

42. G. MORPURGO e G. SERMONTI. — Genetica del *Penicillium chrysogenum*. — V. Reversione da parte del Cloruro Manganoso dell'azione letale e dei danni cromosomici prodotti dall'azotoiprite. (*)

Riassunto. — Nella presente ricerca si mettono in evidenza i seguenti punti:

1) Il $MnCl_2$ aggiunto al terreno culturale agarizzato esercita una forte azione riattivante su conidi di *Penicillium chrysogenum* trattati con azotoiprite (HN—2). Un'azione riattivante, seppure meno intensa, è anche esercitata dal $MgCl_2$, mentre $CaCl_2$ e $ZnCl_2$ sono inefficaci.

2) Il grado di riattivazione è estremamente più forte in ceppi diploidi che in ceppi aploidi.

3) I conidi trattati con HN—2 permangono riattivabili per un periodo di almeno due settimane in acqua dist. a + 5° e almeno 9 ore in brodo nutritivo agitato a + 27°.

4) Per il completamento della riattivazione è sufficiente il contatto dei conidi con $MnCl_2$ nelle prime 20 ore dalla semina.

5) Il $MnCl_2$ non riattiva conidi inattivati con U.V. o raggi X.

6) Il $MnCl_2$ riduce fortemente la percentuale dei riarrangiamenti cromosomici prodotti da trattamento con HN—2 o raggi X.

7) La presenza di $MnCl_2$ sul terreno culturale ristabilizza cloni diploidi geneticamente instabili [Sermonti & Morpurgo (¹)]; numerosi altri cationi bivalenti hanno mancato di esercitare un simile effetto.

Summary. — The following points are established in this paper:

1) Addition of $MnCl_2$ to the agar culture medium has a strongly reactivating effect on conidia of *Penicillium chrysogenum* treated with nitrogen mustard (HN—2). A similar but less intense reactivating effect is exerted by $MgCl_2$, while $CaCl_2$ and $ZnCl_2$ are without effect.

2) The reactivating effect is very much more strongly marked in diploid than in haploid strains.

3) Conidia treated with HN—2 remain capable of reactivation for at least two weeks in distilled water at 5°C and at least nine hours in stirred culture broth at 27°C.

(*) Questo lavoro è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 427 (1959).

4) For reactivation to take place it is sufficient for the conidia to stay in contact with MnCl_2 during the first 20 hours from seeding.

5) MnCl_2 does not reactivate conidia inactivated by ultraviolet or X-ray irradiation.

6) MnCl_2 sharply reduced the percentage of chromosomal rearrangements induced by HN—2 or X-ray treatment.

7) The presence of MnCl_2 in the culture medium restabilizes temporarily genetically unstable diploid clones [Sermonti and Morpurgo ⁽¹⁾]; a number of other bivalent cations failed to have the same effect.

Nella precedente ricerca [SERMONTI e MORPURGO ⁽¹⁾] sull'effetto di alcuni mutageni sulla segregazione somatica da diploidi eterozigoti di *Penicillium chrysogenum*, tra gli altri composti noti per avere azione mutagena sui microorganismi, è stato impiegato anche il Cloruro di Manganese (MnCl_2). Questo era risultato mutageno in *Escherichia coli* B. [DEMEREK e HANSON ⁽²⁾]. Esso non produsse alcun visibile effetto sulla segregazione somatica. In un esperimento il MnCl_2 è stato aggiunto all'agar culturale su cui furono piastrati conidi trattati con azotoiprite (HN—2). In tali condizioni la segregazione somatica indotta da HN—2 risultò fortemente depressa. In successivi esperimenti apparve chiaro che il MnCl_2 produceva anche un secondo effetto sui conidi pretrattati con HN—2. Esso ne riduceva fortemente la mortalità; produceva, cioè, una sensibile riattivazione [SERMONTI e MORPURGO ⁽³⁾]. Le ricerche descritte in questo lavoro riguardano una preliminare analisi di questi fenomeni.

RISULTATI

MATERIALI E METODI.

I terreni, i ceppi, i metodi sono gli stessi descritti nel precedente lavoro [SERMONTI e MORPURGO ⁽¹⁾].

AZIONE RIATTIVANTE DEL MnCl_2 .

