

Mali prinos istraživanju blastokolina

D. Čučković

Kemijski institut, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Primljeno 29. marta 1954.

Ispitano je blastokolinsko djelovanje dehidracetne kiseline [III], metilnog etera dehidracetne kiseline [IV] i etilnog etera benzal-malonske kiseline [V], te je uspoređeno s djelovanjem kumarina.

Osim toga diskutiralo se o eventualnom značenju blastokolina u biljnoj sociologiji.

Premda je već odavna opažena zanimljiva činjenica, da sjemenka u zrelom, mesnatom plodu ne klija, znanstvena se literatura tek koncem XIX. st. stala baviti tom pojavom.

Wiesner je prvi, god. 1894.¹, opširnije izvijestio o svojim opažanjima kod klijanja sjemena bijele imele (*Viscum album L.*). On je ustvrdio, da se u sluzavom viscinu, koji okružuje sjemenku, nalaze tvari, koje sprečavaju klijanje. Wiesner tumači biološku potrebu pojave tih tvari u plodovima, koji nemaju tvrde zaštitne ljuske, i u kojima sjemenka leži u vlažnom, mesnatom usplođu, obavitom tankom i propusnom epidermom. Na raspolaganju joj ovdje stoji dovoljno vlage, pa joj treba samo još dovoljno topline i kisika da proklija. Oba uvjeta može joj priroda dati već i u jesen. Ako dakle u to doba, koje bi bilo za mladu biljku nepovoljno, sjemenka ipak ne proklije, uzrok mora biti jedna ili više tvari, koje klijanje zadržavaju i zaustavljaju. Wiesner ih naziva »tvarima, koje klijanje koče« (Hemmungsstoffe).

Na Molischov poticaj dao se Oppenheimer² na istraživanje toga predmeta. Tvar koja klijanje koči nazvao je on »negativnim katalizatorom« u ovom biološkom procesu. Samu tvar nije, međutim, pokušao istraživati kemijski, već je samo ustanovio, da je slabo otporna kod grijanja i da je netopljiva u alkohol-eterskim mješavinama. Köckemann je god. 1934.³ i 1936.⁴ iznio nešto više o spomenutoj tvari, izlučivši je eterom iz kaše zrelih plodova krušaka i dunja. On je uklonio eter, ostatak otopio u vodi i tom otopinom navlažio podlogu, na koju je stavio sjeme grbnja (*Lepidium sativum L.*), da klija. To je naime sjeme zbog izvanredno brze klijavosti najprikladnije za takve fiziološke pokuse. Ipak, ono nije, na takvoj podlozi, prokljalo ni nakon 8 dana. Da nije samo kisela reakcija spomenutog supstrata uzrokom, da sjemenka ne klije, dokazao je neutraliziravši kiseli sok plodova, a da mu kočeće djelovanje time nije umanjio. Köckemann je, osim toga, ustanovio, da je dobivena supstanca kiselinske prirode, da je netopljiva u petroleteru, otporna prema toplini, a osjetljiva za lužine i perokside, pa je predložio, da se nazove »blastokolinom«

Dalje su istraživali Kuhn, Jerchel, Moewus i Möller⁵ baveći se pitanjem, radi li se ovdje o specifičnoj, svim biljkama zajedničkoj, supstanci, ili kočeće djelovanje uvjetuju različiti organski spojevi u pojedinim biljkama. I oni su pravili pokuse sa sjemenjem grbnja, ali i sa sokom bobulja jarebike (*Sorbus aucuparia L.*).

Kako je glavni sastavni dio plodova jarebike parasorbinska kiselina [I], koja ima laktonski nezasićeni prsten, rečeni su autori pravili jednake pokuse s drugim

sličnim laktonima. Pritom su ustanovili, da kumarin djeluje jače od sviju istraženih laktona, jer već u razređenju od 1 : 10.000 jasno koči klijanje.

