

112. Giuseppe SERMONTI. — Genetica del *Penicillium chrysogenum* —
I. Eterocariosi in *Penicillium chrysogenum*.

Riassunto. — E' presentata una semplice tecnica per la costituzione di eterocarion tra ceppi mutanti con richieste nutrizionali complementari in *Penicillium chrysogenum* Thom. Gli eterocarion si ottengono da culture miste su terreni limitanti. Essi si sviluppano su tali terreni dalle zone di contatto fra colonie di tipo diverso, come ciuffi a crescita rigogliosa. Isolati e trasferiti su MM presentano un aspetto caratteristico per il margine frastagliato delle colonie e un colore della superficie intermedio tra quelli dei ceppi parentali.

Il piastramento dei conidi degli eterocarion su MM non dà luogo a crescita; su terreno completo (CM) i conidi danno luogo a colonie appartenenti alcune all'uno, le altre all'altro tipo parentale.

Gli eterocarion possono mantenersi mediante trasferimento di micelio vegetativo ed anche di singole ife.

La segregazione di due tipi parentali da una colonia proveniente da una singola ifa di un eterocarion rappresenta la prova della condizione eterocariotica della colonia originaria.

L'eterocariosi di una colonia è altresì rilevabile dalla capacità di questa di produrre eccezionalmente diploidi eterozigoti.

Résumé. — On décrit une technique simple pour la formation d'hétérokaryons parmi les mutants de *Penicillium chrysogenum* Thom, ayant des besoins nutritifs complémentaires. Les hétérokaryons ont été obtenus à partir de cultures sur milieux partiellement enrichis.

Ils se développent sur de tels milieux comme des touffes avec une croissance exubérante aux zones de contact de colonies de types différents. Isolés et transplantés sur un milieu minimum (MM) ils donnent des colonies qui affectent un contour irrégulier et dont la couleur de surface est intermédiaire, comparée à celles des colonies-mères.

Les conidies des hétérokaryons en « plating » sur MM ne donnent lieu à aucune croissance; sur un milieu complet, les conidies donnent naissance à des colonies appartenant soit à l'un, soit à l'autre type parental. On peut conserver les hétérokaryons en transférant soit le mycélium végétatif, soit des hyphes isolées.

La récupération des deux types parentaux à partir d'une colonie dérivée d'une hyphe isolée d'un hétérokaryon supposé, est une preuve de son état hétérokaryotique.

On peut aussi révéler les hétérokaryons par leur faculté d'engendrer des diploïdes hétérozygotes.

Summary. — A simple technique is presented for constituting heterokaryons between mutant strains with complementary nutritional requirements in *Penicillium chrysogenum* Thom. The heterokaryons were obtained from mixed cultures on limiting media.

They develop on such media as tufts with exuberant growth in the zones of contact between colonies of different type. Isolated and transferred to MM they give colonies which show an irregular edge, and a surface colour intermediate between those of the parent colonies.

Plating of the conidia of the heterokaryons on MM does not give rise to growth; on fully supplemented medium the conidia give rise to colonies belonging partly to one and partly to the other parent type. The heterokaryons can be preserved by means of transfer of vegetative mycelium, and also of single hyphae.

Recovery of the two parent types from a colony derived from a single hypha of a supposed heterokaryon constitutes a proof of its heterokaryotic state.

Heterokaryons may also be detected by their ability to give rise to heterozygous diploids.

Zusammenfassung. — Es wird eine einfache Technik beschrieben zur Herstellung von Heterokaryons zwischen Ernährungsdefekt-Mutanten von *Penicillium chrysogenum*, die sich in ihren Ernährungsbedürfnissen ergänzen. Die Heterokaryons wurden mit Hilfe von Mischkulturen auf einem unvollständigen Medium erhalten.

Sie entwickeln sich auf einem solchen Medium als kräftig wachsende Büschel zwischen den beiden verschiedenen Kolonien. Wenn man Stücke dieser Büschel auf ein Minimalmedium bringt, erhält man Kolonien, die eine unregelmässige Kante besitzen und deren Oberflächenfarbe als Intermediärprodukt der Pigmente der Elternstämme anzusehen ist.

Die Konidien des Heterokaryons wachsen nicht auf Minimalmedium; aus Maximalmedium dagegen bringen sie Kolonien hervor, die zum Teil dem einen und zum Teil dem anderen Elterntyp angehören. Die Heterokaryons können erhalten werden durch dauernde Übertragung des vegetativen Myzeliums und durch Übertragung von Einzelhyphen.

Wenn in einer Kolonie, die durch Übertragung von einer Einzelhyphne eines mutmasslichen Heterokaryons entstanden ist, sich die beiden Elterntypen zeigen, so ist dies der Beweis für das Vorhandensein des Heterokaryons.

Heterokaryons können auch entdeckt werden durch ihre Fähigkeit heterozygote Diplonten zu bilden.

Gli eterocarion sono ceppi fungini le cui ife contengono due, o più, tipi differenti di nuclei. Un « eterocarion bilanciato » è un ceppo la cui condizione eterocariota si mantiene stabile su un dato mezzo. Come afferma PONTECORVO (1), « l'aspetto essenziale dei sistemi eterocariotici è che essi presentano un meccanismo di segregazione e ricombinazione di particelle ereditarie che si aggiunge a quello della meiosi e cariogamia. »

Per mezzo dell'eterocariosi possono essere compiuti saggi di allelismo e dominanza, senza ricorrere alla riproduzione sessuale. Una tecnica per isolare ceppi diploidi eterozigoti dagli eterocarion bilanciati è stata sperimentata da ROPER (2) in *Aspergillus*, e recentemente applicata in *Penicillium chrysogenum* (3, 4).

Semplici tecniche sono state sviluppate in *Aspergillus* (3) e *Neurospora* (4) per la produzione di eterocarion bilanciati tra ceppi geneticamente marcati, mentre tentativi di costituire eterocarion bilanciati in *Penicillium* adottando le tecniche che si erano dimostrate efficaci con altre specie di funghi hanno avuto esito negativo (5, 6).

Recentemente PONTECORVO e SERMONTI (6) hanno riportato i primi risultati positivi nella sintesi di eterocarion in *Penicillium chrysogenum*. Da allora il lavoro in questo laboratorio è stato diretto alla messa a punto di tecniche convenienti per la produzione di eterocarion bilanciati in *P. chrysogenum*. Questa nota riguarda la descrizione e l'applicazione pratica di tali tecniche.

CEPPI E TERRENI.

I ceppi di partenza sono tre ceppi di *P. chrysogenum*, tra quelli selezionati per la produzione della penicillina: X 1612, Wis Q176 e Wis. 47.1564 (*).

Tutti i mutanti usati nel corso del lavoro sono stati ottenuti per mezzo di trattamento con raggi ultravioletti. I mutanti per il colore

(1) Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 11: 193, (1947).

(2) *Experientia*, 8: 14, (1952).

(3) PONTECORVO G. - *Advances in Genetics*, 3: 141, (1953).

(4) BEADLE G. W. e COONRADT V. L. - *Genetics*, 29: 291, (1944).

(5) BONNER D. - *Amer. J. Bot.*, 33: 788, (1946).

(6) PONTECORVO G. e SERMONTI G. - *J. gen. Microbiol.*, 11: 94, (1944).

(*) Gentilmente fornitici dal dr. M. J. Johnson, Department of Biochemistry, University of Wisconsin, Madison, Wis., U.S.A.

dei conidi sono stati individuati a vista; per i mutanti fisiologici è stato adottato il metodo « dell'isolamento totale », come descritto da FRIES (7) per *Ophiostoma* (vedi tab. 1).

Tab. 1. - Mutanti (1) di *Penicillium chrysogenum* adoperati nel corso del lavoro e ceppi da cui essi sono derivati.

Mutanti semplici		Doppi mutanti		Tripli mutanti	
Dall'X 1612	117 cy (**)	Dal 15 y	35 hy y 92 sp y	Dal 35 hy y	52 nic hy y 55 me hy y
Dal 47. 1564	15 y 20 w 22 su 23 ts 26 le 29 pr 99 sp	Dal 20 w	42 me w	Dal 42 y sp	65 pr y sp
		Dal 29 pr	51 thi pr	Dal 44 py w (3)	74 nic py w
		Dal 99 sp	42 y sp	Dal 51 thi pr	121 sp me w
				Dal 46 me w	86 y thi pr
				Dal 92 sp y	63 ts sp y

(1) Il ceppo 20 w è stato selezionato dopo trattamento con mostarda azotata. Tutti gli altri ceppi dopo trattamento con ultravioletto: i ceppi auxotrofi dopo isolamento totale, i bianchi e i gialli visualmente.

