

Über den Nachweis elektronisch angeregter Moleküle im Zigarettenrauch

On the Detection of Electronic Excited Molecules in Cigaret Smoke

J. Stauff, G. Reske und I. Simo

Institut für physikalische Biochemie, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. **28 c**, 469–470 [1973]; eingegangen am 1. März 1973)

Cigaret smoke, excited molecules, carcinogenesis

In der Diskussion über die Entstehung des Bronchialcarcinoms durch Zigarettenrauch wird häufig der Einwand gemacht, daß die im Rauch (bzw. Teer) enthaltenen Mengen von carcinogenen Kohlenwasserstoffen derart geringfügig seien, daß ein Raucher undiskutabel große Mengen von Zigaretten rauchen müßte, um den im Tierversuch ermittelten notwendigen Schwellenwert der Entstehung von Tumoren zu erreichen^{1–4}. Andererseits kann über die Möglichkeit, daß die krebserregende Wirkung des Tabakrauchs in vollem Umfang durch andere Komponenten des Tabakrauchteers verursacht wird, keine sichere Aussage gemacht werden. Es ist weder über die Angriffsziele (Proteine, Nucleinsäuren, Lipide) noch über den Reaktionsmechanismus der im Tabakteer enthaltenen carcinogenen Substanzen Einigkeit zu erzielen, die von allgemeiner Gültigkeit sein könnte.

Eine frühere Untersuchung, die die Reaktionsfähigkeit des 3.4-Benzpyrens mit Proteinen in wäßrigem Medium prüfen sollte, stellte fest, daß eine Einwirkung nur in Gegenwart von O₂ und nur über den durch Licht angeregten Zustand des Kohlenwasserstoffs stattfindet⁵. In einem anderen Beitrag⁶ wurde gefunden, daß Zigarettenrauch, der mit wäßrigen Proteinlösungen in Berührung gebracht wurde, ebenfalls mit Proteinen reagiert, z. B. durch Angriff auf SH-Gruppen mit entsprechender partieller Denaturierung. Obwohl nun ein direkter Zusammenhang zwischen den Photooxidationen des 3.4-Benzpyrens und der chemischen Reaktion des Zigarettenrauchs nicht ohne weiteres hergestellt werden kann, kann die Frage gestellt werden, wie denn etwa das 3.4-Benzpyren des Zigarettenrauchs auf Proteine einwirken könnte, wenn am Reaktionsort in der wäßrigen Proteinlösung oder in den Schleimhäuten der Bronchien keine Anregung des Kohlenwasserstoffs durch Licht stattfindet. Aus Tierexperimenten ist bekannt^{7,8}, daß sich Hautkrebs durch 3.4-Benzpyren bei Belichtung sehr viel schneller und bei ge-

ringeren Dosen entwickelt als ohne Belichtung. Eine carcinogene Wirkung des Zigarettenrauchs müßte dann entweder auf noch anderen Substanzen des Rauchteers, z. B. Phenolen⁹, oder auf die Kohlenwasserstoffe aktivierenden oder elektronisch anregenden Mechanismen im Organismus beruhen. Wohl können leicht verletzte (Einfrieren, Auftauen) Mitochondrien (aus Rinderherzen oder Rattenlebern) den photodynamisch wirksamen Farbstoff Acridinorange zur Lumineszenz anregen¹⁰; ob sie das gleiche auch bei 3.4-Benzpyren oder anderen carcinogenen aromatischen Kohlenwasserstoffen können, ist nur zu vermuten, da eine Überprüfung wegen der äußerst geringen Löslichkeit der Kohlenwasserstoffe bis jetzt nicht möglich war.

