

**CERCETĂRI FIZIOLOGICE ASUPRA UNOR SPECII
DE PENICILLIUM CARE ATACĂ GHINDA**

de prof. dr. C. C. GEORGESCU și dr. ST. ORENSKI

în colaborare cu EL. ZAHARIA

BUCUREȘTI

1955

CUPRINS

	Pag.
<i>Introducere</i>	475
I. <i>Penicillium granulatum</i>	477
A. Comportarea pe mediul solid, la diferite valori pH.	477
B. Comportarea pe mediul lichid, la diferite valori pH.	479
II. <i>Penicillium clavigerum</i>	482
Comportarea pe mediul solid, la diferite valori pH.	482
III. <i>Penicillium Duclauxii</i>	483
A. Comportarea pe mediul solid, la diferite valori pH	484
B. Comportarea pe mediul lichid, cu diferite surse de carbon	485
C. Comportarea față de tanin	485
IV. Experiențe de infecție artificială a ghindei	487
V. Concluzii	487

INTRODUCERE

Cercetările fiziologice făcute cu speciile Penicillium granulatum, P. clavigerum și P. Duclauxii au scopul de a lămurii unele din aspectele de interes teoretic, care apoi să ne ajute să tragem o serie de concluzii practice asupra atacurilor pe ghinde.

Caracterele morfologice care stau la baza diagnozei lor ca, de exemplu, forma, structura, colorația, zonarea coloniilor, formarea aparatelor fructifere (penicili și coremii) și alte asemenea caractere au o mare variabilitate în diferitele faze de creștere ale ciupercilor, în funcție de sursele de carbon, de starea lichidă sau solidă și, în sfârșit, de aciditatea mediului.

Este cunoscut că în vederea stabilirii caracterelor de determinare a speciilor de Penicillium, acestea se cultivă pe diferite medii nutritive standard. Experiențele de cultură s-au făcut pe mediul Czapek-Dox, în stare solidă și lichidă.

În cele ce urmează se dau observațiile făcute asupra culturilor după 7, 14 și 21 de zile de la inoculare, precum și concluziile noastre asupra variației caracterelor celor mai importante, folosite în distingerea acestor specii.

I. *PENICILLIUM GRANULATUM* Bainier

A. COMPORTAREA PE MEDIUL SOLID, LA DIFERITE VALORI pH

Ca mediu de cultură s-a folosit mediul Czapek, după formula Dox (cu fosfat bipotasie). Mediul a fost ajustat la următoarele valori de pH : 3 ; 4 ; 5,5 ; 6 ; 7 ; 8,5. Observațiile s-au făcut după 7, 14 și 21 de zile.

După 7 zile :

- la pH 3 ... nu se dezvoltă ;
- la pH 4 ... colonia mică, $\varnothing/1,5$ cm, circulară, cu o margine albă, îngustă, de 1 mm, zona centrală cu suprafața neregulată, granuloasă, de culoare albastră-verzuie-cenușie, acoperită de gutații galbene ; începe apariția coremiilor albe ; dosul coloniei, ruginiu-deschis, o foarte slabă colorație a mediului în galben-pal ;
- la pH 5,5 ... colonii rotunde pînă la elipsoidale, de $2,8 \times 1,8$ cm, cu aspect asemănător ca la pH 4 ; colorația dosului coloniei și a mediului, ceva mai pronunțată ;
- la pH 6 ... dezvoltarea abundentă a coloniilor, în benzi de 9,5 cm lungime și 2,5 cm lățime ; marginea albă, îngustă, este urmată de o zonă alb-gălbuie, de 2—3 mm lățime, partea centrală a coloniei cu suprafața slab cutată, de culoare albastră-olivacee, granular pulverulentă, cu gutații galbene abundente ; formarea bogată de coremii albe, uniform repartizate sau în mănunchiuri ; dosul coloniei ruginiu-închis, mediul, colorat în ruginiu ;
- la pH 7 ... dezvoltarea prezintă un aspect identic ca la pH 6, însă ceva mai redusă ; colorația dosului coloniei și a mediului, mai deschisă ;
- la pH 8,5 ... colonii rotunde pînă la elipsoidale, de $2,4 \times 1$ cm, cu o margine albă și centru albăstrui-verzui-cenușiu ; gutația lipsește ; dosul coloniei, ruginiu-deschis ; mediul colorat în galben.

În general, se observă că optimul de dezvoltare este în jurul valorii pH 6, cu valori apropiate de pH 7. Creșterea coloniei se micșorează mai repede înspre partea acidă (pH 4) decît în cea alcalină, prezentînd următoarea curbă de descreștere : pH 6—7—8—5,5—4.

Colorația zonei centrale descrește în intensitate de la albastră-olivacee către albastră-verzuie-cenușie la valorile pH : 6—7—5,5—4—8. Suprafața acestei zone centrale are aspectul cel mai pronunțat granular-pulverulent — în urma producției mai abundente de spori — la pH 6 și 7. Gutații se observă cu intensitate descrescîndă de la pH 6—5,5—7—4 și nu se observă la pH 8. Intensitatea formării coremiilor urmează aceeași curbă.

Intensitatea colorației dosului coloniei și a mediului de cultură înconjurător este proporțională cu intensitatea de creștere a coloniei.

După 14 zile :

- la pH 3* ... nu se dezvoltă ;
- la pH 4* ... diametrul coloniilor aproape neschimbat, se observă o oarecare creștere în vertical, colonia luând o structură stromatică și formând un mamelon la ce mase de coremii cu columela complet galbenă ; colorația coloniei la suprafață pe dos neschimbată, gutație mai redusă ;
- la pH 5,5* ... coloniile asemănătoare din toate punctele de vedere cu cele de la pH 4, însă mai mari în diametru ; colorația neschimbată ;
- la pH 6* ... mărimea și aspectul coloniilor aproape neschimbate, coremiile și-au păstrat mela albă ;
- la pH 7* ... coloniile și-au mărit diametrul cu 7—8 mm, însă aspectul a rămas neschimbat se observă atît coremii cu columela albă, cît și cu columela galbenă la bază complet galbenă ;
- la pH 8,5* ... creșterea coloniilor a continuat atît pe plan orizontal, cît și pe plan vertical, o structură stromatică ; se evidențiază o zonare, marginea alb-gălbuie urmată de o zonă adîncită ocră-gălbuie ; centrul a rămas verzui-cenușiu ; colorația galbene.