(2) Nei simboli dei ceppi il numero indica il posto di collezione, le sigle hanno i seguenti significati:

cy	richiede cisteina o metionina	sp	non produce penicillina
hi	richiede istidina	su	richiede solfito, tiosolfato, cisteina o metion.
hy	richiede ipoxantina o adenina	thi	richiede tiamina
le	richiede leucina	ts	richiede tiosolfato, cisteina o metion
me	richiede metionina	w	conidi bianchi
nic	richiede nicotamide	y	conidi gialli
pr	richiede prolina		
py	richiede piridoxina		

(3) il ceppo 44 py w (8 w) mi è stato gentilmente fornito dal Dr. G. Pontecorvo (Glasgow, Scotland).

I terreni adoperati nel corso del lavoro sono:

a) un terreno minimo (MM) rappresentato dal mezzo Czapek-Dox secondo la modificazione di CLUTTERBUCK et al. (8) per il *Penicillium*: acqua distillata, litri 1; NaNO₃, g 3; KCl, g 0,5; MgSO₄.7H₂O, g 0,5; FeSO₄.7H₂O, g 0,01; KH₂PO₄, g 1; glucosio, g 40; agar, g 20; pH 7.

b) un terreno completo (CM), che rappresenta una modificazione del terreno adoperato da PONTECORVO e coll. (9) per l'*Aspergillus nidulans*: acqua litri 1; idrolisato di caseina « Costantino », g 15; estratto di lievito autolisato « Costantino », g 1; peptone « Costantino », g 1,5;

(7) *Physiol. Plantarum*, 1: 330, (1948).

(8) CLUTTERBUCK P. W., LOVELL R. e RAISTICK H. - *Biochem. J.*, 26: 1907, (1932).

(9) PONTECORVO G. - loc. cit., (1953).

cor steep liquor, g 10; acido nucleico di lievito idrolisato (**), cm³ 3; soluzione di vitamine del gruppo B (***), cm³ 1; glucosio, g 20; agar, g 20; pH 6.

CRITERI GENERALI PER LA COSTITUZIONE DEGLI ETEROCARION BILANCIATI.

Il tipo più conosciuto di eterocarion bilanciato è quello formato da due ceppi con richieste complementari di fattori di crescita. Prendiamo come modello un eterocarion costituito tra un ceppo che richiede la somministrazione di prolina per la crescita (ed è in grado di sintetizzare la leucina come il ceppo selvatico) ed un ceppo che richiede leucina (e sintetizza prolina). I due ceppi isolati non crescono su MM, ove prolina e leucina sono assenti. Quando si forma tra i due ceppi un eterocarion esso si dimostra prototrofo, cioè capace di svilupparsi su MM. L'eterocarion contiene nelle sue ife nuclei dei due tipi (v. dopo) ed è in grado di provvedere alla sintesi sia della prolina che della leucina. Su MM l'eterocarion è quindi avvantaggiato rispetto ai suoi genitori e tale vantaggio selettivo è da mettersi in rapporto con la stabilità che l'eterocarion presenta su tale mezzo. Trasferito su di un terreno che contiene leucina e prolina l'eterocarion segrega in settori che presentano le caratteristiche dei genitori puri.

Il terreno ideale per la messa in evidenza e la conservazione di un eterocarion tra due ceppi auxotrofi (con richieste nutrizionali) complementari è un mezzo assolutamente privo dei fattori di crescita richiesti dai genitori.

Su di un tale terreno la costituzione degli eterocarion non può aver luogo, richiedendosi almeno un inizio di sviluppo dei ceppi originali perchè i nuclei di questi possano confluire in uno stesso citoplasma.

Le condizioni che permettono la crescita e la conservazione degli eterocarion, non favoriscono la loro costituzione. Sorge quindi il problema di stabilire condizioni culturali che permettano sia la costituzione sia la selezione degli eterocarion.

Una simile difficoltà non si presenta in *Neurospora crassa*, ove la semplice semina ravvicinata di frammenti miceliali di due ceppi auxotrofi complementari su MM permette lo stabilirsi dell'eterocarion (¹⁰). E' infat-

(¹⁰) RYAN F. J. - Meth. Med. Res., 3: 51, (1950).

(**) g 2 di acido nucleico in 45 cm³ di NaOH/N; g 2 di acido nucleico in 45 cm³ di HCl/N; le due soluzioni sono riscaldate a 100°C per 20 min., mischiate, portate a pH 6 e filtrate a caldo. Il volume è portato con acqua a 40 cm³.

(***) Riboflavina, mg 10; nicotamide, mg 10; ac. paraminobenzoico, mg 1; piridoxina HCl, mg 5; aneurina HCl, mg 5; biotina, mg 0,025; pantotenato di calcio, mg 20; colina HCl, mg 20; inositolo, mg 40; acido folico, mg 1; acqua, cm³ 20; da conservare al buio.

ti sufficiente quella scarsa crescita che gli auxotrofi presentano allorchè inoculati in MM, per consentire il processo di confluenza di nuclei diversi nello stesso citoplasma e l'emersione dell'eterocarion.

Il processo si presenta più difficoltoso a riprodursi in *Aspergillus nidulas* ⁽¹⁰⁾, per cui la semplice tecnica adottata in *Neurospora* si dimostra spesso inefficace.

Il procedimento che dà risultati più costanti in *Aspergillus* consiste di due fasi: una prima fase per la formazione e una seconda per l'emersione e la stabilizzazione dell'eterocarion. I due ceppi auxotrofi complementari vengono seminati in un mezzo liquido contenente i fattori di crescita richiesti (CM), e lasciati crescere insieme così da permettere la formazione di ife eterocariotiche. Il micelio così sviluppato è quindi prelevato, lavato e disteso su di un mezzo minimo agarizzato: quivi gli eterocarion formati hanno modo di emergere dalla massa del micelio dei due genitori.

Nel *Penicillium chrysogenum* la formazione e selezione degli eterocarion presentano le più grandi difficoltà. Il procedimento messo a punto per l'*Aspergillus nidulans* si presenta di incerta applicazione, e la produzione degli eterocarion sinora ottenuti ⁽¹¹⁾ è risultata piuttosto fortuita.

E' notevole che le difficoltà nella produzione degli eterocarion si presentano, nelle diverse specie, maggiori col diminuire della velocità di crescita dei ceppi. La *Neurospora crassa* cresce su agar a una velocità di 4 mm/ora (avanzamento del fronte della colonia); l'*Aspergillus nidulans* ad una velocità di 0,25 mm/ora; il *Penicillium chrysogenum* 47.1564 ad una velocità di 0,05 mm/ora. Evidentemente un ceppo che si sviluppa su agar con molta lentezza trova il terreno di crescita ricco di prodotti del suo metabolismo; su un tale terreno l'eterocarion non ha più un marcato vantaggio selettivo sui ceppi parentali auxotrofi, da cui dovesse emergere dopo la sua formazione, o che segregassero durante la sua crescita.

Durante due tentativi di sintesi di eterocarion in *Penicillium chrysogenum* ⁽¹²⁾ fu osservata l'inattesa comparsa di alcuni ciuffi di micelio — che poi risultarono quali eterocarion — nella zona di contatto tra colonie auxotrofe complementari in crescita su CM. L'emersione di micelio eterocariotico su CM fu attribuita al fatto che, nei casi su menzionati, i ceppi auxotrofi presentavano crescita ridotta su CM, consentendo anche su questo terreno all'eterocarion (a velocità

⁽¹¹⁾ PONTECORVO G. - loc. cit., (1953).

⁽¹²⁾ PONTECORVO G. e SERMONTI G. - loc. cit., (1954).

di crescita normale) di avvantaggiarsi ed emergere. In un caso l'eterocarion si era formato tra due ceppi auxotrofi e « nani » nell'altro i due ceppi (e particolarmente uno) non crescevano normalmente su CM perchè specificamente inibiti da sostanze presenti nel mezzo.

