

Badania autoradiograficzne nad wpływem światła na włączanie tymidyny³H do chloroplastów w różnych stadiach rozwojowych

*Recherches autoradiographiques sur l'influence de la lumière
sur l'incorporation de thymidine³H dans les chloroplastes
en différentes étapes du développement*

M. J. OLSZEWSKA, E. MIKULSKA

WSTĘP

Przez szereg lat dyskutowano problem występowania DNA w chloroplastach (ref. Sisakian i Odincova 1960; Granick 1961). Wydaje się, że rozbieżność uzyskiwanych wyników należy przypisać trudnościom metodycznym. Przy biochemicznej analizie izolowanych chloroplastów może nastąpić zanieczyszczenie ich frakcją jądrową; barwienia cytochemiczne (reakcja Feulgena, zieleń metylowa) struktur o nieznacznej zawartości DNA mogą być zawodne, a interpretacja wyników jest bardzo trudna.

Ukazujące się ostatnio prace biochemiczne nie tylko wykazują istnienie DNA w chloroplastach, ale także — dzięki udoskonaleniu metod badawczych — wnoszą bardzo istotne dowody, potwierdzające to odkrycie. Wykazano mianowicie, że skład nukleotydowy DNA chloroplastów różni się od składu nukleotydowego DNA jądrowego tej samej rośliny (Kirk 1963 a i b — u fasoli; Segher i Ishida 1963 — u *Chlamydomonas*). Na uwagę zasługuje również praca Gibora i Izawy (1963), którzy badali chloroplasty wyizolowane z bezjądrowych fragmentów *Acetabularia mediterranea* pochodzących z kultur sterylnych, dzięki czemu całkowicie zostało wyeliminowane niebezpieczeństwo zanieczyszczenia chloroplastów jądrami i drobnoustrojami.

Ilość DNA w chloroplastach jest bardzo nieznaczna; w przeliczeniu na 1 chloroplast wynosi ona od 10^{-13} mg u *Acetabularia* (Gibor i Izawa 1963) do 10^{-11} mg u *Chlamydomonas* (Segher i Ishida 1963), co odpowiada zawartości DNA u niektórych wirusów. Wg Iwamury (1962), światło wywiera stymulujący wpływ na metabolizm DNA chloroplastów u *Chlorella*.

W strukturach komórkowych DNA może być wykryty pośrednio, a mianowicie poprzez włączanie się specyficznego prekursora DNA — tymidyny. Metoda ta jednak daje wyniki pozytywne tylko pod warun-

kiem wystarczającej aktywności metabolicznej DNA. Włączanie tymidyny ^3H do chromatoforów *Spirogyra* stwierdzili Stocking i Gifford, 1959 (cyt. wg Gifforda 1960). Podobny wynik uzyskali Wollgiehn i Mothes u *Nicotiana* (1963). Tymidyna ^3H włącza się także do DNA chloroplastów liści *Clivia miniata* i *Bilbergia* sp. (Olszewska i Mikulska 1964).

W niniejszej pracy posługujemy się nadal metodą autoradiograficzną, która jest szczególnie korzystna w przypadku badania DNA chloroplastów. Technika ta pozwala na precyzyjne zlokalizowanie radioaktywności nad badanymi strukturami, a ponadto, przez przedłużanie ekspozycji autoradiogramów, można uzyskać odpowiednie zaczerwienie emulsji w miejscach włączania się prekursora radioaktywnego.

W obserwacjach naszych porównujemy intensywność włączania tymidyny ^3H do chloroplastów o różnym stopniu zróżnicowania oraz badamy wpływ światła na metabolizm DNA tych organoidów komórkowych.

MATERIAŁ I METODY

Obserwacje były przeprowadzane na tych samych obiektach, co poprzednio (Olszewska i Mikulska 1964), tj. na liściach *Clivia miniata* i *Bilbergia* sp. (*Monocotyledonae*). U obu gatunków rozwój chloroplastów i ich struktura zostały poznane w wyniku badań w mikroskopie optycznym (Mikulska 1960) i w mikroskopie elektronowym (Mikulska 1964).

