

Anna Trojak-Goluch, Magdalena Kawka-Lipińska

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach*

GŁÓWNE ALKALOIDY TYTONIU – CHARAKTERYSTYKA,
PRZEMIANY W ROŚLINIE ORAZ WYZWANIA DLA HODOWLI ROŚLIN*

Słowa kluczowe: nikotyna, nornikotyna, tytoń szlachetny, biosynteza, hodowla mutacyjna, interferencja RNA

Wstęp

Alkaloidy to naturalnie występujące w przyrodzie związki organiczne, głównie pochodzenia roślinnego, charakteryzujące się obecnością jednego lub więcej atomów azotu zazwyczaj w pierścieniach heterocyklicznych. Obecnie znanych jest ponad kilka tysięcy tego typu związków. Stanowią one zróżnicowaną strukturalnie grupę produktów występujących zarówno w postaci wolnych zasad, rozpuszczalnych w wodzie soli kwasów organicznych, estrów, jak i w połączeniu z taninami czy cukrami. Wykazują właściwości zasadowe i mają silne oddziaływanie na organizmy ludzkie i zwierzęce, co tłumaczy się ich strukturalnym podobieństwem do ważnych związków sygnałowych (neuroprzekazników), takich jak: dopamina, acetylocholina, noradrenalina i serotonina (44). Wiele z nich stanowi składniki leków i środków farmaceutycznych wykazujących działanie rozkurczowe, znieczulające, przeciwbólowe, przeciwkaszlowe, przeciwreumatyczne, żółciopędne, przeciwzapalne i przeciwgorączkowe. Znaczna część alkaloidów przejawia również właściwości antybakteryjne i przeciwgrzybicze (46). Istnieje wiele doniesień wskazujących, że są one produktami ubocznymi procesów metabolicznych roślin. Pełnią również rolę „broni chemicznej” przed patogenami i szkodnikami (60). Ze względu na swój gorzki smak ograniczają lub uniemożliwiają owadom żerowanie na roślinach. Niektóre z nich są toksyczne dla owadów lub zaburzają ich rozwój i zdolności rozrodcze. Podkreśla się również ich działanie stymulujące i regulujące w procesie wzrostu, metabolizmu i reprodukcji roślin (6). Alkaloidy mogą stanowić prekursorzy do produkcji białek i brać udział

*Opracowanie wykonano w ramach zadania 6.3 pt. „Upowszechnianie wiedzy o wynikach uzyskiwanych w ramach realizacji zadania (hodowla i nasiennictwo chmielu i tytoniu)” z dotacji budżetowej przeznaczonej na realizację zadań MRiRW w 2022 r.

w procesie formowania nasion. Dodatkowo odgrywają rolę w detoksykacji szkodliwych czynników poprzez metylowanie, kondensację i cyklizację związków, których nagromadzenie w komórkach prowadzi do uszkodzenia rośliny. Produkowane są najczęściej w asymilujących częściach roślin, a kumulowane zazwyczaj w liściach, owocach, nasionach, kwiatach, korzeniach i korze (61).

Oszacowano, że niemal jedna czwarta roślin wyższych zawiera w swym składzie alkaloidy. Szczególnie bogate w te związki są gatunki z rodziny *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, a także *Solanaceae* (44). W obrębie rodziny *Solanaceae* ważnym źródłem alkaloidów jest tytoń szlachetny (*Nicotiana tabacum* L). Ten pochodzący z Ameryki Południowej i Meksyku gatunek zawiera szereg alkaloidów, które wykazują silne działanie fizjologiczne na ludzi i zwierzęta. Stosowane w niewielkich dawkach działają pobudzająco na receptory cholinergiczne odpowiedzialne za przesyłanie impulsów nerwowych, wzmagają aktywność ruchową, stymulują pracę gruczołów wydzielniczych. Większe dawki alkaloidów mogą powodować nudności, wymioty, zaburzenia rytmu serca, porażenie układu oddechowego i nerwowego oraz powstawanie procesów nowotworowych (44). Pod względem budowy chemicznej wszystkie alkaloidy tytoniowe są pochodnymi pirydyny – heterocyklicznego związku chemicznego z grupy azyn o aromatycznym, sześcioczołowym pierścieniu zawierających co najmniej jeden atom azotu. Część z nich w swej strukturze chemicznej zawiera także pierścienie piperydynowy lub pirolidynowy powstałe w wyniku cyklizacji i dekarboksylacji aminokwasów białkowych, takich jak: lizyna, ornityna, prolina czy kwas glutaminowy (77). Do najważniejszych alkaloidów tytoniowych należą: nikotyna, nornikotyna, anabazyna, anatabina, miozmina i kotynina. Dominującym związkiem stanowiącym od 90 do 95% ogólnej puli alkaloidów jest nikotyna (77). Jej obecność w liściach w uznanych granicach jest korzystna i oczekiwana, sprzyja bowiem podniesieniu jakości surowca tytoniowego. Pozostałe alkaloidy stanowią od 5 do 10% całkowitej zawartości alkaloidów, przy czym w niektórych odmianach uprawnych dominuje nornikotyna. Obecność tego alkaloidu w tytoniu jest wysoce niepożądana, gdyż stanowi on prekursor związków potencjalnie rakotwórczych (32).

Niniejsze opracowanie przedstawia charakterystykę właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych nikotyny oraz nornikotyny, jak również etapy biosyntezy tych związków. Omówiono także wyzwania stojące przed hodowcami tytoniu w związku z opublikowanymi w 2015 r. rekomendacjami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dotyczącymi profilu alkaloidowego surowca tytoniowego.

Właściwości fizyczne i chemiczne nikotyny

Pierwsze wzmianki o występowaniu pobudzającej substancji w liściach tytoniu pochodzą z XVII wieku. Od tego czasu poznano jej budowę chemiczną, właściwości fizyczne i aktywność biologiczną. Nikotyna ma postać bezbarwnej, oleistej i ciemniejącej na powietrzu cieczy. Chemicznie czysta nikotyna jest prawie bezwonna,

natomiast charakteryzuje się ostrym, długo utrzymującym się smakiem. Jej temperatura wrzenia wynosi 246–247°C, jednakże zaczyna ulatniać się w znacznie niższej temperaturze. Rozpuszcza się dobrze w większości rozpuszczalników organicznych, a także w wodzie o temperaturze poniżej 60°C (70). Jest związkiem heterocyklicznym powstałym w wyniku połączenia sześcioczłonowego pierścienia pirydyny i pięcioczłonowego pierścienia pirolu, którego atom węgla w pozycji 2 stanowi centrum chiralne. Znane są dwa izomery optyczne nikotyny, tj. L-nikotyna i D-nikotyna, różniące się kierunkiem skręcania światła spolaryzowanego. W komórkach roślinnych alkaloid ten występuje najczęściej w połączeniu z kwasami jabłkowym i cytrynowym, tworząc sole, poza tym może być związany z garbnikami i żywicami (45). Jest związkiem chemicznym o silnym działaniu psychoaktywnym i uzależniającym (45).