Effetto di diverse concentrazioni di MnCl_2 sulla riattivazione. — Il Cloruro di Manganese ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) in sol. acquosa, è stato aggiunto al-

l'agar completo fuso, in diverse quantità, per ottenere concentrazioni nell'agar varianti da 10 a 50 mM. A concentrazioni superiori la crescita del *P. chrysogenum* è completamente inibita. Sulle piastre sono stati piastrati conidi inattivati da azotoiprite (sopravvivenza su CM intorno all'1%) o conidi non trattati. Le sospensioni, trattate e non trattate, sono state opportunamente diluite prima del piastramento. La crescita delle colonie è progressivamente inibita coll'aumentare della concentrazione del $MnCl_2$ nel terreno e il momento della loro comparsa è ritardato di un paio di giorni, a concentrazioni di $MnCl_2$ pari a 40 mM. Il numero delle colonie provenienti da conidi non trattati diminuisce alle concentrazioni più alte di $MnCl_2$, mentre il numero delle colonie provenienti da conidi trattati con HN—2 aumenta fortemente coll'aumentare delle concentrazioni del sale (Tab. 1). Alla massima concentrazione di $MnCl_2$, nell'e-

TAB. 1. - Riattivazione da $MnCl_2$ di conidi del ceppo XXXIV S inattivati da azotoiprite o non trattati. Diverse concentrazioni di $MnCl_2$.

Conc. $MnCl_2$ (mM)	Piastramento di conidi non trattati			Piastramento di conidi trattati con HN-2			
	Colonie per piastra (n°)	Fattore di diluizione (n°)	Conidi vitali (n°)	Colonie per piastra (n°)	Fattore di diluizione (n°)	Conidi vitali (**) (n°; ‰)	
0	51.3 ± 6.6	2.125	109.512	12,36 ± 1.02	100	1.236	1.13
10	54.3 ± 2.6	2.125	115.387	6.70 ± 0.61	1.000	6.700	5.81
20	42.0 ± 0.6	2.125	89.250	24.50 ± 1.47	1.000	24.500	27.45
40	48.0 ± 3.2	2.125	102.000	6.95 ± 0.83	5.555	38.607	37.85
50	32.2 ± 6.3	2.125	68.637	7.18 ± 1.17	5.555	39.885	58.11

(*) Una sospensione conidica è trattata con azotoiprite (una eguale non trattata) e quindi diluita secondo il fattore indicato; 0,1 ml della sospensione diluita è piastrata per scatola.

(**) Percento dei conidi vitali non trattati, alla corrispondente concentrazione di $MnCl_2$.

sperienza riportata, circa il 40% di conidi inattivati da HN—2 risultano riattivati dal $MnCl_2$.

Riattivazione di ceppi diploidi ed aploidi. — Quattro ceppi diploidi eterozigoti di *P. chrysogenum* ed altrettanti ceppi aploidi sono stati impiegati per sperimentare l'efficienza del $MnCl_2$ (40 mM) come riattivatore di conidi inattivati da HN—2, in dipendenza della ploidia. L'efficienza è estremamente maggiore sui conidi diploidi. La riattivazione dei conidi

aploidi è in qualche caso appena rilevabile, mentre la quantità dei conidi diploidi riattivati si avvicina in qualche caso al 50% dei conidi inattivati. Nella Fig. 1 è comparata la riattivazione di conidi di un ceppo

