

113. Giuseppe SERMONTI. — Genetica del *Penicillium Chrysogenum*. —
II. Segregazione e ricombinazione da un diploide eterozigote
in *Penicillium chrysogenum* Thom.

Riassunto. — Da due ceppi di *Penicillium chrysogenum* con diverse richieste nutrizionali e differente colore dei conidi (ceppi genitori) è stato ottenuto un eterocarion bilanciato (22y13 + 7w16). Da questo è stato isolato un ceppo diploide eterozigote, con tutte le proprietà dell'ascendente comune (Q176 Wis) dei ceppi genitori (22y13/7w16) ⁽¹⁾.

Il presente lavoro riguarda lo studio dei segreganti dal diploide suddetto (nuovo simbolo: 55 me hy y / 66 ad cy w).

In seguito a piastramento di un migliaio di conidi del diploide su CM (terreno completo) si possono individuare e prelevare tra la massa delle colonie che conservano l'aspetto del diploide, alcune decine di colonie che presentano il colore (giallo o bianco) di uno dei genitori (segreganti selezionati per il colore).

Se il piastramento è eseguito su MM (terreno minimo) cui le sostanze richieste dai ceppi genitori sono aggiunte in quantità limitanti, tra la massa delle colonie che si sviluppano normalmente, se ne presentano alcune a crescita molto stentata. Trasferite su CM e MM buona parte di queste risultano avere richieste nutrizionali (segreganti selezionati per le richieste nutrizionali).

Tutti i segreganti selezionati sono stati saggiati per tutte le proprietà dei ceppi parentali e classificati in riguardo al colore e alle richieste nutrizionali.

I segreganti selezionati direttamente dal diploide (segreganti di primo ordine) presentano, isolate o in varie combinazioni, proprietà recessive dell'uno o dell'altro ceppo genitore. Nessun ceppo presenta però la ricombinazione di proprietà recessive provenienti dai due ceppi genitori.

L'ulteriore selezione di segreganti da quattro segreganti di primo ordine (segreganti di secondo ordine) ha dato luogo a 16 ceppi, 10 dei quali presentavano la ricombinazione di proprietà recessive dei due ceppi genitori.

Ciò rappresenta un'esauriente conferma del processo di ricombinazione parasessuale nel fungo imperfetto *Penicillium chrysogenum* Thom.

Résumé. — En partant de deux souches de *Penicillium chrysogenum* qui avaient des exigences nutritives différentes et dont les conidies étaient

⁽¹⁾ PONTECORVO G. e SERMONTI G. - J. gen. Microbiol., 11: 94, (1954).

de couleurs différentes (souches parentales) on a obtenu un hétérokaryon balancé (22y13-7w16). A partir de celui-ci, on a isolé une souche hétérozygote diploïde, présentant toutes les propriétés de l'ancêtre commun (Q 176 Wis) des souches parentales (22y13/7w16) (1).

L'étude actuelle concerne les ségrégants des diploïdes susdits (nouveau symbole: 55 me hy / 66 ad cy w).

Après « plating » d'un millier de conidies du diploïde sur CM (milieu complet) il a été possible de distinguer et de séparer parmi le grand nombre de colonies qui conservaient l'apparence diploïde, quelques douzaines de colonies ayant la couleur (jaune ou blanche) d'une des souches parentales (appelées ségrégants choisis par la couleur). Lors du « plating » sur MM (milieu minimum) auquel les substances nécessaires aux souches parentales ont été additionnées en quantités sub-optimales, on a pu observer une croissance très médiocre de quelques colonies, parmi celles qui se développaient normalement et qui constituaient la grande majorité. En les transportant sur CM et MM, un bon nombre de celles-ci avaient des besoins nutritifs (appelées ségrégants choisis par les besoins nutritifs).

Tous les ségrégants sélectionnés furent examinés pour toutes les caractéristiques des souches parentales et furent classés par rapport à leur couleur et leurs exigences nutritives.

Tous les ségrégants sélectionnés directement du diploïde (ségrégants de premier ordre) on montré (isolés ou différemment combinés) des propriétés de l'une ou de l'autre des souches parentales. Aucune souche n'a montré une récombinaison des propriétés récessives dérivant des deux souches parentales.

Une sélection ultérieure de ségrégants, en partant de quatre ségrégants de premier ordre, (ségrégants de second ordre) donna naissance à 16 souches, dont 10 montraient la récombinaison de propriétés récessives des deux souches parentales.

Ceci est une confirmation complète du processus de récombinaison « parasexuelle » dans le fungus imperfectus, *Penicillium chrysogenum* Thom.

Summary. — From two strains of *Penicillium chrysogenum* with different nutritional requirements and different colours of conidia (parent strains), a balanced heterokaryon (22y13 + 7w16) was obtained. From this a heterozygous diploid strain was isolated, which had all the

properties of the common ancestor (Q 176 Wis) of the parent strains (22y13/7w16) ⁽¹⁾.

The present study concerns the segregants of the above-mentioned diploid (new symbol: 55 me hy/66 ad cy w).

After plating about a thousand conidia of the diploid on CM (complete medium) it was possible to distinguish and separate from the great number of colonies which retained the diploid appearance, a few dozen colonies which gave the colour (yellow or white) of one of the parents (termed segregants selected for colour). When plating was carried out on MM (minimal medium) to which the substances required by the parent strains were added in limiting quantities, there could be observed a few colonies with very stunted growth among the normally-developing colonies which constituted the large majority. When transferred on to CM and MM to which no growth factors had been added, a fair number of these were shown to have nutritional requirements (termed segregants selected for nutritional requirements).

All the selected segregants were tested for all the markers of the parent strains, and were classified as regards colour and nutritional requirements.

All the segregants selected directly from the diploid (first order segregants) showed (isolated or in various combinations) the recessive properties of one or the other parent strain. No strain showed recombination of recessive properties deriving from both parent strains.

Further selection of segregants from four first order segregants (second order segregants) gave rise to 16 strains, 10 of which showed recombination of recessive properties from both parent strains.