Einen neuen Aspekt gewinnen die Überlegungen zur Wirkung des Zigarettenrauchs, wenn die im folgenden mitgeteilten Beobachtungen berücksichtigt werden. Es konnte nämlich mit Hilfe einer Anordnung, die zur Messung der Chemilumineszenz von Gasen dient¹¹, festgestellt werden, daß vom Zigarettenrauch eine Lichtemission von der Wellenlänge 350–600 nm ausgeht. Sie muß durch eine oder mehrere chemische Reaktionen in den Rauchpartikeln bzw. im Rauchteer erzeugt werden. Abb. 1 zeigt

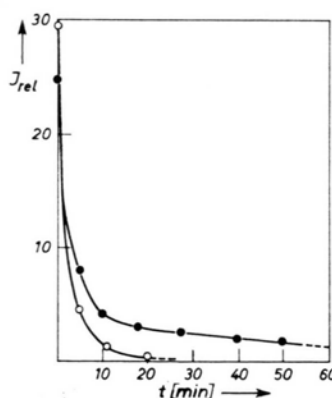


Abb. 1. Lumineszenzintensität von Zigarettenrauch I_{rel} in willkürlichen Einheiten in Abhängigkeit von der Zeit; ●—●—● a. ein Zug, anschließend Spülung der Küvette mit Luft; ○—○—○ b. nach Abrauchen einer ganzen Zigarette (400 ml/min).

die Zeitabhängigkeit der Leuchtintensität nach einem Zug und nach dem Abrauchen einer ganzen Zigarette. Beim Versuch mit einem Zug (Kurve a) wurde anschließend Luft durch die Meßküvette gesaugt. Da sich dabei die Emission nicht änderte, mußte daraus geschlossen werden, daß sie von einem Teer-Niederschlag an den Küvettenwänden herrührt. Dies wurde durch die Zugabe von Methanol oder Äthanol bestätigt. Wie Abb. 2 zeigt, steigt die Lumineszenz bei

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. J. Stauff, Institut für physikalische Biochemie, D-6000 Frankfurt a. M.-Niederrad 1, Sandhofstraße.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

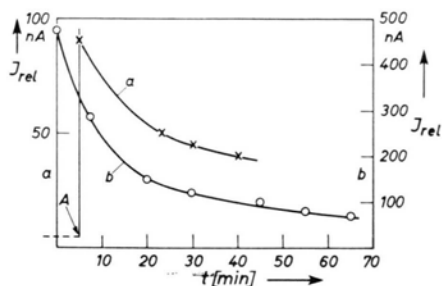


Abb. 2. Lumineszenzintensität des Zigarettenrauch-Teers (in nA des Photomultipliers) in Abhängigkeit von der Zeit: $\times-\times-\times$ a. etwa eine Stunde alter Teer wird bei A mit Methanol versetzt, linker Maßstab, $\circ-\circ-\circ$ b. Rauch einer Zigarette durch Dimethylphthalat geleitet, rechter Maßstab.

Zugabe von Alkohol auf das 10-fache an. Leitet man den Rauch sofort durch ein organisches Lösungsmittel, wie Dimethylphthalat, erhält man eine mit jedem „Zug“ ansteigende Lumineszenz, die beim Abschalten des Rauchstroms erst in etwa 60 min auf den zehnten Teil ihres Ausgangswertes abklingt. Eine

Analyse der Kinetik der Lumineszenzabklingkurven ergab weder eine erste noch eine zweite Reaktionsordnung, was auf einen komplizierten Mechanismus der Erzeugung der angeregten Zustände deutet, die für die Lichtemission verantwortlich sind. Dies und die außerordentlich lange Abklingzeit lassen mit Sicherheit auf eine chemische Reaktion schließen, die erst nach dem Verbrennungsprozeß des Tabaks einsetzt. Sie muß Reaktionsschritte einschließen, die in der Lage sind, fluoreszenz- oder phosphoreszenzfähige Moleküle anzuregen.

Bei Berücksichtigung dieser Eigenschaft des Rauchteers ist damit zu rechnen, daß bei seiner Einwirkung auf biologische Substanzen auch Reaktionen elektronisch angeregter Moleküle stattfinden, wie sie sonst nur bei photochemischen Prozessen auftreten. Wegen der begrenzten Zeit, in der im Teer angeregte Moleküle erzeugt werden, müßten alle Aussagen, die aus Versuchen mit Rauchteer hergeleitet worden sind, überprüft werden, ob diese mit frischen Präparaten (bis zu etwa $\frac{3}{4}$ Sde. alt) gemacht worden sind oder nicht.

