DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA
Diretor: Prof. Dr. Metry Bacila

EFEITO DA NISTATINA E DA ANFOTERICINA B NA INDUÇÃO DE MUTANTES DEFICIENTES RESPIRATÓRIOS (RD) DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* *

(THE EFFECT OF NYSTATIN AND AMPHOTERICIN B ON THE INDUCTION OF RESPIRATORY DEFICIENT MUTANTS (RD) FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*)

JUAREZ BRAZ DE FARIA **

SÉRGIO OLAVO PINTO DA COSTA
Prof. Assistente Doutor

INTRODUÇÃO

MOAT *et al.* (1959) utilizaram a variação de toxicidade sobre leveduras prototróficas, com o interesse de isolar mutantes de culturas contendo mistura de prototróficos e de auxotróficos deficientes para a síntese da adenina.

Tal técnica é análoga ao método de enriquecimento da penicilina descrito por LEDERBERG e ZINDER (1948) e DAVIS (1948), empregado para o isolamento de bactérias auxotróficas. Entre esses antimicóticos figuravam a nistatina, a anfotericina A, a anfotericina B, a actidione, a filipina, a endomicina, a fungicromicina, a cadicitina e hexil e heptil ésteres do ácido p-hidroxibenzênico. Verificou-se que a endomicina e a anfotericina B inibiam fortemente as células prototróficas permitindo o crescimento de células auxotróficas. Contudo, esses antibióticos também produziam mutantes com deficiência respiratória semelhante aos descritos por EPHRUSSI *et al.* (1949) e que eram mais resistentes aos antibióticos do que as células prototróficas sem a deficiência respiratória e cresciam tão bem quanto as auxotróficas.

Algumas referências foram feitas em relação ao mecanismo de ação antimicótica da nistatina (GOTTLIER *et al.* (1958)) e à ação sobre membranas de leveduras (LAMPEN *et al.* (1959; 1960; 1962; 1966)). Contudo não foram feitas referências em relação ao modo pelos quais a nistatina e a anfotericina B produzem mutantes

* Trabalho realizado com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) e do Projeto FUNTEC N.º 31, do Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico.

** Bolsista da CAPES.

deficientes respiratórios. Dado o particular interesse do problema, foram investigados a concentração ótima das drogas, necessárias para induzir os referidos mutantes em população conhecida, bem como testar os referidos mutantes para caracterização da deficiência respiratória utilizando a técnica do crescimento diferencial em meios contendo substratos respiráveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi estudado o comportamento da *Saccharomyces cerevisiae*, 1203 da Micoteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram ensaiados os antibióticos nistatina e anfotericina B (Laboratório Squibb Indústria Química S.A.). A solução de anfotericina B foi obtida dissolvendo o antibiótico em dimetil formamida acidulada na proporção de 60-80 mg/ml e completando o volume em solução de glicose 5% esterilizada. A solução de nistatina foi obtida dissolvendo o antibiótico em formamida na proporção de 20 mg/ml e completando o volume em água destilada esterilizada. A concentração ideal da droga foi determinada com um inóculo cultivado em meio de NAGAI, 1963 (peptona, 0,15%; extrato de levedura, 0,15%; KH_2PO_4 , 0,15%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,15%; MgSO_4 , 0,10%; glicose, 2,0%), por 48 horas a 30°, com absorbância de 2,0 (550 nm); utilizando-se 0,025 ml dessa cultura, obteve-se um número de células aproximado de $2,0 \times 10^8$ por ml em sistema constituído de 5,0 ml de caldo de Nagai adicionado de concentrações decrescentes da droga, que variaram de $1,0 \times 10^{-4}\text{M}$ até $3,7 \times 10^{-5}\text{M}$ para anfotericina B e de $1,1 \times 10^{-4}\text{M}$ até $4,0 \times 10^{-5}\text{M}$ para a nistatina e os resultados foram anotados com 24 horas e 48 horas de cultivo. A diferenciação de colônias normais e mutantes a partir de amostras representativas de cada concentração foi feita por semeadura em placas contendo meio de Nagai sólido (1,4% de agar). Após 72 horas de crescimento procedeu-se a essa diferenciação pelo teste do cloreto de 2, 3, 5, trifenil-tetrazólio (TTC), de acordo com OGUR *et al.* (1957), que consiste essencialmente em depositar uma camada de agar de Nagai semi-sólido (0,7%) contendo 1 mg/ml de TTC e 5,0 ml de glicose sobre as placas portadoras das colônias. Após 1 a 3 horas, as colônias normais são facilmente distinguidas das mutantes por reduzirem o TTC com formação de formazana corando-se de vermelho, em contraste com as colônias mutantes que são brancas e menores.