Le ricerche che sono riferite in questa nota prendono spunto da dette osservazioni, puntando alla definizione di una condizione in cui simili ciuffi eterocariotici potessero comparire nella zona di contatto tra colonie auxotrofe complementari di qualunque tipo.

TERRENI LIMITANTI

Un mezzo per la produzione e la selezione degli eterocarion doveva — secondo le considerazioni su riportate — presentare condizioni che, limitando la crescita dei ceppi auxotrofi, non avessero azione inibitrice sugli eterocarion che da essi si formassero.

Le prime esperienze, immediatamente positive, furono condotte su terreni minimi (MM) cui le sostanze richieste dai due ceppi auxotrofi erano state aggiunte in quantità inferiori alle quantità minime richieste per l'ottima crescita dai ceppi sotto esperimento. Ad una decina di giorni dalla semina di una sospensione mista di conidi di due ceppi auxotrofi complementari su di un simile terreno fornito delle sostanze da essi richieste nelle appropriate concentrazioni sub-ottimali, ciuffi di micelio eterocariotico apparivano regolarmente nelle zone di contatto tra colonie di diverso tipo (fig. 1).

Tali terreni saranno chiamati nel corso del lavoro *terreni limitanti*, e si preciserà — ove non risulta ovvio — per quale o quali ceppi auxotrofi il terreno in questione sarà limitante ovvero quali sostanze saranno state aggiunte al MM in concentrazioni ridotte rispetto alla richiesta minima di uno o più ceppi dati.

Concentrazione limitante di una sostanza rispetto ad un dato ceppo sarà chiamata quella concentrazione in agar della sostanza che si sarà dimostrata adatta, o possibilmente la migliore per ottenere la sintesi di eterocarion tra detto ceppo ed altri ceppi.

Per *concentrazione ottima* si intenderà ogni concentrazione (generalmente la minima) che permetterà ad un dato ceppo che richiede la sostanza in questione la migliore crescita e sporificazione.

Durante il corso, di tutte le esperienze che verranno riferite sono state usate scatole Petri di varie dimensioni (8, 10 o 12 cm diam.) sempre contenenti 20 ml di terreno agarizzato. I 20 ml sono misurati prima della sterilizzazione dei terreni in autoclave, ripartiti in provettoni della capacità di circa 50 ml, chiusi con tappi di cotone.

Le due concentrazioni, ottima e limitante, di ogni sostanza riferita a determinati ceppi, sono state stabilite aggiungendo a 20 ml di agar MM fuso, diverse quantità di alcune soluzioni a concentrazioni note di dette sostanze. Sull'agar solidificato in scatole Petri è stata poi distesa una sospensione di conidi del ceppo in esame (0.1 ml contenente circa 100 conidi) e le scatole sono quindi state poste a 24°C. Dopo una settimana le diverse scatole ordinate erano sottoposte ad osservazione. Se oltre ad una certa concentrazione della sostanza aggiunta la crescita e la sporificazione si mantenevano buone e costanti, detta concentrazione era considerata quale ottima. La concentrazione limitante era stabilita nella concentrazione della sostanza aggiunta corrispondente a quella di una scatola dove la crescita appariva stentata, e la sporificazione generalmente appena accennata. La concentrazione stabilita era poi controllata nelle successive esperienze di sintesi di eterocarion. La risposta dei vari ceppi alle diverse concentrazioni non aveva sempre lo stesso andamento. Alcuni ceppi col diminuire della concentrazione della sostanza richiesta si presentavano in colonie più piccole ma sempre riccamente sporificate. Altri perdevano la facoltà di sporificare prima che la grandezza delle loro colonie diminuisca in vista della concentrazione vieppiù ridotta della sostanza richiesta. Per altri ceppi la diminuzione della concentrazione della sostanza richiesta produceva una diminuzione del numero delle colonie che apparivano sulla piastra e solo una scarsa alterazione dell'aspetto di queste. Questi ultimi ceppi (ad es. 46 me w) si prestano sempre poco alla sintesi degli eterocarion.

Nei casi in cui le concentrazioni ottima e limitante non potevano identificarsi nella serie di concentrazioni provate, le esperienze erano ripetute variando la gamma delle concentrazioni.

Le concentrazioni ottima e limitante di alcune sostanze riferite a determinati ceppi sono raccolte nella tabella 2.

Quando il ceppo saggiato richiedeva, oltre alla sostanza in esame, altra sostanza, quest'ultima era aggiunta all'agar in concentrazione ottima.

RACCOLTA DEGLI ETEROCARION SU TERRENI LIMITANTI.

La procedura adottata per la sintesi di un eterocarion fra due ceppi è la seguente:

Si procede alla preparazione di una serie di scatole Petri con 20 ml di MM cui vengono aggiunte in concentrazioni limitanti le sostanze richieste dai ceppi in esperimento. Dette concentrazioni sono state previa-

Tab. 2. - Concentrazione ottima e limitante di diverse sostanze, in agar MM, riferita ad alcuni ceppi auxotrofi di *P. chrysogenum*.

Sostanza	Peso mol.	Soluzione stock (SS)		Concentraz. ottima		Concentrazione limitante			Ceppi saggiati (**)
		mgr/ml	mM per l	mM per l	ml di SS in 20 ml di agar MM	mM per l	Soluzioni stock diluite (ss)	ml di ss in 20 ml di agar MM	
adenina HCl	171	5	29.2	0.58	0.4	0.007	SS. 10 ⁻²	0.5	33 <i>hy y</i>
dl-metionina	149	10	67.1	0.34	0.1	0.067	SS. 10 ⁻¹	0.2	55 <i>me hy y</i>
l-leucina	131	10	76.3	1.14	0.3	0.076	SS. 10 ⁻¹	0.2	26 <i>le</i>
l-prolina	115	5	43.5	0.65	0.3	0.087	SS. 10 ⁻¹	0.4	29 <i>pr</i>
tiamina HCl	337	0.25	0.74	—	0.1 *	0.000037	SS. 10 ⁻²	0.1	51 <i>thi pr</i>
nicotamide	122	1	8.2	—	0.1 *	0.0082	SS. 10 ⁻¹	0.2	24 <i>nic py w</i>
piridoxina HCl	205	0.15	0.73	—	0.1 *	0.000037	SS. 10 ⁻²	0.1	74 <i>nic py w</i>
istidina HCl	191	5	26.2	0.65	0.5	0.026	SS 10 ⁻¹	0.2	114 <i>hi</i>

(*) in eccesso.

(**) quando un ceppo saggiato presenta più richieste, le sostanze per le quali il ceppo non è saggiato sono aggiunte al terreno in concentrazione ottima.

mente stabilite come detto sopra, usando separatamente i ceppi da associare nell'eterocarion come ceppi saggio. Se la concentrazione ottimale d'una sostanza è già stata stabilita in riferimento ad altro ceppo, l'uso della medesima concentrazione può essere tentato, evitando così, in genere, la ricerca preliminare. Generalmente le concentrazioni ottimali e limitanti di una sostanza si presentano simili in ceppi diversi ma con la stessa richiesta nutrizionale.

E' consigliabile, quando un ceppo è usato per la prima volta nella sintesi di eterocarion, replicare le esperienze usando due o tre concentrazioni della sostanza (o sostanze) richiesta da detto ceppo, prossime a quella ritenuta (all'osservazione visuale) la più adatta.

Questa precauzione, inizialmente adottata per la sintesi di tutti gli eterocarion, è servita a dimostrare che la gamma di concentrazioni che ne permettono la formazione è generalmente molto vasta. Essa può *grosso modo* considerarsi compresa da una concentrazione tre volte superiore ad una tre volte inferiore a quella designata come concentrazione limitante.

Da ognuno dei due ceppi da associare nell'eterocarion è ottenuta una sospensione di conidi e portata ad una densità di circa 100 conidi in 0,1 ml. Sull'agar di un certo numero di piastre (4 sono in genere sufficienti quando le concentrazioni limitanti sono ben stabilite) sono deposti 0,1 ml della sospensione dei conidi di un tipo e 0,1 ml dell'al-

tro tipo. In alcune piastre, che serviranno quali controlli, sarà aggiunto separatamente o un tipo o l'altro di conidi (0,1 ml della sospensione). Le gocce sono distese con un'apposita spatolina su tutta la superficie dell'agar, curando che le diverse sospensioni risultino ben mischiate tra loro.

