

43. G. SERMONTI e Isabella SPADA-SERMONTI. — Analisi genetica preliminare in *Streptomyces coelicolor*. (*)

Riassunto. — La ricombinazione genetica è stata ancora confermata in *Streptomyces coelicolor*. Alcune delle colonie ricombinanti ottenute seminando conidi derivati da una cultura mista sono risultate eterogenee. Tre, ed in un caso quattro, dei cinque marcatori dei ceppi genitori sono stati trovati, in diverse combinazioni, in singole colonie ricombinanti. E' stata supposta l'eterozigosi di una parte delle spore che danno origine ai cloni ricombinanti. Poiché alcune colonie ricombinanti senza pigmento blu (*Pigm*) hanno prodotto come segreganti colonie con pigmento (+ *pigm*), si è concluso che l'allele *Pigm* è dominante sulla presenza di pigmento (+ *pigm*).

Summary. — Genetic recombination has been repeatedly confirmed in *Streptomyces coelicolor*. Contrary to expectations, some of the colonies obtained by plating conidia derived from a mixed culture are heterogeneous. Three, and in one case four, out of five markers of the parent strains have been found in various combinations in single recombinant colonies. Heterozygosis of a proportion of the spores initiating recombinant clones was postulated. It has been concluded that absence of the blue pigment (*Pigm*) is dominant to the presence of the pigment (+ *pigm*), because some recombinants without blue pigment (*Pigm*) produce + *pigm* colonies as segregants.

Dopo la pubblicazione del nostro primo lavoro sulla ricombinazione genetica in *Streptomyces coelicolor* (SERMONTI e SPADA-SERMONTI, ^(1, 2)) alcuni altri lavori sono comparsi sull'argomento, HOPWOOD ⁽³⁾ lavorando con ceppi di *S. coelicolor* differenti dai nostri, ha ottenuto numerosi ricombinanti stabili dalla cultura mista di due genitori marcati geneticamente e ha tentato la costruzione di una mappa di *linkage* ammettendo che la ricombinazione derivasse dalla fusione di due nuclei nel micelio seguita da riduzione precedente la formazione delle spore.

Egli ha osservato che le frequenze dei fenotipi ricombinanti complementari, quando rilevabili, risultavano simili. I dati in dettaglio non sono stati pubblicati. BRAENDLE e SZYBALSKI ⁽⁴⁾, impiegando i ceppi

(*) Questo lavoro è apparso nei Selected Scientific Papers from the Istituto Superiore di Sanità, 2: 437 (1959).

di *S. coelicolor* usati nel nostro lavoro, hanno ottenuto fenotipi ricombinanti stabili, e considerano la loro presenza come indicativa di « synkaryosis ». In una tabella su cui sono riportati fenotipi ricombinanti tra mutanti multipli di *S. coelicolor* sono descritte colonie « containing a mixture of two types of conidia ». Quest'osservazione suggerisce l'eterozigosi parziale e totale di alcuni dei nuclei ricombinanti. BRADLEY (⁵), lavorando con un ceppo di *S. coelicolor* diverso dai nostri ha ottenuto ricombinanti prototrofi con conidiospore e produttori pigmento blu dalla combinazione di due ceppi auxotrofi, privi di micelio aereo e senza pigmento blu. Questi ricombinanti si perpetuavano attraverso le spore, ma, in seguito a successivi trasferimenti producevano raramente ma regolarmente dissociazioni parentali. Egli invoca un peculiare tipo di eterocariosi, nel quale i due nuclei componenti sarebbero strettamente associati, ma considera altresì i suoi dati compatibili con un processo di parasessualità. Le sue conclusioni differiscono da quelle avanzate da HOPWOOD (³) in quanto questi suppone che la segregazione preceda la formazione delle spore che risulterebbero pertanto aploidi. I due autori hanno però lavorato su ceppi differenti.