Biosynteza nikotyny w tytoniu szlachetnym

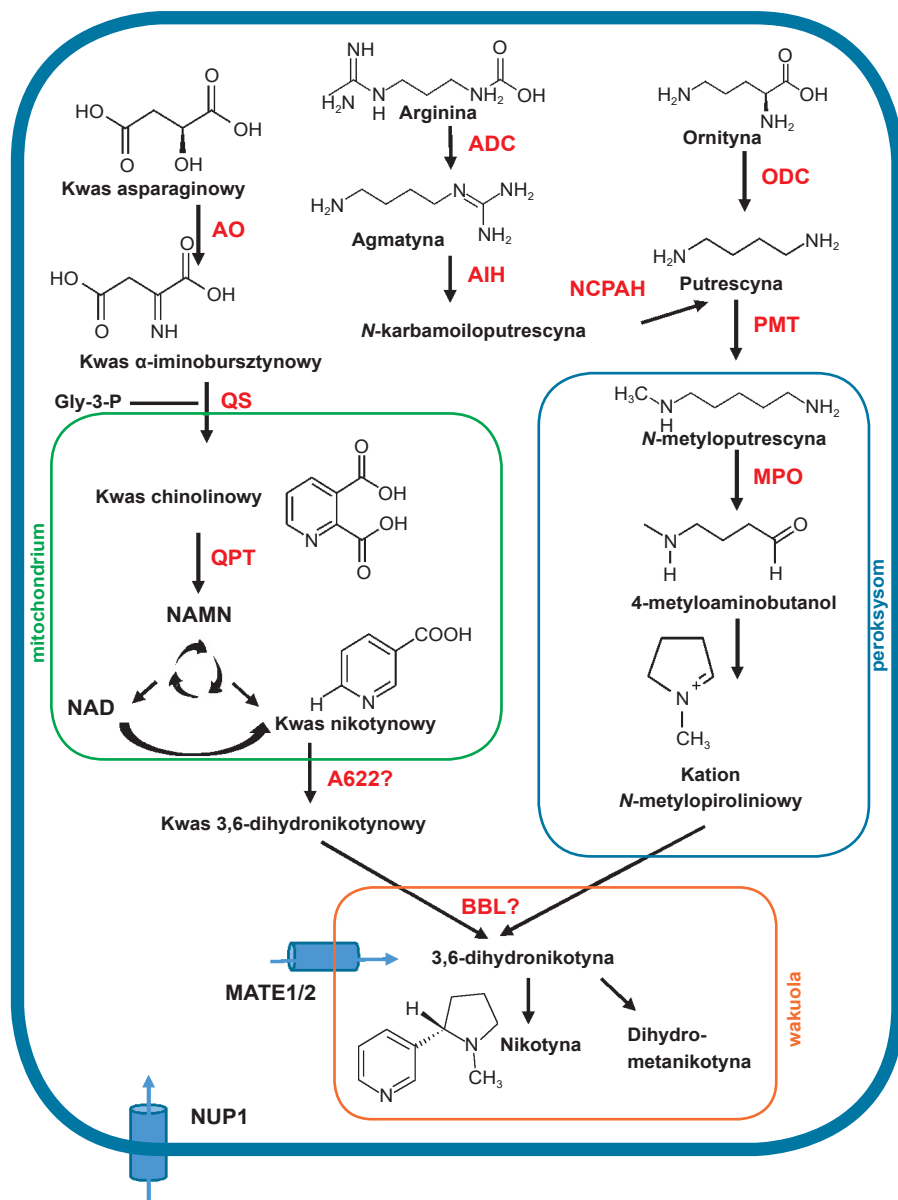
Biosynteza nikotyny jest procesem złożonym, kontrolowanym przez dwa niepowiązane ze sobą genetyczne *loci* *NICI* i *NIC2* warunkujące produkcję enzymów katalizujących reakcje dwóch niezależnych szlaków metabolicznych prowadzących do powstania pierścienia pirolidynowego i pierścienia pirydynowego (66). Substratem w szlaku prowadzącym do powstania pierścienia pirolidynowego jest putrescyna (rys. 1), która może być wytwarzana dwiema alternatywnymi drogami: bezpośrednio z ornityny w wyniku działania dekarboksylazy ornitynowej (ODC) lub pośrednio z argininy (83). W metodzie pośredniej arginina jest dekarboksylowana do agmatyny z udziałem dekarboksylazy argininowej (ADC). Następnie podlega hydrolizie do *N*-karbamoilputrescyny przez iminohydrolazę agmatyny (AIH), a potem do putrescyny przez amidohydrolazę *N*-karbamoilputrescyny (NCPAH) (37). Dalej putrescyna jest przekształcana do *N*-metyloputrescyny przez *N*-metylotransferazę putrescyny (PMT). Wreszcie, *N*-metyloputrescyna jest deaminowana oksydacyjnie przez oksydazę *N*-metyloputrescyny (MPO) do 4-metyloaminobutanalu, który spontanicznie cyklizuje, tworząc kation *N*-metylopiroliniowy. Kation *N*-metylopiroliniowy stanowi substrat do tworzenia pierścienia pirolidynowego. Katalizatorem reakcji jest syntaza nikotyny (SN) (8).

Szlak syntezy pierścienia pirydynowego nikotyny rozpoczyna się od kwasu L-asparaginowego, który jest utleniany przez oksydazę L-asparaginianową (AO) do kwasu α -iminobursztynowego. W kolejnym etapie 3-fosforan aldehydu glicerynowego przy udziale syntazy chinolinowej (QS) kondensuje z kwasem α -iminobursztynowym, tworząc kwas chinolinowy (17). Następnie kwas chinolinowy jest przekształcany do NAMN (mononukleotydu niacyny) przez kluczowy w syntezie wielu alkaloidów enzym fosforybozylotransferazę kwasu chinolinowego QPT (83). NAMN może być przekształcony w kwas nikotynowy albo bezpośrednio przez glikohydrolazę NAMN, albo poprzez wieloetapowy proces obejmujący syntezę i degradację koenzymu NAD (dinukleotydu nikotynamidowo-adeninowego) (74, 75, 76).

W ostatnim etapie syntezy nikotyny prekursor – kwas nikotynowy jest redukowany początkowo do kwasu 3,6-dihydronikotynowego (47, 48), następnie ulega dekarboksylacji i sprzężeniu z substratem *N*-metylopiroliniowym. W kondensacji pierścienia piroolidyny i pirydyny pośredniczą dwie oksydoreduktazy A622 oraz białka BBL (ang. *berberine bridge enzyme-like*). Jednak dokładny przebieg finalnego etapu biosyntezy nikotyny, jak również skład i budowa enzymów w to zaangażowanych pozostają wciąż niewyjaśnione (18, 42). Nowo zsyntetyzowana nikotyna jest transportowana do wakuoli przez zlokalizowane w tonoplastach transportery (65).

Jak wykazały badania Chaze (12) oraz Fardy i in. (24) prowadzone z wykorzystaniem technik histochemicznych, głównym miejscem syntezy alkaloidów są komórki kory usytuowane w wierzchołkowej części korzeni. Zastosowanie szczepienia komercyjnej odmiany pomidora na podkładkach *N. tabacum* ‘Samsun’ zaowocowało pojawieniem się znacznych ilości nikotyny w liściach pomidora (30). Również eksperymenty z zastosowaniem kultur komórkowych szeregu gatunków z rodzaju *Nicotiana* potwierdziły, że bazowym miejscem syntezy alkaloidów tytoniowych są korzenie. Flores i Filner (25) podają, że w kulturach korzeni i włośników *N. tabacum* odnotowano intensywną syntezę nikotyny (3% s.m.), podczas gdy hodowle kalusa oraz zawiesin komórkowych pozyskanych z liści *N. tabacum* ‘Wisconsin 38’ produkowały śladowe ilości tego związku (71).