- ¹ E. L. Wynder u. G. Wright, *Cancer* **10**, 255 [1957].
- ² H. Druckrey, *Acta med. scand.* **170**, Suppl. 24 [1961].
- ³ H. Druckrey u. A. Schildbach, *Z. Krebsforsch.* **65**, 465 [1963].
- ⁴ Ph. Lazar, I. Chouroulinkov, C. Libermann u. M. Guérin, *J. nat. Cancer Inst.* **37**, 573 [1966].
- ⁵ G. Reske u. J. Stauff, *Z. Naturforsch.* **18b**, 774, [1963]; **19b**, 716 [1964].
- ⁶ G. Reske, *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)* **13**, 913 [1963].

- ⁷ J. Maisin u. A. De Jonghe, *C. R. Séances Soc. Biol. Filiales Associées* **117**, 111 [1934].
- ⁸ L. Santamaria, G. G. Giordano, M. Alfisi u. F. Cascione, *Nature [London]* **210**, 824 [1966].
- ⁹ B. L. Van Duuren, A. Sivak, A. Segal, L. Orris u. L. Langseth, *J. Nat. Cancer Inst.* **37**, 519 [1966].
- ¹⁰ J. Stauff u. J. Ostrowski, *Z. Naturforsch.* **22b**, 734 [1967].
- ¹¹ J. Stauff u. H. Fuhr, *Z. Naturforsch.* **26b**, 259 [1971].

Plating Efficiency of Protoplasts of Tobacco in Different Light Conditions

Gisela Enzmann-Becker

Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Melchers, Tübingen

(*Z. Naturforsch.* **28c**, 470–471 [1973]; received May 5, 1973)

Protoplasts, intensity of light, calli, tobacco

Today there appears to exist no real difficulty for the isolation of protoplasts of plant cells. Protoplasts have been successfully cultured and have produced callus masses which can regenerate into whole plants¹. The conditions which proved to be suitable for the cultivation of protoplasts to calluses depend on the plant material (variety, growth conditions,

age of leaves a. s. o.), the culture medium, temperature and light conditions. We found that dimlight, especially in the first two days after isolation, increases the plating efficiency.

The protoplasts were isolated from leaves of *Nicotiana tabacum* var. „Samsun“ which were cultivated in a greenhouse with additional illumination (Osram Fluora; 21–8 o'clock) in autumn and winter. The leaves which had most recently expanded were used. The sterilized leaf pieces² were pre-incubated with pectin-glycosidase from *Aspergillus*, Rohament P* (Röhm GmbH, Darmstadt) as described³. The further isolation followed the two-step method⁴. The liberated cells were counted and the resulting number of the protoplasts per ml of medium was calculated (counts made with a haemocytometer). The cells were plated in agar with the medium described by Nagata and Takebe (1971)² and cultivated in a

Requests for reprints should be sent to Dipl.-Biol. G. Enzmann-Becker, Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Melchers, D-7400 Tübingen, Corrensstr. 41.

* Sincere thanks are due to Röhm GmbH for the donation of the enzyme Rohament P and to Osram GmbH for a gift of fluorescence tubes.

Table I. Influence of different light intensity on colony formation.

Intensity of light [lux]	Protoplasts plated					
	$[6.7 \cdot 10^3]$ proto- plasts/ml	[100] %	$[1.5 \cdot 10^4]$ proto- plasts/ml	[100] %	$[1.4 \cdot 10^5]$ proto- plasts/ml	[100] %
Protoplasts grown to calli						
3000	$5.0 \cdot 10^2$	7.5	$4.7 \cdot 10^3$	47	32	0.02
400	$3.6 \cdot 10^3$	53.5	$3.8 \cdot 10^3$	38	5.4	0.004
400 for 48 h	$4.6 \cdot 10^3$	67.5	$5.9 \cdot 10^3$	59	53	0.04

climate chamber at 28 °C, 85% relative humidity and continuous illumination with white fluorescent light (Belalux, Osram GmbH *), 20 tubes/m², distance from the object 110 cm and intensity approximately 3000 lux. After three weeks of culture the grown colonies were resuspended with liquid medium and the colonies per 0.1 ml of the resulting suspension were counted and the plating efficiency was calculated.