RISULTATI

Le tecniche, i terreni, i metodi sono gli stessi menzionati nei precedenti lavori (SERMONTI e SPADA-SERMONTI, (¹, ²), tranne dove è detto altrimenti.

Un nuovo terreno minimo (MM) è stato introdotto, che è una modifica dell'agar glucosio-asparagina di WAKSMAN (⁶): glucosio, g 10; asparagina, g 0,5; KH_2PO_4 , g 0,5; Agar Difco, g 20; FeSO_4 , g 0,01; acqua distillata, 1 litro; pH, 7,8. Sono stati impiegati i ceppi già riferiti nei lavori citati ed alcuni mutanti ottenuti da questi dopo trattamento con raggi ultravioletti (Tab. 1).

TABELLA 1

Ceppo irradiato (simbolo)	Colonie isolate (n.)	Mutanti tra gli isolati	
		(n.)	(simbolo)
5 <i>me hist</i>	280	2	19 <i>thr me hist</i> 20 <i>ad me hist</i>
6 <i>glu pigm</i>	160	1	21 <i>me glu pigm</i>
6 <i>glu pigm</i>	60	1	22 <i>me glu pigm</i>
16 <i>me hist</i>	160	1	23 <i>sr me hist</i>
6 <i>glu pigm</i>	500	1	27 <i>me glu pigm</i>
23 <i>sr me hi</i>	2.000	1	30 <i>sr me hi pigm₂</i>

SELEZIONE DI RICOMBINANTI DA VARIE COMBINAZIONI DI CEPPI.

Sono stati ottenuti ricombinanti, con la procedura già descritta, tra diverse altre combinazioni di ceppi mutanti, su terreni variamente supplementati. Alcuni risultati sono riferiti sulla Tab. 2. In alcune esperienze i ricombinanti, cresciuti su terreno minimo supplementato, sono stati classificati per le richieste nutrizionali, il colore e la resistenza alla streptomicina. Il dettaglio di una di tali esperienze (Tab. 2.

TABELLA 2

Ricombinazione tra diversi ceppi di *Streptomyces coelicolor*.

Incrocio (esp. n.)	Terreno della cultura mista (*)	Età (g)	Ceppi parentali	Supplementi al terreno di semina	Ricombinan- ti per 10 ⁶ conidi piastrati
1)	C + MM (**)	8	8 <i>nic pigm</i> + 5 <i>me hist</i>	nessuno	287
2)	C	13	22 <i>cy glu pigm</i> + 23 <i>sr me hist</i>	nessuno	17.5
3)	L + ME, GLU	6	14 <i>pr glu pigm</i> + 23 <i>sr me hist</i>	ME, GLU	38.7
4)	L + ME, PR	6	14 <i>pr glu pigm</i> + 23 <i>sr me hist</i>	ME, PR	1.3
5)	L + HI, PR	5	14 <i>pr glu pigm</i> + 23 <i>sr me hist</i>	HI, PR	35.5
6)	L + ME	10	6 <i>glu pigm</i> + 23 <i>sr me hist</i>	ME	1.0
7)	L + HI	11	6 <i>glu pigm</i> + 23 <i>sr me hist</i>	HI	4.8
8)	L	13	30 <i>sr me hi pigm</i> ² + 14 <i>pr glu pigm</i>	nessuno	26.3

(*) Le sostanze aggiunte sono indicate con gli stessi simboli che indicano le corrispondenti richieste nutrizionali dei ceppi mutanti, in lettere maiuscole.

(**) Mezzo limitante (C : MM = 1 : 4 = L.).

Esp. n. 6) è riportato nella Tab. 3. In questo caso sei tipi ricombinanti tra gli otto possibili, sono stati rilevati.

