

Istituto di Microbiologia generale agraria e tecnica dell'Università di Milano
Sezione Microbiologica del Centro Studi per la Chimica e la Microbiologia
delle fermentazioni del C.N.R.
(Direttore: Prof. C. ARNAUDI)

Nuove forme di *Eutorulopsis dubia*

Cif. et Red.

NOTA II

ELISA CORBERI - assistente

Da uno stipite di *Torula rosea* proveniente dalla collezione del professor D. Carbone e classificato come *Eutorulopsis dubia* da Ciferri e Redaelli, e più tardi come *Rhodotorula mucilaginosa* var. *sanguinea* (Schimmon) dalla J. Lodder, previo isolamento monocitogenetico, furono isolati stipiti morfologicamente un poco diversi dall'originale, in maniera piuttosto semplice. Erano stati seminati alcuni palloni di brodo malto con lo stipite sopra ricordato, per controllare una sua eventuale variabilità naturale nei confronti di quella dovuta a potenti mezzi fisici, quali i raggi X. Ci interessava approfondire questo punto perchè in una precedente esperienza in cui la *Torula rosea* era stata irradiata con i raggi X, si erano ottenuti ceppi varianti in modo piuttosto notevole e per la forma e per il pigmento. I controlli (piastre di agar malto) provenivano tutti da culture a loro volta tenute su agar malto come pure le piastre che erano state irradiate; in quelle condizioni non si era trovata nessuna colonia in cui i caratteri fossero diversi da quelli dello stipite originario. Nella attuale esperienza il ceppo originario (fig. I) venne tenuto in terreno liquido (brodo malto) in palloni della capacità di 300 cc. e da questi, rimasti a 30° per 3-4 giorni, poi all'ambiente, si allestirono a distanza di diverso tempo (4-8-39-46 giorni) piastre per diffusione con agar malto. Le piastre, tenute per 3-4 giorni a 30° poi all'ambiente ed alla luce, venivano esaminate dopo circa 15 giorni. Si ebbe così il modo di osservare che il colore della patina di pochissime colonie, non era uguale a quello della grande maggioranza: cioè era o lievemente più pallido, pur mantenendo la colonna la normale pastosità e lucentezza oppure più cupo, o perlomeno apparentemente tale, perchè la patina, perduta la normale consistenza mucilaginosa, era diventata opaca. Così su un totale di 1694 colonie (complessivamente sommando tutte quelle che si ottennero nelle numerose piastre allestite) se ne osservarono 48 un poco diverse come aspetto (2,83%). Queste si esaminarono tutte al microscopio e perchè inoltre non ci sfuggisse una eventuale alterazione delle cellule nelle colonie apparentemente normali se ne osservarono al microscopio 780 di queste.

Il risultato fu che non tutte le 48 colonie diverse per il colore risultarono tali anche per la forma delle cellule, cioè la maggioranza era formata da individui per lo più normali e con solo un piccolo numero di altri distintamente o più tondi o più allungati o più grossi o con un piccolo sottile insolito prolungamento, quasi un tubetto germinativo. Solo 5 colonie mostravano una notevole uniformità nelle cellule, quasi tutte provviste del sottile prolungamento e di queste, 4 si isolarono. Cioè solo 5 delle 48 colonie erano in cultura pura, le altre erano un miscuglio tra il ceppo originario e quelli evidentemente di nuova formazione. Le 780 colonie apparentemente normali come aspetto, al microscopio risultarono quasi tutte costituite di cellule normali e solamente pochissime (circa l'1%) contenevano un numero molto basso di individui chiaramente o più grossi o più allungati o provvisti dei sottili prolungamenti. Sembra quindi che dove si nota un cambiamento macroscopico nella colonia (forma, colore, lucentezza anormali) si presentino pure alterazioni morfologiche e dove l'aspetto è normale vi sia solo una piccolissima probabilità che sia presente qualche forma insolita.

Con un lavoro successivo di piastre si riuscì ad avere in cultura pura: *a*) un ceppo in cui la cellula presenta dei sottili prolungamenti, quasi dei tubetti germinativi (vedi fig. 2 e 3); *b*) un ceppo di forma e pigmento normali ma in cui le cellule hanno tendenza a rimanere attaccate alla cellula madre (fig. 4); *c*) un ceppo di forma e pigmento normali ma notevolmente più grosso dell'originario (fig. 5); *d*) un ceppo pigmentato normalmente ma di forma prevalentemente allungata (fig. 6); *e*) un ceppo più piccolo e meno pigmentato dell'originario (fig. 7).