A caracterização dos mutantes deficientes respiratórios obtidos foi feita através do crescimento diferencial em meios contendo substrato respirável: meio de lactato segundo OGUR e St. JOHN (1956): peptona, 0,35%; extrato de levedura, 0,30%; KH_2PO_4 , 0,20%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,10%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,10%; lactato de sódio, 1% final; agar, 0,30%; pH 5,5. Meio gli-

cerol por NAGAI e NAGAI (1958): glicerina, 2,0 ml; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05%; KH_2PO_4 , 0,10%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,15%; peptona, 0,18%; extrato de levedura seco, 0,20%. Meio acetato, segundo OGUR *et al.* (1954): glicose, 0,02%; KH_2PO_4 , 0,005%; peptona, 0,02%; acetato de sódio, 0,04%; extrato de levedura, 0,02%; traços de metais ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,27 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,883 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,253 mg; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,99 mg; H_2O destilada, 100 ml), 0,01%; vermelho de fenol, solução 0,1%, 0,3 ml, pH 6,5.

A caracterização da deficiência respiratória em meio lactato consistiu em semeadura por esgotamento de alça de suspensão de deficientes respiratórios, previamente cultivados em tubos com 5,0 ml de meio de Nagai, por 48 horas a 30°; as linhagens foram lavadas duas vezes em tampão fosfato, pH 7,0 e ressuspensas em 2 ml de tampão fosfato. Em meio glicerol, foi semeado 0,1 ml de suspensão em tubos contendo 5,0 ml desse meio, por 48 horas a 30°. Em meio acetado foi semeado 1,0 ml da suspensão em erlenmeyer contendo 40 ml desse meio e cultivados por 48 horas com agitação a 30°. A finalidade do inóculo pesado está relacionada com a maior alcalinização do meio, suficiente para alterar a cor do indicador.

RESULTADOS

Efeito da anfotericina B na obtenção de mutantes deficientes respiratórios. Houve inibição total do crescimento celular dos cultivos incubados com a droga nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5}\text{M}$ a $2,5 \times 10^{-6}\text{M}$. A partir de $1,2 \times 10^{-6}\text{M}$ até $3,7 \times 10^{-8}\text{M}$ da droga, notou-se diminuição no efeito letal, efeito esse que decrescia à medida que a concentração diminuía. Verificou-se maior ação da droga na obtenção dos mutantes nas concentrações de $3,1 \times 10^{-7}\text{M}$ e $3,0 \times 10^{-7}\text{M}$, quando a viabilidade da população diminuiu aproximadamente de 10^5 células em relação ao crescimento verificado na ausência da droga (Tabela I). Nas mesmas concentrações, mas com 48 horas de ação da droga, verificou-se também inibição total do crescimento celular dos cultivos incubados com a droga nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5}\text{M}$ a $2,5 \times 10^{-6}\text{M}$. Houve maior eficiência da droga na produção de mutantes em concentrações de $3,1 \times 10^{-7}\text{M}$ e $3,0 \times 10^{-7}\text{M}$.