I ricombinanti tra ceppi 14 *pr glu pigm* × 23 *sr me hist* sono stati analizzati in numerose esperienze, per ricercare una regola nei tipi ricombinanti reperibili e nelle loro relative frequenze. Questo avrebbe potuto suggerire qualche rapporto di linkage. Il marcatore *sr* / + non è stato generalmente considerato. Le frequenze dei ricombinanti sono risultate estremamente variabili da esperienza ad esperienza. Le cause di tale variabilità non sono state determinate. Probabilmente la frequenza relativa delle spore dei ceppi parentali impiegate per la cul-

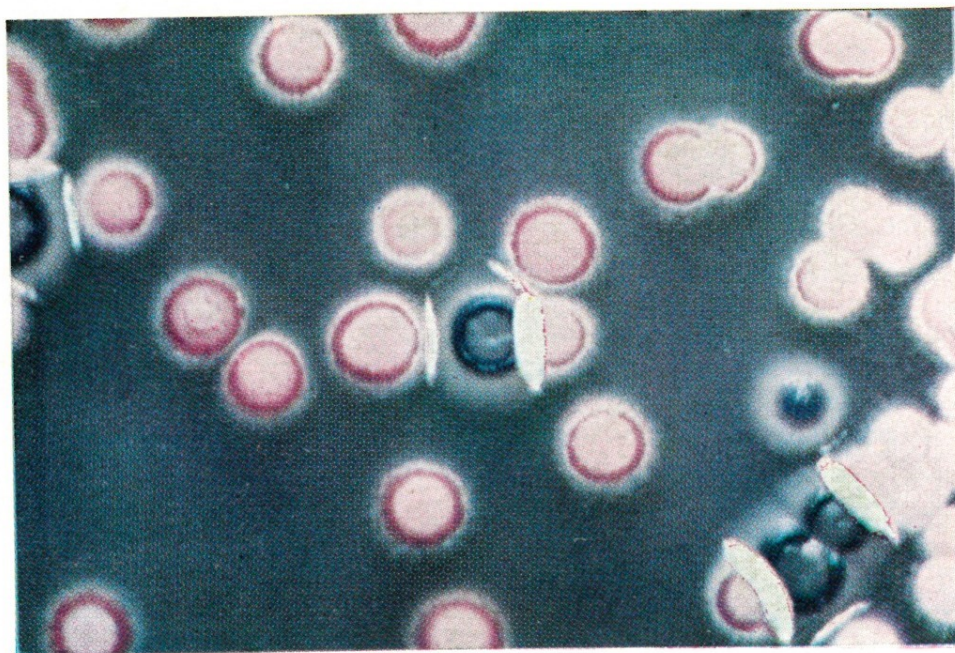


Fig. 1 - Ciuffetti sintrofici su agar CM tra colonie dei ceppi 3 *hist* (colonie blu) e 4 *un Pigm* (colonie rosse).

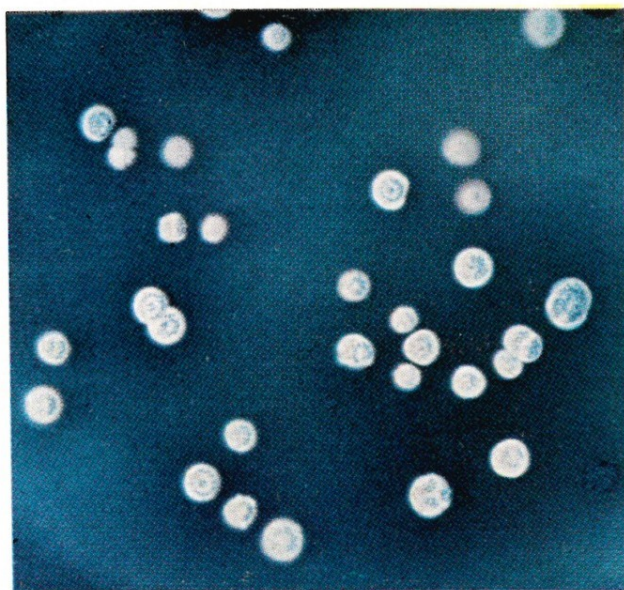


Fig. 2 - Semina di conidi da un ricombinante senza pigmento (*Pigm*) su CM. Notare colonie blu (+*Pigm*) e rosa (*Pigm*). Se i conidi da queste ultime vengono riseminati, si ottiene lo stesso quadro.

