

41. G. SERMONTI e G. MORPURGO. — Genetica del *Penicillium chrysogenum*. — Nota IV. Effetto di alcuni mutageni sulla segregazione somatica da diploidi eterozigoti. (*)

Riassunto. — Gli autori esaminano la possibilità di incrementare per mezzo di agenti mutageni i processi di segregazione somatica da ceppi diploidi eterozigoti di *Penicillium chrysogenum*, giungendo ad i seguenti risultati:

1) Trattamenti con HCHO, U.V. azotoiprite (HN-2) e raggi X producono un notevole incremento nella frequenza dei processi di segregazione somatica.

2) In seguito a trattamento con HN-2 si possono isolare cloni geneticamente instabili in cui il processo di segregazione si ripete con alta frequenza ad ogni « generazione ». Sono stati isolati 8 di tali cloni instabili.

3) All'interno di ogni clone i settori segreganti presentano tutti lo stesso fenotipo.

Summary. — The authors examined the possibility of increasing the rate of somatic segregation processes from heterozygous diploid strains of *Penicillium chrysogenum* by means of mutagenic agents, and reached the following conclusions:

1) Treatment with formalin (HCHO), ultraviolet radiation, nitrogen mustard (HN-2), or X-rays produces a striking increase in the rate of occurrence of somatic segregation processes.

2) After HN-2 treatment genetically unstable clones have been isolated whose conidia give rise to colonies regularly showing segregant sectors.

3) Segregant sectors all show the same phenotype within each unstable clone.

Nello studio della segregazione somatica da diploidi eterozigoti di *Penicillium chrysogenum* ai fini dell'analisi genetica o della pratica utilizzazione del ciclo parasessuale si presentano due principali difficoltà.

(*) Questo lavoro è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 416 (1959).

La prima deriva dalla bassa frequenza delle colonie segreganti che appaiono in seguito a piastramento di conidi diploidi eterozigoti.

Questo fatto rende la ricerca laboriosa particolarmente quando i geni la cui segregazione è in esame non interessano caratteri di facile osservazione. In pratica in qualche caso si devono saggiare alcune migliaia di colonie derivate da conidi di un ceppo diploide eterozigote, per disporre di poche decine di ceppi che abbiano subito qualche rimaneggiamento cromosomico e differiscono pertanto geneticamente dal diploide eterozigote. Nell'esame del diploide IV [SERMONTI ⁽¹⁾] — il primo sistematicamente studiato nel nostro laboratorio — che conteneva quattro marcatori selezionabili, di un totale di circa 40.000 colonie osservate solo 94 risultarono segreganti.

La seconda difficoltà deriva dal fatto che le colonie segreganti ottenute da piastramento di conidi diploidi eterozigoti hanno avuto origine da processi di segregazione anteriori al piastramento stesso, cosicché non può escludersi che diverse colonie segreganti con eguale fenotipo appartengano ad un unico clone prodottosi per un unico processo di segregazione. D'altro canto i nuclei segreganti, prima di essere isolati nei conidi, si trovano in competizione nel micelio con una maggioranza di nuclei non segreganti e processi di selezione possono entrare in giuoco in tale stadio. In tale modo l'emergenza di un dato fenotipo segregante viene ad essere funzione non solo della frequenza del processo di segregazione che gli dà origine, bensì anche di pressioni di selezione che agiscono dal momento del rimaneggiamento cromosomico che interessa i marcatori in questione al momento dell'isolamento del nucleo segregante [SERMONTI ⁽¹⁾].

Per ovviare alla prima difficoltà è necessario trovare qualche espediente atto a stimolare il processo di segregazione somatica, così da aumentare la frequenza dei nuclei segreganti. Per ovviare alla seconda difficoltà è necessario che i processi di segregazione abbiano luogo all'interno dei conidi del diploide eterozigote, dopo che questi sono stati piastrati.

Per realizzare le due condizioni si è pensato di sottoporre i conidi del diploide eterozigote in esame a trattamenti capaci di provocare una alta frequenza di rimaneggiamenti cromosomici.

IKEDA, ISHITANI e NAKAMURA ⁽²⁾ hanno ottenuto un forte incremento della segregazione somatica in diploidi di *Aspergillus sojae* dopo trattamento di conidi con raggi ultravioletti, ma non hanno osservato un eguale effetto in diploidi di *Asp. oryzae*. Le due specie presentano conidi polinucleati. L'effetto degli agenti mutageni sulle mutazioni cromosomiche è largamente noto. [Vedi, per una vasta recensione, MULLER ^(3, 4)].

