

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

| Intensity<br>of light<br><br>[lux] | Protoplasts plated                        |            |                                           |            |                                           |            |
|------------------------------------|-------------------------------------------|------------|-------------------------------------------|------------|-------------------------------------------|------------|
|                                    | $[6.7 \cdot 10^3]$<br>proto-<br>plasts/ml | [100]<br>% | $[1.5 \cdot 10^4]$<br>proto-<br>plasts/ml | [100]<br>% | $[1.4 \cdot 10^5]$<br>proto-<br>plasts/ml | [100]<br>% |
| 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/m<sup>2</sup>, 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.

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

<sup>2</sup> T. Nagata and J. Takebe, *Planta* **99**, 12 [1971].

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

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

Über Flavon- und Anthrachinon-Farbstoffe  
der *Digitalis*-Arten, V <sup>1</sup>

**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 Anthra-  
chinon-Farbstoffe aus den Blättern von *Digitalis*

*ferruginea* berichtet <sup>1</sup>. Ihre Konstitutionen waren mittels UV-, IR- und NMR-Spektroskopie als 1.4-Di-hydroxy-3-hydroxymethylanthrachinon (= DF – A<sub>2</sub>) und 1-Hydroxy-3-(oder-2-)hydroxymethylanthrachinon (= DF – A<sub>3</sub>) 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 ist <sup>2</sup>, möchten wir, um Verwirrungen zu vermeiden, die Bezeichnung von (DF – A<sub>3</sub>) 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, Pharma-  
zeutische Fakultät der Universität Istanbul, *Beyazit-Istan-  
bul*, Türkei.

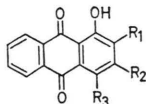


Bei der Synthese von 1,4-Dihydroxy-3-hydroxymethylantrachinon (**1**) haben wir einen anderen Weg gewählt als Chari und Mitarb.<sup>3</sup> Zuerst kondensierten wir Phthalsäureanhydrid mit Hydrochinon in  $\text{AlCl}_3/\text{NaCl}$ -Schmelze zum 1,4-Dihydroxyanthrachinon (**1a**), Schmp. 193–195 °C (Lit.<sup>4</sup> Schmp. 192 °C). Dieses wurde dann nach Marschalk<sup>5</sup> 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  $\text{CF}_3\text{COOD}$  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)<sup>3</sup>. Diese rührt daher, daß es sich beim letzten um nicht ganz reine Substanz handelt<sup>6</sup>. 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.<sup>7</sup> Schmp. 181–182 °C), Schmp. **3** 176–177 °C (Lit.<sup>7</sup> Schmp. 178 °C). Die Überführung der Methyl-Gruppe in Hydroxymethyl erfolgte nach der üblichen Methode<sup>8</sup> in folgender Weise: Bromierung der Acetate von **2** und **3** mit *N*-Bromsuccinimid in wasserfreiem  $\text{CCl}_4$ , in Gegenwart von Benzoylperoxid; Acetylierung der  $\omega$ -Bromoderivate mit Silberacetat und Essigsäureanhydrid und anschließende Hydrolyse der Acetylprodukte mit methanolischer  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . 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.<sup>9</sup> Schmp. 210 °C); Schmp. **3a** 211–212 °C (Lit.<sup>10</sup> 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%) ( $\text{M}^+$ ) [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)     | <b>1</b>  | H                      | $\text{CH}_2\text{OH}$ | OH    |
|                  | <b>1a</b> | H                      | H                      | OH    |
| (Digiferruginol) | <b>2</b>  | $\text{CH}_3$          | H                      | H     |
|                  | <b>2a</b> | $\text{CH}_2\text{OH}$ | H                      | H     |
|                  | <b>3</b>  | H                      | $\text{CH}_3$          | H     |
|                  | <b>3a</b> | H                      | $\text{CH}_2\text{OH}$ | H     |

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

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

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

<sup>4</sup> K. Lagodzinski, Ber. dtsch. chem. Ges. **28**, 117 [1895].

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

<sup>6</sup> V. M. Chari, persönliche Mitteilung.

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

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

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

### Fate of T<sub>4</sub> 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)

T<sub>4</sub> phage DNA, uptake and integration, eukaryotes

After uptake of native T<sub>4</sub> 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<sup>1–3</sup>. 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/cm<sup>3</sup>, chosen (with an eye to future investigations) because of its well defined genetic system of flower pigmentation. The donor DNA used was T<sub>4</sub> phage DNA, which using [<sup>32</sup>P] orthophosphate can be specifically highly labeled; its density of 1.694 g/cm<sup>3</sup> lies within the density values of the recipient DNA.

Maximum uptake of [<sup>32</sup>P]-labeled T<sub>4</sub> DNA occurred in 6 days old *Matthiola* seedlings. The plants were treated for 24 hours under sterile conditions with [<sup>32</sup>P]-labeled T<sub>4</sub> 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

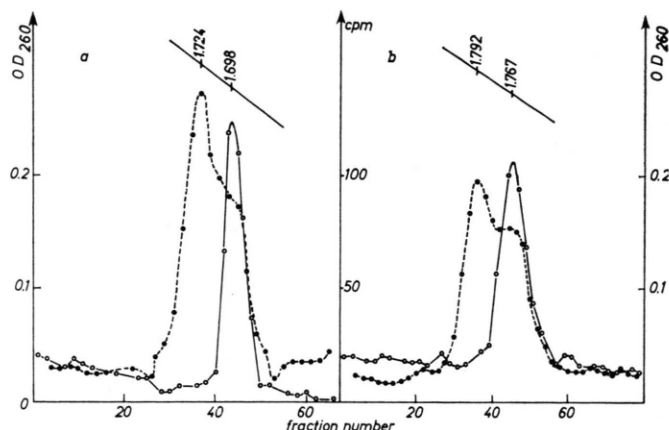


Fig. 1. CsCl gradient centrifugation of DNA from 9 days old seedlings of *Matthiola*. 6 Days old seedlings were incubated with [<sup>32</sup>P]-labeled T<sub>4</sub> DNA ( $1.7 \cdot 10^5$  cpm/plant) for 24 hours, thoroughly washed and grown for a further 48 hours in sterile water. After treatment with 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/cm<sup>3</sup>) as reference. a. Centrifugation in 2.5 ml neutral CsCl solution with a final density of 1.7 g/cm<sup>3</sup>. b. Centrifugation in 3.0 ml alkaline CsCl solution with a final density of 1.79 g/cm<sup>3</sup> (pH 12.5). ○—○ Optical density at 260 nm; ●—● [<sup>32</sup>P] radioactivity.

unexpectedly high density of 1.724 g/cm<sup>3</sup>, 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 T<sub>4</sub> DNA fragments into the plant DNA or of unaltered phage DNA.

The distribution of the DNA from T<sub>4</sub> 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/cm<sup>3</sup> (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 T<sub>4</sub> 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.