Większość wyprodukowanej w korzeniach nikotyny jest transportowana ksylemem do liści, kwiatów i nasion, gdzie ulega nagromadzeniu w wakuolach komórkowych. Translokacja nikotyny odbywa się z uwagi na to, że wysoki jej poziom w korzeniach powoduje hamowanie zwrotne ekspresji genów zaangażowanych w syntezę alkaloidu. Utrzymywanie niskiego stężenia nikotyny w cytoplazmie komórek korzeni jest istotne dla zapewnienia jej ciągłej produkcji (77). Z kolei jej sekwestracja w wakuolach komórkowych liści jest swego rodzaju roślinną strategią detoksykacji alkaloidów i ochrony komórek przed zatruciem (65). W translokację i akumulację endogennej nikotyny zaangażowanych jest kilka transporterów z rodziny MATE (ang. *multidrug and toxic compound extrusion*), jak również z rodziny permeaz wychwyty puryny. Transportery typu MATE, w tym NtMATE1 i NtMATE2, to rozmieszczone w komórkach korzeni białka wykorzystujące antyport protonów z wakuoli do przemieszczania cytoplazmatycznej nikotyny przez tonoplast komórek korzenia (65). Z kolei transporter Nt-JAT1 jest zaangażowany w wakuolarną akumulację nikotyny w nadziemnych częściach roślin tytoniu w liściach, lokalizuje się w tonoplastcie i wykazuje aktywność antyportu nikotynowo-protonowego. Nt-JAT1 może funkcjonować w procesie wypływu nikotyny z komórek i ładowania jej do ksylemu w korzeniach.



Rys. 1. Szlaki metaboliczne prowadzące do biosyntezy nikotyny w komórkach korzeni *Nicotiana tabacum* L. Czerwoną czcionką oznaczono enzymy uczestniczące w poszczególnych etapach szlaku, NAMN – mononukleotyd kwasu nikotynowego, NAD – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, NCPAH – aminohydrolaza *N*-karbamoiłputrescyny, AIH – iminohydrolaza agmatyny, PMT – *N*-metylotransferaza putrescyny, MPO – oksydaza *N*-metyłputrescyny, AO – oksydaza asparaginianowa, QS – syntaza kwasu chinolinowego, QTP – fosforybozyłotransferaza chinolinianowa, ADC – dekarboksylaza argininowa, ODC – dekarboksylaza ornityny, BBL – enzymy mostka berberynowego, A622 – oksydoreduktazy, MATE1/2, NUP1 – transportery nikotyny

Źródło: Zenkner i in., 2019 (83); Dewey i Xie, 2013 (19)

Kolejny transporter Nt-JAT2 został zidentyfikowany jako transporter nikotyny w liściach. Nt-JAT2 lokalizuje się w tonoplacie i bierze udział w transporcie nikotyny do światła wakuoli specyficznie w liściach (58). Wreszcie rozmieszczony w błonie plazmatycznej tytoniu transporter (białko) z rodziny permeaz wychwyty nikotyny 1 (NUP 1) zaangażowany jest w wychwytywanie puryn i zapobieganie utracie nikotyny z apoplastu. NUP1 wykorzystuje symport protonowy do wychwyty nikotyny (35). Ekspresja NUP1 zachodzi głównie w komórkach epidermalnych wierzchołków korzeni, chociaż niską ekspresję wykryto także w liściach i łodygach roślin tytoniu. NUP1 może zapobiegać utracie nikotyny z apoplastu, a nawet pobierać wydzieloną nikotyne z powrotem do tkanek korzenia (43). NUP1 funkcjonuje w celu utrzymania preferowanej homeostazy nikotyny w komórkach korzenia poprzez regulowane uwalnianie i resorpcję nikotyny pomiędzy komórkami korzenia a ryzosferą (19). Sugerowano również, że transporter NUP1 może importować nikotyne z ksylemu do komórek liścia (39). Wciąż nierozpoznane są transportery odpowiedzialne za wprowadzenie nikotyny do ksylemu w korzeniach, jak również uwolnienie nikotyny z ksylemu do komórek liści.

Regulacja zawartości nikotyny w tytoniu

Każda część rośliny tytoniu zawiera nikotyne. Jak podaje Weeks i Bush (78), niewielkie ilości tego związku można wykryć nawet w dojrzałych nasionach. Znaczny wzrost koncentracji nikotyny i innych alkaloidów notuje się wraz z kiełkowaniem nasion i wzrostem wydłużeniowym korzenia. Czynniki modyfikującymi kumulację nikotyny na tym etapie rozwoju mogą być temperatura otoczenia i światło. Doświadczenia wykazały, że największą akumulację nikotyny ($2588 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.) uzyskano w siewkach utrzymywanych przez 144 godziny w temperaturze 27°C , a najmniejszą ($51 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.) w siewkach poddanych działaniu temperatury 16°C przez ten sam okres czasu. Gromadzeniu nikotyny w siewkach sprzyja również początkowa 8-godzinną fotoindukcja nasion, a następnie utrzymywanie ich w ciemności. Wraz ze wzrostem tytoniu wzrasta także produkcja nikotyny w roślinie. Największa jej ilość jest wytwarzana po osiągnięciu przez rośliny faz pąkowania i kwitnienia. Rozmieszczenie nikotyny w poszczególnych organach jest mocno zróżnicowane. Większość nikotyny jest magazynowana w liściach. Nieco mniej alkaloidu gromadzi się w kwiatach, a znacznie mniej w łodygach i korzeniach. Poziom nikotyny w liściach tytoniu jest także uzależniony od położenia na łodydze (69). Djordjevic i in. (20) podają, że liście tytoniu Virginia pozyskane z dolnej części rośliny zawierają niemal dwukrotnie mniej nikotyny niż liście zebrane z jej wierzchołka (odpowiednio: $37,37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ i $60,37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.). Również rozmieszczenie nikotyny w blaszce liściowej nie jest równomierne. Najwięcej alkaloidu jest w brzeżnej części blaszki liściowej, a najmniej u podstawy i w końcowym fragmencie liścia (7, 9). Różnice w rozmieszczeniu nikotyny między segmentami liścia tytoniu ciemnego suszonego powietrzem 'KY171'

mogą wynosić nawet $43,04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. (7). Inni autorzy badający zmiany zawartości nikotyny w poszczególnych częściach rośliny zauważyli, że najbogatsza pod tym względem jest skórka liści, a następnie miękisz gąbczasty liści. Nieco mniej nikotyny zawiera kora pierwotna korzeni, skórka i tkanka miękiszowa łodygi oraz miękisz palisadowy liści. Małe ilości nikotyny zawierają nerwy liści i rdzeń łodygi. Najmniej alkaloidu stwierdzono natomiast w walcu osiowym korzeni (56). Decydujący wpływ na produkcję i gromadzenie nikotyny w liściach tytoniu wywierają jednak właściwości genetyczne odmian i przynależność do typu użytkowego. Pośród różnych typów użytkowych tytoń orientalny i odmiana Maryland mają na ogół niską zawartość nikotyny stanowiącą od 0,3 do 1% s.m. Z kolei tytoń typu Virginia odznacza się zawartością nikotyny od niskiej do średniej (1–2,5%). Liście odmian kubańskich, tytoniu typu Burley, mają średnią zawartość nikotyny (3–4% s.m.). W przypadku niektórych odmian należących do tytoniu ciemnego (typ Mocny Skroniowski) zawartość nikotyny może wynosić 4–5% (2, 21, 56).