One factor which influences the plating efficiency of protoplasts has been shown to be the intensity of the illumination during the first two days of culture following isolation. The effects of different illumination in the development of calli are compared in Table I. One fraction of the protoplast preparation was continuously maintained in 400 lux. Another fraction (the control) was continuously maintained in 3000 lux, and the third fraction was maintained in 400 lux during a period of 48 hours and was then transferred to 3000 lux. Cultures maintained three

weeks in 3000 lux containing $6.7 \cdot 10^3$ protoplasts per ml medium showed a plating efficiency of 7.5% ($5.0 \cdot 10^2$ calli/ml). Cultures with the same cell density but continuously maintained in 400 lux showed a plating efficiency of 53.5% ($3.6 \cdot 10^3$ calli/ml). However, an intensity of 400 lux given for 48 hours followed by an intensity of 3000 lux increased the plating efficiency to 68% ($4.6 \cdot 10^3$ calli/ml).

If the protoplasts are plated in higher densities, $1.5 \cdot 10^4$ and $1.4 \cdot 10^5$ cells per ml medium respectively, the difference between the plates which were kept at 3000 lux and the plates which were kept for 48 hours at 400 lux decreased but was still present (Table I). These observations imply that the dim-light given during a period of 48 hours after isolation of the protoplasts promoted the plating efficiency.

I would like to thank Professor Dr. G. Melchers for support and helpful discussions.

¹ J. Takebe, G. Labib, and G. Melchers, *Naturwissenschaften* **58**, 318 [1971].

² T. Nagata and J. Takebe, *Planta* **99**, 12 [1971].

³ L. Schilde-Rentschler, *Z. Naturforsch.* **27b**, 208 [1972].

⁴ J. Takebe, Y. Otsuki, and S. Aoki, *Plant and Cell Physiol.* **9**, 115 [1968].

Über Flavon- und Anthrachinon-Farbstoffe der *Digitalis*-Arten, V¹

Die Struktur von Digiferrol und Digiferruginol

About Flavone and Anthraquinone Pigments of *Digitalis*

The Structure of Digiferrol and Digiferruginol

Sedat Imre und Lale Ersoy

Pharmazeutische Fakultät der Universität Istanbul, Türkei

(*Z. Naturforsch.* **28 c**, 471–473 [1973]; eingegangen am 3. April 1973)

Anthraquinones, synthesis, structure

Vor kurzem hatten wir über zwei neue Anthrachinon-Farbstoffe aus den Blättern von *Digitalis*

ferruginea berichtet¹. Ihre Konstitutionen waren mittels UV-, IR- und NMR-Spektroskopie als 1.4-Dihydroxy-3-hydroxymethylantrachinon (= DF – A₂) und 1-Hydroxy-3-(oder-2-)hydroxymethylantrachinon (= DF – A₃) aufgeklärt und wir hatten für diese neuen Naturstoffe die Namen Digiferrol und Ferruginol vorgeschlagen. Da wir aber nachträglich festgestellt haben, daß der Name Ferruginol bereits einem Diterpen gegeben ist², möchten wir, um Verwirrungen zu vermeiden, die Bezeichnung von (DF – A₃) als Digiferruginol revidieren.

Zum endgültigen Strukturbeweis haben wir nun die in Frage kommenden Anthrachinone synthetisiert und mit den Naturstoffen verglichen.

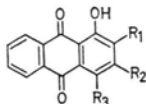
Sonderdruckanforderungen an Doz. Dr. S. Imre, Pharmazeutische Fakultät der Universität Istanbul, *Beyazit-Istanbul*, Türkei.