tura mista e l'età di questa giocano un notevole ruolo. I risultati suggeriscono comunque una estrema cautela nell'avanzare ipotesi sui rapporti di *linkage* tra i vari marcatori, sinché non sarà ottenuta una maggiore riproducibilità dei dati. Alcune considerazioni possono essere però fatte. L'osservazione della produzione di pigmento dei ricombinanti sul terreno di piastramento delle culture miste non è sempre agevole. Strisciando le spore di queste colonie sui terreni impiegati per il saggio delle deficienze nutrizionali il pigmento formato risulta evidente. La quasi totalità dei ricombinanti così saggiati sono risultati produttori del

TABELLA 3

Ricombinanti ottenuti dall'incrocio 23 *sr me hi* x 6 *glu pigm*

Tipi parentali	23) <i>sr me hi</i> + +	
	6) + + + <i>glu pigm</i>	
Ricombinanti selezionabili (**)	+ + + + +	0
su MM + ME	+ + + + <i>pigm</i>	4
	<i>sr</i> + + + +	88
	<i>sr</i> + + + <i>pigm</i>	1
	+ <i>me</i> + + +	1
	<i>sr me</i> + + +	1
	<i>sr me</i> + + <i>pigm</i>	0
		107

(**) I simboli dei caratteri mutanti indicano il fenotipo. + rappresenta gli alleli « wild ».

pigmento, seppure l'intensità di questo non è risultata costante da striscio a striscio. In taluni casi era evidente che lo striscio era composto da una mistura di colonie con pigmento e senza. Una simile osservazione di BRAENDLE e SZYLBASKI (1957) è stata riferita più avanti.

Una cultura mista è stata ottenuta tra due ceppi non produttori del pigmento blu (Tab. 2, Esp. 8). Uno di essi (14) presentava il retro delle colonie rosso (*pigm*) l'altro (30) presentava il retro delle colonie bianco (*pigm₂*). I due ceppi sono ben distinguibili per il loro colore sia su terreno completo che su terreno minimo supplementato. Su un totale di 705 colonie ricombinanti osservate su terreno minimo 342 ave-

vano il retro rosso, 363 il retro bianco e nessuna produceva pigmento blu. Nondimeno piccole macchie blu risultavano sul terreno della cultura mista, suggerendo il non allelismo dei due marcatori $pigm_1$ e $pigm_2$.

TENTATIVI DI SELEZIONE DI TERRENI E DI CEPPI PER UNA PIÙ ALTA FREQUENZA DI RICOMBINAZIONE.

Ottenere una più alta frequenza del processo di ricombinazione è stato ritenuto molto importante, per evitare di dover utilizzare metodi troppo severamente selettivi nell'isolamento dei ricombinanti, per escludere in maniera definitiva possibili interferenze di retromutazioni e, come ultima meta, per poter trasferire la ricerca al livello cellulare.