Non ci sembrò qui il caso di dare importanza alle percentuali delle colonie diverse dalla originaria poichè non è praticamente possibile sceverare tra i ceppi fondamentalmente trovati uguali, quanti siano di vera nuova formazione e quanti abbiano viceversa una origine comune, cioè siano figli di una stessa cellula variante. Poichè sembra logico pensare che una volta formatasi la cellula variante, cominci subito a moltiplicarsi in seno al liquido dove è nata dando luogo ad una discendenza uguale a sè stessa più o meno numerosa. Si correrebbe quindi il rischio di contare come altrettanti ceppi varianti, quelli che potrebbero invece essere solo la discendenza di un'unica cellula variante. Per cui più che insistere nella ricerca delle percentuali, ci sembrò valesse la pena di approfondire le osservazioni sui ceppi varianti isolati. Essi, derivanti tutti da uno stipite unico, di forma lievemente ovale, che aveva subito in tempi successivi due isolamenti monocitogenetici ed era indubbiamente puro, ci fanno intravvedere la possibilità che i diversi caratteri (forma, pigmento, disposizione delle cellule, ecc.) possano mutare piuttosto profondamente ed indipendentemente. Dopo isolamenti di piastra in piastra e dopo parecchi trapianti eseguiti per assicurarci della stabilità dei nuovi caratteri, i ceppi si saggiarono nei riguardi della formazione delle colonie giganti, del potere fermentativo, della fluidificazione della gelatina.

Essi mostrarono rispetto al ceppo originario differenze poco notevoli. Si seguirono inoltre al microscopio per vedere il loro comportamento nel tempo. Per la maggioranza di essi è in tutto simile a quello del ceppo originario; uno solo se ne discosta notevolmente ed è quello dotato del

