Estudios sobre la penicilina IV.

Sobre la obtención de cepas de Penicillium notatum con buena actividad penicilinógena y su relación con la constitución genética.

por Pablo Negroni e Ida Fischer

Del estudio de la bibliografía referente a la producción de penicilina y de nuestra propia experiencia notamos los siguientes hechos: 1) resultados irregulares en cuanto al título de penicilina logrado en diferentes ocasiones pero aparentemente en las mismas condiciones de experiencia, 2) dificultad de obtener una buena cepa penicilinógena, 3) la actividad penicilinógena parecería estar en relación con la esporulación del *Penicillium* por los siguientes motivos: a) la penicilina aparece en el medio de cultivo hacia el tercer día cuando comienza la esporulación, b) las substancias o condiciones que aumentan la esporulación del *Penicillium* (adsorbentes, sulfato de zinc) favorecen la producción de penicilina y c) las capas micelianas blancas, pobres en esporos sólo producen escasa cantidad de penicilina.

H. N. Hansen (1), estudiando 900 aislamientos monocelulares pertenecientes a 30 géneros diferentes de *Fungi imperfecti* esporulados, comprobó que un 50 % presentaba una constitución heterocariótica en cuanto a la esporulación y que contenían dos componentes fundamentales que llamó M y C. Prosiguiendo los aislamientos unicelulares llegó a obtener un tipo M puro con predominio del micelio vegetativo y esporulación escasa o ausente y un tipo C puro con formación abundante de esporos o conidias.

Nosotros tratamos de investigar si en el *Penicillium notatum* tendría lugar un fenómeno sumejante, utilizando para tal estudio tres cepas puras, una la original de Fleming (cepa nº 1174 de nuestra colección) y dos cepas autóctonas aisladas en nuestro laboratorio: cepas nº 56 y 38. Efectuamos de cada una 50 aislamientos unicelulares y estudiamos luego su capacidad de esporular y producir penicilina con los siguientes resultados:

Presentado en la reunión de comunicaciones del 6 de agosto de 1945.

Cepa N.º	Esporulación Micelio	(tipo C) (tipo M)	Inhibición 20 o más mm.	Inhibición menor de 20 mm.	Inhibición escasa o ausente
	Cultivo 1	Tipo C		18 mm.	
	» 2			19 mm.	
	» 3		24 mm.		
	» 4		20 mm.		
	» 5		26 mm.		
	» 6		22 mm.		
	» 7		22 mm.		
	» 8		21 mm.		
	» 9		21 mm.		
	» 10			19 mm.	
	» 11		25 mm.		
	» 12		25 mm.		
	» 13		22 mm.		
	» 14		24 mm.		
	» 15			19 mm.	
	» 16				casi nula
	» 17				casi nula
	» 18				casi nula
	» 19				casi nula
	» 20			16 mm.	
	» 21				casi nula
	» 22			18 mm.	
	» 23			15 mm.	
	» 24		23 mm.		
	» 25		22 mm.		
	» 26				casi nula
	» 27				casi nula
	» 28			16 mm.	
	» 29		22 mm.		
	» 30			18 mm.	
	» 31			18 mm.	
	» 32				casi nula
	» 33		22 mm.		
	» 34		20 mm.		
	» 35			16 mm.	
	» 36			16 mm.	
	» 37		21 mm.		
	» 38		21 mm.		
	» 39				casi nula
	» 40		21 mm.		
	» 41		24 mm.		
	» 42		25 mm.		
	» 43			19 mm.	
	» 44			16 mm.	
	» 45				casi nula
	» 46				casi nula
	» 47			19 mm.	
	» 48		21 mm.		
	» 49			18 mm.	
	» 50		20 mm.		