Terreni per la cultura mista. — Ovviamente un terreno per le culture miste sul quale la frequenza dei ricombinanti tra le spore formate fosse notevolmente aumentata, doveva non essere un terreno selettivo per i ricombinanti, ma, al contrario, essere il meno selettivo possibile e d'altro lato favorire il processo di ricombinazione. Il terreno CM [SERMONTI e SPADA-SERMONTI ⁽²⁾], che è stato considerato come non selettivo, dava raramente più di un ricombinante su 10^6 conidi (incrocio 14×23). L'aggiunta di autolisato di lievito, che era stata trovata utile per stimolare la formazione di ciuffetti sincariotici (SERMONTI e SPADA-SERMONTI ⁽²⁾, Fig. 1) produceva un aumento della frequenza dei ricombinanti di circa 10 volte. Il miglior terreno sperimentato sinora è il seguente (TCA): idrolisato di caseina, g 2; peptone, g 2; lievito autolisato, g 2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, g 0,5; glucosio, g 10; agar, g 20; acqua distillata, 1 litro; pH 6, 2-6, 4. Su questo terreno i ricombinanti sono presenti tra le spore delle culture miste (incrocio 14×23) con una frequenza di circa 10^{-4} . Questa più elevata frequenza permette un esame semiquantitativo della ricombinazione tra due ceppi, mediante uno « spot test » a due stadi. Un'ansata di spore di un ceppo è mescolata con un'ansata di spore di un altro ceppo in una piccola zona sulla superficie di una piastra di TCA. Dopo 4-5 giorni la macchia mista ha sporificato. Con un'ansa calibrata è prelevata una quantità di spore e strisciata, a macchia, in una zona di una scatola di MM. Approssimativamente una dozzina di colonie ricombinanti appaiono dopo alcuni giorni in corrispondenza della macchia.

Cepi. — 232 colonie del ceppo 14 sopravvissute a trattamento con U.V. sono state saggiate, mediante lo « spot test » descritto sopra, contro il ceppo 23. Nessuna di esse dette luogo ad una frequenza di ricombinanti riproducibilmente superiore. Lo stesso risultato negativo è stato

ottenuto saggiando 242 colonie trattate del ceppo 23 contro il ceppo 14. La variabilità osservata è simile a quella che si osserva trasferendo a macchia, su MM, spore di una cultura mista su piastra 14×23 , prelevate da differenti zone della stessa piastra.

ANALISI DELLA « PROGENIE » DI COLONIE RICOMBINANTI.

La caratterizzazione delle colonie ricombinanti è stata fatta sinora presumendo che le colonie stesse fossero pure. In effetti questo era risultato il caso per alcune colonie analizzate (SERMONTI e SPADA-SERMONTI ⁽²⁾). Questo non significava però che la purezza delle colonie ricombinanti dovesse essere la regola.

Successivamente, durante la caratterizzazione dei cloni, fu raggiunta l'impressione che alcuni ricombinanti fossero eterogenei. Per verificare questo sospetto, quindici colonie ricombinanti dall'incrocio 14×23 sono state analizzate riguardo alle deficienze nutrizionali. Spore da ognuno di questi ricombinanti sono state piastrate su CM e 16 colonie della progenie di ogni ricombinante sono state caratterizzate. Quattro dei quindici ricombinanti esaminati presentavano nella progenie due diversi fenotipi ricombinanti, ed uno (a-11) addirittura tre (Tab. 4).

Nelle condizioni sperimentali surriferite era da attendersi che in un clone ricombinante eterogeneo isolato su un terreno selettivo i sub-cloni con richieste nutrizionali non soddisfatte nel terreno stesso, fossero fortemente svantaggiati. Quindi non si poteva aspettare di incontrarne esaminando un piccolo numero di sub-cloni da poche colonie ricombinanti.

Il seguente esperimento è stato immaginato, per reperire da cloni ricombinanti eccezionali sub-cloni con richieste non soddisfatte sul terreno selettivo del piastramento. 192 colonie ricombinanti cresciute su MM + metionina + prolina da conidi di una cultura mista 14×23 sono state « spot tested » semiquantitativamente su tre terreni: MM + prolina + metionina, MM + histidina + ac. glutammico e MM. Il saggio semiquantitativo è stato fatto trasferendo conidi dalle singole colonie in esame in una goccia di acqua sterile e da questa, con un'ansa calibrata, eseguendo trasferimenti — spot sui tre terreni — test. La maggior parte delle colonie davano crescita eguale sui tre terreni. 13 colonie davano luogo a crescita uniforme su MM + metionina + prolina, crescita di distinte coloniette su MM + istidina + ac. glutammico, e a nessuna o scarsissima crescita su MM (Tab. 5). 4 di questi cloni sono stati ulteriormente esaminati. Spore dalle macchie cresciute su MM + metionina più prolina sono state piastrate su C e 45 colonie per ogni clone caratterizzate per le richieste e il pigmento prodotto. Lo stesso è stato fatto dalle