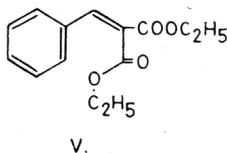
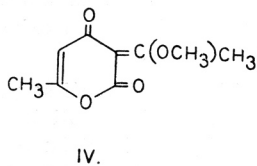
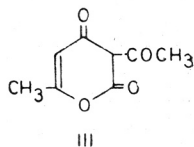
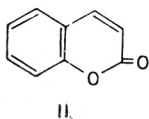
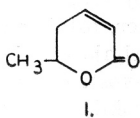
Rezultate pokusa Kuhna i suradnika potvrdili su Veldstra i Havinga⁶. Oni su ustvrdili, da je za blastokolinsko djelovanje substance odlučan nezasićeni laktonski prsten. Sigmund⁷ je, međutim, već prije, pravio pokuse s različitim alkaloidima, glukozidima i produktima njihova cijepanja, pa s trijeslovinama, eterskim uljima, terpenima, smolama i t. d., te je dokazao upravo protivno: među tim spojevima, premda im je građa različita, ima tvari, koje uvelike koče klijanje sjemenja graška, grahorice, ječma, pšenice i repice. Isto tako dokazuju i kasniji pokusi Schmida⁸, s nekim drugim spojevima razne strukture, a istoga djelovanja.

Nas je kod procesa kočenja klijanja sjemenke zanimao u prvome redu odnos između strukture blastokolina i njegova djelovanja, t. j. hoće li spoj prestati da koči klijanje sjemenke, odnosno, da li mu djelovanje slabi, ako otvorimo laktonski prsten, za koji znamo da nije jedini nosilac toga djelovanja, a ipak — sa svim svojim do sada ispitanim spojevima — vrlo energično vrši taj posao.

Spojevi, s kojima smo pravili pokuse, bili su laktonskog karaktera, i to: *para-sorbinska kiselina* [I], *kumarin* [II], *dehidracet kiselina* [III], *metilni eter dehidracet kiseline* [IV] te konačno *benzalmalonski ester* [V], koji ima konstituciju sličnu kumarinu. Otopine supstancu bile su 0.01, 0.005 i 0.001 molarne. Kao objekt, na kojemu su istraživanja vršena, služilo nam je sjeme grbnja, koje je bilo zdravo i 100% kljavu, kako su dokazala tri pokusa s po 100 sjemenaka na bugaćici navlaženoj vodom.

Sjemenka — već nakon nekoliko sati — u vodi nabubri i ovija se jakim slojem sluzi. Drugoga dana sjemena lupina puca, te se pokazuje sitni korjenčić, koji trećega dana doseže poprečno duljinu od 10 mm. Četvrti dan pojavljuju se zelene supke. Hipokotilni se članak petoga dana uspravljuje i produžuje. Korjenčić se usidrio u vlažnoj bugaćici, a biljčica je već sedmi dan dosegla visinu od oko 20—25 mm.

Svi su pokusi s gore navedenim supstancama vršeni uz iste uvjete, uz isto svijetlo i toplinu i s točno jednakim količinama pokusne otopine, dakle uz isti postotak vlage. U svakoj seriji pokusa pravljen je istodobno i kontrolni pokus s vodom. Koliko se razvoj biljke, uzgojene na spomenutim otopinama, razlikuje od opisanog normalnog razvoja, najbolje pokazuju navedene tablice.



TABLICA I.

Supstanca 10 ⁻² Mol/l	nakon 2 dana		nakon 4 dana		nakon 7 dana	
	prokljalo % sjemenaka	poprečna duljina korijena u mm	prokljalo % sjemenaka	poprečna duljina korijena u mm	prokljalo % sjemenaka	poprečna duljina korijena u mm
Kumarin	—	—	1	—	1	—
Metilni eter dehidracet kiseline	46	—	76	—	88	—
Dehidracet kiselina	12	—	26	2	31	4
Benzalomalonski Metilni eter	21	—	88	5	94	9
Voda	99	3	100	12	100	visina stabljike 20—25 mm

Napomena. Gdje nije naznačena duljina korijena, tamo se samo sjemena ljuska raspukla.

TABLICA II

Supstanca 10 ⁻³ Mol/l	nakon 2 dana		nakon 4 dana		nakon 7 dana	
	prokljalo % sjemenaka	poprečna duljina korijena u mm	prokljalo % sjemenaka	poprečna duljina korijena u mm	prokljalo % sjemenaka	poprečna duljina korijena u mm
Kumarin	16	—	59	2	88	3
Metilni eter dehidracet kiseline	46	—	74	3	96	15
Dehidracet kiselina	82	2	100	7	100	visina mlade
Benzalomalonski ester	89	3	97	10	97	biljčice
Voda	98	4	100	15	100	20—25 mm

Napomena. Gdje nije naznačena duljina korijena, tamo se samo sjemena ljuska raspukla.