Oprócz czynników genetycznych zawartość nikotyny w liściach tytoniu pozostaje pod dużym wpływem czynników środowiska, takich jak: wilgotność gleby, temperatura czy nasłonecznienie. Nadmierne opady wpływają niekorzystnie na akumulację azotu, a w efekcie nikotyny w roślinie, głównie z powodu wymywania pierwiastka z gleby (73). Z kolei mała ilość opadów atmosferycznych w sezonie wegetacyjnym sprzyja akumulacji nikotyny w liściach (4). Łagodny stres suszy prowadzi bowiem do wzmożonej produkcji kwasu jasmonowego będącego stymulatorem produkcji metabolitów wtórnych, w tym nikotyny. Dodatkowo zaobserwowano, że u odmian typu Virginia zmiany stężenia nikotyny są zwykle mniej związane z wahaniami wilgotności gleby, natomiast w przypadku odmian typu papierosowego ciemnego wysoka lub niska wilgotność gleby wywiera zdecydowanie większy wpływ na syntezę i akumulację alkaloidów (79). Również temperatura gleby może modyfikować profil alkaloidowy tytoniu. Malik i in. (54) poddali strefę korzeniową tytoniu działaniu różnych temperatur: 12, 25, 30°C. Stwierdzili, że rośliny utrzymywane przez dwie doby w temperaturze 30°C odznaczały się zdecydowanie niższą zawartością nikotyny w korzeniach i wyższą zawartością tego alkaloidu w liściach w porównaniu z roślinami uprawianymi w temperaturach 12 i 25°C. Było to wynikiem obniżenia w korzeniu poziomu ekspresji genów warunkujących produkcję enzymów PMT i A622 uczestniczących w biosyntezie nikotyny, ale także zmian w transporcie i akumulacji nikotyny w liściach. Mechanizmy molekularne, za pomocą których stres temperaturowy zmienia ekspresję genów pozostają wciąż nieznane. Z danych zamieszczonych przez Tso i in. (72) wynika, że zawartość nikotyny w tytoniu może rosnąć wraz ze wzrostem nasłonecznienia roślin. W wyniku wydłużenia fotoperiodu z 8 do 16 godzin odnotowano zwiększoną zawartość nikotyny w liściach (odpowiednio z $5,28$ do $19,80 \text{ mg} \cdot \text{roślin}^{-1}$).

Poziom i skład alkaloidów tytoniowych w znacznym stopniu zależą od zasobności stanowiska. Gleby żyzne, z dużą zawartością materii organicznej, sprzyjają

gromadzeniu nikotyny w liściach. Równie ważnym czynnikiem jest nawożenie mineralne roślin. Odpowiednie zaopatrzenie w składniki pokarmowe intensyfikuje wzrost systemu korzeniowego i części nadziemnej roślin, co przekłada się na wzrost parametrów chemicznych liści. Jednym z najważniejszych składników mineralnych wpływającym na poziom nikotyny w liściach jest azot (N) (15). Efektywność nawożenia tym pierwiastkiem jest znacznie bardziej zauważalna w porównaniu z działaniem innych składników mineralnych, ale pierwiastek ten musi być stosowany w umiarkowanych dawkach. Nadmiar N może opóźnić dojrzewanie liści i obniżyć jakość plonu (73). Zrównoważone zaopatrzenie roślin w ten pierwiastek sprzyja prawidłowemu rozwojowi roślin i intensywnej biosyntezy nikotyny w korzeniach. Drake i in. (23) stosowali różne dawki azotu (75, 100, 125%) w 5 terminach wzrostu tytoniu Virginia (tj. 0, 2, 4, 6, 8 tygodni po sadzeniu roślin). Uzyskali porównywalnie wysoką zawartość alkaloidów w liściach (>2,75% s.m.), stosując standardowo zalecaną dawkę N (100%) rozłożoną równomiernie w trakcie sezonu wegetacyjnego podobnie jak po aplikacji 125% zalecanej dawki podanej głównie przed sadzeniem rozsady i w początkowej fazie wzrostu roślin. Jak podaje Wilkinson i in. (80) oraz Tso (73), sposób aplikacji i rozmieszczenie nawozu azotowego ma również znaczący wpływ na stężenie nikotyny. Równomiernie rozproszone stosowanie nawozu zwykle powoduje ograniczone pobieranie azotu i w konsekwencji niższą zawartość nikotyny w liściach. Z kolei nawożenie zlokalizowane, pasowe, zwiększa pobieranie azotu, co prowadzi do zwiększenia zawartości nikotyny w roślinie (26). Drugim niezbędnym składnikiem pokarmowym oddziałującym na zawartość nikotyny w tytoniu jest potas (K). Zalecenia dotyczące optymalnych dawek nawożenia K różnią się w zależności od rodzaju gleby, pozostałości pierwiastka w glebie, terminu jego stosowania, a nawet w zależności od odmiany tytoniu. Z reguły rolnicy stosują duże dawki potasu – od 130 do 160 kg·ha⁻¹ w postaci K₂O w celu uzyskania wysokich plonów, a także zapewnienia odpowiedniego poziomu składnika, zwłaszcza na glebach gruboziarnistych, podatnych na wymywanie. Zaobserwowano jednak, że nadmiernie wysoki poziom potasu w glebie wyraźnie ogranicza produkcję nikotyny w korzeniach (81). Zupełnie odmienna sytuacja jest w przypadku nawożenia fosforem. Jego zawartość w glebie nie wpływa zasadniczo na poziom nikotyny w liściach (53). Aczkolwiek Gaines i in. (27) podają, że wywołane w uprawie hydroponicznej niedobory podstawowych makroskładników, w tym fosforu, spowodowały obniżenie poziomu alkaloidów w porównaniu z obserwowanym w roślinach kontrolnych optymalnie zaopatrzonych w składniki pokarmowe. Również Henry i in. (33) zalecają, by unikać niedoborów fosforu, ponieważ mogą one intensyfikować negatywny wpływ pobierania azotu przez rośliny w okresie dojrzewania liści i w konsekwencji pogarszać profil alkaloidowy roślin.

Większość praktyk agrotechnicznych poprawiających zdrowotność roślin i wielkość plonów ma pozytywny wpływ na produkcję i akumulację alkaloidów. Wśród nich wymienia się między innymi sadzenie roślin. Wpływ wywiera zarówno termin

sadzenia, jak i wielkość sadzonek. Badania przeprowadzone przez Hawksa i in. (31) wykazały, że rośliny posadzone 2 tygodnie wcześniej niż zwykle miały najniższy poziom alkaloidów w czasie zbioru, podczas gdy rośliny posadzone 2 tygodnie później od zalecanego terminu miały znacznie wyższy poziom alkaloidów. Również Miner (57) wykazał wyższy poziom alkaloidów w roślinach posadzonych 4 tygodnie później niż zwykle. Z kolei Congleton i in. (16) nie zaobserwowali znaczących różnic w poziomie alkaloidów, gdy tytoń sadzono o 4–8 tygodni później niż zwykle. Autorzy nadmieniają jednak, że sadzonki wysadzone na polu po zalecanym terminie mają tendencję do przedwczesnego kończenia fazy wegetatywnej, co skutkuje przedwczesnym kwitnieniem, wytworzeniem na roślinie niewielkiej liczby liści z niską zawartością nikotyny. Gromadzeniu nikotyny w liściach służy uprawa roślin w szerokiej rozstawie. Małe zagęszczenie roślin sprzyja bowiem optymalnemu zaopatrzeniu w składniki pokarmowe, w tym związki azotowe, co skutkuje zwiększoną produkcją alkaloidów.