TABELLA 4

Analisi della « progenie » di alcune colonie ricombinanti. Cultura mista 14 *pr glu* (*pigm*) x 23 (*s_r*) *me hi*. (*)

Supplementi al terreno di semina (MM +) †	conidi dalla cultura mista per piastra (n°)	Colonie ricombinanti per piastra (n°)	Riferimento
ME, PR	0.47 × 10 ⁶	46.55	(a)
PR, HI	0.47 × 10 ⁶	16.11	(b)

Colonie ricombinanti da MM + ME + PR (a) (codice)	« Progenie » da conidi piastrati su CM		Colonie ricombinanti da MM + PR, HI (b) (codice)	« Progenie » da conidi piastrati su CM	
	colonie saggiate (n.)	caratterizzazione ** (n.) (fenotipi)		colonie saggiate (n.)	caratterizzazione (n.) (fenotipi)
1 a	15	15 <i>me hi</i>	7	16	$\left. \begin{array}{l} 6 \text{ } pr \\ 10 \text{ } + \end{array} \right\}$
1 b	16	16 <i>me</i>			
2	16	16 +	8	16	$\left\{ \begin{array}{l} 6 \text{ } pr \\ 8 \text{ } + \\ 2 \text{ } me \text{ } hi \end{array} \right.$
3	16	16 + +			
5	16	16 +	14	16	$\left\{ \begin{array}{l} 14 \text{ } pr \\ 2 \text{ } me \text{ } hi \end{array} \right.$
6	16	$\left\{ \begin{array}{l} 6 \text{ } pr \\ 1 \text{ } + \\ 3 \text{ } me \text{ } hi \end{array} \right.$	15	16	$\left\{ \begin{array}{l} 10 \text{ } pr \\ 1 \text{ } + \\ 5 \text{ } me \text{ } hi \end{array} \right.$
8	16	$\left\{ \begin{array}{l} 12 \text{ } + \\ 4 \text{ } me \text{ } hi \end{array} \right.$	17	16	16 <i>pr</i>
9	16	16 <i>me</i>			
10	16	16 <i>pr</i>			
11	16	$\left\{ \begin{array}{l} 9 \text{ } + \\ 2 \text{ } me \\ 5 \text{ } pr \end{array} \right.$			

* I marcatori tra parentesi non sono stati considerati in questo esperimento.

† Vedi la prima nota alla tab. 2.

**Vedi la prima nota alla tab. 3. + indica il tipo « wild ».

TABELLA 5 — Analisi della « progenie » di alcune colonie ricombinanti. Cultura mista * : 14 per *glu pigm* 23 (s^r) me *hi*.

Supplementi+ al terreno di semina (MM +)	Spore della cultura mista per piastra (n°)	Colonie ricomb. per piastra (n°)	Colonie saggiate (n°)	Crescita su MM con +			Riferimento
				PR, ME	niente	HI, GLU	
ME, PR	3 x 10 ⁶	119	179 43	+++ +++	+++ (+)	+++ +	(a)

Cloni ricombinanti (a)	Da terreno MM + ME, PR				« Progenie » da spore piastrate su CM			
	Colonie saggiate (n.)	Crescita su MM con +		Caratteriz. finale (fenotipo)	Colonie saggiate (n.)	Crescita su MM con +		Caratteriz. finale (fenotipo ***)
Codice		ME	PR			HI	GLU	
35	45	—	+++	<i>pr</i>	16 5 24	+++ — —	+++ +++ —	+ <i>glu pigm</i> ++ <i>pr glu</i> <i>pr glu</i> (non saggiate)
44	43 2	— +++	+++ +++	<i>pr</i> +	43 2	+++ —	+++ —	+ (non saggiate)
61	44	—	+++	<i>pr</i>	45	—	—	<i>hi glu</i> (non saggiate)
72	44	—	+++	<i>pr</i>	45	—	—	+ (i) <i>pr me hi glu</i> (non saggiate)

* Vedi prima nota alla tab. 4.

