

## MORFOLOGIJA I PLASTIDOGENI POSTANAK KAUČUKOVIH ZRNACA KOD SMOKVE (*Ficus carica*) I GUMIJEVCA (*Ficus elastica*).

### I. U v o d

Kod mnogih kopnenih biljaka pojavljuju se uz ostale tvari kao veoma značajni produkti tvarne izmjene politerpeni: kaučuk, gutaperča i balata. Kaučuk,  $(C_5H_8)_x$  najčešći je prirodni politerpen, te dolazi, kako je poznato, u obliku sitnih zrnaca kao hidrofobna disperzna faza mliječnih sokova (lateksa), osobito u porodicama *Euphorbiaceae*, *Moraceae*, *Apocynaceae* i *Compositae*. Dispergirane čestice kaučuka, kao i različitih drugih tvari (smole, bjelančevine i t. d.), koje se uz kaučuk pojavljuju u mliječnim sokovima, uvjetuju ujedno zbog rasapa svjetlosti njihov mliječni izgled. Ona su raspršena u temeljnom prozirnog disperznom sredstvu mliječnog soka, t. zv. serumu. Zrnca kaučuka mogu biti kuglastog, nepravilno poliedričnog, štapićastog ili kruškastog oblika. Veličina im varira od granice mikroskopske vidljivosti do nekoliko mikrona. Po svojoj su konzistenciji gotovo kruta, no posjeduju stanovitu, za kaučuk značajnu plastičnost, te se već u mikroskopskom preparatu čistog mliječnog soka mogu mijesiti u plastičnu masu.

Za razliku od ostalih terpena, postanak kaučuka i njemu srodnih politerpena nije niti u fiziološkom, niti u citološkom pogledu još dovoljno objašnjen. Puštajući po strani biokemijski i fiziološki dio ovoga problema, želio bih ovdje istaknuti osobito citološki dio, budući da sa citološkog stanovišta proces formiranja kaučukovih zrnaca, koja konačno u posve izraslom i više manje specifičnom obliku nalazimo u mliječnim sokovima, može biti od primarne važnosti i za rješavanje dosta zakučastih problema mliječnog soka i mliječnih cijevi.

Po R u ž i č k i možemo politerpene kao i sve ostale terpene smatrati polimerima odnosno derivatima nezasićenog ugljikovodika izoprena  $C_5H_8$ . Nižim stupnjevima polimerizacije ovog osnovnog spoja nastaju monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni i triterpeni, karakterizirani sa 10, 15, 20 i 30 C-atoma, koji zajedno sa svojim derivatima predstavljaju pojedine stvarne komponente eteričnih ulja, balzama, smola, sapogenina i dr. Tetraterpeni (karotinoidi), kojima pripadaju mnoge biljne boje (karotin, ksantofil, likopin i t. d.), karakterizirani su sa 40 C-atoma, t. j. faktorom polimerizacije  $x = 8$ . Kaučuk kao politerpen predstavlja vrlo visoki polimer s faktorom polimerizacije (po S t a u d i n g e r u)  $x =$  cca 2000—5000.

Citološka istraživanja izvedena sa svrhom da se konstatira lokalitet postanka pojedinih terpena u biljci (L e e m a n n, P o p o v i c i (9)), pokazala su da terpeni nižih stupnjeva polimerizacije do uključivo triterpena nastaju direktno u citoplazmi stanica, koje ih izlučuju. Time je oborena teorija T s c h i r c h a, da terpeni nastaju u membrani, što je i razumljivo, kako ističe F r e y - W y s s l i n g (4), jer membrani nedostaju energetski faktori za vršenje takve sinteze. Kod stvaranja tetraterpena umjesto nediferencirane citoplazme kao žarište njihove sinteze nastupa morfološki jasno diferencirana i po biokemijskoj aktivnosti od citoplazme različita plastidoplazma (izraz »plastidoplazma«, V o u k i n litt.). Tako je napose kod poznatih biljnih karotinoida, karotina i ksantofila nazočnost specifično formiranih tjelešaca plastidoplazme. t. j. plastida, kao središta njihovog stvaranja već odavno poznata.

Uzme li se u obzir, da mliječni sok sa sadržajem politerpena u citološkom pogledu predstavlja vakuolni sok mliječnih cijevi, kako to naglašava M o l i s c h (8) i u novije doba F r e y - W y s s l i n g (4), postavlja se pitanje, na koji način uopće dolaze zrnca politerpena u taj sok. Nije naime vjerojatno, da bi se tako visoko polimerizirani spoj, kao što je kaučuk mogao stvarati u biokemijski slabo aktivnom vakuolnom soku, a bez neposrednog djelovanja protoplazme, to više što je intraplazmatski postanak nižih terpena također dokazan. Premda je činjenica, da u mliječnim cijevima nema oštre granice između plazmatskog obloga i centralnog vakuolnog prostora, t. j. da nema razvijenog izrazitog tonoplasta, dokazala su istraživanja B o b i l i o f f - a i P o p o v i c i - j e v e (9), da zrnca kaučuka nastaju upravo u perifernim slojevima, dakle sasvim sigurno intraplazmatski kao i ostali terpeni. Zrnca kaučuka dospijevaju dakle tek sekundarno u centralni vakuolni prostor ispunjen serumom mliječnog soka. Sasvim sličan razvoj konstatirao je M a n g e n o t (6) za poznata

štapicaستا škrobna zrnca euforbijacea. I ta zrnca nastaju intraplazmatski te istom naknadno dospijevaju u serum mliječnog soka. Razlika je samo u tome, što se na spomenutim škrobnim zrnima mogu zapaziti ostaci plastidne mase, dok kod zrnaca kaučuka u spomenutim istraživanjima to nije bilo zapaženo.

Unatoč tomu, što nije bilo citoloških dokaza, iznosi Frey-Wyssling (4) mišljenje, da zrnca kaučuka također nastaju plastidogeno, i osniva to na slijedećim činjenicama:

Prvo, kaučukova zrnca različitih biljaka često su specifično formirana, kao i škrobna zrnca. Tako su kod smokve (*Ficus carica*) i gumijevca (*Ficus elastica*) kuglastog oblika, kod kaučukovca (*Hevea brasiliensis*) kruškolikog ili kapljevitog oblika, kod manihota (*Manihot Glaziovii*) kao štapići ili batići. Kako je na pr. Mangenot (6) dokazao za euforbijski škrob, da su njegovi specifični štapičasti ili dvoglavi oblici uvjetovani djelovanjem plastidne mase na polovima škrobnih zrnaca, to bi i za kaučukova zrnca mogla postojati slična mogućnost.

Drugo, ispitivanja kaučukovih zrnaca mikromanipulatorom Freundlich-Hauser (3), pokazala su, da njihova masa nije u cijelosti jednake konzistencije, nego da se može razlikovati mehanika jezgra od čvršćeg izvanjeg sloja. Hauser povlači iz toga zaključak, da je stupanj polimerizacije kaučuka u jezgri zrnca manji nego na površini, odnosno, da se može razlikovati neka vrst unutarnjeg sol-kaučuka i vanjskog gel-kaučuka. Frey-Wyssling (4) međutim ističe mogućnost, da se može raditi i o dvije posve različite tvari, te da izvanji sloj može predstavljati plastidni ostatak.

Kaučukova zrnca pokazuju nadalje znakove rasta i promjene oblika u toku stvaranja biljke. Tako na pr. u mladim biljkama kaučukovca (*Hevea brasiliensis*) stoje na granici mikroskopske vidljivosti, dok u odraslim stablima mjere 1—2  $\mu$  u promjeru. Postoji dakle mogućnost, da se i na njima, kao i na škrobu, zadržava plastidni ostatak, koji uvjetuje njihov daljnji rast.

Konačno i brojna istraživanja lateksa fizikalnim makrometodama (ispiranje, centrifugiranje i sl.), pokazala su, da se kaučukova zrnca i nakon posvemašnjeg odstranjenja seruma ne mogu posve osloboditi stanovitog proteinskog ostatka, koji na pr. kod hevea-kaučuka iznosi 2—3%. Prema tome ovaj postotak proteina vezan je čvrsto uz sama kaučukova zrnca i može se ukloniti jedino kemijskim putem, t. j. ekstrakcijom kaučuka specifičnim otapalima. Mikrokemijska istraživanja kaučukovih zrnaca kod vrste *Ficus elastica* (Preyer) i *Castilloa elastica* (Weber), pokazala su nadalje, da njihov površinski sloj daje proteinsku mikrokemijsku reakciju.

Molisch (8) je zapazio, da nakon otapanja kaučukovih zrnaca kod vrsta *Ficus carica* i *Broussonetia papyrifera* zaostaje od svakog zrnca neki netopivi ovoj, tvorno različit od jezgre zrnca. Nadalje konstatira Molisch, da kaučukova zrnca od vrste *Ficus elastica* i mnogih drugih biljaka daju Raspailovu reakciju, no on tu reakciju ne dovodi u vezu s proteinima, nego je smatra značajnom za sam kaučuk.

Na temelju tih opažanja zaključuje Frey-Wyssling (4), da kod stvaranja kaučuka i uopće politerpena u biljci plastidi mora da imaju odlučnu ulogu, premda za to nema direktnih citoloških dokaza. Ova je misao još i u toliko vjerojatnija, što već i tetraterpeni, koji su po stupnju polimerizacije mnogo niži, nastaju plastidogeno.