Jednym z ważniejszych zabiegów pielęgnacyjnych tytoniu, który wpływa korzystnie na skład chemiczny liści jest „ogławianie” roślin, czyli usuwanie kwiatostanu głównego. Zabieg ten ma na celu zatrzymanie asymilatów i produktów przemiany materii w liściach, dzięki czemu stają się większe i treściwsze (73). Dodatkowo praktyka ta wpływa znacząco na wzrost zawartości nikotyny w liściach (26). Uważa się, że usunięcie kwiatostanu znosi dominację wierzchołkową, pobudza wzrost korzeni, a dodatkowo uruchamia szlak sygnałowy kwasu jasmonowego (JA) (63). Aktywacja szlaku sygnałowego JA w liściach przyczynia się do wzrostu puli JA w korzeniach oraz ekspresji licznych genów zaangażowanych w reakcje obronne roślin. Białkowe produkty tych genów z kolei indukują produkcję nikotyny poprzez regulację enzymów zaangażowanych w biosyntezę alkaloidu, np.: PMT (5, 34). W efekcie notuje się wzrost zawartości nikotyny w liściach (1). Ustalenie optymalnej wysokości ogławiania jest dość trudne z powodu dużego zróżnicowania odmian komercyjnych pod względem liczby liści, jak również predyspozycji do produkcji alkaloidów. Z reguły pozostawienie na roślinie większej liczby liści skutkuje niższym stężeniem nikotyny, podczas gdy niskie ogławianie i pozostawienie na roślinie małej liczby liści prowadzi do wyższego stężenia nikotyny. Gršić i in. (29) badali wpływ wysokości ogławiania na zawartość nikotyny w liściach trzech odmian tytoniu papierosowego jasnego. Wykazali, że skrócenie pędu i pozostawienie na łodydze 17 zamiast 20 liści prowadzi do wzrostu koncentracji nikotyny średnio o 0,11%. Efekty niskiego ogławiania roślin w postaci wzrostu zawartości alkaloidów głównych są najwyraźniejsze w liściach środkowych i górnych (26). Zabieg ogławiania tytoniu można przeprowadzać w fazie pąkowania roślin, w okresie pojawiania się pierwszych różowych kwiatów lub podczas pełni kwitnienia. Stocks i Whitty (68) utrzymują, że termin usunięcia kwiatostanu wpływa znacząco na koncentrację alkaloidów w liściach. Najlepszym terminem ogławiania tytoni papierosowych jasnych (typy Virginia i Burley) rosnących na glebach piaszczysto-gliniastych jest początek kwitnienia.

Usunięcie pędu głównego przerywa dominację wierzchołkową i stymuluje rozwój pędów bocznych. Pędy boczne tytoniu, potocznie zwane pasynkami, wyrastają z pąków znajdujących się w kątach liści. Pozostawienie ich na roślinie oprócz wyraźnych strat w plonowaniu, o ok. 20–35%, powoduje spadek zawartości nikotyny w liściach (79). Tso (73) utrzymuje, że sposób usuwania odrostów bocznych wywiera znaczący wpływ na zawartość nikotyny. Efektem ręcznego niszczenia odrostów jest najczęściej wzrost koncentracji nikotyny w liściach. Natomiast użycie do tego celu chemicznych regulatorów wzrostu może przyczynić się do spadku jej zawartości. Po zastosowaniu hydrazylu maleinowego całkowita zawartość alkaloidów w roślinach spadła o 0,32% w porównaniu z notowaną u roślin, na których zabieg wykonano ręcznie. Zupełnie inaczej jest w przypadku niszczenia odrostów przy użyciu środków z grupy herbicydów. Ich stosowanie niekiedy wręcz sprzyja akumulacji alkaloidu. Jak wykazały badania Jones i Rideout (38), w wyniku stosowania flumetraliny w dawce 57 mg·roślinę⁻¹ stężenie nikotyny w liściach wyniosło 2,54%, podczas gdy po aplikacji dawki 91 mg·roślinę⁻¹ zawartość nikotyny wyniosła 3,12%.

Kolejnym zabiegiem wywierającym znaczący wpływ na poziom nikotyny w surowcu tytoniowym jest zbiór liści. Przed przystąpieniem do zbiorów należy ocenić dojrzałość technologiczną liści, tj. określić ich barwę, lepkość i ułożenie względem łodygi. Zbiór liści w odpowiedniej fazie jest ważny nie tylko z uwagi na osiągnięcie jak najlepszych cech fizycznych surowca, ale także parametrów chemicznych, w tym pożądanej koncentracji alkaloidów. Zbyt wczesne podrywanie liści skutkuje otrzymaniem surowca z dużą zawartością wody, białka i chlorofilu, a małą ilością składników aromatycznych i nikotyny. Z kolei zbiór nieco przejrzałych liści przyczynia się do uzyskania surowca z małą zawartością węglowodanów i zwiększonym poziomem nikotyny (29). Większa liczba zbiorów dostosowana do tempa dojrzewania liści na łodydze umożliwia uzyskiwanie surowca o pożądanej zawartości nikotyny w liściach. Warto zauważyć, że na zawartość alkaloidów tytoniu mogą wpływać także uszkodzenia powstałe podczas zbioru i przygotowanie liści do suszenia, jak również urazy spowodowane działaniem czynników atmosferycznych, np. gradu czy wiatru.

Nornikotyina – właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne

Kolejnym metabolitem wtórnym produkowanym przez tytoń szlachetny i wiele dzikich gatunków z rodzaju *Nicotiana* jest nornikotyina. Pierwsze wzmianki literaturowe o nornikotyinie pochodzą z 1927 r., kiedy to Polonovscy opisali metodę jej uzyskiwania. Identyfikacja tego alkaloidu w tytoniu odbyła się w 1928 roku przez Ehrensteina. Dwa lata później Von Brown i Weissbach uzyskali nornikotyinę w warunkach laboratoryjnych w wyniku demetylacji nikotyny. Nornikotyina jest bezbarwną, higroskopijną, nieco oleistą cieczą o lekkim zapachu aminy, który jest mniej ostry niż zapach nikotyny. Rozpuszcza się w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych. Jest jednak mniej lotna niż nikotyina (55). Pod względem budowy chemicznej nornikotyina

jest bardzo podobna do nikotyny. Zawiera dwa pierścienie, pirydyny i pirolidyny, przy czym do atomu azotu pirolidyny zamiast grupy metylowej został przyłączony atom wodoru. Podobnie jak nikotyna, jest substancją optycznie czynną, która w roślinach występuje w formie izomerów optycznych (enancjomerów) (S), (R) i SR-nornikotyny, wykazujących podobne właściwości fizyczne i chemiczne. Ich proporcje w komercyjnych odmianach tytoniu są zróżnicowane. Najczęściej dominuje forma R, która w korzeniach stanowi 60–80%, a w liściach 50–80%. Alkaloid ten powstaje w wyniku oksydacyjnej N-demetylacji nikotyny w nornikotyne zarówno w liściach, jak i korzeniach roślin (11, 67).