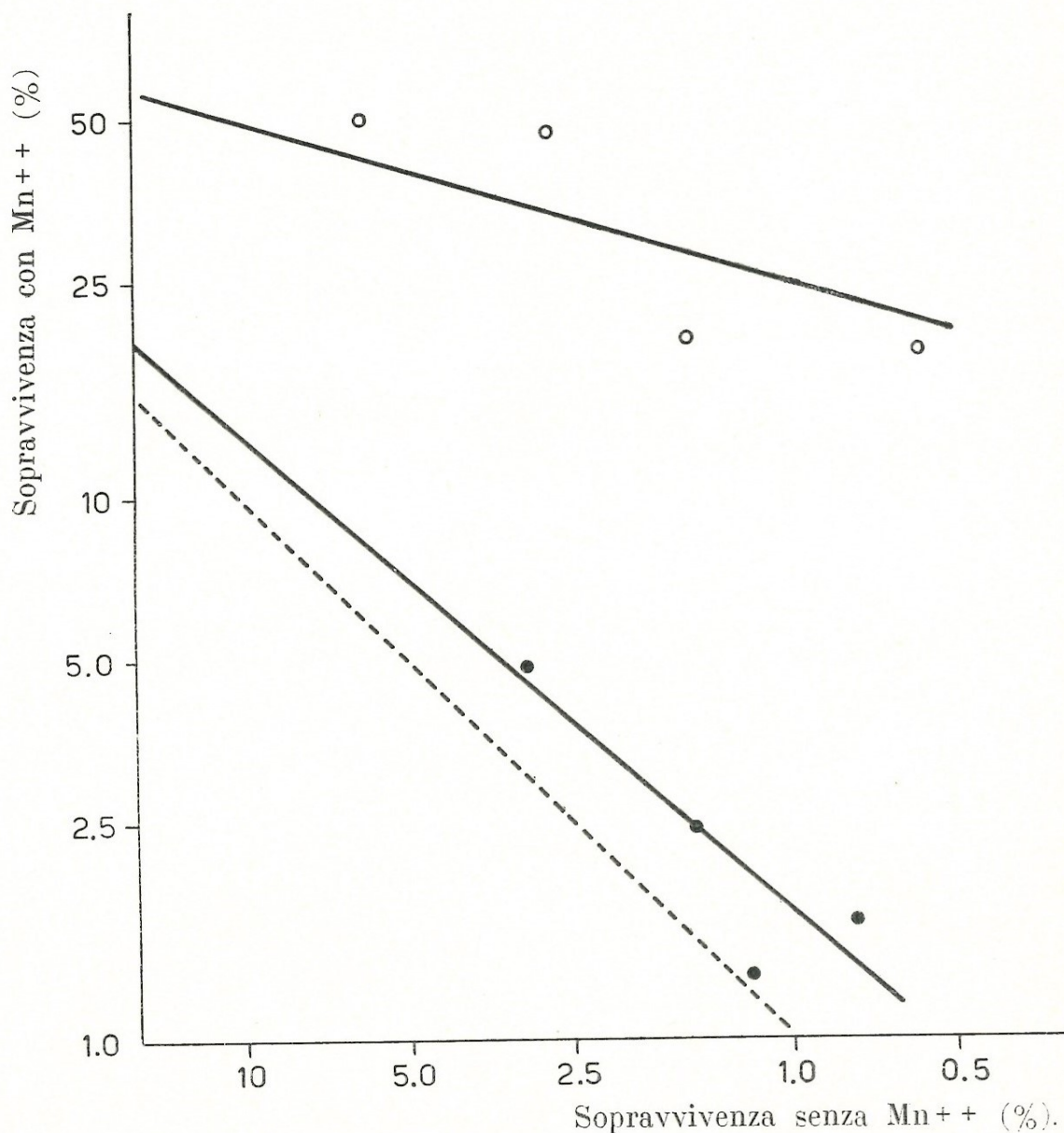


Fig. 1. - Riattivazione da $MnCl_2$ (40 mM) di un ceppo diploide (XXXIV S) e di un ceppo aploide (206 pr) di *P. chrysogenum*, dopo trattamento dei conidi con HN—2. Il numero (%) dei conidi che danno colonia in presenza di Mn^{++} (ordinata) è rapportato al numero (%) di conidi che hanno subito lo stesso trattamento con HN—2, e danno colonie in assenza di Mn^{++} (ascissa). I valori sono interpolati da segmenti che convergono al valore 100 dei due parametri. Il segmento tratteggiato indica assenza di riattivazione.

- Riattivazione in un ceppo aploide
- Riattivazione in un ceppo diploide

aploide (206 pr) con quelli di un ceppo diploide (XXXIV S), a diversi gradi di inattivazione, ottenuti variando il tempo di pretrattamento con HN—2.