Svoju prvu potvrdu našla je teorija Frey-Wyssling-a u istraživanjima Prokofjev-a izvršenim na kaučukovim zrcima ruskog kaučukovca tau-sagiza (*Scorzonera tau-saghyz*). Prokofjev (11), polazeći s istog stanovišta kao i Frey-Wyssling konstatira u prvom redu, da kaučukova zrnca tau-sagiza kod 3—4 tjedna starih biljaka dosižu maksimalno veličinu od 1  $\mu$ , dok kod 2—4-godišnjih biljaka može ona iznositi i do 15  $\mu$ . Oblik zrnaca također se tokom razvoja mijenja. Slične odnose veličina i oblika bilježi Prokofjev i za kaučukova zrnca krim-sagiza (*Taraxacum megalorrhizon*) i kok-sagiza (*Taraxacum kok-saghyz*). Daljnja citološka istraživanja pokazala su konačno, da se razmjerno jednostavnim metodama može u kaučukovim zrcima tau-sagiza morfološki jasno diferencirati kaučukova i proteinska komponenta. Proteinska komponenta kod toga tipa formirana je kao temeljna stroma kaučukovog zrnca, u kojoj su razasuti brojni sitni djelići čistoga kaučuka. Ona se daje obojiti jodom, gencijanavioletom i kiselim fuksinom i daje karakterističnu mikrokemijsku reakciju na proteine po Zacharias-u.

## II.

Gotovo istovremeno sa publiciranjem spomenute najnovije radnje Prokofjeva (11), započeo sam u proljeću 1946. vlastitim istraživanjima morfologije i postanka kaučukovih zrnaca kod smokve (*Ficus carica*) i gumijevca (*Ficus elastica*). Obje ove biljke karakterizirane su obilnim izlučivanjem mliječnog soka sa dosta visokim postotkom kaučuka. Napose *Ficus elastica*, koji se i praktično iskorištava, sadrži u mliječnom soku i do 30% kaučuka, dok količina kod *Ficus carica* dosiže kojih 10 do 12%.

Na svježim mliječnim sokovima obiju biljaka izvršena su mikroskopom slijedeća osnovna opažanja:

*Ficus carica*. Najjednostavniji preparati priređivani su tako, da se sitna kapljica mliječnog soka kapne u destiliranu vodu na objektno staklo. Kaučukova zrnca dispergirana su jednolično u vodi, te ne pokazuju naročitu sklonost agregiranju. Njihov je oblik pravilno kuglast, a veličina im varira od 2—8  $\mu$ . Prozirna su, slabo zelenkaste boje i optički posve homogena. Na njima se ne zamjećuje nikakvih strukturnih pojedinosti.

Preparati nerazrijeđenog mliječnog soka zbog velike množine kaučukovih zrnaca nepregledni su, ali se bitno ne razlikuju od razrijeđenih.

Najjednostavnije, a ujedno vrlo dobro fiksiranje mliječnog soka vrši se formolom. Kod toga nema opasnosti, da će doći do otapanja kaučuka, a niti do nepodesnih obojenja. Fiksiranje se može izvršiti na slijedeći način: Mala količina mliječnog soka (vršak tankog staklenog štapića) kapne se na pokrovno stakalce i na zraku sasuš. Zatim se zajedno sa stakalcem uroni na 5 min. u 10%-tni formol (= 4%-tni formaldehid), ispere u vodi, ponovno sasuš i motri u glicerinu. Rub fiksirane kapljice sastoji se samo od jednog sloja kaučukovih zrnaca. Zrnca su gusto natisnuta jedno do drugoga, oblik im je nepromijenjen, struktura se ne zamjećuje nikakva. Na rubu se zapaža, da zrnca leže u koaguliranoj prozirnoj, fino zrnatoj masi seruma mliječnog soka. Međusobno stapanje kaučukovih zrnaca zamjećuje se dosta rijetko.

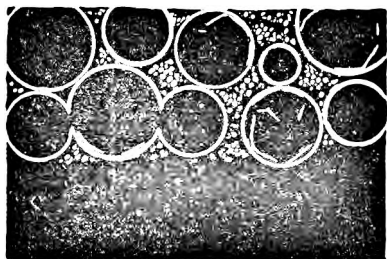
Ako se fiksirani i posušeni preparat uroni na 5 min. u eter, benzol ili koje drugo otapalo za kaučuk, zatim sasuš i onda motri u glicerinu, dobiva se bitno različita slika, jer je kaučuk u tome slučaju otopljen, te se na svakome mjestu, gdje je bilo kaučukovo zrnce vidi okrugla šupljina istoga oblika, koja može biti ispunjena zrakom.

*Ficus elastica*. Preparati svježeg mliječnog soka ove biljke priređeni i motreni na isti način pokazuju razlike od onih smokve. Kaučukova zrnca pokazuju veću sklonost agregiranju, oblik im često nije sasvim pravilno kuglast, nego može biti i polijedričan. Veličina im varira od 1,5—5  $\mu$ . Često se zamjećuje međusobno stapanje kaučukovih zrnaca. Serum nije tako gust, te se i u fiksiranim preparatima teško zamjećuje. U posušanim preparatima se pojavljuju brojni lepezasti kristali. Kao što se zamjećuje stapanje samih kaučukovih zrnaca, tako se u eterom ispranim preparatima mjesto samih pojedinačnih šupljina kao kod *Ficus carica*, zamjećuju i veće nepravilne šupljine.

## Istraživanja mikroskopom u tamnom vidnom polju

Istraživanja mikroskopom u tamnom vidnom polju provedena su sa svrhom, da se optičkim načinom ustanovi, da li se površinski sloj kaučukovog zrnca vlada u svakom smislu diferentno od njegove jezgre, t. j., da li on predstavlja samo kaučuk višeg agregatnog stanja kako to drže *F r e u n d l i c h* i *H a u s e r*, ili se može smatrati posebnim mehanički jasno izdvojenim i tvarno različitim slojem.

Kod istraživanja upotrijebljen je Reichertov katoptrički kondenzor za tamno vidno polje i uljna imerzija 18b. ( $n_A = 1,30$ )



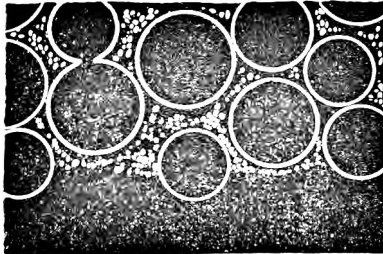
*Sl. 1*      *Fig. 1*

Preparati motreni na ovaj način pokazali su slijedeće:

*F i c u s c a r i c a*. Glicerinski preparati mliječnog soka bez fiksiranja, izvedeni tako, da se kapljica svježeg soka posuši na stakalcu i motri direktno u glicerinu, pokazali su na rubu kapljice jasna, potpuno okrugla kaučukova zrnca natisnuta gusto jedno do drugoga. Njihov je oris svjetao, nutrino optički posve prazna (tamna). Medium između zrnaca također je optički prazan, t. j. serum se ne vidi. On je prema tome ili otopljen u glicerinu ili bez ikakve strukture. Kaučukova zrnca su mjestimično međusobno slijepljena. Na granici slijepljivanja ne vidi se nikakva ili tek vrlo tanka lamela.

Formolom fiksirani i u glicerinu motreni mliječni sok pokazuje u tamnom vidnom polju kaučukova zrnca po veličini i obliku nepromijenjena. Rub (oris) im je svjetao, nutrino većinom optički prazna, ali se mjestimično pojavljuju refleksi kao od bridova. U mediumu između zrnaca zamjećuje se sitna granulacija koaguliranog seruma. (*Sl. 1*).

Formolom fiksirani i benzolom isprani glicerinski preparati daju sada slijedeću sliku: U fino granuliranom mediju leže okrugla tjelešca jasno osvijetljenog ruba, po obliku i veličini potpuno slična kaučukovim zrcima. Njihova je unutrašnjost optički posve prazna kao i u prvom preparatu. Kako je kaučuk uklonjen benzolom, jasno je, da ona tjelešca koja su omeđena svjetlim okruglim rubovima nisu više potpuna kaučukova zrnca, nego šuplji mjehuri, koji u stvari predstavljaju samo površinske slojeve odnosno ovoje nekadanjih zrnaca. Fiksiranjem koagulirana masa površinskog sloja, koja sačinjava te mjehure i u ovom slučaju reflektira svjetlost, oduprla se otapanju benzolom, te prema tome ne predstavlja posebnu gel-formu kaučuka, nego je vjerojatno proteinskog karaktera. (Sl. 2.)



Sl. 2      Fig. 2

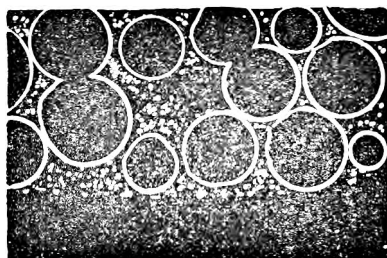
Osobito jasno objašnjavaju ove pojedinosti i trajni preparati u kanadskom balzamu. Formolom fiksirani preparat mliječnog soka ispere se apsolutnim alkoholom, zatim ksilolom i uklopi u kanadski balzam. Ksilol djeluje ovdje kao i benzol, otapajući kaučuk. Mjehuri kao i u predašnjem preparatu jasno su vidljivi, optički prazni, leže u difuzno-sivom mjestimično fino-zrnatom mediju.

*Ficus elastica*. Glicerinski preparat bez fiksiranja, izveden kao i kod *Ficus carica*, pokazuje kaučukova zrnca natisnuta jedno kraj drugoga. Po obliku nisu uvijek okrugla, nego ponekad kao grudice sa mjestimičnim izbočinama. Uslijed nepravilnog oblika mogu se osim svjetlog ruba na gornjoj površini zamijetiti pojedini osvijetljeni bridovi, koji daju utisak, kao da nutrina zrnca nije optički prazna, premda ona to u stvari jest. Medium između zrnaca optički je prazan. Mjestimično vide se lepezasti kristali.