În general, coloniile își păstrează formă inițială, creșterea a rămas staționară la pH 6 (valoarea optimă), la celelalte valori pH, coloniile continuă să se dezvolte într-o măsură mai mare sau mai mică, în unele cazuri în special pe plan vertical în grosime (pH 4, 5, 8). Zona marginală tinde să dispară concomitent cu oprirea creșterii (la pH 6) sau devine îngustă, cenușie și neclar delimitată (la pH 7). O zonare pronunțată se constată la valoarea extremă alcalină (8,5), mai puțin evidențiată la extremele acide (pH 4 și pH 5,5).

Coremiile au columela galbenă la valorile extreme de pH (4, 5,5 și 8) și albe și galbene la pH 7, numai albe la pH 6. Ele se dezvoltă cel mai abundent mai departe la pH 6, unde produc cea mai mare masă de spori, dau coloniei un aspect omogen.

După 21 de zile :

- la pH 3* ... nu se dezvoltă ;
- la pH 4* ... coloniile staționare, cu aspect neschimbat ;
- la pH 5,5* ... idem, coremiile galbene-ocracee ;
- la pH 6* ... creșterea în plan orizontal staționară, în plan vertical, coloniile se îngroașă în mod ternic, apar mameloane cu tufe de coremii galbene-ocracee ;
- la pH 7* ... ca la pH 6 ;
- la pH 8,5* ... coloniile staționare, coremii galbene-ocracee pînă la galbene-ruginii.

În general, se constată în această perioadă o încetare a creșterii pe plan orizontal, continuă însă, în unele cazuri, îngroșarea coloniilor accentuează formarea de coremii cu o producție abundentă de spori, cît întreaga suprafață a coloniilor ia un aspect omogen. Apar tufe de coremii puternic dezvoltate, cu columela galbenă sau galbenă-ruginie. O zonare marcată se observă numai la pH 8,5.

În concluziile generale privind dezvoltarea ciupercii pe mediul solid la diferite valori pH, înregistrăm observațiile de mai jos.

Dezvoltarea optimă a coloniilor are loc la pH 6 și apoi, în ordine descrescîndă, la valorile pH 7 ; 5,5 ; 8,5 și 4. Față de valoarea optimă intensitatea creșterii scade mai repede către zona acidă (pH 4) decît către cea alcalină (pH 8,5).

Suprafața coloniilor poate să rămînă plană sau se ondulează în urma formării unor riduri sinuoase (pH 4 și 5,5), a unor mameloane în

(pH 5,5), centrale (pH 4 și 5,5) sau neregulat dispuse (pH 6; 7 și 8,5). Suprafața coloniilor apare granuloasă și, pe măsura formării conidiilor, ia un aspect pulverulent, care este mai accentuat la pH 6 și 7. La valorile extreme, în special spre partea alcalină (pH 8,5), se accentuează pe măsura maturității coloniilor o zonare distinctă; la celelalte valori, zonarea inițială se acoperă prin creșterea bogată a conidioforilor (pH 6 și 7, la urmă și 5,5).

Marginea albă este în funcție de viteza de creștere a coloniei și este cu atât mai lată, cu cât intensitatea creșterii este mai mare; cu timpul pe măsura încetării creșterii coloniei pe plan orizontal ea se colorează în alb-gălbui, alb-ocraceu sau alb-albăstrui, iar după încetarea acestei creșteri marginea dispare. La pH 8,5 și temporar la 5,5, apare o zonă intermediară, ocracee. Zona centrală are o colorație albastră-verzuie-cenușie la pH 4, 5,5 și 8,5 și o colorație albastră-olivacee la pH 6 și 7. Excrescențele mamelonare care apar la suprafața coloniei sînt colorate la început mai deschis, apoi iau colorația generală.

Gutația care apare în special în primul stadiu, sub forma unor picături gălbui, pare să fie în corelație cu intensitatea metabolismului, deci și a creșterii ciupercii.

Aceeași corelație directă s-a observat între intensitatea colorației dosului coloniei și a mediului de cultură, pe de o parte, și dezvoltarea coloniilor, pe de altă parte. Colorația mediului în jurul coloniilor este galbenă-deschis la pH 4, galbenă la pH 5,5 și 8,5, galbenă-ruginie la pH 7 și ruginie la pH 6. Dosul coloniei este galben-ruginiu pînă la ruginiu-deschis la valori pH 4, 5,5 și 8,5, iar ruginiu-închis la pH 6 și 7.

Coloniile iau un aspect cărnos la valorile extreme, mai ales la pH 8,5. Ele însă prezintă o creștere mai pronunțată în grosime la valorile optime, de pH 6 și 7. Coremiile apar în număr mai mare și se maturizează mai repede la valorile optime de pH 6 și 7. Ele sînt albe la început, columela se colorează pe urmă în galben, începînd de la bază; cînd sau format mase mari de conidii, coremiile apar albastre-olivii. Aceste treceri se observă bine la valorile pH extreme, pe cînd la valorile optime, unde maturizarea are loc repede, fazele colorației arătate nu apar așa de evidente.

La marginea coloniei se dezvoltă conidiofori simpli, iar în zona centrală se observă atât conidiofori simpli, cît și coremii, cele din urmă grupate deseori în tufe groase, care ating la maturitate înălțimi pînă la 1,5 mm.

În concluzie, *Penicillium granulatum* își găsește condiții optime de dezvoltare în zona reacției slab acide pînă la neutre; condițiile de aciditate sau de alcalinitate mai pronunțată influențează caracterul coloniei, în ceea ce privește creșterea în plan orizontal și vertical, zonarea colorației și aspectul granular sau pulverulent al zonei centrale, formarea și maturizarea coremiilor, colorarea dosului coloniei și a mediului înconjurător.

B. COMPORTAREA PE MEDIUL LICHID, LA DIFERITE VALORI pH

Pentru verificarea și adîncirea observațiilor făcute pe mediul solid, s-a instalat încă o serie de experiențe pe mediul lichid, la care valorile pH se pot ajusta cu o mai mare precizie.

