

CI TOHEMI SKO I SPI TUVAWE NA EPI KUTI KULARNI KOMPONENTI KAJ TUTUNOT

Marija Srbinska
Instituta za tutun - Prilep

VOVED

Listot na *Nicotiana tabacum* L e obvi en so kuti kul a koja ja so-i nuvaat epi dermis koj se sostoi od ednokl eto-en sl ojn a kl etki so razli -en oblik, stomi smesteni pomeju kl etki te i lisni vl aknenca ili trihomi (Delon et al., 1979, Poethig, 1997).

Ovali sno tki vo koe se naoja pomeju nadvoretata sredi na i mezofiloti ma specijalizi rana fiziološko-ekološka funkcija izrazena biosintetska sposobnost. Celatalsna površina e prepokriena so smolesti gumešt eksudat koj se sintetizira iz a-uvod kuti kul atati trihomi te (Nielsen et al., 1991, Wagner, 1999).

Kaj razli -ni te sorti tutun i inserciji, gusti nata i vid na vl aknencata variraat vo zavistnost od toadali se naojaat na gornata ili na dolnata strana na listot (Pejinovi} i sarad, 1977, Nielsen et al., 1991).

Sostavot i soдр`inata na nei sparli i vidot eksudat kaj tutunot zavisaat od genotipot, insercijata, agroekološki i proi zvodstveni te uslovi. Eksudatot soдр`i hemijski konstituenti koji vli jaat vrz otpornosta na rasteni etokončtetni te i nsekti i bol estite i konstituenti koji se prekursori na aromata i mirisot na tutunot (Heemann 1981, Severson 1985, Georgieva 1998, Simonska et al., 2006).

Smolite koji se sozdavaat vo l ezdenite vl aknenca i vo subkuti kul arni ot sl ojn a listot pretstavuvaat leplivi, gusti i amorfni supstancii. Po svojata hemijska priroda tie se smesana razli -ni alifati -ni, hidroaromati -ni i aromati -ni soedinenija koji vo odreden stepen se oksidirani, polimerizirani i kondenzirani (Wagner, 1999).

Vosocite se jagl evodorodi so razgrana mol ekul a od 25-34 jagl erodni atomi, koji se sozdavaat od epi dermalni ot sl oji

zaedno so masnite kiselini so S_{16-18} atomi se izl a-uvaaat na površinata na tutunski ot listovi d na kristali (Arrendale et al., 1988).

Na površinata i vo trihomi te na tutunski ot list, osven smolite i vosocite, se sozdavaat mnogu nei sparli i vi komponenti koji davaat karakteristinata aroma i miris na tutunot, kako to se terpenite, saharozni te estri i drugi isparli i vi komponenti (Severson, 1984). Aki kl i -ni te cembreni, l abdanite i di -i tricikli -ni te di terpeni se sintetiziraat od trihomi te na listot pri negovoto sozrevavie vo tutunski te cvetovi (Reid, 1985).

Poditerpenite, e}ernite estri se vtora pogol emi na grupa soedinenija koji se sintetiziraat izl a-uvaaat kako eksudat od l ezdenite kl etki na lisni te vl aknenca od tutunot. Ispi tuvawata poka`aa deka saharozni te estri migri raat od l ezdenite kl etki na trihomi te i se rasporeduvaat i skl u-i vo okolu trihomi te i epi kuti kul arno po površinata na listot (Lin et al., 1994).

Va`en faktor za aromata, mirizl i -vosta, kako i otpornosta kon nsekti na odredena sorta tutun pretstavuva zastapenosta na razli -ni te fenolni komponenti na površinata na listot (Georgieva, 1998). Od polifenolniti soedinenija koji se pri sutni vo eksudatot na listot osobeno se va`nitani nite, kumari nite, flavonolite, fenolite, antocijani te i hidroksil irani te cikloheksani (Snook et al., 1981).

Sozdavaweto na al kal oidi te vol i sinitetrihomi kaj nekovi dovi tutun go i spituval e i stra`uva-i te (Laune et al., 2000).