Formolom fiksirani glicerinski preparat sličan je predašnjem, tek su zrnca nešto bliže natisnuta jedno do drugoga. Osim toga zamjećuje se fino granulirani medij. (Sl. 3.)

Preparati formol-benzol-glicerin daju kao i kod *Ficus carica* sliku praznih mjehurića. Za razliku od *Ficus carica* mjehurići su ovdje vrlo tanki, a mogu biti natisnuti tijesno jedan do drugoga, tako da poprimaju izgled sačastog tkiva. Prema diskontinuitetu svjetlih rubova, vidi se, da su mjehurići mjestimično ili razoreni, ili da ih uopće nema. Granulacija seruma slabo je vidljiva i to samo na mjestima gdje mjehurići nisu odviše gusto natisnuti. Zamjećuju se i veće optički prazne nepravilne šupljine, koje označuju mjesta, gdje je odjednom isprano nekoliko zajedno slijepjenih kaučukovih zrnaca, od kojih nisu zaostali nikakvi mjehurasti ostaci. (Sl. 4.)

Trajni preparati priređeni kao i kod *Ficus carica* (formol-alkohol-ksilol-kanadski balzam) osobito su instruktivni. Ako su



Sl. 3      Fig. 3

preparati načinjeni od nešto veće kapljice soka, zamjećuje se na njima često fino granulirani medij (serum) i u njemu veoma tanki mjehurići. Mjestimično zamjećuju se međutim i takove šupljine, koje po obliku odgovaraju mjehurićima, ali ne pokazuju nikakav svjetli rub, nego su samo omeđene pravilno porudanom granulacijom seruma. Takva mjesta dokazuju, da je bilo i kaučukovih zrnaca bez ikakvog posebnog površinskog sloja. Na drugim se pak mjestima vide samo polukružni, a ne potpuni svjetli rubovi, kao da su pojedina kaučukova zrnca bila samo djelomično omotana ovim proteinskim ovojem.

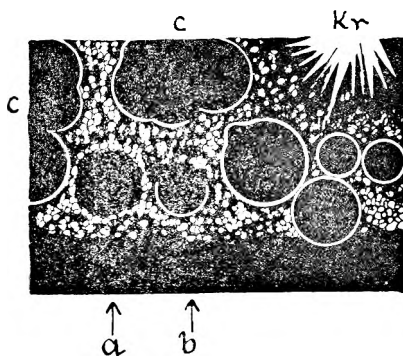
Istraživanja u tamnom vidnom polju dokazuju dakle, da su kaučukova zrnca obiju biljaka u svojoj jezgri izgrađena iz homogene mase kaučuka, koja je omotana posebnim, tvorno i mehanički jasno odvojenim ovojem. Taj ovoj zamjećuje kod



*Ficus carica* već *Molisch* (8), a dokazuju ga i *Hauserovi* pokusi mikromanipulatorom. Kako *Molisch* (8) za kaučukova zrnca obiju fikusa navodi karakterističnom *Raspailovu* reakciju, a *Preyer* također konstatira proteine u površinskim slojevima, to postoji znatna vjerojatnost, da je zapaženi ovoj izgrađen iz proteinske tvari. Tome u prilog govori i njihova homogena fiksacija formolom, kao i netopivost u otapalima kaučuka.

### Obojenje ovoja kaučukovog zrnca kiselim fuksinom

Obojenje kiselim fuksinom izvedeno je zbog toga, da se ovoj kaučukovog zrnca, zapažen mikroskopom u tamnom vidnom polju, pokuša običnom citološkom metodom morfološki diferentno istaknuti.



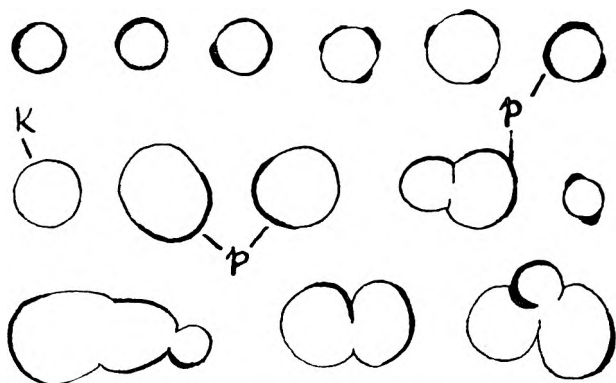
Sl. 4 Fig. 4

Kiseli fuksin smatra se veoma podesnim za obojenje proteinskih granula i kristaloida te leukoplasta. Za obojenje proteinskih ovoja kaučukovih zrnca pokušao je slijedeći postupak:

*Ficus carica*. Na pokrovnom stakalcu načini se staklenim štapićem tanki razmaz svježeg mliječnog soka i ubaci u zasićenu vodenu otopinu pikrinske kiseline. Fiksiranje 5 min. Slijedi ispiranje 50%-tnim alkoholom 1 min., bojadisanje vodenom otopinom kiselog fuksina 1 : 500 kroz 24 sata, ispiranje u 0,5%-tnoj HCl oko 1 min. (kontrolirati pod mikroskopom dok se ne dobije dobra diferencijacija!), zatim kratko ispiranje u 50%-tnom alkoholu. Suvišni alkohol ocijedi se na filterpapir i stakalce metne sušiti na zrak, tako da prašina ne pada po objektu. Uobičajeni prelazni mediji apsolutni alkohol-ksilol ne mogu se upotrijebiti, jer bi se kaučuk otopio. Kad se stakalce

s razmazom potpuno sasuš (1—2 sata) uklopi se preparat u kanadski balzam. Kod uklapanja u balzam ne smije se stakalce jako pritisnuti, da se zrnca ne zgnječe. Balzam treba da je rijedak. Obojenje može se motriti i u glicerinu, te onda otpada sušenje preparata.

Preparati izvedeni na ovaj način daju slijedeću sliku: U slabo crvenkasto obojenom koaguliranom serumu leže raspršena kaučukova zrnca. Na velikoj većini zrnaca, koja su u svojoj unutrašnjosti bezbojna, vidi se jasno tanki crveni ovoj. Taj ovoj nije sasvim jednake debljine, nego je obično na jednoj strani kapičasto, polumjesečasto ili polukružno odebljao (Sl. 5). Mjestimično se vide kaučukova zrnca, na kojima kapičasto odebljanje ovoja izgleda kao posebno sitno crveno zrnce, koje je tijesno



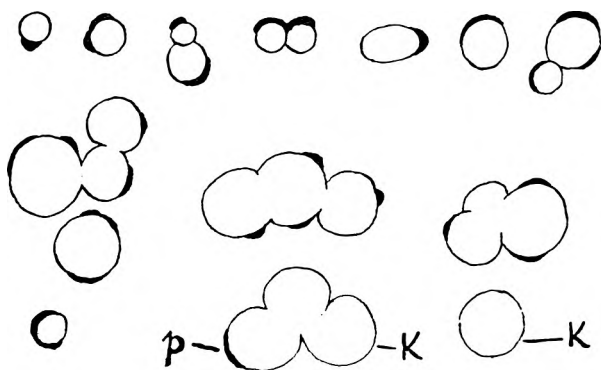
Sl. 5 Fig. 5

prilegnuto na površinu kaučuka. Osim toga imade kaučukovih zrnaca koja ne pokazuju nikakvog ovoja ili tek vrlo tanki ostatak. Općenito manja zrnca imadu nešto deblji ovoj ili izrazitija kapičasta odebljanja od većih zrnaca. Zrnca s tanjim ovojem ili bez njega pokazuju ujedno češće sljepljivanje. Na prvi pogled može se konstatirati velika sličnost tih kapičastih odebljanja s amiloplastima.

*Ficus elastica*. Preparati mliječnog soka *Ficus elastica* priređeni na isti način, daju sasvim sličan rezultat. Primjećene su samo slijedeće razlike: Kod *Ficus elastica* ne vidi se koagulirani serum, ili su ga tek vrlo nezatni ostaci. Kaučukova zrnca se uslijed toga nemaju za što zalijepiti, te se kod postupka lakše ispiru sa stakalca. Ona pokazuju znatnu sklonost međusobnom agregiranju. Njihovi su ovoji nedvojbeno znatno

tanji nego oni kod *Ficus carica*, no kapičasta odebljanja lijepo su razvijena i dobro vidljiva. (Sl. 6.) Imade zrnaca, koja nisu sasvim ovijena, nego se crveni ostatak ovoja drži samo na jednom dijelu zrnca.

Rezultati tih obojenja slažu se potpuno s opažanjima u tamnom vidnom polju. Površinski sloj kaučukovog zrnca, koji se distinktno bojadiše kiselim fuksinom, predstavlja istu tvar zapaženu kao mjehurasti ostatak kaučukovog zrnca u tamnom vidnom polju. Veliki afinitet prema kiselom fuksinu i sličnost obojenja s onim proteinskih granula, daje naslućivati, da je i taj površinski sloj proteinskog karaktera, što je također u skladu s prijašnjim opažanjima, kao i sa spomenutim mikrokemijskim osobinama, koje navode *M o l i s c h* (8) i *P r e y e r*. Prema tome



Sl. 6 Fig. 6

Raspailova reakcija, koju *M o l i s c h* navodi kao karakterističnu, za sam kaučuk, u stvari je samo reakcija tog proteinskog sloja. Dokazom o egzistenciji proteinskog ovoja otpada također i Hauserova teorija o posebnom površinskom gel-kaučuku. Premda su ta istraživanja kao i ranija Prokofjevova izvršena na drugim objektima, vjerojatno je da kod kaučukovih zrnaca vrste *Hevea brasiliensis*, koja je ispitivao *H a u s e r*, vladaju slični odnosi.