T A V O L A I

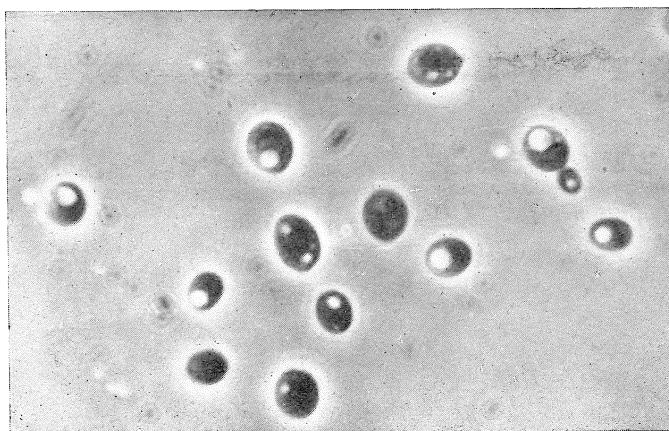


Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

Microfotografie a contrasto di fase - ingr. \times 2.200

TAVOLA II

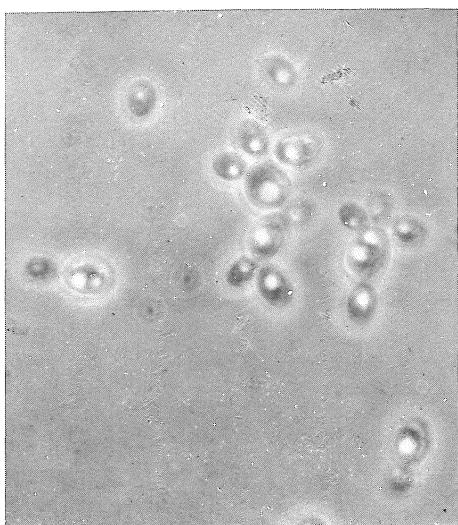


Fig. 4

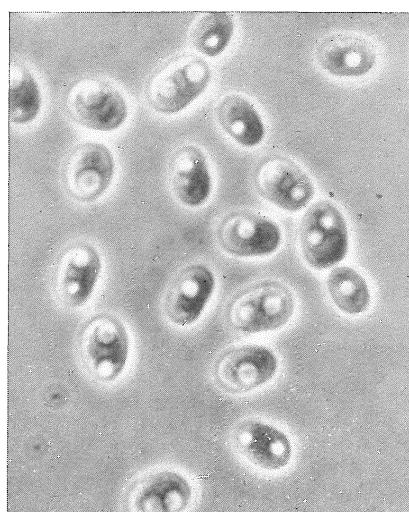


Fig. 6

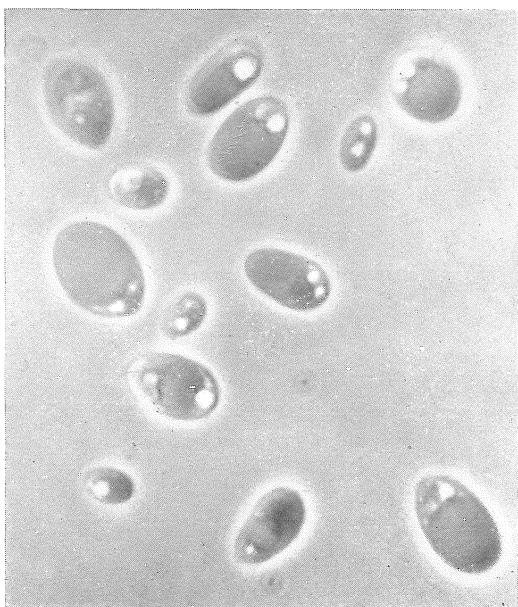


Fig. 5



Fig. 7

Microfotografie a contrasto di fase - ingr. $\times 2.200$

prolungamento. Ne riassumiamo brevemente le particolari caratteristiche: si moltiplica da principio per gemmazione tanto che dopo 24-48 ore sia in brodo che in agar malto, la cultura difficilmente potrebbe essere distinta da quella originaria; dopo qualche giorno (circa 4-8) cominciano a comparire sia forme più grosse e tonde quasi sferiche in cui le granulazioni ed i corpuscoli oleosi si sono fatti aderenti alla membrana e di cui qualcuna emette un piccolo sottile prolungamento a forma di tubicino, sia inoltre piccoli sottili prolungamenti anche su cellule apparentemente normali come forma; raramente qualche cellula ne ha due e pure molto raramente si vede un piccolo ingrossamento tondeggiante all'estremità del tubicino stesso; quando le culture invecchiano (3-4 mesi di età) si osservano molte di queste forme quasi rotte o spezzate.

Contemporaneamente a queste forme se ne vedono sempre anche di normali. L'emissione dei sottili prolungamenti pare sia favorita da condizioni di carenza alimentare: infatti coltivando questo lievito in piastre di agar malto in alto ed in basso strato, i prolungamenti compaiono molto più presto e molto più numerosi in questo secondo caso, soprattutto se le colonie sono fitte. Il colore delle colonie è molto vicino a quello delle colonie dello stipite originario, ne differisce solo un poco perchè la patina non è lucida e mucosa ma piuttosto opaca; invecchiando diviene leggermente più chiara soprattutto quando si sono formati molti prolungamenti. Queste forme un poco differenziate non sono conosciute come produzioni comuni della *Torula rosea*. Infatti, esse non si trovano nè nella descrizione particolareggiata che fanno Ciferri e Redaelli proprio di questo stesso ceppo nella loro monografia sulle *Torulopsidaceae* a pigmento rosso del 1927, nè le vide la Lodder che nel 1934 esaminò a sua volta il medesimo stipite. Non vi è cenno alcuno alla possibilità di trovare forme di tal genere nella descrizione dei caratteri peculiari nè della sottofamiglia delle *Rhodotorulaceae*, nè del genere *Rhodotorula*, cui appartiene il nostro stipite originario. Dobbiamo tuttavia riconoscere che la variabilità della forma da tonda ad allungata è ammessa piuttosto largamente, infatti la Lodder parla per questo ceppo di forme ovali delle dimensioni di $(2,8-4) \times (4,5-6) \mu$ e di forme lunghe ovali $(2,8-3,5) \times 10 \mu$. Le misure corrispondono a quelle dei nostri ceppi salvo che noi ora abbiamo degli stipiti in cui prevalgono a gran maggioranza e di volta in volta le diverse misure. Cercando nella letteratura a quali forme già conosciute poteva essere avvicinato il lievito coi prolungamenti ci imbattiamo in un lavoro di H. Will del 1912 in cui è descritta una forma che un poco ricorda la nostra. La sua è però più differenziata: presenta infatti prolungamenti o tubetti germinativi con un ingrossamento reniforme all'estremità che si stacca e cade. Will la colloca tra i *Blastoderma* (secondo gruppo delle *Torulaceae*) perchè gli ricorda molto il *Blastoderma salmonicolor* di Fischer e Bredeck. Inoltre A. J. Kluyver e C.B. Van Niel nel 1924 in alcuni lieviti osservano prolungamenti e cellule reniformi che considerano come conidi e creano il genere *Sporobolomyces*. Ciferri e Redaelli nel 1927, accolgono questo genere nella sottofamiglia delle *Mycotoruleae*. Nel 1934 Lodder lo toglie dai lieviti asporigeni per collocarlo tra quelli sporigeni, giudicando le formazioni reniformi qualcosa di molto simile a basidiospore. I nostri ceppi non presentano una diffe-