Ca mediu de cultură s-a folosit soluția Czapek, iar reacția a fost ajustată la următoarele valori pH: 3; 4,5; 5,5; 6; 6,5; 7; 8,5. Observațiile s-au făcut după 7, 14 și 21 de zile de incubatie, la temperatura camerei.

După 7 zile :

- la pH 3 ... nu se dezvoltă ;
- la pH 4,5 ... numeroase colonii mici, circulare, în parte unite într-o peliculă ; suprafața niilor albă, cu puncte albastre-verzi-cenușii, de aspect granulos ; mediul colorat ;
- la pH 5,5 ... coloniile puternic dezvoltate, unite în majoritate într-o peliculă cărnoasă suprafața albă și cu punctișoare albastrui-verzui ; apar coremii albe ; mediul colorat în galben-lignicolor ;
- la pH 6 ... colonii izolate, mediul colorat în galben-pal ;
- la pH 6,5 ... colonii mai slab dezvoltate decât la pH 6, cu suprafața albă, granuloasă ; mediul slab colorat ;
- la pH 7 ... colonii izolate, punctiforme, cu suprafața albă ; mediul necolorat ;
- la pH 8,5 ... nu se observă nici o dezvoltare.

În general, dezvoltarea ciupercii este slabă în majoritatea cazurilor numai la pH 4 s-a dezvoltat o peliculă continuă, iar optimum de dezvoltare este la pH 5,5. Prin urmare, în stadiul inițial, dezvoltarea este mai viroasă în mediul acid și mai slabă către punctul neutru, iar în zona nuanțată alcalină, nu s-a produs încă nici o dezvoltare.

După 14 zile :

- la pH 3 ... nu se dezvoltă ;
- la pH 4,5 ... pelicula care include numeroase goluri ocupă 3/4 din suprafața mediului, ea neregulat ridicată, cu zone albe înspre marginea golurilor, în rest albastră-verzui cu coremii albe ; mediul slab colorat ;
- la pH 5,5 ... peliculă continuă, care ocupă aproape în întregime suprafața mediului, este rigidă granuloasă, cu zone marginale albe ; în rest, albastră-verzuie, cu coremii albe ; mediul colorat în galben-brun ;
- la pH 6 ... coloniile unite într-o peliculă ocupă cca. jumătate din suprafața mediului plus se mai găsesc unele colonii izolate ; aspectul coloniilor ca la pH 5,5, cu coremii albe ceva mai late ; mediul colorat în galben-lignicolor ;
- la pH 6,5 ... coloniile izolate, sau grupate într-o peliculă subțire, ocupă sub 50 % din suprafața mediului ; zonele albe constituie 80 % din suprafața coloniilor ; restul, albastru-verzui ; coremii slab dezvoltate, albe ; mediul, galben-pal ;
- la pH 7 ... colonii punctiforme izolate, ocupând aprox. 1/3 din suprafața mediului ; aspectul ca la pH 6,5 ; mediul slab colorat ;
- la pH 8,5 ... colonii punctiforme izolate, ocupând cca. 1/4 din suprafața mediului ; nu se dezvoltă încă coremii ; mediul, necolorat.

În general, în această perioadă dezvoltarea este intensă. Cea mai viguroasă dezvoltare se observă mai departe la pH 5,5, foarte aproape de pH 6. La aceste valori, colorația mediului și formarea coremiilor sunt și mai intense. Zonarea nu mai este regulată ; se mai observă pe rînduri și în jurul golurilor o dungă albă, alb-gălbuie sau alb-albăstruie, dar în același timp se mai mențin în cuprinsul coloniei porțiuni neregulate albe.

După 21 de zile :

- la pH 3 ... nici o dezvoltare ;
- la pH 4,5 ... pelicula aproape neschimbată în extindere, însă parțial îngroșată, prezintă o suprafață ridată pînă la cerebiformă, cu aspect granular-pulverulent ; la margine și în jurul golurilor, zone albe ; în rest, albastră-verzuie, cu coremii albe și galbene în mănunchiuri de 0,3-0,5 mm înălțime ; mediul colorat în galben-lignicolor ;

- la pH 5,5 ... peliculă continuă, fără goluri, cu suprafața ridată, de culoare albastră-olivie și cu aspect granular pulverulent; coremii galbene și galbene-ruginii, izolate sau grupate în mănunchiuri de 1 mm înălțime; mediul colorat în galben-brun;
- la pH 6 ... colonii unite într-o peliculă groasă, ocupând 70—80% din suprafața mediului, dar prezentând goluri mari; suprafața coloniilor ridată, granular-pulverulentă; la margine și în jurul golurilor, o zonă albă-albăstruie; în rest, albăstruie-olivie-cenușie; coremii galbene-ruginii, mai rar albe și galbene, uniform repartizate sau în mănunchiuri de 1,5 mm înălțime; mediul, colorat în galben-brun;
- la pH 6,5 ... colonii unite într-o peliculă subțire, cu îngroșări mamelonare, ocupând 80—100% din suprafața mediului; aspectul ca la pH-ul precedent; mediul colorat în galben-brun;
- la pH 7 ... colonii unite într-o peliculă subțire cu goluri mari, care acoperă aproape toată suprafața mediului; la margine și în jurul golurilor, zone alb-gălbui; în rest, albastre-olivacee; abundente coremii izolate, albe și galbene;
- la pH 8,5 ... coloniile izolate sau unite într-o peliculă subțire ocupă 85—100% din suprafața mediului, prezentând sectoare alb-gălbui și sectoare albastre-olivii; coremii mai puțin abundente; mediu colorat în galben-deschis.

În general, în această perioadă coloniile au continuat să se dezvolte viguros la valorile pH 6,5, 7 și 8,5, în timp ce la celelalte valori creșterea este aproape staționară. Optimumul de creștere se menține la pH 5,5 și 6, ajungându-se la o nivelare a creșterii pentru ambele valori. În această etapă, deci, rezultatele culturii în mediul lichid se apropie de cele de pe mediul solid. La valorile optimale, se înregistrează cea mai mare grosime a peliculei, colorația cea mai intensă a mediului, cea mai abundentă formare de coremii, precum și cea mai mare înălțime a lor. Formarea coremiilor se produce mai de timpuriu în zona acidă, ordinea de formare fiind descrescând în mediile cu pH 5,5—6—4—6,5—7—8.