Efeito da nistatina na obtenção de mutantes deficientes respiratórios. Houve inibição total do crescimento em concentrações de $1,1 \times 10^{-7}\text{M}$ e $5,5 \times 10^{-6}\text{M}$ da droga. A partir da concentração de $2,7 \times 10^{-6}\text{M}$ até $4,0 \times 10^{-8}\text{M}$, foi verificado contínuo aumento no crescimento de células normais. Constatou-se maior obtenção de mutantes deficientes respiratórios na concentração de $2,7 \times 10^{-6}\text{M}$ da droga, quando se notou queda da viabilidade da população correspondente a aproximadamente 10^5 células (Tabela II).

TABELA I — Obtenção de mutantes com deficiência respiratória em *Saccharomyces cerevisiae* pela ação da anfotericina B

Anfotericina (M)	Células normais por ml	Proporção colônias mutantes/normais	Frequência de mutantes %
$1,0 \times 10^{-5}$	0	0	0
$5,0 \times 10^{-6}$	0	0	0
$2,5 \times 10^{-6}$	0	0	0
$1,2 \times 10^{-6}$	$9,1 \times 10^2$	11:274	3,86
$6,0 \times 10^{-7}$	$3,0 \times 10^3$	220:921	19,28
$3,1 \times 10^{-7}$	$7,2 \times 10^3$	1070:2895	26,90
$3,0 \times 10^{-7}$	$8,5 \times 10^3$	894:2000	30,89
$1,55 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^4$	484:5089	8,66
$1,50 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^6$	62:2983	2,03
$7,5 \times 10^{-8}$	$1,5 \times 10^8$	3:3631	0,084
$3,7 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^8$	8:3675	0,21
zero	$2,8 \times 10^8$	7:4138	0,16

Foram semeados 0,025 ml de uma cultura desenvolvida a 30° por 48 horas (Absorbância = 2,0), em cada tubo contendo 5,0 ml de meio líquido de Nagai, dando uma população final aproximada de $2,0 \times 10^6$ células por ml. As concentrações da droga no sistema variavam de $1,0 \times 10^{-5}$ M a $3,7 \times 10^{-8}$ M. As contagens foram feitas após 24 horas de cultivo. A diferenciação de células normais e mutantes foi feita pela técnica do TTC em camada de agar semi-sólido.

em relação ao crescimento verificado na ausência da droga. Houve produção de mutantes deficientes respiratórios para a concentração de $1,3 \times 10^{-6}$ M da droga, porém, com eficiência inferior em relação à produção obtida com a concentração de $2,7 \times 10^{-6}$ M. Com 48 horas de ação da droga houve semelhantes ações, na letal, e na ação indutora, em relação ao ocorrido em 24 horas de ação.

TABELA II — Obtenção de mutantes deficientes respiratórios em *Saccharomyces cerevisiae* pela ação da anfotericina B

Anfotericina B (M)	Células normais por ml	Proporção colônias mutantes/normais	Frequência de mutantes (%)
$1,0 \times 10^{-5}$	0	0	0
$5,0 \times 10^{-6}$	0	0	0
$2,5 \times 10^{-6}$	0	0	0
$1,2 \times 10^{-6}$	$6,0 \times 10^1$	2:50	3,84
$6,0 \times 10^{-7}$	$2,8 \times 10^2$	80:146	3,54
$3,1 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^4$	2842:3463	45,07
$3,0 \times 10^{-7}$	$2,4 \times 10^4$	1118:1307	46,10
$1,55 \times 10^{-7}$	$7,9 \times 10^6$	120:1580	7,06
$1,50 \times 10^{-7}$	$1,5 \times 10^7$	50:2338	2,09
$7,5 \times 10^{-8}$	$2,3 \times 10^7$	4:532	0,74
$3,7 \times 10^{-8}$	$1,6 \times 10^7$	1:666	0,15
zero	$3,0 \times 10^8$	1:246	0,40

Foram semeados 0,025 ml de de uma cultura desenvolvida a 30° durante 48 horas (Absorbância: 2,0), em cada tubo contendo 5,0 ml de meio líquido de Nagai, dando uma população final de $2,0 \times 10^6$ células por ml. As concentrações da droga no sistema variaram de $1,0 \times 10^{-5}$ M a $3,7 \times 10^{-8}$ M. As contagens foram feitas após 48 horas de cultivo. A diferenciação de células normais e mutantes foi feita pela técnica do TTC em camada de agar semi-sólido.