Kao osobito zanimljivu činjenicu valja istaknuti spomenuta kapičasta, polumjesečasta i zrnata odebljanja, koja se tako često zapažaju na proteinskom ovoju kaučukovih zrnaca. Kako je spomenuto, sličnost tih tvorevina s amiloplastima i s drugima vrstama leukoplasta neobično je velika. Zbog toga, premda se na temelju tih opažanja još ne može izvesti konačan zaključak,

nameće se veoma opravdana misao, da kapičaste tvorevine, zajedno sa čitavim proteinskim ovojem predstavljaju plastidni ostatak. Teorijska priprema za takvu mogućnost, kako je iznosi Frey-Wyssling (4), nadalje naslućivanja Barrona (1) i Memmlera (7) o važnosti proteinskog sloja, kao i nalazi proteinske strome na kaučukovim zrnima tau-sagiza, koji su Prokofjevu (11) poslužili kao dokaz za mogućnost plastidogenog porijekla kaučuka, nalaze ovdje svoju najbolju i morfološki najjasnije izraženu potvrdu. Zanimljivo je također, da kaučukova zrnca manjeg promjera, kako je spomenuto naročito za *Ficus carica*, imaju relativno deblji proteinski ovoj nego potpuno izrasla. Osim toga zapažena su kod oba fikusa zrnca bez ovoja, ili sa djelomičnim ostatkom. Te pojave govore također u prilog mišljenju, da se tu radi o plastidnom ostatku. Kaučukova zrnca manjeg promjera ujedno su i mlada, o čemu govore i podaci Prokofjeva (11) za tau-sagiz i druga opažanja. Nebi dakle bilo neobično, da manja zrnca imaju relativno veću količinu plastidne mase, kao što i mlada škrobna zrnca zapažamo isprva u krilu relativno većeg amiloplasta. Ostatak proteinskog odnosno plastidnog ovoja oko čitavog zrnca sve do njegove potpune zrelosti, ukazivao bi na to, da kaučuk analogno škrobu nastaje ne samo intraplazmatski, nego i intraplastidno, a ne površinski.

Daljnja istraživanja izvršena kao nastavak tih osnovnih opažanja imala su svrhu što boljeg morfološkog i mikrokemijskog razlikovanja kaučuka od proteinske mase i konačno traženje inicijalnih stadija postanka kaučukovih zrnaca.

### Dvostruko obojenje kaučukovog zrnca kiselim fuksinom i klorofilom

Pokušaji dvostrukog obojenja vršeni su s tom namjerom, da se postigne što bolji kontrast obiju komponenata kaučukovog zrnca.

Mikrokemijsko dokazivanje kaučuka već je od prije predstavljalo znatnu poteškoću. Ako se izluči Raspailova reakcija, koja prema iznesenim opažanjima nije karakteristična za sam kaučuk, nego za proteinski ovoj, preostaju kao donekle upotrebljive mikroreakcije samo obojenja alkanom, sudanom i osmijevim tetroksidom. Sva ta obojenja međutim nisu specifična za kaučuk, nego se primjenjuju i za masne tvari i za smole. Jedina prava mikrokemijska reakcija, opisana tek u novije doba, jest reakcija bromiranjem po Prokofjevu (10). Djelovanje ele-

mentarnog broma na kaučuk stvara se kaučukov bromid. Eventualne primjese smola uklanjaju se smjesom ugljikovog tetraklorida (CCl<sub>4</sub>) i etilnog alkohola (1 : 1), u kojoj kaučukov bromid nije topiv. Na taj način zaostaje u preparatu tamno-smeđi kaučukov bromid. No uslijed kristaliničnih osobina kaučukovog bromida znatno se mijenja izgled kaučukovog zrnca, nadalje kod postupka redovno dolazi i do koaguliranja kaučuka, tako da se morfološki individualitet zrnaca, a naravno i njihove strukturne pojedinosti posve izgube. Prema tome ta reakcija za navedenu svrhu nije upotrebiva. Obojenja alkanom i sudanom sama su crvenkasta, te sa crveno obojenim ovojem ne daju nikakav kontrast. Obojenje (reakcija) osmijevim tetroksidom na kaučuku je prema onoj na lipidima i smolama odviše slaba, te isto ne daje dovoljan kontrast.

Obojenje masnih tvari klorofilom, kao i njegova netopivost u vodi, navelo me na pokušaje, da ispitam mogućnost obojenja hidrofobnih kaučukovih zrnaca ovom bojom. Rezultati ovih pokušaja su pozitivni. Kod oba objekta, koje sam istraživao, kaučukova zrnca mogu se obojiti klorofilom. Naravno, da se ovo obojenje kao i ono sudanom i alkanom odnosi samo na jezgru zrnca (kaučuk), dok ovoje ostaje neobojen.

Obojenja kaučuka direktno u mliječnom soku vrsta *Ficus carica* i *Ficus elastica* vršio sam običnim sirovim klorofilnim ekstraktom na sljedeći način:

Močenjem trave kroz 3—4 dana u hladnom 96%-tnom alkoholu načini se tamni klorofilni ekstrakt. Ekstrakt se filtrira i neposredno pred upotrebu pomiješa se potrebna količina (nekoliko ccm) sa destiliranom vodom u omjeru 1 : 1, tako da se dobije otopina klorofila u cca 50%-tnom alkoholu. Ta je smjesa dosta nestalna i brzo se taloži, ali za jedno obojenje dostaje. Na pokrovnom stakalcu načini se razmaz mliječnog soka i ubaci u ovu otopinu. Nakon 15 min. bojadisanje je gotovo. Preparat se brzo ispere u 50%-tnom alkoholu i zatim u vodi. Motri se u vodi ili glicerinu. Kaučukova zrnca obojena su intenzivno zeleno. Trajni preparati u kanadskom balzamu ne mogu se načiniti zbog topivosti klorofila u njemu.

Da se postigne traženo kontrastno obojenje kaučuka i proteinskog ovoja postupak je sljedeći: Sježi mliječni sok fiksira se pikrinskom kiselinom na uobičajeni način. Nakon ispiranja u 50%-tnom alkoholu slijedi bojadisanje klorofilom kao gore, ispiranje u vodi, bojadisanje vodenom otopinom kiselog fuksina 1 : 500 kroz 15 min., ponovno ispiranje u destiliranoj vodi (ne u HCl!) i konačno motrenje u glicerinu. Rezultat: jezgra kaučuko-

vog zrnca intenzivno je zelene boje, ovoj crvene. Kontrast je vrlo efektan. Motriti treba kod danjeg svjetla ili kod svjetiljke s modrim filterom.

Prema tim obojenjima može se zaključiti, da je klorofil, ako i ne specifični, ali svakako vrlo dobar mikrokemijski reagens za kaučuk. Dvostruko obojenje nadalje u morfološkom i kemijskom pogledu jasno diferencira ovoj od jezgre kaučukovog zrnca i time potvrđuje ranije iznesena opažanja.

### Redukcija srebrovog nitrata u ovoj u kaučukovog zrnca

U nizu istraživanja, koja su imala za cilj da se kontrastno istakne proteinski ovoj kaučukovog zrnca, posebno mjesto zauzimaju pokusi impregniranja srebrovim nitratom ( $\text{AgNO}_3$ ).

Impregniranje izvedeno je na kaučukovim zrnima vrsta *Ficus carica* i *Ficus elastica* na ovaj način: Razmaz posve svježeg mliječnog soka na pokrovnom stakalcu ubaci se u 1%-tnu otopinu  $\text{AgNO}_3$  i drži u mraku najmanje 3 dana. Zatim se u mraku ispere u destiliranoj vodi i mećne sušiti na zrak u svjetloj prostoriji. Potpuno suhi preparat uklopi se u kanadski balzam i motri. Rezultat: ovoji kaučukovih zrnaca zajedno s kapičastim odeblanjima obojeni su smeđe uslijed nazočnosti elementarnog srebra. Duljim stajanjem preparata na svjetlu intenzitet obojenja se pojačava do stanovitog maksimuma, tako da su ovoji neposredno nakon vađenja iz  $\text{AgNO}_3$  žućkasto-smeđi, a kasnije postaju tamno-smeđi. To dokazuje, da se redukcija srebra produžuje i naknadno u dogotovljenom preparatu.

Sa deskriptivno-citološkog stanovišta ovo opažanje zadovoljava samo po sebi, jer je kontrastno obojenje ovoja time postignuto. No veoma je teško dati poblizu analizu i objašnjenje procesa, koji se tu zbiva, premda je sigurno, da bi za objašnjenje kemijske aktivnosti proteinskog ovoja bilo to veoma važno.