Bei der Synthese von 1,4-Dihydroxy-3-hydroxymethylantrachinon (**1**) haben wir einen anderen Weg gewählt als Chari und Mitarb.³ Zuerst kondensierten wir Phthalsäureanhydrid mit Hydrochinon in $\text{AlCl}_3/\text{NaCl}$ -Schmelze zum 1,4-Dihydroxyanthrachinon (**1a**), Schmp. 193–195 °C (Lit.⁴ Schmp. 192 °C). Dieses wurde dann nach Marschalk⁵ in NaOH-Lösung, in Gegenwart von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ mit 36-proz. Formaldehyd-Lösung alkyliert. Aus dem Reaktionsgemisch isolierten wir durch Kieselgel-SC (Benzol) und Kieselgel-DC (Petroläther/Benzol, 1/1 bzw. Chloroform/Methanol, 15/1) fünf verschiedene Farbstoffe. Einer von diesen erschien bei der DC-Kontrolle auf Polyamid dem Digiferrol ähnlich ($R_f=0,27$; Methanol) und besteht aus roten nadelförmigen Kristallen (aus Methanol) vom Schmp. 204–205 °C.

Aus dem NMR-Spektrum geht eindeutig hervor, daß diese Substanz die erwünschte Verbindung **1** ist: (in DMSO) $\delta=4,67$ (2 H, d, $-\text{CH}_2\text{OH}$), $\delta=5,53$ (1 H, s, $-\text{CH}_2\text{OH}$), $\delta=7,43$ (1 H, s, H-2), $\delta=7,97$ (2 H, m, H-6 und H-7), $\delta=8,27$ (2 H, m, H-5 und H-8), $\delta=12,84$ und $13,09$ (je 1 H und s, $-\text{OH}$ am C-1 und C-4); Durch Zusatz von CF_3COOD verschwinden alle OH-Signale und der Dublett von $-\text{CH}_2\text{OH}$ wird Singulett.

Das Massen-Spektrum gibt das Molekül-Ion bei m/e 270 (100%) [ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$: 270, 245] und folgende Fragment-Ionen: 252 (86%), 241 (24%), 224 (27%), 196 (24%), 185 (12%), 168 (15%), 157 (9%), 139 (21%).

Es gibt aber eine Differenz zwischen den Schmelzpunkten von **1** und des bereits synthetisierten 1,4-Dihydroxy-3-hydroxymethylantrachinons (189–190 °C)³. Diese rührt daher, daß es sich beim letzten um nicht ganz reine Substanz handelt⁶. Der Vergleich von **1** mit natürlichem Digiferrol ergab keine Depression im Mischschmelzpunkt und völlige Übereinstimmung in den chromatographischen, UV- und IR-spektroskopischen Daten.



Zum Strukturbeweis von Digiferruginol synthetisierten wir zuerst 1-Hydroxy-2-methylantrachinon (**2**) und 1-Hydroxy-3-methylantrachinon (**3**), durch Kondensation von Phthalsäureanhydrid und *o*- bzw. *m*-Kresol. Schmp. **2** 180–182 °C (Lit.⁷ Schmp. 181–182 °C), Schmp. **3** 176–177 °C (Lit.⁷ Schmp. 178 °C). Die Überführung der Methyl-Gruppe in Hydroxymethyl erfolgte nach der üblichen Methode⁸ in folgender Weise: Bromierung der Acetate von **2** und **3** mit *N*-Bromsuccinimid in wasserfreiem CCl_4 , in Gegenwart von Benzoylperoxid; Acetylierung der ω -Bromoderivate mit Silberacetat und Essigsäureanhydrid und anschließende Hydrolyse der Acetylprodukte mit methanolischer H_2SO_4 . Nach chromatographischer Reinigung erhielten wir 1-hydroxy-2-hydroxymethylantrachinon (**2a**) bzw. 1-Hydroxy-3-hydroxymethylantrachinon (**3a**) in Form von orangefarbenen Nadeln (aus Methanol). Schmp. **2a** 210 °C (Lit.⁹ Schmp. 210 °C); Schmp. **3a** 211–212 °C (Lit.¹⁰ Schmp. 206 °C). Auch die Zwischenprodukte ergaben mit den Literaturwerten übereinstimmende Schmelzpunktdaten.