Asupra dezvoltării ciupercii, comparativ pe mediul solid și lichid la diferite valori de pH, se pot face următoarele observații generale.

Ritmul de dezvoltare a coloniilor este mai accelerat pe mediul solid, unde, în schimb, creșterea stagnează după 14 zile. Acest din urmă fapt se explică probabil prin acumularea de produse metabolice autotoxice. Pe mediul lichid, dezvoltarea este mai slabă în prima perioadă, însă se remarcă o creștere relativ bună la valorile acide (pH 4,5 și 5,5). În jurul punctului neutru și în zona alcalină, coloniile se dezvoltă mult mai încet, însă creșterea lor continuă viguros chiar pînă în a treia perioadă. Optimumul de dezvoltare pe mediul solid este la valorile între pH 6 și 7, pe mediul lichid între 5,5 și 6, deci în general în zona slab acidă.

Zonalizarea coloniei este evidentă la valorile extreme și în special la pH 8,5.

Caracterul coloniei variază în raport cu valoarea pH a mediului, în limitele descrise pentru această specie. Astfel, la valorile optimale — pe mediul solid la pH 6—7, pe mediul lichid la pH 5,5—6 — coloniile au cea mai mare creștere în suprafață și grosime, zona centrală este mai intens colorată, mediul se colorează mai intens, formarea coremiilor este mai abundentă și acestea se prezintă în mănunchiuri mai bogate și mai înalte. Coremiile trec prin mai multe faze: cu columela albă, columela galbenă la bază, galbenă pe toată lungimea și, la urmă, după coacerea sporilor, albastră-olivie. Maturizarea lor este mai rapidă la valorile extreme decît la cele optimale.

II. *PENICILLIUM CLAVIGERUM* Demelius

COMPORTAREA PE MEDIUL SOLID, LA DIFERITE VALORI pH

Ca mediu de cultură s-a folosit mediul Czapek-Dox, cu glucoză substanță energetică. Diferitele variante ale mediului au fost ajustate valorile pH : 3,5 ; 4,5 ; 5,5 ; 6,5 ; 7,5 ; 8,5. Observațiile s-au făcut din ziua 7 și 14 zile.

După 7 zile :

- la pH 3,5* ... colonii circulare, de 36—39 mm Ø, slab lobate și ondulate, în sectoare de cerc marginea albă, floconoasă, de 5—6 mm, după care urmează o zonă îngustă de coremii albe și o zonă inelară compusă din coremii albe, neregulat amestecate cu fructificații mature, de culoare albastră-verzuie ; centrul este reprezentat printr-o depresiune regulat circulară, de 10 mm Ø, de culoare gălbuie și cu aspect stromatic, fără micel aerian ; pe dos, se observă o slabă zonare și riduri stereocorespunzând cu depresiunile ondulației la suprafața coloniei ;
- la pH 4,5* ... colonii de 35—37 mm Ø, foarte slab lobate și ondulate în sectoare de cerc ; marginea albă, floconoasă, cu o slabă nuanță verzuie, urmată de o zonă îngustă de coremii alb-gălbui, după care urmează partea centrală, foarte slab bombată, de culoare albastră-verzuie mai închisă spre centru, fie în formă de inel înconjoară o mică depresiune centrală, fără micel aerian ; pe dos, o foarte slabă zonare, sectoare de cerc bine marcate ;
- la pH 5,5* ... colonii circulare de 32—35 mm, cu marginea albă-floconoasă de 6—7 mm, urmând de o zonă îngustă de trecere spre o colorare verzuie ; lipsește zona de coremii albe ; partea centrală albastră-verzuie, mamelonar bombată în centru ;
- la pH 6,5* ... dezvoltarea bună a coloniilor până la 50 mm Ø, aspectul identic ca la pH 5,5 ; pe dos, slab zonat și aproape neridat ;
- la pH 7,5* ... colonii până la 45 mm Ø, ondulate în zone circulare și în sectoare de cerc ; culoare albastră-verzuie-deschis până la cenușie și de aspect pulverulent ; coremii albicioase în zona subperiferică ; pe dos, galbene-roz, zonate, circulare și în sectoare de cerc, regulat și des cutate ;
- la pH 8,5* ... dezvoltarea mai redusă a coloniilor, până la 30 mm Ø ; zonare marcată prin depresiuni circulare ; culoare în general albastră-verzuie-intens, unele zone cu nuanță galbene-cenușii ; pe dos, galbene până la galbene-roz (în centru), circular zonat și regulat cutate în partea periferică.

În general, dezvoltarea cea mai bună a coloniilor se menține la pH 5,5, unde se constată și cea mai lentă maturație. Intensitatea creșterii este proporțională cu creșterea valorii pH, atât în ceea ce privește dezvoltarea în diametru cât și în grosime. Aspectul coloniilor rămâne, în linii mari, neschimbat la diferitele valori pH.

Asupra creșterii ciupercii pe mediul solid, la diferite valori pH pot face observațiile generale de mai jos.

Fată de specia cercetată anterior, *Penicillium clavigerum* prezintă acidofilie mult mai pronunțată, având optimul de creștere în zona puternic acidă (pH 3,5—4,5). Aspectul coloniilor, foarte tipic prin zonarea, mult sau mai puțin marcată și prin centrul bombat sau scufundat, suferă însă la diferite valori pH schimbări marcate ; dezvoltarea de coremii albe, mai bogată la valorile extreme.

A. *COMPORTAREA PE MEDIUL SOLID, LA DIFERITE VALORI pH*

Ca mediu de cultură a fost folosit mediul Czapek-Dox, cu glucoză ca substanță energetică. Prin adăugare de HCl n/1, respectiv de Na OH n/1, sterilizat în prealabil, la mediul de cultură turnat în vase Petri, s-au obținut următoarele valori de pH: 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8 și 8,5. Observațiile s-au făcut după 7 și 14 zile.