Ci tohemiskiti i spituvaava ovozmo`uvaat da se odredi mestoto na sozdavavawena nekoi epi kuti kul arni soedinenija na

listot, a posredno so toa i kvalitativno odreduvawe na komponentni ot sostav na nei sparli vi ot eksudat kako i vi dot i zas-

tapenosta na tri homi so koi gi sekretira ovi e soedeni ja.

MATERI JAL I METOD NA RABOTA

Rasti tel en materi jal

Za analiza bea zemeni pri meroci tehni -ki zreli, zdravi i neo{ teteni listovi tutun od podvrvnata insercija na sortata P-23. Tutunot be{ e odgl eduvan spored vopostavenata proi zvodstvena praktika za orientalski tip tutun na Opi tnoto pole na l nsti tutot za tutun vo Pri le p vo 2003 godi na.

Pri gotvuvawe na ci tohemski preparati i *in situ* lokalizacija na epikuti kul arni komponenti

Preparati te bea napraveni od par-i wa epi dermis (okol u 0,5 cm²), i zdvoeni od vrvni ot del na opa-i nata na listot, abak-sijal no od listi te nervi. Potoa e i zvedeno boewe na preparati te so razli -ni reagensi, *in situ* lokalizacija i kvalitativno opredel uvawe na epikuti kul arni te supstanci i (fenol i, flavonoidi, flavonol i, kondenzirani tani ni, polifenol i, saharozni estri i al kal oi di).

Fenol ni te komponenti bea odredeni po obojuvawe vo reagensot 0.5% metil ensko pl avo vo acetaten puf er so pH = 4.4.

Flavonoidi te zastapeni na listnata povr{ i na bea odreduvani spored ni vnata fl uorescencija so reagensot 5% etanol en rastvor na al umi ni um trihl ori d, a **flavonol i te** so 0.5% etanol en rastvor na 2-ami noeti l di feni l bori nat.

Hoepfner-Vorsatz reagensot i ni trozo reakcijata bea upotrebeni za lokalizirawe na **polifenol i te** na preparati te od epi dermis, a vani l i n-hl orovodorodna kisel i na be{ e upotrebena za obojuvawe na **kondenzirani te tani ni**.

So reagensot anil i n-di feni l ami n- fosforna kisel i na (DAP) se obojuvaat i l oci raat **saharozni te estri** vo tri homi te i na epi dermi sot.

Alkaloi di te koi se nao|aat na listot se obojuvaat i i denti f i kuvat so jodkal i um jodi d reagensot.

Pri meneti te hemiski reakcii i reagensi te za obojuvawe i detekcija se i den-

ti -ni so oni e koi se upotrebuvaat vo tenko-slojnata hromatograf ska analiza na fenol -ni te i polifenol ni te soedeni ja, flavonol i te, flavonoidi te i drugi soedeni ja (Jork et al., 1990).

Po obojuvaweto, par-i wata epi dermis vni matel no se stavaat pomelu predmetno i pokrovno staklo i preparati te se posmatrani pod svetl osen mi kroskop od markata Axiovert 25 opremen so videokamera Sony i nadvore{ na PC kontrola i korekcija so i merzija na okul arot vo maslo (Moreno, 2006).

Opredel uvawe na zastapenosta na listni vl aknenca

Gustinata na listni vl aknenca na list od podvrvnata insercija e opredel ena so nivno broewe pri posmatrawe na neoboena listna plojka (0.5 cm²) pod svetl osen mi kroskop od markata Axiovert 25 opremen so videokamera Sony i nadvore{ na PC kontrola (zgol emuvawe 100 x, povr{ i na 2.25 mm²).

