolii*) (a), izolata Coll-18 (*C. destructivum*) (b) i izolata Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) (c), kulture stare deset dana na CLA podlozi

Dimenzije konidija proučavanih izolata *C. trifolii*, *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp. Coll-44 razlikuju se međusobno. Ustanovljeno je da postoje značajne razlike u dimenzijama konidija izolata ispitivanih vrsta, i to kako u prosečnim, tako i u ekstremnim vrednostima.



Slika 17. *Colletotrichum trifolii*: Morfološke osobine kolonija (a), starih 7 dana na PDA podlozi, izgled konidija (b), seta (c) i apesorija (d) izolata Coll-4 poreklom sa lucerke

Izolat Coll-4 koji pripada vrsti *C. trifolii* ima konidije cilindrične zaobljene na oba kraja, dimenzija 12,5-17,5 x 5-7,5 μm u proseku 15 x 5,67 μm (slika 17b). Referentni izolat za vrstu *C. trifolii* CBS158.83 takođe, ima cilindrične konidije zaobljene na oba kraja i njegove dimenzije su od 7,5-12,5 x 5,0 μm u proseku 10,25 x 5,0 μm (tabela 15).



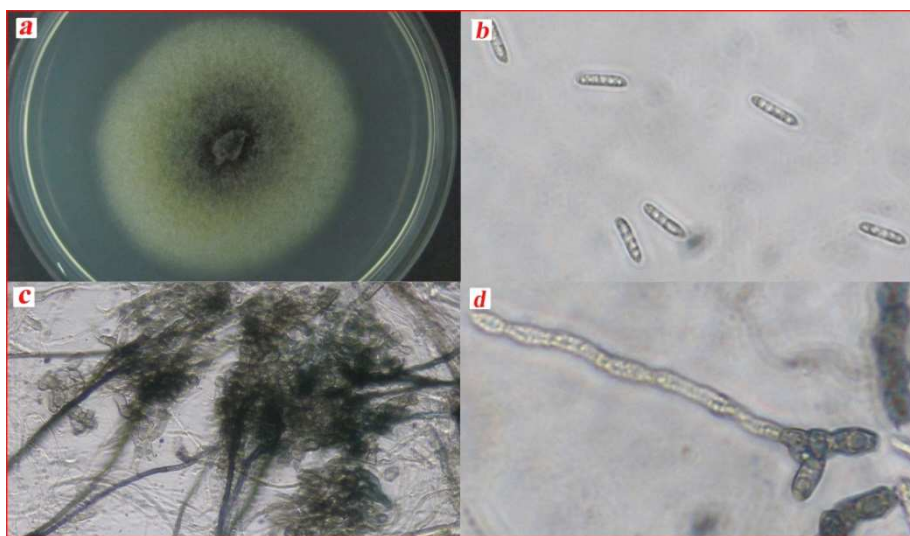
Slika 18. *Colletotrichum destructivum*: Morfološke osobine kolonija-kulture stare 7 dana na PDA podlozi (a), konidije (b), sete (c) i apesorije (d) izolata Coll-18 poreklom sa lucerke

Prosečna veličina konidija za izolate koji pripadaju vrsti *C. destructivum* iznosila 10-25 x 2,5-7,5 μm u proseku 18,78 x 3,37 μm (slika 18b, tabela 15).

Tabela 15. Dimenzije konidija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. izolovanih sa lucerke

Grupa/Vrsta	Oznaka izolata	Konidije						Odnos duž./šir.
		Dužina (µm)			Širina (µm)			
		min.	max.	prosek ^a	min.	max.	prosek ^a	
I <i>C. trifolii</i>	Coll-4	12.5	17.5	15	5	7.5	5.67	2.75
	CBS158.83	7.5	12.5	10.25	5	5	5	2.05
II <i>C. destructivum</i>	Coll-8	12.5	25	19.25	5	5	5	3.85
	Coll-9	12.5	25	19.5	2.5	7.5	4.2	5.09
	Coll-18	10	25	18.5	2.5	5	4.42	4.65
	Coll-48	15	25	19.17	2.5	2.5	2.5	7.83
	Coll-68	12.5	25	18.25	2.5	2.5	2.5	7.27
	Coll-75	10	25	17.5	2.5	2.5	2.5	6.7
	CC657	15	25	19.32	2.5	2.5	2.5	7.97
III <i>Colletotrichum</i> sp.	Coll-44	12.5	25	19.83	2.5	7.5	4.42	5.69

a - Prosečna vrednost iz 30 ponavljanja



Slika 19. *Colletotrichum* sp. izolata Coll-44: Izgled kolonija 7 dana starih na PDA (a), konidija (b), seta (c) i apresorija (d)

Izolat Coll-44 identifikovan kao *Colletotrichum* sp. ima konidije veličine 12,5-25 x 2,5-7,5 μm , u proseku 19,83 x 4,42 μm (slika 19b).

Dužina konidija, širina konidija, izračunavanje odnosa dužina/širina su parametri koji su pojedinačno statistički analizirani u cilju određivanja njihove pogodnosti kao kriterijuma za razlikovanje i određivanje taksonomskog među odnosa između ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Tabela 16. Rezultati jednofaktorijalne analize varijanse dimenzije konidija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Izvor varijacije		Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F-količnik	<i>p</i> -vrednosti
Dužina konidija	Između grupa	2424.667	9	269.407	22.853	0.000
	U grupi	3418.750	290	11.789		
	Ukupno	5843.417	299			
Širina konidija	Između grupa	419.402	9	46.600	65.398	0.000
	U grupi	206.644	290	0.713		
	Ukupno	626.046	299			
Odnos duž./šir.	Između grupa	1208.820	9	134.313	32.655	0.000
	U grupi	1192.817	290	4.113		
	Ukupno	2401.637	299			

Dužina konidija predstavlja prvi merni parametar i dobijeni rezultati obrađeni su analizom varijanse kao jednofaktorijalan ogled, gde je faktor bila dužina konidija (tabela 16).

Poređenjem F količnika je utvrđeno da između izolata postoje statistički vrlo značajne razlike. Nakon izračunavanja analize varijanse pristupilo se parnim poređenjem izolata pomoću Duncan testa 0.05 (tabela 17).

Tabela 17. Analiza varijanse dužine konidija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Izolati	Homogene grupe			
	1	2	3	4
CBS 158.83	10.2500			
Coll-4		15.0000		
Coll-75			17.5000	
Coll-68			18.2500	18.2500
Coll-18			18.2500	18.5000
Coll-8			19.2500	19.2500
Coll-48			19.4167	19.4167
Coll-9				19.5000
Coll-44				19.5833
CC657				19.9167
<i>p</i> -vrednosti	1.000	1.000	0.053	0.108

Analizom rezultata može se uočiti da dužina konidija, kao zaseban morfološki kriterijum, grupisao u izvesnoj meri ispitivane izolate. Tako su se na osnovu dužine konidija, jasno izdvojile grupe izolata iz prve morfološke grupe, *C. trifolii* (CBS 158.83 i Coll-4) koji su svrstani u dve homogene grupe. Kod druge morfološke grupe, *C. destructivum* (Coll-75, Coll-68, Coll-18, Coll-8, Coll-48) izolati su takođe svrstani u dve zasebne homogene grupe. Treća morfološka grupa *Colletotrichum* sp. Coll-44 se jasno ne razlikuje od izolata druge morfološke grupe. Analizom rezultata može se uočiti da dužina konidija, kao zaseban morfološki kriterijum, ne može potpuno da podrži sva prethodno uočena grupisanja ispitivanih izolata gljiva.

Rezultati merenja širine konidija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. statistički su obrađeni analizom varijanse kao jednofaktorijalni ofgled, gde je faktor širina konidija. Rezultati su prikazani u tabeli 16. Poređenjem F količnika sa tabličnim vrednostima, ustanovljeno je da između izolata postoje statistički vrlo značajne razlike.

Tabela 18. Analiza varijanse širine konidija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Izolati	Homogene grupe			
	1	2	3	4
Coll-48	2.5000			
Coll-68	2.5000			
Coll-75	2.5000			
Coll-657	2.5000			
Coll-9		4.1750		
Coll-18		4.4167		
Coll-44		4.4167		
CBS158.83			5.0000	
Coll-8			5.0000	
Coll-4				5.6667
<i>p</i> -vrednosti	1.000	0.300	1.000	1.000

Nakon izračunavanja analize varijanse pristupilo se parnim poređenjima izolata pomoću Duncan testa, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 18. Širina konidija kao morfološki kriterijum nije razlikovala izolate *C. trifolii* (Coll-4 i CBS 158.83) u odnosu na sve ostale grupe izolata. Ova dva izolata su se međusobno statistički razlikovala. Takođe, kod izolata druge morfološke grupe na osnovu širine konidija kao morfološkog kriterijuma nisu se jasno razlikovali izolati (Coll-48, Coll-68, Coll-75, Coll-9, Coll-18 i CC657), slični *C. destructivum* u odnosu na izolate prve morfološke grupe. Kod izolata treće morfološke grupe (Coll-44) nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na izolate prve i druge morfološke grupe. Tako da kod izolata prve, druge i treće morfološke grupe, nije moguće koristiti širinu kao zaseban taksonomski kriterijum za razlikovanje vrsta.

Nakon merenja dužine i širine konidija, pristupilo se izračunavanju količnika, odnosno odnosa dužina/širina, kao karakteru za razlikovanje pojedinih *Colletotrichum* vrsta. Dobijeni rezultati statistički su obrađeni analizom varijanse kao jednofaktorijski ogled, gde je faktor odnos dužine/širine konidija (tabela 16). Poređenjem F količnika ustanovljeno je da između izolata postoje statistički vrlo značajne razlike. Nakon izračunavanja analize varijanse pristupilo se parnim poređenjima izolata pomoću Duncan testa 0.05, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 19.

Tabela 19. Analiza varijanse odnosa dužine/širine konidija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Izolati	Homogene grupe				
	1	2	3	4	5
CBS 158.83	2.0500				
Coll-4	2.7503				
Coll-8		3.8500			
Coll-18		4.6500	4.6500		
Coll-9			5.0917	5.0917	
Coll-44				5.9943	
Coll-75					7.0333
Coll-68					7.2667
Coll-48					7.8333
CC657					7.9667
<i>p</i> -vrednosti	0.182	0.128	0.400	0.086	0.105

Odnos dužina/širina konidija kao zaseban morfološki kriterijum, grupisalo donekle ispitivane izolate. Unutar prve morfološke grupe izolata koji odgovaraju vrsti *C. trifolii*, izolati CBS 158.83 i Coll-4, parnim poređenjem ispitivani izolati grupisani su u istu homogenu grupu, ali ukupno posmatrano, ova grupa izolata uspešno se razlikovala od grupe *C. destructivum*. U pogledu izolata sledeće, druge morfološke grupe, koji po ostalim karakteristikama odgovaraju vrsti *C. destructivum*, parnim poređenjem ispitivani izolati su grupisani u četiri homogene grupe. Kod izolata treće morfološke grupe nema statistički značajnih razlika u odnosu na izolate druge morfološke grupe. Tako da kod izolata druge i treće morfološke grupe odnos dužina/širina konidija kao zaseban morfološki kriterijum ne može samostalno koristiti za razlikovanje vrsta.

Način klijanja konidija - Tokom klijanja, uočeno je da konidije svih ispitivanih izolata trpe izvesne morfološke promene. Najpre dolazi do izvesnog bubrenja konidija, posle čega one vremenom gube granulirani sadržaj i postaju prozračnije, dok se u ekvatorijalnom delu konidije formira ili ne formira septa, što je bitan taksonomski kriterijum vrsta roda *Colletotrichum*. Izolati I morfološke grupe okarakterisani kao *C. trifolii* (Coll-4, CBS 158.83) tokom klijanja konidija ne obrazuju septu u ekvatorijalnom delu. Izolati II morfološke grupe okarakterisani kao *C. destructivum* (Coll-48, Coll-68, Coll-75, Coll-9, Coll-18 i CC657) formiraju ekvatorijalnu septu. III morfološka grupa izolat Coll-44 okarakterisan do nivoa vrste *Colletotrichum* sp. takođe formira ekvatorijalnu septu.



Slika 20. Klijanje konidija proučavanih izolata *Colletotrichum* spp. Formiranje apresorije direktno na konidiji izolata Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) (a); temeno klijanje konidija izolata Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) (b); obrazovanje apresorija na inicijalnoj hifi izolata Coll-8 (*C. destructivum*) (c); bočno-temeno klijanje konidija izolata CBS 158.83 (*C. trifolii*) (d)

Pri klijanju konidije proučavanih izolata *C. trifolii*, *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp. Coll-44 formiraju inicijalne hife, apresorije i sekundarne konidije. Konidije kličaju uglavnom obrazujući jednu ili dve, a veoma retko tri ili četiri inicijalne hife (slika 20b). Inicijalne hife obično se formiraju na jednom ili na oba vrha konidije, što se označava temeno klijanje (slika 20d). Veoma često hife polaze i iz neposredne blizine vrha konidije, što se opisuje kao temeno-bočno klijanje. Isključivo bočno klijanje je uočeno samo u slučajevima kada se formira više od dve inicijalne hife.

Sekundarne konidije slične su primarnim konidijama, ali su nešto tanjih zidova i manjih dimenzija. Obrazuju se direktno na konidijama ili na krajevima inicijalnih hifa. Ukoliko se obrazuju direktno na konidijama, sekundarne konidije locirane su uglavnom na temenu majčinskih konidija, a u izuzetnim slučajevima ustanovljeno je i njihovo bočno obrazovanje. Uočeno je takođe, da je u slučaju brojnog formiranja sekundarnih konidija dužina iskljalih inicijalnih hifa manja, nego u slučaju da konidija klija samo putem inicijalnih hifa. Tokom ovih istraživanja utvrđeno je da nema razlike u klijanju konidija kod svih proučavanih izolata, sve tri morfološke grupe.

Apresorije - Oblik, veličina, boja i struktura apresorija proučavanih izolata određeni su 5 dana nakon postavljanja eksperimenta. Fitopatogene gljive iz roda *Colletotrichum* spp. poseduju osobinu da formiraju organe za prijanjanje, kada

infekciona hifa dođe u dodir sa tvrdom površinom. Smatra se da ovi organi prvenstveno služe da pričvrste patogena za površinu domaćina u početnim stadijumima infekcije.

U ovim istraživanjima apresorije formirane na krajevima hifa koje su rasle u vodi, predstavljaju reakciju na mehanički stimulans, nastao usled njihovog dodira sa čvrstom površinom, koja je preprečila njihov vršni porast. Pri sličnom stimulansu apresorije nastaju i na onim hifama koje su ranije aktivno proizvodile konidije. Apresorije se formiraju pri klijanju konidija, direktno na konidiji (slika 21) ili na kraćoj ili dužoj inicijalnoj hifi. Najčešće se na jednoj konidiji obrazuje jedna, a ređe dve ili tri apresorije. One nastaju tako što se vrh hife, sprečen tvrdom površinom u porastu, proširi i formira se otekna. Kasnije obično pri njihovoj osnovi, pojavljuje se inicijalna hifa u koju prelazi sadržaj apresorije i koja osigurava dalji razvoj micelije. Po nastanku apresorije su svetlo smeđe ili hijalinske, ali sa vremenom u njima se formiraju uljane globule, njihovi spoljni zidovi zadebljavaju, posle čega dobijaju mrku boju.



Slika 21. *Colletotrichum trifolii* izolat Coll-4 klijanje apresorija direktno u konidiju, kulture stare pet dana u visećoj kapi

Tokom ovih istraživanja utvrđeno je da svi proučavani izolati formiraju brojne apresorije. Izolati *C. trifolii* formiraju apresorije u kulturi, koje su sferičnog i glavičastog oblika (slika 22). Dimenzije apresorija su 12,9-17,4 x 5-7,5 μm , u proseku 15,21 x 6,25 μm .



Slika 22. *Colletotrichum trifolii*. Apresorije izolata Coll-4, kulture stare pet dana u visećoj kapi

Formirane apresorije uglavnom su nepravilnog oblika, u početku bezbojne, a kasnije postaju mrke sa zadebljalom spoljnom membranom. Svi ispitivani izolati *C. destructivum* formiraju apresorije. Dimenzije apesorija su u 13,25-18,75 x 5,7- 9,6 μm , u proseku 12,94 x 6,35 μm (slika 23). Apresorije svih ispitivanih izolata *C. destructivum* su nepravilnog oblika, u početku bezbojne, a sa starenjem postaju tamno braon, i zadebljelih zidova.



Slika 23. *Colletotrichum destructivum*. Apresorije izolata Coll-8, kulture stare pet dana u visećoj kapi

Izolat Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) u kulturi formira apresorije. Dimenzije apesorija su od 5-17,5 x 2,5-7,5 μm , u proseku 11,8 x 5,9 μm . Nastale apresorije su

izduženog i jajolokog oblika, u početku bezbojne, a kasnije postaju mrke sa zadebljalim spoljnim zidovima (slika 24).



Slika 24. *Colletotrichum* sp.: izolat Coll-44, apresorije formirane u kulturi staroj 5 dana

Na osnovu sprovedenih istraživanja konstantovano je da se apresorije, između proučavanih vrsta, veoma razlikuju. Razlike u obliku apresorija ispitivanih vrsta su: izolati *C. trifolii* formiraju apresorije koje su sferičnog i glavičastog oblika, dok izolati *C. destructivum* obrazuju apresorije izduženog i nepravilnog oblika. Izolat Coll-44 *Colletotrichum* sp. obrazuje apresorije izduženog i jajolokog oblika. Oblik i dimenzije apresorija predstavljaju veoma koristan taksonomski kriterijum za razlikovanje vrsta u okviru roda *Colletotrichum*.

5.6.3. Reproductivni organi teleomorfno stadijuma ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

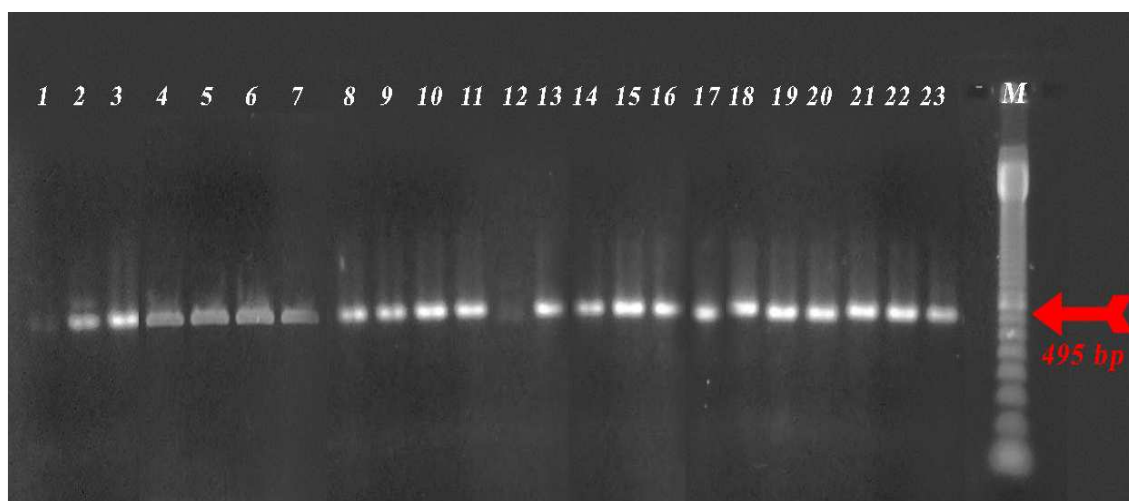
Svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp., poreklom iz Srbije (Coll-4, Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-44, Coll-48, Coll-68, Coll-75) kao i referentni izolati CC657 (*C. destructivum*) i CBS 158.83 (*C. trifolii*), poreklom iz Holandije, nisu formirali peritecije u kulturi. I pored toga što je formiranje peritecija posmatrano u više navrata, nakon 30 dana, nakon 6 i 12 meseci, do potpunog iscrpljivanja kultura.

5.7. Molekularna detekcija i identifikacija gljiva

Molekularna metoda lančane reakcije polimeraze (PCR) i sekvencioniranje umnoženih fragmenata DNK, uspešno je primenjena za identifikaciju i karakterizaciju ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. prouzrokovaca antraknoze na lucerki i crvenoj detelini. Nakon ekstrakcije ukupne DNK ispitivanih izolata gljiva prouzrokovaca antraknoze, obavljene su PCR reakcije sa parovima univerzalnih prajmera u cilju dobijanja specifičnog fragmenta DNK koji obuhvata ITS genomni region (deo 18S rRNA, ITS1, 5.8 rRNA, ITS2 i deo 28S rRNA) i dva različita regiona proteinskih nuklearnih gena region introna gena za glutamin sintetazu (GS) i region introna gena za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GPDH).

Primenom različitih prajmera prilikom izvođenja PCR metode, razlika u specifičnosti i pogodnosti detekcije ciljanih DNK fragmenata sva tri različita dela genoma iz ispitivanih izolata bila je izražena.

Molekularna detekcija 18 odabranih izolata *Colletotrichum* spp. poreklom sa lucerke i crvene deteline, kao i tri referentna izolata *C. trifolii* (C-86-2, rasa 1), *C. trifolii* (CBS 158.83) i *C. destructivum* (CC657) obavljena je korišćenjem univerzalnih prajmera ITS1/ITS4, koji omogućavaju umnožavanje ITS regiona ribozomalne DNK Eucariota. Poređenjem amplifikovanih fragmenata ispitivanih izolata lucerke, prisustvo fragmenata očekivane veličine od oko 495 bp utvrđen je kod svih izolata (slika 25). Prinosi ovih reakcija bili su niži kod izolata treće morfološke grupe (Coll-44), što se ogleda u vidu prisustva tanjih traka. Do amplifikacije nije došlo kod negativne kontrole.



Slika 25. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera ITS1-ITS4. Kolone: 1- izolat Coll-4, 2- izolat Coll-8, 3- izolat Coll-Aš, 4- izolat Coll-3,

5- izolat Coll-9, 6- izolat Coll-10, 7- izolat Coll-11, 8- izolat Coll-18, 9- izolat Coll-29, 10- izolat Coll-35, 11- izolat Coll-37, 12- izolat Coll-44, 13- izolat Coll-48, 14- izolat Coll-Bk, 15- izolat Coll-68, 16- izolat Coll-75 , 17- referentni izolat *C. dematium* (CC560), 18- izolat Coll-31, 19- referentni izolat *C. trifolii* (CBS158.83), 20- referentni izolat *C. trifolii* rasa 1 (C-86-2), 21- referentni izolat *C. destructivum* (CC657), 22-izolat Coll-32, 23 izolat- Coll-38, (-) - negativna kontrola, M- DNK Ladder Amersham Biosciences.

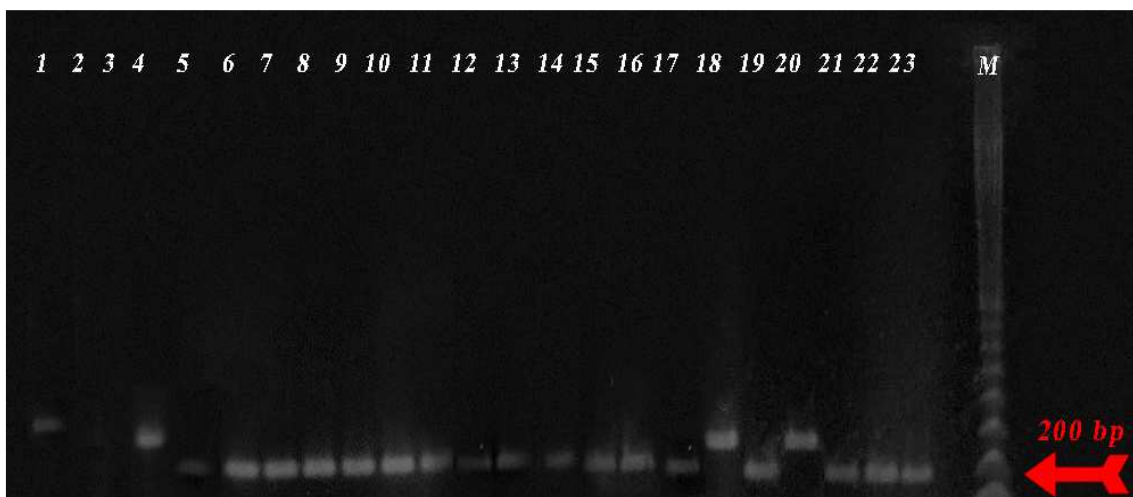
Primenom para prajmera GSF1-GSR1 koji omogućavaju amplifikaciju introna gena koji kodira glutamin sintetazu (GS) i poređenjem amplifikovanih fragmenata testiranih izolata, sa korišćenim markerom (M), ustanovljeno je prisustvo amplicona očekivane veličine oko 900bp kod izolata I morfološke grupe (Coll-4, C-82-2 i CBS 158.83) i izolata II morfološke grupe (Coll-3, Coll-8, Coll-9, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-32, Coll-35, Coll-37, Coll-38, Coll-48, Coll-68, Coll-75, Coll-Aš, Coll-Bk, i CC657). Kod III morfološke grupe (Coll-44) nije došlo do amplifikacije kao i kod negativne kontrole (slika 26).



Slika 26. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera GSF1-GSR1. Kolone: 1-izolat Coll-4, 2- izolat Coll-8, 3- izolat Coll-Aš, 4- referentni izolat *C. gleosporioides* (AVO-37-4B), 5- izolat Coll-3, 6- izolat Coll-9, 7- izolat Coll-10, 8- izolat Coll-11, 9- izolat Coll-18, 10- izolat Coll-29, 11- izolat Coll-35, 12- izolat Coll-37, 13- izolat Coll-44, 14- izolat Coll-48, 15- izolat Coll-Bk, 16- izolat Coll-68, 17- izolat Coll-75, 18-referentni izolat *C. dematium* (CC560), 19-izolat Coll-31, 20-referentni izolat *C. trifolii* (CBS158.83), 21- referentni izolat *C. trifolii* rasa 1 (C-86-2), 22- referentni izolat *C. destructivum* (CC657), 23-izolat Coll-32, 24-izolat Coll-38, M-DNK Ladder Amersham Biosciences, (-) - negativna kontrola.

Molekularna detekcija odabranih izolata izvršena je primenom para prajmera GDF1-GDR1, koji umnožavaju ≈ 200 bp regiona introna gliceraldehid-3 fosfat dehidrogenaze (GPDH). Pomoću ovih prajmera uspešno je amplifikovan intron gen za

GPDH gen kod svih 18 ispitivanih izolata iz sve tri morfološke grupe (slika 27). Do amplifikacije nije došlo u negativnoj kontroli, uzorak pripremljen sa molekularnom H₂O.



Slika 27. Elektroforetska analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem para prajmera GDF1-GDR1. Kolone: 1-izolat Coll-4, 2- izolat Coll-8, 3- izolat Coll-Aš, 4- referentni izolat *C. gleosporioides* (AVO-37-4B), 5- izolat Coll-3, 6- izolat Coll-9, 7- izolat Coll-10, 8-izolat Coll-11, 9-izolat Coll-18, 10-izolat Coll-29, 11- izolat Coll-35, 12- izolat Coll-37, 13- izolat Coll-44, 14- izolat Coll-48, 15- izolat Coll-Bk, 16- izolat Coll-68, 17- izolat Coll-75, 18-referentni izolat *C. dematium* (CC560), 19- izolat Coll-31, 20-referentni izolat *C. trifolii* rasa 1 (C-86-2), 21- izolat Coll-32, 22- izolat Coll-38, 23-referentni izolat *C. destructivum* (CC657), M- DNK Ladder Amersham Biosciences, (-) - negativna kontrola

5.7.1. Molekularna identifikacija *Colletotrichum* vrsta detektovanih na lucerki

Tokom molekularne identifikacije ispitivanih izolata, uspešno je sekvencionirano više genomnih regiona 12 izolata, podeljenih u tri grupe i okarakterisanih na morfološkom nivou. Sekvencionirani su PCR produkti dobijeni primenom prajmera koji omogućavaju amplifikaciju gena GS, a koji je visoko informativan na nivou vrste za ceo rod *Colletotrichum*. Pored toga, za sekvencioniranje i proračun genetičke sličnosti sekvenci izolata korišćeni su PCR produkti dobijeni primenom prajmera koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona rDNA i introna gena za gen GPDH (prilog 1), čije sekvence nisu zavedene u GenBank bazu podataka. Zbog dužine manje od 200 bp. Dobijene sekvence regiona introna za gen GS i ITS regiona rDNA prijavljene su u GenBank bazi podataka, a dobijeni pristupni brojevi prikazani su

u tabeli 20. Identifikacija odabranih izolata izvršena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti dobijenih sekvenci međusobno, kao i sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka, primenom Blast analize i Clustal W programa integrisanog unutar programskog paketa MEGA vel.5.0.

Tabela 20. Pregled sekvenci ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Grupa	Oznaka izolata	Vrsta	GenBank pristupni broj	
			ITS	intronGSgen
I	Coll-4	<i>C. trifolii</i>	-	JX908368
II	Coll-9	<i>C. destructivum</i>	-	JX908366
	Coll-18	<i>C. destructivum</i>	-	JX908367
	Coll-48	<i>C. destructivum</i>	JX908361	-
	Coll-68	<i>C. destructivum</i>	JX908362	-
	Coll-75	<i>C. destructivum</i>	JX908363	-
	Coll-Aš	<i>C. destructivum</i>	-	JX908369
	CC657	<i>C. destructivum</i>	JX908365	-
III	Coll-44	<i>Colletotrichum</i> sp.	JX908364	-

Molekularna identifikacija *Colletotrichum trifolii*. Molekularna identifikacija *C. trifolii* izvršena je višestrukim uparivanjem i proračunom genetičke sličnosti sekvenci odabranog izolata sa sekvencama drugih izolata dostupnih u GenBank bazi podataka. Za ovo ispitivanje odabran je izolat Coll-4 sa lokaliteta Selo Varvarin, predstavnik morfološke grupe I. Amplifikovani fragmenti odabranog izolata, podvrgnuti su sekvencioniranju u cilju utvrđivanja sekvence umnoženog genomnog regiona introna GS gena.

Nakon sekvencioniranja PCR produkata dobijenog amplifikacijom iz micelije uzorka Coll-4, korišćenjem para prajmera GSF1-GSR1 koji omogućava amplifikaciju region intron za GS gen, konsekus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka i dobijen je pristupni broj JX908368 (tabela 20). BLAST analiza sekvence u dužini od 912 bp, pokazala je 99 do 99,8% nukleotidne identičnosti sa sekvencama četiri izolata *C. trifolii* deponovanih u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljen je nakon trimovanja na dužinu od 910 bp. Proračunom genetičke sličnosti izolat Coll-4 pokazao je najviši stepen nukleotidne identičnosti od 99,8 %, sa razlikom u jednom nukleotidu, sa sekvencom izolata ON7 (DQ792872) poreklom sa lucerke iz SAD. Niži stepen nukleotidne identičnosti od 99,4% sa razlikom od tri nukleotida ispitivani izolat ispoljio

je sa sekvencom izolata 14-2-63 (DQ792877) poreklom sa lucerke iz SAD. Isti stepen nukleotidne identičnosti od 99,4% sa razlikom od tri nukleotida ispitivani izolati ispoljio je sa sekvencom izolata ON12 (DQ792875) poreklom sa lucerke iz SAD.

Nakon sekvencioniranja PCR produkata dobijenog amplifikacijom iz micelije izolata Coll-4, korišćenjem para prajmera GDF1-GDR1 koji omogućava amplifikaciju regiona introna za gen GPHD (prilog 1), obavljena je molekularna identifikacija odabranog izolata pomoću BLAST analize i pokazala 100% nukleotidne identičnosti sa tri sekvence izolata *C. trifolii* deponovane u GenBank bazi podataka. Višestruko uparivanje i proračun nukleotidne sličnosti odabranih sekvenci obavljen je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 220 bp. Najviši stepen identičnosti od 100%, sekvenca odabranog izolata pokazala je sa tri izolata *C. trifolii* iz SAD 14-2-63 (DQ792877), ON7 (DQ792872) i ON12 (DQ792875), poreklom sa lucerke.