Die beiden Verbindungen wurden mit natürlichem Digiferruginol verglichen (Mischschmp., UV- und IR-Spektroskopie) und es stellte sich heraus, daß dem Digiferruginol die Struktur von **2a** zukommt.

Zum Schluß haben wir die Konstitution von **2a** durch NMR- und Massen-Spektroskopie gesichert. NMR (in DMSO) $\delta=4,73$ (2 H, s, $-\text{CH}_2\text{OH}$), $\delta=7,70$ – $8,40$ (6 arom. Protonen); Massen-Spektrum: m/e 254 (100%) (M^+) [ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$: 254, 245], 236 (44%), 225 (90%), 208 (45%), 197 (20%), 180 (37%), 152 (63%), 139 (36%).

Über die bei der Synthese von **1** entstandenen weiteren Farbstoffen werden wir später berichten.

Die NMR- und Massen-Spektren wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München aufgenommen. Dafür danken wir Herrn Prof. Dr. H. Wagner und Herrn O. Seligmann herzlichst.

		R_1	R_2	R_3
(Digiferrol)	1	H	CH_2OH	OH
	1a	H	H	OH
(Digiferruginol)	2	CH_3	H	H
	2a	CH_2OH	H	H
	3	H	CH_3	H
	3a	H	CH_2OH	H

¹ IV. Mitt.: S. Imre, R. Tulus u. I. Sengün, Tetrahedron Letters [London] **1971**, 4681.

² C. W. Brandt u. L. G. Neubauer, J. chem. Soc. [London] **1939**, 1031.

³ V. M. Chari, S. Neelakantan u. T. R. Seshadri, Indian. J. Chem. **6**, 764 [1968].

⁴ K. Lagodzinski, Ber. dtsch. chem. Ges. **28**, 117 [1895].

⁵ Ch. Marschalk, F. Koenig u. N. Ouroussoff, Bull. Soc. chim. France, Mém., **1936**, 1545.

⁶ V. M. Chari, persönliche Mitteilung.

⁷ R. Eder, C. Widmer u. R. Bütler, Helv. chim. Acta **7**, 353 [1924].

- ⁸ S. Neelakantan, A. Pocker u. H. Raistrick, *Biochem. J.* **64**, 464 [1956].
⁹ M. D. Bhavsar, B. D. Tilak u. K. Venkataraman, *J. sci. ind. Res.* [New Delhi], Sect. B **16**, 392 [1973].

- ¹⁰ D. S. Bapat u. B. C. Subba Rao, *J. sci. ind. Res.* [New Delhi], Sect. B **21**, 179 [1962].

Fate of T₄ Phage DNA in Seedlings of *Matthiola incana*

Waltraud Rebel, Vera Hemleben, and W. Seyffert

Institut für Biologie, Lehrstuhl für Genetik, Universität Tübingen

(*Z. Naturforsch.* **28 c**, 473–474 [1973]; received March 3, 1973)

T₄ phage DNA, uptake and integration, eukaryotes

After uptake of native T₄ phage DNA in seedlings of *Matthiola incana* this DNA is integrated as a double-stranded fraction with higher density than the unaltered phage DNA and the bulk of plant DNA.

It is known in bacteria, that under certain circumstances genetic information in the form of isolated DNA molecules can be taken up, incorporated and translated. For higher organisms such as plants the uptake of donor DNA is proven, and its integration into the plant genome has been traced^{1–3}. According to the results of Ledoux *et al.* the exogenous DNA of bacteria with a higher density than the plant DNA is bound by covalent linkages. This results in a hybrid DNA fraction of intermediate density.