Równoległe doświadczenia przeprowadzano na dwóch grupach roślin. Jedną rośliny przed inkubacją były umieszczone przez 4 dni w ciemności, po czym inkubację przeprowadzano również w ciemności. Kontrolę stanowiły rośliny rosnące w normalnych warunkach oświetlenia (w szklarni).

Liście podzielono na strefy długości ok. 2 cm, w zależności od stopnia zazielenienia (tablica I, fig. 1). W niniejszej pracy obserwacje przeprowadzałyśmy na chloroplastach strefy III (kolor liści słabozielony), strefy IV oraz strefy V, tj. szczytowej i najstarszej (w obu kolor liści intensywnie zielony).

Tymidynę ^3H w koncentracji $4\ \mu\text{C}$ i $0,078\ \mu\text{M}/\text{ml}$ dodawano do wody wodociągowej. W roztworze tym jednocześnie umieszczano pionowo kawałki liści pochodzące ze wszystkich badanych stref. W tych warunkach, po 8-godzinnej inkubacji, komórki mezofilu pozostawały żywe, widoczna w nich była cykloza.

Po inkubacji fragmenty liści utrwalano w mieszaninie alkoholu absolutnego i kwasu octowego lodowatego (3:1). Skrawki parafinowe, równoległe do powierzchni liścia, grubości $5\ \mu$, pokrywane były płynną emulsją Ilford L 4. Ekspozycja trwała 4 tygodnie dla liści *Clivia* i 6 tygodni dla

liści *Bilbergia*. Porównywane w każdej serii preparaty były jednocześnie pokrywane emulsją oraz jednocześnie, w tej samej kąpeli, wywoływane i utrwalane.

Preparaty kontrolne przed pokryciem emulsją były trawione desoksyrybonukleazą (1mg/ml) w ciągu 24 godzin w temperaturze 37°C.

BADANIA WŁASNE

W trakcie poprzednich obserwacji (Olszewska i Mikulska 1964) przeprowadzonych na najmłodszych strefach liści (strefa I i II, por. tablica I, fig. 1 i fig. 2a—2c) oraz w strefie zawierającej chloroplasty całkowicie zróżnicowane (strefa ta odpowiada obecnej strefie IV, tablica I, fig. 1 i 2 d) stwierdziłyśmy, że włączanie tymidyny ³H zachodzi dopiero w chloroplastach wykazujących w obrazach mikroskopu elektronowego zaczątki struktur lamelarnych gran (tablica I, fig. 2 c) (Mikulska 1964). Proplastydy włączają intensywnie fenyloalaninę ³H.

U obu gatunków w analogicznych strefach liścia ultrastruktura chloroplastów przedstawia się podobnie.

Plastydy III strefy liścia (kolor słabozielony) mają już rozmiary dojrziałych chloroplastów (tablica I, fig. 1 i 2c). Często zachowują jeszcze kształty amebowate. W mikroskopie elektronowym na przekroju podłużnym zaznacza się pod błoną warstwa przebiegająca równolegle do powierzchni plastydu, pozbawiona lamelarniej struktury, bogata w drobne, gęste dla elektronów ziarenka; jest to tzw. peristromium. W matriks pojawiają się pierwsze, nieliczne jeszcze grana. Obok nich występują drobne, gęste dla elektronów ziarenka i nieliczne osmofilne globule. W intensywnie zielonej IV i V strefie liścia chloroplasty są ostatecznie wykształcone i przedstawiają się podobnie w obu strefach (tablica I, fig. 1 i 2d). Posiadają one liczne grana połączone lamellami stromy, rozmieszczone w sposób charakterystyczny dla każdego gatunku. Chloroplasty *Clivia* zawierają krople tłuszczu, chloroplasty *Bilbergia* — po kilka ziaren skrobi (Mikulska 1960; Mikulska 1964).