renziazione così chiara come i ceppi sopra ricordati; essi non possiedono cellule che abbiano nettamente l'aspetto di formazioni sporali; per lo meno per ora non ne sono state osservate a meno di non considerare tali le cellule tonde; ed i prolungamenti come tentativi di formazione di micelio.

I ceppi sono ancora in studio, quindi non è possibile dire nulla di definitivo, però pur essendo di struttura più semplice di quelli di Will e di Kluyver e Van Niel si avvicinano a questi. Ma è possibile che da una forma così semplice come la nostra originaria si giunga ad una discretamente differenziata ed attraverso a quale meccanismo? E' da ricordare che i nuovi ceppi derivano tutti da un'unica cellula lievemente ovale per due volte di seguito isolata in cultura monocitogenetica e se per la formazione dei ceppi varianti di poco, cioè con cellule, o più tonde o più grosse o più allungate, si può invocare la selezione, non sembra altrettanto facile per la formazione di quelli con i prolungamenti perché si passerebbe da una specie asporigena ad una in cui invece si parla di forme che molto si avvicinano alle spore. E' molto logico, nel caso nostro, il sospetto che si tratti di un banale inquinamento, ma sia per la modalità dell'esecuzione, sia perchè il medesimo risultato si è ottenuto costantemente e partendo da parecchie colonie riisolate dallo stipite originario (5) non è affatto azzardato escluderlo. Ci sembra di particolare interesse far notare la non comune coincidenza per cui i ceppi che più ricordano i nostri con prolungamento, cioè quelli di Will e di Kluyver e Van Niel sono stati isolati proprio da culture di altri lieviti e giudicati come inquinamenti di questi. Il ceppo del primo autore sarebbe stato un inquinamento di un *Mycoderma humuli* (*Mycoderma* genere della sottotaniglia delle *Torulopsoideae*), quelli dei secondi di una *Torula flavescens* e di una *Torula alba* di Saito (*Torulopsis flavescens* (Saito) Lodder, e *Torulopsis albida* (Saito) Lodder, secondo Lodder). Questi autori osservarono che in culture piuttosto vecchie di lieviti, appartenenti precisamente alle *Torulaceae*, ad un certo punto oltre al ceppo normale vi erano anche altre forme di lieviti, che isolate considerarono come inquinamenti.

Interpretare come inquinamenti anche il nostro caso, non sembra giustificabile ed è ammissibile possa venirci il dubbio che anche in quei casi sopra ricordati, si potesse trattare di un fatto normale, cioè della produzione, se pure rara, di ceppi nuovi (mutazioni), oppure di fasi di un ciclo di vita che ci sfugge nel suo complesso. Nel tentativo di appurare con i pochi mezzi a disposizione e considerando come nei vecchi controlli provenienti tutti da agar malto (esperienza coi raggi X) non si era notata mai nessuna colonia variante e che viceversa ora erano state notate partendo da un terreno non più solido ma liquido, si pensò di seminare lo stipite originario di *Torula rosea* contemporaneamente in brodo ed in agar malto (il brodo in palloni da 300 cc. e l'agar inclinato in grossi provettoni) per vedere come erano le colonie che ne derivavano. Sia l'agar che il brodo, preparati contemporaneamente e con il medesimo malto, una volta seminati si tennero nelle stesse precise condizioni a 30° per 3 o 4 giorni, poi all'ambiente. Dopo 53 giorni si allestirono piastre per diffusione, sia prelevando dall'agar che dal brodo. Le piastre si osserva-

Rono circa una quindicina di giorni dopo il loro allestimento. L'esperienza si ripetè con 4 stipiti normali, provenienti *dalla Torula rosea* monocitogenetica. Ecco il risultato complessivo:

colonie provenienti dal brodo malto:			
Totalle delle colonie osservate	Numero delle colonie d'aspetto normale	Numero delle colonie d'aspetto diverso	% colonie diverse
8001	7991	100	1,25
colonie provenienti dall'agar malto:			
5602	5601	1	0,017

Si osservarono al microscopio tutte le colonie un pò diverse dal normale e delle rimanenti solo qualcuna.