This represents a complete confirmation of the process of « parasexual » recombination in the fungus imperfectus, *Penicillium chrysogenum* Thom.

Zusammenfassung. — Aus zwei Stämmen von *Penicillium chrysogenum*, die verschiedene Ernährungsbedürfnisse und verschiedene Konidienfarbe besaßen (Elternstämme), wurde ein balanziertes Heterocaryon (22y13 + 7w16) erhalten. Aus diesem wurde eine heterozygoter, diploider Stamm isoliert, der alle Eigenschaften des Stammes (Q 176 Wis) hatte, aus dem die beiden Eltern (22y13/7w16) hervorgegangen waren ⁽¹⁾.

Die gegenwärtigen Untersuchungen behandeln die Aufspaltungen des oben erwähnten Diplonten (neues Zeichen: 55 me hy/ 66 ad cy w).

Nach Aussaat von ungefähr tausend Konidien des Diplonten auf CM

(vollständigem Medium) war es möglich unter der grossen Anzahl der diploiden Kolonien einige Dutzend Kolonien zu isolieren, die die Konidienfarbe der Elternstämme (gelb oder weiss) besaßen. (Auswahl der Aufspaltungen hinsichtlich der Farbe!). Nach einer Aussaat auf einem MM (Minimalmedium), dem in begrenztem Masse die von den Eltern benötigten Stoffe zugesetzt wurden, konnte man unterden sich in der Mehrzahl normal entwickelnden Kolonien einige mit kümmerlichen Wachstum beobachten. Bei Übertragung dieser Kolonien auf ein CM und ein MM, denen keine Wachstumsfaktoren zugesetzt worden waren, zeigte sich, dass eine grosse Anzahl Ernährungsdefekte beass. (Aufspaltung hinsichtlich der Ernährungsbedürfnisse!).

Alle diese Aufspaltungen wurden auf alle Eigenschaften der Elternstämme getestet und klassifiziert hinsichtlich ihrer Farbe und ihrer Ernährungsbedürfnisse.

Alle Aufspaltungen, die unmittelbar aus dem Diplonten isoliert wurden (Aufspaltungen erster Art), zeigten (allein oder in verschiedenen Kombinationen) die rezessiven Eigenschaften des einen oder anderen Elternteils. Kein Stamm zeigte Neukombination der rezessiven Eigenschaften der Elternstämme.

Die weitere Selection von Aufspaltungen aus vier Aufspaltungen erster Art ergab 16 Stämme (Aufspaltungen zweiter Art). 10 dieser Stämme zeigten Neucombinationen der rezessiven Eigenschaften der Eltern.

Dies ist die vollständige Bestätigung des Vorganges der « parasexuellen » Neukombination bei dem imperfekten Pilz *Penicillium chrysogenum* Thom.

La ricombinazione tra caratteri di differenti ceppi, al di fuori o in assenza di un ciclo sessuale, è stata recentemente ottenuta in tre specie di funghi filamentosi, precisamente in *Aspergillus nidulans* (2, 3); *Aspergillus niger* (4, 5); e in *Penicillium chrysogenum* (6).

Il procedimento seguito nei tre casi consiste delle tre seguenti fasi:

1) sintesi di eterocarion bilanciati tra coppie di ceppi mutanti differenti nelle richieste nutrizionali, ed in altre proprietà;

(2) ROPER J. A. - *Experientia*, 8: 14, (1952).

(3) PONTECORVO G. e ROPER J. A. - *J. gen. Microbiol. (Proc.)*, 6: (1952), VII; *Advances in Genetics*, 5: 218, (1953)

(4) PONTECORVO G. - *Nature*, 170: 204, (1952).

(5) PONTECORVO G. ROPER J. A. e FORBES E. - *J. gen. Microbiol.*, 8: 1938, (1953).

(6) PONTECORVO G. e SERMONTI G. - *Nature*, 172: 216, (1953-1954). loc. cit.

2) isolamento dagli eterocarion bilanciati di ceppi aventi nelle loro ife nuclei diploidi eterozigoti;

3) selezione dai ceppi diploidi eterozigoti di segreganti che presentano le proprietà dei ceppi originali in nuove combinazioni.

I processi che conducono alla ricombinazione di caratteri per una via che non è quella sessuale sono detti « parasessuali » (7).

Nel caso del *Penicillium chrysogenum* le maggiori difficoltà nell'induzione del ciclo parasessuale s'incontrano nella formazione degli eterocarion bilanciati (8). Adeguate tecniche per la sintesi degli eterocarion in *P. chrysogenum* sono state sviluppate solo successivamente (9).

L'isolamento dei diploidi eterozigoti dagli eterocarion bilanciati è stato invece facile come nel caso dell'*A. niger* (10). Da due eterocarion bilanciati sono stati ottenuti due diploidi eterozigoti, rispettivamente contrassegnati con i simboli:

22y DW1/7w DW4 e 22y13/7w16.

Dal diploide 22y DW1/7w DW4 sono stati isolati segreganti di primo e di secondo ordine (8). Tra questi un ceppo con conidi bianchi (come il genitore 7w DW4) e con richiesta di ipoxantina (come il genitore 22y DW1) presentava in una nuova combinazione proprietà (recessive) dei ceppi originali.

La ricerca di segreganti e ricombinanti dal diploide eterozigote 22y13/7w16 è oggetto della presente nota.

Essa mira a presentare una più ampia ed esauriente documentazione della ricombinazione in *P. chrysogenum*.

SINTESI DEL DIPLOIDE ETEROZIGOTE II 53/66 (= 22y13/7w16).

Il procedimento attraverso il quale è stata ottenuta la sintesi del diploide 22y13/7w16 è stato descritto dettagliatamente in un precedente lavoro (8) e sarà riferito qui solo sommariamente.