Estas experiencias fueron conducidas en la forma siguiente: los cultivos monocelulares se sembraron en tubos de ensayo comunes que contenían agar-miel (fórmula de Sabouraud) inclinado y el material de esta primera generación se suspendió en caldo aspirando y expulsando el caldo contenido en la mitad de una pipeta Pasteur sobre la superficie esporulada del cultivo dos veces y vertiendo, finalmente, su contenido en un tubo de 180 por 28 mm. con 20 ml. de caldo. En esta forma tratamos de obtener una suspensión de esporos sin micelio en un pequeño volumen de caldo extraído de cada uno de los tubos. La edad de los cultivos osciló entre una y dos semanas. Se los incubó a una temperatura vecina a los 24º C durante 7 días, al cabo de los cuales se efectuó la medición por el método de las placas de Oxford.

Veinte y tres cultivos dieron una zona de inhibición de 20 a 26 mm., 16 de 15 a 19 mm. y 11 no dieron, casi, inhibición.

La cepa autoctona nº 56 nos dió el siguiente resultado: Todos los cultivos unicelulares tenían aparentemente el tipo C y el estudio de su actividad penicilinógena fué el siguiente: 16 cultivos de escasa o nula actividad, 27 cultivos dieron una zona de inhibición entre 10 y 20 mm. y 7 una de 20 a 25 mm. Considerando las cepas penicilinógenas únicamente, el pico de mayor número de cultivos correspondió a los que dieron una zona de 14 mm. de inhibición en placas.

De la cepa nº 38 se obtuvieron 53 cultivos unicelulares de los cuales 42 fueron del tipo M puro, al parecer, 9 del tipo C y 2 del tipo MC. El estudio de la actividad penicilinógena permitió comprobar que los cultivos del tipo M están completamente desprovistos de actividad penicilinógena y los tipos MC, solamente la poseen en pequeño grado.

Del cultivo tipo C, al parecer puro, efectuamos 10 aislamientos monocelulares de segunda generación, digamos, que fueron probados en su actividad penicilinógena con el siguiente resultado: 2 cultivos dieron una zona de 20 mm. de inhibición, 5 dieron una zona de 25 mm. y 3 una de 26 mm.

CONSIDERACIONES

La interpretación de este interesante fenómeno necesita una revisión histórica de las observaciones similares que se vienen sucediendo desde el siglo pasado. En efecto, E. Chr. Hansen ([2]) en 1883-1885 obtuvo de cultivos monocelulares del *Saccharomyces ellipsoideus*, en las temperaturas límites de esporulación y brotación, una raza permanente no esporulada; pero han sido los *Aspergillus* y *Penicillium* los organismos más usados en la experimentación de los investigadores quienes han recurrido a los siguientes procedimientos para la obtención de variantes o cepas especiales: 1) temperaturas disgenésicas (frío o calor), 2) envejecimiento, 3) substancias químicas especiales: sulfato de zinc, bicromato de potasio, cloroformo cianuros, etc., 4) soluciones hipertónicas, 5) radiaciones: rayos X, radium, rayos ultravioletas.

Barnes 1926 y 1932, trabajando con *Eurotium herbariorum*, *Botrytis cinerea* y *Thamnidium elegans*, obtuvo algunas variantes estables por calentamiento de los esporos. Estas variantes diferían en el color y en la riqueza de las fructificaciones sexuadas y asexuadas. Es de hacer notar que ya este investigador había obtenido del *Eurotium herbariorum* un tipo predominantemente miceliano y otro con abundantes peritecios.

Arcichovskij, en 1908, obtuvo de una cepa negra de *Aspergillus niger* por la adición al medio de cultivo de sulfato de zinc en el límite de la tolerancia, una variante parda amarillenta, bastante estable, que producía un pigmento difusible pardo rojizo.

Dimock ([4]) obtuvo variantes estables de *Fusarium* mediante la adición de sulfato de zinc a los medios de cultivo y con el nitrato de zinc, provocó una variante "aborta" con pocas conidias y sin peritecios en un hongo heterothallico, el *Hypomyces ipomoae*.