W autoradiogramach chloroplastów *Clivia miniata* i *Bilbergia* sp. we wszystkich trzech strefach liści roślin rosnących na świetle lub w ciemności można stwierdzić pewne podobieństwa: obok chloroplastów silnie oznakowanych (np. u *Clivia* więcej, niż 20 zaczernionych ziarenek emulsji nad 1 chloroplastem), spotyka się chloroplasty zupełnie nieradioaktywne (tablica I, fig. 3a); obok komórek z chloroplastami oznakowanymi, spotyka się komórki z chloroplastami nieradioaktywnymi. Stosowana technika (płynna emulsja położona na przekroju komórek) wyklucza brak bezpośredniego kontaktu chloroplastów z emulsją, co mogłoby spowodować niewykrywanie przez nią radioaktywności. Różne oznakowanie chloroplastów jest więc wynikiem odmiennej intensywności włączania tymidyny ³H. Nie udało nam się stwierdzić prawidłowości

w rozmieszczeniu komórek z radioaktywnymi i nieradioaktywnymi chloroplastami na terenie mezofilu. Wydaje się, że intensywniej znakują się chloroplasty o stosunkowo małych rozmiarach, znajdujące się w pobliżu wiązek przewodzących. Fakt ten może być związany z lepszą penetracją tymidyny radioaktywnej. Zaczernione ziarenka emulsji nie występują, lub są nieliczne, ponad miejscami, gdzie w chloroplastach występują inkluzje (u *Clivia* — krople tłuszczu, u *Bilbergia* — skrobia, tablica I, fig. 4 a i b).

W preparatach poddanych działaniu dezoksyrybonukleazy chloroplasty były bądź zupełnie nieradioaktywne, bądź zawierały nieliczne zaczernione ziarenka emulsji (tablica I, fig. 3 b).

Tablica I

Fig. 1. Kolejne odcinki liścia *Clivia miniata* i *Bilbergia* sp., zawierające chloroplasty w różnych etapach rozwoju; strefa I — bezbarwna, strefa II — seledynowa, strefa III — bladozielona, strefa IV i V — zielone.

Les parties successives d'une feuille de *Clivia miniata* et *Bilbergia* sp. contenant des chloroplastes en différentes étapes du développement; zone I — incolore, zone II — blanche-verdâtre, zone III — verte-pâle, zone IV et V — vertes.

Fig. 2. Ultrastruktura chloroplastów *Clivia miniata* w różnych stadiach rozwoju; a — strefa I, proplastydy; b — strefa II, proplastydy; c — strefa III, chloroplasty w trakcie różnicowania; d — strefa IV i V, chloroplasty całkowicie zróżnicowane.

Evolution ultrastructurale des chloroplastes de *Clivia miniata*: a — zone I, proplastides; b — zone II, proplastides; c — zone III, chloroplastes en voie de différenciation; d — zone IV et V, chloroplastes entièrement développés.

Fig. 3a. Włączanie tymidyny ^3H do chloroplastów *Clivia miniata*, strefa IV.

Incorporation de la thymidine ^3H dans les chloroplastes de *Clivia miniata*, zone IV.

Fig. 3b. Autoradiogramy z tego samego materiału, ale trawione DNAazą

Autoradiogrammes du même matériel, les coupes soumises à l'action de la DNAase.

Fig. 4. Włączanie tymidyny ^3H do chloroplastów *Bilbergia* sp., strefa III; a — na świetle, b — w ciemności.

Incorporation de la thymidine ^3H dans les chloroplastes de *Bilbergia* sp., zone III; a — à la lumière, b — à l'obscurité.

Fig. 5. Włączanie tymidyny ^3H do chloroplastów *Bilbergia* sp., strefa IV; a — na świetle, b — w ciemności.

Incorporation de la thymidine ^3H dans les chloroplastes de *Bilbergia* sp., zone IV; a — à la lumière, b — à l'obscurité.