In una prima fase del lavoro si è giunti alla costituzione di due ceppi ognuno differente dal ceppo originale (Q 176) in tre paia di caratteri alternativi e l'uno dall'altro in sei paia. I nuovi caratteri sono stati otte-

(7) PONTECORVO G. - *Advances in Genetics*, 5: 144, (1953).

(8) PONTECORVO G. e SERMONTI G. - (1954). loc. cit.

(9) SERMONTI G. - *Rend. Ist. Sup. Sanità*, 17: 1330 (1954).

(10) PONTECORVO G., ROPER J. A. e FORBES E. - (1953). loc. cit.

nuti attraverso successive irradiazioni con U.V. I ceppi ottenuti erano designati con i simboli 22y13 e 7w16. Essi si trovano attualmente nella collezione del nostro laboratorio rispettivamente con i simboli 55 *me hy y* e 66 *ad cy w* e con tali simboli verranno designati d'ora in avanti. Il numero indica il posto di collezione e le sigle letterali contrassegnano le proprietà indotte, in ordine inverso d'induzione (v. tab. 1):

me = richiesta obbligata di metionina per la normale crescita su MM

hy = richiesta di ipoxantina o adenina

y = colore giallo dei conidi

ad = richiesta obbligata di adenina

cy = richiesta di cisteina o metionina

w = colore bianco dei conidi.

Dai due ceppi è stato sintetizzato un eterocarion bilanciato, cioè un nuovo ceppo contenente nelle sue ife nuclei dei due ceppi parentali. L'eterocarion è stato stabilito isolando piccoli frammenti di un micelio più rigoglioso sorto nelle regioni di contatto tra colonie dei due tipi in crescita su un agar completo.

L'eterocarion si sviluppava su terreno minimo (cioè su un terreno in cui erano assenti i fattori di crescita richiesti dai ceppi parentali) e presentava una superficie sporificata di colore giallastro. Esso poteva venir trasferito attraverso frammenti di micelio o singole ife, ma, trasferito per conidi, segregava nei due tipi parentali.

I conidi del *P. chrysogenum* contengono un solo nucleo ⁽¹¹⁾ e non sono quindi in grado di conservare la condizione eterocariotica.

8 milioni di conidi dall'eterocarion sono stati piastrati su piastre di Petri con terreno minimo. Solo rare colonie si sono sviluppate (circa 100 ogni 10⁶ conidi piastrati): la maggior parte di esse risultarono nuovi eterocarion, presumibilmente sviluppatasi da frammenti di ifa piastrati casualmente insieme ai conidi.

Tre colonie crescevano meglio delle altre e presentavano superficie sporificata verde. Isolate e purificate mediante isolamento di singolo conidio, si dimostrarono diploidi eterozigoti. Eguali diploidi eterozigoti sono stati ottenuti anche come settori, dalle nuove colonie eterocariotiche. Uno schema del processo parasessuale in *P. chrysogenum* è presentato nella fig. 1.

⁽¹¹⁾ TONOLO A. e URBANI E. - Bull. World Hlth Org., 6: 177, (1952).

PROPRIETA' DEL DIPLOIDE ETEROZIGOTE 55/66.

Il diploide eterozigote 22y13/7w16 sarà da ora in poi indicato col simbolo 55/66 o più estesamente

$$\frac{55 \text{ me hy y}}{66 \text{ ad cy w}}$$

Esso cresce normalmente su terreno minimo, dando luogo alla formazione di colonie regolari che si mantengono anche per trasferimento di singolo conidio. Presenta conidi verdi che microscopicamente risultano di dimensioni superiori a quelle dei genitori aploidi e dell'ascendente comune di questi.

Esso non presenta cioè alcuna delle proprietà indotte per mutazione nei ceppi 55 *me hy y* 66 *ad cy w* (tab. 1). (Per mutazione s'intende la

Tab. 1. - Caratteristiche del diploide eterozigote 55/66 comparate con quelle dei due ceppi aploidi componenti e del ceppo originale aploide Q176 Wis.

Ceppi	Sostanze richieste dai ceppi per la crescita			Colore dei conidi
	su MM + adenina (a)	su MM + metionina (b)	su MM	
Q 176 Wis	—	—	—	verde
55 <i>me hy y</i>	metionina	adenina/ipoxantina	a + b	giallo
66 <i>ad cy w</i>	metionina/cisteina	adenina	a + b	bianco
55/66	—	—	—	verde

Il segno / tra due sostanze sta ad indicare che l'una o l'altra sostanza permettono la crescita del ceppo.

brusca comparsa di un clone che differisce dal clone originale per una proprietà, in seguito a trattamento con agente mutageno). Ciò significa che ognuna delle proprietà indotte per mutazione in uno dei ceppi genitori è recessiva rispetto alla condizione originale di tale proprietà conservatasi nell'altro ceppo.

In termini genetici ciò significherebbe che le sei mutazioni indotte investono loci diversi, anche se, come nel caso di *y* e *w*, interessano

l'espressione di uno stesso carattere. Come generalmente accade, gli alleli mutati sarebbero recessivi rispetto agli alleli originali.

Le proprietà indotte per mutazione nei ceppi genitori saranno denominate da ora in poi *proprietà recessive* e contrassegnate da sigle con lettere minuscole. I ceppi saranno contrassegnati colle sigle delle sole proprietà recessive che essi presentano fenotipicamente. Solo il simbolo esteso del diploide eterozigote contiene le sigle di proprietà recessive latenti, quali indicazioni della sua costituzione genotipica.

MATERIALE E TECNICHE.

Le tecniche usate in questo lavoro, ove non esplicitamente detto, sono le stesse descritte nella prima nota di questa serie ⁽¹²⁾.

I terreni base adottati sono:

un *terreno minimo* (MM): Czapek-Dox modificato;

un *terreno completo* (CM): idrolisato di caseina, g 1,5; peptone Costantino, g 1,5; lievito autolisato Costantino, g 1; corn steep liquor, g 10; acido nucleico idrolisato, ml 3; soluzione di vitamine, ml 1; glucosio, g 20; agar, g 20; acqua fino a 1 litro. Per dettagli vedi il lavoro citato.