E' importante che l'agar nelle scatole sia molto spesso, tale cioè da permettere la migliore crescita delle colonie normali, così da evitare la presenza di un fattore inibente aspecifico, che agisca cioè sia sull'eterocarion che sui ceppi distinti.

Le scatole sono poste a 24°C e mantenute a tale temperatura per 9-10 giorni. Dai conidi si sono sviluppate nel frattempo piccole colonie poco rilevate e con poche spore. Alcune di esse sono giunte durante la crescita a contatto tra loro, altre sono rimaste isolate. Osservando il tipo di crescita che l'uno o l'altro tipo di colonie presentano nei controlli è spesso possibile riconoscere i due tipi nelle culture miste.

Nella zona di contatto tra colonie di tipo diverso si osserva talvolta come un manicotto cotonoso rilevato, che si distingue nella cultura prima per il suo biancore, poi per la ricca sporificazione che esso presenta in contrasto con le altre colonie della cultura (figg. 1, 2, 8).

Con un ago, un piccolo ciuffo di ife da qualcuna delle zone di sovracrescita è trasferito su agar MM fresco. Dopo alcuni giorni dei ciuffetti trasferiti avranno dato luogo a crescita, producendo la formazione di caratteristiche colonie: gli eterocarion bilanciati (figg. 3 e 4).

E' da notare il fatto che le zone eterocarioniche che si sviluppano nelle culture miste non si espandono sull'agar, ma sono costituite esclusivamente (o quasi) da micelio aereo che si sviluppa verticalmente. Alcuni eterocarion di *P. chrysogenum* ottenuti su mezzi limitanti nel laboratorio sono riportati nella tab. 3. Accanto ad ognuno è indicato il saggio che ne ha permesso la designazione come eterocarion.

CARATTERISTICHE DEGLI ETEROCARION.

Tutti gli eterocarion tra ceppi auxotrofi complementari crescono su MM, e per tale proprietà sono stati selezionati.

La loro velocità di crescita, misurata come incremento del diametro giornaliero della colonia su agar MM è approssimativamente la stessa di quella dell'ascendente comune dei due ceppi parentali.

Essi si distinguono da ogni altro tipo di colonia per il caratteristico aspetto del margine in accrescimento. Questo è costituito, per la profon-

Tab. 3. - Eterocarion bilanciati isolati in *Penicillium chrysogenum* su terreni limitanti, e saggio ⁽¹⁾ della loro natura.

Eterocarion ottenuti ⁽²⁾	Sostanze in concen. limitante aggiunte a MM ⁽³⁾	Crescita caratterist. ⁽¹⁾	Segregaz. nei tipi parentali	La stessa dopo isolamento di singola ifa	Formaz. di diploidi eterozigoti
57 nic hy y + 74 nic py w	ad nic py	+	—	(—)	—
23 ts + 22 su	me	+	+	—	—
55 me hy y + 22 su	ad me	+	+	—	—
55 me hy y + 74 nic py w	me nic py	+	+	—	—
29 pr + 26 le	le pr	+	+	—	+
63 ts sp y + 46 me w	me	+	+	+	+
63 ts sp y + 63 pr y sp	me pr	+	—	—	+
51 thi pr + 63 ts sp y	me pr thi	+	+	+	+
86 y thi pr + 117 cy	me pr thi	(—)	+	(—)	+
51 thi pr + 55 me hy y	me hy thi pr	+	—	+	—

⁽¹⁾ + Rappresenta una risposta positiva, — significa che il saggio non è stato eseguito, (—) rappresenta una risposta negativa.

⁽²⁾ Gli eterocarion sono indicati con i simboli dei ceppi componenti congiunti dal segno +

^(*) Le sostanze indicate, con i simboli che ne contrassegnano la richiesta da parte dei mutanti (v. tab. 1) sono aggiunte all'MM nelle concentrazioni limitanti indicate nella tab. 2.

dità di 1-2 mm, di micelio sommerso nell'agar, che microscopicamente appare composto di rare ife diversamente protendenti. In una colonia omocariotica le ife marginali sono fitte, compatte, allineate e regolarmente sovrastate da micelio aereo. Macroscopicamente il margine dell'eterocarion appare frastagliato (fig. 5), ma la sua caratteristica più evidente è la sua trasparenza in controluce (fig. 6).

La sporificazione è notevolmente più tarda negli eterocarion che nel ceppo naturale. Il colore della superficie sporificata è risultato sempre intermedio tra i corrispondenti colori dei due genitori come osservato da PONTECORVO e SERMONTI ⁽¹³⁾.

Nei diversi eterocarion selezionati dalla stessa cultura mista o derivati da trasferimento di ife da una colonia eterocariotica, il colore della superficie sporificata è spesso variabile, presentando diverse gradazioni comprese tra il colore di un ceppo parentale e quello dell'altro.

Gli eterocarion tra un ceppo a conidi bianchi e un ceppo a conidi gialli apparivano sempre di un giallo più o meno chiaro. Quelli tra ceppi gialli e ceppi verdi sono risultati di un colore verde giallastro. Due eterocarion tra due ceppi verdi ed uno tra due ceppi gialli, si presentavano

⁽¹³⁾ PONTECORVO G. e SERMONTI G. - Loc. cit. (1954).



Fig. 1. - Colonie del ceppo 57 nic₁ hy y e 74 nic₂ py w, cresciute su terreno limitante; età 10 giorni. Un manicotto di micelio lussureggiante (eterocariotico) è evidente tra due colonie. Quella a sinistra è bianca (74), quella a destra è gialla (57), le altre tre colonie sono gialle ($\times 6,5$).

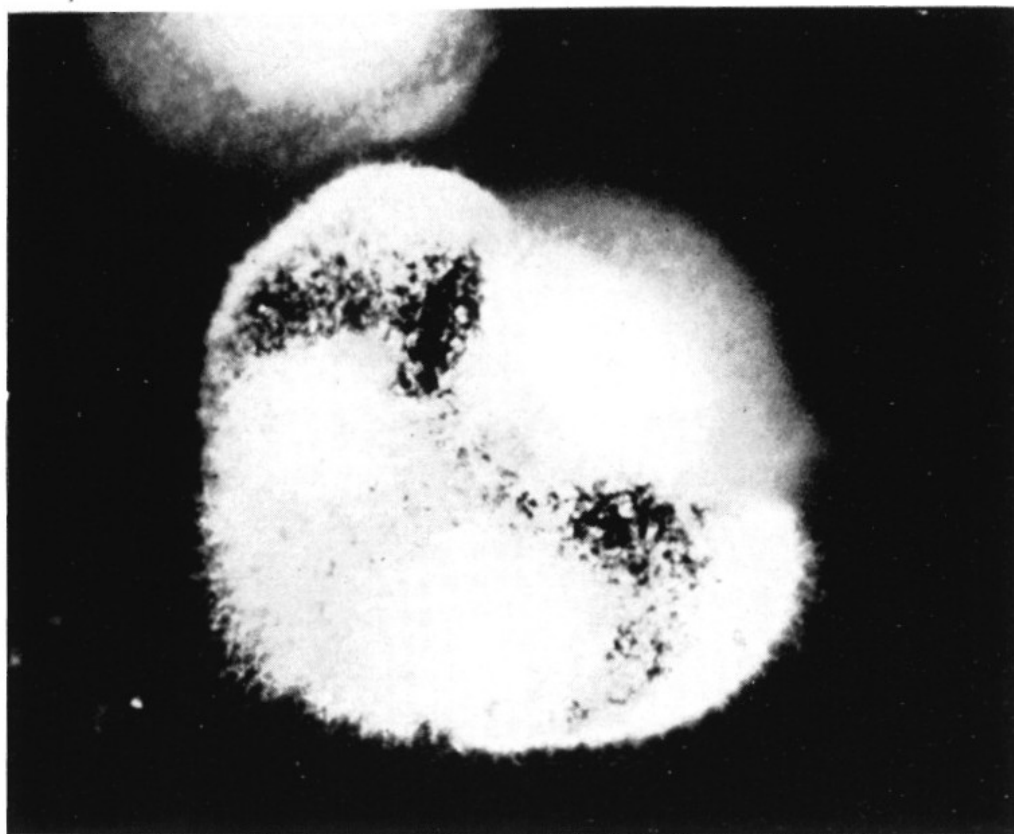


Fig. 2. - Ciuffi di micelio intensamente sporificato che sorgono nella zona di contatto tra colonie dei ceppi 22 le (a sinistra) e 29 pr (a destra), cresciute su mezzo limitante. Età 10 giorni ($\times 10$).