Philippov, G ([5]) haciendo actuar los rayos X sobre cultivos de *Mucoraceae*, *Sporobolomyces* y *Nadsonia* provocó la formación de variantes con pérdida de la sexualidad y cambios de color así como también en las *Mucoraceae*, razas especiales que producían mayor cantidad de esporangios y de esporangiosporos. Nadson, G. A. ([6]), mediante el empleo de los rayos X y del radium, obtuvo razas de levaduras de mayor vitalidad y poder fermentativo y, otras, con caracteres letales.

Dodge, B. O., por la acción de los rayos X sobre cultivos de *Neurospora tetrasperma*, obtuvo una cepa con un factor recesivo r (letal) para la formación de ascosporos.

La formación de variantes estables no solamente se la puede provocar mediante los artificios mencionados sino que también tienen lugar espontáneamente. La aparición de sectores con caracteres somáticos diferentes en las colonias de los hongos es un hecho observado por todos los micólogos (Crabill 1915, Blakeslee 1920, Lieske, 1921, Blochwitz 1923, entre otros) Christensen (1925-1926) demostró que los sectores de las colonias aparecen de preferencia en las zonas donde existe una capa delgada del medio nutritivo sólido, en los medios de cultivo ricos (solución de Richard) y en el centro de las colonias (envejecimiento) y a temperaturas mayores de 15° C.

Caldis y Coons ([7]) obtuvieron razas incoloras fijas de *Septoria*, *Sphaeropsis*, *Coletothrichum* y *Cladosporium* mediante aislamientos unicelulares. Greene, H. C. ([8]) de 448 cultivos monocelulares del *Aspergillus fischeri*, obtuvo dos variantes: una con peritecios grandes y aislados y otra con formación predominante de conidias y con peritecios escasos y de aparición tardía.

De los hechos expuestos podemos deducir que los cultivos puros de los hongos, aún los obtenidos por aislamiento monocelular, pueden presentar variantes estables o uno o más caracteres diferentes a los del cultivo madre que se transmiten de generación en generación. Estas variantes pueden ser provocadas o nacer espontáneamente y si bien es cierto que son muy escasos los estudios citológi-

cos de estos fenómenos, deben ocurrir, con toda verosimilitud, en la substancia nuclear. Se ha comprobado que los esporos de los hongos tienen, a menudo, más de un núcleo y su número puede variar en los esporos de una misma cepa. El aislamiento unicelular de tales esporos puede conducir a la separación de monotipos con caracteres morfológicos y biológicos particulares. Según Hansen, H. N. la facilidad y rapidez de la segregación de los homotipos estaría en relación inversa al número de núcleos que contienen los esporos.

En las variantes provocadas, los agentes físicos y químicos mencionados más arriba pueden dañar o, por el contrario, estimular a ciertos factores a expensas de sus correspondientes alelomorfos, si cabe la expresión, y no sería imposible que los mismos elementos utilizados artificialmente para provocar la formación de variantes, actuaran espontáneamente en la naturaleza (envejecimiento, temperaturas disgenésicas, desecación, soluciones hipertónicas, minerales radioactivos, agentes químicos, etc.).

Además de estos agentes modificadores de la constitución genotípica, es fácil explicarse la aparición de variantes en los hongos sexuados heterothallicos por la formación de cepas heterozigóticas. En los hongos asexuados unicelulares la población de un clone estaría a menudo representada por un mosaico de individuos con diferentes aptitudes morfogenéticas y biológicas, traducida también en los esporos de los hongos filamentosos. Este estado heterotípico se mantiene por los transplantes en masa efectuados en el laboratorio y, a menudo, en la naturaleza por la fusión vegetativa de las hifas o de los tubos germinativos de los esporos o entre los esporos (Reinhardt, Buller, Davidson y Dowding, Gómez de Cisneros ([9]), Hansen). Las variantes originadas por este mecanismo corresponderían a las *mixochimaeras* de Bailey ([10]), quien afirma que la fusión vegetativa no solamente puede tener lugar entre cepas muy vecinas sino, también, entre especies o géneros distintos. En los vegetales superiores se ha comprobado que los agentes físicos y químicos ya citados son capaces de provocar la fragmentación, soldadura, poliploidia, polisomia, transmutación estructural por inversión, translocación, intercambio, etc., de los cromosomas originando mutaciones.