Zastapenosta na tri homi te so pove{ekl eto -ni ` l ezdeni kletki i na tri homi te bez ` l ezdeni kletki e ocenuvana od 0 (bez tri homi) do 9 (dvata vida na tri homi) i e i zrazena kako sredna vrednost na gustinata na pet slu-ajno zemeni listovi tutun. Broeweto e izvr{ eno na tri lokacii na gornata i dolnata strana na listot, bez da se zaf a|aat nervi te:

Lokacija 1: Na osnovata na listot

Lokacija 2: Vo srednata na listot

Lokacija 3: Pri vrvot na listot

Dokol ku brojnosta na tri homi te e oceneta so vrednost od 1 do 8 zna-i deka na listot se prisutni od 1 do 120 tri homi so ` l ezdeni kletki na povr{ i na 2.25 mm², odnosno 1-80 tri homi bez ` l ezdeni kletki na 2.25 mm². Vrednosta nad 9 zna-i deka na listot se prisutni nad 120 tri homi te so ` l ezdeni kletki i nad 80 tri homi bez ` l ezdeni kletki na 2.25 mm².

Potoa matemati -ki se presmetuva zastapenosta na tri homi te na edini cal i sna povr{ i na i zrazeno vo mm².

REZULTATI I DISKUSIJA

Ci tohemiska lokalizacija na epi kuti kul arni komponenti

Epi dermisot i kletko-niteyi dovi na tri homite se obojuvat metahromatski od si no do si no zel eno, zavino od pri sustvoto na **fenolnitesupstancii** (Slika 1).

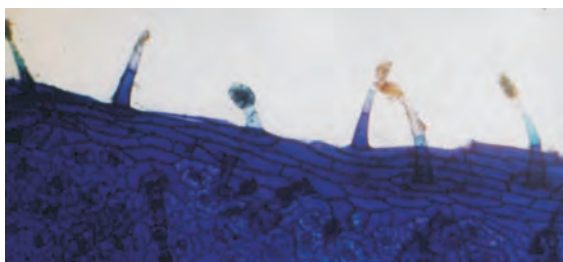
Po obojuvaweto so al umi ni um tri hl orid, epi dermisot i tri homite dobi vaat zel ena ili olta fluorescencija kako rezul tat na pri sustvoto na **flavonoidite**. Zel ena fluorescencija mo`eda se posmatra na epi dermisot i kaj`lezdenite kletki od mal ite tri homi, dodeka pove}ekleto-nite`lezdeni tri homi fluoresci raat`ol to (Slika 2).

Po tretmanot so etanol en etil flavognost, tri homite poka`uvaat portokal ova fluorescencija kako rezul tat na pri sustvoto na **fenolite** (Slika 3).

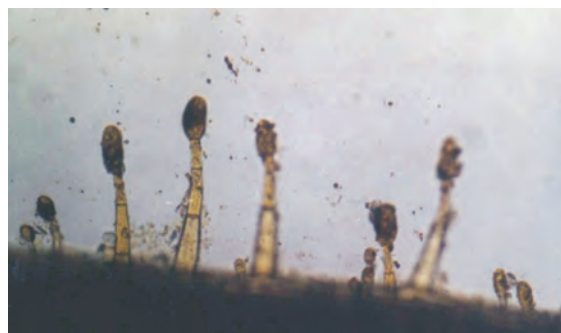
Hoepfner-Vorsatz reagensot gi identifikuvani trozo derivatite na dihidrofenolnitesoedinenija, odnosno **polifenolite** koi formiraat razli-no oboeni soli. @lezdenite vlaknenca i epi dermalniteskletki se obojuvat portokal ovo, a mestata kade se locirani polifenolite bl edo`ol to (Slika 4). Reagensot vanilin-hlorovodorodna kiselina dava sjajno crveno obojuvawe vo pri sustvoto na flavan-3-ol s-monomerni i polimerni **tani ni** (Slika 5).

DAP reagensot dava metahromatsko kafeavo obojuvawe vo pri sustvoto na **saharozni estri** vo`lezdestite tri homi (Slika 6).