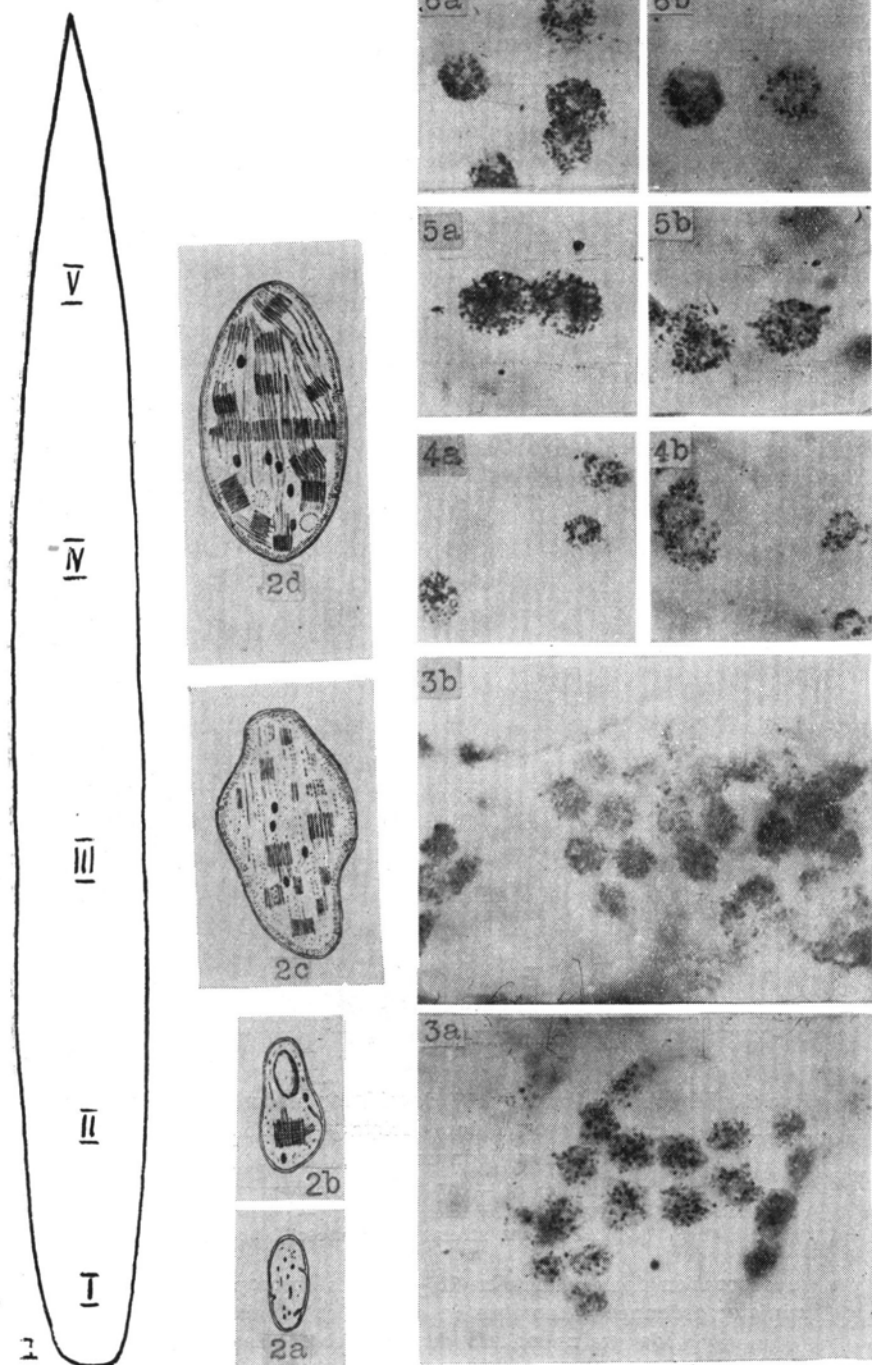
Fig. 6. Włączanie tymidyny ^3H do chloroplastów *Bilbergia* sp., strefa V; a — na świetle, b — w ciemności.

Incorporation de la thymidine ^3H dans les chloroplastes de *Bilbergia* sp., zone V; a — à la lumière, b — à l'obscurité.