Finalmente la sugestión de que los tipos M y C del *Penicillium notatum* y su variada actividad penicilinógena están ligados a su constitución nuclear nos la ofrece el análisis de nuestras experiencias. La cepa nº 38 se comportó como un híbrido en el cual el aislamiento unicelular permitió separar 1|4 de individuos del monotipo C y 3|4 con tipo predominantemente M. Esto parece indicar que existen en los núcleos dos factores M y C capaces de separación independiente. Los caracteres ligados a los factores M y C serían pues alelomorfos.

El estudio de la actividad penicilinógena nos permitió comprobar otro hecho interesante y es que el factor M condiciona la ausencia de actividad penicilinógena. No sería improbable que el tipo M

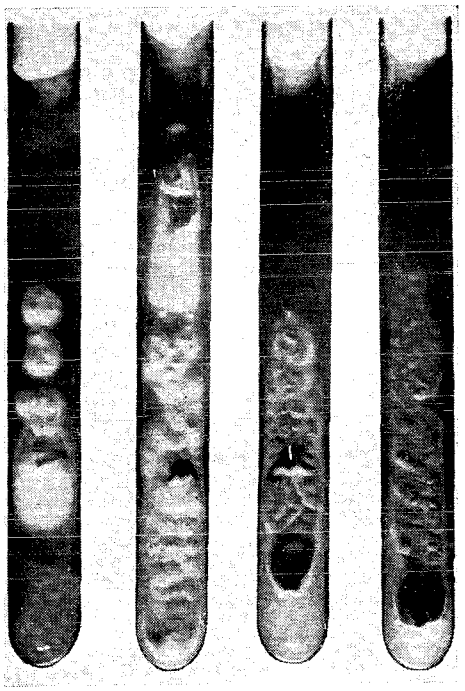

Fig. 1. - Diversos aspectos macroscópicos de cultivos monocelulares del *Penicillium notatum* cepa autóctona Nº 38. De derecha a izquierda: tipo C (conidial o esporulado) puro, tipos MC mixtos y tipo M puro (miceliano), casi blanco y con muy pocos esporos.

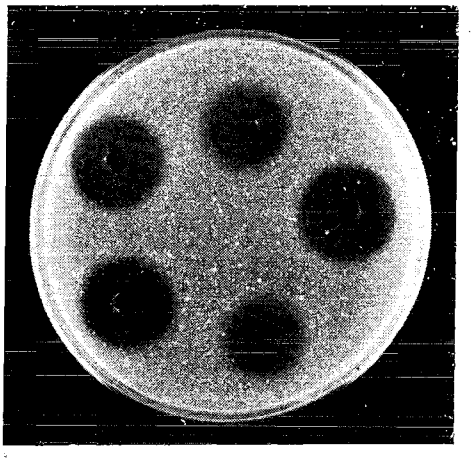

Fig. 2. — Penicilinograma de cinco cepas, del tipo C, procedentes de aislamientos monocelulares.

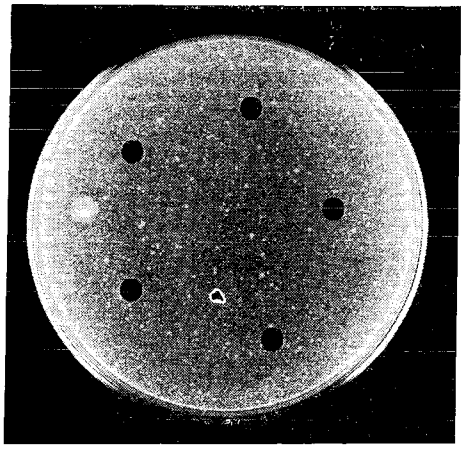

Fig. 3. — Penicilonograma de cinco cepas, del tipo M, procedentes de aislamientos monocelulares.

homocariótico poseyera un factor letal para la actividad penicilinógena como ciertos homozigotes entre los metafitos y metazoarios. Las anastomosis vegetativas se opondrían a la persistencia de estos factores letales.