SELEZIONE DI SEGREGANTI DI PRIMO ORDINE.

I diploidi eterozigoti sintetizzati in *Aspergillus* ⁽¹³⁾ e in *Penicillium chrysogenum* ⁽¹⁴⁾ non sono completamente stabili e presentano una tendenza alla segregazione di distinti cloni in cui proprietà recessive dei ceppi aploidi originali ricompaiono nelle combinazioni originali o in nuove combinazioni.

La segregazione dal ceppo diploide eterozigote di cloni aventi le proprietà recessive dei ceppi parentali attesta la condizione eterozigote e quindi diploide del ceppo in esame.

La identificazione dei ceppi segreganti è facile quando essi presentano il colore dei conidi di uno dei ceppi genitori, giallo o bianco, che contrasta con il colore verde del diploide eterozigote. Segreganti gialli o bianchi possono essere identificati, o quali settori o chiazze gialle o bianche (fig. 6) che eccezionalmente compaiono dai diploidi eterozigoti, o

⁽¹²⁾ SERMONTI G. - (1954). loc. cit.

⁽¹³⁾ PONTECORVO G. - (1953). loc. cit.

⁽¹⁴⁾ PONTECORVO G. e SERMONTI G. - (1954). loc. cit.

quali singole rare colonie che spiccano dopo il piastramento di conidi del diploide eterozigote, tra le numerose colonie che hanno conservato il colore verde del diploide eterozigote.

Più difficile è la rilevazione dei segreganti che differiscono dal diploide per sole richieste nutrizionali. Essa richiede il saggio di singole colonie, isolate dopo piastramento di conidi del diploide su CM.

Un metodo per una grossolana selezione visuale dei segreganti auxotrofi (cioè con richieste nutrizionali), utilizzato nel corso del presente lavoro, è descritto più avanti.

Prima di essere studiato in riguardo alla segregazione il diploide II 55/66 è stato purificato attraverso isolamento con micromanipolatore di singolo conidio.

I segreganti direttamente derivati dal diploide eterozigote purificato sono chiamati segreganti di primo ordine.

La selezione dei segreganti di primo ordine dal diploide II 55/66 è stata condotta come segue.

Sospensioni di conidi del diploide eterozigote II 55/66 sono state distese su agar CM, in modo da ottenere in diversi gruppi di scatole Petri 5, 30 e 150 colonie per scatola. Dopo una settimana era possibile osser-

Tab. 2. - Terreni per saggiare le richieste nutrizionali dei segreganti dal diploide

eterozigote II $\frac{55 \text{ me hy y}}{66 \text{ ad cy w}}$

Possibili segreganti *	Supplementi al mezzo minimo **					
	nessuno	me + ad	me + hy	me	ad + cy	ad
cy hy	—	+	+	—	+	—
cy ad	—	+	—	—	+	—
cy	—	+	+	+	+	—
me hy	—	+	+	—	—	—
me ad	—	+	—	—	—	—
me	—	+	+	+	—	—
hy	—	+	+	—	+	+
ad	—	+	—	—	+	+
prototroph	+	+	+	+	+	+

* Nessun altro tipo di segregante è individuabile, causa la epistasi di *me* su *cy* e di *ad* su *hy*.

** La metionina soddisfa la richiesta di cistina (non viceversa), l'adenina soddisfa la richiesta di ipoxantina (non viceversa).

+ significa crescita; — significa mancanza di crescita.