I presenti autori [MORPURGO e SERMONTI ⁽⁵⁾] in una nota preliminare presentata alla IV Riunione dell'Associazione Genetica Italiana (Milano) hanno comunicato i primi risultati positivi ottenuti con alcuni mutageni su conidi di un diploide eterozigote di *Penicillium chrysogenum*. I risultati saranno presentati in dettaglio in questa nota ed integrati con ulteriori dati ottenuti successivamente sull'argomento. Questi ultimi dati riguardano l'effetto dell'azotoiprite su diploidi eterozigoti di *P. chrysogenum* e in particolare la comparsa di cloni instabili osservata dopo il trattamento con questo agente.

MATERIALI E METODI

CEPPI. — Nel corso della presente ricerca sono stati impiegati i due seguenti diploidi eterozigoti di *Penicillium chrysogenum*: VII 63 *cy p y/46 me w* [CAGLIOTI e SERMONTI ⁽⁶⁾; SERMONTI ⁽¹⁾] e XXXIV 173 *y py/176 w cy*. Il significato dei simboli impiegati è riportato in precedenti lavori [SERMONTI ⁽⁷⁾; CAGLIOTI e SERMONTI ⁽⁶⁾]. I due diploidi, ottenuti con il metodo di ROPER ⁽⁸⁾, sono prototrofi e presentano conidi giganti e verdi.

E' stato sottoposto ad azione mutagenica anche un segregante diploide con richiesta di piridossina ottenuto dal diploide eterozigote XXXIV. Il segregante (XXXIVS) è eterozigote per i geni *w/W*, *y/Y* e *cy/CY* del diploide XXXIV.

TRATTAMENTO CON AGENTI MUTAGENI. — Come agenti mutageni sono stati impiegati i raggi ultravioletti, metil-bis (β -cloro-etil) amina (HN-2) aldeide formica (HCHO); il trattamento con raggi ultravioletti è stato eseguito su conidi piastrati su agar completo, con una lampada germicida per un tempo necessario a provocare la morte di circa il 95 per cento dei conidi.

Il trattamento con HN-2 è stato eseguito sospendendo i conidi in una soluzione della mostarda (0,15%) in acqua e NaHCO_3 (3,15%) e interrompendo poi l'azione del mutageno mediante diluizione della sospensione in una soluzione decontaminante (glicina, 4,6 g; NaHCO_3 , 0,7 g; acqua dist., 1 litro). La durata del trattamento (1-4 minuti) è stata regolata per ottenere una mortalità dei conidi del 99%, e talvolta anche superiore. Il trattamento con raggi X è stato fatto su conidi in sospensione acquose in provette di vetro, con un tubo a raggi X a 245 KV, 15 m. A, filtrazione 1 mm. Al. esposizione 50.000 r.

L'aldeide formica è stata inclusa nell'agar disciolto in concentra-

zioni di 0,016, 0,013 e 0,012%, che hanno prodotto mortalità di conidi rispettivamente del 97,5, 87,4 e 83,5%.

Terreni culturali. — Sono impiegati un terreno completo (CM) ed il terreno minimo di Czapek-Dox [SERMONTI (¹)]. Le culture sono state incubate a 24° C.

RISULTATI

1) ESALTAZIONE DELLA SEGREGAZIONE SOMATICA.

In assenza di trattamento con agenti mutageni, i cloni segreganti per il colore si manifestano dopo il piastramento dei conidi di diploidi eterozigoti come settori gialli o bianchi da colonie verdi, o come intere colonie gialle o bianche. In questo paragrafo saranno considerati solamente i segreganti con conidi gialli, poiché il colore delle colonie a conidi bianchi si distingue con difficoltà dal colore del micelio sterile di colonie senza conidi che frequentemente appaiono, particolarmente in seguito a trattamento con agenti mutageni.

Tutti gli agenti mutageni impiegati provocano un forte aumento nella frequenza dei segreganti gialli, rispetto alle frequenze osservate nei controlli (Tab. 1).

