

38. A. TONOLO e A. CARILLI. — Fenomeni di fusione nucleare nella formazione di conidiofori di *Penicillium purpurogenum* Stoll., in coltura sommersa. (*)

Riassunto. — Sono descritti particolari fenomeni cariologici osservati all'atto della formazione del conidioforo di *Penicillium purpurogenum* STOLL in coltura sommersa, che vengono interpretati come una fusione nucleare. Si dà un'interpretazione genetica del fenomeno osservato sulla base di quanto è stato ampiamente documentato con soli mezzi genetici per la formazione di nuclei diploidi in specie di funghi asessuati.

Summary. — Some particular caryological phenomena are described observed during the formation of conidiophores of *Penicillium purpurogenum* Stoll in submerged culture, which are interpreted as a nuclear fusion. A genetical interpretation of the observed phenomena is given, based on knowledge which has been largely established with genetical methods for the formation of diploid nuclei in species of asexual fungi.

INTRODUZIONE.

In un precedente lavoro ⁽¹⁾ sono state riportate alcune osservazioni citologiche sulla formazione di conidi di *Penicillium chrysogenum*, in coltura sommersa.

Tali osservazioni si riferivano anche ad un altro ceppo isolato da un inquinamento su piastra — il PR/8 della nostra collezione — che risultò appartenere alla specie *Penicillium purpurogenum* STOLL ⁽²⁾. Il ceppo, in coltura sommersa, produce conidi a mezzo di conidiofori regolari, ma monoverticillati (fig. 1), a differenza di quanto riscontrato in diversi ceppi di *Penicillium chrysogenum* THOM, che possono produrre conidi contemporaneamente in due modi ben distinti: a mezzo di ife differenziate in conidiofori rudimentali e a mezzo di ife non differenziate.

Ulteriori osservazioni sul meccanismo di formazione dei conidiofori in *Penicillium purpurogenum* STOLL hanno messo in evidenza particolari fenomeni cariologici, che vengono descritti in questa nota.

(*) Questo lavoro è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 381 (1959).

TECNICHE E METODI.

Il ceppo è mantenuto in terra e per ogni esperienza si trasferiscono i conidi dalla terra sul seguente terreno:

Glucosio	g	10
Peptone Difco	»	5
Acqua distillata		1000 cm ³
Agar	g	20
pH 6-7		

Le colture sono tenute in termostato a temperatura di 27°C per 8-10 giorni, fino a completa conidificazione. Successivamente conidi sono seminati in beute da 350 cm³ contenenti g 30 ca. di orzo brillato, umettato con 10 cm³ della soluzione sporulante di WHIFFEN e SAVAGE (³). Queste colture sono fatte sviluppare in termostato a 27°C per 8 giorni, in modo che tutta la superficie delle cariossidi sia ricoperta di conidi. Mantenu- te in frigorifero a 5°C queste colture vengono prelevate quando occorra preparare la sospensione di conidi per l'inoculo.

L'inoculo consiste di una sospensione di conidi ottenuta dalle beute di orzo per lavaggio con acqua distillata; il suo volume è tale da dare nelle beute di sviluppo circa 100.000 conidi per cm³.

TERRENO.

Per la produzione di conidi in coltura sommersa è stato usato lo stesso terreno delle colture in agar, distribuito in ragione di 100 cm³ in beute da 500 cm³ di vetro Pyrex, poste su agitatore rotatorio (200 giri al minuto con eccentrico di cm 10) in camera termostatica a 27°C. L'osservazione microscopica è eseguita su materiale colorato con bleu cotton, verde malachite e, previa fissazione per 5' in alcool a 95°, con fucsina fenicata di Ziehl a caldo per 1'. Per la colorazione dei nuclei è seguito il metodo di ROBINOW (⁴), che consiste: 1) fissazione in goccia del preparato con vapori di acido osmico all'1% per 2'. 2) idrolisi in HCl normale a 60°C per un tempo variabile da 2 a 12'. 3) colorazione in una soluzione tampone M/15 secondo Sørensen a pH 7,2, contenente in rapporto 1 : 40 il colorante azzurro eosina bleu di metilene, soluzione sec. Giemsa, per 1 ora.