La actividad penicilinógena en el tipo C de *Pen. notatum* presenta una curva continua de variabilidad que, representada gráficamente, disponiendo en el eje de las abscisas el diámetro de la inhibición en placas de Petri y en el de las ordenadas el número de individuos, nos da una curva en forma de campana típica con el pico correspondiendo a una zona de 21 a 22 mm. de inhibición para la cepa Fleming y a 14 mm. para la cepa autoctona nº 56. Sin embargo el examen parcial de los cultivos nos había hecho pensar que la cepa nº 56 era más activa.

El factor que condiciona la actividad penicilinógena parece ser, también, capaz de separación independiente como parece indicarlo el resultado del estudio de 50 cultivos monocelulares del tipo C. de la cepa Fleming en la que hemos obtenido 1/4 de individuos inactivos y 3/4 activos. En el tipo C sería éste un factor dominante.

Finalmente en apoyo de nuestra creencia de que la actividad penicilinógena está ligada a un factor o gene, mencionaremos el hecho de que, en ocasiones, el efecto normal de un gene solamente se manifiesta en ciertas condiciones de medio. Por ej. *Primula sinensia rubra* da flores rojas a 15-20º y blancas a 30-35º, el *Penicillium notatum* C produce penicilina a 24° y no la produce a 30° C.

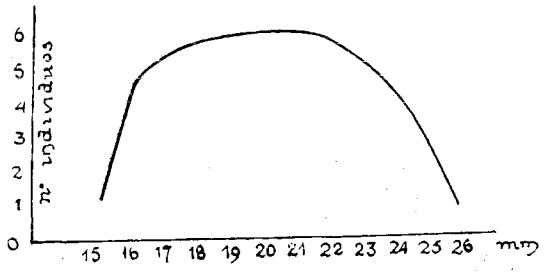

Fig. 4. - Penicilinograma de 6 cultivos monocelulares de *P. notatum*, tipo C. Se traduce por una curva de variabilidad continua.

Por los hechos expuestos y analizados creemos pues que la actividad penicilinógena está ligada a la esporulación del *P. notatum* y que continuando los aislamientos unicelulares podremos llegar a seleccionar un tipo C de mayor actividad aún, haciendo desplazar hacia la derecha la curva de variación. Pero una vez conseguida debemos esforzarnos en conservarla. La especie como el individuo nace, crece, envejece y muere. Cómo nació la genoespecie penicilinógena es difícil decirlo, tal vez por algunos de los mecanismos naturales y artificiales ya mencionados y podría persistir indefinidamen-

te si ningún agente exterior viniera a perturbar el equilibrio delicado de su sistema nuclear.

Nuestro trabajo viene a confirmar el resultado de las investigaciones de Hansen y Snyder ([11]), publicación que llegó recientemente a nuestras manos cuando ya teníamos casi finalizado nuestro estudio.

RESUMEN

Los aislamientos unicelulares de tres cepas de *Penicillium notatum*: una cepa Fleming y dos autoctonas (nº 38 y 56) nos ha permitido comprobar que la cepa nº 38 era heterotípica pues contenía dos factores M y C capaces de segregación independiente. El factor M es dominante.

Las cepas híbridas se mantienen indefinidamente por los transplantes en masa en el laboratorio y tal vez en la naturaleza por la fusión vegetativa de las hifas.

La actividad penicilinógena del *P. notatum* está asociada a los factores M y C. El tipo M puro carece de actividad penicilinógena y el tipo C presenta una curva de variabilidad continua de la actividad penicilinógena.