Dai dati della Fig. 1 può anche osservarsi come il rapporto tra il numero di conidi che danno colonia in presenza di $MnCl_2$ ed il numero

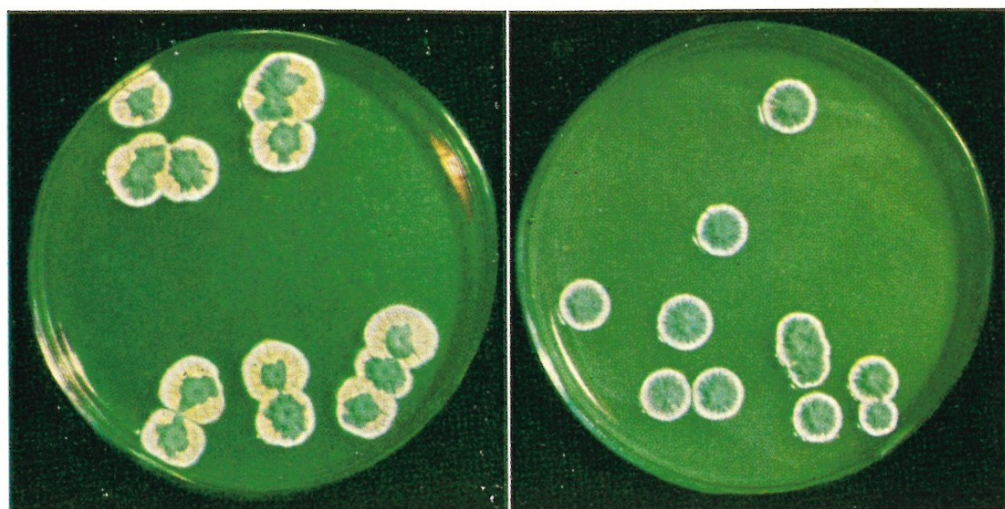
di conidi che danno colonia in assenza del sale aumenta coll'aumentare dell'inattivazione, mentre la differenza tra gli stessi (grado di riattivazione) diminuisce coll'aumentare della inattivazione.

Tempo di riattivazione. — Conidi conservati in frigorifero per due settimane dopo il trattamento con HN—2 presentano un grado di riattivazione da MnCl_2 pressochè inalterato. La incubazione di conidi inattivati da HN—2 in un terreno culturale liquido (corn steep liquor, 8%; destrina, 6%) per nove ore, non produce alcuna diminuzione nel grado di riattivazione che i conidi presentano allorchè piastrati su agar contenente MnCl_2 (40 mM). Questo significa che la riattivabilità dei conidi si conserva a lungo dopo il trattamento con HN—2, certamente al di là del momento in cui i conidi iniziano il loro metabolismo. [TONOLO e URBANI ⁽⁴⁾].

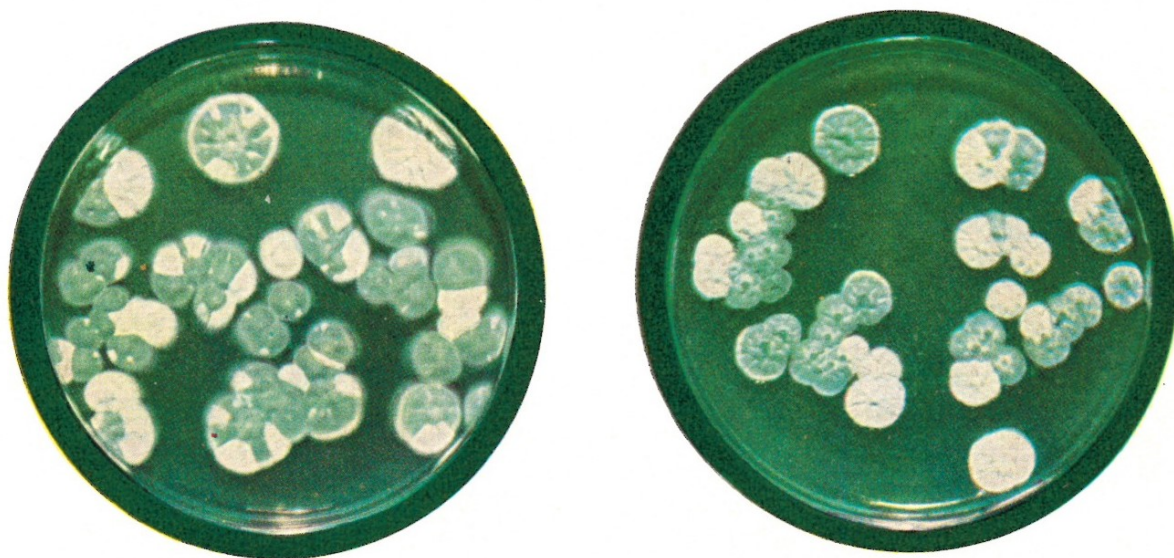
Per stabilire quanto a lungo i conidi devono rimanere a contatto con l' MnCl_2 , dopo il trattamento con HN—2, per essere riattivati, sono stati fatti alcuni esperimenti in condizioni che permettevano di mantenere i conidi a contatto col MnCl_2 per un tempo stabilito, per poi continuare a svilupparsi in assenza del sale. I conidi trattati sono stati piastrati su dischi di cellophan appoggiati sulla superficie di agar contenente il MnCl_2 (40 mM) e posti ad incubare. A intervalli successivi, da diverse scatole, erano prelevati i dischi di cellophan e appoggiati su agar sterile per un periodo di tempo (almeno mezz'ora) ritenuto sufficiente per eliminare le tracce di MnCl_2 adsorbito dal cellophan. I dischi erano quindi trasferiti su altro agar nutritivo sterile e posti ancora ad incubare. Con tale espediente si è potuto stabilire e confermare in tre successivi esperimenti che venti ore di contatto con MnCl_2 sono sufficienti per la completa riattivazione dei conidi trattati riattivabili. Un ulteriore soggiorno di questi in presenza di MnCl_2 non aumenta il grado di riattivazione. Le colonie che sono rimaste a contatto, nelle prime 20-30 ore della loro crescita, con MnCl_2 non presentano alcune differenze nella morfologia, nè nel tempo di comparsa sulle piastre, rispetto a quelle che non sono mai state a contatto col MnCl_2 ; esse sono, a parità di conidi trattati piastrati, molto più numerose.