Molekularna identifikacija *Colletotrichum destructivum*. Molekularna identifikacija odabranih izolata *C. destructivum* obavljena je nakon sekvencioniranja i proračuna genetičke sličnosti sekvenci izolata dobijenih primenom prajmera koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona rDNK, introna gena za GS i introna gen za GPDH gena.

Za identifikaciju na osnovu ITS regiona odabrano je četiri izolata II morfološke grupe (Coll-48, Coll-68, Coll-75 i referenti izolati CC657). Svi odabrani izolati prethodno su na osnovu morfoloških i patogenih osobina okarakterisani kao *C. destructivum*. Nakon sekvencioniranja PCR produkata dobijenog amplifikacijom iz micelije uzoraka korišćenjem para prajmera ITS1/ITS4, konsezijske nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazi podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi JX908361, JX908362, JX908363 i JX908365 (tabela 20). Međusobnim poređenjem i upotrebom MEGA 5.0 softvera izvršen je proračun genetičke sličnosti sekvenci izolata korišćenih u ovim istraživanjima, utvrđen je najviši stepen identičnosti od 100%. Proračun genetičke sličnosti odabranih sekvenci iz GenBank baze podataka obavljen je nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 520 bp. Najviši stepen nukleotidne identičnosti od 98,3% pokazuje sekvenca ispitivanog izolata, koji je poslužio kao referentni u ovim istraživanjima CC657, sa sekvencom *C. destructivum* izolati ATCC11995 (AF3205663) poreklom iz Kanade, iz duvana (*Nicotiana tabacum*). Stepenn nukleotidne identičnosti od 97,8 % sa razlikom od 12 nukleotida, ispitivani izolati pokazali su sa sekvencom izolata *C. destructivum* C08077 (GU935874) poreklom iz Koreje iz nepoznatog domaćina.

Stepen nukleotidne identičnosti od 97,9% ispitivani izolati pokazali su sa sekvencom *C. destructivum* izolata CBS14934 (JQ005764) poreklom iz Holandije iz nepoznatog domaćina. Nivo nukleotidne identičnosti od 97,2% sa razlikom od 15 nukleotida ispitivani izolati pokazali su sa sekvencom *C. destructivum* izolat ATCC10921 (AF3205663) iz Kanade, poreklom iz duvana (*Nicotiana tabacum*).

Za sekvencioniranje regiona introna za GS gena odabrani su amplifikovani fragmenti tri izolata iz II morfološke grupe izolovanih iz prizemnog dela stabla lucerke Coll-9, Coll-18 i Coll-Aš. Konsenzus nukleotidne sekvence deponovane su u GenBank bazu podataka i dodeljeni su im pristupni brojevi JX908366, JX908367 i JX908369 (tabela 20). Međusobnim poređenjem sekvenci izolata Coll-9, Coll-18 i Coll-Aš korišćenjem MEGA 5.0 softver, utvrđen je najviši stepen međusobne identičnosti od 100%. BLAST analiza sekvence produkta dužine od oko 964 bp, pokazala je 96% nukleotidne identičnosti sa jednim izolatom *C. destructivum* deponovanim u GenBank bazi podataka. Za proračun genetičke sličnosti sve sekvence su svedene na dužinu od 910 bp, koliko je iznosila dužina najkraće sekvence korišćene u analizi, a svi ispitivani izolati pokazali su najviši stepen nukleotidne identičnosti od 96 % sa sekvencama *C. destructivum* izolata C08077 (GU935814), porekla iz Koreje.

Za sekvencioniranje regiona introna gena za GPDH odabrano je i amplifikovano šest izolata iz II morfološke grupe (Coll-10, Coll-29, Coll-32, Coll-48, Coll-68 i Coll-75) (prilog 1). Korišćenjem MEGA 5.0 softvera izvršeno je međusobno poređenje sekvenci 6 proučavanih izolata i utvrđena je 100% homologija sekvenci ispitivanih izolata II morfološke grupe. Nakon sekvencioniranja fragmenata umnoženog u PCR reakciji korišćenjem regiona introna za GPHD gen koji omogućava amplifikaciju GPDH gena, obavljena je molekularna identifikacija sekvence produkta u dužini od oko 250 bp, pomoću BLAST analize pokazala je sličnost od 99,4% sa razlikom od pet nukleotida sa *C. destructivum* izolatom C08077 (GU935854) poreklom iz Koreje iz nepoznatog domaćina.

Molekularna identifikacija *Colletotrichum* spp. Delimična molekularna identifikacija odabranog izolata *Colletotrichum* sp. izolat Coll-44 obavljena je, nakon sekvencioniranja i proračuna genetičke sličnosti sekvence izolata, dobijene parom prajmera koji omogućavaju amplifikaciju ITS regiona rDNK i regiona introna za GPHD gen. Molekularna identifikacija odabranog izolata obavljena je nakon sekvencioniranja

ITS regiona rDNK. Konsenzus nukleotidna sekvenca deponovana je u GenBank bazu podataka i dodeljen joj je pristupni broj JX908364 (tabela 20). BLAST analiza sekvence produkta dužine 550 bp, pokazala je 91,3 do 100% nukleotidne identičnosti sa ITS rDNK sekvencama 28 izolata deponovanih u GenBank bazi podataka, dvanaest izolata vrste *C. destructivum*, jednim izolatom vrste *C. higginsianum*, jednim izolatom vrste *C. trifolii*, tri izolata vrste *C. orbiculare*, dva izolata *C. lindemuthianum* koji su GenBank bazi zavedeni kao *Glomerella lindemuthianum*, jedan izolat vrste *C. graminicola*, jedan izolat vrste *C. linicola*, jedan izolat vrste *C. fuscum*, jedan izolat vrste *C. dematium*, jedan izolat vrste *C. lineola*, dva izolata *C. gleosporioides*, dva izolata vrste *C. boninense*, jedan izolat vrste *C. spaethianum*, jedan izolat vrste *C. acutatum* koji je u GenBank bazi podataka zaveden kao *Glomerella acutatum* i jednim izolatom vrste *C. lupini*.

Nakon trimovanja sekvenci na dužinu od 520 bp, izvršen je proračun genetičke sličnosti najviši nivo homologije od 100 % ispitivani izolat Coll-44 pokazao je sa jednom sekvencom izolata CBS 172. 51 (JQ005765) vrste *C. linicola*, poreklom iz Holandije iz nepoznatog domaćina. Prema izolatima vrste *C. destructivum* C08077 (GU935874) poreklom iz Koreje i DAOM196849 (EU400156) poreklom iz Kine pokazuje nukleotidnu identičnost od 98,9%. Isto tako prema izolatu vrste *C. higginsianum* C00112 (GU935872) poreklom iz Koreje, pokazuje nukleotidnu identičnost od 98,9%. Nukleotidnu identičnosti od 98,8% ispitivani izolat je pokazao sa sekvencama izolata *C. destructivum* CBS 149.34 (JQ005764) poreklom iz Holandije.

Nakon sekvencioniranja fragmenta umnoženog u PCR reakciju korišćenjem prajmera GDF1 i GDR1 regiona introna za gen GPHD molekularna identifikacija odabranog izolata obavljena je BLAST analizom sekvence produkta u dužini od 250 bp i pokazala je 94,3% identičnosti sa jednom sekvencom vrste *C. destructivum* C08077 (GU935854) poreklom iz Koreje i jednom sekvencom vrste *C. higginsianum* C97027 (GU935850) poreklom iz Koreje. Ispitivana sekvenca izolata Coll-44 *Colletotrichum* sp. pokazala je 91,3% identičnosti sa drugim izolatom *C. higginsianum* C00112 (GU935852) takođe poreklom iz Koreje.

Kako se sekvence ITS regiona rDNK ne smatraju potpuno pouzdanim za identifikaciju i razlikovanje *Colletotrichum* spp., naročito blisko srodnih vrsta, a rezultati sekvencioniranja i nukleotidna identičnost introna gena GPHD nisu bili

potpuno informativni, izolat Coll-44 (prilog 1) nije mogao pouzdano biti identifikovan do nivoa vrste. To je razlog zašto ovaj izolat kao predstavnik III morfološke grupe u daljem tekstu se označava kao *Colletotrichum* sp. delimično identifikovan takson Coll-44. Sa istraživanjima u cilju potpune identifikacije *Colletotrichum* sp. Coll-44 biće nastavljeno primenom dodatnih konvencionalnih i molekularnih metoda i taksonomskih kriterijumima.

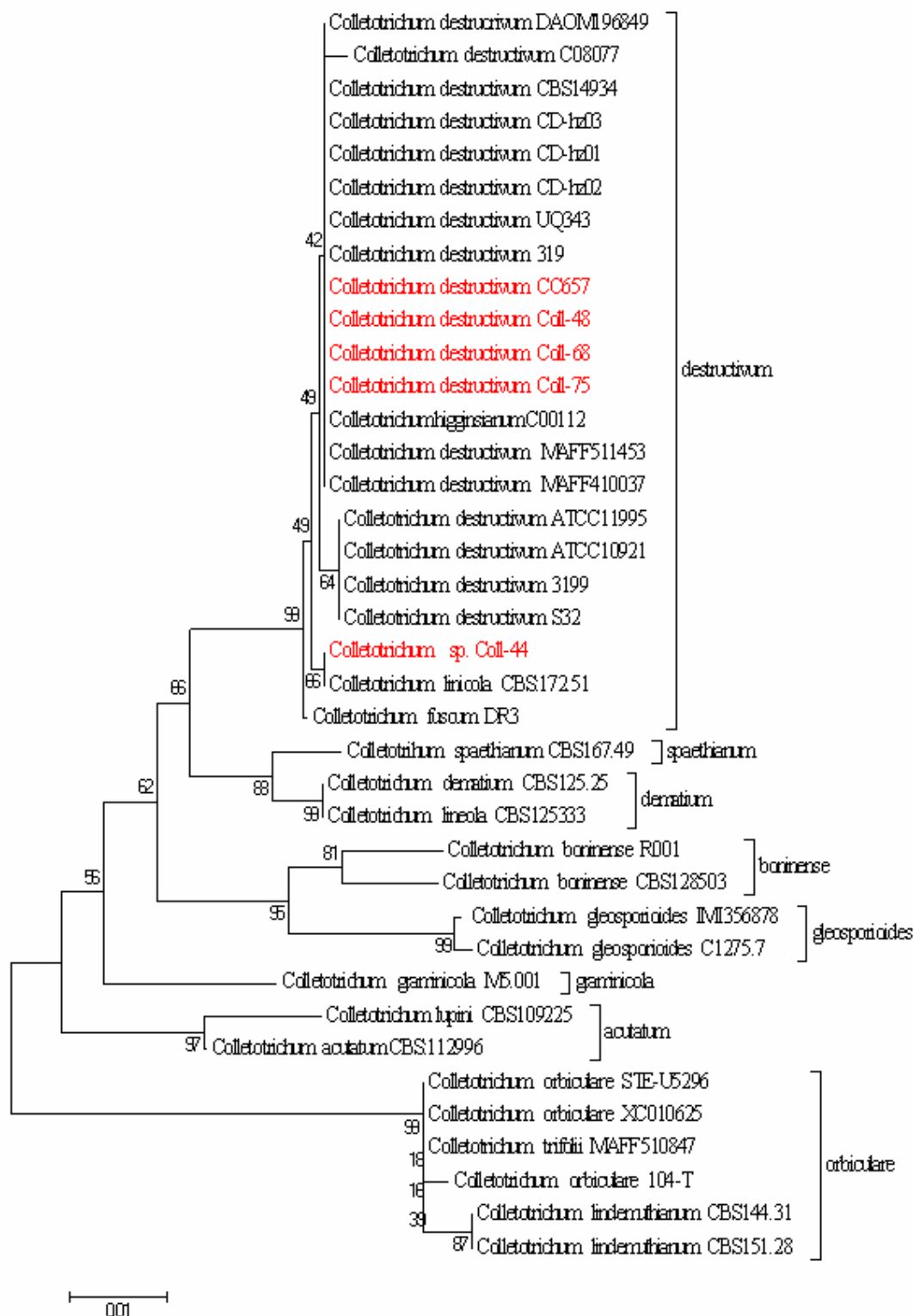
5.7.2. Molekularna karakterizacija vrsta roda *Colletotrichum* patogena lucerke

Dalja molekularna karakterizacija uključila je filogenetske analize vrsta roda *Colletotrichum*, patogena lucerke. Za filogenetske analize korišćene su nukleotidne sekvence tri različita genomna regiona: ITS rDNK, intron GS gena i intron GPDH gena. U ova ispitivanja uključeno je ukupno 12 sekvenci izolata identifikovanih vrsta *C. trifolii* (Coll-4), *C. destructivum* (Coll-9, Coll-10, Coll-18, Coll-29, Coll-32, Coll-48, Coll-68, Coll-75, Coll-Aš, CC657) i *Colletotrichum* sp. (Coll-44).

Dobijene sekvence vrsta *C. trifolii*, *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp. Analizirane su sa odgovarajućim sekvencama 33 *Colletotrichum* vrste, dostupnim GenBank bazi podataka i rekonstruisana su tri filogenetska stabla na osnovu odgovarajućih delova genoma, primenom Maximum Parsimony metode sa bootstrap podrškom od 1000 ponavljanja.

Filogenetska analiza na osnovu ITS regiona rDNK. Sekvence ITS regiona r DNK izolata Coll-48, Coll-68, Coll-75 i CC657 (*C. destructivum*) i izolata Coll-44 (*C. linicola*) sa lucerke poreklom iz Srbije, i 33 dostupne sekvence *Colletotrichum* vrsta međusobno su uparene i rekonstruisano je filogenetsko stablo.

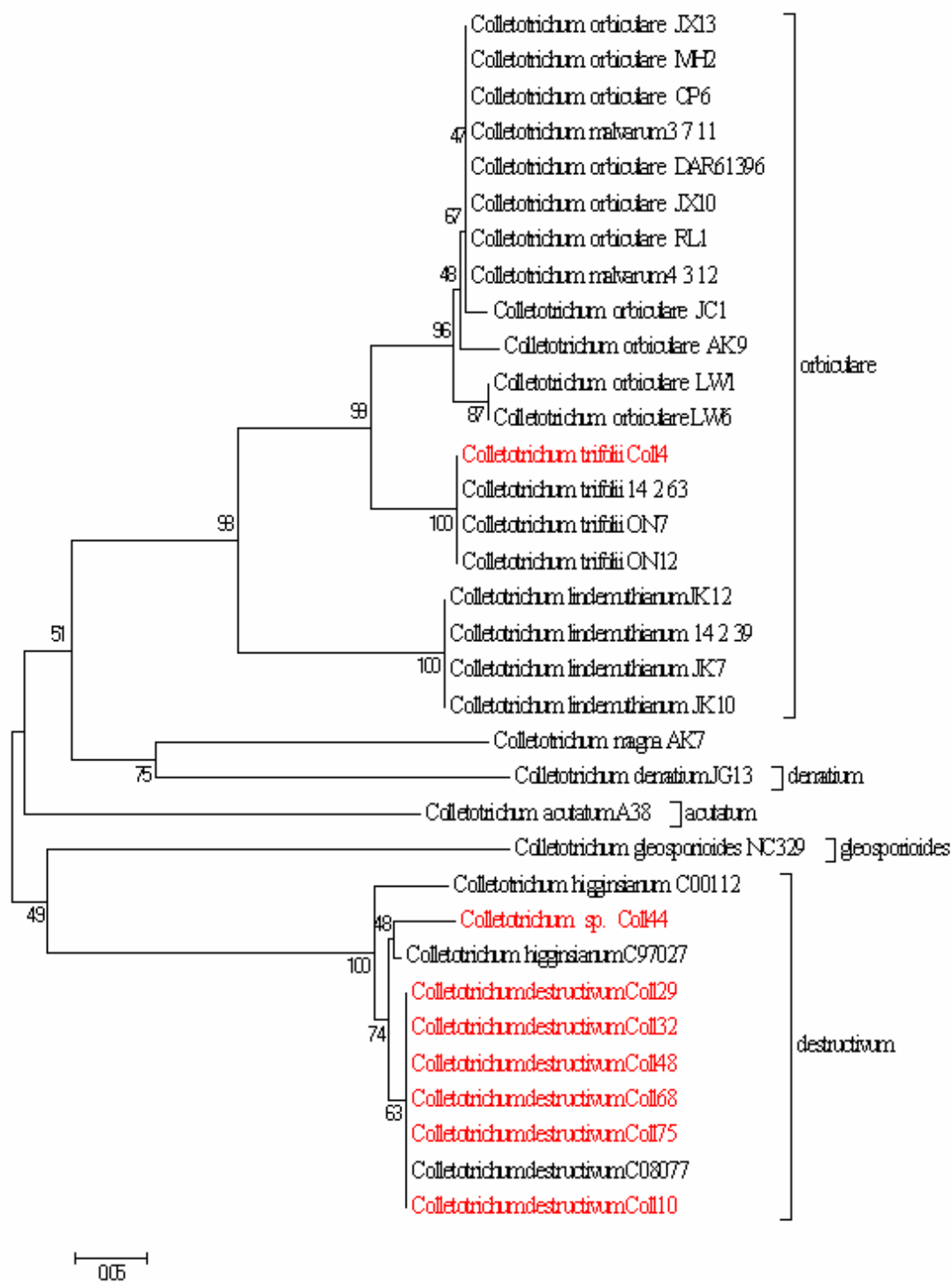
Analizom filogenetskog stabla (slika 28) rekonstruisanog na osnovu sekvenci ITS regiona rDNK uočljiva je podela na osam klastera. Utvrđeno je da su ispitivani izolati Coll-48, Coll-68, Coll-657, CC657 (*C. destructivum*) i Coll-44 (*Colletotrichum* spp.) smešteni unutar prvog klastera destructivum. U okviru ovog klastera grupisano je dvanaest izolata *C. destructivum* (tabela 21). Pored ovih vrsta u ovaj klaster grupisale su se vrste *C. linicola*, *C. fuscum* i *C. higinisaimi* ukazujući na njihovu veću srodnost na osnovu ovog dela genoma



Slika 28. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci ITS regiona rDNK 38 izolata *Colletotrichum* vrsta, korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Izolati iz lucerke sekvencionirani u ovom radu označeni su crvenom bojom

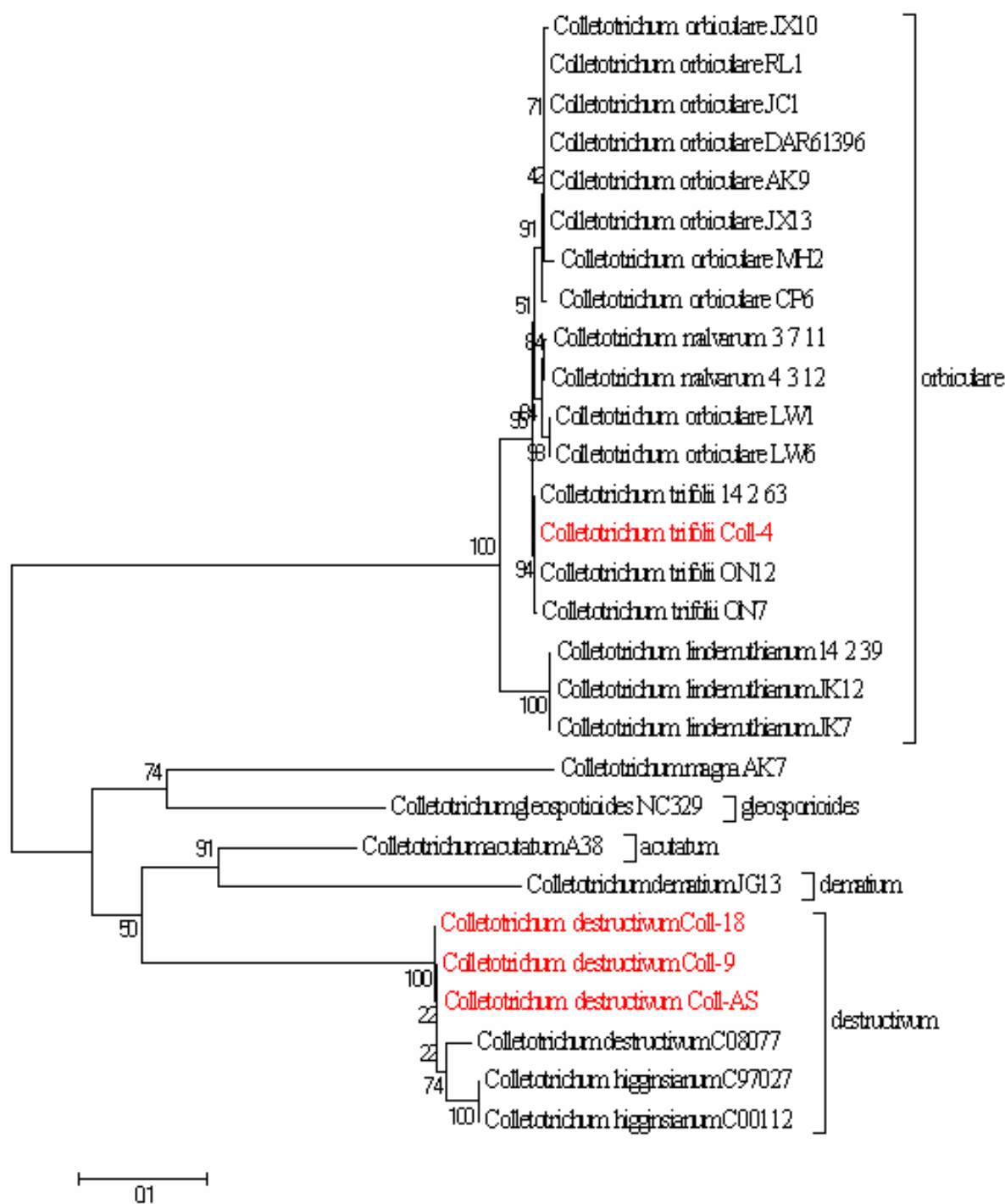
Filiogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci GPHD gena, izolata Coll-4 (*C. trifolii*), Coll-10, Coll-29, Coll-32, Coll-48, Coll-68, Coll-75 (*C. destructivum*) i Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) poreklom iz lucerke iz Srbije kao i 26 dostupnih sekvenci *Colletotrichum* pokazalo je razdvajanje odabranih izolata u pet klastera (slika 29). Sekvenca izolata Coll-4 (*C. trifolii*) grupisana je u prvi klaster orbiculare, među kojima su vrste *C. orbiculare*, *C. malvarum* i *C. lindemuthianum* poreklom iz SAD iz nepoznatog domaćina (tabela 22).

Sekvenca izolata Coll-44 (*C. linicola*) svrstana je u klaster destructivum zajedno sa vrstama *C. destructivum*, *C. higginsianum* poreklom iz Koreje. Ostale sekvence izolata Coll-10, Coll-29, Coll-32, Coll-48, Coll-68 i Coll-75 (*C. destructivum*) takođe su svrstane u klaster destructivum sa vrstama *C. linicola* i *C. higginsianum*. Grupisanje u okviru klastera snažno je podržano sa "bootstrap" vrednostima od 100 %.



Slika 29. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu sekvenci GPDH gena 34 izolata *Colletotrichum* vrsta kompleksa, korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Izolati iz lucerke sekvencionirani u ovom radu označeni su crvenom bojom

Na osnovu nukleotidnih sekvenci introna GS gena izolata Coll-4 (*C. trifolii*), Coll-9, Coll-18 i Coll-Aš (*C. destructivum*) sa lucerke i crvene deteline poreklom iz Srbije, kao i 25 dostupne sekvence *Colletotrichum* vrsta, rekonstruisano je filogenetsko stablo i pokazalo razdvajanje odabranih izolata u pet klastera (slika 30). Sekvence izolata Coll-4 (*C. trifolii*) svrstane su u prvi klaster orbiculare, sa vrstama *C. orbiculare*, *C. malvarum* i *C. lindemuthianum* poreklom iz SAD. Dok su sekvence ostalih izolata Coll-9, Coll-18 i Coll-Aš (*C. destructivum*) svrstani u peti klaster destructivum, sa vrstom *C. higginsianum* (tabela 23). Grupisanje u okviru oba klastera snažno je podržano sa "bootstrap" vrednostima od 100%.



Slika 30. Filogenetsko stablo rekonstruisano na osnovu nukleotidnih sekvenci intron GS gena 29 izolata vrsta *Colletotrichum* kompleksa, korišćenjem MEGA 5 softvera upotrebom Maximum Parsimony metode sa bootstrap analizom u 1000 ponavljanja gde su bootstrap vrednosti (>50%) prikazane pored odgovarajućih grana. Izolati iz lucerke sekvencionirani u ovom radu označeni su crvenom bojom

Tabela 21. Sekvence ITS regiona rDNK *Colletotrichum* vrsta korišćene za filogenetske analize

Vrsta	Domaćin	Poreklo	GenBank		Izvor
			Kolekcija	Acc. No	
<i>C. destructivum</i>	nepoznat	Koreja	C08077	GU935874	O'Connell et al., 2012
<i>C. destructivum</i>	nepoznat	Engleska	319	AJ558107	O'Connell et al., 2012
<i>C. destructivum</i>	nepoznat	Australija	UQ343	AF451908	O'Connell et al., 2012
<i>C. destructivum</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Kina	CD-hz-02	EU070912	Sun and Zang, 2009
<i>C. destructivum</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Kina	CD-hz-01	EU070911	Sun and Zang, 2009
<i>C. destructivum</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Kina	CD-hz-03	EU070913	Sun and Zang, 2009
<i>C. destructivum</i>	nepoznat	Kina	DAOM196849	EU400156	Neobjavljeni rad
<i>C. destructivum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Kanada	ATCC11995	AF3205663	Shen et al., 2001
<i>C. destructivum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Kanada	ATCC10921	AF320562	Shen et al., 2001
<i>C. destructivum</i>	nepoznat	Kina	3199	FJ490758	Neobjavljeni rad
<i>C. destructivum</i>	nepoznat	Kina	S32	EF016298	O'Connell et al., 2012
<i>C. destructivum</i>	nepoznat	Holandija	CBS 149.34	JQ005764	O'Connell et al., 2012
<i>C. destructivum</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Japan	MAFF410037	AB105061	Moriwaki et al., 2002
<i>C. destructivum</i>	<i>Trifolium repens</i>	Japan	MAFF511453	AB105062	Moriwaki et al., 2002
<i>C. higginsianum</i>	nepoznat	Koreja	C00112	GU935872	Neobjavljeni rad
<i>C. linicola</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	Holandija	CBS 172.51	JQ005765	O'Connell et al., 2012
<i>C. fuscum</i>	<i>Ixodes scapularis</i>	SAD	DR3	EU886770	Neobjavljeni rad
<i>C. spaethianum</i>	<i>Hosta sieboldiana</i>	Nemačka	CBS 167.49	GU227807	Damm et al., 2009
<i>C. dematium</i>	<i>Eryngium campestre</i>	Francuska	CBS 125.25	GU227819	Damm et al., 2009
<i>C. lineola</i>	<i>Heracleum</i> sp.	Holandija	CBS 125.333	GU227832	Damm et al., 2009
<i>C. boninense</i>	<i>Rubus glaucus</i>	Kolumbija	R001	JN15846	Neobjavljeni rad
<i>C. boninense</i>	<i>Solanum betaceum</i>	Novi Zeland	CBS 128.503	JQ005237	Neobjavljeni rad
<i>C. gleosporioides</i>	<i>Citrus sinensis</i>	Italija	IMI 356878	JX010152	Weir et al., 2012
<i>C. gleosporioides</i>	<i>Ficus habrophylla</i>	Nemačka	C12757	JX010181	Weir et al., 2012

<i>C. graminicola</i>	nepoznat	Holandija	M 5.001	JQ005768	O'Connell et al., 2012
<i>C. lupini</i>	nepoznat	Holandija	CBS 109225	JQ948155	Damm et al., 2012
<i>G. acutatum</i>	nepoznat	Holandija	CBS 112996	JQ005776	O'Connell et al., 2012
<i>C. orbiculare</i>	nepoznat	Holandija	STE-U5296	AY3765541	Lubbe et al., 2004
<i>C. orbiculare</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>	Kina	XCO10625	HQ839785	Neobjavljen rad
<i>C. orbiculare</i>	nepoznat	Holandija	104-T	JQ005778	O'Connell et al., 2012
<i>C. trifolii</i>	<i>Medicago satia</i>	Japan	MAFF510847	AB087223	Moriwaki et al, 2002
<i>G. lindemuthianim</i>	nepoznat	Holandija	CBS 144.31	JQ005779	O'Connell et al., 2012
<i>G. lindemuthianim</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Holandija	CBS 151.28	GU227800	Damm et al., 2009
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-48	JX908361	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-68	JX908362	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-75	JX908363	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Holandija	CC657	JX908365	Ova istraživanja
<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-44	JX908364	Ova istraživanja

Tabela 22. Sekvence intron GPHD gena *Colletotrichum* vrsta korišćene za filogenetske analize

Vrsta	Domaćin	Poreklo	GenBank		Izvor
			Kolekcija	Acc. No	
<i>C. orbiculare</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>	SAD	JX13	DQ792865	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>	SAD	RL1	DQ792868	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Cucumis sativum</i>	SAD	JC1	DQ792866	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Cucumis sativum</i>	SAD	DAR61396	DQ792862	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	SAD	AK9	DQ792861	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>	SAD	JX10	DQ792864	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>	SAD	CP6	DQ792867	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Cucumis sativum</i>	SAD	MH2	DQ792863	Liu et al., 2007
<i>C. malvarum</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>	SAD	3711	DQ792869	Liu et al., 2007
<i>C. malvarum</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>	SAD	4312	DQ792870	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Xanthium spinosum</i>	SAD	LW1	DQ792860	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Xanthium spinosum</i>	SAD	LW6	DQ792859	Liu et al., 2007
<i>C. trifolii</i>	<i>Medicago satia</i>	SAD	14263	DQ792854	Liu et al., 2007
<i>C. trifolii</i>	<i>Medicago satia</i>	SAD	ON12	DQ792852	Liu et al., 2007
<i>C. trifolii</i>	<i>Medicago satia</i>	SAD	ON7	DQ792853	Liu et al., 2007
<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	SAD	14239	DQ792856	Liu et al., 2007
<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	SAD	JK12	DQ792858	Liu et al., 2007
<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	SAD	JK7	DQ792857	Liu et al., 2007
<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	SAD	JK10	DQ792855	Liu et al., 2007
<i>C. destructivum</i>	nepoznat	Koreja	C08077	GU935854	Neobjavljen rad
<i>C. higginsianum</i>	nepoznat	Koreja	C97027	GU935850	Neobjavljen rad
<i>C. higginsianum</i>	nepoznat	Koreja	C00112	GU935852	Neobjavljen rad
<i>C. acutatum</i>	nepoznat	SAD	A38	DQ792848	Liu et al., 2007
<i>C. dematium</i>	nepoznat	SAD	JG13	DQ792851	Liu et al., 2007
<i>C. magna</i>	nepoznat	SAD	AK7	DQ792850	Liu et al., 2007

<i>C. gleosporioides</i>	nepoznat	SAD	NC329	DQ792849	Liu et al., 2007
<i>C. trifolii</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-4	-	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-10	-	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-29	-	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-32	-	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll- 48	-	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-68	-	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-75	-	Ova istraživanja
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-44	-	Ova istraživanja

Tabela 23. Sekvence intron GS gena *Colletotrichum* vrsta korišćene za filogenetske analize

Vrsta	Domaćin	Poreklo	GenBank		Izvor
			Kolekcija	Acc. No	
<i>C. orbiculare</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>	SAD	JX13	DQ792888	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>	SAD	RL1	DQ792891	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Cucumis sativum</i>	SAD	JC1	DQ792889	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Cucumis sativum</i>	SAD	DAR61396	DQ792885	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	SAD	AK9	DQ792884	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>	SAD	JX10	DQ792887	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Citrullus vulgaris</i>	SAD	CP6	DQ792890	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Cucumis sativum</i>	SAD	MN2	DQ792886	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Xanthium spinosum</i>	SAD	LW1	DQ792883	Liu et al., 2007
<i>C. orbiculare</i>	<i>Xanthium spinosum</i>	SAD	LW6	DQ792882	Liu et al., 2007
<i>C. trifolii</i>	<i>Medicago satia</i>	SAD	14263	DQ792877	Liu et al., 2007
<i>C. trifolii</i>	<i>Medicago satia</i>	SAD	ON12	DQ792875	Liu et al., 2007
<i>C. trifolii</i>	<i>Medicago satia</i>	SAD	ON7	DQ792876	Liu et al., 2007
<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	SAD	14239	DQ792879	Liu et al., 2007
<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	SAD	JK12	DQ792881	Liu et al., 2007
<i>C. lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	SAD	JK7	DQ792880	Liu et al., 2007
<i>C. destructivum</i>	nepoznat	Koreja	C08077	GU935814	Neobjavljen rad
<i>C. higginsianu</i>	nepoznat	Koreja	C97027	GU935810	Neobjavljen rad
<i>C. higginsianu</i>	nepoznat	Koreja	C00112	GU935812	Neobjavljen rad
<i>C. acutatum</i>	nepoznat	SAD	A38	DQ792871	Liu et al., 2007
<i>C. dematium</i>	nepoznat	SAD	JG13	DQ792874	Liu et al., 2007
<i>C. magna</i>	nepoznat	SAD	AK7	DQ792873	Liu et al., 2007
<i>C. gleosporioid</i>	nepoznat	SAD	NC329	DQ792872	Liu et al., 2007
<i>C. malvarum</i>	<i>Sida spinosa</i>	SAD	3711	DQ792892	Liu et al., 2007
<i>C. malvarum</i>	<i>Sida spinosa</i>	SAD	4312	DQ792893	Liu et al., 2007

<i>C. trifolii</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-4	JX908368	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-9	JX908366	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Medicago satia</i>	Srbija	Coll-18	JX908367	Ova istraživanja
<i>C. destructivum</i>	<i>Trifolium repens</i>	Srbija	Coll- Aš	JX908369	Ova istraživanja

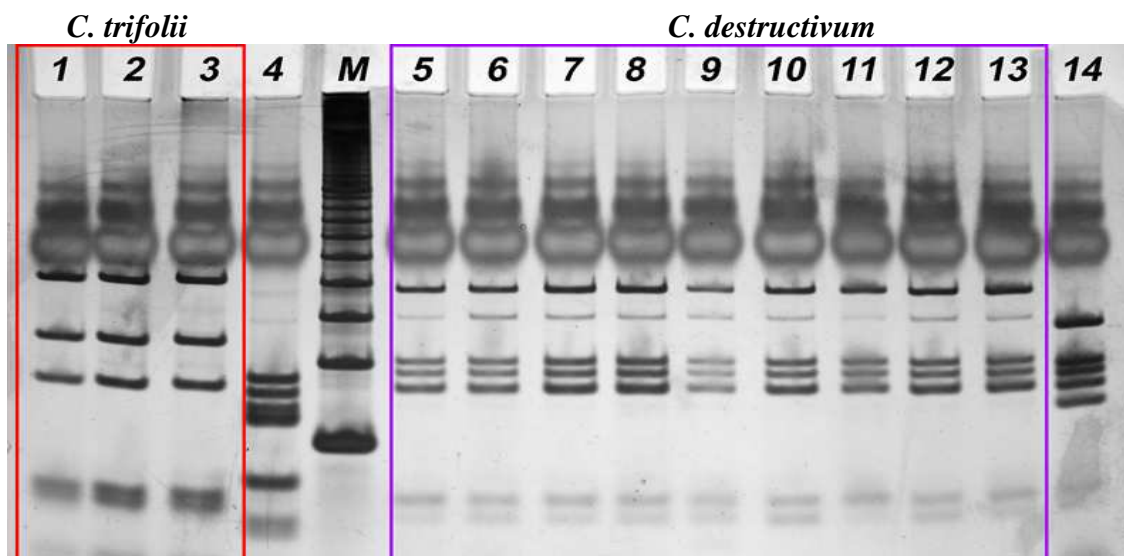
5.7.3. RFLP-PCR analiza

Za RFLP-PCR analizu korišćeno je ukupno 18 izolata su podeljeni u tri morfološke grupe. Izolati I morfološke grupe okarakterisanih kao *C. trifolii* i uključili su tri izolata, Coll-4 i dva referentna izolata C-86-2 i CBS158.83. Izolati II morfološke grupe okarakterisani su kao *C. destructivum* uključili su 16 izolata (Coll-3, Coll-8, Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-32, Coll-35, Coll-37, Coll-38, Coll-48, Coll-AŠ, Coll-BK, Coll-68, Coll-75) i referentni izolat CC657. U analize uključen je i izolat Coll-44 *Colletotrichum* sp. takson identifikovan do nivoa roda i označen kao pripadnik III morfološke grupe. Kao referentni izolati korišćeni su i izolati AVO-37-4B *C. gloeosporioides* i CC560 *C. dematium*.