TABELA III — Obtenção de mutantes deficientes respiratórios em *Saccharomyces cerevisiae* pela ação da nistatina

Nistatina (M)	Células normais por ml	Proporção colônias mutantes/normais	Frequência de mutantes (%)
$1,1 \times 10^{-5}$	0	0	0
$5,5 \times 10^{-6}$	0	0	0
$2,7 \times 10^{-6}$	$1,39 \times 10^3$	603:456	56,97
$1,3 \times 10^{-6}$	$1,20 \times 10^4$	1139:4883	18,91
$6,5 \times 10^{-7}$	$2,00 \times 10^6$	12:3166	0,37
$3,2 \times 10^{-7}$	$2,30 \times 10^7$	3:4883	0,06
$1,6 \times 10^{-7}$	$1,20 \times 10^8$	2:270	0,73
$8,0 \times 10^{-8}$	$2,00 \times 10^8$	4:457	0,86
$4,0 \times 10^{-8}$	$2,10 \times 10^8$	2:475	0,42
zero	$2,60 \times 10^8$	12:3383	0,35

Foram semeados 0,025 ml de uma cultura desenvolvida a 30° durante 48 horas (Absorbância: 2,0), em cada tubo contendo 5,0 ml de meio de Nagai, com uma população final aproximada de $2,0 \times 10^6$ células por ml, variando as concentrações da droga de $1,1 \times 10^{-5}$ M a $4,0 \times 10^{-8}$ M. A diferenciação de células normais e mutantes foi pela técnica do TTC em camada de agar semi-sólido.

TABELA IV — Obtenção de mutantes deficientes respiratórios em *Saccharomyces cerevisiae* pela ação da nistatina

Nistatina (M)	Células normais por ml	Proporção colônias mutantes/normais	Frequência de mutantes (%)
$1,1 \times 10^{-5}$	0	0	0
$5,5 \times 10^{-6}$	0	0	0
$2,7 \times 10^{-6}$	$2,8 \times 10^2$	123:112	52,34
$1,3 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^4$	667:2060	24,45
$6,5 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^8$	14:2852	0,48
$3,2 \times 10^{-7}$	$7,7 \times 10^7$	5:1751	0,28
$1,6 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^8$	6:3245	0,18
$8,0 \times 10^{-8}$	$1,9 \times 10^8$	2:2569	0,07
$4,0 \times 10^{-8}$	$1,6 \times 10^8$	0:2953	0
zero	$3,2 \times 10^8$	2:2410	0,08

Foram semeados 0,025 ml de uma cultura desenvolvida a 30° durante 48 horas de cultivo (Absorbância: 2,0), em tubos contendo 5,0 ml de meio líquido de Nagai, com a população final aproximada de $2,0 \times 10^6$ células por ml, variando as concentrações da droga de $1,1 \times 10^{-5}$ M a $4,0 \times 10^{-8}$ M. Foi feita a contagem após 48 horas de cultivo. A diferenciação de células normais e mutantes foi feita pela técnica do TTC em camada de agar semi-sólido.

Caracterização dos deficientes respiratórios. Após 48 horas de cultivo nos meios diferenciais, foi levada a efeito a caracterização dos deficientes respiratórios. Observou-se que nas placas contendo o meio de lactato, nas quais foram semeadas as linhagens deficientes respiratórias não houve crescimento; em contraste quando semeada nesse meio a linhagem selvagem houve crescimento, podendo-se admitir de fato a deficiência respiratória nos mutantes obtidos, pois o não crescimento das mesmas em substrato respirável indica a deficiência respiratória. O mesmo aconteceu em relação ao meio glicerinado, havendo crescimento da linhagem selvagem e não crescimento das linhagens mutantes; com referência ao meio de acetato, verificou-se mudança de cor do indicador do meio em consequência do crescimento evidente da linhagem selvagem, com atividade respiratória intensa; os deficientes respiratórios com atividade respiratória deficiente não conseguiram alcalinizar o meio, portanto, não houve mudança de cor do indicador.