Azione del MnCl_2 su conidi irradiati. — Come risulta dalla Fig. 2, il MnCl_2 è assolutamente inefficiente nella riattivazione di conidi inattivati con raggi ultravioletti o con raggi X. Sembrerebbe anzi, che in queste condizioni, esso accresca l'effetto letale dei due agenti mutageni.

Azione di altri cationi bivalenti su conidi inattivati da HN—2. — Alcuni altri cationi bivalenti, come sali di Cloro, sono stati aggiunti al



Fot. 1 - Colonie del ceppo instabile D che crescono su terreno completo, a destra supplementato con MnCl_2 (40 mM) e a sinistra non supplementato. Il MnCl_2 inibisce la formazione di settori segreganti gialli.



Fot. 2 - Colonie del ceppo instabile L che crescono su terreno completo, a destra supplementato con MnCl_2 (40 mM) e a sinistra non supplementato. Il MnCl_2 inibisce la formazione di settori segreganti bianchi. Le dimensioni relative delle colonie bianche provenienti da conidi segreganti non sono « alterate » in presenza di MnCl_2 .

terreno culturale, per studiare il loro effetto sulla sopravvivenza di conidi (diploide XXXIV S) inattivati da HN—2. CaCl_2 e MgCl_2 sono stati impiegati a concentrazioni 50, 100 e 200 mM, ZnCl_2 , che è fortemente tossico, a concentrazioni 3, 6 e 10 mM. Come risulta dalla terza colonna