I raggi ultravioletti (Esp. 3 e 4) provocano un aumento significativo sia nel numero delle colonie gialle ($P < 0,01$) che in quello delle colonie con settori gialli ($P < 0,01$), da conidi del diploide XXXIV. Se si considera che l'azione letale degli ultravioletti sui conidi gialli è circa dieci volte superiore (alle dosi impiegate) di quella sui conidi verdi, l'incremento nel numero delle colonie gialle risulterà più forte di quanto appaia dal confronto dei dati riportati nella Tab. 1, (Esp. 1, 2, 3, 4). Anche i raggi X provocano un fortissimo aumento della segregazione somatica (Esp. 18, 19).

La semina di conidi del diploide XXXIV in terreni contenenti formalina (Esp. 5, 6, 7) ha dato luogo alla formazione di numerose colonie con piccoli settori gialli alla estrema periferia, la cui frequenza aumenta fortemente con l'aumento della concentrazione dell'aldeide. E' degna di nota l'assoluta assenza di colonie o settori bianchi in seguito all'aggiunta al terreno della formalina, anche nella dose inferiore (Esp. 5). L'azione della formalina merita uno studio più approfondito.

Il trattamento dei conidi diploidi con HN-2 (Esp. 8-17) produce un



Fig. 1 - Colonie provenienti da conidi del diploide eterozigote XXXIV S sopravvissuti a trattamento con HN-2. Si osserva un segregante bianco ed una colonia con un settore giallo ed uno bianco segreganti.



Fig. 2 - Colonie del clone instabile D.

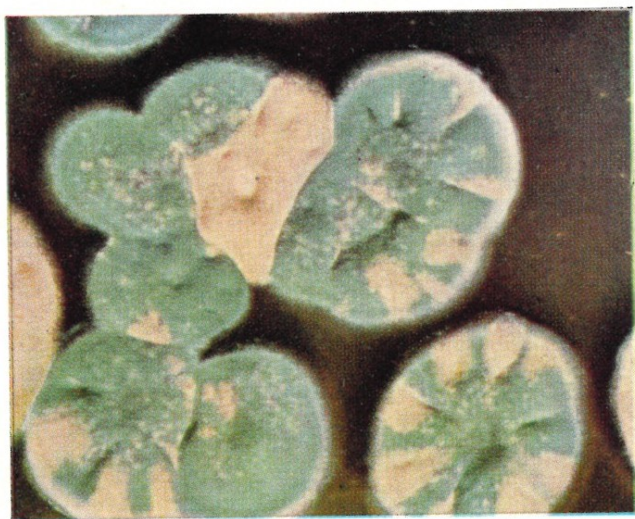


Fig. 3 - Colonie del clone instabile F.



Fig. 4 - Colonia del clone instabile B, mostrante un settore giallo ed uno bianco, emergenti da una zona centrale verde.



Fig. 5 - Colonie del clone instabile M, selezionato senza trattamento.



Fig. 6 - Colonie del clone instabile F sopravissute a trattamento con HN-2. Si osservano due colonie segreganti bianche.

TABELLA 1

Incremento della segregazione somatica del marcatore « conidi gialli » da tre diploidi eterozigoti, ad opera di agenti mutageni.

Esperimento	Diploide eterozigote trattato	Agenie mutageno	Conidi sopravv. (%)	Colonie osservate (n°)	Segreganti con conidi gialli			
					Intere colonie (n°)	Settori (n°)	Totali (n°)	Frequenza totale (%)
1	XXXIV	—	100	1380	18	9	27	2,0
2	XXXIV	—	100	723	10	7	17	2,3
3	XXXIV	u. v.	5,7	530	17	16	33	5,7
4	XXXIV	u. v.	0,8	220	11	5	16	7,3
5	XXXIV	H.CHO	16,5	1157	9	44 *	53	4,6
6	XXXIV	H.CHO	12,6	816	7	48 *	55	6,8
7	XXXIV	H.CHO	2,5	146	0	47 *	47	32,0
8	XXXIV	HN-2	1,1	635	42	50	92	14,5
9	VII	HN-2	0,5	208	16	18	34	16,2
10	VII	—	100	513	0	1	1	0,2
11	XXXIV S	HN-2	2,0	403	9	15	24	6,0
12	XXXIV S	—	100	362	0	0	0	0,0
13	XXXIV S	—	100	154	0	0	0	0,0
14	XXXIV S	HN-2	2,0	1120	40	66	106	9,5
15	XXXIV S	HN-2	1,5	1147	51	43	94	8,2
16	XXXIV S	HN-2	0,4	272	19	20	39	14,3
17	XXXIV S	HN-2	0,2	145	19	16	35	24,1
18	XXXIV	—	100	107	0	—	—	0,0**
19	XXXIV S	raggi X	0,4	269	23	—	—	8,6**

* Minuscoli settori tardivi alla periferia delle colonie. H.CHO aggiunto all'agar.
 ** Frequenza delle sole intere colonie gialle.

forte aumento tanto della frequenza delle colonie gialle, quanto di quella delle colonie con settori gialli, rispetto alle corrispondenti frequenze osservate nei controlli (Fig. 1). L'effetto è stato riscontrato su tutti i tre diploidi eterozigoti esaminati.