The present paper forms a description and discussion of the behaviour of phage donor DNA of the same density as the recipient DNA in plant cells. The recipient organism was the annual crucifer *Matthiola incana* with a DNA density of 1.698 g/cm³, chosen (with an eye to future investigations) because of its well defined genetic system of flower pigmentation. The donor DNA used was T₄ phage DNA, which using [³²P] orthophosphate can be specifically highly labeled; its density of 1.694 g/cm³ lies within the density values of the recipient DNA.

Maximum uptake of [³²P]-labeled T₄ DNA occurred in 6 days old *Matthiola* seedlings. The plants were treated for 24 hours under sterile conditions with [³²P]-labeled T₄ DNA; the seedlings were then thoroughly rinsed in water and grown for a further 48 hours. The isolated DNA from seedlings thus treated was characterized on neutral and alkaline CsCl gradients.

Fig. 1 a shows the distribution on a neutral CsCl gradient. A maximum in radioactivity occurs at an

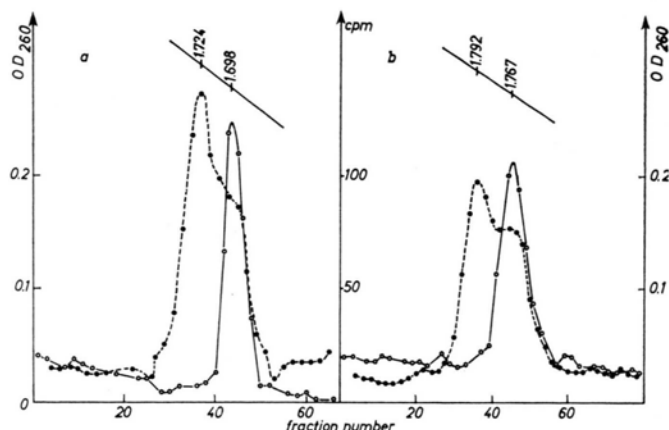


Fig. 1. CsCl gradient centrifugation of DNA from 9 days old seedlings of *Matthiola*. 6 Days old seedlings were incubated with [³²P]-labeled T₄ DNA ($1.7 \cdot 10^5$ cpm/plant) for 24 hours, thoroughly washed and grown for a further 48 hours in sterile water. After treatment with DNAase and pronase the whole plants were homogenized. DNA was isolated by the phenol method followed by RNAase treatment and separated on CsCl gradients (conditions of centrifugation: 50 000 rpm, 24 hours, 20 °C, rotor SW 65, Spinco). About 60–70 fractions of three drops each were collected; to every second fraction carrier RNA was added, the radioactive material precipitated with trichloroacetic acid and counted on membrane filters. The optical density of the samples was measured in 1 ml buffer at 260 nm. The data of density were received by refractometer measurements and calculated from *Matthiola* DNA ($\rho = 1.698$ g/cm³) as reference. a. Centrifugation in 2.5 ml neutral CsCl solution with a final density of 1.7 g/cm³. b. Centrifugation in 3.0 ml alkaline CsCl solution with a final density of 1.79 g/cm³ (pH 12.5). ○—○ Optical density at 260 nm; ●—● [³²P] radioactivity.

unexpectedly high density of 1.724 g/cm³, in an area where the profile of optical density exhibits no related ultraviolet absorption. The shoulder in the radioactivity curve above the main peak for *Matthiola* DNA can be the result of either the incorporation of T₄ DNA fragments into the plant DNA or of unaltered phage DNA.

The distribution of the DNA from T₄ DNA treated seedlings on an alkaline CsCl gradient gives the same distribution of radioactivity and optical density with a uniform density shift of about 68 mg/cm³ (Fig. 1 b). It thus follows, that all components of this DNA preparation must have been double-stranded. The higher density fraction which recurs after incubation of the seedlings with T₄ DNA must therefore also be double-stranded DNA.

Requests for reprints should be sent to Dr. Vera Hemleben, Institut für Biologie, Lehrstuhl für Genetik, D-7400 Tübingen, W.-Germany, Auf der Morgenstelle 1.