DISKUSIJA

Priložene tablice pokazuju, da je — uz kumarin, koji je već utvrđen kao najjači poznati blastokolin — još i metilni eter dehidracet kiseline u centomolarnom razrjeđenju isto tako djelotna blastokolinska supstanca. U jačem razrjeđenju, međutim, on u znatnoj mjeri zaostaje za kumarinom.

Rezultati, koji su dobiveni ispitivanjem benzalinalonskog estera, kojega je struktura slična strukturi kumarina, pokazuju, da ta supstanca — u razređenju približno centimolarnom — ipak još djeluje jasno kočeci, premda znatno slabije od kumarina. Sjemenke kočene kumarinom i metilnim eterom dehidracet kiseline, nakon tri dana pomno isprane i prenesene na bugaćicu i navlažene čistom vodom, nisu proklijale ni tri dana kasnije. Pokus je izveden nadalje sa sjemenkama, koje su tri dana normalno klijale na vodenoj podlozi, te su nakon toga prenesene na približno m/100 otopinu kumarina. Mlade su klice time zaustavljene u rastu, te nakon nova tri dana uopće nisu više napredovale na ovom supstratu. Blastokolini, čini se, ne samo da koč klijanje, nego i zaustavljaju rast mlade biljke.

Kumarina, koji se kod sjemenke grbnja pokazao kao najjača blastokolinska supstanca, ima u mnogom našem bilju, što preformiranog, što sekundarno nastalog enzimatskim cijepljenjem. Motrimo li u bukovim šumama prostrane i guste zadruge lazarkinje (*Asperula odorata* L.), jedne od naših najpoznatijih kumarinskih biljaka, koje su tako isključive, da se u njima rijetko kada pojavljuje koja druga biljka, nameće nam se pitanje, nije li upravo kumarin uzrokom tolikoj ekskluzivnosti? Kumarina ima u biljci u svim organima. On s uvenulom biljkom pada na tlo, gdje možda dolazi u takvoj koncentraciji, koja koči klijanje drugoga bilja, jer je dokazano, da je za to dovoljna već i koncentracija od 1:10.000. Kumarina ima i u trajnom podanku te biljke. Nije li možda već i sama njegova ekshalacija dovoljna da zaustavi ili barem uspori klijanje drugoga bilja, koje prema tome ne može izdržati na takvom tlu konkurenciju sa glavnim domaćinom takve zadruge-lazarkinjom? Vjerojatno je pak, da sama sjemenka lazarkinje ne reagira na kumarin, jer po Sigmundovim istraživanjima, kao i po istraživanjima, što su ih proveli Audus i Quastel⁹ svako sjeme ne reagira jednako na tvari, koje koč klijanje. Po podacima te dvojice istraživača, kumarin koči mrkvu u dvadeset puta manjoj koncentraciji nego grbanj.

U smjeru ove hipoteze namjeravamo nastaviti s pokusima, jer držimo, da nije nemoguće dokazati, da i blastokolini — uz druge, već poznate, faktore tla i podneblja, u određenoj mjeri odlučuju o raširenju i razdiobi biljnog svijeta na zemlji. Isto ćemo tako nastaviti pokuse s obzirom na vezu između konstitucije tvari, koja klijanje koči, i njezina djelovanja, jer bi to moglo biti važno s obzirom na konstituciju prirodnih blastokolina, koja dosad još nije poznata.

LITERATURA

1. J. Wiesner, *Sitzber. Akad. Wiss. Wien, Math. naturw. Kl. Abt. I*, **103** (194) 432.
2. H. Oppenheimer, *Sitzber. Akad. Wiss. Wien, Math. naturw. Kl. Abt. I*, **131** (1922) 59, 279.
3. A. Köckemann, *Ber. deut. botan. Ges.* **52** (1934) 523.
4. A. Köckemann, *Botan. Centr. Beih.* **55** (1936) 191.
5. R. Kuhn, D. Jerchel, F. Moewus i E. F. Möller, *Naturwissenschaften*, **31** (1943) 468.
6. H. Veldstra i E. Havinga, *Rec. trav. chim.* **62** (1943) 841.
7. W. Sigmund, *Biochem. Z.* **62** (1914) 299, 339; **146** (1924) 389; **154** (1924) 399.
8. H. Schmid, *Helv. Chim. Acta* **27** (1944) 1197.
9. L. J. Audus i J. H. Quastel, *Nature*, **159** (1947) 320.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein kleiner Beitrag zur Erforschung der Blastokoline I.