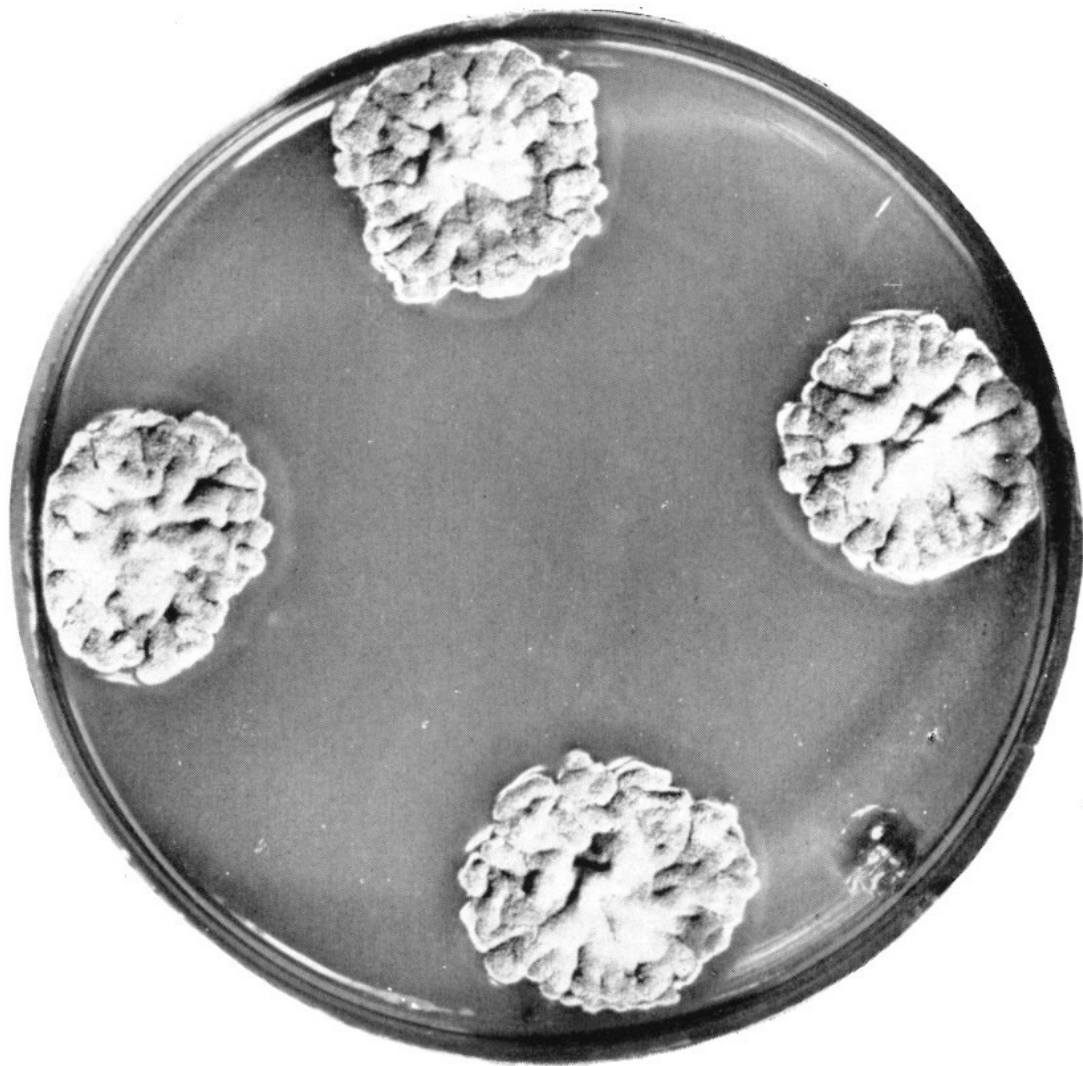


Fig. 3. - Colonie dell'eterocarion 26 le + 29 pr in crescita su MM (illuminate dall'alto).

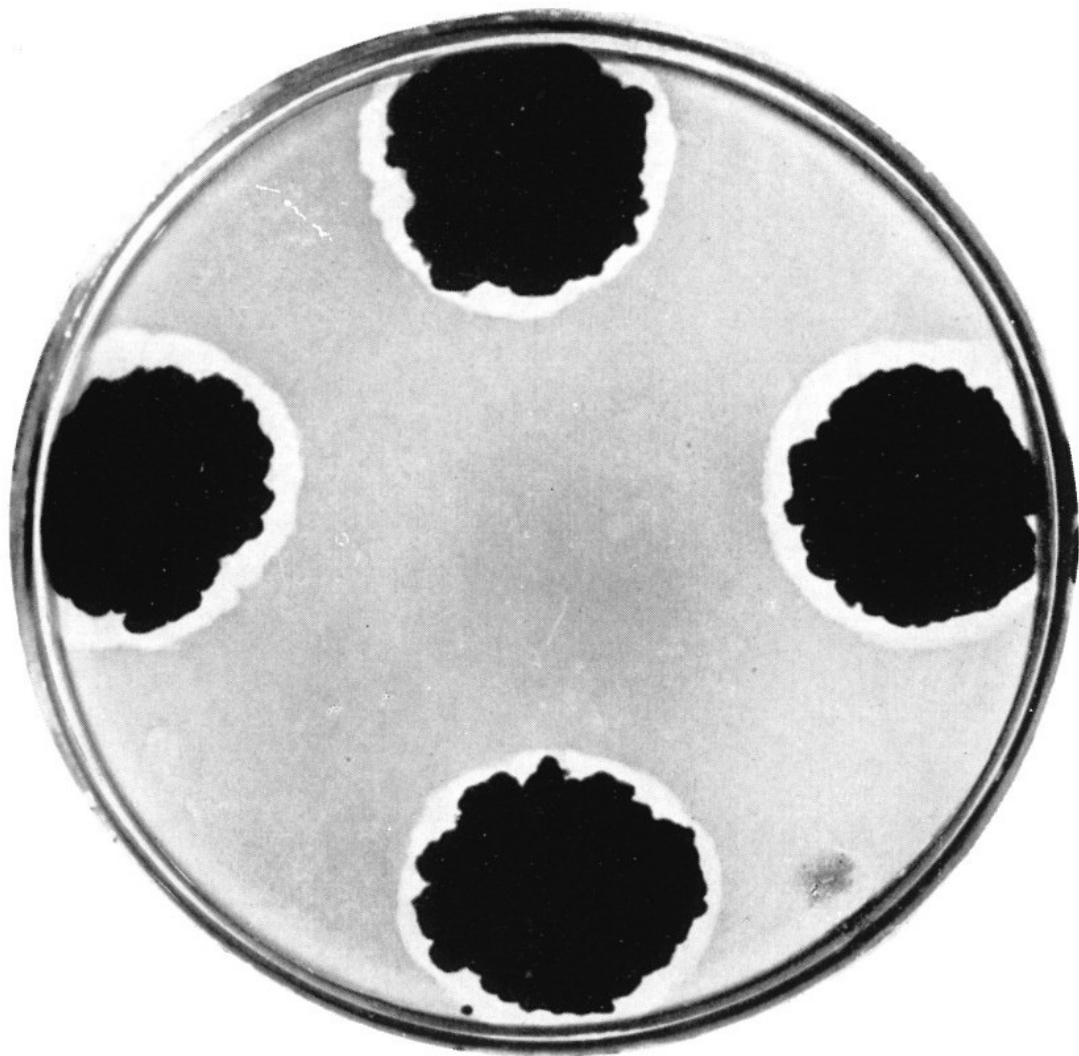


Fig. 4. - Colonie dell'eterocarion 26 le + 29 pr in crescita su MM (illuminate da sotto).
Si noti il margine trasparente costituito da micelio che cresce sommerso nell'agar.