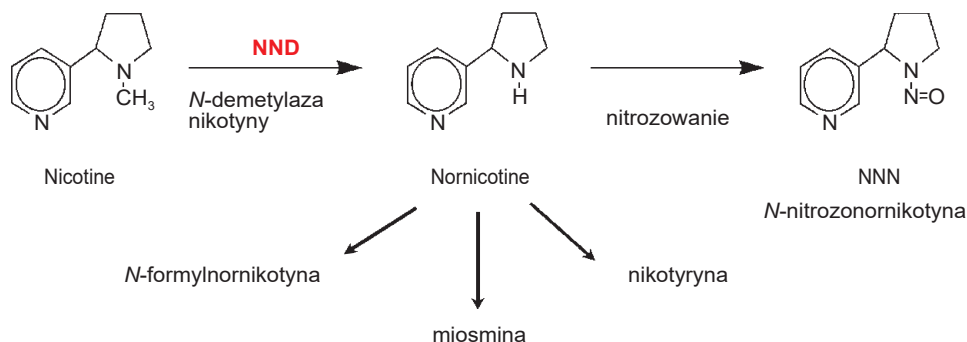
Przeprowadzone przez Blaima (3) badania sekwestracji nornikotyny przez *N. glutinosa* wykazały, że zawartość tego alkaloidu jest zmienna i uzależniona od wieku rośliny. Młode siewki są pozbawione nornikotyny. Natomiast starsze, 8-tygodniowe rośliny wykazują nieznaczny poziom tego alkaloidu, który wzrasta wraz ze wzrostem roślin. Nornikotyne z korzeni jest transportowana do najniższej położonych liści, z czasem trafia do tych z wyższych pięt. Stąd liście dolne zawierają największe ilości nornikotyny, a posiadają najmniej nikotyny. Natomiast liście środkowe, z mniejszą ilością nornikotyny, są zasobniejsze w nikotyne. Odnotowano także zróżnicowane rozmieszczenie nornikotyny w poszczególnych częściach blaszki liściowej. Brzegi liścia obfitują w nornikotyne, natomiast część środkowa jest niemal pozbawiona tego alkaloidu (3). Zawartość nornikotyny w tytoniu uprawnym waha się zazwyczaj od 2 do 5% ogólnej sumy alkaloidów (11). Znane są jednak odmiany tytoniu, w których nornikotyne stanowi nawet 95% ogółu alkaloidów. Należą do nich przede wszystkim odmiany zaliczane do typu użytkowego Burley, jak również do innych typów użytkowych, których liście suszone są na powietrzu. Natomiast większość odmian w typie Virginia charakteryzuje się niską zawartością nornikotyny (59, 67). Ilość nikotyny i nornikotyny oraz wzajemny stosunek zawartości tych dwóch substancji są wykorzystywane do oceny jakości tytoniu.

Nornikotyne wykazuje silne działanie na ludzi i zwierzęta. Uwalnia dopaminę w mózgu, przez co przyczynia się do wzmacniania działania nikotyny i przyspiesza proces uzależnienia. Jest uważana za jeden z najbardziej szkodliwych alkaloidów, ponieważ jest prekursorem specyficznej dla tytoniu N-nitrozonornikotyny (NNN), z grupy nitrozoamin tytoniowych (TSNA) (ang. *tobacco-specific nitrosamines*). Nitrozoaminy są odpowiedzialne za występowanie wielu nowotworów (32), zmieniają profil lipidowy krwi, powodując wzrost prawdopodobieństwa rozwoju miażdżycy i choroby wieńcowej. Dodatkowo obniżają poziom katalazy i dysmutazy nadtlenkowej, tj. enzymów biorących udział w niwelowaniu wpływu wolnych rodników na organizm człowieka. Testy farmakologiczne wykazały, że właściwości fizjologiczne nitrozonornikotyny zależą od optycznej formy jej występowania. Forma S-nitrozonornikotyny charakteryzuje się wyższą zdolnością akumulacji i wyższym poziomem toksyczności od formy R-nitrozonornikotyny (9).

Biosynteza nornikotyny w tytoniu szlachetnym

W wyniku działania funkcjonalnych *N*-demetylaz nikotyny (NND) zgromadzona w komórkach tytoniu nikotyna ulega przemianom biochemicznym (rys. 2). Grupa metylowa pierścienia pirolidynowego zostaje zastąpiona atomem wodoru, a nikotyna przekształca się w nornikotyne. Produktem ubocznym tej reakcji jest CO₂. Dowiedziono, że enzymy NND są kodowane przez grupę genów cytochromu P450 należących do podrodziny *CYP82E* (65). W *N. tabacum* występuje co najmniej pięć genów związanych z *CYP82E*. Są to: *CYP82E4*, *CYP82E5* i *CYP82E10*, które kodują funkcjonalne *N*-demetylasy nikotyny (10, 67, 51), jak również geny *CYP82E2* i *CYP82E3* kodujące enzymy nieaktywne (10). Badania dowiodły, że geny te znajdują się w niestabilnym locus sprzyjającym ich przemieszczaniu się, co w efekcie powoduje spontaniczne pojawianie osobników przekształcających nikotyne do nornikotyny (51). Stąd w populacjach odmian i linii hodowlanych, stabilnych pod względem wielu cech użytkowych, notuje się znaczne zróżnicowanie międzyosobnicze pod względem zawartości nikotyny i nornikotyny. Rośliny, które gromadzą nikotyne jako alkaloid główny nazywane są niekonwerterami, a te, u których znaczna część nikotyny przekształcana jest w nornikotyne, określane są jako konwertery. Wysoką frekwencję konwerterów obserwuje się przede wszystkim w odmianach należących do typu użytkowego Burley, w przypadku których proces suszenia prowadzony na powietrzu, w nieogrzewanych wiatach sprzyja oksydacyjnej *N*-demetylacji nikotyny. Mniejszy udział konwerterów notuje się natomiast wśród suszonych gorącym powietrzem odmian w typie Virginia, u których oddziaływanie wysokiej temperatury inaktywuje geny warunkujące przebieg konwersji (59).

Aktywność enzymów NND i efektywność konwersji nikotyny w nornikotyne są zróżnicowane i uzależnione od wielu czynników wewnętrznych, zewnętrznych, ale także fazy rozwojowej roślin. Według Chelvarajana i in. (13) czynnikiem wewnętrznym stymulującym aktywność NND może być podwyższony poziom NADH (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego) w komórkach. Zastąpienie NADPH formą NADH zwiększa trzykrotnie wydajność konwersji nikotyny w nornikotyne. Z kolei czynnikiem zewnętrznym wydatnie ograniczającym wydajność procesu demetylacji może być wzrost temperatury otoczenia powyżej 30°C. Donaldson i Luster (22) utrzymują, że skutecznym inhibitorem demetylacji nikotyny jest także tlenek węgla, który blokuje działanie NND.



Rys. 2. Schemat przemian nikotyny w roślinach tytoniu szlachetnego

Źródło: Siminszky i in., 2005 (67); Cai, 2012 (9)

Ustalono również, że w roślinach tytoniu zachodzi metylacja nornikotyny do nikotyryny i nikotyny, jak również przekształcenie nornikotyny do miosminy. Leete (49) przez 8 dni podawał młodym roślinom tytoniu znakowaną ($2\text{'-}^{14}\text{C}$) nornikotynę, a następnie dokonywał ekstrakcji i rozdzielania poszczególnych alkaloidów z roślin. Uzyskał nieznaczny stopień radioaktywności w nikotynie (0,047% pozyskanej nikotyryny) i znaczący poziom radioaktywności w miosminie (25,4%).