Le varianti (o più chiare o più scure o più opache) risultarono come al solito miste di cellule del tipo normale e dei tipi o più grossi o più allungati o coi sottili prolungamenti. Il risultato conferma quanto si era già osservato: dall'agar più scarsa probabilità di ottenere una variazione dei caratteri normali che non dal brodo. Si direbbe quindi che la possibilità di una variazione anche notevole sia insita naturalmente in questo lievito e che forse sia più facile metterla in evidenza quando lo stipite viene tenuto in terreno liquido perchè il rimescolamento che precede il prelievo crea una maggiore probabilità di raccogliere anche qualche eventuale cellula mutata qualunque sia il punto del mezzo culturale in cui essa si sia originata. Perciò i ceppi varianti che si erano ottenuti per azione dei raggi X (vedi nota 1) sembra possano essere considerati come vere mutazioni, dovute alle radiazioni, poichè nelle condizioni in cui erano state eseguite le prove, provenendo sempre le culture da agar, erano nelle condizioni meno favorevoli al dar luogo a variazioni spontanee.

RIASSUNTO

Da uno stipite di *Eutorulopsis dubia* Ciferri e Redaelli in cultura monocitogenetica e coltivato in brodo malto, furono isolati alcuni ceppi morfologicamente un poco diversi dall'originario, sia per la forma e la pigmentazione delle colonie che per la forma e le dimensioni delle cellule. I nuovi caratteri sono risultati stabili anche dopo numerosi passaggi. Uno di questi ceppi, il più interessante, ha cellule dotate di un corto e sottile prolungamento a forma di tubicino ed altre un poco più grosse e quasi sferiche. I ceppi sono ancora in studio e quindi non è possibile dire nulla di definitivo su queste particolari formazioni. Esaminate numerose colonie del ceppo originario provenienti sia da agar che da brodo malto parrebbe risultare che la possibilità di una variazione anche notevole sia insita naturalmente in questo lievito e che forse sia più facile metterla in evidenza quando lo stipite viene tenuto in terreno liquido, anzichè in solido, per ragioni puramente meccaniche.

SUMMARY

From *Eutorulopsis Dubia* Cif. et Red. in monocitogenetic culture and cultivated in malt broth, some progeny were isolated which morphologically differed but slightly from the original one, both as regards the form and pigmentation of the colonies and as regards the form and the dimensions of the cells. The new characters were found to be stable even after numerous platings and transfers over a prolonged period. One, the most interesting of these clones, has cells endowed with one long thin tubelike prolongation and with others slightly larger and almost spherical in shape. The study of these clones still continues and it is therefore impossible to make any final statement on these particular formations. From the examination of numerous colonies of the original yeast from agar or from malt broth, it would appear that the possibility of a variation and even a considerable one is lodged naturally in this yeast and that perhaps it is easier for purely mechanical reasons to demonstrate this when the yeast is kept in liquid rather than in solid media.

BIBLIOGRAFIA

- Ciferri R. e Redaelli P.: « Monografia delle *Torulopsidacee* a pigmento rosso ». Atti R. Ist. Bot. Univ. Pavia, 1927.
- Corberi E.: « Nuove forme di *Eutorulopsis dubia* Cif. et Red. per azione dei raggi X ». Boll. Soc. It. Biol. Speriment. Vol. XXV, fasc. 4-5, 1949.
- Diddens H. A. e Lodder J.: « Die Anaskosporogenen Hefen ». II Parte. Martinus Nijhoff, Amsterdam, 1942.
- Kluyver A. J. e Van Niel C. B.: « Über Spiegelbider erzngende Hefenarten und die neue Hefengattung "Sporobolomyces" ». Centrl. Bakt. II Abt., Ed. 63, n. 1/8, pag. 1, 1925.
- Lodder J.: « Die Anaskosporogenen Hefen ». I Parte. Martinus Nijhoff, Amsterdam; 1934.
- Nyshiwaki Y.: « Über eine neu Sporenbildende Rot Hefe ». Centrl. Bakt. II Abt., Band. 63, 1925.
- Will H.: « Beiträge zur Kenntnis rotgefärbter, niederer Pilze ». Centrl. Bakt., II Abt., Ed. 35, n. 6/10, 1912.
- Will H.: « Beiträge zur Kenntnis der Sprosspilze onhe Sporenbildung, welche in Brauereibetrieben und in deren Umgebung Vorkommen ». Centrl. Bakt., Ed. 46, pag. 226, 1916.

Pervenuto in redazione il 1 luglio 1950.