L'analisi della segregazione somatica, dopo trattamento con HN-2, dal ceppo diploide eterozigote XXXIV: *w cy/y pg* è stata estesa a tutti i quattro marcatori presenti. Di 208 colonie osservate ed esaminate (Esperienza 9) 141 non differivano fenotipicamente dal diploide di origine, 16 erano gialle, 28 bianche, 2 erano verdi e presentavano la richiesta di piridossina. Le rimanenti 23 presentavano settori gialli (14), bianchi (5) o bianchi e gialli (4). Tutti i cloni segreganti sono stati isolati ed esaminati per il loro fenotipo. 6 diversi fenotipi sono stati individuati (ed un settimo è stato ottenuto in un'altra esperienza (Esp. 8) nelle stesse condizioni) tra i 10 teoricamente possibili (Tab. 2).

Tra 723 colonie derivate da conidi non trattati dello stesso diploide (Esp. 2) ed esaminate per il colore sono stati isolati 17 cloni segreganti (10 intere colonie) appartenenti a due soli fenotipi: 16 erano gialli prototrofi ed uno bianco con richiesta di cisteina.

TABELLA 2

Fenotipi dei cloni segreganti ottenuti dopo trattamento con Cloramin di conidi del diploide eterozigote XXXIV : *cy w / py y*.

Colore	Richiesta nutrizionale	Simbolo	Frequenza **	
			intere col.	settori
giallo	nessuna	y	11	16
giallo	piridossina	y py	5	2
giallo	cisteina	y cy	—	(1) *
bianco	nessuna	w	5	(1) *
bianco	cisteina	w cy	22	6
bianco	cisteina e piridossina	w cy .py	1	2
verde	piridossina	py	2	1

** Su un totale di 208 colonie esaminate (Esp. 9, Tab. 1).

* Ottenute in un altro esperimento (Esp. 8, Tab. 1).

E' da notare, per inciso, che l'efficacia del HN-2 nello stimolare la segregazione somatica dal diploide XXXIV è particolarmente elevata nei riguardi del marcatore « conidi bianchi » (*w*). Per evitare errori nella stima della frequenza di segreganti bianchi tutti i cloni classificati come tali sono stati esaminati microscopicamente e sono risultati coperti da numerosissimi conidi incolori.

2) ISOLAMENTO DI LINEE INSTABILI.

Nelle esperienze su riportate il numero delle colonie e dei settori segreganti per il colore veniva osservato più volte, in giorni successivi. Mentre la frequenza delle colonie segreganti risultava costante nelle successive osservazioni, la frequenza delle colonie con settori aumentava nel tempo. La comparsa ritardata dei settori attrasse la nostra attenzione. Fu avanzata l'ipotesi che, almeno in alcuni casi, l'effetto del mutageno sul fenomeno della segregazione potesse essere indiretto, cioè che il mutageno avesse prodotto sul nucleo trattato una condizione di instabilità, che si manifestasse nella segregazione somatica. In base ad una tale ipotesi ci si doveva aspettare che i conidi non segreganti, cioè i conidi verdi, delle colonie con settori segreganti gialli o bianchi, trasferiti su un nuovo terreno culturale, avrebbero dato luogo in una elevata proporzione a colonie con settori. Da un certo numero di colonie con settori sono stati prelevati conidi verdi e seminati su terreno completo. Su un totale di 28 semine effettuate da conidi di altrettante colonie con settori sopravissute a trattamento con Cloramin, 17 diedero luogo a popolazioni di colonie con una normale frequenza di segreganti per il colore; 3 diedero luogo a popolazioni nelle quali il numero di colonie con settori era significativamente elevato rispetto al normale; 8 diedero luogo ad un fenomeno mai osservato prima di allora: la maggioranza delle colonie, in qualche caso quasi la totalità, presentavano settori. Questi ceppi in cui la segregazione somatica si manifestava con altissima frequenza, sono stati conservati e contrassegnati con lettere maiuscole.