PCR produkti dobijeni umnožavanjem parom prajmera GSF1-GSR1 koji umnožavaju region introna gena za glutamin sintetazu (GS) tretirani su sa dve kombinacije restrikcioni enzima: (a). *Hind*III + *Hinf*I + *Hae*III i (b). *Hind*III + *Hinf*I + *Msp*I. Analizom RFLP proizvoda u agaroznom gelu dobijeni su restrikcioni profili koji su jasno pokazali razlike između analiziranih uzoraka (slike 31 i 32). Kod uzoraka prve morfološke grupe (Coll-4, CBS 158.83 i C-86-2) dobijeni profili restrikcioni fragmenata koji odgovaraju vrsti *C. trifolii*. Kod uzoraka II morfološke grupe dobijeni su restrikcioni profili devet izolata (Coll-3, Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-35, Coll-37 i Coll-AŠ) koji su se jasno razlikovali od profila vrste *C. trifolii*. Ovi izolati pokazali su međusobno identične restrikcione profile, što znači da kod ovih izolata nije izražen polimorfizam.

Međutim, ostalih osam izolata II morfološke grupe (Coll-8, Coll-32, Coll-38, Coll-48, Coll-68, Coll-75, Coll-Bk i CC657) okarakterisani kao *C. destructivum* i jednim izolatom treće morfološke grupe (Coll-44) okarakterisan do nivou roda *Colletotrichum* sp. u kombinaciji sa šest enzima A: *Hind*III + *Hinf*I + *Hae*III i B: *Hind*III + *Hinf*I + *Msp*I dali su vrlo slabu reakciju sa regionom introna gena za glutamin sintetazu (GS) od oko 900 bp, tako da nije moglo da dođe do digestije primenjenim enzimima.

Dobijeni profili ne odgovaraju nijednom od profila dobijenih za više vrsta iz roda *Colletotrichum* (*C. orbiculare*, *C. malvarum*, *C. dematium*, *C. acutatum*, *C. magna* i *C. lindemuthianum*).



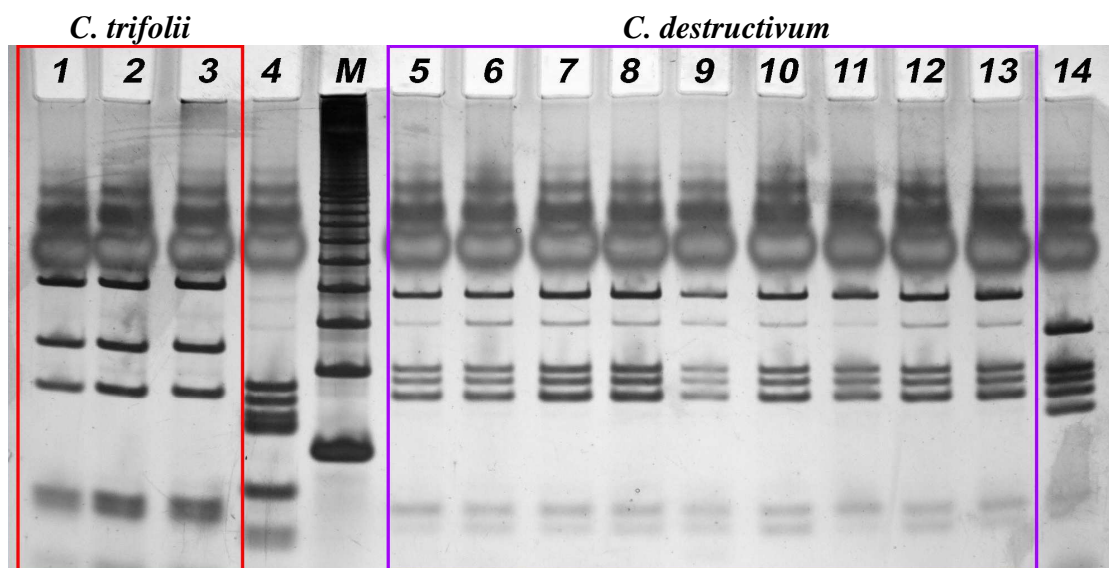
Slika 31. RFLP analiza 900 bp introna GS gena odabranih izolata. Umnoženi PCR proizvod (≈ 900 bp) tretiran je kombinacijom tri enzima (a): *Hind*III + *Hinf*I + *Hae*III, (kolone: 1-izolat Coll-4, 2- referentni izolat *C. trifolii* (CBS 158.83), 3- referentni izolat *C. trifolii* rase 1 (C-86-2), 4- referentni izolat *C. gleosporioides* (AVO-37-4B), 5- izolat Coll-Aš, 6- izolat Coll-3, 7- izolat Coll-9, 8- izolat Coll-10, 9- izolat Coll-11, 10- izolat Coll-18, 11- izolat Coll-29, 12- izolat Coll-35, 13- izolat Coll-37, 14- referentni izolat *C. dematium* (CC560)) i analiziran u poliakrilamidnom gelu. M- marker-100 bp DNK Ladder: uzorci: 1-3: 50 bp, 60 bp, 90 bp, 140 bp, 220 bp; uzorak: 4-20 bp, 60 bp, 80 bp, 100 bp, 150 bp, 210 bp, 220 bp; uzorci: 5-13: 20bp, 40 bp, 60 bp, 80 bp, 100 bp, 190 bp, 300 bp; uzorak: 14-20 bp, 40 bp, 80 bp, 150 bp, 160 bp, 220 bp

Kod prve kombinacije enzima A: *Hind*III + *Hinf*I + *Hae*III izolati I morfološke grupe (Coll-4, CBS 158.83 i C-86-2) formirali su šest restrikcionih traka, dok izolati iz II morfološke grupe (Coll-3, Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-35, Coll-37 i Coll-Aš), koji su dali pozitivnu reakciju, formirali su osam restrikcionih traka.

Analizom rezultata za I morfološku grupu okarakterisanu kao *C. trifolii* možemo da konstatujemo da nije izražen polimorfizam između izolata bez obzira što ispitivani izolati imaju različito geografsko poreklo. Izolat Coll-4 je iz lucerke iz Srbije (rasinski okrug) dok su ostali izolati (CBS 158.83) iz Holandije i (C-68-2) iz Francuske.

Na osnovu analize izolata II morfološke grupe koji su okarakterisani kao *C. destructivum* kod devet izolata došlo je do formiranja restrikcionih traka, izolati su dobijeni iz lucerke Coll-3, Coll-9, Coll-10 (rasinski okrug), Coll-11 (srednje banatski), Coll-18 (niški), Coll-29 (podunavski), Coll-35 (južno banatski), Coll-37 (šumadijski) i crvene dateline Coll-Aš (južno bački) iz Srbije. Kod ovih izolata nije izražen polimorfizam bez obzira na geografsko poreklo.

Kod osam izolata II morfološke grupe, okarakterisanih kao *C. destructivum*, nije došlo do formiranja restrikcionih traka. Sedam izolata je dobijeno iz lucerke Coll-8 (raški okrug), Coll-32 (srednje banatski), Coll-38 (podunavski), Coll-48 (pomoravski), Coll-68 (pčinjski), Coll-75 (južno bački okrug) i jedan izolat iz crvene dateline Coll-Bk (sremski okrug) iz Srbije, dok je referentni izolat CC657 iz Holandije. Dobijeni rezultati ukazali su na izvesnu varijabilnost prisutnu u okviru populacije *C. destructivum* u Srbiji.



Slike 32. RFLP analiza 900 bp introna GS gena odabranih izolata. Umnoženi PCR proizvod (≈ 900 bp) tretiran je kombinacijom tri enzima (b): *HindIII* + *HinfI* + *MspI* (kolone: 1-izolat Coll-4, 2-referentni izolat *C. trifolii* (CBS 158.83), 3-referentni izolat *C. trifolii* rase 1 (C-86-2), 4- referentni izolat *C. gleosporioides* (AVO-37-4B), 5- izolat Coll-Aš, 6- izolat Coll-3, 7- izolat Coll-9, 8-izolat Coll-10, 9-izolat Coll-11, 10-izolat Coll-18, 11- izolat Coll-29, 12- izolat Coll-35, 13-izolat Coll-37, 14- referentni izolat *C. dematium* (CC560)) i analiziran u poliakrilamidnom gelu. M- marker-100 bp DNK Ladder: uzorci: 1-3; 180 bp, 220 bp, 400 bp; uzorak: 4-50 bp, 130 bp, 140 bp, 160 bp, 180 bp; uzorci: 5-13: 180 bp, 190 bp, 200 bp, 300 bp, 380 bp; uzolark: 14-170 bp, 180 bp, 190 bp, 200 bp, 290 bp.

U drugoj kombinaciji enzima B: *HindIII* + *HinfI* + *MspI* izolati I morfološke grupe (Coll-4, CBS 158.83 i C-86-2) formirali su pet restrikcionih traka, dok izolati iz II morfološke grupe (Coll-3, Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-35, Coll-37 i Coll-Aš), koji su dali pozitivnu reakciju, formirali su osam restrikcionih traka. Kod III morfološke grupe, izolata Coll-44 (južno banatski okrug) dobijenog iz lucerke iz Srbije, okarakterisanog kao *Colletotrichum* sp., nije došlo do formiranja restrikcionih traka, odnosno digestije primenjenim restrikcionim enzimima.

5.8. Proučavanje vegetativne kompatibilnosti odabranih izolata *Colletotrichum* spp.

Određivanje grupa vegetativne kompatibilnosti (Vegetative Compatibility Groups, VCG), kao jedne veoma značajne genetičke osobine kod askomiceta kojom se jedna subpopulacija može identifikovati kao posebna genetička grupa, primenjeno je na populaciji vrsta iz roda *Colletotrichum* patogena za lucerku i crvenu detelinu u Srbiji.

Vegetativno kompatibilne grupe u populaciji *C. trifolii*, *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp. određene su na osnovu izdvajanja hlorat-rezistentnih sektora odabranih izolata, njihovim gajenjem na podlogama sa različitim izvorima azota radi utvrđivanja fenotipa i komplementarnosti *nit* mutanata.

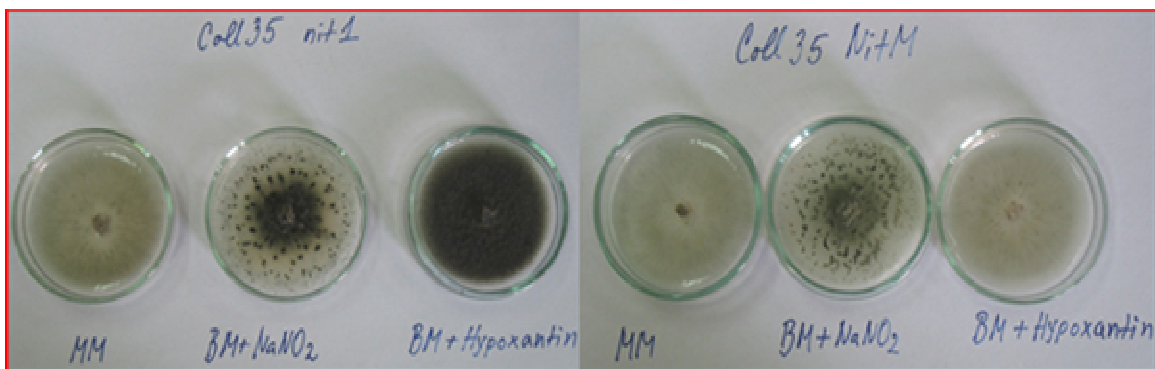
Hlorat-rezistentni sektori na minimalnoj podlozi sa hloratom razvili su se posle 7-14 dana kod svih proučavanih izolata. Kod većine ispitivanih izolata najčešće je zapažen razvoj jednog sektora (slika 33), dok je kod izolata vrste *C. trifolii* (C-86-2, Coll-4) i vrste *C. destructivum* (Coll-10, Coll-32, Coll-37, Coll-68 i Coll-Bk) razvijeno dva sektora. Samo izolat CBS 158.83 (*C. trifolii*), formira tri sektora oko centralnog isečka kolonije. Varijabilnost u broju sektora koje izolati formiraju zabeležena je kod sve tri vrste uključene u ova istraživanja.

Iz hlorat-rezistentnih sektora kod svih proučavanih izolata izolovani su mutanti koji su se odlikovali retkom, tankom substratnom micelijom na MM podlozi. Izolati iz hlorat-rezistentnih sektora, koji su na MM podlozi razvili bujnu vazдушnu miceliju, tzv. divlji-tip micelije odbacivani su i nisu dalje analizirani.

Iz hlorat-rezistentnih sektora svih ispitivanih izolata izdvojene su dve vrste *nit* mutanata, *nit1* i NitM. Mutant *nit1* je razvio retku i tanku, ne vazдушnu miceliju na MM podlozi i divlji-tip micelije na nitritnoj i hipoksantin podlozi (slika 34), dok je mutant NitM razvio retku i tanku, substratnu miceliju na MM i hipoksantin podlozi, a divlji-tip micelije na nitritnoj podlozi (slika 34). Mutant *nit3* razvija retku i tanku, ne vazдушnu miceliju na MM i nitritnoj podlozi i divlji-tip micelije na hipoksantin podlozi ali u ovim istraživanjima nije zabeleženo prisustvo takvog tipa mutanata. Međutim, izolati na podlogama sa različitim izvorima azota mogu imati porast koji je sličan divljem-tipu i to su *crn* mutanti koji mogu koristiti nitrite i otporni su prema hloratima. Ovi mutanti se odbacuju jer ne mogu formirati heterokarione na MM podlozi.



Slika 33. *Colletotrichum trifolii*: Izolat CBS 158.83 izgled hlorat rezistentnog sektora na MMC podlozi



Slika 34. *Colletotrichum destructivum*: Izolat Coll-35: levo - izgled mutanata *nit1* na nitratnoj (BM+NaNO₃), nitritnoj (BM+NaNO₂) i hipoksantin (BM+hipoksantin) podlozi, desno – izgled mutanta NitM na nitratnoj (BM+NaNO₃), nitritnoj (BM+NaNO₂) i hipoksantin (BM+hipoksantin) podlozi

Broj hlorat-rezistentnih sektora sa MMC podlogom (relativna učestalost sektora) i fenotip *nit* mutanata varirao je među proučavanim izolatima. Učestalost hlorat-rezistentnih sektora bila je kod izolata vrste *C. trifolii* (Coll-4, C-86-2 i CBS 158.83) od 22 do 66 sektora. Dok kod izolata *C. destructivum* učestalost hlorat-rezistentnih sektora bila je od 5 za izolat Coll-11 do 28 sektora za izolat Coll-48 (tabela 24). Kod *Colletotrichum* sp. (Coll-44) učestalost hlorat-rezistentnih sektora je 10.

Kod 18 proučavanih izolata mutant *nit1* je češće izolovan u odnosu na mutante NitM i *nit3*. Formiranje *nit3* mutanata nije zabeleženo u ovim istraživanjima ni kod jedne od proučavanih vrsta iz roda *Colletotrichum*. Relativna učestalost mutanata *nit1* za izolate vrste *C. trifolii*: izolat Coll-4 imao je 13 *nit1* mutanta, C-86-2, 12 *nit1* mutanta i

CBS 158.83, 14 *nit1* mutanta. Kod izolate vrste *C. destructivum* učestalost mutanata *nit1* je bila od dva za izolat Coll-3 do 17 za izolat Coll-32 (tabela 24). Relativna učestalost mutanata *nit1* za izolat Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) iznosila je tri. Procene relativne učestalosti *nit1* mutanta za sve proučavane izolate iznosilo je 8,57. Opseg relativne učestalosti mutanata NitM je kod izolata vrste *C. trifolii* bio od tri (C-86-2), osam (Coll-4) do 18 (CBS158.83). Kod izolata vrste *C. destructivum* relativna učestalost mutanata NitM je iznosila od jedan za izolate Coll-38 i Coll-48 do 12 za izolat Coll-29 (tabela 24). Opseg relativne učestalosti mutanata NitM za izolat Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) iznosio je dva. Prosek relativna učestalost NitM mutanta za sve proučavane izolate iznosila je 4,43. Za izolate *C. trifolii* relativna učestalost *crn* mutanata je bila od 7 (C-86-2) do 29 (Coll-4), za izolate *C. destructivum* od 0 (Coll-10, Coll-11 i Coll-35) do 20 (Coll-3) i za izolat Coll-44 (*Colletotrichum* spp.) 5 (tabela 24). Prosečna relativna učestalost *crn* mutanata za sve proučavane izolate je 7,23.

Tabela 24. Učestalost hlorat rezistentnih sektora, izolata *nit* (*nit1*, NitM) i *crn* mutanata kod ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Vrsta	Izolati	Broj				
		sektora	<i>nit1</i>	NitM	<i>crn</i>	Σnit
<i>C. trifolii</i>	Coll4	50	13	8	29	21
	C-86-2	22	12	3	7	15
	CBS 158.83	66	14	18	34	32
<i>C. destructivum</i>	Coll3	25	2	3	20	5
	Coll8	10	6	3	1	9
	Coll9	9	3	4	2	7
	Coll10	7	5	2	0	7
	Coll11	5	3	2	0	5
	Coll18	15	10	4	1	14
	Coll29	17	3	12	2	15
	Coll32	26	17	3	6	20
	Coll35	15	10	5	0	15
	Coll37	9	2	2	5	4
	Coll38	14	11	1	2	12
	Coll48	28	12	3	13	15
	Coll68	20	14	1	5	15
	Coll75	25	16	3	6	19
	CollAš	20	14	4	2	18
	Coll BK	20	5	8	7	13
	CC657	12	5	2	5	7
<i>Colletotrichum</i> sp.	Coll44	10	3	2	5	5
Prosek	-	20.23	8.57	4.43	7.23	12.90

Testovi uparivanja (test autokompatibilnosti i kompatibilnosti među *nit* mutantima). U testovima uparivanja na nitratnoj/minimalnoj podlozi (MM), zapaženo je da nakon sedam dana kod izolata vrste *C. trifolii* došlo je do uparivanja *nit1* i NitM mutanata, odnosno uočeno je formiranje prototrofnih (vidljivih) heterokariona na mestima dodira kolonija koje se uočava u vidu bujnog porasta vazdušne micelije. Kod izolata vrste *C. destructivum* i izolata Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) do uparivanja došlo je značajno kasnije, posle 14 dana. Pozitivna reakcija, odnosno formiranje heterokariona između *nit1* i NitM mutanata istog izolata, ocenjen je kao autokompatibilnost ili samokompatibilnost proučavanog izolata (slike 35 i 36).

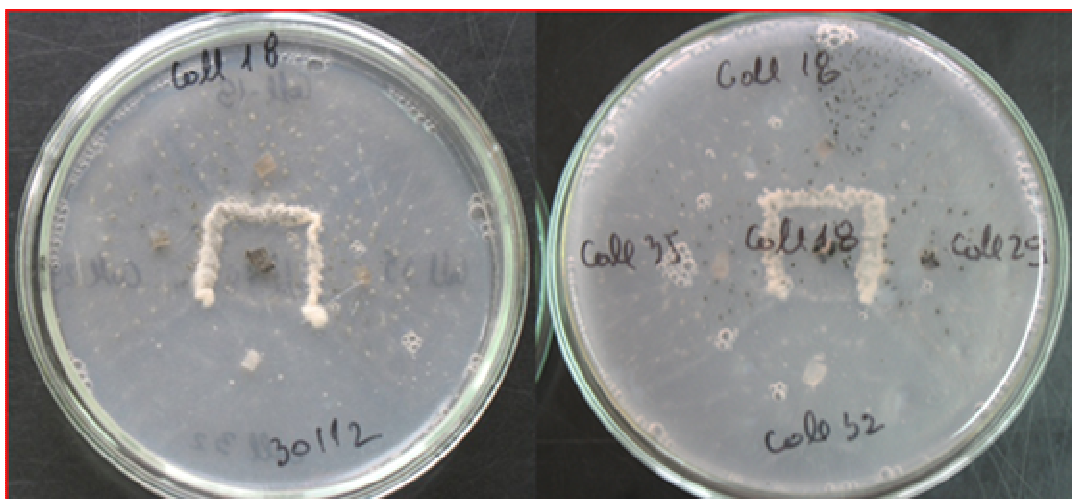
Ukoliko prilikom uparivanja mutanata istog izolata ne dođe do formiranja heterokariona, ocenjeno je kao heterokarionska autoinkompatibilnost (HSI) ili nesamokompatibilnost proučavanog izolata. Pozitivna reakcija između *nit1* i NitM mutanata različitih izolata ocenjena je kao kompatibilnost proučavanih izolata (slika 37) i ovakvi izolati svrstani su u istu VCG.



Slika 35. *Colletotrichum destructivum*: Izgled prototrofnog heterokariona između NitM i *nit1* mutanata monosporijalnog izolata Coll-3 (autokompatibilnost) i nekompatibilnost izolata Coll-3 sa izolatima Coll-4, CBS 158.83 i C-86-2, na MM podlozi



Slika 36. *Colletotrichum destructivum*: Izgled prototrofnog heterokariona između NitM i *nit1* mutanata monosporijalnog izolata Coll-3 (autokompatibilnost) i nekompatibilnost izolata Coll-3 sa izolatima Coll-4, CBS 158.83 i C-86-2, na MM podlozi



Slika 37. *Colletotrichum destructivum*: Izgled prototrofnih heterokariona na MM podlozi između NitM i *nit1* od izolata Coll-18 (autokompatibilnost) i između NitM od izolata Coll-18 i *nit1* od izolata Coll-29 i Coll-35 (kompatibilnost) i *nit1* od izolata Coll-32 (nekompatibilnost)

Za identifikaciju vrsta i populacija patogenih gljiva, koriste se morfološke, filogenetske i populaciono genetičke metode u kojima se porede osobine nukleinskih kiselina. Sistem vegetativne kompatibilnosti veoma je koristan metod u proučavanju populacione dinamike gljiva. Za determinaciju vegetativne kompatibilnosti-nekompatibilnosti koristi se makroskopska ocena u komplementarnim testovima. U toku rada na determinaciji VCG proučavane su populacije tri vrste iz roda *Colletotrichum*: *C. trifolii* (Coll-4), *C. destructivum* (Coll-3, Coll-8, Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-35, Coll-37, Coll-32, Coll-38, Coll-48, Coll-68, Coll-75, Coll-Bk, Coll-Aš) i *Colletotrichum* sp. (Coll-44) iz Srbije. U komplementarnim testovima odabrani izolati iz Srbije upareni su sa referentnim izolatima *C. trifolii* rase 1 (C-86-2) iz Francuske i Holandije (CBS158.83) i izolatom *C. destructivum* (CC657) iz Holandije.

U komplementarnim testovima 18 izolata poreklom iz lucerke i crvene deteline iz Srbije, i tri referentna izolata, grupisalo se u sedam VC grupa. VC grupa su obeležene velikim slovima latiničnog pisma (tabele 25, 26 i 27). Među ustanovljenih sedam VC grupa, dve VC grupe sadrže najveći broj izolata, VCG B (Coll-3, Coll-8, Coll-10, Coll-11, Coll-Aš), VCG C (Coll-18, Coll-29, Coll-35, Coll-37, Coll-BK) odnosno po pet izolata (tabela 25), dok VCG A (C-86-2, CBS158.83, Coll-4) i VCG D (Coll-9, Coll-32, Coll-38) sadrže po tri izolata (tabela 26). Ostale grupe VCG E (Coll-44), VCG F

(Coll-68), VCG G (Coll-75) sadrže po jedan izolat (tabela 27). Auto nekompatibilni izolati bili su izolati *C. destructivum* Coll-48 i CC657.

Na osnovu metode vegetativne kompatibilnosti utvrđeno je da izolat Coll-4 iz rasinskog okruga, nakon uparivanja sa referentnim izolatima za vrstu *C. trifolii* svrstan su u istu VC grupu, VCG A (C-86-2, CB158.83, Coll-4). Što ukazuje da je izolat Coll-4 poreklom iz Srbije genetički identičan sa referentnim izolatima vrste *C. trifolii*.

Ostali izolati koji su na osnovu morfoloških i molekularnih osobina okarakterisani kao *C. destructivum* su svrstani u pet različitih VCGs. Ovim grupama pripadaju izolati VCG B (Coll-3, Coll-8, Coll-10, Coll-1, Coll-AŠ); VCG C (Coll-18, Coll-29, Coll-35, Coll-37, Coll-BK) i VCG D (Coll-9, Coll-32, Coll-38) sadrže izolate sa raznih lokaliteta, a osim lucerke kao domaćina, dva izolata su poreklom iz crvene deteline i to su: Coll-AŠ i Coll-BK, koji pripadaju dvema različitim VCGs. VCG F (Coll-68) i VCG G (Coll-75) svaki izolat čini grupu za sebe i nisu genetički srodni. Treća grupa koja je na osnovu morfoloških osobina i molekularne karakterizacije identifikovana kao *Colletotrichum* sp. je posebna grupa VCG E (Coll-44) (tabela 27).

Tabela 25. VCG grupe B i C proučavanih izolata poreklom sa lucerke u Srbiji

Vrsta	Nit	B					C				
		Coll-3	Coll-8	Coll-10	Coll-11	CollAš	Coll-18	Coll-29	Coll-35	Coll-37	CollBk
<i>C. trifolii</i>	Coll-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C-86-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CBS158.83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. destructivum</i>	Coll-3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Coll-8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Coll-10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Coll-11	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Coll-AŠ	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Coll-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Coll-32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Coll-38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Coll-48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Coll-68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Coll-75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Coll-18	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Coll-29	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Coll-35	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Coll-37	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Coll-BK	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
CC657	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Colletotrichum</i> sp.	Coll-44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*rezultati testova uparivanja: pozitivna reakcija označena je simbolom "+" a negativna simbolom "-"

Tabela 26. VCG grupe A i D proučavanih izolata poreklom sa lucerke u Srbiji

Vrsta	Nit	A			D		
		Coll-4	C-86-2	CBS 158.83	Coll-9	Coll-32	Coll-38
<i>C. trifolii</i>	Coll-4	+	+	+	-	-	-
	C-86-2	+	+	+	-	-	-
	CBS158.83	+	+	+	-	-	-
<i>C. destructivum</i>	Coll-3	-	-	-	-	-	-
	Coll-8	-	-	-	-	-	-
	Coll-10	-	-	-	-	-	-
	Coll-11	-	-	-	-	-	-
	Coll-AŠ	-	-	-	-	-	-
	Coll-9	-	-	-	+	+	+
	Coll-32	-	-	-	+	+	+
	Coll-38	-	-	-	+	+	+
	Coll-48	-	-	-	-	-	-
	Coll-68	-	-	-	-	-	-
	Coll-75	-	-	-	-	-	-
	Coll-18	-	-	-	-	-	-
	Coll-29	-	-	-	-	-	-
	Coll-35	-	-	-	-	-	-
	Coll-37	-	-	-	-	-	-
Coll-BK	-	-	-	-	-	-	
CC657	-	-	-	-	-	-	
<i>Colletotrichum</i> sp.	Coll-44	-	-	-	-	-	-

*rezultati testova uparivanja: pozitivna reakcija označena je simbolom ''+''' a negativna simbolom ''-''

Tabela 27. VCG grupa E, F i G proučanih izolata poreklom sa lucerke u Srbiji

Vrsta	Nit	E	F	G
		Coll-68	Coll-75	Coll-44
<i>C. trifolii</i>	Coll-4	-	-	-
	C-86-2	-	-	-
	CBS158.83	-	-	-
<i>C. destructivum</i>	Coll-3	-	-	-
	Coll-8	-	-	-
	Coll-10	-	-	-
	Coll-11	-	-	-
	Coll-AŠ	-	-	-
	Coll-9	-	-	-
	Coll-32	-	-	-
	Coll-38	-	-	-
	Coll-48	-	-	-
	Coll-68	+	-	-
	Coll-75	-	+	-
	Coll-18	-	-	-
	Coll-29	-	-	-
	Coll-35	-	-	-
	Coll-37	-	-	-
Coll-BK	-	-	-	
CC657	-	-	-	
<i>Colletotrichum</i> sp.	Coll-44	-	-	+

*rezultati testova uparivanja: pozitivna reakcija označena je simbolom ”+” a negativna simbolom ”-“

5.9. Ocena nivoa otpornosti različitih genotipova lucerke prema testiranim izolatima *Colletotrichum* spp.

Za ispitivanje osetljivosti različitih genotipova lucerke prema pojedinim vrstama iz roda *Colletotrichum* u uslovima staklenika, odabrano je 8 izolata iz sve tri morfološke grupe: I morfološka grupa Coll-4 (*C. trifolii*), II morfološka grupa Coll-3, Coll-8; Coll-9, Coll-10, Coll-18 i Coll-75 (*C. destructivum*) i III morfološka grupa Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) poreklom iz Srbije. U ova istraživanja uključena su i dva referentna izolata C-86-2 (*C. trifolii*) i CC657 (*C. destructivum*). Svi izolati prethodno su okarakterisani na morfološkom i molekularnom nivou, kao i metodom vegetativne kompatibilnosti. Za testiranje odabrano je 10 sorti lucerke različitog porekla i to: K-1, K-28, Zaječarska 83, Osječka 12, NS Slavija, Banja Luka, Affinity 401 + Z (HR-visoko otporna na antraknozu), Florida 77 (MR srednje otporna), Vernal S (S osetljiva) i Perry (LR neotporna).