BIBLIOGRAFÍA

1. HANSEN, H. N. — The dual phenomenon in Imperfect Fungi. Mycologia, **30**, 1938, 4, 442-445.
2. HANSEN, *E. Chr.* — Gesammelte theoretische Abhandlungen über Garungsorganismen, Jena, 1911.
3. BARNES, B. — Presidential addrees. Induced variation. Trans. Brit. Myc. Soc., **20**, 1935, P. I., 17-32.
4. DIMOCK, A. W. — Hybridization studies on a zinc-induced variant *of Hypomyces ipomoeae*. Mycologia, **29**, 1937, 3, 273-285.
5. PHILIPPOV, G. — De la formation de nouvelles races stables hez les hampignons inferieures sous l'influene des rayons X. C. R. Ac. Science, **188**, 1929, 1566.
6. NADSON, G. A. — Sur les variations hereditaires provoquées expérimentalement chez les levures. C. R. Ac. Sciences, **200**, 1935, 1875.
7. CALDIS, P. D. y COONS, G. R. — Achromatic variation in pathogenic fungi. Papers of Michigan Ac. of Sc. Arts and Letters, **6**, 1926, 189-236. Ref.: Bull. Inst. Pasteur, **25**, 1927, 938 939.
8. GREENE, H. C. — Variation in single spore cultures of *Aspergillus fischeri*. Mycologia, **25**, 1933, 2, 117-138.
9. GÓMEZ DE CISNEROS, J. M. — Meccanismo, specificita e significato biologico delle anastomosi nelle ife dei dermatofiti. Atti Ist. Bot. "G. Briosi" e labor. Grittog., Pavia, **5**, 1933, 45-75.
10. BAILEY, L. H. — Statements on the systematic studies of variables Proc. Plant Sec, **2**, 1926, 1427-1433.
11. HANSEN, H. N. — SNYDER, W. C. — Relation of dual phenomenon in *Penicillium notatum* to penicillin production. Science, **99**, 1944, 2570, 264-265.
12. ERRERA, L. — Heredite d'un cractere acquis chez un champignon pluricellulaire, d'apres les experiences de M. le Dr. Hunger. Ref.: Bull. Soc. Myc. France, **15**, 1899, 263-264.

te si ningún agente exterior viniera a perturbar el equilibrio delicado de su sistema nuclear.

Nuestro trabajo viene a confirmar el resultado de las investigaciones de Hansen y Snyder ([11]), publicación que llegó recientemente a nuestras manos cuando ya teníamos casi finalizado nuestro estudio.

RESUMEN

Los aislamientos unicelulares de tres cepas de *Penicillium notatum*: una cepa Fleming y dos autoctonas (nº 38 y 56) nos ha permitido comprobar que la cepa nº 38 era heterotípica pues contenía dos factores M y C capaces de segregación independiente. El factor M es dominante.

Las cepas híbridas se mantienen indefinidamente por los transplantes en masa en el laboratorio y tal vez en la naturaleza por la fusión vegetativa de las hifas.

La actividad penicilinógena del *P. notatum* está asociada a los factores M y C. El tipo M puro carece de actividad penicilinógena y el tipo C presenta una curva de variabilidad continua de la actividad penicilinógena.