Jednostavan postupak pokazuje, da se ovdje ne radi o posrebrivanju (impregniranju) po poznatim Cajalovim metodama, jer se redukcija srebra ne vrši razvijanjem, nego nastupa u preparatu sama od sebe. Nedvojbeno je dakle, da se radi o procesu, koji bi se mogao označiti kao »samoposrebrivanje« preparata. Posrebrivanje te vrste rjeđa je pojava, a zbiva se na taj način, da se impregniranjem sa fotokemijski neosjetljivim  $\text{AgNO}_3$  stvaraju u stanovitim strukturama preparata osjetljivi srebrovi spojevi, koji se mogu lako reducirati djelovanjem svjetla ili različitih kemijskih agensa. U ovoj u kaučukovog zrnca vjero-

jatno se radi o nekoj sličnoj pojavi. Da li je konačna redukcija srebra u tom ovoju samo kemijski ili posebno fotokemijski proces, teško je zaključiti. Činjenica je, da se početak redukcije zbiva već u mraku, jer su ovoji malo obojeni već u momentu vadenja preparata iz  $\text{AgNO}_3$ . Prema tome je vjerojatno, da se u ovovima nalaze i takve tvari, moguće encimskog karaktera, koje neposredno reduciraju srebro iz novo nastalih osjetljivih spojeva. Da se međutim ta redukcija u pojačanoj mjeri nastavlja i dalje djelovanjem svjetlosti, dokazuje naknadno tamnjenje ovoja. Preparati impregnirani od početka na svjetlu pokazuju obilno izlučivanje elementarnog srebra i ne daju se distinktno impregnirati. Zbog toga je bolje i za razumijevanje i za kontrolu toka procesa, a i za konačni efekt impregniranja, da postupak počne u mraku i da se po vadenju na svijetlo suvišni  $\text{AgNO}_3$  odmah ispere, kako je to prije navedeno.

Prema analognim rezultatima samoposrebrivanja drugih svježih objekata, pokusi na kaučukovim zrcima dokazuju također proteinski karakter ovoja. No nije isključeno, da upravo ova metoda dokazuje i njihov plastidni karakter. Poznato je, da se redukcija srebrovog nitrata osobito intenzivno vrši i u kloroplastima (M o l i s c h, E r t l 2), kod čega se također radi o procesu samoposrebrivanja. Moguće je da i drugi oblici plastidoplazme pokazuju sličnu sposobnost redukcije srebrovih spojeva, odnosno drugačije rečeno, da bi se intenzivna redukcija srebrovih spojeva mogla smatrati značajnom za plastidoplazmu.

### Istraživanje početnih stadija razvoja kaučukovih zrnaca

Sva naprijed iznesena opažanja izvršena su na mliječnim sokovima, koji su dobiveni zarezivanjem istraživanih biljaka i sakupljenih u manjim količinama u epruvete. Od ove osnovne mase mliječnog soka pravljeni su preparati kapanjem ili razmazom na poznati način. Kaučukova zrnca mliječnog soka, koji teče iz zarezane biljke nisu sva jednake veličine, no ona su uglavnom sva u zaključnim fazama rastanja. Imade doduše zrnaca s debljim ili tanjim proteinskim ovojem, no ti su ovoji, odnosno plastidni ostaci, po svojoj masi relativno manji od mase kaučuka, koju omataju. Kako je međutim poznato (P o p o v i c i. 9) da kaučukova zrnca nastaju u plazmatskom oblogu mliječnih cijevi, a tek sekundarno padaju u centralni vakuolni prostor i dispergiraju se u serumu mliječnog soka, jasno je, da se među kaučukovim zrcima samoga mliječnog soka ne može tražiti

njihove početne razvojne stadije. Kako plazmatski oblog zaostaje u mliječnim cijevima i nakon ispražnjenja soka iz njih (Molisch, 8), treba inicijalne stadije tražiti na histološkim preparatima intaktnih mliječnih cijevi, a ne u iscijeđenom mliječnom soku.

U tome pravcu vršena su istraživanja na mliječnim cijevima kod vrste *Ficus carica*, koja ovdje iznosim:

Plodovi (cvatovi) smokve različite zrelosti odrezani su i ubacivani čitavi direktno u 10%-tni formol, ali tako brzo, da iz njih nije moglo isteći gotovo ništa soka. Odmah po ubacivanju u formol prestalo je uslijed fiksiranja izlaženje soka iz ploda, te se moglo predmnijevati (a to se kasnijim istraživanjima i potvrdilo), da se u mliječnim cijevima, koje su podalje od rezne plohe, nalazi još čitava i netaknuta sadržina. Tom prilikom ustanovljeno je, da iz posve zrelih plodova uopće ne teče mliječni sok. Zbog boljeg konzerviranja prerezani su neki plodovi nakon 14 dana uzdužno po polovici i preneseni u čisti formol iste jakosti.

Nakon konzerviranja od kojih mjesec dana pravljeni su iz posve mladih plodova (promjera kojih 2 cm) uzdužni radijarni prerezi i to neposredno kraj otvora ploda, dakle na suprotnoj strani od rezne plohe. Moglo se je predmnijevati, da iz toga dijela ploda nije isteklo ništa soka, a osim toga se na tome mjestu nalaze završeci mliječnih cijevi, koje ulaze kroz držak u plod ili započinju u nodiju ploda. Pokazalo se, da je mjesto prereza dobro odabrano. Takvim rezanjem dobivaju se u preparatima mliječne cijevi u uzdužnom položaju. One se granaju sve do ispod površine ploda i upravo pod samom površinom zapažaju se njihovi završni ogranci. Ovi ogranci potpuno odgovaraju postavljenom zahtjevu, te se u njima odvijaju početni stadiji stvaranja mliječnog soka, a s time u vezi i kaučuka.

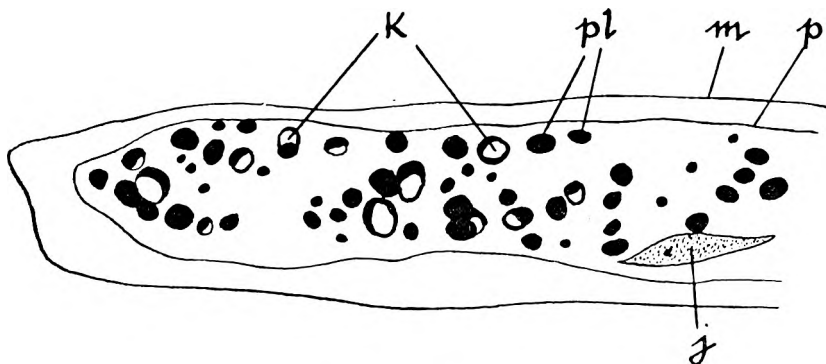
Prerezi motreni su najprije neobojeni, nakon kratkog ispiranja vodom, u vodi ili glicerinu. U sadržini najtanjih ogranka ne može se na taj način vidjeti nikakvih pojedinosti, osim gotovo posve prozirne koagulirane mase. U debljim mliječnim cijevima vidi se gusto nabijena masa kaučukovih zrnaca, što dokazuje, da je uslijed fiksacije formolom zadržana i u debljim mliječnim cijevima čitava sadržina, t. j. plazmatski oblog i koagulirani serum mliječnog soka zajedno s kaučukovim zrcima.

U nastavku istraživanja izvršeno je bojadisanje preparata na slijedeći način: Prerezi nakon dobrog ispiranja destiliranom vodom dolaze u vodenu otopinu kiselog fuksina 1 : 500. Bojadisanje traje 24 sata. Nakon toga ispiranje u 1%-tnoj vod. otopini pikrinske kiseline tako dugo, dok otpuštaju od sebe



oblačiće boje (prema debljini prereza 1—5 min.), ispiranje u 50%-tnom alkoholu 15—30 min. i zatim kratko vrijeme (najviše 5 min.) u 96%-tnom alkoholu, samo toliko da se izvrši za preparat potrebno dehidriranje, a da ne dođe do eventualnih neželjenih deformacija kaučukovih zrnaca. Prezezi se umeću zatim u klinčićevo ulje (ne u ksilol!), gdje mogu ostati nekoliko sati i uklapaju u kanadski balzam. Mikrotomska metoda parafinom nije se mogla upotrijebiti zbog otapanja kaučuka u ksilolu.

U preparatima priređenim na taj način vide se mliječne cijevi u uzdužnom položaju. Najtanji ogranci ispunjeni su prozirnom slabo obojenom masom citoplazme, bez izrazite centralne vakuole. U citoplazmi zamjećuju se slabo crvenkasto obojene vretenaste jezgre i brojna, sitna intenzivno crveno obojena okruglasta tjelešca (Sl. 7, pl). Kako su plastidi okolnih stanica



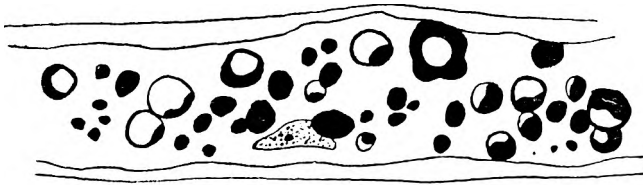
Sl. 7 Fig. 7

također u istom tonu crveno obojeni, može se zaključiti, da su i ova tjelešca elementi plastidoplazme. Već na ovim zrcima vide se mjestimično počeci stvaranja kaučuka, koji se kao mala količina prozirne neobojene mase drži uz ta tjelešca ili u njima. (Sl. 7, k). Ovo opažanje potvrđuje, da kaučuk nastaje u krilu plastidne mase i to uglavnom ekscentrično. Imade zrnaca, kod kojih se čini, da kaučuk nastaje u samom središtu plastida. Tako, gdje se kaučukova masa drži uz plastidna tjelešca, također nije na samoj površini, nego je s druge strane ovijena poznatim ovajem.