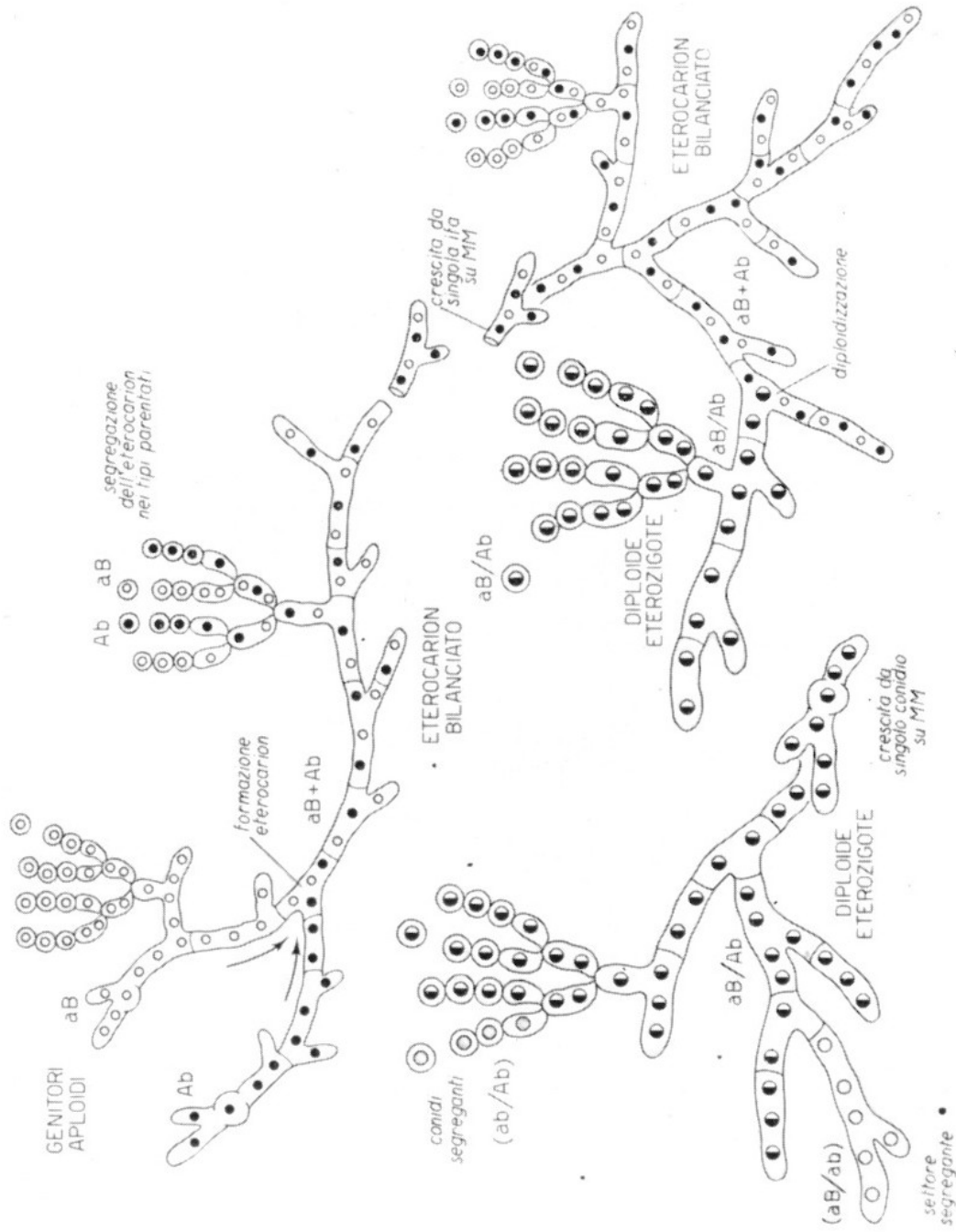


Fig. I. - Schema del processo « parasessuale » in *Penicillium chrysogenum* Thom. Prima fase: formazione dell'eterocarian bilanciato da due ceppi aploidi; seconda fase: formazione di nuclei diploidi eterozigoti nell'eterocarian, isolamento di un clone diploide eterozigote; terza fase: comparsa di cloni segreganti, talvolta ricombinanti, dal diploide eterozigote.



Fig. 2. - Selezione di segreganti per le richieste nutrizionali su terreno limitante. Le tre colonie piccole saranno prelevate e saggiate.

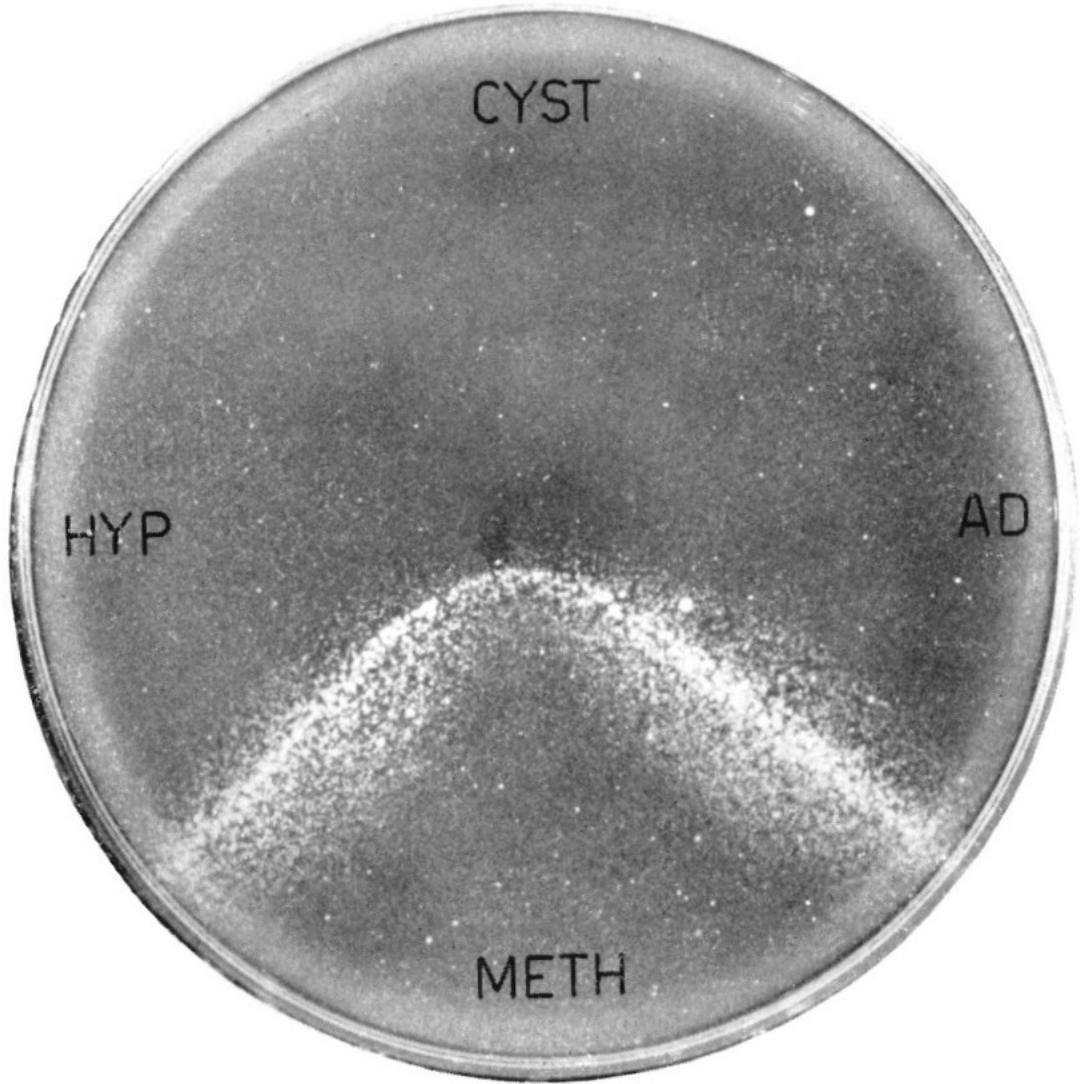


Fig. 3. - Saggio auxanografico: ceppo 55 me hy y (richiede metionina + adenina/ipo-xantina).