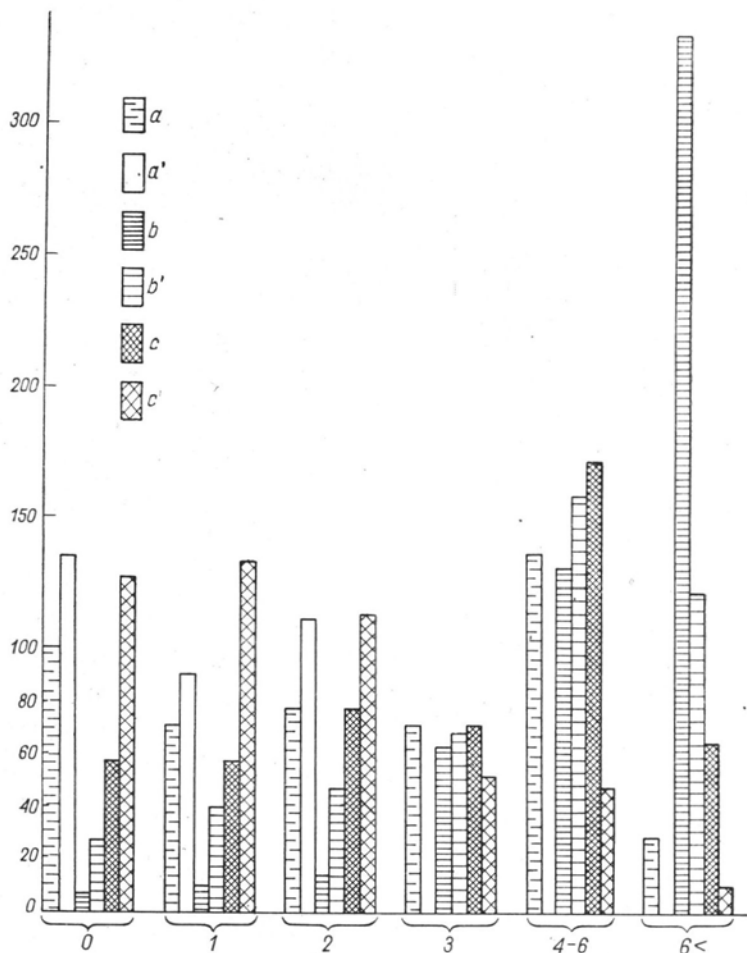
Fig. 3—6 pow. ok. 1000 X;

Fig. 3—6 agrand. env. 1000 X

Tablica I



Wobec idealnie czystego tła w autoradiogramach liści *Clivia* można było porównać ilościowo radioaktywność chloroplastów w poszczególnych częściach liści roślin zaciemnianych i pozostawionych na świetle. Liczyliśmy zaczernione ziarenka emulsji w co najmniej 500 chloroplastach każdej serii. Wyniki, przedstawione na ryc. 1 w postaci diagramu, nie



Ryc. 1. Włączanie tymidyny ^3H do chloroplastów *Clivia miniata*; rzędna — liczba chloroplastów, odcięta — liczba zaczernionych ziaren w jednym chloroplaste

a — III strefa na świetle; a' — III strefa w ciemności; b — IV strefa na świetle; b' — IV strefa w ciemności; c — V strefa na świetle; c' — V strefa w ciemności

Incorporation de la thymidine ^3H dans les chloroplastes de *Clivia miniata*; ordonnée — nombre de chloroplastes, abscisse — nombre de grains noirs dans un chloroplaste.

a — zone III à la lumière; a' — zone III à l'obscurité; b — zone IV à la lumière; b' — zone IV à l'obscurité; c — zone V à la lumière; c' — zone VI à l'obscurité

zostały opracowane statystycznie, ponieważ w bardzo radioaktywnych chloroplastach dokładnej liczby ziaren nie udało się ustalić.