După 7 zile:

- la pH 3,5 ... colonii circulare de cca. 12 mm Ø, cu marginea ușor dințată; se observă o zonare prin alternarea de zone galbene și verzi; pe dos, galbene-portocalii;
- la pH 4,5 ... colonii de 15 mm Ø, cu zonare netă, la care predomină porțiunile verzi; pe dos la fel ca mai sus;
- la pH 5,5 ... colonii de 13–14 mm Ø, cu margine hialină de 1 mm; nu prezintă zonare, porțiunile galbene și verzi fiind neregulat răspândite pe suprafața coloniei, predomină cele galbene; pe dos, galbene-slab-portocalii;
- la pH 6,5 ... colonii de cca. 12 mm Ø, prezentînd o zonare distinctă, cu predominarea porțiunilor galbene; pe dos, portocalii-deschis;
- la pH 7,5 ... colonii cu diametrul ceva mai redus (10 mm), cu o zonare slabă, lipsind componența curat galbenă; suprafața coloniei verde-murdar, cu aspect prăfos; pe dos, cărămizie;
- la pH 8,5 ... colonii aproape identice ca dimensiune și aspect cu cele precedente; ca singură deosebire se observă gutații galbene-portocalii.

În general, ciuperca se dezvoltă încet și nu se observă deosebiri mari între coloniile crescute la diferitele valori pH. În zona acidă, pare să predomine aspectul galben, ceea ce indică o maturare lentă, față de cel verde-murdar în zona alcalină, provocat de producția abundentă de spori, de către fructificațiile mature.

După 14 zile:

- la pH 3,5 ... colonii bine dezvoltate, cu 30 mm Ø; zonare distinctă, prin alternarea conidioforilor ramificați, de aspect floconos și de culoare galbenă și a conidioforilor simpli, cu conidii verzi-olivii; zona centrală matură ocupă partea cea mai mare a coloniei;
- la pH 4,5 ... colonii mai puternic dezvoltate, avînd 35 mm Ø; aspect asemănător, însă zonarea se întinde pe o suprafață mai mare: partea centrală cu fructificații mature, uniform verzi-olivii, fiind mai redusă;
- la pH 5,5 ... colonii foarte bine dezvoltate, cu 40 mm Ø; marginea îngustă, hialină, este urmată de o zonă de cca. 12 mm lățime, în care pe fondul conidioforilor galbeni sînt împrăștiate neregulat fructificații mature, verzi-olivii; în centru, o masă compactă, ușor ridicată, de fructificații mature;
- la pH 6,5 ... colonii de diametru mai redus (20–22 mm), care se compun dintr-o margine hialină de 5–6 mm și o parte centrală, acoperită de fructificații verzi-olivii, care îi dau un aspect pulverulent; zonarea abia perceptibilă, din lipsa componentei galbene;
- la pH 7,5 ... dimensiunea și aspectul identice ca la pH 6,5;
- la pH 8 ... dezvoltarea sărăcăcioasă a coloniilor cu margine lată, hialină și un centru uniform colorat în verde-oliviu;
- la pH 8,5 ... toată colonia redusă la partea centrală, cu conidiofori maturi; aspect pulverulent; la marginea coloniei apare un inel de coremii mature; pe dos, colorat în rosu-viu.

În general, dezvoltarea optimă a ciupercii se produce în zona acidoasă la valoarea pH 5,5. Creșterea bună are loc însă pînă la valoarea extrem de acidă, pe cînd în apropierea punctului neutru și mai ales în zona alcalină se produce o maturație timpurie și oprirea creșterii. Este de remarcabilă apariția de coremii la valoarea alcalină extremă.

Asupra creșterii acestei specii pe mediul solid, la diferite valori de pH se pot face observațiile generale de mai jos.

În comparație cu *P. clavigerum*, specia cercetată este mai puțin acidofilă, avînd optimul de creștere abia la pH 5,5. Ea este însă în măsură acidotolerantă, în schimb nu suportă bine reacția neutră și alcalină.

Pentru valoarea optimă și cele apropiate, creșterea este adecvat caracterizată printr-o zonare distinctă, produsă de alternarea coloniilor galbene sterile cu zone de fructificații mature. În primele stadii de dezvoltare predomină pe medii acide aspectul general galben al coloniilor iar pe mediile neutre și alcaline, din cauza unei maturații accelerate aspectul verde.

Pe medii foarte alcaline (pH 8,5), ciupercia produce coremii.

B. COMPORTAREA PE MEDIUL LICHID, CU DIFERITE SURSE DE CARBON

Pentru aprofundarea cunoștințelor noastre asupra cerințelor nutriționale ale ciupercii studiate, s-a instalat o experiență pe soluție Czapek, cu adăugarea de următoarele hidrocarbonate în variantele respective :

- monozaharide : glucoză ;
- dizaharide : maltoză ;
- polizaharide : amidon ;
- alcooli trivalenți : glicerină ;
- „ hexavalenți : manită.

Valoarea pH a mediului a fost ajustată pentru toate variantele la pH 5. Din cauza dezvoltării mai lente a acestei specii, observațiile s-au făcut la 10 și 20 de zile. După ultimele observații, miceliile au fost recoltate prin filtrare, uscate la 105° și cîntărite.

După 10 zile :

- pe glucoză ... creșterea bună, cu majoritatea coloniilor tipice circulare sau confluențe, cu margine galbenă, mai mult sau mai puțin lată ;
- pe maltoză ... creșterea bună, cu colonii tipice, în mare parte avînd numai o margine galbenă îngustă ; se observă și o creștere submersă ;
- pe amidon ... creșterea mai puțin avansată, coloniile, cu diametrul mic și nemature (galbene) formează totuși o peliculă mai mult sau mai puțin continuă ; creștere submersă prezentă ;
- pe glicerină ... creștere foarte slabă, sub formă de miceliu floinos, cu aspect de vată ;
- pe manită ... creștere foarte slabă, sub formă de colonii punctiforme, cu aspect pulverulent ;

După 20 de zile :

- pe glucoză ... dezvoltare bogată, formînd o peliculă aproape continuă, de culoare albăstruiie, cu porțiuni gri-portocalii, corespunzînd marginilor coloniilor confluențe ; suprafața peliculei, de aspect prăfos, poate prezenta gutație aburită galbenă-portocalie ; mediul colorat în roșu ;

- pe *maltoză* ... peliculă continuă sau aproape continuă, groasă, de culoare verde, cu câteva insule de miceliu galben, gutație slabă; mediul colorat în roz-intens;
- pe *amidon* ... peliculă continuă, cu suprafață uniformă verde, de aspect prăfos; în câteva porțiuni izolate, gutație roșie-portocalie, care corespunde unei colorații roșii-intense pe dosul peliculei; mediul, slab-roz;
- pe *glicerină* ... creștere foarte redusă la suprafață, submers ceva mai abundentă; mediul, galben-slab-roz; formare de coremii;
- pe *manită* ... creștere de asemenea slabă la suprafață și ceva mai abundentă submers; coloniile punctiforme, cu margine galbenă; se observă, ca și la glicerină, formarea de coremii de culoare verde-deschis.