Izolati iz sve tri morfološke grupe su na stabljikama biljaka lucerke izazvali tipične simptome antraknoze. Posle 15 dana od inokulacije na testiranim biljkama javile su se pre svega nekrotične lezije na stablu i lagano povijanje vrha gornje trećine stabla. Nekrotične lezije širile su se dalje na celu biljku i kod pojedinih biljaka dovele do potpunog sušenja i propadanja biljaka. Ocena intenziteta razvoja bolesti vršena je na osnovu skale od 0-5. Reakcija ispitivanih genotipova lucerke kao i ocenjeni nivo razvoja oboljenja nakon inokulacije svim odabranim izolatima *Colletotrichum* spp. prikazani su u tabeli 28.

Dobijeni rezultati obrađeni su analizom varijanse, kao dvofaktorijalni ogled, gde je prvi faktor sorta, a drugi izabrani izolati. Primenom dvofaktorijalne analize varijanse (ANOVA) za značajnost utvrđenih razlika između sorti, dobijena je *p* vrednost od 0.057, koja je veća od 0.05, što znači da te razlike nisu statistički značajne (tabela 29).

Tabela 28. Prosečna ocena reakcije različitih genotipova lucerke na inokulaciju izolatima *Colletotrichum* spp.

Genotipovi	<i>C. trifolii</i>		<i>C. destructivum</i>							<i>Colletotric.</i>	K
	Coll-4	C-86-2	Coll-3	Coll-8	Coll-9	Coll-10	Coll-18	Coll-75	CC657	Coll-44	
K-1	3.90	3.70	3.70	3.70	3.50	3.60	2.80	3.30	3.40	3.30	0.00
K-28	4.70	2.30	4.10	2.90	3.50	2.40	2.90	3.70	2.80	3.10	0.00
Zaječarska 83	3.30	3.60	2.50	3.20	3.50	2.80	2.50	3.30	4.10	2.60	0.00
Osječka 12	4.30	3.90	2.70	4.50	3.60	3.10	2.20	4.20	3.90	2.60	0.00
NS Slavija	3.90	2.40	2.40	3.40	2.40	4.20	3.60	3.60	2.70	3.50	0.00
Banja luka	3.20	2.30	4.00	2.40	3.10	3.00	2.40	3.70	2.90	3.50	0.00
Affinity 401 + Z	2.40	3.60	2.20	3.70	3.70	4.00	2.80	2.40	2.70	3.90	0.00
Florida 77	2.50	2.40	2.40	4.00	3.30	3.80	3.20	3.90	2.30	3.50	0.00
Vernal S	2.70	2.00	2.50	3.60	3.10	3.80	2.90	3.00	2.30	3.40	0.00
Perry	3.60	2.70	3.00	3.10	3.70	3.80	3.00	3.30	3.40	3.30	0.00
Prosek	3.45	2.89	2.95	3.45	2.97	3.07	2.83	3.44	3.05	3.27	0.00

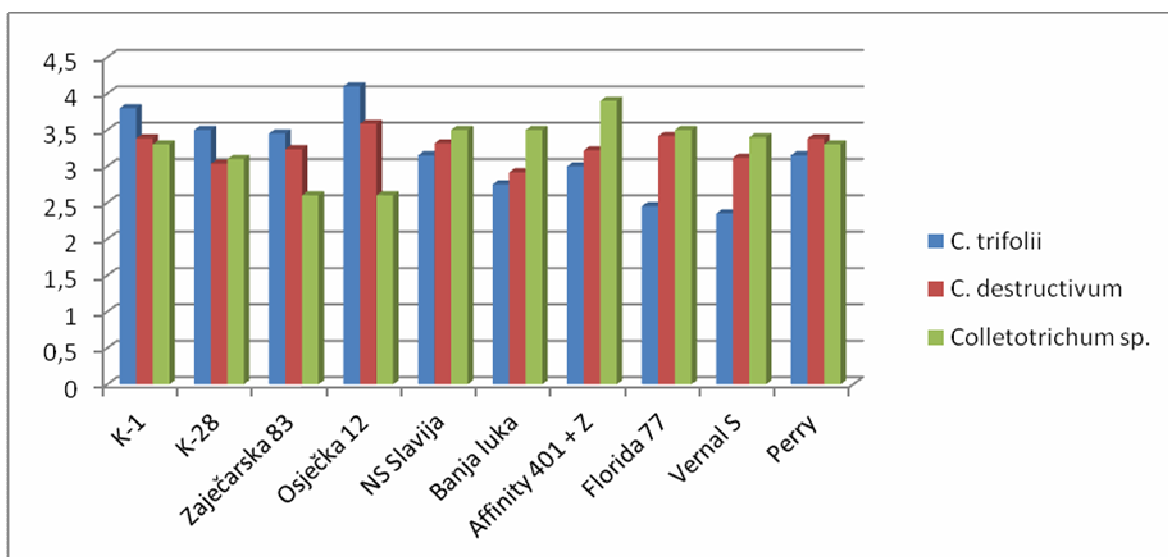
Tabela 29. Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse ocene različitih genotipova lucerke u uslovima veštačke inokulacije ispitivanim izolatima *Colletotrichum* spp.

Izvor varijacije	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Varijanse	F količnik	<i>p</i> vrednosti
Genotip	28.645	9	3.183	1.841	0.057
Izolat	60.125	9	6.681	3.865	0.000
Genotop x Izolat	282.305	81	3.485	2.016	0.000
Greška	1555.700	900	1.729		
Ukupno	1926.775	999			

Kod značajnosti razlika prosečnih ocena za izolate, p vrednost je 0,000 i manja je od 0,01. Ovakva p vrednost ukazuje na značajnost razlike između prosečnih ocena pojedinih izolata. Ono što je bitno uočiti je da je p vrednost za interakciju sorte i izolata manja od 0,01 (tabela 29), što znači se izolati ne ponašaju isto po pojedinim sortama, a isto tako se sorte ne ponašaju na isti način po pojedinim izolatima.

Tabela 30. Prosečna ocena reakcije različitih genotipova lucerke na inokulaciju tri ispitivane vrste *Colletotrichum* spp.

Genotipovi	Vrste		
	<i>C. trifolii</i>	<i>C. destructivum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
K-1	3.8	3.4	3.3
K-28	3.5	3.0	3.1
Zaječarska 83	3.5	3.2	2.6
Osječka 12	4.1	3.6	2.6
NS Slavija	3.2	3.3	3.5
Banja luka	2.8	2.9	3.5
Affinity 401 + Z	3.0	3.2	3.9
Florida 77	2.5	3.4	3.5
Vernal S	2.4	3.1	3.4
Perry	3.2	3.4	3.3
Prosek	3.2	3.3	3.3



Grafik 1. Ocena patogenosti izolata *Colletotrichum* spp. prema različitim genotipovima lucerke

Na osnovu osetljivosti ispitivanih sorti prema izolatima I morfološke grupe okarakterisanih kao *C. trifolii* (Coll-4 i referentni izolat C-86-2 rsa 1) sorte Florida 77,

Vernal S i Banja Luka, su pokazale otpornost na izolate ove morfološke grupe, dok su genotipovi K-1, NS Slavija, Osječka 12, Zaječarska 83 i K-28 pokazale veliku osetljivost prema ispitivanim izolatima (tabele 28, 29 i 30).

Zaražene biljke ispoljile su simptome prvenstveno na pojedinačnim stablima u prizemnom delu, u vidu svetlo braon pega sa ivicama tamno braon boje. Kako je bolest napredovala pege su se širile po celom stablu. Vrhovi zaraženih stabala povijali su se na dole karakteristično za antraknozu. Kako je bolest napredovala liske su se sušile i biljke su u potpunosti propadale (slika 38). Dobijeni rezultati ukazuju na veliku varijabilnost u osetljivosti ispitivanih genotipova lucerke prema testiranim izolatima okarakterisanim kao *C. trifolii*. U toku ovih istraživanja utvrđeno je da su domaći genotipovi lucerke K-1, K-28, Zaječarska 83 i NS Slavija pokazali veliku osetljivost prema ispitivanim izolatima. Ipak, sorta Banja Luka pokazala je otpornost prema izolatima vrste *C. trifolii*, što se vidi i po prosečnoj oceni (tabela 30).



Slika 38. *Colletotrichum trifolii*: Reakcija sorte NS Slavija inokulisane izolatom Coll-4

Zabeležene su razlike u osetljivosti ispitivanih sorti lucerke prema izolatima II morfološke grupe okarakterisanih kao *C. destructivum* (Coll-3, Coll-8, Coll-9, Coll-10, Coll-18, Coll-75 i referentni izolat CC657). Reakcija ispitivanih genotipova lucerke na inokulaciju izolatima II morfološke grupe pokazala je razliku između genotipova K-1, K-28, Zaječarska 83, Osječka 12, NS Slavija, Banja Luka, Affinity 401 + Z, Florida 77, Vernal S i Perry. Zaražene biljke ispoljile su tipične simptome za antraknozu. Vrhovi

biljaka su počeli da se povijaju na dole, a sa širenjem infekcije postepeno bi i cele biljke počele da venu i da se suše.



Slika 39. *Colletotrichum destructivum*: Reakcija sorte Banja Luka inokulisane izolatom Coll-3

Ispitivanjem reakcija genotipova lucerke prema testiranim izolatima, utvrđeno je da je sorta Banja Luka (slika 39) pokazala otpornost prema ispitivanim izolatima *C. destructivum*. Ostale domaće sorte K-28, K-1 (Slika 40), NS Slavija i Zaječarska 83 pokazale su veliku osetljivost prema ispitivanim izolatima vrste *C. destructivum* (grafik 1).



Slika 40. *Colletotrichum destructivum*: Reakcija sorte K-1 inokulisane izolatom Coll-18

Američke sorte Affinity 401 + Z, Vernal S, Florida 77 i Perry su prema ispitivanim izolatima *C. destructivum* ispoljile značajnu osetljivost.

Izolat Coll-44 *Colletotrichum* sp. takson identifikovan do nivoa roda predstavnik je III morfološke grupe koji je prouzrokovao značajan intezitet simptoma na biljkama ispitivanih genotipova lucerke. Najniža ocena inteziteta oboljenja je zabeležen na biljkama genotipova Zaječarska 83 i Osječka 12, tako da se oni mogu smatrati otpornim prema ispitivanom izolatu, dok najviša ocena inteziteta oboljenja zabeležena je kod biljka genotipova Affinity 401+Z, Florida 77, Banja Luka i NS Slavija. Treba napomenuti da domaći genotipovi K-28 (slika 41, grafik 1) i K-1 su pokazali osetljivost prema ispitivanom izolatima. Američki genotip Vernal S prema ispitivanom izolatu pokazao se tolerantnim.



Slika 41. *Colletotrichum* sp. Coll-44: Reakcija sorte K-28 inokulisane izolatom Coll-44

6. DISKUSIJA

Lucerka je jedna od najstarijih i ekonomski najvažnijih višegodišnjih krmnih biljaka. Od lucerke se dobija prvoklasna stočna hrana, pogodna za ishranu svih domaćih životinja, posebno preživara. Kao leguminozna biljka, zahvaljujući aktivnostima simbiotskih mikroorganizama (*Rhizobium meliloti*), ona zemljište obogaćuje azotom, utiče na poboljšanje strukture, odnosno fizičkih svojstava, biogenosti i plodnosti zemljišta, što ovoj vrsti daje veliki ekološki značaj (Đukić i sar., 2009). Ona je cenjena krmna kultura zbog svoje raznovrsne primene, koristi se kontinuirano 4-5 godina, dajući godišnje 4-5 otkosa uz prosečan godišnji prinos sena i preko 15 tha^{-1} . U našim prouzvodnim uslovima prosečni prinosi sena lucerke u praksi kreću se od 4 do 6 tha^{-1} . Jedan od razloga za postizanje manjih prinosa, proređivanju useva lucerke, kraćem periodu iskorišćavanja je i neadekvatna borba protiv bolesti (Vučković, 1999). Mnoge bolesti prouzrokuju uginuće biljaka, smanjenje prinosa i kvaliteta lucerke. Prouzrokovači bolesti napadaju pojedine delove ili celu biljku u različitim fenofazama razvića (Vučković, 1999). Antraknoza lucerke je jedna od vrlo važnih bolesti koje smanjuju prinos lucerke (O'Neill et al., 1997; Mackie et al., 2003; Vasić, 2007), izazvana gljivama iz roda *Colletotrichum* spp.. One se u prirodi najčešće nalaze u vidu kompleksa od više vrsta i verovatno kao takve učestvuju u patološkim procesima izazivajući mešane infekcije. Kao najznačajniji prouzrokovači antraknoze lucerke u svetu se navode *C. trifolii* i *C. destructivum*, s tim što se vrsta *C. trifolii* smatra patogenijom (Stuteville and Erwin, 1990; Mackie et al., 2003).

6.1. Simptomi antraknoze na biljkama u polju

Tokom višegodišnjeg pregleda različitih lokaliteta gajenja lucerke i crvene deteline u Srbiji, u periodu od 2005. do 2010. zabeležena je pojava velike učestalosti simptoma antraknoze na stablu i korenu. Prisustvo bolesti doprinosilo je da se usev lucerke proređuje i dovodi do skraćivanja perioda iskorištavanja lucerišta. Biljke u poodmaklim fazama razvoja bolesti u gornjem delu stabla su povijene u vidu kuke, što je tipičan simptom (Stuteville and Erwin, 1990). Kako bolest napreduje, infekcija se širi i sa stabljike prelazi u zonu korenovog vrata i korena.

Micelija parazita prorasta niz stablo i kada se stabljike osuše, nastupa antraknoza krune. Infekcija krune i korena karakteriše se suvom truleži sa promenom boje napadnutog tkiva u plavo-crnu (**Lukezić, 1974**). Infekcija krune može biti sa ili bez stabljičnih lezija. Obolele biljke na ovaj način mogu da propadnu u toku jedne vegetacione sezone ili prilično oslabljene, često podlegnu mrazu u zimskim uslovima (**Henderson and Smith, 1948; O'Rourke and Milliar, 1966; Barnes et al., 1969; O'Rourke, 1976**). Antraknoza uništava biljku ili pravi ozbiljna oštećenja na stabljikama tokom porasta i novim kruničnim pupoljcima lucerke. **Barens et al.** (1969) navode da su slab vigor biljaka u proleće i proređivanje biljaka posledica napada prouzrokovala antraknoze. U regionima sa toplom i umerenom klimom, *C. trifolii* i *C. destructivum* održavaju se u stabljikama i kruni lucerke.

Formiranje konidija i razvoj bolesti pospešeni su toplim i vlažnim vremenom. Glavni načini širenja infekcije su konidije. Topli, vlažni vremenski uslovi u letnjem periodu povoljni su za razvoj bolesti. Prema rezultatima dobijenim tokom ovih istraživanja bitan je sklop samog useva, jer kod lucerišta koja su gušća, intezitet bolesti je jači za razliku od ređih, gde ima manje biljaka. Gusto zbijeni redovi biljaka, koje su prislonjene i dodiruju se smanjuju cirkulaciju vazduha i obezbeđuju povoljne uslove za lako širenje infekcije. U takvim uslovima, kada se biljke dodiruju i inokulum se lakše prenosi sa biljke na biljku kapima kiše. Kako bolest napreduje, infekcija se širi i sa stabljike prelazi u krunu korena i koren. Micelija parazita prorasta niz stablo i kada se stabljike osuše, nastupa antraknoza krune. Takođe, treba napomenuti da osim napred navedenih načina održavanja inokuluma u poljima značajnu ulogu imaju i korovske biljke koje su prirodni domaćini vrste *C. destructivum*. Za vrstu *C. destructivum* značajnu ulogu u širenju infekcije imaju i parazitne cvetnice kao što je vilina kosica (**Latunde-Dada et al., 1997; Latunde-Dada et al., 1999**).

Postojanost konidija *C. trifolii* i *C. destructivum* u žetvenim ostacima i na površini žetvene opreme važan su izvor širenja patogena u narednoj setvi. Inokulum koji se nalazi u polju izvor je sekundarnog širenja u celoj zaraženoj oblasti kao i izvor primarnih infekcija ovom gljivom pri povoljnim vremenskim uslovima. U regionima sa hladnim zimama, konidije *C. trifolii* i *C. destructivum* mogu da opstanu do 100 dana (**Lukezić, 1974**).

6.2. Patogene osobine izolata *Colletotrichum* spp.

Izolacijom iz zaraženih biljaka lucerke u polju ukupno je dobijeno 80 izolata, a za dalja istraživanja je odabrano 18 izolata *Colletotrichum* spp. koji su svrstani u tri morfološke grupe. Infektivnost 18 odabranih izolata *Colletotrichum* spp. proverena je primenom dve metode, koje su se pokazale podjednako uspešne. Svih 18 ispitivanih izolata izazvali su pojavu jakih simptoma antraknoze na inokulisanim klijancima lucerke sorte K-28.

Kod inokulacije klijanaca došlo je do pojave simptoma dva dana nakon inokulacije. Simptomi su se uočavali u vidu nekroze na vrhovima korena kod svih proučavanih izolata. Nekroza se potom uzdužno širila, i kod svih izolata je posle 10 dana u potpunosti zahvatila koren, stabaoce i listove klijanaca. Vreme potrebno za razvoj simptoma odgovara rezultatima provere patogenosti vrsta *C. trifolii*, *C. destructivum* i *C. linicola* koje navode **Graham et al.** (1976); **O'Neill et al.** (1997); **Vasić**, (2007); **Latunde-Dada and Lucas** (2007) i **Frasysinet** (2008). **Graham et al.** (1976) su u svojim istraživanjima dokazali različitu infektivnost četiri *Colletotrichum* vrste (*C. trifolii*, *C. destructivum*, *C. dematium* i *C. truncatum*) ka i različitu otpornost genotipova lucerke u *in vitro* uslovima.

Primenom druge metode provere patogenosti, inokulacijom isečaka korena lucerke, svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp. ispoljili su patogenost u vidu pojave nekrotičnih zona na isečcima korena. Zaraženo tkivo korena ispoljilo je nekrozu smeđe, crvenosmeđe ili tamno smeđe boje. Ovakvi isecci su bili meki sa dezintegrisanim tkivom, sa simptomima vlažne truleži. Na uzdužnom preseku isečaka intenzivnija nekroza zapažena je u centralnom delu tkiva korena. Osam dana od postavljanja isečaka na koloniju, kod svih ispitivanih izolata došlo je do značajne nekroze na korenu. Razvoj simptoma u saglasnosti je sa rezultatima **Krnjaja** (2005). **O'Neill et al.** (1996) su utvrdili da *C. trifolii*, *C. destructivum* i *C. gleosporioides*, ispoljavaju izraženu patogenost za klijance lucerke u *in vitro* uslovima.

Obe metode za inokulaciju korišćene u ovom radu imaju određene prednosti u poređenju sa poljskim ogledima, jer se do rezultata dolazi brže, koristi se uniformna i tačno određena količina inokuluma, što omogućava tačnije poređenje, ponovljivost ogleda i otvara mogućnost da se metode koriste za preliminarno ocenjivanje otpornosti/osetljivosti genotipova lucerke.

6.3. Proučavanje eksperimentalnih domaćina ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

U ispitivanje eksperimentalnog kruga domaćina 10 izolata različitih vrsta iz roda *Colletotrichum* uključeno je ukupno 15 biljnih vrsta iz šest botaničkih familija. Biljne vrste koje su uključene u ova istraživanja odabrane su kao srodne vrste koje se često gaje u zajednici sa lucerkom u mešanim usevima, mogu biti susedni usevi koji se gaje u blizini lucerišta ili su česte korovske vrste prisutne u i oko njiva pod lucerkom. Osetljivost ovih biljaka ukazala bi na njihovu eventualnu ulogu u epidemiologiji vrsta roda *Colletotrichum*, patogena lucerke jer bi se mogle ponašati kao rezervoar inokuluma patogena. Ova istraživanja biće nastavljena, širenjem broja vrsta uključenih u istraživanja, kao i pokušajima detekcije latentnih ili zaraza sa slabijim simptomima.

Odabrani izolati ispoljili su različitu sposobnost da ostvare infekciju na ispitivanim test biljkama, a na biljkama koje su bile zaražene, razvili su se simptomi nekroze i sušenja. Na biljkama je došlo do formiranja, manje-više udubljenih nekrotičnih pega tamno braon do skoro crne boje, oko inokulisanog mesta. Posle 15 dana od inokulacije kod svih osetljivih biljaka došlo je do uginuća čitavih biljaka.

Izolat Coll-4 kao i standard *C. trifolii* CBS 158.83, ispoljili su ujednačeno delovanje na test biljke. Nakon inokulacije, izolati su izazvali pojavu nekrotičnih pega i sušenje svih inokulisanih sejanaca lucerke i crvene deteline, ispoljavajući visoku infektivnost. Oba izolata ispoljila su visoku specijalizaciju zaražavajući sejance lucerke i crvene deteline. Takođe treba napomenuti da izolat Coll-4 je izazvao značajne simptome na biljkama grahorice i graška što ga svrstava u visoko infektivne. Nijedan izolat nije uspeo da zarazi esparzetu, mačiji rep, perko, ježevicu, belu rosulju, soju, pasulj, žuti zvezdan, poponac, lan i papriku. U literaturi za krug domaćina *C. trifolii* navode se podaci da ova vrsta isključivo parazitira lucerku i crvenu detelinu. Jedna grupa autora navodi da je ova vrsta, mada primarni patogen lucerke, u stanju da zarazi i neke druge biljke kao što su boranija, pasulj i tikva (**Baxter et al.**, 1983; **Liu et al.**, 2007). Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima u potpunosti su saglasni sa navodima ovih autora.

Sledeća morfološka grupa izolata identifikovana kao *C. destructivum* Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68, Coll- 75 i standard za *C. destructivum* CC657, takođe

su ispoljili relativnu ujednačenost u pogledu infektivnosti za ispitivane biljke. Oni su izazvali pojavu nekrotičnih pega i izumiranje sejanaca lucerke, crvene deteline, pasulja, graška, soje i žutog zvezdana. Na žutom zvezdanu jedino izolati Coll-9 i Coll-18 nisu izazvali nikakve promene. Na biljkama grahorice izazvali su zarazu manjeg inteziteta. Svih sedam izolata nije uspjelo, u uslovima postavljenog eksperimenta, da zarazi ostale test biljke kao što su: esparzeta, mačiji rep, perko, ježevica, bela rosulja, poponac, lan i paprika. U pogledu kruga domaćina *C. destructivum* brojni autori (**Baxter et al.**, 1983; **Manandahar et al.**, 1986; **Koch et al.**, 1989; **Latunde-Dada et al.**, 1997; **O'Connell et al.**, 2004; **Latunde-Dada and Lucas**, 2007; **Hyde et al.**, 2009a, 2009b) navode da je širok i uključuje leguminoze kao što su *Glycine max*, *Leucaena leucocephala*, *Lotus* spp., *Melilotus albus*, *Phaseolus lathyroides*, *Trifolium* spp., *Vigna unguiculata*, *Coronilla varia*, kao i duvan (*Nicotiana tabacum*), vilinu kosicu (*Cuscuta* spp.) i *Arabidopsis thaliana*. Rezultati dobijeni tokom ovih istraživanja slažu se sa pomenutim navodima.

Treća morfološka grupa, izolat Coll-44 identifikovana do nivoa roda kao *Colletotrichum* sp., ispoljio je značajnu specijalizaciju u pogledu niza domaćina. Ovaj izolat prouzrokovao je pojavu nekrotičnih pega i uginuće svih klijanaca lucerke, crvene deteline, grahorice, poponca i lana. Ovaj izolat nije bio u stanju da zarazi ostale test biljke: esparzetu, mačiji rep, perko, ježevicu, belu rosulju, papriku, žuti zvezdan, pasulj, grašak i soju na taj način ispoljavajući sličnost sa vrstom *C. linicola* **Hyde et al.**, (2009a, 2009b) i **Tunali et al.** (2008) navode da su lan i poponac domaćini vrste *C. linicola*, dok **Latunde-Dada and Lucas** (2007) navode lucerku kao eksperimentalnog domaćina vrste *C. linicola*. Imajući u vidu rezultate morfološke identifikacije i delimične molekularne karakterizacije, ovaj izolat *Colletotrichum* sp. Coll-44 pokazuje veliku sličnost sa *C. linicola* što je dalje potvrđeno specifičnim krugom eksperimentalnih domaćina. Od svih ispitivanih izolata, samo je *Colletotrichum* sp. Coll-44 bio ispoljio značajnu patogenost za lan i poponac što ga je veoma značajno razlikovalo od ostale dve determinisane vrste, *C. trifolii* i *C. destructivum*.

S obzirom na izrazito komplikovan taksonomski status vrsta *C. trifolii*, *C. destructivum* i *C. linicola*, **Jonston** (2000) navodi da nema opštih pravila koja se tiču njihovog odnosa patogena i domaćina, a **Freemen et al.** (1998) naglašavaju da razdvajanje vrsta zasnovan na odnosu prema biljci domaćinu ne mora biti pouzdan

kriterijum, naročito u slučajevima kada su u pitanju polifagne, kosmopolitske i genetski varijabilne vrste. Upravo zbog toga, sa proučavanjima u cilju identifikacije taksona *Colletotrichum* sp. Coll-44 biće nastavljeno.

6.4. Morfološke osobine izolata *Colletotrichum* spp.

6.4.1. Makroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Uporedna morfološka proučavanja obavljena su sa 8 izolata *Colletotrichum* spp. koji su Izolati su svrstani u tri morfološke grupe na osnovu sličnosti sa referentnim sojevima vrsta *C. trifolii* i *C. destructivum*. Prvu grupu čini izolat Coll-4 koje po fenotipskim karakteristikama najbliži referentnom izolatu *C. trifolii* (CBS 158.83). Drugoj grupi pripadaju izolati: Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll-48, Coll-68 i Coll-75, koji su po morfološkim karakteristikama najbliži referentnom soju *C. destructivum* (CC657). Treću morfološku grupu čini izolat Coll-44 koji je po svojim osobinama veoma sličan drugoj grupi, ali istovremeno i specifičan po sporijem porastu na PDA podlozi i identifikovan do nivoa roda kao *Colletotrichum* sp.

Makroskopskim pregledom kolonija izolata iz sve tri morfološke grupe u morfološkim osobinama micelije. Izolat Coll-4 koji je okarakterisan kao *C. trifolii* ima tamno maslinasto zelene kolonije, sporo rastuće na PDA podlozi. Izolati Coll-8, Coll-9, Coll-18, Coll- 48, Coll-68 i Coll-75 okarakterisani su kao *C. destructivum*, na PDA podlozi formiraju kolonije pamučaste, somotasto sive do svetlo maslinasto zelene boje i imaju znatno brži porast u odnosu na prvu grupu izolata. Izolat treće grupe Coll-44 ima svetlo zelenu pamučastu miceliju sa tamno zelenim središtem i ima neznatno sporiji porast u odnosu na drugu grupu izolata.

Rezultati ovih istraživanja slični su sa rezultatima drugih istraživača (**Baxter et al.**, 1983; **Freeman et al.**, 1998; **Trkulja**, 2004; **Peres et al.**, 2005; **Hyde et al.** 2009b) koji se navode za vrste *C. trifolii*, *C. destructivum* i *C. linicola*.

6.4.2. Mikroskopske morfološke odlike ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp.

Svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp. pokazali su sličnost u pogledu formiranja hifa, tako da se ova osobina ne može koristiti kao taksonomski kriterijum za razlikovanje vrsta (**Bailey and Jeger**, 1992; **Baxter et al.**, 1983).

Morfologija plodonosnog tela (konidiomate). Svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp. obrazuju plodonosna tela – acervule. Dimenzije acervula se kreću od 100-280 μm , koje u okviru kolonija mogu biti grupisane u centralnom delu, razbacane ili koncentrično raspoređene. Slične rezultate iznose **Robotić i sar.** (1983a); **Baxter et al.** (1983) i **Vasić** (2007). Konidije proučavanih izolata *C. trifolii*, *C. destructivum* i *C. linicole*, oslobađaju se u vidu guste tečnosti, u obliku kapljice ili ređe, razlivenne želatinozne mase (matriksa) bledoružičaste do narandžaste boje, što se navodi za ove vrste prema podacima **Baxter et al.** (1983), **Robotić i sar.** (1983a); **Milijić i sar.** (1986); **Hu Sun and Jing-Ze Zhang** (2009). Raspored u kulturi, vreme formiranja kao i izgled i veličina acervula variraju, ali nije primećeno postojanje jasnih razlika između vrsta kao ni pojedinih izolata u okviru vrsta tako da se ovaj taksonomski kriterijum ne može koristiti samostalno za razlikovanje vrsta u okviru kompleksa *Colletotrichum* na lucerki.

Morfologija seta. Proučavani izolati *C. trifolii* u okviru konidiomata formiraju sete u kulturi, koje su svetlo do tamnije braon boje, obično prave, glatke ili blago naborane površine, često proširene u osnovi i zašiljene i nešto tamnije na vrhu. Na setama se uočavaju 1–3 septe u proseku 2, a njihove dimenzije iznose 70,44–90 x 4,5–8,5 μm u proseku 89,45 x 5,4 μm .

Svi izolati korišćeni u ovim istraživanjima u konidiomatama formiraju brojne sete, tamno braon boje, nešto su tamnije pri vrhu, septirane 1-3 septe, prave, sa glatkom ili blago naboranom površinom, sa dimenzijama 75-100 x 2,5 μm , u proseku 91,1 x 2,5 μm . Sete su često skrivene u blizini blede narandžaste mase konidija. Slične rezultate navode i **Baxter et al.** (1983); **Boland and Brochu** (1989); **Bailey and Jeger** (1992); **O'Neill et al.** (1997); **Photita et al.** (2005); **Hyde et al.** (2009b) u svojim istraživanjima.

Proučavani izolati *C. destructivum* u okviru konidiomata formiraju sete, koje imaju smeđu boju, nešto su tamnije pri osnovi i svetlije prema vrhu, septirane su, imaju

od 1-7 septi u proseku 3, prave su ili nešto povijene, sa glatkom ili naboranom površinom. Sete *C. destructivum* su nešto duže od seta izolata *C. trifolii*, sa dimenzijama 45-195 x 3,5-11 μm , u proseku 105 x 5,2 μm . Svi proučavani izolati formiraju brojne sete u konidiomati sa dimenzijama 50-150 x 2,5-7,5 μm , u proseku 118,9 x 5,2 μm .

Proučavani izolat *Colletotrichum* sp. Coll-44 u konidiomati formira sete, koje imaju svetlo do tamno braon boju, pri osnovi su nešto tamnije i svetlije pri vrhu, septirane su i imaju 3 septe. Dimenzije seta su 100-185,5 x 2,5-5 μm u proseku 160,9 x 3,12 μm .