Trasferendo conidi dalla parte verde di colonie di questi ceppi su nuove piastre Petri, il fenomeno della comparsa di settori da quasi tutte le colonie si ripeteva indefinitamente. Ciò significa che in seguito a trattamento con HN-2 si erano stabilite un certo numero di *linee instabili*, nelle quali l'instabilità si manifesta colla comparsa di settori segreganti, ogni volta che conidi dalle varie linee erano seminati su terreno completo.

Una linea instabile (M) è stata isolata, senza previo trattamento con mutageni, da una colonia che presentava un settore giallo, dal diploide eterozigote XXXIV (Fig. 5). Altre 9 colonie con settori ottenute

senza trattamenti dallo stesso diploide e esaminate per l'instabilità, risultarono stabili.

Dei nove cloni instabili studiati, sei procedevano colonie con soli settori gialli (Fig. 2, 3), uno (L) con soli settori bianchi e due con settori bianchi e gialli (B e G) (Fig. 4). Le dimensioni e le caratteristiche morfologiche delle colonie con settori erano peculiari in ogni linea instabile. I settori variavano nella grandezza, da minuscoli e periferici a vasti e precoci, nella forma da precisi settori circolari ben delimitati, a piccole macchie, a vaste zone bruscamente iniziandosi lungo un fronte di crescita e bruscamente interrotte su un fronte più avanzato per ridar luogo a zone di colore verde (C, D).

I settori segreganti da numerose colonie di ogni clone sono stati isolati, purificati e saggiati per le deficienze nutrizionali. E' risultato che anche sotto questo rispetto ogni clone ha il suo peculiare modello di segregazione, e che, all'interno dei vari cloni, tutti i settori di eguale colore presentano le stesse esigenze nutrizionali (v. Tab. 3).

Sono state condotte alcune esperienze per stabilire se i cloni instabili contenessero, allo stato eterozigote, quei marcatori che non partecipavano alla alta frequenza di segregazione caratteristica delle diverse linee. Di questi marcatori è stata stimolata la segregazione con HN-2 o con raggi ultravioletti, e quasi in ogni caso è stato possibile osservare la loro presenza. In particolare, dal clone F (alta segregazione di gialli (*y*) prototrofi) sono riapparsi i marcatori *w* (conidi bianchi) (Fig. 6) *py* (richiesta di piridossina) e *cy* (richiesta di cisteina).

Un fenomeno degno di menzione è infine la comparsa di colonie senza settori dopo la semina di conidi di cloni instabili. Riprese e successivamente trasferite, tali colonie hanno in taluni casi mostrato di aver perduta parzialmente o totalmente la instabilità caratteristica del clone di provenienza, pur conservando allo stato eterozigote i marcatori interessati in detta instabilità. In seguito a ripetuti trasferimenti in condizioni non controllate un ceppo instabile può perdere la sua instabilità caratteristica, probabilmente per selezione di subcloni revertiti. Ciò è accaduto per il clone L. Per recuperare il clone è stata isolata una colonia che ha iniziato la linea instabile N. I settori bianchi della colonia di questa nuova linea, anziché presentarsi prototrofi come quelli della linea originale L, mostravano regolarmente la richiesta di cisteina (Tabella 3) (MORPURGO e SERMONTI 1959; Tav. 1, Fig. 1).

Maggiori dettagli ed una particolareggiata discussione del fenomeno della instancabilità genetica indotta in diploidi di *P. chrysogenum* saranno oggetto di una prossima pubblicazione [MORPURGO e SERMONTI ⁽⁹⁾].

TABELLA 3

Linee instabili ottenute in seguito a trattamento con Cloramin di conidi del diploide XXXIV : cy w / py y.

Clone instabile (simbolo)	Settori prodotti (colore)	Caratteristiche morfologiche delle colonie con settori	Richieste nutrizionali dei settori	
			gialli	bianchi
A	gialli	settori periferici g.	nessuna	—
B	gialli e bianchi	vasti settori g. e b.	piridossina (parz.)	cisteina
C	gialli	vasti settori g. e grigio-verdi	nessuna	—
D	gialli	vasti settori g.	nessuna	—
F	gialli	vasti settori g.	nessuna	—
G	gialli e bianchi	vasti settori g. e b.	piridossina (parz.)	cisteina
H	gialli	piccoli settori g.	cisteina	—
L	bianchi	vasti settori b.	—	nessuna
M+	gialli	minuscoli settori g. in vaste zone grigio-verdi	nessuna	—
N*	bianchi	settori di media grandezza	—	cisteina

+ Clone instabile spontaneo.