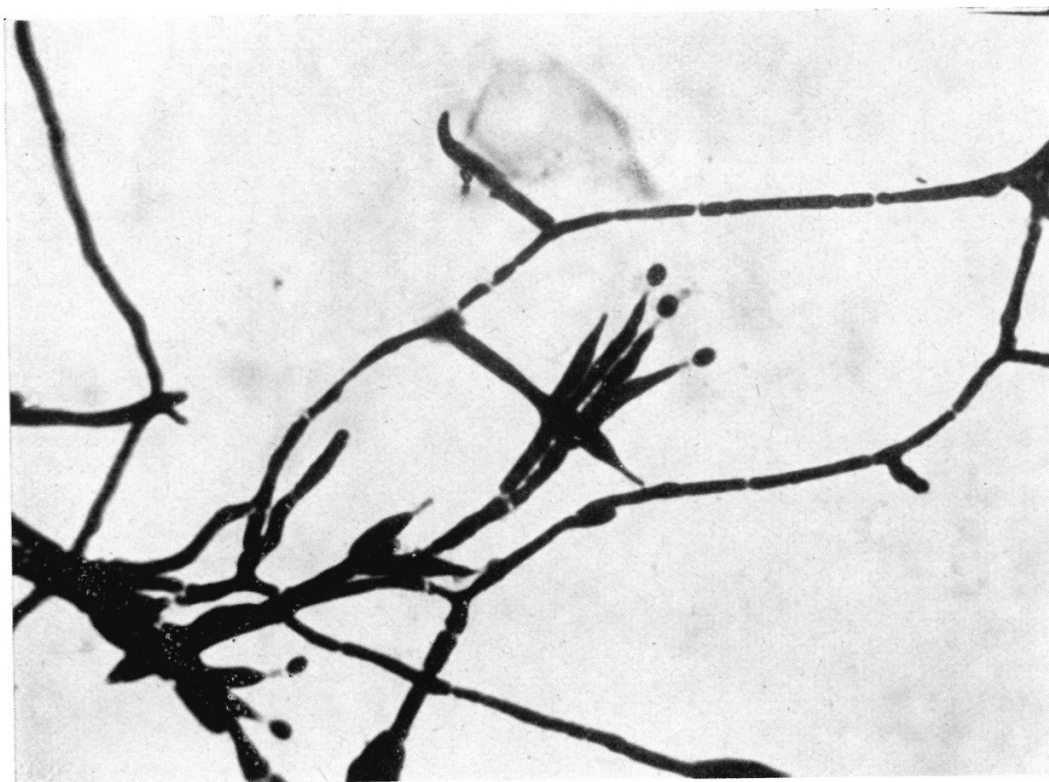


Fig. 1. - *Penicillium purpurogenum* Stoll in coltura sommersa. Formazione di conidi: colorazione con fuxina fenicata; $\times 1400$.