BIBLIOGRAFÍA

1. HANSEN, H. N. — The dual phenomenon in Imperfect Fungi. Mycologia, **30**, 1938, 4, 442-445.
2. HANSEN, *E. Chr.* — Gesammelte theoretische Abhandlungen über Garungsorganismen, Jena, 1911.
3. BARNES, B. — Presidential addrees. Induced variation. Trans. Brit. Myc. Soc., **20**, 1935, P. I., 17-32.
4. DIMOCK, A. W. — Hybridization studies on a zinc-induced variant *of Hypomyces ipomoeae*. Mycologia, **29**, 1937, 3, 273-285.
5. PHILIPPOV, G. — De la formation de nouvelles races stables hez les hampignons inferieures sous l'influene des rayons X. C. R. Ac. Science, **188**, 1929, 1566.
6. NADSON, G. A. — Sur les variations hereditaires provoquées expérimentalement chez les levures. C. R. Ac. Sciences, **200**, 1935, 1875.
7. CALDIS, P. D. y COONS, G. R. — Achromatic variation in pathogenic fungi. Papers of Michigan Ac. of Sc. Arts and Letters, **6**, 1926, 189-236. Ref.: Bull. Inst. Pasteur, **25**, 1927, 938-939.
8. GREENE, H. C. — Variation in single spore cultures of *Aspergillus fischeri*. Mycologia, **25**, 1933, 2, 117-138.
9. GÓMEZ DE CISNEROS, J. M. — Meccanismo, specificita e significato biologico delle anastomosi nelle ife dei dermatofiti. Atti Ist. Bot. "G. Briosi" e labor. Grittog., Pavia, **5**, 1933, 45-75.
10. BAILEY, L. H. — Statements on the systematic studies of variables Proc. Plant Sec, **2**, 1926, 1427-1433.
11. HANSEN, H. N. — SNYDER, W. C. — Relation of dual phenomenon in *Penicillium notatum* to penicillin production. Science, **99**, 1944, 2570, 264-265.
12. ERRERA, L. — Heredite d'un cractere acquis chez un champignon pluricellulaire, d'apres les experiences de M. le Dr. Hunger. Ref.: Bull. Soc. Myc. France, **15**, 1899, 263-264.

homocariótico poseyera un factor letal para la actividad penicilinógena como ciertos homozigotes entre los metafitos y metazoarios. Las anastomosis vegetativas se opondrían a la persistencia de estos factores letales.

La actividad penicilinógena en el tipo C de *Pen. notatum* presenta una curva continua de variabilidad que, representada gráficamente, disponiendo en el eje de las abscisas el diámetro de la inhibición en placas de Petri y en el de las ordenadas el número de individuos, nos da una curva en forma de campana típica con el pico correspondiendo a una zona de 21 a 22 mm. de inhibición para la cepa Fleming y a 14 mm. para la cepa autoctona nº 56. Sin embargo el examen parcial de los cultivos nos había hecho pensar que la cepa nº 56 era más activa.

El factor que condiciona la actividad penicilinógena parece ser, también, capaz de separación independiente como parece indicarlo el resultado del estudio de 50 cultivos monocelulares del tipo C. de la cepa Fleming en la que hemos obtenido 1/4 de individuos inactivos y 3/4 activos. En el tipo C sería éste un factor dominante.

Finalmente en apoyo de nuestra creencia de que la actividad penicilinógena está ligada a un factor o gene, mencionaremos el hecho de que, en ocasiones, el efecto normal de un gene solamente se manifiesta en ciertas condiciones de medio. Por ej. *Primula sinensia rubra* da flores rojas a 15-20º y blancas a 30-35º, el *Penicillium notatum* C produce penicilina a 24º y no la produce a 30º C.

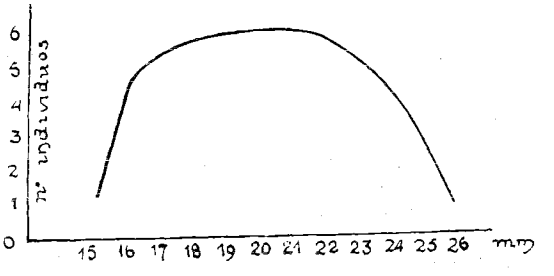

Fig. 4. - Penicilinograma de 6 cultivos monocelulares de *P. notatum*, tipo C. Se traduce por una curva de variabilidad continua.