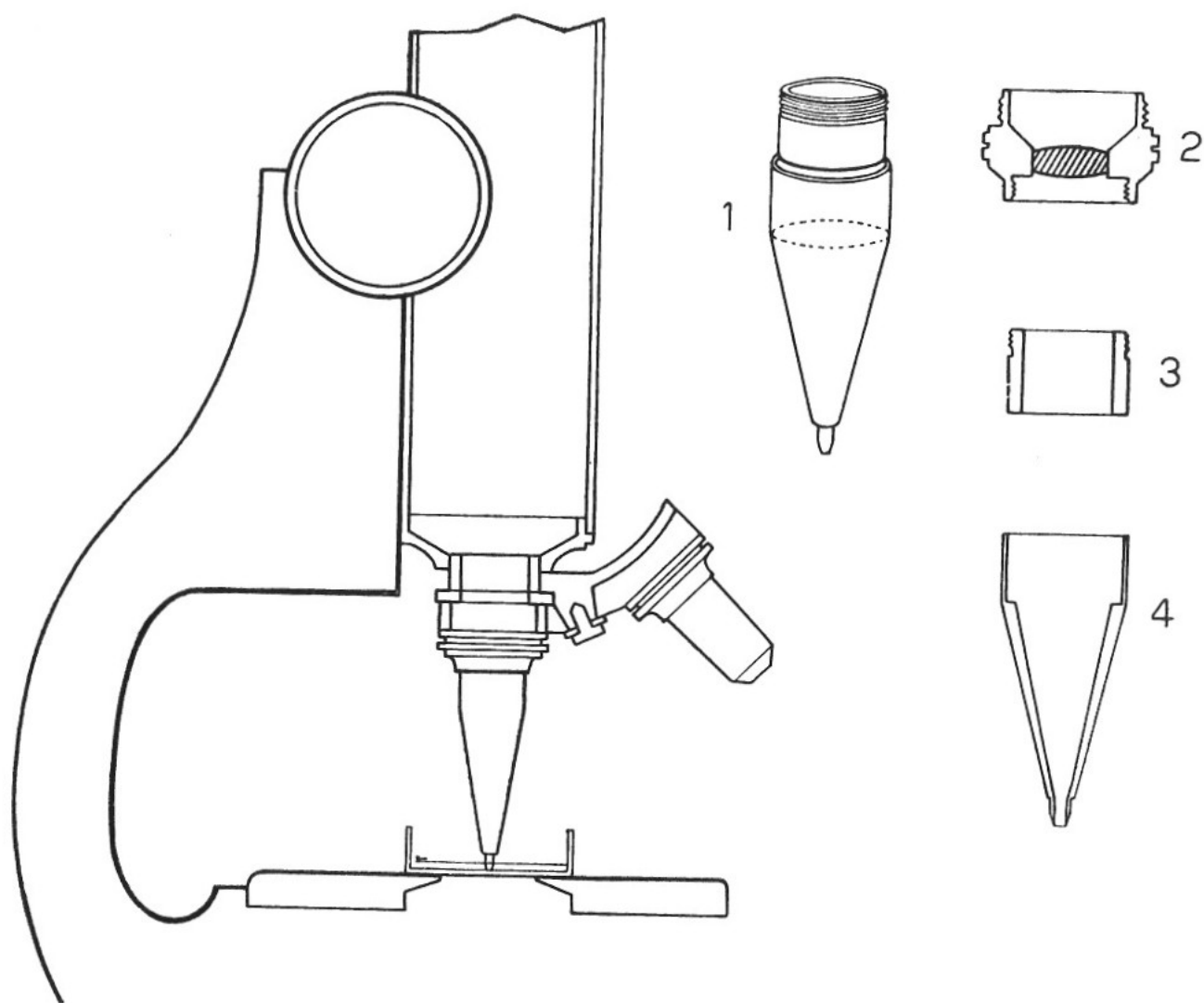


Fig. 5. - Piccolo cono cavo d'acciaio inossidabile per l'isolamento di singole ife, applicato ad un obiettivo del microscopio in luogo della lente frontale. (1) veduta dell'apparecchio completo, rimosso dall'obiettivo; (2) sezione dell'obiettivo, da cui la lente frontale e il suo supporto sono stati asportati; (3) cilindro a frizione che collega l'obiettivo con il cono; (4) il cono cavo: esso termina con un piccolo cilindro il cui margine affilato taglia l'agar. Quest'ultima parte (4) può essere rapidamente sostituita durante il lavoro.



Fig. 6. - Saggio auxanografico dell'eterocariosi. Una densa sospensione di conidi dall'eterocarion 26 le + 29 pr è inclusa in agar MM. Alcuni cristalli di leucina (sotto) e di prolina (sopra) sono infissi nell'agar in punti opposti della piastra. La crescita dei ceppi componenti ha luogo nelle zone in cui le sostanze sono diffuse.

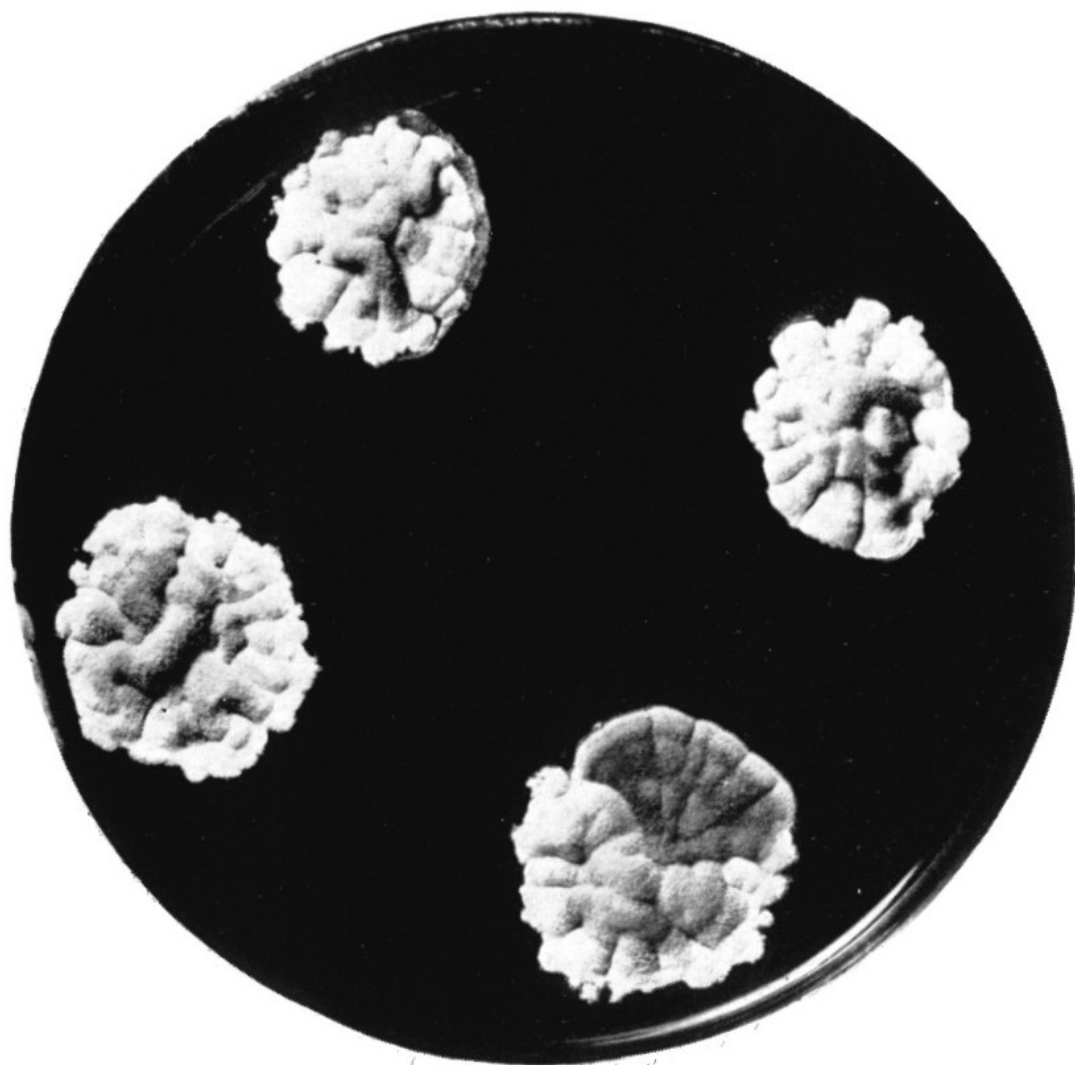


Fig. 7. - Colonie dell'eterocarion $65 pr y_2 sp_2 + 124 hy y_2 sp_2$ isolate su MM. Al margine di una di esse si osserva un settore diploide eterozigote, con spore verdi e crescita regolare.