DISCUSSÃO

Existe direta relação entre as concentrações da anfotericina B e da nistatina e a produção de mutantes deficientes respiratórios em *Saccharomyces cerevisiae*. A produção dos mutantes ocorreu quando foram utilizadas as concentrações de $3,1 \times 10^{-7}M$ e $3,0 \times 10^{-7}M$ de anfotericina B e de $2,7 \times 10^{-6}M$ de nistatina. Nota-se que essas concentrações de anfotericina B estão situadas entre as concentrações de $1,0 \times 10^{-6}M$ a $2,5 \times 10^{-6}M$, correspondente à ação lesiva total sobre a população e as concentrações de $1,5 \times 10^{-7}M$ a $3,7 \times 10^{-8}M$ correspondentes à sua ineficácia sobre a população; a concentração indutora de nistatina está compreendida entre as concentrações de $1,1 \times 10^{-5}M$ e $5,5 \times 10^{-6}M$ correspondentes à sua lesão total sobre a população e as concentrações de $6,5 \times 10^{-7}M$ a $4,0 \times 10^{-8}M$ correspondentes à ação ineficaz sobre a população. Observou-se que grande parte da população celular, cerca de 10^5 células se tornaram inviáveis quando foram utilizadas as concentrações indutoras, concentrações essas dependentes do número de células presentes na população inicial. A grande inviabilidade celular e a alta frequência de mutantes produzidos faz supor que a transformação de células normais em mutantes deficientes respiratórios ocorra por lesão parcial da integridade celular. Os estudos da estrutura e das propriedades físico-químicas do DNA de grande número de organismos e dos componentes e propriedades do sistema de síntese protéica da mitocôndria que foram realizadas nesses últimos anos (SLATER *et al.*, 1968; ROODYN e WILKIE, 1968; NASS, 1967; BORST *et al.*, 1967; WORK *et al.*, 1968; WAGNER, 1969; NAS, 1969) tornaram altamente provável que o DNA da mitocôndria represente um segundo sistema genético da célula (NASS 1969). Seria de se considerar que os mutantes deficientes respiratórios tenham sua origem em decorrência de lesão única do apa-

relho genético da mitocôndria. Pode-se supor ocorrência de lesão inicial vinculada ao equipamento de citocromos situados na membrana mitocondrial. Entretanto, pode-se admitir, também, efeito direto das drogas mutagênicas sobre o DNA, que tem sido considerado também ligado a ela (NASS *et al.*, 1965; NASS, 1967; NASS, 1969), resultando em bloqueio da síntese de proteínas da membrana interna, não produzindo citocromos a, a₃, b e c₁ (STALER *et al.*, 1968; ROODYN e WILKIE, 1968; GIBOR e GRANICK, 1964). Uma consequência direta do efeito de indutores sobre o DNA mitocondrial foi referida por WOODWARD e MUNURES, (1966) e WOODWARD, (1968) e mrelação à proteína estrutural isolada da mitocôndria de um mutante citoplasmático “poky” de *Neurospora* contendo uma leve diferença na composição de aminoácidos (cisteína foi substituída pelo triptofano) quando comparada com a proteína do tipo selvagem.

Micrografias eletrônicas têm mostrado que mutantes deficientes respiratórios de leveduras contém membrana mitocondrial anormal (YOTSUYANAGAI, 1962a, 1962b e 1966). Por outro lado, o DNA de alguns mutantes citoplasmáticos além de diferir significamente na composição de base do DNA mitocondrial da levedura do tipo selvagem (MOUNOULOU *et al.*, 1966), tem sido referido como diminuído (TEWARI *et al.*, 1966) ou mesmo não detectável (MOUSTACCHI e WILLIAMSON, 1966; CORNEO *et al.*, 1966).