Utvrđene razlike između izolata važne su za determinaciju vrsta, pa se koriste kao taksonomski kriterijum. Dobijeni rezultati su slični sa navodima **Baxter et al.** (1983); **Boland and Brochu** (1989); **Bailey and Jeger**, (1992); **O'Neill et al.** (1997); **Photita et al.** (2005); **Latunde-Dada and Lucas** (2007); **Frayssinet** (2008); **Tunali et al.** (2008).

Konidiogene ćelije. Svi proučavani izolati u bazalnom delu konidiomata, obrazuju konidiofore koje su izduženog cilindričnog oblika, prave ili blago povijene hijalne ili svetlosmeđe boje, glatke, proste ili retko razgranate blizu osnove. U kulturi fialidične konidiogene ćelije, osim u konidiomatama, formirale su se i na miceliji kao bočne grane i tada su cilindrične, hijalne do svetlosmeđe i relativno teško su se razlikovale od sterilnih hifa. Nisu uočene razlike između tri morfološke grupe odnosno identifikovane vrste roda *Colletotrichum*. Njihove prosečne dimenzije su 17-25 x 4-4,5 μm , u proseku 21,5 x 4,1 μm , što je u saglasnosti sa navodima **Baxter et al.** (1983).

Morfologija konidija. Morfološkim proučavanjem konidija konstatovane su razlike u obliku i dimenzijama, na osnovu čega je obavljena diferencijacija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. Ovaj taksonomski kriterijum se pokazao kao zadovoljavajući za razlikovanje vrsta.

Konidije izolata prve morfološke grupe identifikovane kao *C. trifolii* su cilindrične, zaobljene na oba kraja, dimenzija 7,5-17,5 x 5-7,5 μm u proseku 10,125 x 5,55 μm . Oblik i dimenzije opisanog izolata odgovaraju vrsti *C. trifolii*, opisane od strane različitih autora na lucerki (**Kuprevič**, 1954; **Tiffany and Gilman**, 1954; **Laviolle**, 1963; **Schietinger**, 1970; **Baxter et al.**, 1983; **Robotić i sar.**, 1983a; **Milijić i sar.**, 1986; **Boland and Brochu**, 1989; **Koch et al.**, 1989; **Stutveille and Erwin**, 1990; **O'Neill**, 1996; **O'Neill et al.**, 1997 i **Vasić**, 2007).

Izolati svrstani u drugu morfološku grupu identifikovani kao *C. destructivum* formirali su konidije koje su cilindrične, sužene na jednom kraju i zaobljene na drugom kraju, dimenzija, 10-25 x 2,5-7,5 µm u proseku 18,78 x 3,37 µm. Dobijeni rezultati su slični sa navodima drugih autora **Baxter et al.** (1983) poreklom iz crvene deteline; **Hu Sun and Jing-Ze Zhang** (2009) poreklom iz vigne; i **Boland and Brochu** (1989); **Koch et al.** (1989); **O'Neill** (1996); **Latunde-Dada et al.** (1997); **Latunde-Dada and Lucas** (2007); **Frayssinet** (2008) poreklom iz lucerke.

Treću morfološku grupu čini izolat Coll-44 identifikovan do nivoa roda *Colletotrichum* sp. sa cilindričnim, suženim na jednom kraju i zaobljenim na drugom kraju konidijama, čije su dimenzije 12,5-25 x 2,5-7,5 µm u proseku 19,83 x 4,42 µm. Oblik i dimenzije konidija poklapaju se sa navodima opisanim za *C. linicola* od strane različitih autora **Latunde-Dada and Lucas** (2007) izolat iz lan i **Tunali et al.** (2008) izolat iz poponaca.

Dužina konidija, kao zaseban morfološki kriterijum, delimično je grupisao ispitivane izolate. Tako su se na osnovu dužine konidija, jasno izdvojili izolati iz prve morfološke grupe, identifikovanih kao *C. trifolii*. Kod druge morfološke grupe, *C. destructivum* izolati su svrstani u dve homogene grupe. Treća morfološka grupa *Colletotrichum* sp. Coll-44 ne razlikuje se jasno na osnovu dužine konidija od druge morfološke grupe.

Pojedini izolati statistički su se značajno razlikovali od ostalih, ali nije bilo zakonitosti koja je u saglasnosti sa ostalim taksonomskim kriterijumima. Slične rezultate navode **Baxter et al.** (1983); **O'Neill** (1996) i **Latunde-Dada and Lucas** (2007). Ovi autori navode da morfološki kriterijum dužine konidija nije dovoljan za razlikovanje vrsta sa sličnim dimenzijama kao što su *C. destructivum* i *C. linicola*.

Rezultatima merenja širina konidija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. utvrđeno je da između izolata postoje statistički značajne razlike. Kod izolata sve tri posmatrane morfološke grupe, nije moguće koristiti širinu kao zaseban kriterijum, jer uočena značajnost statističkih razlika ne odgovara u potpunosti grupisanju korišćenjem svih ostalih morfoloških i drugih kriterijuma.

Odnos dužina/širina konidija kao zaseban morfološki kriterijum, takođe je na nedovoljno zadovoljavajući način grupisao ispitivane izolate. Prva morfološka grupa izolata koja je identifikovana kao *C. trifolii*, uspešno je razlikovana od grupe *C.*

destructivum. Izolati, druge morfološke grupe, koji po ostalim karakteristikama odgovaraju vrsti *C. destructivum*, parnim poređenjem grupisani su u četiri homogene grupe. Kod izolata treće morfološke grupe nema statistički značajnih razlika u odnosu na izolate druge morfološke grupe. Tako da kod izolata druge i treće morfološke grupe, nije moguće koristiti odnos dužina/širina konidija kao zaseban kriterijum za razlikovanje vrsta, naročito ne blisko srodnih kao što su na primer *C. destructivum* i *C. linicola*.

Način klijanja konidija. Pri klijanju konidija izolata I morfološke grupe identifikovane kao *C. trifolii*, dolazi do određenih promene. U početku dolazi do bubrenja, konidije postaju prozračnije, dok se u ekvatorijalnom delu konidije ne formira septa, što je značajna morfološka karakteristika ove vrste. Prema **O`Connell et al.** (1992), konidije vrsta *C. orbiculare*, *C. malvacearum*, *C. trifolii*, *C. lindemuthianum* ne formiraju septu prilikom klijanja, što može biti jedan od pokazatelja prilikom određivanja njihove taksonomske pripadnosti.

U ovim istraživanjima je utvrđeno da kod izolata II morfološke grupe identifikovane kao *C. destructivum* prilikom klijanja konidija u ekvatorijalnom delu formira se septa, što je značajna karakteristika ove vrste. Takođe, kao kod izolata III morfološke grupe Coll-44 okarakterisnog do nivoa roda *Colletotrichum* sp. prilikom klijanja konidija dolazi do formiranja ekvatorijalne septe. **Latunde-Dada and Lucas** (2007) i **Shen et al.** (2001) navode da vrste *C. destructivum* i *C. linicola* formiraju septu prilikom klijanja konidija. Prema tome tip konidija i formiranje ekvatorijalne septe tokom klijanja konidija uspešno razlikuje *C. trifolii* od ostale dve vrste iz kompleksa *Colletotrichum* na lucerki u Srbiji. Ovaj taksonomski kriterijum nije uspeo da razlikuje blisko srodne *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp. Coll-44.

Pri klijanju, konidije proučavanih izolata *C. trifolii*, *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp. izolat Coll-44 formiraju inicijalne hife, apesorije i sekundarne konidije. Konidije kličaju uglavnom obrazujući jednu ili dve, a ponekad i do četiri inicijalne hife. Do klijanja dolazi obično na jednom ili oba vrha konidije (temeno klijanje), a veoma često hife prolaze i iz neposredne blizine vrha konidije (temeno-bočno klijanje). Bočno klijanje je uočeno samo u slučajevima kada se formira više od dve inicijalne hife, kako je konstatovao i **Stojanović** (1997). Isti autor napominje da je, po pravilu, dužina inicijalnih hifa manja ukoliko se obrazuje više od jedne hife na

konidiji. Na vrhovima iskljalih inicijalnih hifa ili njihovih ogranaka često se formiraju apesorije ili sekundarne konidije.

O`Connell et al. (1992) napominju da mnoge vrste roda *Colletotrichum* obrazuju jednu ili više inicijalnih hifa i apesorija prilikom klijanja u destilovanoj vodi na različitim veštačkim podlogama kao što je staklo, nitrocelulozna membrana, polistiren i dr. Prema ovom autoru, na ovaj način formirane hife i apesorije su identične onima koje se formiraju u toku infektivnog procesa *in vivo*, na biljci domaćinu.

Na vrhovima inicijalnih hifa ili njihovih ogranaka obično se formiraju sekundarne konidije ili apesorije. Sekundarne konidije su slične primarnim konidijama, ali su nešto tanjih zidova i manjih dimenzija. Obrazuju se direktno na konidijama ili na krajevima inicijalnih hifa. Ukoliko se obrazuju direktno na konidijama, sekundarne konidije su locirane uglavnom na temenima majčinskih konidija, a u izuzetnim slučajevima ustanovljeno je i njihovo bočno obrazovanje. U slučaju brojnog formiranja sekundarnih konidija, dužina iskljalih inicijalnih hifa je manja nego u slučaju da konidija klija samo putem inicijalnih hifa. Slično rezultatima **Stojanovića** (1997), ustanovljeno je da sekundarne konidije retko kličaju dok su na materinskoj konidiji, a kada se odvoje kličaju uglavnom formirajući jednu inicijalnu hifu. U retkim slučajevima uočena je pojava anastomoze kličajućih konidija koje su se nalazile u neposrednoj blizini, kao i anastomoza inicijalnih hifa.

Morfologija apesorije. Fitopatogene gljive iz roda *Colletotrichum* spp. poseduju osobinu da formiraju organe za prijanjanje, kada infektivna hifa dođe u dodir sa tvrdom površinom. Smatra se da ovi organi prvenstveno služe da pričvrste parazita za površinu domaćina u početnim stadijumima infekcije (**Bailey and Jeger**, 1992; **Baxter et al.**, 1983).

Još je **Dey**, 1933 godine (loc. cit **Trkulja**, 2004) utvrdio da je formiranje apesorija kod vrsta *Colletotrichum* na krajevima hifa koje su rasle u vodi, reakcija na mehanički stimulans, koji nastaje usled njihovog dodira sa čvrstom površinom, koja je preprečila njihov vršni porast. Pri sličnom stimulanu apesorije nastaju i na onim hifama koje su ranije aktivno proizvodile konidije (**Trkulja**, 2004). Apesorije se formiraju pri klijanju konidija, direktno na konidiji ili na kraćoj ili dužoj inicijalnoj hifi. Najčešće se na jednoj konidiji obrazuje jedna, a ređe dve ili tri apesorije. One nastaju tako što se vrh hife, sprečen tvrdom površinom u porastu, proširi i nabrekne. Kasnije se,

obično pri njihovoj osnovi, pojavljuje inicijalna hifa u koju prelazi sadržaj apresorije i koja osigurava dalji razvoj micelije. Nastale apresorije u početku su svetlo smeđe ili hijalinske, ali vremenom se u njima formiraju uljane globule, spoljni zidovi zadebljavaju, posle čega dobijaju mrku boju. Prema **Bailey and Jeger** (1992), pri sazrevanju apresorija dolazi do razvoja debelog višeslojnog ćelijskog zida, kao i sekrecije tankog sloja ekstracelularne, sluzave mase i formiranja pore u ventralnom zidu apresorije koji je u kontaktu sa supstratom. Tamna boja apresorije prema ovim autorima potiče od melanina, koji ne samo da ih štiti od štetnog zračenja, već ima presudnu ulogu u procesu penetracije. Smatra se da je uloga sluzave mase da štiti apresoriju od ekstremno visokih ili niskih temperatura ili isušivanja, kao i u procesu prijanjanja gljive za površinu biljke domaćina. **O`Connell et al.** (1992) utvrdili su da na tvrdoj površini kao što je staklo, apresorija klija uskom končastom hifom koja ne odgovara velikim globularnim infektivnim vezikulama koje gljiva obrazuje u toku prodiranja u tkivo domaćina. Takođe je tokom ovih istraživanja utvrđeno da svi proučavani izolati iz lucerke i crvene deteline formiraju apresorije. Izolati I morfološke grupe identifikovani kao *C. trifolii* formiraju apresorije dimenzija 17,4-12,9 x 7,5-5 µm, u proseku 15,21 x 6,25 µm, slično tome, izolati II morfološke grupe identifikovani kao *C. destructivum* formiraju brojne apresorije, dimenzija 18,75-13,25 x 9,61-5,7 µm u proseku 12,94 x 6,35 µm. Izolat iz III morfološke grupe identifikovan do nivoa roda kao *Colletotrichum* sp. izolat Coll-44 u kulturi formira apresorije, dimenzija 17,5-5 x 7,5-2,5 µm, u proseku 11,8 x 5,9 µm.

Na osnovu sprovedenih istraživanja konstantovano je da se apresorije, između proučavanih vrsta, veoma razlikuju. Izolati *C. trifolii* formiraju apresorije koje su sferičnog i glavičastog oblika, dok izolati *C. destructivum* obrazuju apresorije izduženog i nepravilnog oblika. Izolat Coll-44 *Colletotrichum* sp. obrazuje apresorije izduženog i jajolikog oblika. Formirane apresorije između vrsta razlikuju se po dimenzijama i obliku, tako da su bitan taksonomski kriterijum. Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima podudaraju se sa rezultatima **Baxter et al.** (1983); **Vasić** (2007); **Latunde-Dada and Lucas** (2007); **Frayssinet** (2008) i **Tunali et al.** (2008).

6.4.3. Formiranje teleomorfog stadijuma

Svi proučavani izolati *Colletotrichum* spp., poreklom iz Srbije, kao i kontrolni izolati CC657 i CBS 158.83, poreklom iz Holandije, nisu formirali peritecije, ni u kulturi (u uslovima postavljenog eksperimenta), niti na veštački inokulisanim biljkama lucerke. Ovi rezultati se poklapaju sa navodima **Baxter et al.** (1983), koji takođe nisu uspeli da izazovu formiranje teleomorfog stadijuma.

Tradicionalni načini determinacije vrsta iz roda *Colletotrichum*, na osnovu morfologije, izgleda kultura, patologije, kruga domaćina nepouzdati su, jer ne postoje standardi po kojima se te osobine ispituju (**Cai et al.**, 2009). Potrebna je uniformnost protokola za gajenje vrsta iz roda *Colletotrichum*.

Morfološka karakterizacija ispitivanih izolata *Colletotrichum* spp. patogenih za lucerku u Srbiji je uslovna identifikacija do nivoa vrste i pokazala se kao pouzdana. Dobijeni rezultati dalje su potvrđeni molekularnom identifikacijom i karakterizacijom ispitivanih izolata.

6.5. Molekularna detekcija i identifikacija prouzrokovala antraknoze na lucerki

Molekularne metode kao savremen pristup u identifikaciji biljnih patogena imaju veliku prednost u primeni za preciznu identifikaciju, karakterizaciju, utvrđivanje strukture populacije, određivanje puteva introdukcije i drugih brojnih aspekata fitopatologije i molekularne epidemiologije različitih patogena. Zbog visoke osetljivosti i specifičnosti, ove metode predstavljaju značajno poboljšanje u dijagnostici oboljenja koje prouzrokuju fitopatogene gljive. PCR tehnika primenjena je u ovim istraživanjima u cilju molekularne detekcije kompleksa gljiva prouzrokovala antraknoze na lucerki i potvrde identifikacije obavljene na osnovu njihovih morfoloških osobina i testova patogenosti, kao i u cilju ispitivanja pogodnosti različitih parova prajmera za identifikaciju i karakterizaciju izolata ekonomski najvažnih vrsta roda *Colletotrichum* lucerke poreklom iz Srbije. Pored toga, značajan doprinos molekularnih metoda ogleda se u bržoj i lakšoj identifikaciji i razlikovanju srodnih i morfološki sličnih vrsta i izolata koje je teško razlikovati na drugi način.

Zbog svoje jednostavnosti i pouzdanosti PCR metoda postala je jedna od najčešće korišćenih metoda u detekciji fitopatogenih gljiva. Molekularna detekcija

odabranih izolata *Colletotrichum* spp., obavljena je izolacijom ukupne DNK primenom CTAB protokola po **Day and Shattock** (1997). Ekstrahovana DNK bila je intaktna i pogodna za dalje uspešno umnožavanje u PCR reakciji, omogućavajući uspešnu detekciju i identifikaciju svih izolata odabranih za rad.

Primenom različitih parova prajmera u izvođenju PCR detekcije i identifikacije ustanovljena je razlika u specifičnosti i pogodnosti detekcije sekvenci tri različita dela genoma, ITS regiona, introna gena za GS i introna gena GPHD. Univerzalni par prajmera ITS1/ITS4 koji amplifikuje ITS region svih Eucariota, pokazao se pogodnim za proveru uspešnosti ekstrakcije DNK, a takođe i za korišćenje u okviru protokola za identifikaciju sekvencioniranjem dobijenih produkata vrsta roda *Colletotrichum*.

Mills et al. (1994) i **Sreenivasaprasad et al.** (1996) prvi put koriste DNA sekvence za utvrđivanje razlika između vrsta u okviru roda *Colletotrichum*. Što su na osnovu ITS regiona rDNK ustanovljene razlike između šest vrsta roda *Colletotrichum*. Tako **Sherriff et al.** (1994) sprovode analizu, koristeći bootstrap NJ stablo za analizu vrsta *Colletotrichum*, pomoću ITS2 i LSU sekvenci za 27 izolata, 13 rodova *Colletotrichum*. **Sreenivasaprasad et al.** (1996) sprovode filogenetsku analizu roda *Colletotrichum* koristeći parsimon analizu sekvence regiona ITS1 i ITS2 za 18 vrsta *Colletotrichum* roda. Broj radova koji koriste molekularne metoda za proučavanje srodnosti u okviru roda *Colletotrichum* značajno raste od devedesetih godina prošlog veka. Najveći broj ovih radova fokusiran je na male grupe u okviru roda, obično koje su u zajednici na određenom usevu.

Johnston and Jones (1997) koriste analizu sekvenci LSU rDNK izolata koji potiču sa različitih useva iz Novog Zelanda. **Moriwaki et al.** (2002) uspešno razlikuju 236 izolata proučavajući ITS-2/LUS rDNK vrsta roda *Colletotrichum* u Japanu, koristeći rDNA ITS1 region sekvencioniranjem produkata veličine od oko 157-190 bp. **Freeman et al.** (2000a) uspešno su razlikovali 230 izolata različitih *Colletotrichum* vrsta primenom univerzalnih prajmera ITS1/ITS4 sekvencioniranjem produkata veličine oko 450-490 bp svih ispitivanih izolata.

Liu et al. (2007) navode da se korišćenje regiona introna gena za glutamin sintetazu (GS) od oko 900 bp pokazalo uspešnim za identifikaciju i karakterizaciju blisko povezanih vrsta u okviru roda *Colletotrichum*, koje je ranije bilo teško razlikovati na osnovu morfoloških osobina. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije pokazala

su da je region introna gena za GS pogodan za identifikaciju i filogenetsku analizu izolata predstavnika sve tri morfološke grupe: I morfološka grupa identifikovan kao *C. trifolii*, II morfološka grupa identifikovan kao *C. destructivum* i III morfološka grupa identifikovana kao *Colletotrichum* sp. Coll-44. Detekcija i identifikacija ispitivanih izolata obavljena je i primenom prajmera GDF1/GDR1 koji omogućavaju amplifikaciju drugog genskog segmenta region introna gena za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GPHD). Primenom ovih prajmera prisustvo fragmenta veličine oko 200 bp ustanovljeno je kod svih predstavnika sve tri morfološke grupe ispitivanih izolata. Prvu multilokus filogenetsku analizu za rod *Colletotrichum* sopsstavaju **Talhinhas et al.** (2002), proučavajući *C. acutatum* zajednicu na lupini (*Lupinus*), koristeći ITS, TUB2 i HIS4 sekvence. **Guerber et al.** (2003) koriste regione introna gena za GPHD i GS nukleotidne sekvence za analizu grupe *C. acutatum*.

Multilokus analiza postaje standard za detekciju i identifikaciju sekvenci, pomoću sekvenci gena actin (ACT), calmodulin (CAL), chitin synthase (CHS-1), DNA lyase (APN2), manganese superoxide dismutase (SOD2), velike podjedinice polimeraze RNA (RPB1) i gena za translacioni faktor izduživanja 1- α (EF1 α) (**Hyde et al.**, 2009a, 2009b; **Prihastuti et al.**, 2009; **Damm et al.**, 2009; **Cai et al.**, 2009).

Molekularna detekcija, sekvencioniranje i filogenetska analiza DNK sekvenci odgovarajućih delova genoma pružile su mogućnost da se preciznije proučava razdvajanje vrsta roda *Colletotrichum*, da se identifikuju nepoznati izolati i da se ustanove međuodnosi između pojedinih vrsta (**Cannon et al.**, 2012).

Kako populacija *Colletotrichum* spp. iz stabla lucerke poreklom iz Srbije do sada nije ispitivana na molekularnom nivou, nije poznata njihova genetička struktura, kao ni variranje srpskih izolata u odnosu na izolate *Colletotrichum* spp. poreklom iz Evrope i drugih delova sveta. Molekularna ispitivanja, osim detekcije bila su usmerena i na njihovu identifikaciju i karakterizaciju. Dobijeni rezultati predstavljaju prvu detaljnu karakterizaciju u Srbiji. Višestrukim poređenjem sekvenci odgovarajućih delova rDNK, kao i dva gena (intron GS gena i intron GPHD gena) sa dostupnim sekvencama odgovarajućih regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti, obavljena je potvrda morfološke identifikacije svih odabranih izolata poreklom sa lucerke. Izolat iz III morfološke grupe, kod koga je sekvencioniran samo ITS region rDNK nije mogao pouzdano biti identifikovan do nivoa vrste, zbog čega se u ovom radu

označava sa *Colletotrichum* sp. izolat Coll-44. Ovaj takson prisutan na lucerki u Srbiji, nedvosmisleno je ispoljio patogenost kao i morfološke osobine različite od ostale dve vrste detektovane na lucerki tokom istraživanja. Zbog značaja ovog izolata kao treće vrste roda *Colletotrichum* potogene za lucerku sa identifikacijom će biti nastavljeno sekvencioniranjem introna gena GS kao regiona koji se uspešno primenjuje za razlikovanje vrsta ovog roda. Prema tome, analizom nukleotidnih sekvenci različitih delova genoma utvrđeno je da odabrani izolati pripadaju vrstama *C. trifolii*, *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp. Coll-44.

Molekularna identifikacija odabranih izolata obavljena BLAST analizom sekvenci produkata sva tri gena pojedinačno, pokazala je visok stepen nukleotidne identičnosti sa sekvencama odgovarajućih izolata *C. trifolii* i *C. destructivum* dostupnim u GenBank bazi podataka.

Genetička sličnost izolata Coll-4, koji je prethodno okarakterisan na morfološkom nivou kao predstavnik morfološke grupe I, sa ostalim izolatima *C. trifolii* poreklom iz SAD, ispitivana je analizom sekvenci dva različita dela genoma koji su se pokazali značajnim za karakterizaciju *C. trifolii*. Homologija sekvenci GS gena kretala se od 99-100%. Proračunom genetičke sličnosti izolata Coll-4 pokazao je stepen nukleotidne identičnosti od 100% sa sekvencom izolata 14-2-63 (DQ792877) poreklom iz SAD, dobijen iz lucerke. Na osnovu analize sekvenci regionu introna gena za GPHD ispoljena je visoka homologija u okviru vrste. Sličnost od 100% ispitivani izolat ispoljio je sa izolatima *C. trifolii* iz SAD 14-2-63, ON7 i ON12.

Genetička sličnost između izolata Coll-9, Coll-10, Coll-18, Coll-29, Coll-32, Coll-48, Coll-68, Coll-75, Coll-Aš i CC657, predstavnika druge morfološke grupe sa ostalim izolatima *C. destructivum* poreklom iz različitih delova sveta, ispitivana je analizom sekvenci različitih delova genoma. Na osnovu sekvence ITS regiona izolati Coll-48, Coll-68, Coll-75 i CC657 ne pokazuju homologiju sa sekvencama izolata *C. destructivum* iz GenBank baze podataka. Iako ITS regionu mogu biti potencijalno informativni regionu za filogenetsku analizu na nivou vrsta, u ovim istraživanjima nisu bili dovoljno informativni da reše odnose između vrste *C. destructivum* i njenih morfološki sličnih vrsta. **Moriwaki et al.** (2002) konstatuju da vrsta *C. destructivum* nije jasno odvojena od srodnih vrsta *C. higginsianum*, *C. linicola* i *C. fuscum* na osnovu sekvence ITS regiona. Isto tako **Kyung et al.** (2011) na osnovu filogenetske analize

zasnovane na sekvencama ITS regiona rDNK, opisuju da se *C. destructivum* jasno ne razlikuje od srodnih vrsta *C. higginsianum* i *C. panacicola*. Tako da možemo konstatovati da u slučaju vrsta roda *Colletotrichum*, ovaj deo genoma nije pogodan za identifikaciju niti može da ukaže na njihove filogenetske međuodnose.

Međutim, kod drugih rodova gljiva kao što su *Fusarium* i *Alternaria* ITS region može se pouzdano koristiti za razlikovanje njihovih predstavnika (**Kyung et al.**, 2011). ITS region je visoko varijabilan između morfološki različitih vrsta gljiva nekih rodova, a sa druge strane konzervativan na nivou vrste. **Mirhendi et al.** (2010) navode da su uspešno razlikovali 16 *Fusarium* vrsta primenom ITS regiona rDNK. Isto tako **Mmbaga et al.** (2011) navode da korišćenjem ITS regiona uspešno identifikuju izolate *Alternaria alternata* poreklom iz jorgovana. Identifikacija je obavljena na osnovu poređenja njihovih sekvenci sa sekvencama izolata *A. alternata* iz različitih delova sveta iz GenBank baze podataka i njihova homologija bila je 100%.

Na osnovu analize sekvenci introna gena za GPHD ispitivani izolati II morfološke grupe Coll-10, Coll-29, Coll-32, Coll-48, Coll-68 i Coll-75 pokazali su izraženu uniformnost, pri čemu svi izolati imaju 99,4% nukleotidne sličnosti sa izolatom vrste *C. destructivum* C08077 (GU935854) poreklom iz Koreje.

Genetička sličnost jednog izolata III morfološke grupe identifikovanog kao *Colletotrichum* sp. (Coll-44) sa izolatima iz roda *Colletotrichum* ispitivana je analizom sekvenci dva različita dela genoma. Na osnovu sekvenci ITS regiona ispitivani izolat pokazuje 91,3 do 100% nukleotidne identičnosti sa izolatima različitih vrsta roda *Colletotrichum*.

Najviši nivo homologije od 100 % ispitivani izolat Coll-44 pokazao je sa jednom sekvencom izolata CBS 172. 51 identifikovane kao *C. linicola* (JQ005765) poreklom iz Holandije. Ispitivani izolat pokazuje nukleotidnu identičnost od 98,9% sa izolatima vrste *C. destructivum* C08077 (GU935874) poreklom iz Koreje i DAOM196849 (EU400156) poreklom iz Kine kao i sa *C. higginsianum* izolatom C00112 (GU935872) poreklom iz Koreje, pokazuje nukleotidnu identičnost od 98,9%. Nukleotidnu identičnost od 98,8% ispitivani izolat je pokazao sa sekvencama izolata *C. destructivum* CBS 149.34 (JQ005764) poreklom iz Holandije.

Na osnovu analize sekvenci regiona introna gena za GPHD ispitivani izolat III morfološke grupe Coll-44 pokazao je 94,3% nukleotidne identičnosti sa jednom

sekvencom vrste *C. destructivum* C08077 (GU935854) poreklom iz Koreje i jednom sekvencom vrste *C. higginsianum* C97027 (GU935850) poreklom iz Koreje, kao i 91,3% identičnosti sa drugim izolatom *C. higginsianum* C00112 (GU935852) poreklom iz Koreje.

Liu et al. (2007) analizirajući sekvence 19 izolata *C. orbiculare*, *C. trifolii*, *C. lindemuthianum* i *C. malvarum*, i poređenjem sekvenci zaključuju da je sličnost između sekvenci proučavanih vrsta, korišćenjem intron GS gena veća od 90%, dok je na osnovu analize regiona introna za gen GPHD od oko 200 bp sličnost među posmatranim vrstama roda *Colletotrichum* veća od 86%. Takođe, zaključuju da su sekvence regiona introna gena za GS od oko 900 bp vrste *C. orbiculare* 99,9% slične sa sekvencama vrste *C. malvarum*. Analizom sekvenci regiona introna gena za GPHD od oko 200 bp obe vrste, zaključuju da je sličost 95%.

6.5.1. Molekularna karakterizacija prouzrokovača antraknoze na lucerki

Filogenetska analiza nukleotidnih sekvenci različitih delova genoma (ITS regiona, regiona introna gena za GS i regiona introna gena za GPHD) potvrdila je svrstavanje ispitivnih izolata gljiva u tri vrste iz roda *Colletotrichum* patogena lucerke i crvene deteline u Srbiji. U ovom radu, ukupno su rekonstruisana tri filogenetska stabla koja su dala doprinos razumevanju međusobnih odnosa ispitivanih vrsta. Rasvetljavanje evolutivne međupovezanosti različitih izolata iz roda *Colletotrichum* pružilo je uvid u prisustvo i rasprostranjenost vrsta ovog veoma značajnog roda u našoj zemlji i njihovo mesto u odnosu na sve ostale vrste.

Raznolikost sekvenci ITS1 rDNK može ilustrovati sličnost mnogih vrsta jednog klastera, dok se na osnovu sekvenci ITS2 *Colletotrichum* vrste mogu grupisati u devet klastera (**Cannon et al.**, 2012). Filogenetska analiza roda *Colletotrichum* otkriva da on obuhvata devet glavnih klastera (*acutatum*, *graminicola*, *spaethianum*, *destructivum*, *dematium*, *gleosporioides*, *boninense*, *truncatum* i *orbiculare*). Klaster *orbiculare* obuhvata neke od najznačajnijih patogena u poljoprivredi: *C. lindemuthianum*, *C. malvarum*, *C. orbiculare* i *C. trifolii*. Pripadnost klasteru *orbiculare*, trenutno je bazirana, pored molekularnih osobina i na nekim morfološkim osobinama kao što je izgled konidija koje su kratke široke i zaobljene na oba kraja. **Sherriff et al.** (1994) i

Johnston and Jones (1997) koriste ITS/LSU analizu za determinaciju klastera orbiculare gde svrstavaju samo monofiletičke predstavnike. **Liu et al.** (2007) na osnovu filogenetske analize navode da je klaster orbiculare monofiletički i da su *C. lindemuthianum*, *C. malvarum* i *C. trifolii* izdvojeni u odnosu na *C. orbiculare* koji je parafiletički. Kao i kod drugih *Colletotrichum* klastera, broj raspoloživih informacija u GenBank bazi podataka je prilično mali, tako da su neophodna dalja istraživanja u ovom pravcu (**Cannon et al.**, 2012). U okviru klastera destructivum nalaze se ekonomski značajne bolesti na gajenim biljkama *C. destructivum*, *C. fuscum*, *C. higginsianum* i *C. linicola*. **Sun and Zang** (2009) vrstu *C. higginsianum* predstavljaju kao sinonim za vrstu *C. destructivum*.

O'Connell et al. (2012) su na osnovu multilokus filogenetske analize ITS dela genoma vrste *C. higginsianum* i *C. destructivum* svrstali unutar klastera destructivum. Po **Moriwaki et al.** (2002) *C. fuscum* je patogen *Digitalis* sp. i na osnovu ITS sekvenci ova vrsta je takođe svrstana u destructivum klaster, ali zbog nedovoljnih informacija, potrebna je detaljnija filogenetska analiza (**Cannon et al.**, 2012). Slična situacija je i sa vrstom *C. linicola*, koju su analizirali **Latunde-Dada and Lucas** (2007) na osnovu sekvence umnoženog prajmera ITS2/D2, pri čemu je i ova vrsta svrstana u klaster destructivum **Cannon et al.** (2012).