Još bolje objašnjavaju početne stadije stvaranja kaučuka opažanja na mjestima, gdje se tanki ogranci mliječnih cijevi postepeno proširuju, ili na nešto debljim mliječnim cijevima. Većina kaučukovih zrnaca ovdje je već potpuno izrasla, te se

na njima zamjećuje samo poznati crveni ovoj. Uz ovaj tip, koji je već ranije opisan iz slobodnog mliječnog soka, opažaju se još i zrnca, na kojima je zaostalo mnogo više plastidne mase. Imade međutim i takvih mjesta, na kojima se mogu vidjeti svi razvojni stadiji kaučukovih zrnaca, od stadija golog plastida, preko raznih faza nagomilavanja kaučuka do posve izraslog zrnca. To temeljno i za postavljeni problem najvažnije opažanje ilustriraju sl. 7 i 8.

Intenzivnim rastom i nagomilavanjem kaučukovih zrnaca ispunjava se lumen mliječne cijevi sve više, tako da već u istim preparatima možemo vidjeti mliječne cijevi potpuno ispunjene onakvim zrcima, kakva su opisana iz iscijeđenog mliječnog soka. Serum u kome ona leže zamjećuje se na takvim mjestima po tome, što je difuzno crvenkasto obojen, no još se mnogo jasnije vidi, ako se kaučuk iz prereza ekstrahira eterom ili benzolom, pa zaostane sačasta masa puna šupljica u kojima su bila kaučukova zrnca.



Sl. 8 Fig. 8

Sva ta opažanja, a napose studij vršnih ogranaka mliječnih cijevi, u kojima se dobro mogu pratiti sve faze postanka i rasta kaučukovog zrnca, dokazuju, da kaučuk kod vrste *Ficus carica* nastaje u posebno formiranim tjelešcima proteinske naravi, koja se po svojoj biokemijskoj aktivnosti mogu smatrati elementima plastidoplazme. Može se dakle zaključiti, da je kaučuk kod vrste *Ficus carica* plastidogenog porijekla.

### III. O s v r t

Kao što je u uvodu ove radnje napomenuto, obuhvaćen je ovdje samo citološki dio problema postanka kaučuka. U osvrtu na vlastita istraživanja, koja su kod smokve (*Ficus carica*) i gumijevca (*Ficus elastica*) u tome pravcu vršena i ovdje iznesena, može se naglasiti, da je pošlo za rukom objasniti nekoje

važne momente morfologije i postanka kaučukovih zrnaca. Zbog pregleda iznosim sumarno još jednom glavne rezultate ovih opažanja:

1) Istraživanje potpuno razvijenih kaučukovih zrnaca mikroskopom u tamnom vidnom polju, dokazala su, da se ona kod obiju biljaka sastoje iz dvije morfološki i tvarno različite komponente, kaučukove jezgre i tankog proteinskog ovoja, koji tu jezgru omata. Time su potvrđena i opažanja Preyera, Webera, Molischa (8) i Prokofjeva (11), na drugim biljkama, s tom razlikom, da se tom metodom može proteinski ovoj uočiti kao distinktni, morfološki jasno izraženi površinski sloj.

2) Metode obojenja kiselim fuksinom dovele su do izražaja stanovite, do sada nepoznate strukturne pojedinosti ovih proteinskih ovoja. Kapičaste i zrnate nabreklinae na njima, koje su veoma slične plastidnim ostacima na škrobnim zrcima, daju naslućivati, da i kod formiranja kaučukovih zrnaca osobito značenje imade plastidoplazma, kako to drži i Prokofjev (11) na temelju svojih istraživanja kod tau-sagiza. Metode obojenja kiselim fuksinom nadopunjene su još posebnim kontrastnim obojenjem samoga kaučuka klorofilom. To obojenje ima i stanovito mikrokemijsko značenje, te ističe ne samo jasan površinski položaj proteinskog sloja, nego i tvarnu razliku obiju komponenata kaučukovog zrnca.

3) U vezi s metodama obojenja ističe se kao metoda sasvim posebnog značaja impregniranje kaučukovog zrnca srebrovim nitratom ( $\text{AgNO}_3$ ). Redukcija srebrovih spojeva, koja se vrši u svim dijelovima proteinskog ovoja i rezultira taloženjem elementarnog srebra u njemu, služi kao sigurni dokaz, da proteinski ovoj svježeg kaučukovog zrnca posjeduje visoku kemijsku aktivnost, koja veoma slični aktivnosti kloroplasta. Redukcija srebrovog nitrata ima dakle osim kao obojenje još i posebni mikrokemijski značaj, te se ističe kao daljnji prilog mišljenju o plastidnoj naravi proteinskog ovoja.

4) Studij početnih stadija razvoja kaučukovih zrnaca direktno u mliječnim cijevima kod smokve omogućio je objašnjenje onih momenata u njihovu razvoju, o kojima se ne može steći predodžba istraživanjem iscijeđenog mliječnog soka izvan biljke. Nazočnost brojnih plastidnih tjelešaca u najtanjim vršnim ograncima mliječnih cijevi, kao i različiti sukcesivni stadiji nagomilavanja kaučuka u krilu tih tjelešaca, te konačna redukcija plastidne mase na samo mjestimično odebljali ovoj kod posve izraslih kaučukovih zrnaca, može se smatrati kao najsigurniji dokaz plastidogenog porijekla kaučuka ovih biljaka.

Teorijsko predmnijevanje Frey-Wysslinga (4) o plastidogenom postanku politerpena i prijašnji nalazi Prokofjeva (11), nailaze u ovim istraživanjima svoju punu potvrdu. Držim da se može smatrati posve sigurnom činjenicom, da kaučuk nastaje plastidogeno. Zanimljivo je također da se u brojnim mliječnim sokovima osim već poznatih amiloplasta i sada pobliže istraženih kaučukovih plastida u velikom broju javljaju plastidi i kao centri stvaranja uljevitih i proteinskih tvari (Molisch, 8). Ova opažanja, kao i opažanja o postanku rezervnih proteina (aleurona) kod drugih biljaka, iako različito interpretirana (Mottier, Vouk 15, Urban 13, 14) ukazuju također na značenje plastidoplazme i na njenu posebnu ulogu kod stvaranja visokomolekularnih ili visoko-polimeriziranih spojeva bez obzira na njihovu kemijsku različnost, a vjerojatno i bez obzira na njihovo fiziološko značenje (sravni: Vouk, 15 str. 40).

Treba međutim naglasiti da biokemijska i fiziološka problematika stvaranja politerpena ostaje i nakon ovih nalaza otvorena. Položaj politerpena u izmjeni tvari i njihov ekskretni karakter, koji nakon istraživanja Bobilioffa, Spence-a, Mac Calluma i Moškine (Frey-Wyssling, 4, 5), te po mišljenju samog Frey-Wysslinga (4, 5) izgleda neprijeoran, pokazuje se sada također u posebnom svijetlu. Bilo bi svakako potrebno ispitati i naći detaljnije objašnjenje donekle paradoksnj pojavi, da se goleme energetske mogućnosti plastidoplazme iscrpljuju na stvaranju čistih ekskreta. Frey-Wysslingova misao (4) o ulozi plastida u vezi s agregatnim stanjem stvorenih spojeva, do sada je jedini prilog objašnjavanju ovoga problema.

Nazočnost plastidnog ostatka na kaučukovim zrcnima, slobodno dispergiranim u serumu mliječnog soka, otvara također ponovno i pitanje, što u stvari predstavlja mliječni sok, t. j. da li se on ima smatrati vakuolnim sokom ili posebnim razrijeđenim oblikom plazme. Iako u novije doba preteže mišljenje, da je mliječni sok vakuolni sok, ipak će pomanjkanje tonoplasta, a ovime sada i nazočnost plastidnih produkata i ostataka, koja za vakuolne sokove nije poznata, zahtijevati stanovito bistrenje ovoga problema. Vjerojatno je, da će opažanja o plastidogenom postanku kaučuka moći ovdje pospješiti rješenje i otvoriti put boljem i jasnijem karakteriziranju mliječnih sokova uopće.

## R É S U M É

# MORPHOLOGIE ET L'ORIGINE PLASTIDIQUE DES GLOBULES DE CAOUTCHOUC CHEZ FICUS CARICA ET FICUS ELASTICA

B o r i s V r t a r

### I. Introduction

Bien que le caoutchouc tienne une place caractéristique dans le métabolisme végétal, son origine n'est pas encore suffisamment expliquée ni au point de vue physiologique ni au point de vue cytologique. Les recherches de B o b i l i o f f (F r e y - W y s s l i n g 4) et de P o p o v i c i (9) ont démontré que le caoutchouc se forme dans les couches périphériques du protoplaste des vaisseaux lactifères, c'est-à-dire d'une manière intraplasmatique, comme les autres terpènes eux-aussi, et qu'il ne tombe qu'ultérieurement dans la cavité vacuolaire centrale, remplie du sérum de latex. Cependant, il n'est pas clair si le processus de la formation des globules du caoutchouc a lieu dans le cytoplasma indifférencié, comme c'est le cas chez des terpènes plus simples (huiles volatiles, résines), ou si ce processus se déroule en présence de la substance plastidique, comme chez les tétraterpènes ou chez l'amidon.

C'est F r e y - W y s s l i n g (4) qui a le premier émis l'hypothèse que les globules du caoutchouc se forment aussi d'une manière plastidique, en fondant son hypothèse sur les faits suivants. 1<sup>o</sup> les globules du caoutchouc ont souvent une forme spécifique, de même que les grains d'amidon; 2<sup>o</sup> on peut distinguer souvent sur ces globules un noyau mou et une couche superficielle particulière, du caractère protéinique, qui peut représenter le résidu de la substance plastidique; 3<sup>o</sup> pendant la croissance de la plante les globules du caoutchouc montrent des signes d'un grossissement successif; 4<sup>o</sup> en éliminant le sérum du latex, les globules du caoutchouc ne peuvent pas être débarrassés d'un certain résidu protéinique (2—3%), ce qui prouve que cette

quantité de la substance protéinique est fortement liée aux globules du caoutchouc.