Dentro dessa lesão parcial, quando o agente indutor atuar somente na membrana, inibiria a respiração celular mas não teria efeito mutagênico e consequentemente não resultaria em mutação deficiente respiratório. Nesse caso, o conteúdo de citocromos estaria grandemetne influenciado pelo estado fisiológico das células, tais como na repressão pela glicose (SLONIMSKI, 1956) e na anaerobiose (GALZY e SLONIMSKI, 1957). A acriflavina inibe a síntese de enzimas respiratórias mas o seu efeito mutagênico ocasionando mutantes deficientes respiratórios não é total, originando “petite negativo” (De DEKEN, 1966; BULDER, 1964); a acriflavina atuaria em duas etapas: reprimindo a informação genética para a síntese dos citocromos e atuando como mutagênico especialmente sobre o DNA mitocondrial. De qualquer um desses estagios fisiológicos pode-se verificar volta ao estado normal ou o inverso, fixando-se como mutação.

SUMMARY

Respiratory defficient mutants from *Saccharomyess cerevisiae* were induced by nystatin and by amphotericin B. The highest yield of mutants was obtained at the concentration of 2.7×10^{-6} M for nystatin and 3.1×10^{-6} M for amphotericin B. It was found out that there is a relationship between the concentration of the inducing compounds and the number of cells per ml, in regard to the yield

of mutants obtained. The proper mutagenic concentrations of the inducing compounds were in the range between the lethal dosis and the ones which cause no appreciable effect in the cells.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOST, P.; KROON, A. M.; RUTTENBERG, G. T. C. M. — *Genetics elements: properties and functions*. New York, Academic Press, 1967.
2. BULDER, C. J. E. A. — Antoine vanLeeuwenhock, 30:1, 1964.
3. CORNEO, G.; MOORE, C.; SANADI, D. R.; GROSSMAN, L. I.; MARMUR, J. — Mitochondrial DNA in yeast and some mammalian species. *Science* 151:687-9, 1966.
4. DAVIS, B. D. — Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. *J. Amer. chem. Soc.* 70:4267, 1948.
5. De DEKEN, R. H. — The Crobtree effect and its relation to the petite mutation. *J. gen. Microbiol.* 44:157-65, 1966.
6. EPHRUSSI, B.; HUTTINGUER, H.; TAVLITZKI, J. — Action de l'acriflavine sur les levures. II. Étude génétique du mutant "petite colonie". *Ann. Inst. Pasteur*, 76:419-50, 1949.
7. GALZY, P. P. & SLONIMSKI, P. P. — Evolution de la constitution enzymatique de la levure cultivée sur l'acide lactique ou sur glucose comme seule source de carbone. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 245:2556-8, 1957.
8. GIBOR, A. & GRANICK, S. — Plastids and mitochondria: inheritable systems. *Science* 145:890-7, 1964.
9. GOTTLIEB, D.; CARTER, H. E.; SLONEKER, J. H.; AMMANN, A. — Protection of fungi against polyene antibiotics by sterols. *Science* 128:361, 1958.
10. LAMPEN, J. O.; MORGAN, E. R.; SLOCUM, A.; ARNOW, P. — Absorption of nystatin by microorganisms. *J. Bact.* 78:282-9, 1959.
11. LAMPEN, J. O.; ARNOW, P. M.; SAFFERMAN, R. S. — Mechanism of protection by sterols against polyene antibiotics. *J. Bact.* 80:200-6, 1960.
12. LAMPEN, J. O.; ARNOW, P. M.; BOROWSKA, Z.; LASPIN, A. I. — Location and role of sterol at nystatin-binding sites. *J. Bact.* 80:1152-60, 1962.
13. LAMPEN, J. O. — Interference by polyene anti-fungal antibiotics (specially nystatin and filipin) with specific membrane functions. *Symp. Soc. gen. Microbiol.* 16:111-30, 1966.
14. LEDERBERG, J. & ZINDER, N. — Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin. *J. Amer. chem. Soc.* 70:4267, 1948.
15. MOAT, A. G.; PETERS, N., Jr.; SRB, A. M. — Selection and isolation of auxotrophic yeast mutants with the aid of antibiotics. *J. Bact.* 77:673-7, 1959.