Fig. 8. - Ciuffi di micelio eterocariotico con sporificazione verde, formati in una cultura mista, su terreno limitante, dei ceppi 26 le (colonie piccole biancastre) e 29 pr (colonie giallastre a forma di ciambella).



Fig. 9. - Colonie dell'eterocarion 63 ts sp y + 51 thi pr, isolate su MM. Una di esse ha dato luogo ad un settore diploide eterozigote, con spore di un verde intenso.

rispettivamente di un verde e di un giallo intenso. Tali osservazioni sono raccolte nella tab. 4.

Tab. 4. - Colore della superficie sporificata in diversi eterocarion bilanciati di *Penicillium chrysogenum*.

Eterocarion bilanciati	Colore dei conidi dei genitori	Colore della superficie sporificata dell'eterocarion
57 nic hy y + 74 nic py w	giallo + bianco	giallastro
63 ts sp y + 46 me w	giallo + bianco	bianco-giallastro
63 ts sp y + 65 pr y sp	giallo + giallo	gialla
51 thi pr + 63 ts sp y	verde + giallo	giallo-verdastro
86 y thi pr + 117 cy	giallo + verde	verde-giallastro
23 ts + 22 su	verde + verde	verde
29 pr + 23 le	verde + verde	verde

Dopo un periodo di circa una decina di giorni dal trasferimento l'eterocarion cessa di crescere ed il margine della colonia, pur conservando la sua irregolarità perde la sua caratteristica trasparenza e si ricopre di micelio aereo.

Il trasferimento degli eterocarion si effettua prelevando dal margine della colonia in sviluppo un pezzetto di agar contenente le ife in crescita e trasportandolo su MM. L'eterocarion si riproduce regolarmente, a meno che la colonia da cui si tenta il trasferimento non sia stata lasciata invecchiare sino alla morte del micelio vegetativo.

Il trasferimento di conidi dall'eterocarion su MM non dà luogo a crescita. Trasferiti su CM i conidi germinano e danno origine a colonie che risultano o dell'uno o dell'altro tipo parenterale. La segregazione è immediatamente evidente quando l'eterocarion è sintetizzato tra due ceppi a differente colore di conidi. Su MM cui sia stata aggiunta la sostanza (o le sostanze) richiesta dall'uno o dall'altro ceppo parentale si sviluppa quel solo tipo la cui richiesta sia stata soddisfatta. Il conteggio delle colonie che si sviluppano sui diversi terreni, o la rilevazione del colore delle colonie che si sviluppano sul terreno completo, permettono il calcolo del rapporto tra le frequenze dei due tipi parentali tra i conidi dell'eterocarion. Alcuni di tali rapporti sono riportati nella tab. 5.

Tab. 5. - Frequenza dei due tipi parentali tra i conidi di alcuni eterocarion bilanciati in *Penicillium chrysogenum*.

Eterocarion bilanciati		Terreni adottati (MM con aggiunta di)(*)		N. di colonie dei tipi:		Percentuale delle colonie dei tipi:	
a	b	1	2	a	b	a	b
51 thi pr	+ 63 ts sp y	pr thi	me	29	131	18	82
86 y thi pr	+ 117 cy	pr thi	me	7	43	14	86
26 le	+ pr	le	pr	164	200	45	55
63 ts sp y	+ 121 sp me w	cy	me (**)	22	180(**)	10	90
65 pr y sp	+ 121 sp me w	pr	me	46	366	11	89

(*) Le sostanze, indicate come nella tab. 3, sono aggiunte nelle concentrazioni ottime riportate nella tab. 2

(**) Tutti e due i ceppi crescono su MM + metionina. Il numero b di colonie è stato calcolato come la differenza tra il numero di colonie in (1) e in (2) (202-22=180).

PROVE DELL'ETEROCARIOSI.

L'eterocarion è per definizione un ceppo che presenta nelle sue ife nuclei di natura diversa. Essa non è semplicemente una mistura di ife di tipo diverso, ma contiene alcune singole ife nel cui citoplasma sono presenti nuclei diversi.

La prova dell'eterocariosi si raggiunge pertanto isolando meccanicamente una singola ifa dalla colonia supposta eterocariotica e ricuperando poi dal micelio prodotto da questa i due cloni costituenti l'eterocarion.

La prova è stata realizzata in alcuni degli eterocarion prodotti in *Penicillium* col seguente procedimento: un tratto del margine della colonia che si vuole saggiare è prelevato con un ago insieme all'agar in cui è sommerso, ponendo cura ad evitare il contatto dell'ago con la zona conidiofora della colonia. Il tassello è trasferito nel fondo di una provettina sterile in poche gocce d'acqua e accuratamente spappolato con una bacchettina di vetro. Con una sottile pipetta Pasteur la sospensione è quindi più volte succhiata e respinta nel fondo della provettina, in modo da realizzare quanto meglio la separazione delle ife.

Sono preparate intanto alcune scatole Petri dal fondo il più possibile piano, su cui è disteso uno strato sottilissimo di agar MM (ca 2 mm di spessore).

Una goccia della sospensione di ife è posta su di un coprioggetti, portata sotto il microscopio ed esplorata per valutare il grado di sepa-

razione delle ife ed il loro numero. Se le ife sono ben separate e ne risultano circa un centinaio in una goccia, una goccia della sospensione è lasciata cadere su ognuna delle scatole di MM preparate come sopra specificato. Altrimenti la sospensione è diluita, oppure più di una goccia è lasciata cadere su ogni scatola se la sospensione risulta più o meno affollata del desiderio. Se la separazione delle ife è insoddisfacente è continuato il frantumamento nel fondo della provettina.

La goccia (o le gocce) deposta sull'agar è distesa con una spatolina su tutta la superficie. E' consigliabile effettuare la stessa operazione in alcune scatole di CM, che serviranno come controllo del numero dei frammenti ifali vivi. Le scatole sono deposte a 24°C ed ivi tenute fino al giorno successivo.

L'isolamento delle singole ife previamente separate è eseguito col micromanipolatore rappresentato e descritto nella fig. 5. Il piccolo cono cavo è sterilizzato sulla fiamma e lasciato raffreddare in una scatola Petri sterile. L'operazione si esegue a coperchio sollevato, essendo il pericolo di contaminazione dall'aria irrilevante, in considerazione della minuscola frazione di superficie che viene prelevata in seguito all'isolamento. La scatola aperta è posta sul tavolo del microscopio e il microscopio, col cono inserito all'obbiettivo, è messo a fuoco sulla superficie dell'agar. Alcune delle ife si presentano come ombre, altre spiccano sulla superficie per la loro rifrangenza; tra queste ultime sono scelte quelle che offrono una più ricca ramificazione, mai però tale che non risulti evidente la continuità del tronco centrale e dei suoi rami. Il tubo del microscopio è allora abbassato col movimento delle viti macrometriche finchè la punta aperta del cono non abbia raggiunto il fondo della scatola. Se l'agar è troppo spesso deve essere fatta attenzione che la punta del cono non affondi troppo nell'agar, ad evitare che il tassellino rimanga ad occludere l'apertura del cono. Il tassellino delimitato dal taglio operato dal micromanipolatore rimarrà al suo posto dopo il sollevamento del tubo del microscopio e al suo centro potrà osservarsi l'ifa isolata. L'operazione è ripetuta su altre ife.

I tassellini di agar così ottenuti sono quindi trasferiti con una lancetta su scatole di agar MM di spessore normale. Qui alcune delle ife trasferite daranno luogo nei giorni successivi allo sviluppo di colonie. Quando le nuove colonie presenteranno la superficie sporificata, i conidi potranno essere prelevati e piastrati per il recupero dei cloni originali.

In tutti i casi in cui l'isolamento ifale di singole ife su colonie eterocariotiche è stato tentato la frequenza delle risposte positive è stata sempre molto bassa (v. Tab. 6).

Tab. 6. - Isolamento di singole ife e recupero dei ceppi parentali da eterocarion bilanciati di *Penicillium chrysogenum*.