Trenutno još uvek ne postoji univerzalno prihvaćen način za određivanje pripadnosti odgovarajućim klasterima koji bi bio usklađen sa konvencionalnim taksonomskim kriterijumima (**Cannon et al.**, 2012). ITS deo genoma predložen je kao primarni marker za identifikaciju gljiva iz praktičnih razloga, jer trenutno najveći broj sekvenci raznih vrsta gljiva obrađen je samo na osnovu ovog dela genoma, koji se inače smatra "barcoding" delom za identifikaciju većine ili skoro svih vrsta gljiva. Takođe, postoje drugi, geni čije se sekvence mogu koristiti za identifikaciju gljiva, posebno geni za beta tubulin (TUB2) i calmodulin za rodove *Aspergillus* i *Penicillium*, TEF1 za rod *Fusarium* i COX1 za *Penicillium* (**Cannon et al.**, 2012). Isti autori predlažu za potpuniju analizu, uključivanje drugih gena i morfoloških metoda radi potpunije identifikacije gljiva naročito srodnih vrsta. Slično tome, filogenetska analiza rekonstruisana na osnovu sekvenci ITS regiona rDNK i odgovarajućih odabranih vrsta iz roda *Colletotrichum*, kao i sekvenci izolata dobijenih u ovom radu, a identifikovanih kao *C. destructivum* (Coll-48, Coll-68, Coll-75 i CC657) i *Colletotrichum* sp. izolat

Coll-44 iz Srbije, smešta ih unutar klastera *destructivum* zajedno sa drugim srodnim vrstama. Dobijeni rezultati slični su navodima **Latunde-Dada and Lucas** (2007) i **Cannon et al.** (2012). Izolat Coll-44 je na osnovu sekvence ITS regiona rDNK ispoljio nukleotidnu identičnost od 100% sa vrstom *C. linicola*, izolat CBS 172. 51. Ove dve vrste morfološki su vrlo slične, mada sa izvesnim razlikama u dimenzijama konidija, apresorija i seta. Naime vrsta *C. linicola* formira nešto duže konidije u poređenju sa vrstom *C. destructivum*. Prema literaturnim navodima, ali i rezultatima dobijenim u ovim istraživanjima, između ove dve vrste postoji razlika i u krugu domaćina. Vrsta *C. linicola* parazitira lan i poponac, dok vrsta *C. destructivum* nije zabeležena na ovim domaćinima (**Latunde-Dada and Lucas**, 2007) niti je u ovim ispitivanjima bio domaćin većeg broja izolata *C. destructivum*.

Damm et al. (2012a) sprovode filogenetske analize vrste *C. acutatum* uključujući šest gena ACT, TUB2, CHS-1, GPDH, HIS3. Brojne studije pokazale su da u okviru klastera *acutatum* postoje podgrupe. Analize su uključile 331 izolat koji su prethodno identifikovani kao *C. acutatum*, koji vode poreklo sa različitih domaćina i različitog su geografskog porekla. Analize su ukazale na postojanje 31 vrste koje se svrstavaju u klaster *acutatum*, od kojih 21 vrsta prethodno nije bila poznata. Pojedinačnim poređenjem i filogenetskim analizama šest pojedinačnih gena, utvrđeno je da u odnosu na ostale proučavane gene najbolji rezultati su dobijeni korišćenjem beta tubulin TUB2 i GPDH gena. Na osnovu ovih gena je izvršena diferencijacija vrsta u okviru klastera *acutatum* (**Damm et al.**, 2012a). Isti autori uočavaju da između TUB2 i GPDH gena postoje neznatne razlike tako da autori sugerišu da je neophodno koristiti oba gena za potpunu identifikaciju *Colletotrichum* vrsta.

Filogenetskom analizom izolat Coll-4 identifikovan kao *C. trifolii* svrstan je u klaster *orbiculare* zajedno sa ostalim izolatima srodnih vrsta. Rezultati ovog rada se poklapaju sa navodima **Liu et al.** (2007). Analizom filogenetskog stabla rekonstruisanog na osnovu sekvenci regiona introna za GPDH gen odabrani izolati grupisali su se prema očekivanoj evolutivnoj srodnosti.

Tokom ovih istraživanja jasno su se izdvojila dva klastera iz roda *Colletotrichum* prisutna na lucerki u Srbiji. Odabrani izolat prve morfološke grupe Coll-4 identifikovan kao *C. trifolii* grupisao se u klaster *orbiculare* sa ostalim izolatima srodnih vrsta, dok su izolati II morfološke grupe Coll-10, Coll-29, Coll-32, Coll- 48, Coll-68 i Coll-75

identifikovani kao *C. destructivum* kao i izolat treće morfološke grupe Coll-44 identifikovan kao *Colletotrichum* sp. svrstani u klaster *destructivum*. Rezultati ovih istraživanja poklapaju se sa navodima (**Cannon et al.**, 2012; **Damm et al.**, 2012a, 2012b).

Liu et al. (2007) i **Cai et al.** (2009) navode da su sekvence introna GS gena i introna GPHD gena filogenetski informativnije za *Colletotrichum* vrste u odnosu na ITS region. Na osnovu regiona introna za GS gen i regiona introna za GPHD gen pouzdanije je razlikovanje vrsta u okviru roda *Colletotrichum*, naročito morfološki sličnih vrsta i izolata koje je na drugačiji način teško razdvojiti i razlikovati.

6.5.2. PCR – RFLP analiza

PCR se može kombinovati sa drugim tehnikama i time identifikaciju učiniti još specifičnijom. Nakon PCR, umnožena DNK tretira se restrikcijom enzimima (endonukleazama). Dobijeni fragmenti razdvajaju se elektroforezom. Princip metode je da u zavisnosti od prisutnosti odgovarajućih restrikcijonih mesta nastaju DNK fragmenti različitih dužina koji zajedno čine profil karakterističan za odgovarajuću vrstu. Poređenjem dva profila može se utvrditi da li izolati pripadaju istim ili različitim vrstama. RFLP markeri daju realnu sliku polimorfizma i mogu se koristiti za precizno određivanje razlika između vrsta gljiva.

U okviru ovih istraživanja, dobijeni PCR proizvodi tretirani su sa dve kombinacije restrikcijonih enzima: A. *HindIII* + *HinfI* + *HaeIII* i B. *HindIII* + *HinfI* + *MspI*. Analizom RFLP proizvoda u agaroznom gelu dobijeni su restrikcijoni profili koji su jasno pokazali razlike između analiziranih uzoraka. Kod uzoraka Coll-4, CBS 158.83 i C-86-2 dobijeni su profili koji odgovaraju vrsti *C. trifolii* što u potpunosti odgovara identifikaciji primenom konvencionalnih metoda i sekvencioniranjem. Identične profile sa navedenim kombinacijama prajmera u svom radu prikazali su i **Liu et al.** (2007). Kod ostalih uzoraka identifikovanih kao *C. destructivum* (Coll-3, Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-35, Coll-37, Coll-Aš) dobijeni su međusobno identični restrikcijoni profili ali koji se jasno razlikuju od profila karakterističnog za vrstu *C. trifolii*. Dobijeni profili ne odgovaraju nijednom od profila koje su **Liu et al.** (2007) dobili za više vrsta iz roda *Colletotrichum* (*C. orbiculare*, *C. malvarum*, *C. dematium*, *C. acutatum*, *C. magna*, *C. lindemuthianum*). Kao referentni izolati u ovim

istraživanjima korišćeni su i izolati AVO-37-4B predhodno identifikovan kao *C. gleosporioides* i CC560 identifikovan kao *C. dematium*.

Liu et al. (2007) proučavaju 72 izolata vrsta roda *Colletotrichum* uključujući *C. orbiculare*, *C. trifolii*, *C. lindemuthianum* i *C. malvarum* različitog geografskog porekla i sa različitih domaćina. Ove četiri vrste predstavljaju filogenetski tesno povezane grupe. Na osnovu RFLP analize fragmenata od 900 bp nastalog umnožavanjem introna gena za GS jasno se mogu razlikovati proučavane vrste. **Liu et al.** (2007) na osnovu uporednih istraživanja preporučuju korišćenje RFLP analize u kombinaciji sa drugim metodama za detekciju gljiva, kao što su krug domaćina, VCG metoda i sekvencioniranje, jer se tada dobijaju tačnije i potpunije informacije. **Correll et al.** (2000) analiziraju mtDNK *C. acutatum* sa plodova jabuke različitog geografskog porekla, RFLP metodom sa ciljem da utvrde razlike između izolata. Na osnovu analiza oni zaključuju da većina proučavanih izolata pripada jednom mtDNK C1 haplotipu. **Figueiredo et al.** (2012) proučavaju 18 izolata *C. gleosporioides* iz indijskog oraha (*Anacardium occidentale*) sa različitih lokaliteta u Brazilu, RFLP analizom rDNA i primenom kombinacije restrikcionih enzima *DraI*, *HaeIII* i *MspI* radi utvrđivanja polimorfizma između izolata. Isti autori primenom restrikcionog enzima *MspI* utvrdili su veliki polimorfizam među izolata vrste *C. gleosporioides*. **Maharaj and Rampersad** (2012) analiziraju 48 izolata *Colletotrichum* vrsta, sa različitih domaćina, na osnovu proizvoda ITS regiona genoma PCR RFLP analizom. Dobijeni restrikcioni profili, jasno pokazuju razlike između vrsta *C. gleosporioides* i *C. truncatum*. **Vale'rio et al.** (2005) proučavaju diverzitet 37 izolata *C. graminicola* poreklom iz sirka iz geografski udaljenih područja Brazila korišćenjem različitih restrikcionih enzima na ovaj način uočeno je razdvajanje 11 restrikcionih profila među izolatima vrste *C. graminicola*.

Identifikacija i karakterizacija *Colletotrichum* vrsta je teška zbog velikih morfoloških varijacija. Molekularne metode, veoma su korisne za filogenetsku analizu izolata *Colletotrichum* vrsta. Ispitivanja *Colletotrichum* vrsta sa lucerke u Srbiji pokazala su da u okviru izolata prve morfološke grupe okarakterisanih kao *C. trifolii*, polimorfizam nije izražen bez obzira na različito geografsko poreklo izolata. Ispitivani izolati formirali su šest restrikcionih traka primenom obe kombinacije restrikcionih enzima. Primena RFLP na izolate druge morfološke grupe, koja je identifikovana kao *C.*

destructivum ustanovljen je izražen polimorfizam. Ispitivani izolati podelili su se u dve grupe na osnovu dobijenih restrikcionih profila. Devet izolata ove grupe (Coll-3, Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-35, Coll-37 i Coll-Aš) u kombinaciji sa prvom grupom restrikcionih enzima formiralo je restrikcioni profil sa osam traka. Ostali izolati (Coll-8, Coll-32, Coll-38, Coll-48, Coll-68, Coll-75, Coll-Bk i CC657) pod istim uslovima nisu formirali restrikcione profile.

Primenom druge kombinacije restrikcionih enzima, devet izolata Coll-3, Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-35, Coll-37 i Coll-Aš, različitog geografskog porekla i domaćina, formiralo je restrikcione trake, (dok kod osam izolata, nije formiralo restrikcione trake (Coll-8, Coll-32, Coll-38, Coll-48, Coll-68, Coll-75, Coll-Bk i referentni izolat CC657).

RFLP metoda može da prikazuje vezu između genetičkih grupa i geografskog porekla izolata (Figueiredo et al., 2012). U ovim istraživanjima nije uočena veza između genetičkih grupa i njihovog porekla, mada je uočeno jasno postojanje izražene varijabilnosti izolata identifikovanih kao *C. destructivum* porekla sa lucerke i crvene deteline iz Srbije.

Izolat Coll-44 iz treće morfološke grupe, ni u jednoj od ponuđenih kombinacija enzima nije formirao restrikcione profile.

Dobijeni rezultati primene RFLP za razlikovanje vrsta *Colletotrichum* patogenih za lucerku i crvenu detelinu u Srbiji ukazuju da ova metoda ima veliki mogući značaj za brzu i pouzdanu rutinsku dijagnostiku. Primenjene kombinacije više restrikcionih enzima ukazale su na mogućnost jasnog razdvajanja *C. trifolii* od ostalih srodnih vrsta, ali i na postojanje varijabilnosti unutar populacije *C. destructivum*. Primenjena kombinacija restrikcionih enzima nije mogla razlikovati pripadnike treće morfološke grupe identifikovane kao *Colletotrichum* sp. izolat Coll-44 od pojedinih izolata *C. destructivum* koji nisu posedovali restrikciona mesta za korišćenje enzima. Kako su molekularna proučavanja kompleksa *Colletotrichum* na lucerki u Srbiji, započeta u okviru ove disertacije, po prvi put su dobijene sekvence izolata iz naše zemlje što je obezbedilo uslov za izbor novih kombinacija enzima koji bi se mogli primeniti u budućim dijagnostičkim protokolima.

6.6. Proučavanje vegetativne kompatibilnosti odabranih izolata *Colletotrichum* spp.

Fenomen vizuelne reakcije fenotipa, koji se pojavljuje kada se dva izolata jedne vrste gljive gaje u združenim kulturama na specifičnim podlogama, poznat kao vegetativna ili heterokarionska kompatibilnost, omogućava identifikaciju klonova gljive i njihovu klasifikaciju prema filogenetskim grupama. Hife izolata koje imaju identične alele kod svih *vic* lokusa mogu da anastomoziraju u oblik vidljivog heterokariona. Izolati koji dele kompatibilne lokuse i mogu da anastomoziraju jedni s drugima, pripadaju subpopulaciji označenoj kao vegetativno kompatibilna grupa (VCG) koja je genetski odvojena od drugih vegetativno kompatibilnih grupa. Svaka VCG specifična je prema biljci domaćinu ili srodnoj grupi domaćina i karakteriše je određeni krug biljaka domaćina (**van der Nest et al.**, 2011).

Vegetativnu kompatibilnost prvi je opisao **Puhalla** (1985) i zasnovana je na mogućnosti formiranja heterokariona između izolata iste vrste. Primenom VCG metode izoluju se auksotrofni mutanti koji ne koriste nitrata (nitrate nonutilizing mutants), tzv. *nit* mutanti. Ako auksotrofni *nit* mutanti različitih izolata prilikom uparivanja na minimalnoj podlozi, na mestu dodira kolonija, formiraju prototrofne heterokarione, što se manifestuje porastom divljeg-tipa micelije, tj. micelije robustnog izgleda, znači da pripadaju istoj vegetativno kompatibilnoj grupi, odnosno da su genetički srodni.

Kod filamentoznih gljiva vegetativna kompatibilnost regulisana je brojem lokusa, koji se nazivaju *het* ili *vic* lokusi što zavisi od organizma. Vegetativnu kompatibilnost kod *Fusarium* i *Colletotrichum* vrsta karakterišu *vic* lokusi (**Katan and Primo**, 1999). Vegetativna inkompatibilnost (nesamokompatibilnost) determinisana je kao nemogućnost da se formiraju prototrofni heterokarioni pod povoljnim uslovima, ili kao formiranje barijere kada su dva inkompatibilna izolata u interakciji. Vegetativna kompatibilnost koristi se kao multilokusni fenotip u analizama populacija gljiva, i u nekim populacijama sa visokom genetičkom srodnošću ona je povezana sa patogenošću (**Leslie and Zeller**, 1997).

Kod gljiva osobina vegetativne kompatibilnosti upućuje na karakterističnu sposobnost dve gljive da se spoje, anastomoziraju i na tom mestu izmene citoplazmatski ili jedarni sadržaj (**Katan**, 2000) i smatra se važnom biološkom osobinom po kojoj dolazi do formiranja heteroplazme i heterokariona (**Correll et al.**, 2000). Izolati koji su

vegetativno kompatibilni svrstani su u istu VC grupu. Dva izolata koja su vegetativno kompatibilna moraju imati zajedničke, iste alele u jednom ili više lokusa (**Katan**, 2000). Roditeljske linije sa istim alelima kod svih *vic* gena (lokusa) daju potomstvo koje je u istoj VC grupi. Najmanje 10 *vic* lokusa poznato je za kontrolu vegetativne kompatibilnosti kod *Fusarium moniliforme*. Identifikovanih 10 *vic* lokusa, sa dva alela pri svakom lokusu, polnim rekombinacijama mogu proizvesti 2^{10} ili 1024 različita rasporeda koja mogu teoretski proizvesti isti broj VCG (**Elmer**, 1991). Na osnovu preliminarnih genetičkih testova, manjeg broja izolata, teleomorfa *Glomerella*, za vrste *Colletotrichum acutatum*, *C. gleosporioides* i *C. graminicola*, utvrđeno je da je broj *vic* lokusa od dva do sedam (**Katan**, 2000). Proučavanja vegetativne kompatibilnosti vrsta iz roda *Colletotrichum* usvojena je iz sličnih istraživanja vrsta iz rodova *Fusarium* i *Verticillium* (**Katan**, 2000).

Vrste roda *Colletotrichum* razmnožavaju se uglavnom ili isključivo vegetativno. U odsustvu polnog načina razmnožavanja, kod ovih vrsta razmena genetičkog materijala između dva izolata vrši se anastomozom i heterokariozom. Izolati ne mogu međusobno da formiraju stabilne heterokarione, jer su oni genetski udaljeni, odnosno oni su vegetativno inkompatibilni. Vegetativno kompatibilni izolati su identični pri svakom setu *vic* gena i svrstavaju se, po definiciji, u istu VC grupu (**Elmer**, 1991; **Leslie and Zeller**, 1997). *Vic* lokusi deo su velike grupe gena odgovornih za formiranje i održavanje stabilnog heterokariona (**Leslie and Zeller**, 1997).

Gljive mogu formirati heterokarione u vreme polne reprodukcije ili bespolnog (vegetativnog) porasta. Formiranje polnog heterokariona zahteva razvoj i diferenciranje određenih polnih struktura. Kod heterotalusnih askomicetnih gljiva formiranje polnog heterokariona odvija se pomoću alela lokusa polnog tipa. Formiranje bespolnog (vegetativnog) heterokariona rezultat je spajanja vegetativnih ćelija u laboratorijskim uslovima. Bespolni heterokarioni mogu biti ograničeni na pojedinačne spojene ćelije ili mogu proliferacijom dati jednu nezavisanu višejedarnu tvorevinu. Polni i bespolni heterokarioni mogu se sasvim značajno razlikovati jedan od drugog. Parovi izolata koji su sposobni da formiraju polne heterokarione ne moraju biti u stanju da formiraju bespolne heterokarione i obrnuto (**Leslie and Yamashiro**, 1997).

Genetički diverzitet u okviru *Colletotrichum* spp. vrsta proučavan je u manjem obimu, primenom VCG metode. Detaljna proučavanja ukazuju da izolati koji pripadaju

istoj VC grupi poseduju slične ili identične multilokusne haplotipove i pripadaju istoj klonskoj liniji (**Katan**, 2000). Ispitivanje srodnosti između izolata pomoću VCG metode korišćeno je kod sledećih vrsta iz roda *Colletotrichum*: *C. gleosporioides*, *C. dematium*, *C. orbiculare*, *C. acutatum*, *C. fragariae* i *C. kahawe*. Korišćeni su uglavnom anamorfi izolati, a dobijeni su uglavnom oprečni rezultati (**Katan**, 2000).

Kako genetički diverzitet vrsta gljiva iz roda *Colletotrichum* poreklom iz lucerke i crvene deteline iz Srbije do sada nije ispitan na osnovu vegetativne kompatibilnosti, nije poznata genetička struktura i variranje srpskih izolata u odnosu na geografsko poreklo i biljke domaćine. U komplementarnim testovima, proučavani izolati poreklom iz Srbije i referentni izolati vrste *C. trifolii* iz Francuske i Holandije, ustanovljeno je da je jedan izolat poreklom iz Srbije kompatibilan sa referentnim izolatima (C-82-2 i CBS158.83) i to je Coll-4, sa kojima su formirali zajedničku VCG. Referentni izolat sa oznakom C-82-2 je determinisan do nivoa rase 1, dok ostali proučavani izolati koji su na osnovu morfoloških osobina i molekularne karakterizacije okarakterisani kao *C. destructivum* i *Colletotrichum* spp. poreklom iz Srbije. nisu kompatibilni sa napred pomenutim izolatima. Ovi izolati na osnovu testova kompatibilnosti svrstavaju se u šest različitih VCGs.

Razlike u virulentnosti unutar jedne specijalizovane forme okarakterisane su imenovanjem patotipova u patogene rase. Rase se definišu prema različitim interakcijama sa genotipovima domaćina, koji u nekim slučajevima nose jedan ili više gena za rezistentnost. Kod lucerke otpornost prema rasama 1 i 2 vrste *C. trifolii* kontrolišu dva dominantna gena An_1 i An_2 (**O'Neill**, 1996). **Liu et al.** (2007) navode da ovom metodom ne mogu razlikovati rase 1 i 2 u okviru vrste *C. trifolii* i da se izolati rase 1 i 2, svrstavaju u istu VC grupu.

Svi izolati vrste *C. destructivum* poreklom iz Srbije pripadaju jednoj od pet VC grupa od kojih su tri uključile izolate iz različitih i geografski udaljenih lokaliteta sa teritorije Srbije kao i izolate poreklom iz različitih biljaka domaćina. U preostale dve VC grupe svrstali su se po jedan izolat iz dva različita lokaliteta. Prema rasporedu izolata u VC grupe unutar populacije vrste *C. destructivum* nije ustanovljena korelacija između njihove genetičke srodnosti i porekla, odnosno razlika uzorkovanja ili biljke domaćina. Smatra se da izolati unutar jedne VC grupe su obično više genetički slični nego izolati u različitim VC grupama (**Leslie and Summerell**, 2006). Mali broj studija

primenjuju vegetativnu kompatibilnost za proučavanje raznolikosti vrsta u okviru roda *Colletotrichum* (Freeman et al., 2000a; Pieczul and Rataj-Guranowska, 2004; Liu et al. 2007).

Liu et al. (2007) izolate *C. orbiculare* poreklom iz krastavca, lubenice i dinje svrstavaju u jednu od četiri VC grupe (VC grupe 1001, 1002, 1003 i 1004), dok izolate iste vrste poreklom iz *Xanthium spinosum* svrstavaju u VC grupu označenu sa 1050. Isti autori izolate *C. trifolii* poreklom sa lucerke svrstavaju u jednu VC grupu CT-1, bez obzira na pripadnost različitim rasama. Pieczul and Rataj-Guranowska (2004) izolate bespolne forme *C. gleosporioides* iz *Lupinus* sp. svrstavaju u dve VC grupe VCG-1 i VCG-2. Prema literarnim podacima (Freeman et al., 2000b; Pieczul and Rataj-Guranowska, 2004; Liu et al. 2007) u kojima je predstavljen numerički sistem određenih VC grupa za vrste *C. gleosporioides*, *C. acutatum*, *C. orbiculare* i *C. trifolii*, ne postoje nikakvi podaci o numerisanju vrsta *C. destructivum* i *C. linicola*. Slabu korelaciju između VC grupa prema rasama patogena i geografskom poreklu ustanovili su Woo et al. (1996). Broj identifikovanih VC u populaciji predstavlja minimalan broj genetičkih individua, haplotipova (Leslie and Summerell, 2006). Srodnost izolata, međusobna sposobnost razmene genetičkog materijala u vezi je sa paralelno biljkom domaćinom na kome se gljiva razvija, lokalitetom i polnim stadijumom (Correll et al., 1993; Freeman et al., 1998; Correll et al., 2000; Katan, 2000; Li-Pyung et al., 2003; Pieczul and Rataj-Guranowska, 2004).

Upotreba *nit* mutanata je velika i mogu se koristiti za proučavanje sličnosti izolata širom sveta u testovima virulentnosti i toksičnosti pesticida, a mogu obezbediti i vredne informacije o genetičkoj sličnosti prirodnih populacija, posebno u zemljištu (Lević, 2008). Prednost korišćenja *nit* mutanata je što se mogu povećati bez mutagenih tretmana (Puhalla, 1985).

Većina gljiva može koristiti nitrata kao izvor azota koji se redukuju do amonijaka pomoću nitrat i nitrit reduktaze (Correll et al., 1987). Amonijak se može iskoristiti u ćelijama na različite načine. Hlorati, koji su analogni nitratima, koriste se za proučavanje asimilacije nitrata kod gljiva, isto tako dobro kao i kod bakterija, algi i biljaka. Redukcija hlorata u hlorite pomoću nitrat reduktaze može imati za posledicu toksičnost hlorata za navedene organizme. Izolati gljiva koji su osetljivi na hlorate mogu redukovati nitrata do nitrata dok hlorat-rezistentni izolati nisu za to sposobni. *Nit*

mutanti se izdvajaju iz hlorat-rezistentnih sektora koji imaju intenzivan porast na minimalnoj podlozi sa hloratom (Correll et al., 1987). Porast izolata divljeg tipa je ograničen u hloratima, verovatno zbog toga što se hlorati pomoću nitrat reduktaze redukuju u visoko toksične hlorite. U hlorat rezistentnim delovima kolonije sprečena je aktivnost nitrat reduktaze zbog mutacija u genskim lokusima odgovornim za aktivnost ovog enzima. *Nit* mutanti nisu sposobni da redukuju hlorate u hlorite jer sprečavaju aktivnost enzima nitrat reduktaze i zato su hlorat-rezistentni (Correll et al., 1987).

Nit mutanti obično se dele u tri fenotipska tipa. *Nit1* mutant ima jednu mutaciju u genskom lokusu koji reguliše aktivnost nitrat reduktaze, kod *nit3* mutanta onemogućena je asimilacija nitrata u lokusu odgovornom za ovaj proces. NitM predstavlja mutacije u lokusima (najmanje pet lokusa) odgovornim za asimilaciju kofaktora koji sadrži molibden neophodan za aktivnost nitrat reduktaze (Correll et al., 1987; Summerell, 2003).

Enzim nitrat reduktaza je oktamer polipeptidnog holoenzima i kodira ga gen *nit1*. Izolati koji nose mutacije u genu *nit1* ne mogu koristiti nitrata kao izvor azota, ali su prirodno sposobni da koriste azotna jedinjenja kao izvore azota. Takođe, kod NIT1 proteina, kofaktor koji sadrži molibden je aktivni deo enzima nitrat reduktaze (Summerell, 2003). Postoji pet genskih lokusa (*nit3*, *nit4*, *nit5*, *nit6* i *nit7*) koji kodiraju deo ovog kofaktora kod *Fusarium* i *Colletotrichum* vrsta, ali identifikacija mutanata kod pojedinačnih lokusa obično je nevažna u kontekstu VCG testova. Zajedno ovih pet lokusa nazivaju se NitM mutantima i svi daju isti fenotip. Mutanti različitih NitM lokusa mogu biti komplementarni jedan sa drugim. Ovaj kofaktor, takođe, funkcioniše kao deo purin dehidrogenaze. Nitrat reduktaza kao i purin dehidrogenaza ne mogu funkcionisati ako se promeni jedan deo kofaktora. NitM mutanti ne mogu koristiti nitrata ili hipoksantin kao izvore azota, ali mogu koristiti druga azotna jedinjenja kao izvore azota (Katan, 2000).

Primenom VCG metode, iz hlorat-rezistentnih sektora, izolovano je kod 18 proučavanih izolata *C. trifolii*, *C. dematium* i izolat Coll-44 (*Colletotrichum* spp.) dve vrste *nit* mutanata, *nit1* i NitM. Prema literarnim podacima (Correll et al., 1993; Freeman et al., 1998; Correll et al., 2000; Katan, 2000; Li-Pyung et al., 2003; Pieczul and Rataj-Guranowska, 2004), najučestalija je izolacija *nit1* mutanata što je potvrđeno i u uslovima ovih istraživanja.

Kod svih proučavanih izolata iz hlorat-rezistentnih sektora, pored *nit* mutanata, razvio se divlji-tip micelije na minimalnoj podlozi. Relativna učestalost pojave mutanata *nit1* za izolate vrste *C. trifolii* bila je niža u odnosu na vrste *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp. Coll-44 iznosila je od 12 - 14. Kod izolata vrste *C. destructivum* učestalost formiranja mutanata *nit1* je bila najviša u odnosu na ostale proučavane vrste i kretala se od 2 - 17. Relativna učestalost pojave mutanata *nit1* za izolat Coll-44 je bila najniža i iznosila 3. Prosečna relativna učestalost pojavljivanja *nit1* mutanta za sve proučavane izolate iznosila je 8,57. Opseg relativne učestalosti pojave mutanata NitM kod izolata vrste *C. trifolii* bio je najviši u odnosu na ostale dve ispitivane vrste i kretao se od 3 - 18. Kod izolata vrste *C. destructivum* relativna učestalost izolovanja mutanata NitM je bila niža i iznosila je od 1 - 12. Relativna učestalost pojave mutanata NitM za izolat Coll-44 iznosila je 2 i ona je bila najniža u odnosu na relativnu učestalost pojave NitM kod ostalih proučavanih vrsta. Prosečna relativna učestalost pojave NitM mutanata za sve proučavane izolate iznosila je 4,43. *crn* mutanat je imao najvišu relativnu učestalost pojave za izolate vrste *C. trifolii* od 7 – 34, a za izolate vrste *C. destructivum* je bio niži i kretao se od 0 - 20. Kod izolata Coll-44 identifikovanog kao *Colletotrichum* sp. *crn* mutanat je imao najnižu relativnu učestalost pojave od 5. Prosečna relativna učestalost pojave *crn* mutanata za sve proučavane izolate je 7,23. **Correll et al.** (1987) detaljnije su objasnili pojavu divljeg-tipa kolonije na minimalnoj podlozi, poreklom iz hlorat-rezistentnog sektora. Izolati sa porastom koji je sličan divljem-tipu su ili izolati divljeg-tipa koji se ne testiraju ili *crn* mutanti koji mogu koristiti nitrata i otporni su prema hloratima (**Summarell**, 2003).

6.7. Osetljivost različitih genotipova lucerke prema ispitivanim izolatima *Colletotrichum* spp.

Vrste roda *Colletotrichum* jedan su od najznačajnijih rodova fitopatogenih gljiva koji ugrožava useve pod lucerkom i crvenom detelinom, prouzrokujući najčešće veoma značajne ekonomske štete (**Elgin and Ostazeski**, 1982; **Allen et al.**, 1982; **O'Neill et al.**, 1989). Problemi i štete od bolesti lucerke koji se u našim uslovima javljaju su veliki i teško rešivi između ostalog i zbog nepostojanja komercijalnih sorti koje pokazuju otpornost prema gljivičnim prouzrokovateljima bolesti. Rezultati dobijeni u istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije, predstavljaju uvod u oplemenjivanje lucerke na

otpornost prema prouzročivačima antraknoze. Proučavanje patogena, etiologije oboljenja, genetičke prirode reakcije zaraženih biljaka, razvijanje odgovarajućih metoda veštačkih inokulacija, kao i identifikovanje efikasnih izvora otpornosti predstavljaju preduslove koje je neophodno zadovoljiti da bi moglo da se pristupi uspešnom poboljšanju nivoa otpornosti bilo koje gajene biljke. Kako je organizovanje poljskog ogleda za ocenu otpornosti najčešće teško, skupo i dugotrajno, postoji potreba da se obavi preliminarno testiranje u uslovima koji su kontrolisani i u kojima je moguće doći do rezultata brže, a pri tome obuhvatiti veći broj genotipova kako lucerke tako i patogena. Ocena nivoa otpornosti genotipova lucerke u kontrolisanim uslovima, odnosno u stakleniku, uz veštačku inokulaciju obezbeđuje brži uspeh u preliminarnom pronalaženju otpornih genotipova. Veštačke inokulacije imaju i prednost u tome što se koristi precizno određena i uniformna količina inokuluma (fragmenat kolonije određene veličine, suspenzija spora određene koncentracije) potpuno identifikovanog prouzročivača, što obezbeđuje ponovljivost ogleda, kao i preciznije određivanje potencijala u pogledu otpornosti ispitivanih genotipova. U svetu postoji ograničen broj radova o testiranju na otpornost lucerke prema bolestima (**Barnes et al.**, 1969; **Ostazeski et al.**, 1969; **Devine et al.**, 1971; **Ostazeski et al.**, 1979).