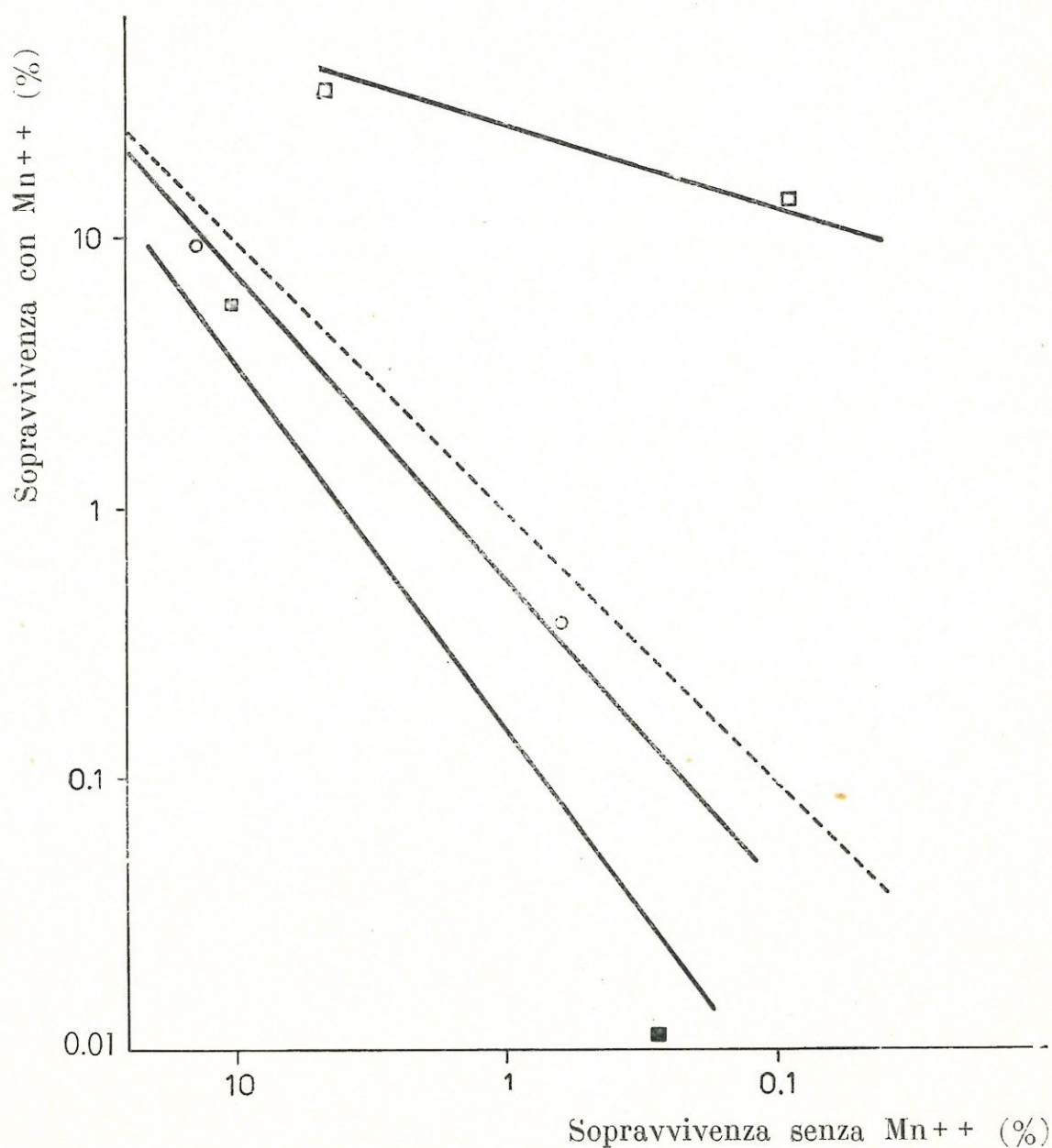


Fig. 2. - Azione del MnCl_2 (40 mM) su conidi di *P. chrysogenum* (XXXIV S), inattivati da HN—2, raggi X e raggi ultravioletti. I valori sono disposti e interpolati come nella fig. 1

- inattivazione con HN—2
- inattivazione con U. V.
- inattivazione con raggi X

della tab. 2, il Mg^{++} esercita una notevole azione riattivante, meno pronunciata però di quella del Mn^{++} . Gli altri cationi esercitano una leggera azione riattivante alle concentrazioni più alte.

Azione del MnCl_2 sulla segregazione somatica indotta da HN—2. — L'HN—2 aumenta la frequenza dei riarrangiamenti cromosomici in diploidi eterozigoti di *P. chrysogenum* [SERMONTI e MORPURGO (¹)]. Indice

della frequenza di tali riarrangiamenti è considerata la frequenza delle colonie segreganti gialle che compaiono da conidi trattati del diploide eterozigote XXXIV S (*y py/w cy py*). Conidi del diploide XXXIV S, trattati con HN—2, sono stati piastrati su agar contenente $MnCl_2$, ed è osservato il numero di colonie gialle che appaiono in tali condizioni, in confronto con il numero di colonie gialle che appaiono dagli stessi conidi su un terreno non supplementato. Nella Tab. 2 è riportato un tale esperimento e viene presa in esame anche la possibile azione in tal senso di altri cationi bivalenti. I dati dimostrano chiaramente che il Mn^{++} alle dosi più alte produce una drastica riduzione nel numero delle colonie gialle segreganti. Tale azione è specifica per il Mn^{++} dato che nessun altro dei cationi saggiati e cioè Mg^{++} , Ca^{++} , Zn^{++} ha prodotto spostamenti significativi nella frequenza delle colonie gialle segreganti. E' particolarmente interessante notare che anche il Mg^{++} non modifica la segregazione indotta, nonostante presenti una attività riattivante della vitalità abbastanza forte. (Tab. 2).