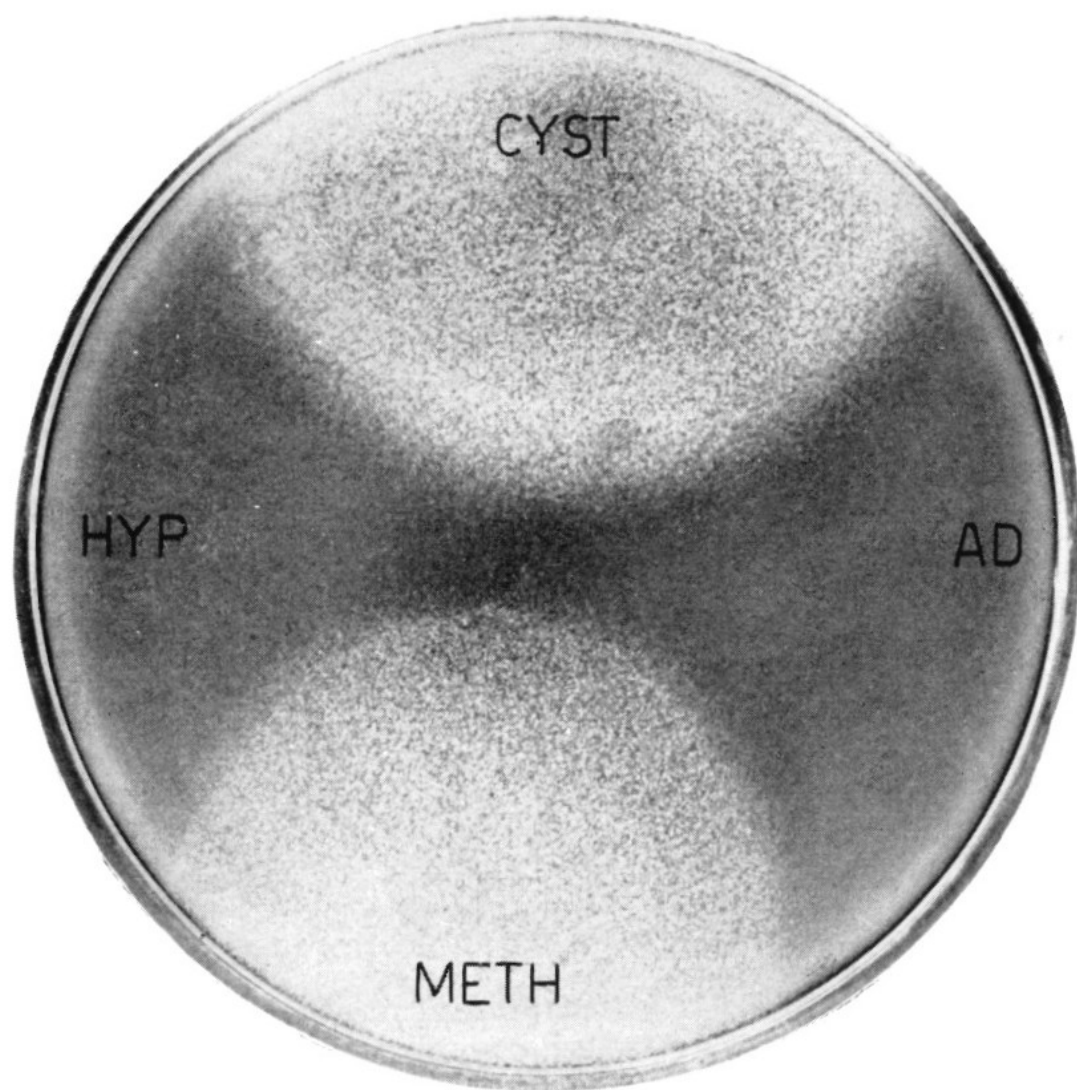


Fig. 4. - Saggio auxanografico: segregante di primo ordine dal diploide *55 me hy y / 66 ad cy w* (richiede metionina / cistina).