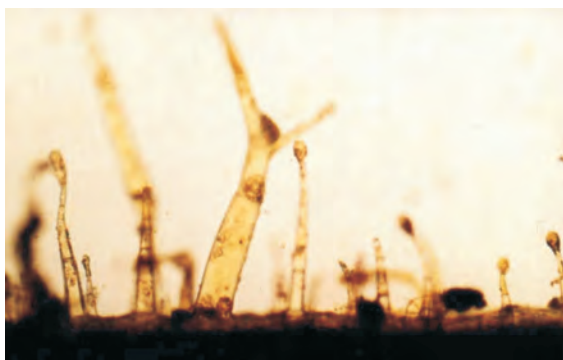
Jodkali um jodid testot gi obojuva **alkaloidite** koi se prisutni na lisnata povr{ina vo kafeava boja (Slika 7).



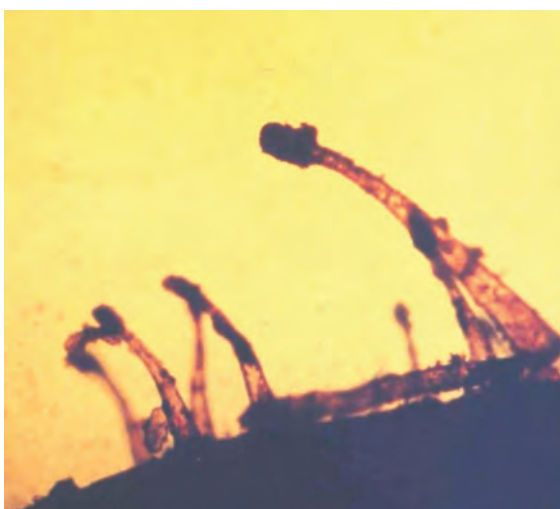
Slika 1. Ci tohemiska lokalizacija na fenolite
Photo1. Cytochemical localization of phenols



Slika 2. Ci tohemiska lokalizacija na flavonoidite
Photo2. Cytochemical localization of flavonoids



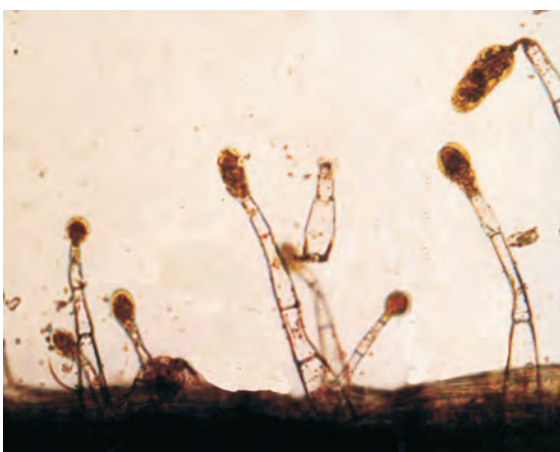
Slika 3. Ci tohemiska lokalizacija na flavonolite
Photo 3. Cytochemical localization of flavonols



SI i ka 4. Ci tohemi ska l okal i zaci ja na
pol i f enol i
Photo 4. Cytochemical localization of polyphenols



SI i ka 5. Ci tohemi ska l okal i zaci ja na
tani ni
Photo 5. Cytochemical localization of tannins



SI i ka 6. Ci tohemi ska l okal i zaci ja na
saharozni estri
Photo 6. Cytochemical localization of sucrose esters



SI i ka 7. Ci tohemi ska l okal i zaci ja na
al kal oi di
Photo 7. Cytochemical localization of alkaloids

Zastapenost na lisi v aknenca

Brojot i vidot na lisi v aknenca na podvrvna i nsercija kaj sortata tutun P-23 se pretstaveni vo Tabel a 1.

Brojot, rasporedot i formatata na lizdeni te v aknenca na istata strana na listot se razlini. Zastapenosta na trihomite e pogol emana gornata strana na listot, sporedeno so dolnata strana.