TAB. 2. - Effetto di $MnCl_2$ e di altri sali di cationi bivalenti sulla mortalità e sulla segregazione somatica indotta da HN—2 del diploide XXXIV S: *y py/w cy py*.

Catione aggiunto	Conc. (mM)	Sopravvivenza (%)	Totale colonie osservate (n°)	Colonie gialle (*)	
				(°)	(%)
—	—	3.03	1019	65	6.38
Mg^{**}	50	13.0	1216	63	5.18
	100	17.0	1585	96	6.06
	200	14.1	1315	79	6.01
Ca^{**}	50	3.07	516	35	6.78
	100	3.30	925	73	7.89
	100	5.60	—	—	—
Zn^{**}	3	2.41	674	51	7.57
	6	2.16	606	34	5.61
	10	3.74	—	—	—
Mn^{**}	10	9.18	257	15	5.84
	30	34.1	944	19	1.99
	50	20.5	575	11	1.91

(*) La frequenza delle colonie che esibiscono il marcatore « y » è presa come indice delle aberrazioni cromosomiche indotte dall'HN—2.

Sono stati condotti degli esperimenti di ricostruzione per vedere se si potesse attribuire questa azione del Mn^{++} ad una azione selettiva diretta contro il fenotipo giallo. L'esame statistico dei dati ha dimostrato

che il Mn^{++} esercita una certa azione differenziale diretta contro il fenotipo giallo, ma che questa azione selettiva non può spiegare che piccola parte della diminuzione osservata. La probabilità che la diminuzione della frequenza delle colonie gialle da conidi trattati con HN—2 sia dovuta esclusivamente all'azione selettiva del $MnCl_2$ contro di esse è inferiore al 0,001. Il Mn^{++} produce analoga azione sulla segregazione somatica indotta dopo trattamento con raggi X, nonostante che in tal caso non eserciti una parallela azione riattivante.

Azione del $MnCl_2$ sui cloni instabili. — Il $MnCl_2$ aggiunto al terreno di cultura nella molarità del 40 mM esercita una potente azione stabilizzante sui cloni diploidi eterozigoti che presentano un'alta frequenza della segregazione somatica spontanea di alcuni marcatori (cloni instabili). [SERMONTI e MORPURGO ⁽¹⁾]. Esperimenti condotti nei cloni instabili B, D, F ed L [SERMONTI e MORPURGO ⁽¹⁾], hanno mostrato che il $MnCl_2$ inibisce la produzione di settori segreganti. Le Fot. 1 e 2 mostrano chiaramente tale fenomeno nei ceppi instabili D ed L.

L'azione stabilizzante del $MnCl_2$ è legata alla presenza del sale; i conidi di ceppi instabili prelevati da colonie cresciute su agar CM contenente il sale, riseminati su terreno privo di $MnCl_2$, danno nuovamente origine a colonie con il caratteristico quadro di segregazione. Questa azione è specifica per il $MnCl_2$: sono stati aggiunti al terreno di cultura sali di Ca^{++} , Mg^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} , Co^{+} , Fe^{++} , Zn^{++} , senza osservare alcuna diminuzione della situazione dei cloni instabili: Ca^{++} e Mg^{++} sono stati usati in concentrazione 40 mM mentre gli altri sali data la superiore tossicità, sono stati aggiunti in concentrazioni inferiori e tali da inibire fortemente la crescita. I sali saggiati sono i seguenti: $(CH_3COO)_2 Cu$, $ZnCl_2$, $FeSO_4$, $NiSO_4$, $CoSO_4$, $CaSO_4$, $MgSO_4$.