Mais malgré l'admissibilité considérable de l'hypothèse de Frey-Wyssling, il nous manquait, d'abord, des arguments cytologiques plus exacts. Une couche particulière superficielle d'une dureté plus grande que celle du noyau du globule est constatée chez plusieurs plantes (*Hevea*, *Castilloa*, *Ficus carica*, *Broussonnetia papyrifera*). [v. les travaux de Barron (1), Freundlich & Hauser (2), Memmler (7), Frey-Wyssling (4), Molisch (8)]. Chez *Ficus elastica* seule une certaine couche adsorptive était constatée à l'aide de l'ultramicroscope (Freundlich & Hauser 2). Mais aucun de ces auteurs, à l'exception de Frey-Wyssling et, partiellement, de Memmler, ne mettait cette couche, comme aussi ses caractères protéiniques, en rapport avec la formation des globules du caoutchouc.

L'hypothèse de Frey-Wyssling, fondée sur ces observations, s'est trouvée confirmée pour la première fois par les recherches de Prokofjev (11), qui a démontré l'origine plastidique des globules du caoutchouc chez *Scorzonera taushyzy*.

En même temps que s'accomplissait la publication de ce travail de Prokofjev, je faisais, au printemps et en été 1946, mes propres recherches sur la morphologie et sur l'origine des globules du caoutchouc chez *Ficus carica* et *Ficus elastica*, dont voici les résultats, exposés sommairement:

## II. Méthodes et observations

### Recherches ultramicroscopiques

(Dans ces recherches je me servais d'un ultracondenseur catoptrique de Reichert, avec immersion d'huile Reichert No 18b).

Les préparations sont faites de manière suivante: Une petite goutte de latex sur un couvre-objet est desséchée à l'air. Puis, fixation dans le formol 10%, 5 minutes — lavage dans l'eau distillée — dessèchement de nouveau — éther ou benzol, 5 minutes — dessèchement — glycerine. Ou: formol — l'eau — alcool — xylol — baume du Canada. Résultat: Fig. 2 (*Ficus carica*) et Fig. 4 (*Ficus elastica*). On voit sur les bords de la préparation, que, même après l'extraction au benzol, les enveloppes complètes ou incomplètes des globules du caoutchouc, substantiellement différentes du caoutchouc, restent. Elles sont situées dans le sérum finement granulé.

## Coloration de l'enveloppe du globule de caoutchouc avec la rubine S.

Préparation: On plonge l'enduit du latex frais sur le couvre-objet, dans la solution aqueuse saturée de l'acide picrique (fixation 5 min.). Puis, alcool 50%, 1 min. — rubine S, solution aqueuse 1 : 500, 1 heure — lavage dans l'acide chlorhydrique 0,5%, environ 1 min. (contrôler la différenciation au microscope!) — alcool 50%, court lavage — dessèchement à l'air — baume de Canada. On colle la préparation, en évitant une trop forte pression. Résultat: Fig. 5 (*Ficus carica*), Fig. 6 (*Ficus elastica*). Presque sur chaque globule on distingue nettement une mince enveloppe rouge, complète ou incomplète. L'enveloppe même sur certains parties a des épaisissements en forme de casque, de croissant ou granuleux, qui montrent une grande similitude avec les amyloplastés. Les enveloppes de *Ficus elastica* sont plus minces. Il y a des globules sur lesquels on ne voit aucune enveloppe (c'est du caoutchouc nu). Les globules sans enveloppe ou avec une enveloppe incomplète collent facilement ensemble. Il est un peu plus difficile de faire une bonne préparation de *Ficus elastica* à cause de la viscosité plus faible du sérum.

## Coloration double du globule de caoutchouc avec la chlorophylle et la rubine S.

La coloration avec la chlorophylle est réalisée à l'aide d'un extrait chlorophyllien cru, préparé de la manière suivante: Par le trempage de l'herbe pendant 3—4 jours dans l'alcool 96% froid, on obtient un extrait chlorophyllien plus foncé. On filtre l'extrait et on le mêle, immédiatement avant l'usage, avec de l'eau (1 : 1). Ce mélange est inconstant, (il s'y forme facilement un dépôt), mais il suffit pour une coloration.

Préparation: on fixe un enduit du latex frais dans l'acide picrique, comme au chapitre précédent. Puis, alcool 50%, 1 min. — solution chlorophyllienne 15 min. — lavage dans l'eau, 1 min. — rubine S, solution aqueuse 1 : 500, 15 min. — lavage dans l'eau distillée (pas HCl!) — glycérine. Résultat: le noyau du globule de caoutchouc est d'un vert intensif, l'enveloppe est d'une couleur rouge. Le contraste des couleurs est d'un grand effet. L'observation doit se faire à la lumière du jour ou à la lumière d'une lampe munie d'un filtre bleu.

## Réduction du nitrate d'argent dans l'enveloppe du globule de caoutchouc

Préparation: On plonge, dans l'obscurité, un enduit de latex tout frais sur un couvre-objet, dans une solution aqueuse d'AgNO<sub>3</sub> 1%, et on le laisse dans la solution au moins 3 jours. Puis, on le lave dans l'eau distillée et on le laisse sécher à l'air, dans une pièce éclairée. Coller par le baume du Canada. Résultat: Les enveloppes des globules du caoutchouc, ensemble avec les épaisissements casqueteux (de même comme figure 5 et 6), se colorent en brun, à cause de la présence de l'argent réduit. Si on prolonge l'exposition à la lumière, la coloration de la préparation devient plus forte. L'imprégnation est donc, en partie, un processus chimique, conditionné par l'activité chimique de l'enveloppe elle-même et, en partie, un processus photochimique.

## Recherches des stades initiaux de l'évolution des globules du caoutchouc chez *Ficus carica*

Les fruits de *Ficus carica* pas encore mûrs sont coupés et plongés dans le formol 10% si rapidement que pas une goutte du latex ne peut s'écouler. Après un mois environ, on fait, avec un rasoir, des coupes longitudinales radiaires, tout près de l'orifice du fruit, c'est-à-dire du côté opposé au plan de coupage. Ensuite, coloration des coupes dans la solution aqueuse de rubine S 1 : 500, 24 heures — lavage dans la solution aqueuse saturée d'acide picrique, 1—5 min. (pendant que se lèvent encore les petits nuages de la couleur!) — alcool 50%, 15—30 min. — alcool 96%, tout au plus 5 min. — huile volatile de girofles (pas xylol!) — baume du Canada. Résultat: Fig 7., 8. Dans les vaisseaux lactifères, surtout à leurs faites, on voit le cytoplasme peu coloré, sans une vacuole centrale bien exprimée. Dans le cytoplasma se trouvent les noyaux fusiformes et les nombreux petits corps plus ou moins ronds d'un rouge intensif. D'après leur forme et d'après leur coloration rouge, identique à la coloration des autres plastides dans la préparation, on peut conclure, que ces corps représentent des éléments de la substance plastidique. Déjà dans les plus petits granules on voit, par endroits, des commencements de la formation du caoutchouc, qui, sous la forme d'une petite quantité d'une substance transparente incolore, adhère à ces corps. Dans les divers vaisseaux lactifères on voit les différents stades de la croissance et de la formation des globules de caoutchouc, au sein de ces corps plastidiques. Les vaisseaux lactifères plus larges sont remplis des globules de caoutchouc tout grandis.



### III. Conclusions

L'examen des globules de caoutchouc tout à fait grandis de *Ficus carica* et *Ficus elastica* au ultramicroscope a démontré, qu'ils se composent, chez les deux plantes, de deux composants morphologiquement et substantiellement différents: d'un noyau de caoutchouc, et d'une enveloppe mince d'une autre matière.

Les méthodes de la coloration avec la rubine S et la chlorophylle mettaient en évidence la différence substantielle de ces deux phases, comme aussi le caractère protéinique de l'enveloppe. Les détails structuraux (les épaissements en forme de casque) sur les enveloppes et leur disparition successive chez les globules plus vieux, montrent, qu'il s'agit ici d'un reste de la substance plastidique de laquelle le caoutchouc s'est formé.

La déposition de l'argent élémentaire, après l'imprégnation en obscurité au nitrate d'argent, laquelle se réalise dans toutes les parties de l'enveloppe protéinique, prouve que l'enveloppe du globule de caoutchouc frais possède une activité chimique, qui ressemble à l'activité des chloroplastes. La réduction de l'AgNO<sub>3</sub>, a, par suite, outre comme facteur d'une coloration, aussi un caractère microchimique, et elle est comme une preuve nouvelle de la nature plastidique de l'enveloppe protéinique.

La présence de nombreux corps plastidiques dans les rameaux terminaux les plus minces des vaisseaux lactifères, comme aussi les divers stades successifs de l'accumulation du caoutchouc au sein de ces corps, et enfin, la réduction définitive de la masse plastidique sur une enveloppe, épaissie seulement par endroits, chez les globules de caoutchouc tout grandis, peuvent servir d'argument le plus sûr en faveur de l'origine plastidique du caoutchouc chez ces plantes.

L'hypothèse de Frey-Wyssling (4) sur l'origine plastidique des polyterpènes et les observations subséquentes de Prokofiev (11), trouvent dans nos recherches leur confirmation entière. Je crois qu'on peut considérer comme un fait bien certain que le caoutchouc est d'origine plastidique. Il est aussi intéressant que dans les nombreux latex, excepté les amyloplastides déjà connus et les plastides du caoutchouc à présent mieux examinés par ces travaux, les plastides se montrent dans un grand nombre aussi comme centres de la formation des matières huileuses et protéiniques (Molisch 8). Ces observations démontrent aussi la signification de la substance plastidique et son rôle spécial dans la formation des composés haut-moléculaires.

lares et haut-polymérisés, sans égard à leur différence chimique, et, probablement, sans égard à leur rôle physiologique.