Najgol em broj v aknenca na mm^2 i sna povr{ina e regi stri ran na osnovata na listot, a najmal na vrvni ot del od listot. Ovi rezultati se vo soglasnost so spituvawata na Pej-inovi}, (1977) za gustinata na lisi v aknenca kaj neкои orientalski i polorientalski sorti tutun odgl edani vo regionot na Priilep.

Tabela 1. Zastapenost na lisi v aknenca kaj podvrvna sortata P-23
Table 1. Presence of trichomes in the upper leaves of variety P-23

Горна лисна површина Upper leaf surface			
Локација Location	1	2	3
Индекс на трихоми со жлездести клетки Index of trichomes with glandular cells	5.1	4.5	3.7
Просечен број на трихоми со жлездести клетки на (mm^2) Average number of trichomes with glandular cells (mm^2)	34.0	30.1	24.6
Индекс на трихоми без жлездести клетки Index of trichomes without glandular cells	0.8	1.2	0.3
Просечен број на трихоми без жлездести клетки на (mm^2) Average number of trichomes without glandular cells (mm^2)	5.3	8.0	2.0
Долна лисна површина Lower leaf surface			
Локација Location	1	2	3
Индекс на трихоми со жлездести клетки Index of trichomes with glandular cells	4.7	4.2	3.1
Просечен број на трихоми со жлездести клетки на (mm^2) Average number of trichomes with glandular cells (mm^2)	30.1	28.0	20.6
Индекс на трихоми без жлездести клетки Index of trichomes without glandular cells	0.5	0.3	0.3
Просечен број на трихоми без жлездести клетки на mm^2 Average number of trichomes without glandular cells (mm^2)	3.3	2.0	2.1

ZAKLU^OK

• Postapki te na ci tohemi ski te boewa na l i snata kuti kul a (epi dermi s i tri-homi) mo` at da se pri menat za brza kval i tati vna anal i za na epi kuti kul arni te supstanci i koi se nao|aat na povr{ i nata na zel en tutunski l i st.

• So ovi e postapki i zvedena e i n si tu l okal i zaci ja i kval i tati vno doka` uvawe na pri sustvoto na f enol i , f l avonoi di , f l avonol i , kondenzi rani tani ni , pol i f enol i , saha-rozni estri i al kal oi di na l i snata povr{ i na od sortata P-23. Po su{ eweto i

f ermentaci jata, tokmu ovi e komponenti mu davaat karakteri sti -en mi ri s i aroma na tutunot od sortata P-23 i go def i ni raat kako vi sokokval i tetna surovi na.

• Zastapenosta na tri homi te so si n-tetska sposobnost kaj sortata P-23 e pogol ema na gornata strana od l i stot, sporedeno so dol nata.

• Najgol em broj na vl aknenca na edi -ni ca l i sna povr{ i na e regi stri ran na osnovata na l i stot, a najmal na vrvni ot del od l i stot.

LI TERATURA

1. **Arrendale R.F., Severson R.F., Chortyk O.T., Stephenson M.G., 1988.** Isolation and Identification of the Wax of Green Leaf Tobacco, Beitr.Tabakforsh., 14 (2), 67-84.

2. **Delon R., Kiffer E., Schiltz P. and Rohr R., 1979.** Les Poils Foliaires des Nicotian?es. I. El?ments Bibliographiques, Comparison Tabac Noir et Tabac d'Orient. A.du.Tabac. Sect.2, 16, 13-29.

3. **Georgieva Y., 1998.** Possible Relation between Tobacco Resistance to Aphids (*Mysus nicotianae* Blackman) and Phenolic Compounds in Glandular Trichomes and Leaf Epidermis. Ann.du Tabac, Section 2.30, 3-9.

4. **Heemann V., Brhmer U., Spremberg G., Seehofer F., 1981.** Influence of Genotype and Environment on the Diterpenes in the Wax Layer of Some Flue-cured Tobaccos, Beitr.Tabakforsh. 11(2), 107-11.