Por los hechos expuestos y analizados creemos pues que la actividad penicilinógena está ligada a la esporulación del *P. notatum* y que continuando los aislamientos unicelulares podremos llegar a seleccionar un tipo C de mayor actividad aún, haciendo desplazar hacia la derecha la curva de variación. Pero una vez conseguida debemos esforzarnos en conservarla. La especie como el individuo nace, crece, envejece y muere. Cómo nació la genoespecie penicilinógena es difícil decirlo, tal vez por algunos de los mecanismos naturales y artificiales ya mencionados y podría persistir indefinidamen-

13. BEAUVERIE, J. — Etude sur le polymorphisme des champignons. Influence du milieu. Paris, Lyon, 1900.
14. KRASAN. DE GRAZ. — Varieté, race, modification. C. R. 1er. Congr. Internat. Bot., París, 1900, 367-369.
15. VRIES. H. DE. — Variabilité et instabilité. Id., pp. 1-6.
16. BRIERLEY, W. B. — Discussion on mutation of species. Brit. Med. J., 1922, 3225, 722-726.
17. BRIERLEY, W. B. — Variation in fungi and bacteria. Proc. Internat. Congr. Plant Sc., **2**, 1929, 1629-1654.
18. MITRA, M. — Saltation in the genus Helminthosporium. Trans. Brit. Myc. Soc,. **16**, 1931, p. II-III, 115-127.
19. EMMONS, C. W. — Pleomorphism and variation in the dermatophyes. Arch. of Dermat. & Syph., **24**, 1932, 6, 986-1001.
20. KARRENBERG, UBER. — Variabilitatserscheinungen bei pathogenen Hautpilzen. Dedmat. Zeitscr., **63**, 1932, 4, 230.
21. FABIAN, F. W. y MC CULLOUGH, N. B. — Dissotiation in yeasts. J. of Bact., **27**, 1934, 583.
22. HIROE, I. — Experimental studies on the saltation in fungi. Rel.: The Rev. ol Appl. Myc., **14**, 1935, P. 8, 528.
23. NEGRONI, P. — Variantes provocadas de Myc. albicans. Rev. Inst. Bact., **7**, 1936, 3, 393-409.
24. DAS GUPTA. — Saltation in fungi. Ref.: Rev. of Appl. Myc., **16**, 1937, P. 3, 200.
25. IMLER, L. — L'espece et sa variété en mycologie. Bull. Soc. Myc. France, **50**, 1934, 30-36 y **52**, 1936, 300-304.
26. MACKINNON, J. E. — Nuevo sentido de variación en Myc. albicans. Arch. Soc. Biol. Montevideo, **7**, 1936, 3, 162-188.
27. HRUSZEK, H. — Mutationserscheinungen des Trichophyton gypseum persicolor auf hormonhaltigen (Insulin) Nahrboden. Dermat. Woch., **104**, 1937, 23, 689.
28. BESTA, B. — Il fenomeno della dissociazione in uno stipita di "Mycotorula albicans". Mycopathologia, **1**, 1938, 41-52.
29. CAVALLERO, C. — Fenomeni di variazione e di dissociazione nei miceti lievitiformi. Id., 227-266.
30. NEGRONI, P. y LOIZAGA, D. — Accion in vitro de los colorantes sobre la morfologia y biología de Myc. albicans. Rev. Arg. Dermatosif., **22**, 1938, 556-561.
31. REDAELLI, P. CIFERRI, R. y CAVALLERO, C. — Un'ipotesi sull'eterosmosi dei lieviti in repporto alla dissociazione. Mycopathologia, **2**, 1939, 12-27.
32. SNYDER, W. C. y HANSEN, H. N. — The importance of variation in the taxonomy of fungi. Ref.: Rev. Appl. Myc., **21**, 1942, 306.
33. HOLLANDER, A. y EMMONS, C. W. — Wavelenght dependence of mutation production in the ultraviolet with special emprasis on fungi. C. Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **9**, 1941, 179-186.
34. SALVIN, S. B. — Varations of species and varietal character induced in an isolate of Brevilegnia. Mycologia, **34**, 1942, 1, 38-51.
35. QUINTANILHA, A. — Etude génétique du phénomene de Buller. Ref.: Rev. Appl. Myc., **21**, 1942, 301.