* Sub-clone dal clone L.

DISCUSSIONE

I raggi ultravioletti, l'HN-2, i raggi X e la formalina sono efficienti stimolanti della segregazione somatica in *P. chrysogenum*.

L'efficacia di quest'ultima sostanza non è quantitativamente comparabile con quella degli altri mutageni per le particolari condizioni del trattamento, che comporta la crescita del micelio in presenza dell'agente. L'effetto dei raggi ultravioletti, del HN-2 e dei raggi X è immediato su alcuni nuclei, ritardato su altri. Un indice del primo tipo di effetto è dato dalla frequenza delle colonie segreganti omogenee, un indice del secondo tipo di effetto è dato dalla frequenza delle colonie che presentano tardivi settori segreganti.

I segreganti che appaiono come settori sono di formazione certamente posteriore al piastramento dei conidi del diploide eterozigote, essi sono quindi certamente di origine indipendente. Il loro isolamento è però possibile solo quando la segregazione interessa marcatori visibili; il fenomeno della segregazione per settori non può quindi essere utilizzato per la selezione di segreganti nel processo di miglioramento della produzione della penicillina attraverso il ciclo parasessuale. A questo effetto i segreganti che appaiono come intere colonie presentano un maggiore interesse. Il loro incremento in seguito all'azione dei raggi ultravioletti, dei raggi X e del HN-2 è apprezzabile nella Tab. 1, che riguarda la segregazione del marcatore *y* (conidi gialli), ma risulta più evidente ancora dalla Tab. 2 che riguarda tutti i marcatori segreganti dal diploide XXXIV in seguito a trattamento con HN-2. Le intere colonie segreganti per il colore sono il 21,1% del totale delle sopravvissute, mentre nel controllo esse rappresentano solo il 1,4% del totale. Si deve quindi supporre, nell'esperimento considerato, che circa il 20% delle colonie osservate siano segreganti di origine posteriore al trattamento dei conidi del diploide eterozigote, e quindi di origine indipendente. Prima del trattamento erano disponibili appena l'1,4% di colonie segreganti, alcune di esse potendo presumibilmente aver una origine comune.

Le difficoltà segnalate nella premessa di questo lavoro sono quindi in larga misura superate, e l'impiego di mutageni per analisi genetica dei diploidi eterozigoti di *P. chrysogenum* e per l'utilizzazione industriale del processo parasessuale diverrà necessariamente una pratica di routine nelle future ricerche.

La comparsa di colonie con settori in seguito a trattamento con mutageni, studiata in dettaglio in esperienze in cui era stato impiegato HN-2, riveste d'altro lato un interesse teorico notevole. Una parte di tali

colonie presentano una peculiare instabilità genetica, cioè una forte tendenza ereditaria a produrre settori caratteristici. L'instabilità genetica dipende da una elevata frequenza del processo di segregazione somatica interessante particolari regioni cromosomiche e controllata geneticamente. Gli argomenti a sostegno di questa conclusione sono sviluppati per esteso in un'altra pubblicazione [MORPURGO e SERMONTI ⁽⁹⁾].

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) SERMONTI G. - Genetics, 42: 433 (1957).
 - (²) IKEDA Y., ISHITANI C., NAKAMURA K. - J. Gen. appl. Microbiol., 3: 1 (1957).
 - (³) MULLER H. J. - Radiation Biology - Mc. Graw Hill Book Co., 1: 351-475 (1954).
 - (⁴) MULLER H. J. - Radiation Biology. - Mc. Graw Hill Book Co., 1: 475-627 (1954).
 - (⁵) MORPURGO G. e SERMONTI G. - IV Riunione Assoc. Genet. Ital. (1957) Suppl. a « La Ricerca Scientifica » (in stampa).
 - (⁶) GAGLIOTI M. T. e SERMONTI G. - J. Gen. Microbiol., 14: 38 (1956).
 - (⁷) SERMONTI G. - Rend. Ist. sup. Sanità (English Edition) 17: 231 (1954).
 - (⁸) ROPER J. A. - Experientia 8: 14 (1952).
 - (⁹) MORPURGO G. e SERMONTI G. - Genetics (in stampa).
-