Anche in questo caso è assai improbabile che l'azione del $MnCl_2$ si eserciti attraverso effetti selettivi. Le dimensioni relative delle colonie verdi e di quelle gialle o bianche segreganti non vengono modificate dall'aggiunta del sale. Inoltre semine di conidi verdi, gialli e bianchi tratti dai ceppi instabili D, F, L, hanno mostrato che la mortalità ad opera del $MnCl_2$ è leggermente ma significativamente più forte fra i conidi verdi che fra quelli segreganti.

DISCUSSIONE

I dati qui presentati non permettono alcuna sicura interpretazione dell'azione del $MnCl_2$ quale riparatore dei danni prodotti dall'azotoiprite (HN—2). L'informazione di più critica importanza ci deriva dalla rispo-

sta differenziale all'azione del MnCl_2 dei conidi aploidi e diploidi. Poichè nei primi la riattivazione è molto meno notevole, si può pensare che al danno reversibile prodotto dall'HN—2 si sovrapponga precocemente, in essi, un altro effetto letale irreversibile. Le cellule aploidi sono più esposte di quelle diploidi all'effetto letale dei danni cromosomici, si può quindi avanzare l'ipotesi che il danno prodotto dall'HN—2, e riparato dal Mn^{++} , abbia sede al di fuori del nucleo, e che ad esso si sovrapponga, nei ceppi aploidi, un danno irreversibile con sede nel nucleo.

Si può però proporre anche una spiegazione che prescinda da danni extracromosomici. Un danno nucleare letale implica, in un nucleo diploide, la delezione di due segmenti cromosomici omologhi, mentre la riparazione della condizione letale può ottenersi — teoricamente — attraverso la restituzione di una sola delle due rotture. In un nucleo aploide una delezione è sufficiente a produrre una condizione letale, ed essa deve essere restituita per la riattivazione del nucleo. Quindi la probabilità di riparazione è doppia nel nucleo diploide. Per di più, ragionando su una pura base matematica, a parità di mortalità il numero di nuclei con più di una delezione letale sarebbe più alto in cellule aploidi che in cellule diploidi (delezioni omologhe); poichè tutte le delezioni letali devono essere riparate per la riattivazione della cellula, le cellule aploidi avrebbero una minore probabilità di essere riattivate.

Un esame accurato della dose di HN—2 necessaria per indurre lo stesso grado di inattivazione in conidi aploidi e diploidi può essere indicativo su quale delle due interpretazioni sia preferibile.

Il fatto che il MnCl_2 produca una riduzione delle aberrazioni cromosomiche indotte da HN—2 è accertato dalle esperienze compiute sull'effetto del MnCl_2 sulla segregazione somatica indotta. Una tale osservazione non è però decisiva, poichè l'azione dell'HN—2 sui cromosomi potrebbe essere un effetto secondario del danno prodotto dall'HN—2 ad un sistema cellulare extracromosomico [Van BEKKUM ⁽⁵⁾; WOLFF e LUIPPOLD ⁽⁶⁾].

Degna di nota è l'azione differenziale del Mn^{++} su conidi inattivati da diversi mutageni. Essa indica un meccanismo d'azione differente di questi. Particolarmente notevole è il confronto tra HN—2 e raggi X. L'HN—2 è il più radiomimetico tra i mutageni chimici conosciuti, e la differente risposta al Mn^{++} dei conidi inattivati da HN—2 e da raggi X ci sembra tra i più evidenti punti di divergenza sinora trovati tra l'azione dei due mutageni.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) SERMONTI G. e MORPURGO G. - Rend. Ist. sup. Sanità, 24: 483 (1961).
 - (²) DEMEREC M. e HANSON J. - Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 16: 215-228 (1951).
 - (³) SERMONTI G. e MORPURGO G. - Rend. Acc. naz. Lincei, 14: 96-99 (1958).
 - (⁴) TONOLO A. e URBANI E. - Bull. World. Hlth. Org., 6: 277-285 (1952).
 - (⁵) BEKKUM Van D. W. - CIBA Found. Symposium Ionizing Radiations and Cell Metabolism », Churchill Ltd-London, 77-91 (1956).
 - (⁶) WOLF S. e LUIPPOLD K. C. - « The biochemical aspect of chromosome rejoining ». Progress in Radiobiology Mitchell, Holmes and Smith, Edinburgh (1956).
-