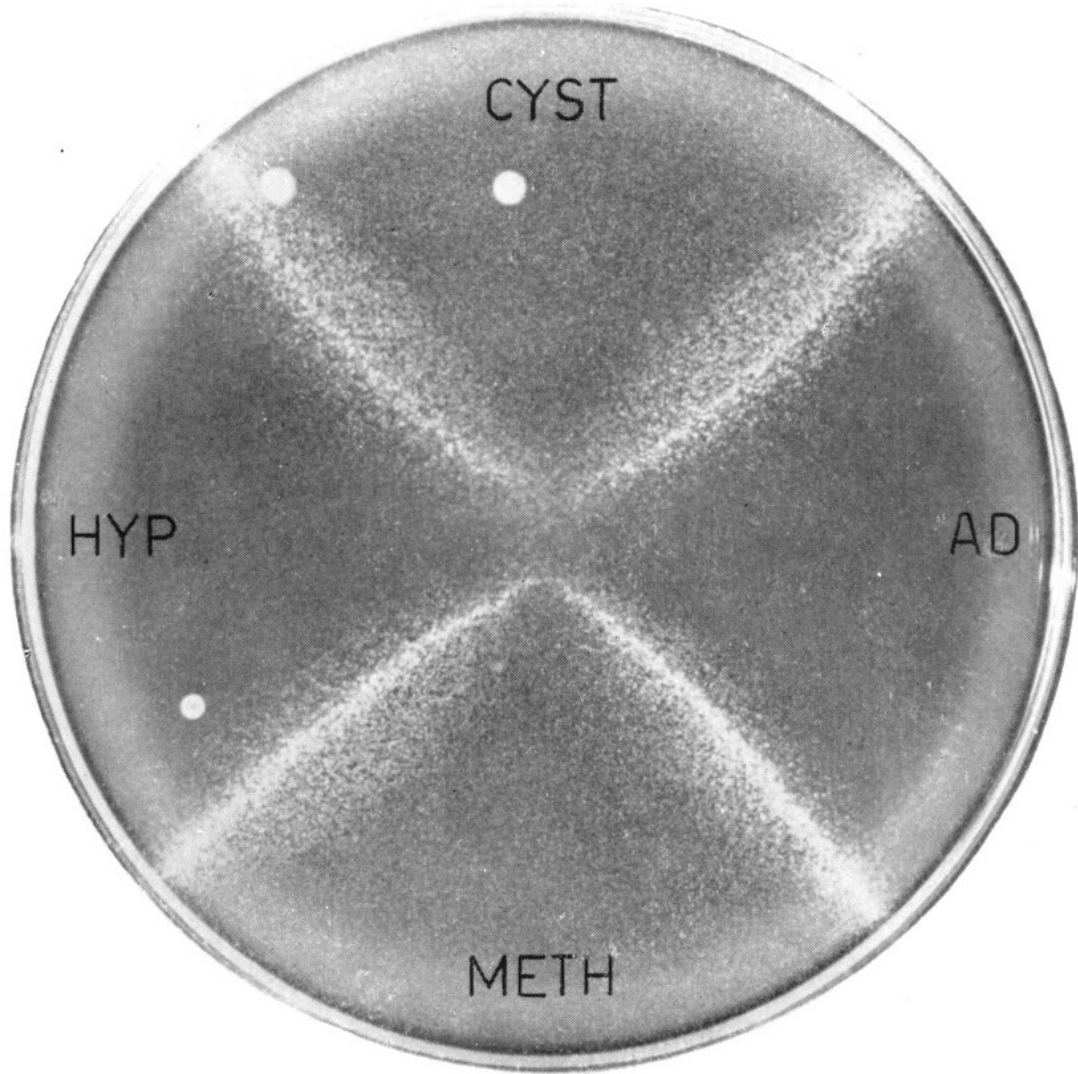


Fig. 5. - Saggio auxanografico: segregante di secondo ordine dal diploide *55 me hy y / 66 ad cy w* (richiede metionina / cistina + adenina / ipoxantina).



Fig. 6. - Colonie dal diploide eterozigote 55 me hy y / 65 ad cy w. Un segregante giallo si è formato come settore da una di esse.

vare — tra le colonie verdi del diploide eterozigote apparse — colonie gialle e bianche, ben distinte nelle scatole con minor numero di colonie, spesso frammiste alle verdi nelle altre scatole. La percentuale di segreganti per il colore osservabili tra le colonie apparse, diminuisce fortemente con l'aumentare della densità delle colonie per scatola. In totale su 1330 colonie contate si sono individuati 97 segreganti per il colore. Questi sono stati purificati mediante striscio su CM e successivo reisolamento, ricontrrollati per il colore e quindi saggiati per le richieste nutrizionali.

Su 81 segreganti per il colore passati ai saggi successivi 72 erano gialli e 9 bianchi. Essi sono stati trasferiti mediante inoculo puntiforme su varie scatole di MM, fornite delle sostanze richieste dai ceppi originali in diverse combinazioni, per il riconoscimento delle richieste nutrizionali, secondo lo schema della tab. 2.

69 ceppi su 81, tutti con conidi gialli, presentavano la doppia richiesta di metionina e ipoxantina. Due altri ceppi presentavano singole richieste, dieci erano prototrofi. Le richieste nutrizionali di 14 dei ceppi auxotrofi, tra cui i due con singole richieste, sono state controllate con il metodo auxanografico ⁽¹⁵⁾ (figg. 3, 4, 5).

Il dettaglio delle caratteristiche dei segreganti di primo ordine per il colore è riportato nella tab. 3A.

La selezione per le richieste nutrizionali dei segreganti di primo ordine dal diploide II 55/66 è stata ottenuta come segue.

E' stato preparato un MM, fornito di metionina e adenina, (cioè delle sostanze sufficienti per permettere la crescita di ogni eventuale segregante) in concentrazioni limitanti. Per concentrazione limitante di una sostanza s'intende una concentrazione tale da permettere solo uno stentato sviluppo di una colonia che richieda detta sostanza per la crescita ⁽¹⁶⁾. La metionina è stata aggiunta al MM per una concentrazione nell'agar di 0,02 mgr/ml, l'adenina per una concentrazione di 0,001 mgr/ml.

Su numerose scatole di questo terreno è distesa una sospensione di conidi del diploide, in modo di avere da 30 a 100 colonie per scatola. Le colonie che dopo sei giorni dalla semina presentavano crescita fortemente ridotta sono state trasferite su scatole di CM e MM (fig. 1). Da 1101 colonie comparse su 20 scatole sono state raccolte 47 colonie a crescita ridotta. Di esse 11 risultarono deficienti nutrizionali.

Tutte le undici colonie sono state saggiate col metodo auxanografico

⁽¹⁵⁾ PONTECORVO G. - J. gen. Microbiol., 3: 122, (1949).

⁽¹⁶⁾ SERMONTI G. - (1954). loc. cit

per le richieste nutrizionali (fig. 2) e classificate per il colore. Il dettaglio dell'esperienza è dato nella tab. 3B.

Tab. 3. - Segreganti di primo ordine dal diploide eterozigote

II $\frac{66 \text{ ad cy } w}{55 \text{ me hy } y}$

	A. - Selezionati per il colore							
	Proto-trofi	hy	me	cy	ad	hy me	ad cy	Tot
gialli	2	0	1	0	0	69	0	72
bianchi	8	0	0	1	0	0	0	9
	10	0	1	1	0	69	0	81
	B. - Selezionati per richieste nutrizionali							
verdi	—	2	0	3	0	0	0	5
gialli	—	0	1	0	0	4	0	5
bianchi	—	0	0	0	0	0	1	1
	—	2	1	3	0	4	1	11

Da quanto risulta dalla tab. 3A, B è possibile inferire che da piastramento di conidi del diploide eterozigote appaiono segreganti che presentano proprietà recessive dei ceppi originali isolate o in combinazioni. Si osserva altresì che tra i 92 segreganti di primo ordine osservati nessuno presenta proprietà recessive derivate da differenti genitori.

SELEZIONE DI SEGREGANTI DI SECONDO ORDINE.