On the question of its origin it remains to clarify whether this DNA fraction results from native phage DNA or from the specific incorporation of T_4 DNA fragments into a more densely banded plant DNA fraction. In order to resolve this point [^{32}P]-

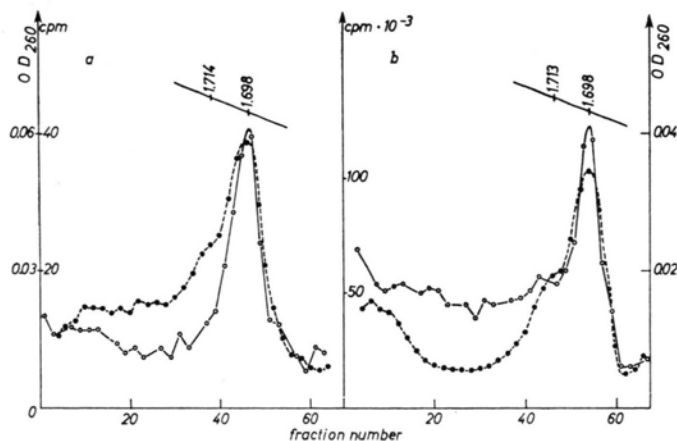


Fig. 2. CsCl gradient centrifugation of DNA from 9 days old seedlings of *Matthiola*. a. 6 Days old seedlings were incubated with [^{32}P]-labeled T_4 DNA ($4.35 \cdot 10^4$ cpm/plant) degraded by DNase treatment. After 24 hours the seedlings were thoroughly washed and grown in sterile water for a further 48 hours. b. 7 Days old seedlings were incubated with [^{32}P] orthophosphate ($5 \mu\text{Ci/plant}$) for 48 hours. Isolation of the DNA from the whole plants was done as described in the legend to Fig. 1. Neutral CsCl gradient centrifugation was carried out under the following conditions: 32 500 rpm, 45 hours, 20°C , rotor SW 65, Spinco. Measurements of optical density, radioactivity and density were done as described for Fig. 1. $\bigcirc$ — $\bigcirc$ Optical density at 260 nm; $\bullet$ — $\bullet$ [^{32}P] radioactivity.

labeled T_4 DNA was degraded with DNase to oligonucleotide size. 6 Days old *Matthiola* seedlings were incubated for 24 hours with this preparation and then grown for a further 48 hours. The DNA isolated from these seedlings exhibits, after centrifugation in a neutral CsCl gradient, a similar radioactivity distribution pattern to that obtained for *Matthiola* seedlings grown under the same conditions after treatment with [^{32}P] orthophosphate (Figs. 2 a and 2 b). The bulk of the radioactivity now coincides with the *Matthiola* DNA at a density of 1.698 g/cm^3 . The weak [^{32}P] radioactivity shoulder, which at a density of 1.714 g/cm^3 indicates a second DNA fraction, probably represents a plant satellite DNA⁴. The questionable DNA fraction with the high density of 1.724 g/cm^3 (Fig. 1 a) does not appear here. It occurs solely after incubation of plants with native phage DNA.

Alteration in the density of phage DNA through change in conformation after uptake in the plants can be excluded, because ultrasonication of this densely banded fraction does not influence its position on the CsCl gradient.

Future investigation must elucidate how this new DNA fraction can form after uptake of T_4 phage DNA. The formation of hybrid DNA from plant and phage DNA, analogous to the results of Ledoux, postulates a recipient DNA fraction of very high density, which after association of the T_4 phage DNA would shift the latter to an intermediate density of 1.724 g/cm^3 . Some preliminary results indicate the replication of the phage DNA fraction within the plant cells.

¹ A. J. Bendich and P. Filner, *Mutation Res.* **13**, 199 [1971].

² L. Ledoux and R. Huart, *J. molecular Biol.* **43**, 243 [1969].

³ L. Ledoux and R. Huart, *Eur. J. Biochem.* **23**, 96 [1971].

⁴ T. Beridze, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **262**, 393 [1972].