Modyfikacje zawartości nikotyny i nornikotyny a hodowla tytoniu

Konsumpcja wyrobów tytoniowych wciąż pozostaje dużym wyzwaniem dla zdrowia publicznego na całym świecie. Wiele instytucji, w tym Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), od lat prowadzi intensywną politykę antynikotynową, wskazując używanie wyrobów tytoniowych jako istotny czynnik ryzyka rozwoju wielu groźnych chorób. Chociaż nikotyryna nie jest rakotwórcza sama w sobie, wykazuje działanie uzależniające, a produkty jej przemiany są zaliczane do czynników rakotwórczych. W 2015 r. WHO opublikowała rekomendacje dotyczące obniżenia stężenia nikotyryny w krajance papierosowej do poziomu 0,04%. Uznano bowiem, że obniżenie zawartości składnika uzależniającego w surowcu i wyrobach tytoniowych może odegrać ważną rolę w koncepcji mającej na celu złagodzenie negatywnych skutków palenia tytoniu na poziomie światowej populacji.

Strategia redukcji zawartości nikotyryny w tytoniu może być realizowana z wykorzystaniem szeregu metod chemicznych, agrotechnicznych, prac hodowlanych oraz badań genetycznych. Ekstrakcja chemiczna nikotyryny z liści tytoniu pozwala zmniejszyć zawartość tego alkaloidu do bardzo niskiego poziomu, ale jednocześnie przyczynia się do zmniejszenia zawartości składników aromatycznych w surowcu. Z kolei uprawa odmian niskonikotyrynowych, jak również modyfikacje zabiegów agrotechnicznych, tj. zaniechanie ogławiania roślin i usuwania pędów bocznych tytoniu,

zmniejszenie dawki nawozów azotowych oraz zbiorów części liści z rośliny, oprócz ograniczenia zawartości nikotyny w liściach skutkują wyraźnym 25–50% spadkiem plonowania (33). Obniżenie potencjalnie kancerogennych związków w tytoniu może być prowadzone poprzez odpowiedni dobór form rodzicielskich do krzyżowania, a następnie selekcję osobników wykazujących niską zawartość niepożądanych alkaloidów. Wykorzystanie klasycznych metod hodowlanych jest strategią dość prostą i tanią, lecz wymagającą systematycznej kontroli profilu alkaloidowego osobników rodzicielskich. Jack i in. (36) wskazują, że rośliny rodzicielskie, które wykazują ponad 3% konwersję nikotyny do nornikotyny, powinny być usuwane z produkcji nasiennej. Zastosowanie tak rygorystycznej procedury przesiewowej i krzyżowanie wyłącznie niekonwertujących genotypów prowadzi do znacznego obniżenia zawartości nornikotyny i *N*-nitrozonornikotyny (NNN) w porównaniu z populacjami tytoniu, które nie były poddane tym czynnościom. Gavilano i in. (28) donoszą o uzyskaniu tą drogą elitarnych linii hodowlanych/odmian o niskim współczynniku konwersji. Zaznaczają jednak, że znaczna część roślin (>20%) w warunkach polowych może zmienić fenotyp na konwerterowy. Lewis i in. (51) także zauważają, że klasyczna hodowla w połączeniu z eliminacją konwerterów z populacji nasiennych nie jest skutecznym rozwiązaniem, ponieważ w każdym następnym pokoleniu mogą spontanicznie powstawać rośliny o wysokiej zawartości nornikotyny. Tłumaczy to tym, że geny z rodziny *CYP 450* regulujące konwersję nikotyny znajdują się w niestabilnym locus sprzyjającym ich przemieszczaniu się, co w efekcie powoduje spontaniczne pojawianie osobników konwerterów. Stąd w populacjach odmian i linii hodowlanych, stabilnych pod względem wielu cech użytkowych, notuje się znaczne zróżnicowanie międzyosobnicze pod względem zawartości nikotyny i nornikotyny. Niekontrolowane pojawianie się konwerterów stanowi poważny problem, głównie wśród odmian typu Burley. Również w niektórych odmianach typu Virginia zawartość nornikotyny może przekraczać dopuszczalny poziom 3% sumy alkaloidów.

W celu pozyskania stabilnych, niskonikotynowych odmian tytoniu słuszne zatem wydaje się zastosowanie hodowli mutacyjnej. Technika ta polega na generowaniu trwałych, tj. podlegających dziedziczeniu zmian w materiale genetycznym przy użyciu czynników chemicznych lub fizycznych. Wymaga działania na dużych populacjach roślin w celu uzyskania grupy osobników o wysokim stopniu mutagenizacji i niezmienionej morfologii oraz dostępności czułych metod pozwalających na szybką identyfikację mutacji w sekwencjach docelowych. Uzyskana w wyniku jej stosowania zmienność genetyczna jest powszechnie akceptowana przez społeczeństwo. Julio i in. (40) przeprowadzili mutagenezę podkiełkowanych nasion silnie konwertującej odmiany tytoniu typu Burley BB16NN przy użyciu metylenosulfonianu etylu (EMS) w stężeniach 0,8% i 0,6%. Technika mutagenезy genu *N*-demetylazy nikotynowej (*NtabCYP82E4*) w połączeniu z krzyżowaniem wstecznym uzyskanych mutantów z wysokiej jakości odmianami tytoniu umożliwiła otrzymanie w krótkim czasie (1,5 roku) niekonwertujących linii hodowlanych typu Burley. Wygenerowany materiał

roślinny w odróżnieniu od uzyskanego w przypadku stosowania hodowli konwencjonalnej wyróżniał się stabilnym, niekonwerterowym fenotypem warunkowanym trwałą dezaktywacją alleli *NtabCYP82E4*. Również Lewis i in. (51) wskazują, że doskonalenie i modyfikacja profilu alkaloidowego odmian uprawnych tytoniu może opierać się na stosunkowo szybkiej i prostej hodowli mutacyjnej. Poddając nasiona silnie konwertującej linii Burley DH98-325-6 działaniu EMS, wywołali mutacje nokautujące w genach demetylazy nikotynowej (*CYP82E4* i *CYP82E5v2*). Następnie skrzyżowali mutanty punktowe w *CYP82E4* oraz *CYP82E5v2* w celu połączenia obydwu mutacji w jednym genomie i uzyskali rośliny homozygotyczne pod względem obydwu mutacji, które wykazywały średnią konwersję nikotyny na poziomie 2,3%. Dalsze krzyżowanie homozygotycznych genotypów *e4e4/e5e5* i dołączenie kolejnej mutacji w genie *CYP82E10* dało bardzo dobry efekt w postaci potrójnych mutantów (*e4e4/e5e5/e10e10*), u których konwersja nikotyny do nornikotyny wyniosła średnio 0,55%. Skutecznym rozwiązaniem w redukcji zawartości alkaloidów linii DH98-325-6 była także chemiczna mutageneza izoform rodziny genów *BBL* (*BBLa*, *BBLb* i *BBLc*), przy czym najlepsze rezultaty uzyskano dla homozygot z potrójną kombinacją mutacji – *bbla/bbla bblb/bblb bblc/bblc* (52).