Quattro dei segreganti di primo ordine sono stati utilizzati per la ricerca di ulteriori segreganti (segreganti di secondo ordine); e precisamente:

- un ceppo bianco prototrofo (*w*)
- un ceppo giallo prototrofo (*y*)
- un ceppo verde con richiesta di ipoxantina (*hy*)
- un ceppo verde con richiesta di cisteina (*cy*).

Dai primi tre ceppi i segreganti di secondo ordine sono stati selezionati per le richieste nutrizionali. Dall'ultimo per il colore.

I procedimenti seguiti sono stati gli stessi adottati per i segreganti di primo ordine. Nel caso del ceppo *hy*, al MM con metionina e adenina in concentrazioni limitanti, è stata aggiunta ipoxantina in concentrazione ottimale.

Tutte le richieste nutrizionali sono state saggiate col metodo auxanografico (fig. 2).

Sono stati isolati in totale 16 segreganti. Tra essi 10 presentavano proprietà recessive dei ceppi genitori in nuove combinazioni, rappresentando quindi veri ricombinanti.

I segreganti di secondo ordine sono elencati nella tab. 4; i ricombi-

Tab. 4. - Segreganti di secondo ordine dal diploide eterozigote II $\frac{66 \text{ ad } cy \text{ w}}{55 \text{ me } hy \text{ y}}$

Fenotipi dei segreganti di I ordine	Colonie osservate n.	Selezione per	Colonie selezion. n.	Segreganti di secondo ordine *			
				fenotipi	n.	tot	% trai selezion.
w	215	richieste	15	<i>w me hy</i>	3	3	20
hy	357	richieste	9	<i>y me hy</i> <i>w cy hy</i>	5 2	7	78
y	967	richieste	22	<i>y me hy</i> <i>y cy</i>	1 2	3	17
cy	688	colore	5	<i>y (cy) me hy</i>	3	3	60

(*) I fenotipi in corsivo sono ricombinanti.

nanti sono riportati in corsivo. Questi appartengono a quattro diversi tipi:

1) *w me hy*: conidi bianchi (dal ceppo 66), richiesta di metionina e ipoxantina (dal ceppo 55).

2) *w cy hy*: conidi bianchi e richiesta di cisteina (66), richiesta di ipoxantina (55) (v. fig. 5).

3) *y cyst*: conidi gialli (55) e richiesta di cisteina (66).

4) *y me (cy) hy*: conidi gialli e richiesta di metionina e di ipoxantina (55), presunta richiesta di cisteina (66). La richiesta di cisteina, supposta perchè il ceppo è segregante da un deficiente di cisteina, non può essere verificata in presenza della richiesta di metionina.

E' stata così raggiunta un'esauriente conferma della ricombinazione tra proprietà recessive di due diversi ceppi in *Penicillium chrysogenum*.

DISCUSSIONE.

I risultati della ricerca compiuta confermano e portano ulteriore evidenza alla presenza del fenomeno della ricombinazione parassessuale in *Penicillium chrysogenum*, come osservato da PONTECORVO & SERMONTI (17).

I dati riguardanti le frequenze relative e assolute di segreganti per le diverse proprietà non possono considerarsi quali espressione delle frequenze dei processi di segregazione perchè nessuna cura è stata presa per evitare l'effetto della distribuzione clonale nei nuclei segreganti, ed è altresì possibile che questi si moltiplichino differenzialmente.

In *Aspergillus nidulans* (18) la segregazione delle proprietà recessive dei ceppi parentali dai diploidi eterozigoti, sembra avvenire attraverso due distinti processi: il *crossing-over* somatico e la riduzione somatica.

Nel primo caso i segreganti conservano la condizione diploide, avendo uno o più geni, originalmente eterozigoti, allo stato omozigote recessivo e gli altri nella primitiva condizione eterozigote. Nel secondo caso i segreganti hanno nuclei aploidi che possono contenere cromosomi provenienti dai due diversi genitori.

In seguito al *crossing-over* somatico la ricombinazione tra proprietà recessive dei due genitori può avvenire solo attraverso due processi di segregazione successivi (salvo il caso eccezionale che due *crossing-over* somatici si producano contemporaneamente). I segreganti ancora eterozigoti per alcuni geni, possono dare ancora luogo a segregazione.

I segreganti aploidi derivati da un processo di riduzione somatica, possono presentare la ricombinazione di proprietà recessive dei due ceppi parentali in prima segregazione, e non danno luogo ad ulteriore segregazione.

Tra i segreganti di primo ordine del diploide studiato nessuno presenta ricombinazione di proprietà recessive dei due genitori e, d'altro canto, tutti i quattro segreganti impiegati per la ricerca di ulteriore segregazione hanno prodotto segreganti di II ordine. Ciò fa pensare che il processo di segregazione avvenga in *P. chrysogenum*, almeno principal-

(17) J. gen. Microbiol., 41: 94, (1954).

(18) PONTECORVO G., TARR GLOORR E. e FORBES E. - J. Benet., 52: 226, (1954).

mente, attraverso il processo del *crossing-over somatico* ⁽¹⁹⁾, come in *Aspergillus nidulans* ⁽²⁰⁾.

La dimostrazione della ricombinazione parasessuale in *P. chrysogenum* apre un nuovo campo per i ricercatori interessati ai problemi concernenti la produzione della penicillina, fornendo loro tutti quei mezzi di lavoro e quelle possibilità di rappresentazione che la genetica ha introdotto recentemente nel campo della microbiologia.

L'A. desidera esprimere i suoi ringraziamenti al Dr. Pontecorvo per la sua guida e i suoi suggerimenti, al Prof. E. B. Chain F.R.S. per l'interessamento concesso a questo lavoro e al Dr. L. G. Silvestri per le utili discussioni sulla materia trattata in questa nota.

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

⁽¹⁹⁾ STERN C. - Genetics, 21: 625, (1936).

⁽²⁰⁾ PONTECORVO G., TARR GLOORR E. e FORBES E. - (1954). loc. cit.