Trenutno u Srbiji ne postoje razvijeni programi oplemenjivanja lucerke na otpornost prema bolestima. Lucerka je visoko varijabilna vrsta, pre svega zbog svoje prirodne tetraploidnosti, što uslovljava kontrolu svake osobine sa najmanje 4 gena. Pored toga, stranooplodni način oprašivanja i jako izražena inbreed depresija uslovljavaju visoku heterozigotnost vrste. Sorte lucerke su uglavnom sintetičke sorte, nastale višestrukim ukrštanjem i odlikuju se širokom genetičkom osnovom koja uslovljava visoku unutar populacijsku varijabilnost pojedinačnih biljaka za veliki broj osobina (**Radović et al.**, 2010). Sve to omogućava visoku adaptabilnost lucerke na različite biotičke (uključujući i patogene) i abiotičke stresne faktore. Jedan od doprinosa ove disertacije je ispitivanje reakcije domaćih komercijalnih sorti, kao i sorti iz okruženja sa referentnim sortama lucerke na otpornost prema antraknozi u uslovima veštačke inokulacije u cilju iznalaženja izvora variranja za ovu osobinu.

Prilikom ispitivanja nivoa osetljivosti/otpornosti genotipova lucerke u eksperimentalnim uslovima staklenika, ispitivane vrste *C. trifolii*, *C. destructivum* i izolat Coll-44 identifikovan do nivoa roda *Colletotrichum* sp., na osnovu jačine

oboljenja biljaka lucerke, nisu se razlikovale. U uslovima eksperimenta sve tri ispitivane vrste uspele su da izazovu tipične simptome na ispitivanim genotipovima lucerke K-1, K-28, Zaječarska 83, Osječka 12, NS Slavija, Banja Luka, Affinity 401 + Z, Florida 77, Vernal S i Perry.

Vrsta *C. trifolii* bila je veoma patogena prema domaćim genotipovima lucerke. Nakon četiri nedelje od inokulacije izazvala je potpuno sušenje i propadanje biljaka sorti K-1, K-28, NS Slavija i Zaječarska 83. Sorta Banja Luka pokazala je otpornost prema ispitivanim izolatima *C. trifolii*. Američki genotipovi Vernal S i Perry su pokazali niži nivo otpornosti, dok drugi američki genotipovi Affinity 401 + Z i Florida 77 pokazuju otpornost prema ispitivanim izolatima vrste *C. trifolii*. Sorta Affinity 401 + Z u ovim istraživanjima je pokazala najbolju otpornost na izolate *C. trifolii*, dok je otpornost na ostale izolate bila manja, što je u skladu sa rezultatima (Gray et al., 2003) koji ukazuju da je genotip Affinity 401 + Z visoko otporan na *C. trifolii*.

Vrsta *C. destructivum* izazvala je veoma jake simptome na genotipovima lucerke K-1, K-28, Zaječarska 83, Osječka 12, NS Slavija i američkim genotipovima Affinity 401 + Z i Perry. Ostali američki genotipovi Florida 77 i Vernal S ispoljili su otpornost prema ispitivanoj vrsti. Međutim, sorta Banja Luka je takođe ispoljila otpornost prema ispitivanim izolatima vrste *C. destructivum*, pa može biti izvor otpornosti prema ovoj vrsti patogena.

Izolat Coll-44 koji pripada trećoj vrsti *Colletotrichum* sp. na sortama NS Slavija, Banja Luka, K-1 i američkim sortama Affinity 401 + Z i Florida 77 izaziva, nakon četiri nedelje od inokulacije, potpuno sušenje i propadanje biljaka. Američki genotipovi Vernal S i Perry prema ispitivanom izolatu pokazali su se srednje otpornim. Nešto niža otpornost na izolat Coll-44 je zabeležena kod stranih sorti (Vernal S i Perry) u odnosu na domaći sortiment. To se može objasniti verovatno skorom pojavom ove nove vrste *Colletotrichum* sp. izolat Coll-44 kao patogena lucerke u arealu gajenja ovih sorti. Sorte Zaječarska 83 i Osječka 12 su pokazale najveću otpornost prema Coll-44, i mogu biti dobar izvor otpornosti prema ovoj vrsti *Colletotrichum*.

Boland and Brochu (1989) i **O'Neill et al.** (1989) su u istraživanjima patogenosti pokazali da je *C. trifolii* najinfektivniji na lucerki, kako u zaštićenom prostoru tako i na otvorenom polju. Isti autori navode da je *C. destructivum* u

zaštićenom prostoru pokazao veći nivo infektivnosti i isti nivo infekcije kao vrsta *C. trifolii* u uslovima polja.

Prema **Ostazeski et al.** (1969), osetljiva sorta ima 10% zdravih biljaka, dok se za sortu koja ima preko 65% zdravih biljaka može reći da je otporna. Sorta Arc, koja je otporna na rasu 1. *C. trifolii*, ima indeks oboljenja 2.72 odnosno 2.25 (**Ostazeski et al.**, 1979). Danas u svetu postoji veliki broj otpornih sorti (HR) na *Colletotrichum trifolii* kao što su Arc, Saranc Ar, Vangaurd, Florida 77, Affinity+Z, DK 125, WL 135 i druge. **Devine et al.** (1973) navode da je pet populacija lucerke dobijeno sa povećanom otpornošću prema *C. trifolii*. Od toga su Beltsville 1-An4, Beltsville 2-An4, Beltsville 3-An4, visoko rezistentne prema antraknozi, dok su populacije Beltsville 4-An4, Beltsville 5-An4 srednje otporne prema antraknozi. Otpornost prema *C. trifolii* može se povećati sa 5 na 82% nakon dva ili tri ciklusa selekcije (**Devine et al.**, 1971). **Devine et al.** (1975) su dobili sortu Arc nakon osam ciklusa rekurentne fenotipske selekcije.

Međutim, pojava rasa *C. trifolii* ukazuje da je stvaranje otpornih sorti lucerke složenije nego što se mislilo. Prirodna otpornost prema prouzročivaču antraknoze još je nedovoljno poznata. Čini se da je otpornost kod sorte Arc kontrolisana jednim dominantnim alelom i da poseduje vertikalnu otpornost prema rasi 1 *C. trifolii*, dok je otpornost kod sorte Saranac AR, Vangaurd i Florida 77 složenije prirode i ove sorte su otporne prema rasama 1 i 2 *C. trifolii* (**Devine et al.**, 1971; **Elgin and Ostazeski**, 1982). **O'Neill et al.** (1996) testiraju 250 američkih komercijalnih sorti lucerke prema izolatima *C. trifolii* rase 2. Tom prilikom konstatuju da je 30 testiranih sorti pokazalo 20% otpornosti. Ovu pojavu objašnjavaju činjenicom da je nivo otpornosti individualna osobina sorti lucerke.

Elgin and Ostazeski (1982) testiraju nivo otpornosti sorti Florida 77 i Perry prema izolatima *C. trifolii* rasa 1 i 2, i dolaze do zaključka da je kod sorte Florida 77 u odnosu na rasu 1 *C. trifolii* bilo 11% otpornih biljaka, a u odnosu na rasu 2 iste vrste, bilo je otporno 10% biljaka. Isto tako kod sorte Perry prema rasama 1 i 2 *C. trifolii* bilo je 2% zdravih biljaka. Sorta Vernal S pokazala je veću osetljivost u kontrolisanim uslovima nego na polju (**Barnes et al.**, 1969). **Devine et al.** (1975) testiraju uticaj tri vrste iz roda *Colletotrichum* koje prouzrokuju simptome antraknoze na lucerki. Oni proučavaju patogenost i interakciju *C. trifolii*, *C. destructivum* i *C. dematium* f. *truncata*. Tom prilikom koriste komercijalne sorte lucerke koje pokazuju različitu

osetljivost prema antraknozi i to su: Glacier, Glacier-AN4, Saranc, Saranc-AN4, Vernal, Vernal-AN4, Team i Arc. Autori konstantuju da je procenat preživelih biljaka kod osetljivih sorti najmanji, 16% za *C. trifolii* a kod vrsta *C. destructivum* i *C. dematium* f. *truncata* procenat preživelih biljaka je 50%. **Ostazeski et al.** (1969) navode da je otpornost prema antraknozi visoko heritabilna. Posle jednog ciklusa selekcije frekvencija otpornih biljaka se kreće od 18-75%. **Graham et al.** (1976) navode da je infektivnost izolata *C. trifolii* mnogo manja posle infekcije izolatima *C. destructivum* i *C. dematium* f. *truncata*.

Tokom ispitivanja prisustva i rasprostranjenosti vrsta roda *Colletotrichum* na lucerki, na usevima lucerke u Srbiji dobijen je i izolat Coll-44, koji po pojedinim osobinama pre svega morfološkim, krugu domaćina kao i sekvenci ITS regiona, odgovaraja vrsti *C. linicola*, koja se u literaturi ne navodi kao patogen lucerke.

Bez obzira na manju učestalost, prisustvo i trećeg taksona iz roda *Colletotrichum* na lucerki je od velikog značaja jer ukazuje da je raznolikost vrsta verovatno veća i da se vrste javljaju kao kompleks. U testu provere patogenosti, infektivnost izolata Coll-44 dokazana je veštačkim inokulacijama klijanaca lucerke sorte K-28 u Petri kutijama. Nakon deset dana izolat Coll-44 izazvao je potpuno sušenje i propadanje klijanaca. Buduća istraživanja uključice, pored *C. trifolii* i *C. destructivum* i izolat Coll-44 (*Colletotrichum* sp.) kao patogena lucerke za uporedno ispitivanje osetljivosti genotipova. Pored toga, buduća istraživanja će uključiti i potpunu identifikaciju i karakterizaciju ovog, za Srbiju novog taksona kao i određivanje njegovog prisustva i rasprostranjenosti u Srbiji.

U uslovima postavljenog eksperimenta, može se zaključiti da je najveću otpornost pokazao američki genotip Vernal S, iako je on u radovima predstavljena kao osetljiv genotip na antraknozu (**Devine et al.**, 1971). Najmanju otpornost prema *C. trifolii*, *C. destructivum* i izolatu Coll-44 identifikovanom do nivoa roda *Colletotrichum* sp. pokazali su domaći genotipovi K-28, K-1, Zaječarska 83, NS Slavija i američka sorta Perry.

Vasić et al. (2009) proučavali su uticaj četiri izolata *C. trifolii* na četiri komercijalna genotipa lucerke (K-28, NS Mediana, Affinity + Z i Alfagraze) i utvrdili su značajnu osetljivost ispitivanog biljnog materijala prema vrsti *C. trifolii*. Takođe, **Vasić et al.** (2010) proučavaju osetljivost pet genotipova crvene deteline (K-39,

Manuela, Margot, K-32 i L-50) prema *C. trifolii* i dolaze do zaključka da su testirani genotipovi crvene deteline veoma osetljivi prema prouzročivaču antraknoze.

Dobijeni rezultati ukazuju na visoku varijabilnost reakcije u sistemu sorta - izolat u testiranom biljnom materijalu. Pored toga, odgovor pojedinačnih biljaka u okviru sorti na inokulaciju patogenim izolatima, takođe je bio jako varijabilan. Manji broj pojedinačnih biljaka uspele su, da i pored jasnih simptoma oboljenja donesu seme. Potomstvo ovih biljaka odličan je izvor otpornosti na ispitivane izolate patogena i biće uključeno u sledeći ciklus selekcije na ovu osobinu. Imajući u vidu rezultate **Devine et al.** (1971) koji ukazuju da je nakon nekoliko ciklusa selekcije moguće podići nivo otpornosti, nastavak istraživanja u ovom pravcu ima veliki potencijalni značaj.

Rezultati ovih istraživanja ukazali su na postojanje različitih vidova tolerancije komercijalnih sorti lucerke prema vrstama *Colletotrichum* spp., koji će se dalje koristiti u programima selekcije lucerke na otpornost. Od naročitog značaja je i ispitivanje osetljivosti genotipova u uslovima veštačke inokulacije u uslovima staklenika, čime su dobijeni podaci o potencijalu ovih genotipova. U kontrolisanim uslovima moguće je još pre početka vegetacije ispitati nivo otpornosti genotipova i za dalji rad u polju odabrati genotipove koji ispoljavaju otpornost.

Izdvojeni genotipovi lucerke koji su ispoljili viši nivo otpornosti na ispitivane vrste biće dalje korišćeni u poljskim ogledima u različitim klimatskim uslovima kako bi se tačnije procenio nivo otpornosti na kompleksu *Colletotrichum* spp. Na taj način biće izdvojeni genotipovi koji će se koristiti u daljim procesima selekcije i oplemenjivanja lucerke u cilju poboljšanja nivoa otpornosti.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu obavljenih šestogodišnjih istraživanja gljiva iz roda *Colletotrichum* patogenih za lucerku u Srbiji izvedeni su zaključci.

♣ Redovnim pregledom useva lucerke u 17 lokaliteta gajenja u Srbiji, zabeležena je pojava intenzivnih simptoma antraknoze biljaka lucerke. Procenjeni prosečni intezitet zaraze pregledanih površina pod lucerkom, bilo je oko 30%, štete su uvećane usled proređivanja i propadanja lucerišta u narednoj godini. Izolacijom fitopatogenih gljiva iz zaraženih biljaka lucerke u polju, izdvojeno je ukupno 80 izolata *Colletotrichum* spp. kojima je potvrđena patogenost veštačkim inokulacijama klijanaca lucerke.

♣ Tokom izolacije i gajenja za proveru patogenosti, uočene su izvesne morfološke osobine koje su bile zajedničke za neke izolate, tako da je izvršeno njihovo grupisanje. Za nastavak istraživanja, odabrano je 18 izolata, koji su međusobno upoređivani u cilju pravilne identifikacije i utvrđivanja njihovog taksonomskog međuodnosa. Ispitivani izolati takođe su upoređivani sa tri referentna izolata vrsta *C. trifolii* (C-86-2 rasa 1 i CBS 158.83) i *C. destructivum* (CC657). Odabrani izolati svrstani su u tri morfološke grupe na osnovu međusobne sličnosti kao i sličnosti sa referentnim izolatima. Izolat prve grupe (Coll-4) identifikovan kao *C. trifolii*, izolati druge grupe (Coll-3, Coll-8, Coll-9, Coll-10, Coll-11, Coll-18, Coll-29, Coll-32, Coll-35, Coll-37, Coll-38, Coll-48, Coll-68, Coll-75, Coll-AŠ, Coll-BK) identifikovani kao *C. destructivum*, a izolat Coll-44 identifikovan je do nivoa roda kao *Colletotrichum* sp.

♣ Testovi patogenosti obavljeni su primenom dve metode, veštačkom inokulacijom korena klijanca i inokulacijom isečaka korena lucerke sorte K-28 u *in vitro* i dokazali su patogenost svih 18 odabranih izolata. Primenjene metode provere patogenosti nisu se razlikovale po dobijenim rezultatima, obe metode imaju prednosti jer se do rezultata dolazi brzo, koristi se uniformna i tačno određena količina inokuluma, što omogućava tačnije poređenje, ponovljivost ogleda i otvara mogućnost da se metode koriste za preliminarno ocenjivanje otpornosti/osetljivosti genotipova lucerke.

♣ Proučavanje eksperimentalnih domaćina potvrdilo je formiranje morfoloških grupa izolata. Izolati prve grupe identifikovani kao *C. trifolii*, ispoljili su visok nivo

specijalizacije zaražavajući intenzivno biljke lucerke i crvene deteline. Grupa izolata koja je identifikovana kao *C. destructivum* ispoljila je takođe visok nivo specijalizacije, tako što su ostvarili infekcije na sejancima lucerke, crvene deteline i pasulja. Treća morfološka grupa izolata identifikovana do nivo roda *Colletotrichum* sp. Coll-44, ispoljila je visok nivo specijalizacije prema biljkama lucerke, crvene deteline, lana i poponca.

♣ Proučavane makroskopske i mikroskopske morfološke osobine odabranih izolata iz lucerke iz Srbije u kompleksu vrsta *Colletotrichum*, pružile su stabilnu mogućnost za njihovo razlikovanje. S obzirom da vrste roda *Colletotrichum* imaju sposobnost da variraju u morfološkim osobinama (oblik i veličina konidija, oblik i veličina apresorija, mogućnost formiranja seta u kulturi, boja kolonija), dve hranljive podloge uključene u istraživanja omogućile su razlikovanje i grupisanje svih odabranih izolata i njihovu identifikaciju do vrste, što je nadalje i potvrđeno molekularnim metodama identifikacije. Imajući u vidu izuzetnu varijabilnost *Colletotrichum* spp. neophodna je oprezna primena morfoloških kriterijuma u taksonomske svrhe. Izolati identifikovani kao *C. trifolii* imali su cilindrične, zaobljene na oba kraja konidije, sete septirane 1-3 septe, formiraju apresorije koje su sferičnog i glavičastog oblika. Izolati identifikovani kao *C. destructivum* imali su cilindrične i zaoštrene na jednom kraju a zaobljene na drugom kraju konidije, sete septirane 1-7 septe, obrazuju apresorije izduženog i nepravilnog oblika. *Colletotrichum* sp. izolat Coll-44, čije su konidije prave cilindrične na jednom kraju zaobljene a na drugom blago zaoštrene, sete septirane 1-3 septe, obrazuje apresorije izduženog i jajolikog oblika, .

♣ Reakcijom umnožavanja ciljane DNK ispitivanih izolata uz primenu različitih prajmera zabeležena je razlika u specifičnosti i pogodnosti detekcije sekvenci tri različita dela genoma (ITS rDNK, region introna gena za glutamin sintetazu (GS) i region introna gena za glicer aldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GPDH)).

♣ Molekularna detekcija, sekvencioniranje i filogenetske analize odgovarajućih delova genoma pružile su mogućnost da se preciznije proučava razdvajanje vrsta roda *Colletotrichum*, da se identifikuju nepoznati izolati i da se ustanove međudnosi između poznatih vrsta. Višestrukim poređenjem sekvenci dobijenih sekvencioniranjem odgovarajućih delova DNK, sa dostupnim sekvencama odgovarajućih regiona genoma gljiva u GenBank bazi podataka i proračunom genetičke sličnosti, obavljena je potvrda

morfološke identifikacije svih odabranih izolata iz lucerke. Na taj način utvrđeno je da odabrani izolati pripadaju vrstama roda *Colletotrichum*: *C. trifolii* i *C. destructivum*, kao i delimično identifikovanom taksonu *Colletotrichum* sp. Coll-44.

♣ Rekonstrukcijom filogenetskih stabala dat je doprinos u rasvetljavanju evolutivne međupovezanosti različitih izolata što je pružilo uvid u prisustvo i rasprostranjenost vrsta *Colletotrichum* u našoj zemlji. Uspešna primena protokola za molekularnu identifikaciju *Colletotrichum* vrsta, *C. trifolii*, *C. destructivum* i *Colletotrichum* sp. Coll-44 koji čine kompleks u Srbiji, na osnovu sekvenci regiona introna za GS gen i regiona introna za GPHD gen predstavljaju početak i osnovu proučavanja filogeografske distribucije ovih vrsta u Srbiji.

♣ Primena PCR RFLP metode korišćenjem dve kombinacije restrikcioni enzima, omogućilo je razlikovanje vrsta unutar roda *Colletotrichum*. Naročito je značajno što dobijeni rezultati predstavljaju brzo i lako razlikovanje ovih vrsta od morfološki sličnih vrsta iz *Colletotrichum* kompleksa, što je obavljeno prvi put u Srbiji.

♣ Rezultati ovih istraživanja pokazuju jasno razlikovanje, na osnovu vegetativne komatibilnosti, između vrsta kompleksa *Colletotrichum* na lucerki i crvenoj detelini u Srbiji. Ustanovljeno je da je samo jedan izolat identifikovan kao *C. trifolii* (Coll-4) i svrstan je u istu VC grupu sa referentnim izolatima C-82-2 i CBS158.83. Svi izolati vrste *C. destructivum* poreklom iz Srbije, pripadaju jednoj od pet VC grupa od kojih su tri uključile izolate iz različitih i geografski udaljenih lokaliteta sa teritorije Srbije kao i izolate poreklom iz različitih biljaka domaćina. Prema rasporedu izolata u VC grupe unutar populacije vrste *C. destructivum* nije ustanovljena korelacija između njihove. Ovo ukazuje da je populacija vrste *C. destructivum* poreklom iz Srbije, genetički varijabilna. Izolat iz treće morfološke grupe Coll-44 je svrstan u posebnu VC grupu što potvrđuje da nije srodan ni sa jednom ostalih *Colletotrichum* vrsta u Srbiji.

♣ Rezultati ispitivanja u okviru ove disertacije ukazali su na postojanje značajnog nivoa osetljivosti većine komercijalnih sorti lucerke i crvene deteline prema vrstama *Colletotrichum* spp. Od testiranih domaćih i stranih komercijalnih genotipova lucerke, u uslovima postavljenog eksperimenta može se zaključiti da su određeni nivoi otpornost i prema izolatima I morfološke grupe identifikovane kao *C. trifolii* ispoljile komercijalne sorte Florida 77, Vernal S i genotip Banja Luka. Američke sorte Affinity 401+Z, Vernal S i Florida pokazale značajnu osetljivost prema izolatima II morfološke

grupe identifikovane kao *C. destructivum*, kao i NS Slavija i Zaječarska 83 od domaćih sorti. Međutim, genotip Banja Luka je ispoljio povišen nivo otpornosti prema ispitivanim izolatima II morfološke grupe. Prema izolatu treće morfološke grupe Coll-44 identifikovanom kao *Colletotrichum* sp. Povišen nivo otpornost pokazuju sorte Zaječarska 83 i Osječka 12, dok su američke sorte Perry, Vernal S, Florida 77 i Affinity 401+Z pokazale veliku osetljivost.

♣ Ispitivanje taksonomskog mesta različitih izolata *Colletotrichum* kompleksa iz Srbije, obavljeno u okviru ove doktorske disertacije pružilo je uvid u prisustvo i rasprostranjenost vrsta ovog kompleksa u našoj zemlji. Takođe, u okviru ove disertacije izolovan je i izolat Coll-44 koji po svojim osobinama pripada rodu *Colletotrichum*, ali po svojim svojstvima ne odgovara ni jednoj od opisanih vrsta na lucerki. U našoj zemlji ovi preliminarni rezultati ukazuju da je ovo značajno pitanje sa čijim proučavanjem će biti nastavljeno. Dokazano prisustvo tri različite vrste ukazuju na veću raznovrsnost populacije vrsta roda *Colletotrichum* na lucerki u Srbiji nego što se do sad znalo.

♣ Taksonomski kriterijumi, razvijeni molekularni protokoli i okarakterisani izolati *Colletotrichum* kompleksa u Srbiji predstavljaju osnovu koja se može primeniti za razlikovanje novih izolata gljiva ovog kompleksa. Rezultati ovih istraživanja pružili su uvid u postojanje određenog nivoa otpornosti pojedinih komercijalnih sorti lucerke prema predominantnim vrstama *Colletotrichum* spp. u Srbiji. Dobijeni rezultati i izdvojeni genotipovi lucerke korišće se dalje u programima selekcije u cilju poboljšanja otpornosti, tako stvarajući osnovu za primenu otpornosti kao najefikasnijeg i ekonomski najprihvatljivijeg načina kontrole antraknoze na lucerki.

8. LITERATURA

Agrios, G.M. (1997): Plant diseases caused by fungi. Plant Pathology. 4th ed. Academic Press, San Diego, USA. 265-509.

Allen, S.J., Barnes, G.L., Caddel, J.L. (1982): A new race of *Colletotrichum trifolii* on alfalfa in Oklahoma. Plant Disease 66, 922-924.

Allen, D.J., Lenné, J.M. (1998): Disease as a constraint to production of legumes in agriculture. In "The Pathology of Food and Pasture Legumes" by Allen, D. J. and Lenné, J. M., eds CAB International. Wallingford. UK: 1-61.

Armour, D.J., Mackie, J.M., Musial, J.M., Irwin, J.A.G. (2008): Transfer of anthracnose resistance and pod coiling traits from *Medicago arborea* to *M. sativa* by sexual reproduction. Theoretical and Applied Genetics 117: 149-156.

Ariss, J.J., Rhodes L.H. (2007): A New Race of *Colletotrichum trifolii* Identified on Alfalfa in Ohio. Plant Diseases, Volume 91, Number 10, pp. 1362.

Arsenijević, M., Klement, Z. (1969): Bacterial stem blight and wilt of lucerne in Yugoslavia. Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae 4: 111-116.

Arsenijević, M., Draganić, M., Trkulja, V. (1996): Vrste roda *Colletotrichum* utvrđene na teritoriji prethodne i sadašnje Jugoslavije (1926-1995). Zaštita bilja, Vol. 47(1), 215: 5-25.

Arsenijević, M. (1997): Bakterioze biljaka. S print, Novi Sad, pp: 189-576.

ARS Fungal Databases, <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> (2012).

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.

Arx, J.A. von (1981): The genera of fungi sporulating in pure culture (3th Ed.). J. Cramer, Vaduz.

Babović, M. (1968): Virus diseases of alfalfa in Yugoslavia. (In Serbo-Croatian; English summary) Zaštita Bilja 19: 335-410.

Babović, M., Mijatović, M. (1985): Studies of cucumber mosaic virus on bean and alfalfa. *Mikrobiologija* 21: 119-128.

Bailey, J.A., Jeger, M.J. (1992): *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control. CAB International. Wallingford, UK.

Balaž, J., Popović, T. (2005): Bakterioze lucerke i deteline. *Biljni lekar*, Novi Sad, br. 5: 579-583.

Barnes, D.K., Ostazeski, S.A., Schillinger, J.A., Hanson, C.H. (1969): Effect of Anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) Infection on Yield, Stand, and Vigor of Alfalfa. *Crop Science* 9, 344-346.

Baxter, A.P., Westhuizen, G.C.A. van der, Eicker, A. (1983): Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. *South African Journal of Botany* 2: 259-289.

Baxter A.P., van der Westhuizen, G.C.A. (1984): A synoptic key to South African isolates of *Colletotrichum*. *South African Journal of Botany* 3: 265-266.

Baxter, A.P., Westhuizen, G.C.A. van der, Eicker, A. (1985): A review of literature on the the taxonomy, morphology and biology of the fungal genus *Colletotrichum*. *Phytophylactica* 17: 15-18.

Boland, G.J., Brochu, L.D. (1989): *Colletotrichum destructivum* on alfalfa in Ontario and cultivar response to anthracnose. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11: 303-307.

Broad Institute *Colletotrichum* Genome Database,

http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/colletotrichum_group (2012).

Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Waller, J., Abang, M.M., Zhang, J.Z., Yang, Y.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, R.G., McKenzie, E.H.C., Johnston, P.R. (2009): A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39: 183-204.

Cannon, P.F., Bridge, P.D., Monte, E. (2000): Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum*, Host Specificity, pathology, and Host – Pathogen Interaction (Eds. Prusky, D., Freeman, S., and Dickman, M.B.), pp. 1-20. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.

Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S (2012): *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181–213. Published online: 15. September 2012; doi:10.3114/sim0014. Hard copy: September 2012.

Cano, J., Guarro, J., Gené, J. (2004). Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum* Species of Clinical Interest. *Journal of Clinical Microbiology* 42(6): 2450-2454.

Charudattan, R. (2005): Use of plant pathogens as bioherbicides to manage weeds in horticultural crops. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 118: 208-214.

Chen, C., Dickman, M.B. (2002): *Colletotrichum trifolii* TB3 Kinase, a COT1 Homolog, Is Light Inducible and Becomes Localized in the Nucleus during Hyphal Elongation. *Eukaryotic Cell*, 1(4): 626-633.

Chi, C. C., Childers, W. R., Hanson, E. W. (1964): Penetration and subsequent development of three *Fusarium* species in alfalfa and red clover. *Phytopathology* 54: 434-437.

Correll, J.C., Klittich, C.J.R., Leslie, J.K. (1987): Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77: 1640-1646.

Correll, J.C., Morelock, T.E., Guerber, J.C. (1993): Vegetative compatibility and virulence of the spinach anthracnose pathogen, *Colletotrichum dematium*. *Plant Diseases* 77: 688-691.

Correll, J.C., Guerber, J.C., Wasilwa, L.A., Sherrill, J.F., Morelock T.E. (2000): Inter- and Intra-Species Variation in *Colletotrichum* and Mechanisms which affect Population Structure. In "*Colletotrichum* Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction" by Prusky, D., Freeman, S., Dickman, M.B, eds. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, 145-179.

Damm, U., Woudenberg, J.H.C., Cannon, P.F., Crous, P.W. (2009): *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39: 45-87.

Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C. and Crous, P.W. (2012a): The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 37-113.

Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Johnston, P.R., Weir, B. S., Tan, Y.P., Shivas R.G. i Crous, P.W. (2012b): The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73: 1–36.

Day, J.P., Shattock, R.C. (1997): Aggressiveness and other factors relating to displacement of population of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *European Journal of Plant Pathology* 103: 379–391.

DeMarsay, A., Oudemans, P.V. (2004): Blueberry anthracnose: From bud infection to fruit rot. *Phytopathology* 94: 25.

Devine, T.E., Hanson, C.H., Ostazeski, S.A., Campbell, T.A. (1971): Selection for Resistance to Anthracnose (*Colletotrichum trifolii*) in Four Alfalfa Populations. *Crop Science* 11: 854-855.

Devine, T.E., Hanson, C.H., Ostazeski, S.A., Hunt, O.J. (1973): Registration of alfalfa germplasm. *Crop Science* 13: 289.

Devine, T.E., Raticliffe, R.H., Rincker, C.M., Barnes, D.K., Ostazeski, S.A., Busbice, T.H., Hanson, C.H., Schillinger, J.A., Buss, G.R., Cleveland, R.W. (1975): Registration of Arc alfalfa. *Crop Science* 15: 97.

Dhingra, O.D., Sinclar, J.B. (1995): *Basic Plant Pathology Methods*, second edition. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.

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.

Du, M., Schardl, C. L., Nuckles, E. M., Vaillancourt, L. (2005): Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia* 97: 641-658.

Đukić, D. i Erić P. (1995): *Lucerka*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Đukić, J.D., Stevanović, I.S., Janjić, R.J. (2009): *Proizvodnja stočne hrane na oranicama i travnjacima*, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet, Čačak.

Elgin, J.H., Jr. Ostazeski, S.A. (1982): Evaluation of Selected Alfalfa Cultivars and Related Medicago Species for Resistance to Race 1 and Race 2 Anthracnose. *Crop Science* 22: 39-42.

Elgin, J.H., Jr. Ostazeski, S.A. (1985): Inheritance of Resistance to Race 1 and Race 2 Anthracnose in Arc and Saranc Ar Alfalfa ¹. *Crop Science* 25: 861-865.

Elmer, W.H. (1991): Vegetative compatibility groups of *Fusarium proliferatum* from asparagus and comparasions of virulence, growth rates, and colonization of asparagus residues among groups. *Phytopathology* 81: 852-857.

Figueirêdo, L.C., Figueirêdo, G.S., Quecine, M.C., Cavalcanti, F.C.N., Santos, A.C., Costa, A.F., Oliveira, N.T., Azevedo, J.L. (2012): Genetic and pathogenic diversity of *Colletotrichum gleosporioides*, the causal agent of cashew anthracnose. *Journal of Fundamental and Applied Life Sciences* ISSN: 2231-6345 (Online) An Online International Journal Available at <http://www.cibtech.org/jls.htm>, Vol. 2(1): 250- 259.

Frayssinet, S. (2008): *Colletotrichum destructivum* a new lucerne pathogen in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes* 3: 68.

Freeman, S., Pham, M., Rodriguez, R.J. (1993): Molecular Genotyping of *Colletotrichum* Species Based on Arbitrarily Primed PCR, A + T-Rich DNA, and Nuclear DNA Analyses. *Experimental Mycology* 14: 309-322.

Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. (1998): Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits. *Plant Diseases* 82: 596-605.

Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., Shabi, E. (2000a): Molecular Analyses of *Colletotrichum* Species from Almond and Other Fruits. *Phytopathology*, Vol. 90(6): 608-614.

Freeman, S., Shabi, E., Katan, T. (2000b): Characterization of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose of Anemone (*Anemone coronaria* L.). *Applied and environmental microbiology*, Vol. 66(12): 5267–5272.