+ Vedi prima nota alla tab. 2.

** +++ crescita completa +, crescita di distinte coloniette;

(+), crescita scarsissima o nulla; —, nessuna crescita.

++ Da un clone *glu pigm* sono stati isolati alcuni subcloni *glu*.

*** Vedi prima nota alla tab. 3. + indica il tipo « wild ».

coloniette cresciute su MM + istidina + ac. glutammico appartenenti agli stessi cloni. I dettagli dell'esperimento risultano dalla Tab. 5. I quattro cloni sono risultati eterogenei e da tre di essi sono stati ottenuti subcloni con richieste nutrizionali non soddisfatte nel terreno selettivo del piastramento.

Tutti i subcloni isolati presentavano il pigmento blu, ad eccezione di cinque subcloni *glu pigm* dal clone 35. Questi, trasferiti su tubi di CM mostravano alcune macchie fortemente pigmentate in blu. Da queste sono stati isolati subcloni richiedenti ac. glutammico con produzione del pigmento blu (*glu* + *pigm*).

Un subclone richiedente prolina, produttore pigmento blu, esaminato per due « generazioni » è risultato completamente stabile. In totale 208 colonie sono state saggiate per la richiesta nutrizionale e oltre 4.000 osservate per la produzione del pigmento blu.

COMPORTAMENTO DEL CARATTERE « PRODUZIONE DEL PIGMENTO ».

La produzione del pigmento blu dal ceppo « wild » l'intensa pigmentazione blu delle culture miste + *pigm* × *pigm* e la produzione del pigmento blu dalla stragrande maggioranza dei ricombinanti ottenuti da tali culture miste, tutti suggerivano che la « produzione di pigmento » dovesse essere dominante sull'« assenza del pigmento ». Con nostra sorpresa è risultato esattamente il contrario.

Come già riferito nel precedente lavoro [SERMONTI e SPADA-SERMONTI (2)] e in questo (ultimo paragrafo), non è mai stato ottenuto un segregante senza pigmento da un ricombinante con pigmento blu. Una colonia ricombinante prototrofa (incrocio 14 × 23) mostrava, trasferita su MM, una evidente eterogeneità rispetto al carattere + *pigm* / *pigm*. I suoi conidi, piastrati su CM, davano luogo a colonie con pigmento blu (+ *pigm*) o senza pigmento blu (*pigm*). I conidi di una dozzina di colonie + *pigm* e di una dozzina di colonie *pigm* sono stati piastrati su CM e il risultato è stato il seguente. Le colonie + *pigm* davano luogo a solo colonie + *pigm* (talvolta apparivano rare colonie atrofiche), e le colonie *pigm* a una mistura di colonie + *pigm* e di colonie *pigm*.

Queste ultime, trasferite su CM davano ancora luogo a una mistura di colonie + *pigm* e *pigm*, mentre le colonie + *pigm* erano stabili. Questo comportamento è stato osservato per tre successivi trasferimenti, e solo due colonie *pigm* sono state osservate, che non davano nella loro « progenie » colonie + *pigm*. La mutazione *pigm*, essendo risultata domi-

nante dovrà essere indicata, da ora in poi come *Pigm*, e l'allele « wild » come + *Pigm* in accordo con le regole indicate dalla *International Committee on Genetic Symbols and Nomenclature* (⁷).