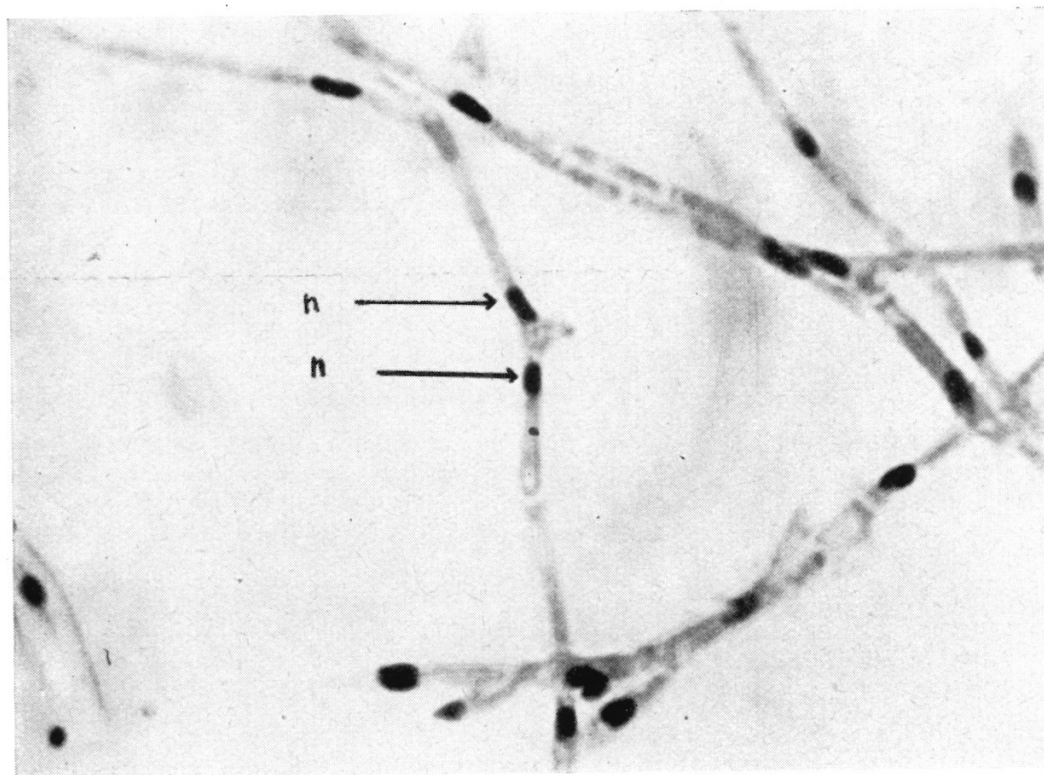


Fig. 2. - Stadio iniziale della formazione del conidioforo di *Penicillium purpurogenum* in coltura sommersa. Si notano i due nuclei (n) alla base della ramificazione; $\times 2300$.



Fig. 3. - Formazione del conidioforo di *Penicillium purpurogenum* in coltura sommersa. La distanza tra i due nuclei (n) è diminuita ed i nuclei stessi risultano spostati verso il tratto basale della ramificazione; $\times 2300$.

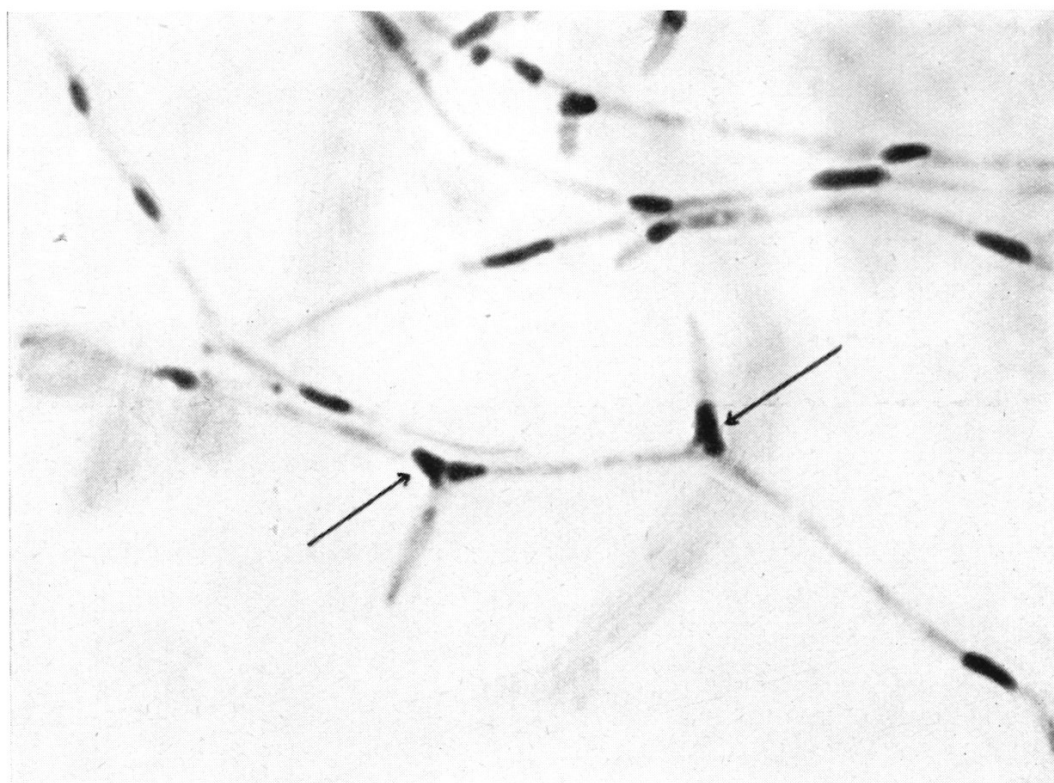


Fig. 4. - Stadi successivi della formazione del conidioforo di *Penicillium purpurogenum* in coltura sommersa. La distanza tra i due nuclei risulta sempre minore fino a scomparire; $\times 2300$.