Recolta de miceliu confirmă observațiile asupra dezvoltării ciupercii. Cântărirea miceliilor uscate a dat rezultatele de mai jos (media a două repetiții); concomitent au fost determinate valorile pH ale soluției nutritive la terminarea experienței.

Sursa de carbon.	Greutatea miceliului	pH final
Glucoză	0,3673	6,5
Maltoză	0,7217	5,1
Amidon	0,5201	6,2
Glicerină	0,0999	5,2
Manită	0,1077	6,3

Dăm, în continuare, concluziile generale care se pot trage din rezultatele acestei experiențe.

Aparatul enzimatic al ciupercii permite folosirea cu un bun randament, atât a unor dizaharide, cât și a unor polizaharide, ambele evidențindu-se ca surse mai favorabile de carbon decât glucoza. De importanță practică pentru dezvoltarea ciupercii în condiții naturale este în special facultatea de a folosi cu un bun randament energetic amidonul. Alcoolii superiori nu constituie surse de carbon favorabile acestei specii.

Spre deosebire de experiențele cu alte specii de *Penicillium*, colorația mediului și formarea de gutații nu sînt în acest caz în corelație directă cu intensitatea dezvoltării. Este de remarcat apariția coremiilor în condițiile de nutriție cele mai nefavorabile.

Valorile finale de pH ne indică că în unele cazuri s-a produs o ușoară neutralizare, pe cînd în alte cazuri pH-ul inițial s-a menținut aproape neschimbat. Materialul experimental prea redus nu permite o concluzie asupra corelației între pH-ul final și intensitatea dezvoltării ciupercii.

C. COMPORTAREA FAȚĂ DE TANIN

Fiind vorba de un parazit pe ghindă, care conține 9% tanin, era de interes să se cerceteze dacă această substanță poate servi, pe de o parte, ca substanță energetică pentru ciupercă, iar pe de altă parte, dacă și în ce concentrații taninul stînjenește dezvoltarea ciupercii în prezența unei alte surse de carbon. Pentru elucidarea acestei chestiuni, a fost instalată următoarea experiență.

A fost pregătită soluția nutritivă Czapek-Dox fără zaharuri și împărțită în trei loturi, la care s-a adăugat 1%, 2% și 4% tanin. În toate cazurile, reacția a fost ajustată cu soluție concentrată de carbonat de sodiu la pH

5,5. Fiecare lot de soluție a fost împărțit în două serii, a câte două baloane dintre care prima serie a primit un adaos de 5% glucoză, pe când a doua serie taninul reprezenta singura sursă de carbon. Variantele experimentale au fost deci următoarele :

var. I/a	1 % tanin	5 % glucoză
var. I/b	2 % „	5 % „
var. I/c	4 % „	5 % „
var. II/a	1 % „	fără „
var. II/b	2 % „	„ „
var. II/c	4 % „	„ „
martor : 5 % glucoză, fără tanin		

După 10 zile :

- la martor . . . peliculă continuă ; a intrat în faza de maturare ;
- la var. I/a . . . peliculă aproape continuă, păstrând încă contururile galbene ale componentelor ;
- la var. II/a . . . creștere slabă, mult întârziată, sub forma inelară la marginea balonului unor insule izolate ;
- la var. I/b . . . nici o dezvoltare ;
- la var. II/b . . . idem.

După 20 de zile :

- la martor . . . neschimbat ;
- la var. I/a . . . peliculă aproape continuă, matură, de culoare verde, cu marginile galbene ;
- la var. II/a . . . coloniile unite într-o peliculă acoperă 50—90 % din suprafața mediului, nișele mature au culoare verde-gălbui ;
- la var. I/b . . . se observă divergențe între paralele, creșterea fiind într-un balon mult întârziată, iar celălalt prezentând două centre de creștere continue și numeroase colonii izolate, pur galbene ;
- la var. II/b . . . de asemenea, diferențe între paralele ; în balonul cu dezvoltare mai înaintată se observă o creștere circulară masivă, lăsând liberă partea centrală a suprafaței coloniei verde, cu margini galbene ;
- la var. I/c . . . creșterea numai într-un singur balon, pornind de la margine și acoperind aproximativ 20 % din suprafața mediului ; suprafața coloniei galbenă, cu nișele portocalii și cu o dungă verzuie ;
- la var. II/c . . . același aspect, mărimea mai redusă.

Dăm mai jos concluziile generale care se pot trage în urma acestor observații.

Taninul, în concentrație de 1%, nu stânjenește în mare măsură dezvoltarea ciupercii, iar în această concentrație constituie o sursă de carbon de favorabilă de carbon.

În concentrații mai mari (2% și mai ales 4%), se observă o stângăci pronunțată a creșterii, exprimată atât prin întârzierea dezvoltării, cât și prin dimensiunea redusă a coloniei. Este de remarcat că diferențele dintre variantele I și II, adică cea cu și cea fără glucoză, nu sînt pronunțate ceea ce denotă că ciuperca, după ce și-a adaptat aparatul enzimatic la existența în prezența taninului (probabil prin producția de tanin) poate să și folosească această substanță ca sursă de carbon.

Sensibilitatea destul de mare a acestei specii față de tanin — toate că are o creștere foarte bună pe ghinda cu un conținut de tanin mult mai ridicat — se explică prin faptul că în ghindă taninul nu se găsește în formă pură, ci în complex cu proteină, prin care toxicitatea este înăbușată în mod pronunțat.

IV. EXPERIENȚE DE INFECȚIE ARTIFICIALĂ A GHINDEI

Concomitent cu cercetările fiziologice asupra speciilor de *Penicillium* izolate de pe ghindă, s-au făcut și unele experiențe de infecție artificială.