Eterocarion bilanciati	Età degli E. C. giorni	Ife isolate n.	Nuovi eteroc. sviluppati	Recupero dei ceppi parentali (*)
51 thi pr + 63 ts spy	9	15	2	+
117 cy + 86 y thi pr	8	14	0	—
63 ts sp y + 46 me w	7	12	3	+
51 thi pr + 53 me hy y	7	22	1	+

(*) Un risultato positivo è indicato con +

Il recupero di conidi dei due tipi parentali dalle colonie che derivano dall'isolamento di singole ife rappresenta una prova critica dell'eterocariosi. Nella pratica di lavoro, una buona evidenza dell'eterocariosi potrà ottenersi col recupero dei tipi parentali anche da colonie supposte eterocariotiche, non provenienti da singole ife.

In tal caso l'eterocariosi non si distingue criticamente dal sintrofismo, quella condizione cioè in cui le ife di due auxotrofi complementari, mescolate insieme, crescono su MM senza fondersi a formare eterocarion.

La crescita sintrofica su agar in *Penicillium chrysogenum* dà luogo a colonie minuscole, senza margine in crescita sull'agar, molto convolute, che fessurano l'agar adiacente, inconfondibili con le colonie eterocariotiche.

Il recupero dei ceppi parentali dai conidi di un eterocarion può effettuarsi secondo due modalità. a) Mediante il piastramento di un certo numero di conidi su terreni che permettono il differenziamento di due tipi di colonie parentali: in questo caso è possibile il calcolo delle frequenze relative dei due tipi (Tab. 5). b) con una auxanografia dei conidi dell'eterocarion. Un gran numero di conidi lavati via dalla superficie dell'eterocarion sono inclusi in agar MM fuso in una scatola Petri. La sostanza (o le sostanze) richiesta da un ceppo è aggiunta sotto forma di pochi cristalli in un punto dell'agar prossimo al margine della scatola. All'estremità opposta dello stesso diametro è aggiunta la sostanza (o le sostanze) richiesta dall'altro ceppo. Se un alone di crescita si forma dopo pochi giorni in corrispondenza delle due aggiunte la presenza dei due tipi di conidi è provata (la prova non è evidentemente significativa se una delle due sostanze aggiunte soddisfa la richiesta di tutti e due i ceppi originali).

Poichè nel *P. chrysogenum* le cellule ifali contengono diversi nuclei, mentre i conidi sono uninucleati ⁽¹⁴⁾, la crescita eterocariotica può iniziare da ife ma non da singoli conidi. In specie con conidi bi- o multinucleati, l'eterocarion può riprodursi anche attraverso singoli conidi ⁽¹⁵⁾. Pertanto una prova dell'eterocariosi può ottenersi in *P. chrysogenum* quando il ceppo in esame si riproduce per ife ma non per conidi. Quando l'eterocarion è sintetizzato tra ceppi auxotrofi, il piastramento dei suoi conidi su MM non dovrebbe dar luogo a nessuna crescita. Invero, l'assenza di crescita su MM dai conidi di tali eterocarion, sperimentalmente stabilita, conferma le osservazioni citologiche di TONOLO e URBANI ⁽¹⁴⁾.

La prova più sbrigativa per distinguere un eterocarion da un re-tromutante o da un diploide consiste nel passare delicatamente un'ansa che trattenga una goccia di acqua sterile sulla superficie della colonia da saggiare, in modo da prelevare solo dei conidi, quindi strisciare l'ansa su agar MM. In queste condizioni solo l'eterocarion non si riproduce.

Tab. 7. - Diploidi eterozigoti ottenuti da alcuni eterocarion bilanciati in *Penicillium chrysogenum*.

a) Selezione di diploidi da conidi di eterocarion piastrati su MM.			
Eterocarion bilanciati	N. conidi piastrati	Diploidi eterozig. ottenuti	Rapporto conidi piastrati/diploidi ottenuti
55 me hy y + 66 ad cy w	9.750.000	139	70.144 : 1
26 le + 29 pr	10.240.000	5	2.048.000 : 1
63 ts sp y + 65 pr y sp	21.000.000	ca 1.400	15.000 : 1
51 thi pr + 63 ts sp y	6.000.000	6	1.000.000 : 1
86 y thi pr + 117 cy	2.740.000	ca 800	3.400 : 1
b) Eterocarion da cui i diploidi sono apparsi come settori.			
63 ts sp y	+ 65 pr y sp		
46 me w	+ 63 ts sp y		
51 thi pr	+ 63 ts sp y		

⁽¹⁴⁾ TONOLO A. e URBANI E. - Bull. World Hlth Org., 6: 177, (1952).

⁽¹⁵⁾ PROUT T., HUEBSCHMAN C., LEVENE H. e RYAN F. J. - Genetics, 38: 518, (1953).

Per distinguere l'eterocarion da uno dei ceppi parentali (in terreni limitanti) basterà trasferire un tassello di agar dal margine delle colonie in questione su MM. Solo l'eterocarion si riproduce in queste condizioni. Queste ultime prove si basano sull'assunzione, già ricordata, che l'eterocariosi in *Penicillium chrysogenum* è possibile nelle ife (polinucleate), ma non nei conidi (uninucleati).

Un'ultima prova dell'eterocariosi di natura diversa da quelle sinora esposte, perchè non presuppone osservazioni e nozioni citologiche, è quella fondata sulla capacità degli eterocarion di preludere alla formazione di diploidi eterozigoti.

Un diploide eterozigote è un ceppo che presenta tutti i caratteri dell'ascendente comune dei due parenti dell'eterocarion, e che si riproduce attraverso i singoli conidi.

Esso contiene nei suoi singoli nuclei i geni dominanti e recessivi dei due genitori dell'eterocarion da cui il ceppo proviene (¹⁶, ¹⁷).

I diploidi sorgono rarissimi dopo piastramento su MM di diversi milioni di conidi di un eterocarion tra ceppi auxotrofi complementari (Tab. 7). Come si è detto, i conidi di un tale eterocarion, presentando le caratteristiche dei ceppi parentali, non sviluppano su MM. Il diploide eterozigote, eccezionalmente prodotto, sviluppa invece da singolo conidio, formando su MM una colonia con le caratteristiche dello ascendente dei ceppi parentali.

Un eterocarion tra due ceppi mutanti per il colore ha una superficie sporificata di un colore intermedio tra i colori dei ceppi parentale. Un diploide eterozigote tra gli stessi ceppi ha invece una superficie sporificata di un colore uguale a quello dell'ascendente comune dei due ceppi componenti. Se, per esempio, un genitore è giallo e l'altro è bianco, ed ambedue discendono da un ceppo verde, l'eterocarion che essi formano è giallo chiaro, il corrispondente diploide eterozigote è verde. In tali condizioni un diploide eterozigote può essere individuato come un settore verde, che eccezionalmente emerge dall'eterocarion giallastro. La formazione di un diploide eterozigote comporta una cario-gamia tra nuclei differenti presenti nello stesso citoplasma, e quindi l'eterocariosi.

CONCLUSIONI

Mediante le tecniche descritte in questa nota, la sintesi di eterocarion bilanciati tra ceppi auxotrofi di *P. chrysogenum* diviene un processo di facile realizzazione.

(¹⁶) PONTECORVO G. e SERMONTI G. - loc. cit., (1954).

(¹⁷) SERMONTI G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 17: 1348 (1954).

La tecnica è adottabile anche per la costituzione di eterocarion tra due ceppi che differiscono dal tipo selvatico per una sola richiesta nutrizionale. Ciò rende la preparazione dei ceppi da riunire in un eterocarion rapida come in *Neurospora* e *Aspergillus*.

Dopo un po' di pratica con il metodo, gli eterocarion possono essere isolati con la più grande facilità. In culture miste su terreno limitante alcuni eterocarion sono stati isolati con successo dalle zone di contatto tra colonie di tipo differente anche ove i ciuffi di micelio più sviluppati si osservavano appena.

La capacità di un ceppo di dar luogo a diploidi eterozigoti rappresenta una prova dell'eterocariosi, accanto alla sua capacità di segregare nei due tipi componenti. Essa costituisce una prova particolarmente conveniente nelle ricerche genetiche in *P. chrysogenum*, ove la sintesi degli eterocarion bilanciati è sempre un necessario preliminare per giungere alla costituzione dei diploidi eterozigoti.

L'A. desidera ringraziare la d.ssa M. T. Caglioti e la signora I. Sermonetti che hanno realizzato la sintesi di alcuni degli eterocarion su riportati.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro internazionale di chimica microbiologica.