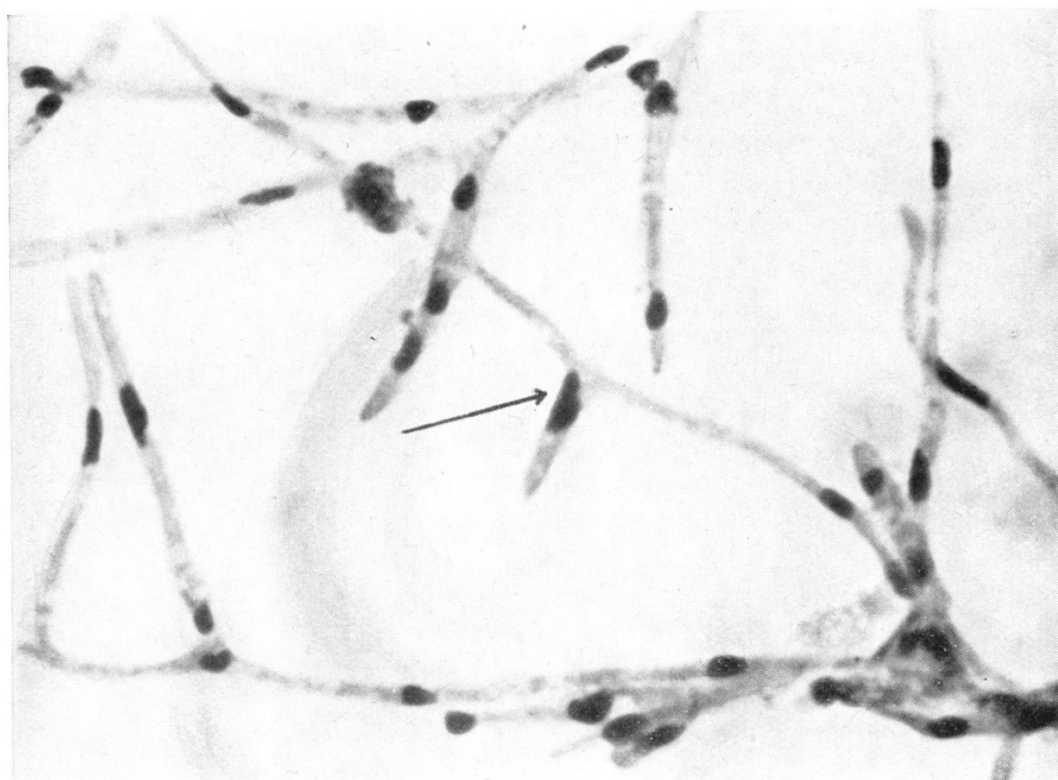


Fig. 5. - Stadi successivi della formazione del conidioforo di *Penicillium purpurogenum* in coltura sommersa. La distanza tra i due nuclei risulta sempre minore fino a scomparire; $\times 2300$.