U roślin rosnących na świetle większość chloroplastów strefy III jest bądź nieradioaktywna, bądź należy do klas o niskiej radioaktywności, tzn. zawiera 1, 2 lub 3 zaczernione ziarenka emulsji. W strefie IV większość chloroplastów należy do klasy o największej radioaktywności (powyżej 6 ziarenek). W strefie V maleje liczba chloroplastów silnie radioaktywnych, ale radioaktywność ich jest większa, niż w strefie III.

Zaciemnianie powoduje we wszystkich strefach wyraźny spadek radioaktywności chloroplastów. Stwierdza się przesunięcie liczebności poszczególnych klas w lewo, ku niższej radioaktywności. U roślin zaciemnianych zachowuje się prawidłowość w intensywności znakowania się chloroplastów poszczególnych stref: najmniej radioaktywne są chloroplasty strefy III, najbardziej — strefy IV.

Autoradiogramy liści *Bilbergia* sp. były dłużej ekspozowane, dzięki czemu ponad chloroplastami znajdowało się bardzo dużo zaczernionych ziarenek emulsji. Różnica między poszczególnymi strefami oraz między roślinami zaciemnianymi a rosnącymi na świetle była uderzająca i dała się uchwycić na zdjęciach (tablica I, fig. 4—6).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Brak radioaktywności w preparatach trawionych dezoksyrybonukleazą upoważnia do wniosku, że stwierdzone przez nas znakowanie się chloroplastów tymidyną ³H zachodzi wskutek włączania tego nukleozydu do DNA. Ze względu na charakter metody autoradiograficznej, różnice ilościowe wyrażające się liczbą zaczernionych ziaren w emulsji mogą być traktowane jedynie jako wskaźniki różnic w aktywności metabolicznej DNA, a nie jako wskaźniki bezwzględnej zawartości tego związku.

Aktywność metaboliczna DNA wzrasta w miarę osiągania przez chloroplasty dojrzałości strukturalnej. Największa aktywność charakteryzuje chloroplasty w pełni zróżnicowane (strefa IV), potem maleje ona w chloroplastach znajdujących się w szczytowych, najstarszych częściach liścia (strefa V). We wszystkich badanych strefach aktywność metaboliczna DNA chloroplastów poszczególnych komórek mezofilu, a także chloroplastów tej samej komórki jest odmienna. Nie można wykluczyć jako przyczyny tego faktu obumierania w trakcie inkubacji komórek, których chloroplasty nie były radioaktywne.

Dane nasze potwierdzają wyniki uzyskane przez Iwamurę (1962), który stosując ³²P wykazał stymulujący wpływ światła na metabolizm DNA chloroplastów *Chlorella*. W naszych doświadczeniach włączanie tymidyny ³H do chloroplastów zachodziło mniej intensywnie u roślin zaciemnianych, niż u roślin rosnących na świetle.

Najmłodsze części liści u badanych roślin pozbawione są dopływu światła. Ta okoliczność mogłaby wpływać nie tylko na sposób różnicowania się ultrastruktury chloroplastów (ref. Mikulska 1964), ale również na niską aktywność metaboliczną zawartego w nich DNA. Interesujące wyjaśnienie braku włączania tymidyny ^3H przez proplastydy stwierdzone w poprzedniej pracy (Olszewska i Mikulska 1964) nasuwa się w związku z eksperymentami McCalla i Allana (1964) oraz Pogo i Pogo (1964). Autorzy ci wykazali u *Euglena*, że aktynomycyna D (antybiotyk blokujący syntezę RNA zależną od DNA, a więc blokujący aktywność genetyczną DNA), nie daje efektu we wczesnym okresie przekształcania się proplastydów w chloroplasty. Hamujący wpływ aktynomycyny przejawia się dopiero w momencie, kiedy wykształcają się na terenie plastydów lamelle, tj. struktury charakterystyczne dla chloroplastów. Zdaniem Pogo i Pogo (l.c.) pierwszy etap różnicowania się proplastydów zachodzi bez genetycznej informacji, która staje się konieczna dopiero w końcowym okresie dyferencjacji chloroplastów.