5. **Jork H., Funk W., Fisher W., Wimmer H.:** Thin-layer Chromatography.Reagents and Detection Methods.Vol.1. Physical and Chemical Detection Methods:Fundamentals, Reagents I., WCH, Veclagsselschaff, Germany, 1990.

6. **Laune G., Preston C.A. Baldwin J.T., 2000.** Fast Trace to the Trichome: Induction of N-Acyl Nornicotines Precedes Nicotine Induction in *Nicotiana repanda*. Planta 210, 510-514.

7. **Lin Y., Wagner G.J., 1994.** Rapid and Simple Method for Estimation of Sugar Esters. J.Agric.Food .Chem 42(8), 1709-1712.

8. **Moreno N., Bougourd S., Haseloff J., Feijo J.A.:** Handbook of Biological Confocal Microscopy, third edition, edited by J.B. Pawley, SpringerScience+Business Media, New York, 769-787, 2006.

9. **Nielsen M. T., Akers C. P., Jarlfors U. E., Wagner G. J., Berger S., 1991.** Comparative

Ultrastructural Features of Secreting and Nonsecreting Glandular Trichomes of Two Genotypes of *Nicotiana tabacum* L.

Botanical Gazette, Vol. 152, No. 1, 13-22.

10. **Pej~inovi~ D., Gudeski A., Gligorievi~ S., 1977.** Gustina pojedinih tipova trihoma na mm² na listovima nekih sorti duvana u SR Makedoniji u zavisnosti od insercije listova, prisustvo cvasti i dubine njenog odlamanja, Tutun, No. 11-12 , 495-508.

11. **Poethig R.S., 1997.** Leaf Morphogenesis in Flowering plants. The Plant Cell, Vol. 9, 1077-1087

12. **Reid W.W., 1985.** La chemie des diterpenes des tabacs orientaux ou aromatiques, A.du Tabac. Sec.2-19, 101-114.

13. **Severson R.F., Arrendale R.F., Chortyk O.T. and Johnson A.W., 1984.** Quantitation of Major Cuticular Components from Green Leaf of Different Tobacco Types, J.Agric.Food.Chem. 32, 566-570.

14. **Severson R.F., Johnson A. W. and Jackson D.M., 1985a.** Cuticular Constituent of Tobacco: Factors Affecting Their Production and Their Role in Insect and Disease Resistance and Smoke Quality. Rec.Adv.Tob.Sci.11, 105-173.

15. **Snook M.E., Fortson P.J., Chortyk O.T., 1981.** Isolation and Identification of Phenolic Acids from Tobacco Leaf, Beitr.Tabakforsh., 11(1), 19-26.

16. **Wagner G., 1999.** Leaf Surface Chemistry in Tobacco Production, Chemistry and Technology, Davis D. L and Nielsen M. T., Blackwell Science, Ltd, 293-303.

17. **Simonovska B., Srbinska M., Vovk I., 2006.** Analysis of sucrose esters-insecticide from the surface of tobacco plant leaves, Journal of Chromatography A, 1127 , 273-277.

CYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF EPICUTICULAR COMPONENTS ON TOBACCO

M. Srbinoska
Tobacco Institute-Prilep

SUMMARY

Today, the majority of information on leaf surface morphology has been obtained using transmission or scanning electron microscopy.

As an alternative to direct imaging of plant tissues, it is possible to fix and stain intact plant tissue and obtain high-resolution images with using an optical microscopy with CCD camera. Laboratory study was conducted to examine the leaf surface of green tobacco leaves of variety P-23 with cytochemical staining techniques and demonstrate the presence of some epicuticular substances in abaxial leaf epidermis. The cytochemical localization of flavonoids, flavonols, tannins, polyphenols, sugar esters and alkaloids in tobacco leaf epidermis were assessed. There was significant variation in the type and number of trichomes per unit leaf area of leaf surface.

Author's address:

Marija Srbinoska
Tobacco Institute - Prilep
Republic of Macedonia
e-mail: marijasrbinoska@mt.net.mk