În acest scop s-au folosit culturi pe agar ale ciupercilor respective, triturându-se cu puțină apă pînă la obținerea unei paste, care a fost aplicată pe urmă pe ghindă.

S-a lucrat cu *P. Duclauxii*, *P. glaucum*, *P. granulatum* și *P. clavigerum*, iar infectarea ghindelor s-a făcut în următoarele variante :

- var. 1 : ghindă intactă, infectată la vîrf
- var. 2 : „ „ „ „ bază ;
- var. 3 : crăpată „ „ „ vîrf ;
- var. 4 : ghindă cojită „
- var. 5 : „ infectată printr-o fantă tăiată în coajă.

S-a menținut umiditate suficientă în tot timpul experienței, care a fost întreruptă după șase săptămîni.

Cercetarea ghindelor după terminarea experienței a permis concluziile de mai jos.

Inocularea ghindelor intacte și chiar a celor crăpate cu un inoculum bogat în spori și miceliu de ciuperci n-a produs infecție. Cel mai mare procent de infecție s-a obținut prin introducerea inocului în fanta efectuată în coajă. Un procentaj mai redus de infecție se observă în cazul inoculării ghindelor cojite.

Concluzia generală este că ciupercile nu găsesc în pericarpul intact condițiile de nutriție și de umiditate care să permită germinarea sporilor sau creșterea miceliului. Modul principal de infecție în condiții naturale este răspîndirea miceliului dezvoltat pe o ghindă, care a suferit vreo leziune, la ghindele cu care este în contact direct, așa cum se întîmplă în depozit.

V. CONCLUZII

Comportarea speciilor *P. granulatum*, *P. clavigerum* și *P. Duclauxii* pe medii solide și lichide, cu diferite valori pH, este diferită.

Penicillium granulatum are o creștere optimă pe medii solide, la pH 6—7, iar pe medii lichide, la pH 5,5—6. La valori pH mai mari, are către zona neutră o creștere înceată, dar susținută, pe cînd la valori mai mici, înspre zona acidă, are o creștere limitată. Această specie este deci slab acidofilă, cu o dezvoltare bună în zonele de slabă reacție acidă pînă la neutră. *P. clavigerum* prezintă optimul de creștere în zone puternic acide (3,55—4,5), deci este o specie pronunțat acidofilă. *P. Duclauxii* are o creștere optimă la o valoare pH de 5,5, continuînd să se dezvolte viguros pînă la pH 3,5. Deci, această specie are o poziție intermediară între celelalte două de mai sus, apropiindu-se însă mai mult de *P. clavigerum*.

În decursul creșterii lor, ciupercile schimbă aciditatea mediului mai ales în mediul lichid. Se observă, în general, o tendință de egalizare a pH-ului în jurul valorii optime, ceea ce implică o uniformizare a creșterii după o oarecare perioadă de timp ; o excepție o constituie coloniile de pe mediul solid, la care, la valori extreme de pH, creșterea rămîne limitată.

Pe medii solide, în diferite valori pH, se mai observă următoarele. — Consistența coloniilor sporește la valori extreme ale pH-ului, cînd devine cărnoasă, cu aspect de stromă.

— Grosimea coloniei care determină, în general, apariția de riduri mameloane de diferite dispoziții (inelare, radiare sau neregulate), este accentuată la valorile pH optinale.

— Zonarea coloniilor este în funcție, în primul rând, de viteza de creștere; ea apare evidentă în perioada de creștere optimală și apoi acoperită către maturitatea coloniilor, prin producția abundentă a conidii, care le dă un aspect omogen, și dispăre cu totul la coloniile în trînite. Colorația diferitelor zone este mai variată și mai vie la valorile extreme ale pH-ului, în special către zona alcalină. *P. Duclauxii* are în prima fază de creștere miceliul galben; după apariția coremiilor, apoi de la mijloc, lățindu-se, o zonă centrală verzuie, datorită masei de coremi verzi.

Pe medii acide, această colorație galbenă se menține ca o zonă marginală, timp îndelungat. Pe mediile neutre sau alcaline, din cauza maturității accelerate a coremiilor, miceliul apare omogen verde.

— Formarea aparatelor fructifere, penicilii simple și coremii, este în general, mai abundentă la valorile optinale ale pH-ului, coremi dezvoltate aici fiind în mănunchiuri mai bogate și mai înalte decât la alte valori ale pH-ului. Tot în acest mediu se dezvoltă mai abundent peniciliile. La valori extreme ale pH-ului, abundă coremiile și acestea se maturizează mai repede. La *P. Duclauxii*, coremiile se produc pe medii alcaline cu pH 8,5, pe cînd la valori pH mai reduse, coremiile rămîin sterile.

Acesta constituie un fapt nou. În literatură, se atribuie producerea de coremii unor anumite surse de carbon. În experiențele noastre, coremiile s-au dezvoltat pe manită și glicerină, care sînt surse de carbon nefavorabile pentru creșterea ciupercii și nu s-au produs pe amidon, maltoză și glucoză, care sînt surse favorabile de carbon. Rezultă, deci, că o nutriție abundentă stînjenește dezvoltarea coremiilor.

Comportarea pe mediul lichid, cu diferite surse de carbon, s-a studiat numai la *Penicillium Duclauxii*. De importanță practică este faptul că ciuperca are facultatea de a folosi amidonul cu un bun randament genetic, ceea ce explică marea frecvență și creșterea viguroasă pe ghindele de ciuperca are o abundentă dezvoltare și pe maltoză, produsul de hidroliză al amidonului.

Este interesant de cunoscut modul de creștere a speciilor de *Penicillium* izolate de pe ghinde, pe medii cu un conținut variat de tanin. Este cunoscut că în ghindă procentul de tanin este de cca 9%. Culturile de *Duclauxii* au arătat că taninul în concentrație de 1% constituie o sursă favorabilă de carbon, iar în concentrații mai mari, taninul produce o stînjenerie a creșterii coloniilor. Aceasta ne arată că, în condițiile de ghindă, ciuperca poate să se dezvolte la o concentrație ridicată de tanin datorită faptului că această substanță se găsește în celulele de rezerva în complex tanino-proteic, care îi anihilează efectul inhibitor. Această constatare ar putea să explice una din cauzele pentru care speciile de *Penicillium* se dezvoltă pe ghindele în stare mai uscată și nu pe ghindele puternic umezite.