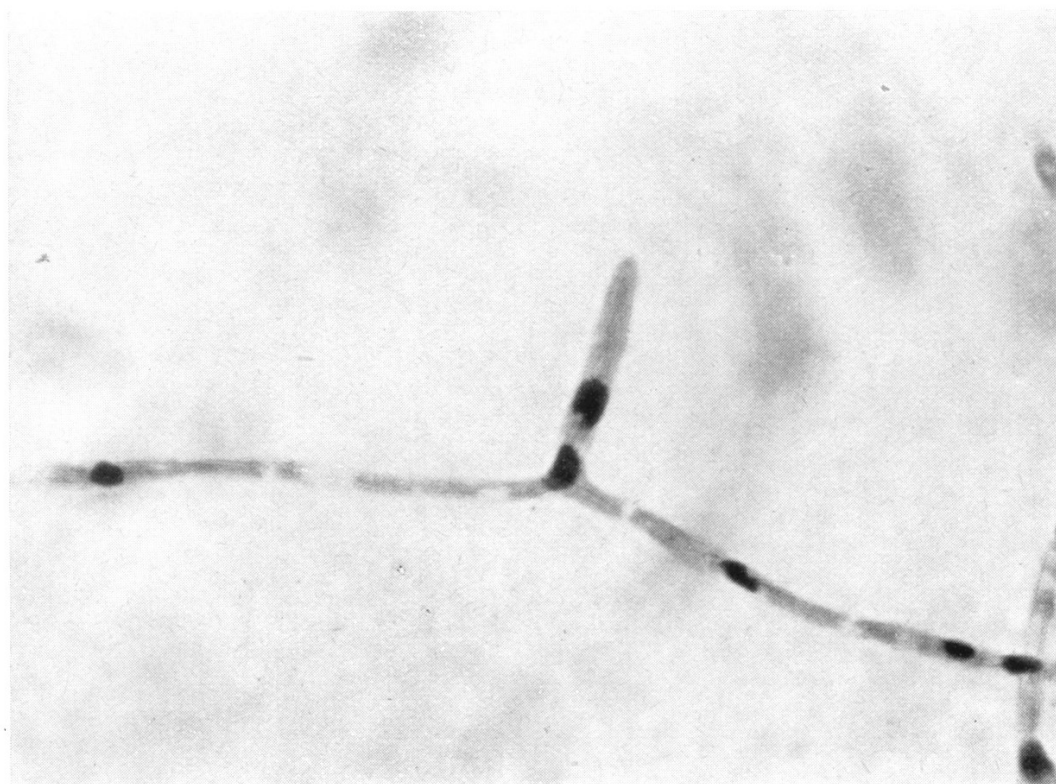


Fig. 6. - Formazione del conidioforo di *Penicillium purpurogenum* in coltura sommersa. Il nucleo derivato dalla fusione si è diviso originandone due, tra i quali si è formato il setto; $\times 2300$.



Fig. 7. - Formazione del conidioforo di *Penicillium purpurogenum* in coltura sommersa; $\times 2300$.

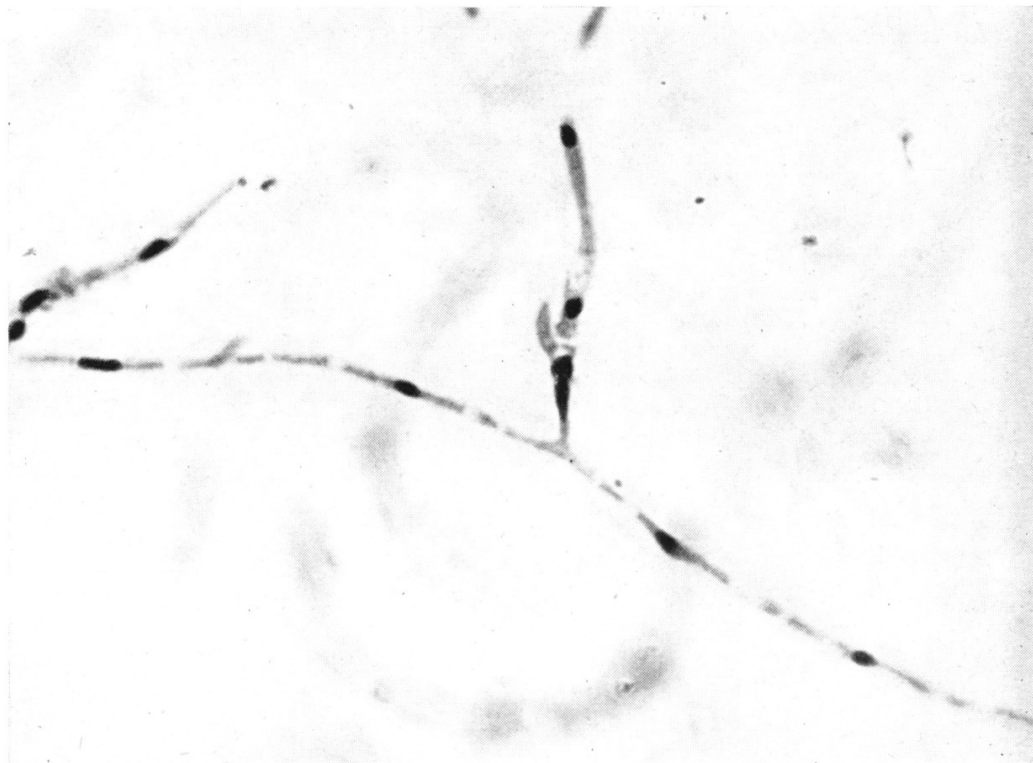


Fig. 8. - Formazione del conidioforo di *Penicillium purpurogenum* in coltura sommersa; $\times 2300$.