Wydaje się, że światło stymuluje także syntezę RNA. Do takiego wniosku prowadzą wyniki prac Brawermana i wsp. (1961, 1962) nad *Euglena gracilis*. Natomiast, wg Szarkowskiego i Gołaszewskiego (1961), w etiolowanych roślinach wyższych chloroplasty zawierały 3 razy więcej RNA, niż chloroplasty roślin rosnących na świetle. Cytowani autorzy zastrzegają jednak, że zjawisko to można objaśnić albo wzrostem syntezy RNA w chloroplastach w ciemności, albo nagromadzeniem się w chloroplastach RNA syntetyzowanego w innych częściach komórki. Jeśli chodzi o aktywność metaboliczną RNA, to w naszych poprzednich doświadczeniach (Olszewska i Mikulska 1964) stwierdziłyśmy, że włączanie urydyny ^3H wzrasta w miarę różnicowania się chloroplastów, co można wiązać nie tylko z uaktywnieniem ich aparatu genetycznego, ale i z wpływem światła.

Pozostaje otwarty problem lokalizacji DNA na terenie chloroplastów. Rozstrzygnięcie tego zagadnienia może nastąpić tylko przy pomocy mikroskopu elektronowego. Tą metodą Ris i Plaut (1961) wykazali, że w chromatoforach *Chlamydomonas* regiony Feulgen-pozytywne w mikroskopie optycznym zawierają mikrofibrele o średnicy 25 Å, przypominające nici DNA.

Odkrycia ostatnich lat rzucają nowe światło na chloroplasty, które dzięki obecności DNA są składnikiem komórki w pewnym stopniu niezależnym od jądra. Dowiedzenia genetycznej autonomii chloroplastów można było się spodziewać od momentu stwierdzenia, że w bezjądrowych fragmentach *Acetabularia mediterranea* synteza RNA odbywa się jedynie w chloroplastach (Naora i wsp. 1960). U *Euglena* przekształcanie się bezbarwnych proplastydów w zielone chloroplasty nie jest kontrolo-

wane przez jądro; proces zielenienia chloroplastów odbywa się normalnie w komórkach, których jądro było naświetlone mikrowiązką UV. Różnicowanie chloroplastów jest natomiast zahamowane, jeśli naświetlaniem została uszkodzona cytoplazma (Gibor i Granick 1962). Autonomia chloroplastów, jak można wnosić z badań na najlepszym obecnie modelu — glonie *Acetabularia mediterranea* — jest jednak ograniczona, ponieważ fragmenty bezjądrowe są zdolne do życia tylko przez kilka tygodni (ref. Olszewska 1962).

STRESZCZENIE

Metoda autoradiograficzna (kontrola — trawienie dezoksyrybonukleazą) wykazała, że tymidyna ³H włącza się do DNA chloroplastów *Clivia miniata* i *Belbergia* sp. Prekursor ten jest najintensywniej pobierany przez chloroplasty w pełni zróżnicowane (strefa IV), nieco słabiej — przez chloroplasty najstarszych odcinków liści (strefa V), najslabiej — przez chloroplasty będące w trakcie różnicowania (strefa III).

We wszystkich badanych odcinkach liści aktywność metaboliczna DNA chloroplastów jest stymulowana przez światło.

Stwierdzono różnice w intensywności znakowania się chloroplastów w poszczególnych komórkach mezofilu, a także chloroplastów tej samej komórki.

Zakład Cytochemii,
Katedra Anatomii i Cytologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, Nowotki 18

(Wpłynęło: dn. 10.XI.1964 r.)

RESUMÉ

Nous avons démontré, par autoradiographie, l'incorporation de la thymidine ³H dans les chloroplastes de *Clivia miniata* et *Bilbergia* sp. (Monocotylédonées). Les préparations témoins, traitées à la DNAase n'étant pas radioactives, l'incorporation de ce précurseur est due à la présence de l'ADN.

L'incorporation la plus intense a lieu dans les chloroplastes entièrement différenciés (zone IV); les chloroplastes des parties les plus vieilles des feuilles (parties apicales, zone V) sont moins marqués; l'incorporation est la plus faible dans les chloroplastes en voie de la différenciation (zone III).