În ultimul caz, taninul poate trece în soluție și ar avea, prin concentrația sa mai ridicată, un efect inhibitor asupra ciupercii.

Ca o concluzie practică, din cercetările fiziologice întreprinse se deduce că dezvoltarea speciilor de *Penicillium* pe ghinde este în funcție de aciditatea apei de inibare. Intrucît la valori extreme (acide sau alcaline) creșterea acestora este oprită, cercetările pe viitor vor putea stabili

substanță de o aciditate sau alcalinitate convenabilă, cu o aderență mare și cu un efect de durată, cu care să se trateze ghinda spre a o feri de atacul acestor ciuperci. Sînt de preferat substanțele alcaline care au un caracter general inhibitor, față de atacul tuturor ciupercilor.



ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ *PENICILLIUM* КОТОРЫЕ ПОРАЖАЮТ ЖЕЛУДИ

Резюме

В настоящей работе исследуется устойчивость видов грибка *Penicillium granulatum*, *P. clavigerum*, и *P. Duclauxii* на твердой среде и в жидкости Czapek-Dox, при различных величинах pH и с различным происхождением углерода.

Устанавливается что *P. granulatum* находит наилучшие условия для развития в зоне слабо кислой до нейтральной реакции, эти оптимальные условия в жидкой среде равняются pH 5,5—6 и в твердой среде между pH 6—7. Реакция среды сильно влияет на характер колонии. В оптимальных условиях выращивания окраска колонии ярче в особенности на обратной стороне, причем ярко окрашиваются и окружающая среда (твердая), образование коремий более обильное а зрелость их достигается медленно, переходя через фазы колумела белая, желтая у основания, колумела желтая по всей длине и наконец колумела с зрелыми спорами. При крайних величинах кислотности или щелочности (4,5 или 8,5) зональность колонии более заметна, а вызревание спор развивается быстрее чем в оптимальных.

Темпы развития колонии более ускоренные на твердой среде где останавливаются после 14 дней, в то время когда на жидкой среде развитие в начале слабое, а потом продолжается более усиленно до 21 дня.

P. clavigerum развивается оптимально на более кислотных средах (pH 3,5—4,5). Внешний вид колоний очень типичный, из-за зональности более или менее выраженной не подвергается сильным изменениям при нейтральной или щелочной реакции.

P. Duclauxii имеет оптимальный рост при pH 5,5, в сильной степени устойчив против кислоты, не устойчив на щелочную и даже нейтральную реакцию, при которой имеет меньший рост со спешным вызреванием. При pH 8,5 появляются коремии.

Относительно использования разных источников углерода, устанавливается что грибок использует как дисахариды так и полисахариды (в особенности крахмал) лучше чем глюкозу, в то время как высшие алкоолы (глицерин, манита) не составляют благоприятный источник углерода. Наблюдается появление коремии в неблагоприятных условиях питания.

Танины в концентрации 1 процента являются хорошим источником углерода В большей концентрации (2 процента и 4 процента), задерживающее влияние танина становится очевидным, выражаясь в особенности в замедлении роста (даже в присутствии сахара) а также и в сокращении размеров колонии.



RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES SUR QUELQUES ESPÈCES DE *PENICILLIUM* QUI ATTAQUENT LES GLANDS

R E S U M É

Le travail étudie la manière dont se comportent les espèces *Penicillium granulatum*, *P. clavigerum* et *P. Duclauxii* sur des milieux solides et liquides Czapek-Dox, ayant des valeurs différentes pour le pH et des diverses sources pour le carbone.

On constate que *P. granulatum* trouve les conditions optimales pour son développement dans un milieu à réaction faiblement acide jusqu'à neutre; cet optimum est réalisé par les milieux liquides à un pH entre 5,5 et 6, tandis que par les milieux solides à un pH entre 6 et 7.

La réaction du milieu a une influence sensible sur le caractère de la colonie : quand les valeurs de pH sont optimales pour la croissance, la coloration de la colonie est plus intense, spécialement sur le dos, et le milieu solide environnant se colore intensivement aussi. La formation des zones est plus abondante et leur maturation découle lentement ; elles passent par les phases columelle blanche, columelle jaune à la base, columelle jaune sur toute la longueur et après la formation de la bande d'évacuation des spores, l'aspect de la colonie est déterminé par les couleurs bleu-olivâtre des spores mûres. Pour les valeurs extrêmes du pH, tant en ce qui concerne l'acidité que l'alcalinité (4,5 respectivement 8,5), la formation des zones est plus lente et la maturation des spores évolue plus rapidement que pour les valeurs optimales.

Le rythme dans le développement des colonies sur un milieu solide est d'abord plus lent, mais il s'arrête après 14 jours, tandis que sur un milieu liquide le développement est plus rapide au commencement, mais il continue ensuite vigoureusement jusqu'à 21 jours.

P. clavigerum présente une acidophilie plus accentuée, l'optimum pour le développement se trouvant à un pH de 3,5 à 4,5. L'aspect des colonies, assez typique par la formation de zones, ou moins prononcée des zones ne subit pas de grands changements quand la réaction du milieu est neutre ou alcaline.

P. Duclauxi présente, pour le pH 5,5 une croissance optimale, c'est-à-dire il est assez résistant pour la réaction acide ; par contre il ne supporte pas la réaction alcaline voire même dans ce dernier cas il montre une croissance réduite et une maturation précoce. A un pH de 8,5 se produisent des chorémies.

En ce qui concerne les diverses sources de carbone, on constate que les champignons utilisent les disaccharides et les polysaccharides (spécialement l'amidon) mieux que la glucose, les alcools supérieurs (la glycérine, la mannite) ne constituent pas une bonne source de carbone. On remarque l'apparition des chorémies quand les conditions de nutrition sont défavorables.

Le tannin en concentration de 1 % est une bonne source de carbone. En concentrations plus fortes (2 et 4 %) se fait remarquer l'effet inhibiteur du tannin, ce qui se met en évidence par un ralentissement de la croissance (même en présence du sucre), aussi que par les dimensions réduites des colonies.