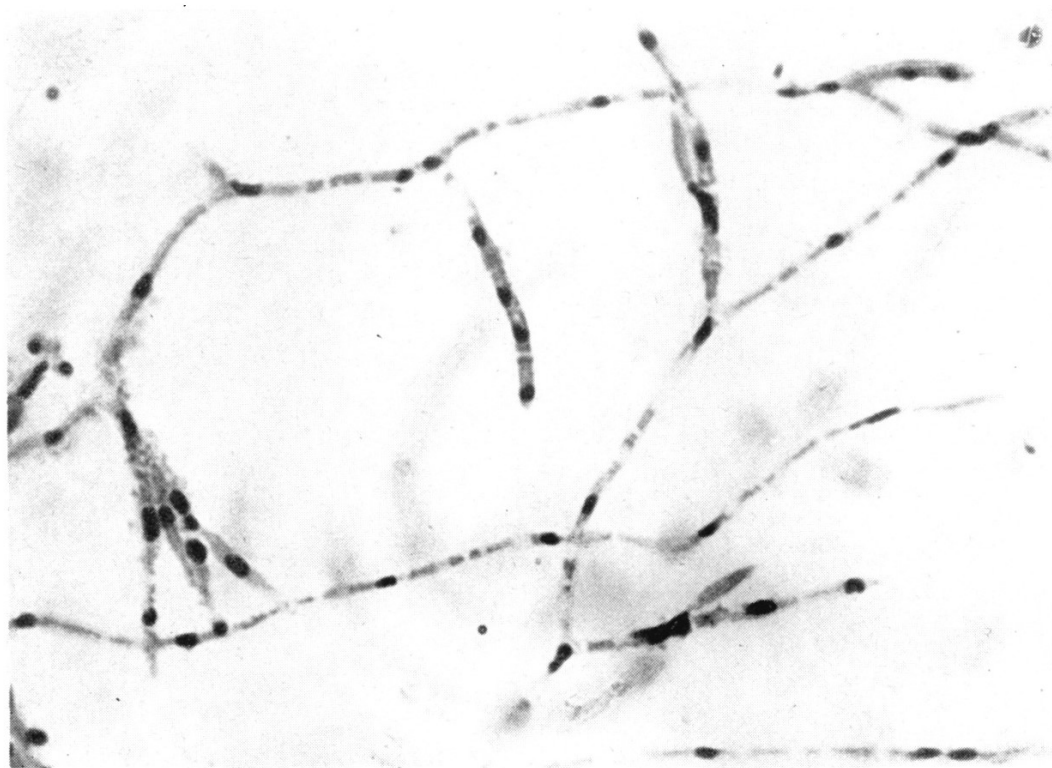


Fig. 9. - Formazione del conidioforo di *Penicillium purpurogenum* in coltura sommersa; $\times 2300$.