Dans toutes les zone étudiées, l'activité métabolique de l'ADN est stimulée par la lumière.

L'intensité du marquage des chloroplastes diffère d'une cellule à l'autre; il en est de même en ce qui concerne le marquage des chloroplastes de la même cellule.

LITERATURA

- Brawerman G., Pogo A. O., Chargaff E., 1961, Synthesis of novel ribonucleic acid and proteins during chloroplast formation in resting *Euglena* cells, Biochim. Biophys. Acta 48:418—420.
Brawerman G., Pogo A. O., Chargaff E., 1962, Induced formation of

- ribonucleic acids and plastids proteins in *Euglena gracilis* under the influence of light, *Biochim. Biophys. Acta* 55:326—337.
- Gibor A., Granick S., 1962, Ultraviolet sensitive factors in the cytoplasm that affect the differentiation of *Euglena* plastids, *J. Cell Biol.* 15:599—603.
- Gibor A., Izawa M., 1963, The DNA content of the chloroplasts of *Acetabularia*, *Proc. Natl. Ac. Sci.* 50:1164—1169.
- Gifford E. M., 1960, Incorporation of thymidine ^3H into shoot and root apices of *Ceratopteris thalictroides*, *Am. J. Bot.* 47:834—837.
- Granick S., 1961, *The Cell*, vol. II, Academic Press, New York and London.
- Iwamura T., 1962, Characterisation of the turnover of chloroplast deoxyribonucleic acid in *Chlorella*, *Biochim. Biophys. Acta* 61:472—474.
- Kirk J. T. O., 1963 a, The deoxyribonucleic acid of broad-bean chloroplasts, *Biochem. J.* 88:45p.
- Kirk J. T. O., 1963 b, The deoxyribonucleic acid of broad-bean chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* 76:417—424.
- McCalla D. R., Allan R. K., 1964, Effect of actinomycin D on *Euglena* chloroplast formation, *Nature* 201:504—505.
- Mikulska E., 1960, Inkluzje tłuszczowe w chloroplastach, *Acta Soc. Bot. Pol.* 29:431—455.
- Mikulska E., 1964, Badania nad ultrastrukturą komórek liści *Clivia miniata* i *Bilbergia* sp. ze szczególnym uwzględnieniem chloroplastów, wyd. Uniwersytet Łódzki, Łódź.
- Naora H., Naora H., Brachet J., 1960, Studies on the independent synthesis of cytoplasmic ribonucleic acids in *Acetabularia mediterranea*, *J. Gen. Phys.* 43:1083—1102.
- Olszewska M. J., 1962, Rola biologiczna kwasów rybonukleinowych, *Wiad. Bot.* 6:109—130.
- Olszewska M. J., Mikulska E., 1964, Étude autoradiographique de l'incorporation de la thymidine ^3H , de l'uridine ^3H et de la phénylalanine ^3H dans les chloroplastes de *Clivia miniata* et *Bilbergia* sp., *Experientia* 20:267—268.
- Pogo B. G. T., Pogo A. O., 1964, DNA-dependence of plastid differentiation inhibition by actinomycin D, *J. Cell Biol.* 22:296—301.
- Ris H., Plaut W., 1962, Ultrastructure of DNA containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*, *J. Cell Biol.* 13:383—391.
- Segher R., Ishida M. R., 1963, Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*, *Proc. Natl. Ac. Sci.* 50:725—730.
- Sisakian N. M., Odincova M. S., 1960, Nukleinowyje kisloty kletocznych struktur rastienij, *Izw. A.N. S.S.S.R., ser. biol.*, No 6:817—850.
- Szarkowski J. W., Gołaszewski T., 1961, RNS-Gehalt der Plastiden von grünen und etiolierten Pflanzen, *Naturwiss.* 48:457—458.
- Wollgiehn R., Mothes K., 1963, Über DNS in den Chloroplasten von *Nicotiana rustica*, *Naturwiss.* 50:95—96.