D. Čučković

Substanzen, die hemmend auf die Samenkeimung wirken, werden nach dem Vorschlage Köckemanns^{3, 4} Blastokoline genannt. Sie kommen in der Natur in reifen fleischigen Früchten vor. Ihre Konstitution ist bis jetzt noch unbekannt. Veldstra und Havinga⁶ behaupten, dass die keimungshemmende Wirkung der Blastokoline dem ungesättigten Lactonring zuzuschreiben sei. Entgegen diesen Behauptungen, fanden Sigmund⁷ und Schmid⁸, dass auch manche andere chemische Verbindungen ebenso stark keimungshemmend wirken können.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb einige Lactone auf ihre keimungshemmende Wirkung untersucht und es wurde versucht zu ermitteln, inwieweit der ungesättigte Lactonring an der genannten Wirkung beteiligt ist.

Die Versuche wurden mit Cumarin [II], Dehydracetsäure [III], Dehydracetsäuremethyläther [IV] und Benzalmalonester [V] durchgeführt. Als Versuchsobjekt wurden Kressesamen (*Lepidium sativum* L.) benutzt.

Es wurden folgende Resultate erhalten:

1. Dehydracetsäuremethyläther [IV] hemmt die Keimung in einer 10^{-2} Mol/l Lösung ebenso stark als das Cumarin. In einer 10^{-3} Mol/l Lösung steht er aber der Wirkung des Cumarins bedeutend nach. Das Cumarin erwies sich also auch bei diesen Versuchen als das stärkste Blastokolin, womit die Resultate Kuhns und Schmid's neuerlich bestätigt wurden.

2. Benzalmalonester [V] das eine dem Cumarin ähnliche Struktur hat, wirkt, obwohl bedeutend schwächer als dieses, doch noch ausgesprochen hemmend in einer annähernd 10^{-2} Mol/l Lösung. Da die geringe Löslichkeit sowohl des Cumarins, als auch des Benzalmalonesters die Bereitung m/100 Lösungen nicht zulässt, wurden gesättigte Lösungen beider Substanzen benutzt. Man kann deshalb keine bestimmten Schlüsse ziehen, aber scheinbar ist die hemmende Wirkung nicht nur an den ungesättigten Lactonring gebunden, da der Benzalmalonester, der einen solchen Ring nicht besitzt, noch ganz merklich die Keimung hemmt.

3. Die mit Cumarin gehemmten Samen, mit Wasser ausgewaschen, lassen sich nicht mehr zum Keimen bringen. Die Reversibilität und Irreversibilität der toxischen Wirkung der Blastokoline scheint von physikalisch-chemischen Bedingungen, die an der Oberhaut der Samenschale herrschen, abzuhängen. Samen deren Oberhaut bei der Quellung Schleim absondert, wie dies bei der Kresse der Fall ist, adsorbieren das Blastokolin, so dass es auch nach der Waschung noch weiter die Keimung hemmt.

4. Normal ausgekeimte Samen, am dritten Tage in eine beiläufig 0,01 molare Cumarinlösung übertragen, entwickeln sich weiter nicht. Demnach wirkt das Blastokolin nicht nur keimungshemmend, sondern auch entwicklungshemmend.

Ausgedehnte und dichte Bestände des Waldmeisters (*Asperula odorata* L.), einer der bekanntesten kumarinhaltigen Pflanzen, zu denen sich selten eine andere Pflanze gesellt, führen uns auf den Gedanken, dass eben das Cumarin andere Pflanzen von solchen Beständen fern hält. Walmeistersamen reagieren aber scheinbar auf dieses Blastokolin nicht, da schon von W. Sigmund nachgewiesen wurde, dass nicht alle Samen gleich stark auf die keimungshemmende Substanzen reagieren.

In diesem Sinne denkt die Autorin ihre Versuche fortzusetzen zu um nach Möglichkeit zu erfahren, inwieweit die Blastokoline an der Verteilung der Pflanzenwelt auf der Erde beteiligt sind. Auch um weiterhin zu prüfen, in welcher Abhängigkeit die Wirkung der keimungshemmenden Substanzen zu ihrer Konstitution steht. Das ist eine überraschend wichtige Frage, da die Konstitution der Blastokoline bisher noch unbekannt ist.