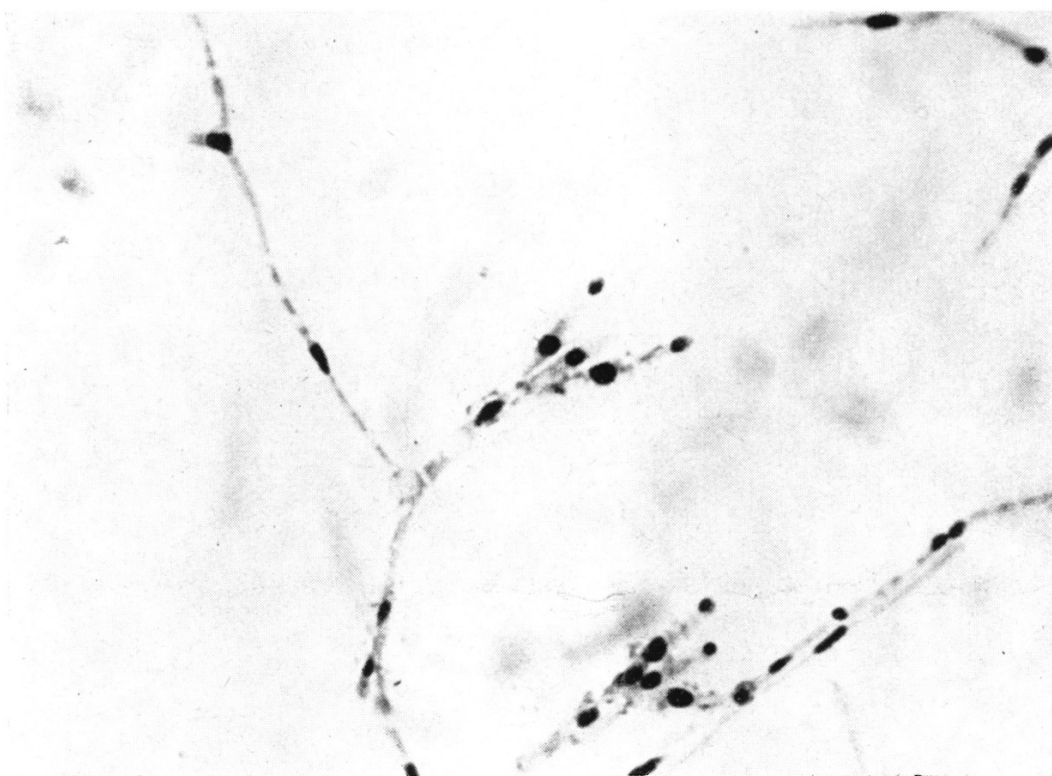


Fig. 10. - Formazione del conidioforo di *Penicillium purpurogenum* in coltura sommersa; $\times 2300$.



Fig. 11. - Formazione del conidioforo di *Penicillium purpurogenum* in coltura sommersa; $\times 2300$.

RISULTATI.

I primi conidi si formano a 24-48 ore dall'inoculo: la produzione va quindi rapidamente aumentando insieme a quella del pigmento rosso.

L'osservazione microscopica su materiale colorato è eseguita fin dal secondo giorno di coltura, ma il terzo giorno la produzione di conidi è tanto abbondante che, in genere, il materiale di un solo preparato permette di seguire tutte le fasi successive che portano alla formazione del conidioforo.

Da una ifa vegetativa si origina un abbozzo di ramificazione come una protuberanza laterale (fig. 2), che può essere considerata senz'altro il primo stadio della formazione di un conidioforo dal momento che, in queste condizioni, si osservano raramente ramificazioni vegetative. In stadi successivi si osserva che, mentre va aumentando la lunghezza della ramificazione laterale, diminuisce gradatamente la distanza tra i due nuclei più prossimi alla ramificazione stessa (fig. 3). Questi due nuclei risultano così sempre più vicini finchè, ad un certo punto, si trova un solo grosso nucleo nel tratto basale della ramificazione (figg. 4 e 5). Questo processo è sempre molto evidente nella formazione dell'apparato conidioforo e fa ritenere che tra i due nuclei interessati avvenga una cariogamia. Naturalmente è stato possibile seguire il fenomeno solo su materiale fissato e colorato, ma la successione delle diverse fasi è risultata tanto regolare da giustificare questa interpretazione.

La fusione nucleare descritta precede tutte le fasi successive di divisioni nucleari che portano alla formazione del conidioforo. Infatti da questo grosso nucleo basale, ben differenziato da quelli delle ife vegetative, per una prima divisione se ne originano due (fig. 6). Tra questi due nuclei si forma un setto che separa così la parte basale dell'ifa (conidioforo) dalla parte apicale, che costituisce la prima cellula conidiogena (sterigma). Raramente l'ifa conidiofora è risultata formata da più di una cellula. Il nucleo dello sterigma si divide a sua volta dando origine al nucleo del primo conidio; è interessante notare che questa divisione avviene contemporaneamente all'allungamento della parte distale dello sterigma, dove poi migra uno dei nuclei, mentre l'altro rimane al centro della cellula conidiogena (fig. 7).

Durante queste fasi si divide anche il nucleo della cellula basale, mentre da questa, per ramificazione laterale, si forma l'abbozzo di un secondo sterigma (figg. 7-8). Uno dei due nuclei originatisi da questa divisione migra nel secondo sterigma (fig. 9), mentre l'altro per successive divisioni forma i nuclei del terzo e, più raramente, del quarto sterigma (figg. 10 e 11).

I nuclei degli sterigmi, dividendosi contemporaneamente all'allungamento della parte distale dello sterigma, formano i nuclei dei conidi.