Freeman, S., Horowitz, S. Sharon, A. (2001): Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. *Phytopathology* 91: 986-992.

Frost, R.R. (1964): Seta formation in *Colletotrichum*. *Nature* 201: 730-731.

Förster, H., Adaskaveg, J.E. (1999): Identification of subpopulations of *Colletotrichum acutatum* and epidemiology of almond anthracnose in California. *Phytopathology* 89: 1056-1065.

García-Pajón, C.M., Collado, I.G. (2003): Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Natural Product Reports*, 20: 426-431.

Goodwin, P.H. (2001): A molecular weed–mycoherbicide interaction: *Colletotrichum gleosporioides* f. sp. *malvae* and round-leaved mallow, *Malva pusilla*. *Canadian Journal Plant Pathology* 23: 28–35.

Graham, J.H., Devine, T. E., Hanson, C.H. (1976): Occurrence and Interaction of Three Species of *Colletotrichum* on Alfalfa in the Mid-Atlantic United States. *Phytopathology*, 66: 538-541.

Gray, F., Hollingsworth, C., Koch. D. (2003): "B-1136 Alfalfa Disease Management". University of Wyoming. A full copy of this publication can be accessed at www.uwyo.edu/ces/plantsci.htm (accessed may, 2003).

Guerber, J.C., Liu, B., Correll, J.C., Johnston, P.R. (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.

Hall T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Hawksworth, D.L., Graham, S.O. (1974): *Mycologists Handbook*. Commonwealth mycological Institute, Kew, England.

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.

Henderson, R.G., Smith, T.J. (1948): A Crown Rot of Alfalfa Caused by *Colletotrichum trifolii*. *Phytopathology* 38: 570.

Hu Sun, Jing-Ze Zhang (2009): *Colletotrichum destructivum* from cowpea infecting *Arabidopsis thaliana* and its identity to *C. higginsianum*. *European Journal of Plant Pathology* 125: 459–469.

Hyde, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z. and Prihastuti, H. (2009a). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39: 1-17.

Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Yang, Y.L. and Zhang, J.Z. (2009b). *Colletotrichum* - names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147-182.

Index Fungorum, <http://www.indexfungorum>. IMA Fungus 3, No 1, June 2012.

Irwin, J.A.G. (1974): Crown rot of Lucerne in Queensland caused by *Colletotrichum trifolii*. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 14: 197-200. Volume 3 No. 1 June 2012.

- Ivanović, M.** (2005): Bolesti lista lucerke i deteline. Biljni lekar, Novi Sad, 5: 557-564.
- Ivanović, M., Ivanović, D.** (2001): Mikoze i pseudomikoze bilja. P.P. De-eM-Ve. Beograd.
- Jasnić, S.** (2005): Viroze lucerke i deteline. Biljni lekar, Novi Sad, 5: 576-579.
- Johnston, P.R., Jones D.** (1997): Relationship among *Colletotrichum* isolates from fruit rots assessed using rDNA sequences. Mycologia 89: 420-430.
- Johnston, P.R., Lardner, R., Jones, D., Plummer, K.M.** (1998): The importance of phylogeny in understanding host relationships within *Colletotrichum*. Phytoparasitica 26: 351.
- Johnston, P.R.** (2000): The importance of phylogeny in understanding host relationships within *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum, Host Specificity, Pathology, and Host –Pathogen Interaction* (Eds. Prusky, D., Freeman, S., and Dickman, M.B.), pp. 21-28. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Jones, E.R., Carroll, R.B., Swain, R.H., Bell, K.W.** (1978): Role of anthracnose in stand thinning of alfalfa in Delaware. Agronomy Journal 70: 351-353.
- Katan, T., Primo, D.P.** (1999): Current status of vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum*: Supplement (1999). Phytoparasitica 27(4): 273-277.
- Katan, T.** (2000): Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In "*Colletotrichum* Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction" by Prusky, D., Freeman, S., Dickman, M.B, eds. The American Phytopatological Society St. Paul, Minnesota, 45-56.
- Kim, K.H., Yoon, J.B., Park, H.G., Kim, Y.H.** (2004): Structural modification and programmed cell death of chili pepper fruit related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. Phytopathology, 94: 1295-1304.
- Koch, S. H., Baxter, A. P., Knox-Davies, P. S.** (1989): Identity and pathogenicity of *Colletotrichum* species from *Medicago sativa* in South Africa. Phytophylactica 21: 69-78.
- Kojić, M.** (1984): Botanika. Naučna knjiga, Beograd.pp. 519.
- Krnjaja, V., Ivanović, M., Lević, J., Tomić, Z.** (2005): Bolesti korena lucerke i mere suzbijanja. Biljni lekar, Novi Sad, 5: 565-576.

Krnjaja, V. (2005): Uloga *Fusarium* spp. u kompleksu prouzročivača truleži korena lucerke (*Medicago sativa* L.). Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd, pp. 1-124.

Kuprevič, B.F. (1954): Bolezni klevra i lucerne. Moskva-Lenjingrad.

Kyung, J. C., Wan, G. K., Hong, G. K., Hyo, W. C., Young, K. L., Byung, D. L., Sangm, Y. L., Sung, K. H. (2011): Morphology, Molecular Phylogeny and Pathogenicity of *Colletotrichum panacicola* Causing Anthracnose of Korean Ginseng. The Plant Pathology Journal 27 (1), pp. 1-7.

Lamprecht, S. C. (1986): Reaction of annual *Medicago* species to *Colletotrichum* crown rot caused by *Colletotrichum trifolii*. Phytophylactica 18: 183-185.

Latunde-Dada, A.O., Bailey, J.A., Lucas, J.A. (1997): Infection process of *Colletotrichum destructivum* O’Gara from lucerne (*Medicago sativa* L.). European Journal of Plant Pathology 103: 35–41.

Lantunde-Dada, A.O., O’Connell, R.J., Bowyer, P., Lucas, J.A. (1999): Cultivar resistance to anthracnose disease of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) caused by *Colletotrichum destructivum* O’Gara. European Journal of Plant Pathology 105: 445-451.

Latunde-Dada, A.O., Lucas, J.A. (2007): Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. Plant Pathology 56: 437–447.

Laviola, C. (1963): Osservazioni sull’ antracnosi dell’ erba Medica (*Medicago sativa* L.) in Puglia, Annali della Facolta di Agraria Universita di Bari, 337-346.

Leandro, L.F.S., Gleason, M.L., Nutter, F.W., Wegulo, Jr.S.N., Dixon, P.M. (2001): Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. Phytopathology 91: 659-664.

Leandro, L.F.S., Gleason, M.L., Nutter, F.W., Wegulo, S.N., Dixon, P.M. (2003a): Influence of temperature and wetness duration on conidia and appresoria of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. Phytopathology 95: 513-520.

Leandro, L.F.S., Gleason, M.L., Nutter, F.W., Wegulo, S.N., Dixon, P.M. (2003b): Strawberry plant extracts stimulate secondary conidiation by *Colletotrichum acutatum* on symptomless leaves. Phytopathology 93: 1285-1291.

Leslie, J.F., Yamashiro, C.T. (1997): Effects of the *tol* mutation on allelic interactions at *het* loci in *Neurospora crassa*. *Genome* 40: 834-840.

Leslie, J.F., Zeller, K. (1997): Mutants that blur the line between biological species and vegetative compatibility groups. *Cereal Research Communications* 25(3/2): 539-542. (Fifth European Fusarium Seminar, Szeged, Hungary, 1997).

Leslie, J.F., Summerell, B.A. (2006): Vegetative Compatibility Groups (VCGs). In "The *Fusarium* Laboratory Manual" (eds. Leslie, J.F. and Summerell, B.A.), pp 31-43. Blackwell Publishing, Australia.

Lević, J. (2008). Vrste roda *Fusarium*. Cicero, Beograd, pp. 1226.

Linné, J.M. (1992): *Colletotrichum* disease of legumes. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*, by Bailey, J.A. and Jeger, M.J. eds. Cab International. Wallingford. UK. 134-166.

Liu, B., Wasilwa, L.A., Morelock, T.E., O'Neill, N.R., Correll, J.C. (2007): Comparison of *Colletotrichum orbiculare* and several allied *Colletotrichum* spp. for mtDNA RFLPs, intron RFLP and sequence variation, vegetative compatibility, and hostspecificity. *Phytopathology* 97: 1305-1314.

Li-Pyung, A., Soonok, K., Kyung-Hwan, I., Yong-Hwan, L. (2003): Vegetative compatibility grouping and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different host plants. *Plant Pathology Journal*, 19(6): 269-273.

Lugić, Z. i Dinić, B. (2010): Proizvodnja, konzervisanje i iskorišćavanje kabaste stočne hrane kao osnovni uslov održivog razvoja stočarstva. Simpozijum, Tradicija i budućnost stočarstva u brdsko planinskom području sa posebnim osvrtom na sjeničko peštarsku visoravan. Zbornik radova, Sjenica, 22-24. jun, 20-49.

Lukezić, F.L. (1974): Dissemination and Survival of *Colletotrichum trifolii* Under Field conditions. *Phytopathology* 64: 57-59.

Lukić, D. (2000): Lucerka. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.

Lušin, V., Brnetić, D., Keglević, S. (1971): Izveštajna služba zaštite bilja u SR Hrvatskoj u 1970. Biljna zaštita, 1: 1-28.

Mackie, J.M., Irwin, J.A.G. (1998): Genetics and race variability of the Lucerne-*Colletotrichum trifolii* pathosystem in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 49: 713-722.

Mackie, J.M., Musial, J., O'Neill, N.R., Irwin, J.A.G. (2003): Pathogenic specialization within *Colletotrichum triflii* in Australia, and lucerne cultivars reactions to all known Australian pathotypes Australian Journal of Agricultural Research 54: 829-836.

Maharaj, A., Rampersad, S.N. (2012): Genetic Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* Associated with Anthracnose Disease of Papaya (*Carica papaya* L.) and Bell Pepper (*Capsium annuum* L.) Based on ITS PCR-RFLP Fingerprinting. Molecular Biotechnology, Vol. 50(3): 237-249.

Manandhar, J.B., Hargman, G.L., Sinclair, J.B. (1986). *Colletotrichum destructivum*, the anamorph of *Glomerella glycines*. Phytopathology 76: 282-285.

Mijušković, M. (1993): Najčešće mikoze lucerke u Crnoj Gori. Poljoprivreda i šumarstvo, XXXIX (3-4): 55-64.

Milijić, S., Spasić, M., Perišić, M., Babović, M. (1984): Proučavanje uzročnika propadanja lucerke. Glasnik zaštite bilja, 9-10: 329.

Milijić, S., Spasić, M., Perišić, M., Babović, M. (1986): Prilog proučavanju pojave sušenja i truljenja lucerke. Arhiv za poljoprivredne nauke 47, 165: 69-74.

Mills, P.R., Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E. (1994): Detection of the Anthracnose Pathogen *Colletotrichum*. In Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi. Identification, Detection and Quantification, by Brigde, Schots, A., Dewey, F.M., Oliver, R.P. eds. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK, 183-189.

Mirhendi, H., Ghiasian, A., Vismer, H. F., Asgary, M. R., Jalalizand, N., Arendrup, M. C., Makimura, K. (2010): Preliminary Identification and Typing of Pathogenic and Toxigenic Fusarium Species Using Restriction Digestion of ITS1 - 5.8S rDNA - ITS2 Region. Iranian Journal of Public Health, 39: 35-40.

Moncalvo, J.M. (2005): Molecular systematics: major fungal phylogenetic groups and fungal species concepts. In: Evolutionary genetics of Fungi (ed. J.P. Xu). Horizon Scientific Press, Norfolk: 1-33.

Moriwaki, J., Tsukiboshi, T., Sato (2002): Grouping of *Colletotrichum* Species in Japan Based on rDNA Sequences. Journal of General Plant Pathology 68: 307-320.

Mordue, J.E.M. (1971): *Glomerella cingulata*. CMI Descriptions of Pathogenic fungi and Bacteria, No. 315. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.

Mould, M.J.R., Robb, J., Boland, G.J. (1992): Loss of resistance to *Colletotrichum trifolii* in in vitro regenerated alfalfa. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28: 207-213.

Muntanola-Cvetković, M. (1987): Opšta mikologija. NIRO, Književne novine, Beograd. pp: 63-82.

Mmbaga, M., T., Shi, A., Kim, M., S. (2011): Identification of *Alternaria alternata* as a Causal Agent for Leaf Blight in *Syringa* Species. *The Plant Pathology Journal*. 27(2) : 120-127.

Ntahimpera, N., Wilson, L.L., Ellis, M.A., Madden, L.V. (1999): Comparison of rain effects on splash dispersal of the *Colletotrichum* species infecting strawberries. *Phytopathology* 89: 555-563.

Norman, D. J., Strandberg, J. O. (1997): Survival of *Colletotrichum acutatum* in soil and plant debris of leather leaf fern. *Plant Disease* 81: 1177-1180.

O'Connell, R.J., Nash, C., Bailey, J.A. (1992): Lecityn Cytochemistry: A New Approach to Understanding Cell Differentiation, Pathogenesis and Taxonomy in *Colletotrichum*. In ''*Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*'' by Bailey J. A. and Jegger M. J. eds CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 67-87.

O'Connell, R., Herbert, C., Sreenivasaprasad, S., Khatib, M., Esquerré-Tugayé, M.T. and Dumas, B. (2004): A novel *Arabidopsis-Colletotrichum* pathosystem for the molecular dissection of plantfungal interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 272-282.

O'Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., Torres, M., Damm, M.F., Buiate, U.E.A., Epstein, L., Alkan, N., Altmüller, J., Alvarado-Balderrama, L., Bauser, C.A., Becker, C., Birren, B.W., Chen, Z., Choi, J., Crouch, J.A., Duvick, J.P., Farman, M.A., Gan, P., Heiman, D., Henrissat, B., Howard, R.J., Kabbage, M., Koch, C., Kracher, B., Kubo, Y., Law, A.D., Lebrun, M.H., Lee, Y.H., Miyara I., Moore, N., Neumann, U., Nordström, K., Panaccione, D.G., Panstruga, R., Place, M., Proctor, R.H., Prusky, D., Rech, G., Reinhardt, R., Rollins, J.A., Rounsley, S., Schardl, C.L., Schwartz, D.C., Shenoy N., Shirasu, K., Sikhakolli, U.R., Stüber, K., Sukno, S.A., Sweigard, Y., Takano, H., Takahara, Trail, F., van der Does, H.C., Voll, L.M., Will, I., Young, J.A., S., Zeng, Q., Zhang, J., Zhou, S., Dickman, M.B., Schulze-Lefert, P., van Themaat, E.V.L., Ma, L.J., Vaillancourt, L.J. (2012): Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, Vol. 44(9): 1060-1066.

Ogle, H.J., Irwin, J.A.C., Cameron, D.F. (1986): Biology of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from tropical pasture legumes. *Australian Journal of Botany* 34: 537-550.

O'Neill, N.R., Elgin, J.H., Jr. and Baker, C.J. (1989): Characterization of Induced Resistance to Anthracnose in Alfalfa by Races, Isolates and Species of *Colletotrichum*. *Phytopathology* 79: 750-756.

O'Neill, N.R. (1996): Pathogenic Variability and Host Resistance in the *Colletotrichum trifolii*/*Medicago sativa* Pathosystem. *Plant Disease* 80: 450-457.

O'Neill, N.R., van Berkum, P., Lin, J.J., Kuo, J., Ude, G.N., Kenworthy, W., Saunders, J.A. (1997): Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytopathology* 87: 745-750.

O'Rourke, C.J., Milliar, R.L. (1966): Root rot and root microflora of alfalfa as affected by potassium nutrition. Frequency of cutting, and leaf infection. *Phytopathology*, Vol. 56: 1040-1046.

O'Rourke, C.J. (1976): Diseases of Grasses and Forage Legumes in Ireland. An Foras Taluntais, Carlow, Ireland.

Ocokojić, S., Mijatović, M., Čolić, D., Bošnjak, D., Milošević, P. (1983): Višegodišnje leptirnjače. Prirodni i sejani travnjaci. NOLIT, 118-141.

Ostazeski, S.A., Barnes, D.K., Hanson, C.H. (1969): Laboratory Selection of Alfalfa for Resistance to Anthracnose, *Colletotrichum trifolii*. *Crop Science*, 9: 351-354.

Ostazeski, S.A., Elgin, J.H., Jr., McMurtray, J.E. (1979): Occurrence of anthracnoses on formerly anthracnose-resistant "Arc" alfalfa. *Plant Disease Report* 63: 734-736.

Ostazeski, S.A., Elgin, J.H., Jr. (1982): Physiological races of *Colletotrichum trifolii*. *Phytopathology*, 70: 691.

Peres, N.A., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E., Correll, J.C. (2005): Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 89: 784-796.

Perfect, S.E., Hughes, H.B., O'Connell, R.J., Green, J. (1999): *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics Biology* 27: 186-198.

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.

Pieczul, K. and Rataj-Guranowska, M. (2004): *Colletotrichum* species causing lupinus anthracnose in Poland. *Phytopathol. Pol.* 34: 59-70.

Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. (2009): Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. *Fungal Diversity* 39: 89-109.

Prusky, D. (1996): Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology* 34: 413-434.

Puhalla, J.E. (1985): Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the bases of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* 63: 179-183.

Putnam, D. H., Summers, C. G., Orloff, S. B. (2007): Alfalfa Production Systems in California. An introduction to alfalfa production systems in California. *Irrigated Alfalfa Manual*. University of California. Publication 8287, 12/2007. <http://anrcatalog.ucdavis.edu/>.

Quiros, C.F., Bauchan, G.R. (1988): The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In *Alfalfa and alfalfa improvement*. Published by American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, 93-124.

Radović, J. Sokolović D., Lugić Z., Anđelković S., Štrbanović R. (2010): Genetic diversity within and among alfalfa varieties for some traits. Ch 45, 319-324. In: C. Huyghe (ed.) *Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding*. Springer.

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*. (<http://edis.ifas.ufl.edu/PP104>).

Robotić, V., Klokočar-Šmit, Z. (1983a): *Colletotrichum trifolii* Bain et Essary prozrokoval antraknoze lucerke. *Zaštita bilja, Beograd*. 34(2), 164: 225-239.

Robotić, V., Klokočar-Šmit, Z., Đukić, D. (1983b): Reakcija nekih sorti lucerke prema *Colletotrichum trifolii* Bain et Essary. *Zbornik naučnih radova sa IV Jugoslovenskog simpozijuma o krmnom bilju, Novi Sad*, 378-386.

Schietinger, von R. (1970): Vergleichende Untersuchungen über Erreger der Luzerne + Anthraknoze *Colletotrichum* spp. *Z. Pflanzenker. Pflanzenschutz*, 76: 12-24.

Schumacher, J., Meyer, N., Riesner, D., Wiedemann, H.L. (1986): Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by return-gel electrophoresis. *Journal of Phytopathology* 115: 332-343.

Shen S., Goodwin P., Hsiang T. (2001): Hemibiotrophic infection and identity of the fungus, *Colletotrichum destructivum*, causing anthracnose of tobacco. *Mycological Research* 105 (11): 1340-1347.

Sherriff, C., Whelan, M.J., Arnold, G.M., Lafay, J.F. (1994): Ribosomal DNA Sequence Analysis Reveals New Species Groupings in the Genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology* 18: 121-138.

Sherwood, R.T., Olah, A.F., Oleson, W.H., Jones, E.E. (1970): Effect of diseases and injury on accumulation of a flavonoid estrogen, coumestrol, in alfalfa. *Phytopathology* 60: 684-688.

Sinclair, J.B. (1999): Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Disease* 75: 220-224.

Smith, B.J., Black, L.L. (1990): Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease* 74: 69-76.

Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A.E., Mills, P.R. (1996): PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* 45: 650-655.

Stojanović, S. (1997): Epidemiološka i ekološka proučavanja *Colletotrichum gleosporioides*, superparazita stroma *Polystigma rubrum*. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

Stovold, G.E. (1981): Some crown and root diseases of lucerne. *The Agricultural Gazette of New South Wales* 92: 17-18.

Stuteville, D.L., Erwin, D.C. (1990). Compendium of alfalfa diseases, second edition. St. Paul, Minnesota USA: The American Phytopathological Society, Aps Press, 84.

Summerell, B.A. (2003): Vegetative Compatibility Groups. 5-38. KSU *Fusarium* Laboratory Workshop. Kansas State University Manhattan, KS, USA, 22-27.

Sun, H., Zhang, J.Z. (2009): *Colletotrichum destructivum* from cowpea infecting *Arabidopsis thaliana* and its identity to *C. higginsianum*. *European Journal of Plant Pathology* 125 (3): 459-469.

Sutton, B.C. (1966): Development of fructifications in *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. and related species. *Canadian Journal of Botany* 44: 887-897.

Sutton, B.C. (1980): The *Coelomycetes* – Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. CMI, Kew, Surrey, England, 190.

Sutton, B.C. (1992): The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In "Colletotrichum: Biology, Pathology and Control", by J. A. Bailey and M. J. Jeger, eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 1-26.

Takamatsu, S. (1998): PCR Applications in Fungal Phylogeny. In: "Applications of PCR in Mycology" (Eds Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A. and Elander R.P.), pp 125-152. CAB International, Wallingford, UK.

Talhinhas, P, Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., Oliveira, H. (2002). Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology* 92: 986–996.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011): MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Tapio, E. (1979): Virs diseases of legumes in Finland and in the Scandinavian countries. *Annales Botanici Fennici* 9: 7-97.

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.

Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T. (1994): Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4690.

Tiffany, L.H., Gillman, J.G. (1954): Species of *Colletotrichum* from Leguminosae. *Mycologia* 46: 52-75.

Trkulja, V. (2004). Patogene, morfološke i odgajivačke odlike *Colletotrichum* spp., prouzročivača gorke truleži ploda jabuke. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Beograd. pp. 1-163.

Troeung, D.M., Gosset, H. (1987). First observation of lucerne anthracnose in Eastern Morocco, *Agronomie* 7: 361-363.

Tu, J.C. (1983): Epidemiology of anthracnose caused by *Colletotrichum lindemuthianum* on white bean (*Phaseolus vulgaris*) in southern Ontario: survival of the pathogen. *Plant Disease* 65: 645-651.

Tunali, B., Berner, D.K., Dubin, H. (2008): First report of leaf spot caused by *Colletotrichum* cf. *linicola* on field bindweed in Turkey. *Plant Disease* 92: 316.

USDA (October 2010): Field Crops Usual Planting and Harvesting Dates 11, National Agricultural Statistics Service, <http://www.nass.usda.gov>

Vance, C.P., Heichel, G.H., Phillips, D.A. (1988): Nodulation and symbiotidinitrogen fixation. In *Alfalfa and alfalfa improvement*. Published by American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, 229-257.

van der Nest, M.A., Steenkamp, E.T., Slippers B., Mongae A., van Zyl K., Stenlid J., Wingfield M.J., Wingfield, B.D. (2011): Gene expression associated with vegetative incompatibility in *Amylostereum areolatum*. *Fungal genetics and Biology*, 48: 1034-1043.

Vale'rio, H.M., Resende, M.A., Weikert-Oliveira, R.C.B., C.R. Casela (2005): Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum graminicola* from Brazil. *Mycopathologia*, 159: 449-459.

Vasić, T. (2007): *Colletotrichum trifolii* (Bain et Essary), prouzrokovatelj antraknoze, u kompleksu propadanja lucerke u Srbiji. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet Zemun-Beograd, pp. 1-88.

Vasić, T., Radović, J., Lugić, Z., Marković, J., Jevtić, G., Gajić, S. (2009): Occurrence of *Colletotrichum trifolii* (Bain et Essary), the inducer of alfalfa anthracnose in Serbia. In: C. Huyghe (ed.) *Sustainable Use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding*. Ch 53, 369-374, Springer.

Vasić, T., Lugić, Z., Anđelković, S., Štrbanović, R., Marković, J., Gajić, S., Anđelković, B. (2010): The Impact of isolate *Colletotrichum trifolii* on resistance in different red clover cultivars. *Biotechnology in animal husbandry. XII International Symposium on Forage Crops of Republic of Serbia*, 26-28. May, Book 2(26), Spec. issue: 51-56.

Vasić, T., Anđelković, S., Živković, S., Anđelković, B., Terzić, D., Milenković, J. (2011a): Appearance and frequency of fungi on alfalfa seed in Serbia. *Proceedings 3rd International Congress "New Perspectives and Challenges of Sustainable Livestock Production"* Belgrade, Republic of Serbia 5 – 7th October. Vol 27(4): 1579-1584.

Vasić, T., Trkuljja, V., Rajčević, B., Živković, S., Anđelković, S., Marković, J. (2011b): Molecular and morphological determination isolates of *Colletotrichum trifolii* origination from alfalfa. Matica Srpska proceedings for natural sciences, Srbija, Novi Sad, 2011, No 120: 197-203.

Vico, I., Tošić, M., Krstić, B., Stojanović, G., Grebović, G. (1996): Prilog poznavanju etiologije propadanja lucerke. Zbornik naučnih radova sa X međunarodnog savetovanja agronoma i tehnologa. Arandelovac, februar 1996: 193-199.

Vinijanum, T., Irwin, J.A.C., Cameron, D.F. (1987): Host range of three strains of *Colletotrichum gleosporioides* from tropical pasture legumes, and comparative histological studies of interactions between Type B disease-producing strains and *Stylosanthes scabra* (non-host) and *S. guainensis* (host). Australian Journal of Botany, 35: 665-677.

Vučković, S. (1999): Krmno bilje. Institut za istraživanja u poljoprivredi "SRBIJA", BONART, Nova Pazova, Beograd, pp. 553.

Wajid Khan, M., Singh, R.K. (1974): Anthracnoses of arhar incited by *Colletotrichum truncatum*. Indian Phytopathology 27: 622-624.

Waller, J.M., Rithcie, B.J., Holderness, M. (1998): Plant clinic handbook. CAB International, Wallingford, Oxon.

Wharton, P.S., Uribeondo J.D. (2004): The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del Jardin Botanico de Madrid 61: 3-22.

Woo, S.L., Zoina, A., Del Sorbo, G., Lorito, M., Nanni, B., Scala, F., Noviello, C. (1996): Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli by pathogenic races, VCGs, RFLP, and RAPD. Phytopathology 86: 966-973.

Yang, Y.L., Liu, Z.Y., Cai, L., Hyde, K.D., Yu, Z.N., Mckenzie, E.H.C. (2009): *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. Fungal Diversity 39: 123-146.

Zhang, N., Castebury, A.L., Miller, N.A., Huhndorf, M.S., Shoch, L.C., Seifert, A.K., Rossman, Y.A., Rogers, D.J., Kohlmeyer, J., Kohlmeyer, B.V., Sung, G.H. (2006): An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on four-gene phylogeny. Mycologia 98: 1076-1087.

Šutić, D. (1995): Viroze biljaka. Poljoprivredni fakultet. Beograd. pp.69-87.(1-394).

Prilog 1. Sekvence ispitivanih izolata vrsta *Colletotrichum* spp. region introna gena za GPHD od oko 200 bp

>Coll4

GTACAATTGTTCCCTCTTTCAAATATCTCCAATGGCATTATGGCTTGCAACAA
CACTTTTGAGCGTGCTGGTATACTTCCAACGAGGACACCAAGCCGTCATGGT
GTCTCGGGATTCCGAGGGTTGCCAGCCAGAGTGATCGATGGCAGTCAGTGA
AGACAGTACACACGCTGACACTTTCATCTCCAG

>Coll10

CCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTACCACCCGCAT
TACCCTTCCAACAACATGAAACCACGCTTGCCGCTCACTCGCGGCAACATGT
GTTCAAGGATTATTGACAAATCCCATCCGAATTGCTCATGGCTGACGCATCA
TCCCCCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCC

>Coll29

CCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTACCACCCGCAT
TACCCTTCCAACAACATGAAACCACGCTTGCCGCTCACTCGCGGCAACATGT
GTTCAAGGATTATTGACAAATCCCATCCGAATTGCTCATGGCTGACGCATCA
TCCCCCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCC

>Coll32

CCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTACCACCCGCAT
TACCCTTCCAACAACATGAAACCACGCTTGCCGCTCACTCGCGGCAACATGT
GTTCAAGGATTATTGACAAATCCCATCCGAATTGCTCATGGCTGACGCATCA
TCCCCCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCC

>Coll48

CCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTACCACCCGCAT
TACCCTTCCAACAACATGAAACCACGCTTGCCGCTCACTCGCGGCAACATGT
GTTCAAGGATTATTGACAAATCCCATCCGAATTGCTCATGGCTGACGCATCA
TCCCCCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCC

>Coll68

CCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTACCACCCGCAT
TACCCTTCCAACAACATGAAACCACGCTTGCCGCTCACTCGCGGCAACATGT
GTTCAAGGATTATTGACAAATCCCATCCGAATTGCTCATGGCTGACGCATCA
TCCCCCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCC

>Coll75

CCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTGAGTACCACCCGCAT
TACCCTTCCAACAACATGAAACCACGCTTGCCGCTCACTCGCGGCAACATGT
GTTCAAGGATTATTGACAAATCCCATCCGAATTGCTCATGGCTGACGCATCA
TCCCCCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCC

>Coll44

CCGTCAACGACCCCTTCATTGAGACCAAGTACGCTGTAAGTACCACCCGCAT
TGCCCCTCCAACACCATAAAACCACGCTGGCCGCTCACTCGCGGCAACATG
TGTTCAAGGAGTATGGACAAATCCCGTCCGAATTGCTCATGGCTGACGAAT
CATCCCCCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCC

BIOGRAFIJA

Tanja P. Vasić (devojačko Gajić) rođena je 2. avgusta 1972. godine u Kruševca. Osnovnu i srednju školu završila u Kruševcu.

Školske 1991/92 upisala se na Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda. Fakultetsku diplomu stekla 25.septembra 1997. godine, odbranivši diplomski rad pod nazivom “*Alternaria alternata* (Fries.) Keisler, prouzrokovatelj pegavosti lista paradajza” sa ocenom 10. Od 22. avgusta 2001. godine zaposlena je u Institutu za krmno bilje u Kruševcu, na radnom mestu istraživača pripravnika-fitopatologa. Poslediplomske studije, na odseku za fitopatologiju, takođe na Poljoprivrednom fakultetu u Beogradu, upisala je školske 1997/98. Početkom 2002. godine za magistarski rad dobila je temu "*Colletotrichum trifolii* (Bain et Essary), prouzrokovatelj antraknoze, u kompleksu propadanja lucerke u Srbiji", pod rukovodstvom prof. dr Mirka Ivanovoća. Tokom 2005. i 2006. godine u više navrata je boravila na Poljoprivrednom institutu u Banja Luci, u cilju stručnog usavršavanja, pod rukovodstvom prof. dr Vojislava Trkulje.

Magistarski rad na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu–Beograd odbranila 14.05.2007., pod nazivom: "*Colletotrichum trifolii* (Bain et Essary), prouzrokovatelj antraknoze, u kompleksu propadanja lucerke u Srbiji".

Do sada je učestvovala u realizaciji četiri naučno-istraživačka projekta. Samostalno ili kao koautor objavila je 40 naučnih radova. Član je društva za zaštitu bilja Srbije. Živi u Varvarinu sa suprugom Dejanom i decom Sofijom i Pavlom.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: mr Tanja Vasić

broj indeksa 40/10-4.4

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Karakterizacija vrsta roda *Colletotrichum*, prouzrokovala antraknoze lucerke u

Srbiji i osetljivost genotipova

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranta

U Beogradu, 29. 03. 2013.

Stanka Bacuk

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: mr Tanja Vasić

Broj indeksa: 40/10-4.4

Studijski program: Poljoprivredne nauke

Naslov rada: Karakterizacija vrsta roda *Colletotrichum*, prouzrokovača antraknoze lucerke u Srbiji i osetljivost genotipova

Mentor: prof. dr Aleksandra Bulajić, vanredni profesor

Potpisani/a Tanja Vasić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 29. 03. 2013

Potpis doktoranta



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Karakterizacija vrsta roda *Colletotrichum*, prouzrokovaca antraknoze

lucerke u Srbiji i osetljivost genotipova

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u **Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu** mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranta

U Beogradu, 29. 03. 2013.

Marisa Bacut