DISCUSSIONE

Dallo sviluppo della ricerca sullo *S. coelicolor* riportato in questo lavoro è emerso un fatto rimarchevole che getta qualche luce sul processo di ricombinazione, ed è la occorrenza di colonie ricombinanti che danno luogo per subcultura ad una varietà di fenotipi ricombinanti. La probabilità che tali colonie originino da più di un conidio è trascurabile. Ammesso che esse, o almeno la maggior parte di esse, originino da un singolo conidio, rimane la possibilità che questo contenga più nuclei. Questa sarebbe una situazione insolita per il genere *Streptomyces*, e d'altro lato, poichè da singole colonie sono stati recuperati tre e fin quattro diversi fenotipi ricombinanti, dovrebbe essere ammesso un numero troppo grande di nuclei geneticamente indipendenti nella stessa spora. Benchè le prove non siano conclusive, la occorrenza, tra le spore di una cultura mista di eccezionali spore con nucleo eterozigote per alcuni marcatori dei ceppi parentali sembra altamente probabile. Il comportamento del carattere + *pigm* / *pigm* è fortemente indicativo del perpetuarsi dell'eterozigosi attraverso singoli conidi. L'allele *pigm* sembra dominante nell'eterozigote e l'allele + *pigm* segregherebbe spontaneamente.

Nei cloni misti esaminati il numero dei segreganti è elevatissimo, e ciò suggerisce una notevole instabilità del nucleo eterozigote. La presenza di linee pure, originate direttamente dai conidi della cultura mista non è stata ancora esaurientemente dimostrata. In qualche caso il terreno selettivo per il piastramento potrebbe produrre una forte selezione tra i subcloni segreganti derivati da una spora iniziale eterozigote, così da dare l'impressione che il clone derivato da questa sia puro. (v. ad es. clone 35 e 72, Tab. 5).

Il saggio globale dei conidi di una colonia ricombinante, ottenuta su un terreno selettivo dal piastramento delle spore di una cultura mista, ci dà una scarsa informazione sulla costituzione genetica del clone in esame. Solo una accurata analisi dei subcloni puri può darci una tale informazione.

Rimane inoltre da chiarire se la segregazione dei nuclei eterozigoti avviene in un solo passo, attraverso la formazione di aploidi, o gra-

dualmente per l'insorgere dell'omozigosi o dell'emizigosi in alcuni loci. I due processi potrebbero aver luogo parallelamente, come nella segregazione somatica dell'*Aspergillus nidulans* [PONTECORVO ⁽⁸⁾]. Un altro punto che dovrà essere oggetto di future ricerche è se nella formazione dei nuclei eterozigoti si abbia regolarmente la fusione di due nuclei interi. Questo non può essere ammesso *a priori*.

I presenti risultati suggeriscono che il processo di segregazione può in qualche caso essere conseguente alla formazione delle spore nella coltura mista. La conclusione più plausibile è che una proporzione dei conidi riceve nuclei segreganti (aploidi?) mentre altri conidi ricevono nuclei ancora eterozigoti, per almeno qualcuno dei marcatori.

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) SERMONTI G. e SPADA-SERMONTI I. - Nature, Lond., 176: 121 (1955).
 - (²) SERMONTI G. e SPADA-SERMONTI I. - J. gen. Microbiol., 15: 609 (1956).
 - (³) HOPWOOD D. A. - J. gen. Microbiol., 16: ii-iii (1957).
 - (⁴) BRAENDLE D. H. e SZYBALSKI W. - Proc. nat. Ac. Sci. U. S., 43: 947 (1957).
 - (⁵) BRADLEY S. G. - J. Bact., 73: 581 (1957).
 - (⁶) WAKSMAN S. A. - « The Actinomycetes », Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., USA (1950).
 - (⁷) Report of the International Committee on Genetic Symbols and Nomenclature. Intern. Un. Biol. Sci. Serie B. no. 30, 1-6 (1957).
 - (⁸) PONTECORVO G. - Proc. 9th Intern. Congr. Genetics, Caryologia, 6th suppl. 192 (1954).
-