CONCLUSIONI.

I fenomeni cariologici osservati alla base dei conidiofori suggeriscono che un reale processo di cariogamia abbia luogo quasi regolarmente al momento della formazione del conidioforo in *Penicillium purpurogenum* STOLL. Questo processo porterebbe alla costituzione di nuclei diploidi il cui destino non può essere seguito sulla base della sola osservazione citologica. Tuttavia, un processo di riduzione cromatica deve necessariamente seguire nel ciclo vitale del fungo, ma non si può affermare se esso avvenga nel conidioforo stesso, all'atto della germinazione dei conidi o durante la fase di crescita vegetativa.

Dal punto di vista genetico i processi su menzionati darebbero luogo ad una vera sessualità, o, secondo la terminologia introdotta da PONTECORVO (5), a fenomeni di « parasessualità », non svolgendosi i processi regolarmente ed in organi specificamente differenziati per la riproduzione sessuale.

La formazione di nuclei diploidi in specie asessuate di funghi, o nella fase asessuale di funghi con riproduzione sessuale, ha ricevuto un'ampia documentazione genetica in questi ultimi anni. Essa è stata dimostrata in *Aspergillus nidulans* (6, 7), in *Aspergillus niger* (8) ed in *Penicillium chrysogenum* (9, 10, 11) sulla base dell'analisi genetica di cloni diploidi eterozigoti, isolati da miceli eterocariotici. Tuttavia nessuna dimostrazione citologica è stata sinora fornita del processo di fusione nucleare.

Ciò che è sorprendente nel materiale da noi esaminato, è l'altissima frequenza dei processi di fusione nucleare alla base dei conidiofori. Essi porterebbero alla costituzione di nuclei diploidi con una frequenza molto superiore a quella ottenuta nelle specie sopra indicate. Deve però osservarsi che in dette specie, con le tecniche impiegate, solo nuclei diploidi eterozigoti, cioè provenienti dalla fusione di nuclei geneticamente diversi, poterono essere rilevati.

Nel *Penicillium purpurogenum* STOLL invece, sembra di poter escludere che la fusione avvenga tra nuclei eterocariotici, in seguito a fenomeni di anastomosi tra ife originate da differenti conidi. Infatti l'osservazione di materiale prelevato nei primi stadi di sviluppo ha messo in evidenza che i conidiofori si formano allo stesso modo anche da ife giovanissime, nelle quali è ancora possibile riconoscere il conidio da cui queste si sono formate.

I risultati delle ricerche carilogiche descritte incoraggiano ad estendere al campo genetico lo studio dei processi osservati, impiegando ceppi geneticamente marcati ed adottando le tecniche di isolamento di nuclei diploidi eterozigoti sviluppate da ROPER ⁽⁶⁾.

Ringraziamo sentitamente il Prof. E. B. Chain, F.R.S. per l'interesse e l'incoraggiamento allo svolgimento di queste ricerche; il Prof. C. Sibilila ed il Prof. E. Gaümann per gli utili consigli e il Prof. G. Sermonti per la collaborazione nella interpretazione genetica.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro Internazionale di Chimica Microbiologica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) CARILLI A. e TONOLO A. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24: 436 (1961).
 - (²) RAPER K. B. e THOM C. - A manual of Penicillia. Williams and Wilkins Co. (1949).
 - (³) WHIFFEN A. J. e SAVAGE G. M. - J. Bact., 53: 231 (1947).
 - (⁴) ROBINOW C. F. - Proc. roy. Soc. London, B. 130 (1942).
 - (⁵) PONTECORVO G. - Atti IX Congr. Int. Genet., Caryologia, 6: (suppl.) 192 (1954).
 - (⁶) ROPER J. A. - Experientia, 8: 14 (1952).
 - (⁷) PONTECORVO G. - Advances in Genetics, 3: 141 (1953).
 - (⁸) PONTECORVO G., ROPER J. A. and FORBES E. - J. gen. Microbiol., 8: 198 (1953).
 - (⁹) PONTECORVO G. e SERMONTI G. - Nature, Lond., 172: 126 (1953).
 - (¹⁰) PONTECORVO G. e SERMONTI G. - J. gen. Microbiol., 11: 94 (1954).
 - (¹¹) SERMONTI G. - Rend. Ist. Sup. Sanità, (English edition) 17: 231 (1954).
-