On doit cependant souligner que la problématique biochimique et physiologique de la création des polyterpènes reste même après ces recherches ouverte. La place des polyterpènes dans le métabolisme et leur caractère excrétoire, lequel paraît incontestable d'après les investigations de Bobiloff, Spence, Mac Callum et Mochkina (Frey-Wyssling 4, 5) et d'après l'opinion de Frey-Wyssling, se montre à présent aussi dans une lumière spéciale. Il serait, en tout cas, indispensable de trouver une explication plus détaillée au phénomène en quelque sorte paradoxal, que les énormes possibilités énergétiques de la substance plastidique s'épuisent dans la création des excreta purs. La suggestion de Frey-Wyssling (4) sur le rôle des plastides en liaison avec l'état d'agrégation des composés créés représente jusqu'ici l'unique apport à l'éclaircissement de ce problème.

La présence d'un résidu plastidique sur les globules du caoutchouc, dispersés dans le sérum du latex, pose aussi la question, ce que représente en réalité le latex. Est-ce que on le doit considérer comme un suc vacuolaire, ou comme une forme diluée spéciale du cytoplasme? Bien qu'en ces derniers temps l'opinion prévaut que le latex est un suc vacuolaire, le manque du tonoplaste et, dès maintenant, aussi la présence des produits et des résidus plastidiques, laquelle n'est pas connue pour les sucs vacuolaires, exigeront une certaine clarification de ce problème. Il est probable que ces observations sur l'origine plastidique du caoutchouc pourront favoriser une solution dans ce domaine, et ouvrir ainsi la voie à une caractérisation meilleure et plus évidente du latex en général.

TUMAČ SLIKAMA — EXPLICATION DES FIGURES

- Sl. 1. *Ficus carica*. Formolom fiksirani mliječni sok, motren u tamnom vidnom polju. Okrugla zrnca kaučuka leže u koaguliranom serumu. Vidi se samo oris kaučukovih zrnaca i mjestimično refleksi bridova u njima. Pov. oko 2000 X.
- Fig. 1. *Ficus carica*. Latex fixé par formol, observé sous l'ultramicroscope. Les globules ronds du caoutchouc sont situés dans le sérum coagulé. On voit seulement les bords lumineux des ces globules et, par endroits, la réflexion des arêtes. Gross. env. 2000 X.
- Fig. 2. *Ficus carica*. Mliječni sok fiksiran formolom i ekstrahirani benzolom. Sok motren u tamnom vidnom polju. Svjetle kružnice ne predstavljaju kaučukova zrnca kao u sl. 1., nego samo njihove prazne ovoje. Pov. oko 2000 X.
- Fig. 2. *Ficus carica*. Latex fixé par formol et extrait avec benzole, observé sous l'ultramicroscope. Les ronds lumineux ne représentent pas les globules du caoutchouc, comme en Fin. 1., mais seulement leurs enveloppes vides. Gross. env. 2000 X.
- Sl. 3. *Ficus elastica*. Formolom fiksirani mliječni sok, motren u tamnom vidnom polju (kao u sl. 1. kod *F. carica*). Vidi se kružni oris kaučukovih zrnaca, koja su mjestimično stopljena. Pov. oko 2000 X.
- Fig. 3. *Ficus elastica*. Latex fixé par formol, observé sous l'ultramicroscope (comme en fig. 1. chez *F. carica*). On voit les bords ronds des globules de caoutchouc, qui sont, par endroits, collés ensemble. Gross. env. 2000 X.
- Sl. 4. *Ficus elastica*. Formolom fiksirani i benzolom ekstrahirani mliječni sok motren u tamnom vidnom polju. Svjetle kružnice predstavljaju (kao i kod *F. carica* u sl. 2.) prazne ovoje kaučukovih zrnaca. Kod (a) opaža se mjesto gdje je ležalo posve izraslo kaučukovo zrnce bez ikakvog ovoja, a kod (b) je bilo zrnca s polovičnim ovojem. (c) su šupljine iz kojih je ekstrahirano nekoliko zajedno slijepljenih kaučukovih zrnaca. Zaostali su dijelovi njihovih ovoja. (kr) kristal magnezijeve soli. Pov. oko 2000 X.
- Fig. 4. *Ficus elastica*. Latex fixé par formol et extrait avec benzole, observe sous l'ultramicroscope. Les ronds lumineux représentent (comme aussi chez *F. carica* en fig. 2) les enveloppes vides des globules de caoutchouc. A l'endroit (a) on voit la place où se trouvait une globule du caoutchouc tout grandis, sans aucune enveloppe et à l'endroit (b) il y avait une globule avec une enveloppe incomplète. Les (c) sont cavité desquelles sont extraits quelques globules du caoutchouc collés ensemble. Les parties de leurs enveloppes ont resté. (kr) le cristal du sel de magnésium. Gross. env. 2000 X.

Sl. 5. *Ficus carica*. Kaučukova zrnca obojena kiselim fuksinom. Sva su zrnca osim onog kod (k) posve ili djelomično ovijena proteinskim ovojem (p). Na ovoju vide se često karakteristična kapičasta odebljanja. Pov. 1200 X.

Fig. 5. *Ficus carica*. Les globules du caoutchouc colorés avec la rubine S. Tous les globules à l'exception de celui de (k) sont entièrement ou partiellement enveloppés d'une enveloppe protéinique (p). Sur l'enveloppe on voit souvent des épaissements casqueteux caractéristiques. Gross. 1200 X.

Sl. 6. *Ficus elastica*. Kaučukova zrnca obojena kiselim fuksinom. Kapičasta odebljanja (p) na proteinskim ovojmima jasno su vidljiva. Kod (k) zrnca bez ovoja (goli kaučuk). Pov. 1200 X.

Fig. 6. *Ficus elastica*. Les globules du caoutchouc colorés avec la rubine S. Les épaissements casqueteux (p) sur les enveloppes protéiniques sont nettement visibles. (k) les globules sans enveloppe (caoutchouc nu). Gross. 1200 X.

Sl. 7. *Ficus carica*. Vršni ogranak mliječne cijevi iz ploda. (m) membrana, (p) protoplast, (j) jezgra, (pl) plastidi crveno obojeni kiselim fuksinom, (k) masa kaučuka, koji se stvara u plastidima. Pov. 1200 X.

Fig. 7. *Ficus carica*. Le rameau terminal d'un vaisseau lactifère du fruit. (m) la membrane, (p) le protoplasme, (j) le noyau, (pl) les plastides colorés en rouge avec la rubine S, (k) la masse du caoutchouc, qui s'accumule dans les pastides. Gross. 1200 X.

Sl. 8. *Ficus carica*. Kao sl. 7. Vide se razni stadiji stvaranja kaučukovih zrnaca iz plastidnih tjelešaca. Pov. 1200 X.

Fig. 8. *Ficus carica*. Comme dans Fig. 7. On voit les stades différents de la création des globules du caoutchouc dans les corps plastidiques. Gross. 1200 X.

## LITERATURA · LITTÉRATURE

1. Barron H.: Chemische Technologie des Kautschuks. — Berlin, 1941. (Prijevod engleskog originala »Modern Rubber Chemistry«, 1937).
2. Ertl O.: Über die Silbernitrat-reduktion der Plastiden — Protoplasma Bd. 33., Berlin, 1939.
3. Freundlich H., Hauser E. A.: Kolloid-Zeitschrift. Ergänzungsband 36, 1925.
4. Frey-Wyssling A.: Die Stoffausscheidung der höheren Pflanzen. — Berlin, 1935.
5. Frey-Wyssling A.: Ernährung und Stoffwechsel der Pflanzen. — Zürich, 1945.
6. Mangenot G.: Sur le mode de formation des grains d'amidon dans les lactificères des Euphorbiacées. — Comptes rendues 180, 1925., Paris.
7. Memmler K.: Handbuch der Kautschukwissenschaft, Leipzig, 1930.
8. Molisch H.: Studien über den Milchsafte und Schleimsafte der Pflanzen. — Jena, 1901.
9. Popovici H.: Contribution a l'etude cytologique des lactificères. — Comptes rendues, 183, 1926., Paris.
10. Prokofjev A. A.: Metod otkritija kaučuka v tkanjah rastenij. Trudi n.-issl. lab. kaučuktrust, 4, 1930. (Ref. B C. 23, 1933, pag. 340.).
11. Prokofjev A. A.: O plastidnom proishozhdenii kaučuka. — Botaničeskij žurnal SSSR., Tom 31, No 2, Moskva-Leningrad 1946.
12. Sperlich A.: Exkretionsgewebe. — Handbuch der Pflanzenanatomie, Abt. I., Teil 2, Band IV B, Berlin, 1939.
13. Urban S.: O razvoju plastida i o citosomima. Zagreb, 1936.
14. Urban S.: Istraživanja plastida u zrelih sjemenkama nekih angiosperma. Poljoprivredna naučna smotra (Revisio scientifica agriculturæ), Vol. 1. Zagreb, 1939.
15. Vouk V.: Über den plastidogenen Ursprung der Aleuronkörner. — Acta botanica Vol. 1., Zagreb, 1935.
16. Zeiger K.: Physiokochemische Grundlagen der histologischen Technik. — Dresden-Leipzig, 1938.