16. MOUNOLOU, J. C.; JAKOB, H.; SLONIMSKI, P. P. — Mitochondrial DNA from yeast "petite" mutants specific changes of buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24(2):218-24, 1966.
17. MOUSTACCHI, E. & WILLIAMSON, D. H. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24:2. Apud NASS, M. M. K. — Mitochondrial DNA: advances problems, and goals. *Science* 165:25-35, 1969, 1966.
18. NAGAI, S. & NAGAI, H. — Demonstration of the induction of respiration deficiency in yeast by acriflavine. *Experientia* 14:321-3, 1958.
19. NAGAI, S. — Diagnostic colar differentiation plates for heredity respiration deficiency in yeast. *J. Bact.* 86:299-302, 1963.
20. NASS, M. M. K.; NASS, S.; AFZELIUS, B. A. — The general occurrence of mitochondrial DNA. *Exp. Cell. Res.* 37:516-39, 1965.
21. NASS, M. M. K. — In: VOGEL, H. J.; LAMPEN, J. O. & BRYSON, V. — *Organizational biosynthesis*. New York, Academic Press, 1967.
22. NASS, M. M. K. — Mitochondrial DNA: advances, problems and goals. *Science* 165:25-35, 1969.
23. OGUR, M.; LINDEGREN, G.; LINDEGREN, C. C. — A simple screening test for genetic studies of respiration deficiency in yeast. *J. Bact.* 68:391-2, 1954.
24. OGUR, M. & St. JOHN, R. — A differential and diagnostic plating method for population studies of respiratory deficiency in yeast. *J. Bact.* 72:500-4, 1956.
25. OGUR, M.; St. JOHN, R.; NAGAI, S. — Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science* 125: 928-9, 1957.
26. ROODYN, D. B. & WILKIE, D. — *The biogenesis of mitochondria*. London, Methuen & Co., 1968.
27. SLATER, E. C.; TAGER, J. M.; PAPA, S.; QUAGLIARELLO, eds. — *Round-table discussion on biological aspects of biogenesis of mitochondria*. Bari, Adriatica Editrice, 1968.
28. SLONIMSKI, P. P. — Adaptation respiratoire développement du système hémoproteique induit par l'oxygène. Brussels. *Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem.*, 1956, p. 242-252.
29. TEWARI, T. T.; VOTSCH, W.; MAHLER, H. R. — Biochemical correlates of respiratory deficiency. VI. Mitochondria DNA. *J. molec. Biol.* 20:453-81, 1966.
30. YOTSUYANAGI, Y. — Études sur le condriome de la levure. I. Variations de l'ultrastructure de condriome au cours de la croissance aérobie. *J. Ultrastruct. Res.* 7:121-40, 1962a.
31. YOTSUYANAGI, Y. — Études sur le condriome de la levure. II. Condriomes de mutants à déficience respiratoire. *J. Ultrastruct. Res.* 7: 141-58, 1962b.

32. YOTSUYANAGI, Y. — Un mode de differentiation de la membrane mitochondriale évoquant le mesosome bacterien. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* 262:1348-51, 1966.
33. WAGNER, R. P. — Genetics and phenogenetics of mitochondria. *Science* 163:1026-31, 1969.
34. WOODWARD, D. O. & MUNKRES, K. — Alterations of maternally inherited mitochondrial structural protein in respiratory deficient strains of *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55:872-880, 1966.
35. WOODWARD, D. O. — Functional and organization properties of *Neurospora* mitochondrial structural protein. *Fed. Proc.* 27(5):1167-73, 1968.
36. WORK, T. S.; COOTE, J. L.; ASHWELL, M. — Biogenesis of mitochondria. *Fed. Proc.* 27(5):1174-9, 1968.