Równie przydatnym narzędziem w realizacji strategii obniżania nikotyny w tytoniu jest inżynieria genetyczna wykorzystująca m.in. modyfikację genetyczną poprzez antysensowną regulację ekspresji genów uczestniczących w szlaku biosyntezy nikotyny. Xie i in. (82) wprowadzili do genomu tytoniu Burley 21 antysensowny konstrukt genu *NtQPT1* warunkującego produkcję enzymu QPT. Ekspresja antysensownego transkrypty w tej samej komórce, w której następowała ekspresja sensownego transkrypty endogennego genu zmniejszyła ilość produktu kodowanego przez gen endogeny. Otrzymano transgeniczną linię Vector 21-41, o niezmiennych cechach morfologicznych w stosunku do odmiany kontrolnej i bardzo niskiej zawartości nikotyny. Podobny efekt uzyskali Chintapakorn i Hamill (14) poprzez transformowanie antysensownym fragmentem genu warunkującego produkcję *N*-metylotransferazy putrescyny (PMT). Otrzymali linie transformowanych korzeni tytoniu, które wykazywały wyraźnie obniżoną aktywność PMT, z równoczesnym obniżeniem zawartości nikotyny w porównaniu z liniami kontrolnymi. Dodatkowo wykazali, że manipulacja poprzez wprowadzenie konstrukt antysens-PMT miała niewielki wpływ lub nie miała żadnego wpływu na poziom transkryptów innych genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm alkaloidów. Transgeniczna supresja genu *MPO* w korzeniach włósnikowatych tytoniu skutkowałą zmniejszeniem zawartości nikotyny. Towarzyszył jej jednak gwałtowny wzrost zawartości anatabiny (64). Wprowadzenie do komórek małych, interferujących, dwuniciowych fragmentów RNA (RNAi) zahamowało również ekspresję genów *A622* i *A622L* warunkujących kondensację pierścienia pirodiny i pirydiny, co znacząco obniżyło produkcję wszystkich alkaloidów i jednocześnie indukowało akumulację β -*N*-glukozydu kwasu nikotynowego w komórkach tytoniu (41). Również wyciszenie ekspresji genów *BBL*

za pomocą konstruktów opartych na RNAi zmniejszyło zawartość nikotyny w liściach większości roślin transgenicznych do poziomu około 10% zawartości obserwowanej w obiekcie kontrolnym. Co więcej, supresja *BBL* za pomocą RNAi w komórkach BY-2 indukowanych MeJA zredukowała zawartość wszystkich alkaloidów pirydynowych do nieistotnego poziomu (42). Stosując metodę interferencji RNA homologicznego do produktu genu demetylazy nikotynowej *CYP82E4*, odpowiedzialnego za większość przemian nikotyny do nornikotyny, obniżono poziom konwersji nikotyny do wartości 0,5% zarówno w linii silnie konwertującej, jak i słabo konwertującej (28, 50). Ważną strategią redukcji poziomu nikotyny była także modyfikacja genów odpowiedzialnych za transport nikotyny z korzeni do liści, w tym genu warunkującego produkcję permeazy wychwyty nikotyny (NUP 1). Zahamowanie produkcji NUP 1 doprowadziło do zmniejszenia akumulacji nikotyny zarówno w korzeniach, jak i w liściach tytoniu (35). Zablockowanie ekspresji genów na drodze interferencji RNA z wykorzystaniem silnych, konstytutywnych promotorów niesie za sobą wiele korzyści. Sprawia, że zmodyfikowane rośliny stanowią mniejsze zagrożenie dla zdrowia konsumentów tytoniu, a ponadto nie wymagają intensywnej ochrony chemicznej. Istnieje jednak szereg ujemnych stron wprowadzenia tego typu modyfikacji genetycznych, wśród których wymienia się letalność, zahamowanie wzrostu roślin, zwiększenie stężenia nowych metabolitów, jak np.: dihydrometanikotyny (DMN) lub pogorszenie jakości suszonych liści (41, 42). Wymienione wady, a także liczne ograniczenia prawne uniemożliwiają wprowadzenie do uprawy genetycznie modyfikowanych odmian tytoniu.

Szereg możliwości modyfikacji profilu alkaloidowego tytoniu stwarza stosunkowo nowe narzędzie biologii molekularnej CRISPR-Cas (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). Pozwala ono na precyzyjne wprowadzenie zmian genetycznych w DNA komórkowym, określanych jako edytowanie genomu, bez wprowadzenia obcych genów. Dzięki tej technologii można dokonać między innymi mutacji określonego genu, a uzyskane zmiany są nie do odróżnienia od mutacji naturalnych lub indukowanych. Edytowanie rodziny genów *BBL* skutkowało uzyskaniem beznikotynowych, nietransformowanych genetycznie roślin *N. tabacum* (62). Wciąż jednak trwają prace nad doskonaleniem techniki edytowania genomu i poznaniem potencjalnych zagrożeń wynikających z jej stosowania.

Podsumowanie

Bardzo ważnymi składnikami tytoniu decydującymi o jakości technologicznej surowca są alkaloidy, wśród których ważną rolę odgrywają nikotyna i nornikotyna. Związki te wykazują silne działanie stymulujące na ludzi i zwierzęta poprzez oddziaływanie na ośrodkowy układ nerwowy, układ krwionośny i drogi oddechowe. W ostatnich latach liczne regulacje prawne skłaniające do obniżenia zawartości alkaloidów głównych w produktach tytoniowych, jak również rosnące wymagania podmiotów skupujących tytoń odnośnie jakości surowca i jego przydatności do pro-

dukcji tradycyjnych i elektronicznych papierosów, skłaniają do podejmowania prac badawczych i doskonalenia odmian uprawnych tego gatunku. Poprawę przydatności technologicznej odmian tytoniu przynosi hodowla selekcyjna oparta na eliminacji z populacji nasiennych osobników o niepożądanym profilu alkaloidowym. Dobrą alternatywą dla tradycyjnej hodowli jest hodowla mutacyjna oraz nowoczesne techniki biotechnologiczne, jak interferencja RNA czy technologia CRISPR-Cas. Ich wykorzystanie umożliwiło uzyskanie niemal beznikotynowych odmian tytoniu. Metody te nie znajdują jednak szerokiego praktycznego zastosowania z uwagi na niską akceptację społeczną organizmów genetycznie modyfikowanych.

Literatura

1. Baldwin I.T., Zhang Z.P., Diab N., Ohnmeiss T.E., McCloud E.S., Lynds G.Y., Schmelz E.A.: Quantification, correlation and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta*, 1997, **201**: 397-404.
2. Blakeley T., Bates M.: Nicotine and Tar in cigarette tobacco: a literature review to inform policy development, A report for the Ministry of Health of New Zealand, Institute of Environmental Science and Research Limited (ESR), 1998, p. 15-17.
3. Blaim K.: Występowanie normikotyny w *N. glutinosa*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 1963, **XXXII** 2: 303-312.
4. Biglouei M.H., Assimi M.H., Akbarzadeh A.: Effect of water stress at different growth stages on quantity and quality traits of Virginia (flue-cured) tobacco type. *Plant Soil and Environment*, 2010, **56**: 67-75.
5. Bowman D.T.: History of the Regional Minimum Standards Program for the release of flue-cured tobacco varieties in the United States. *Tobacco Science*, 1996, **40**: 99-110.
6. Britannica, The Editors of Encyclopaedia. „alkaloid”. *Encyclopedia Britannica*, Invalid Date, <https://www.britannica.com/science/alkaloid>. Accessed 2 June 2022.
7. Burton H.R., Dye N.K., Bush L.P.: Distribution of tobacco constituents in tobacco leaf tissue. 1. Tobacco-specific nitrosamines, nitrate, nitrite and alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, **40**: 1050-1055.
8. Bush L., Hempfling W.P., Burton H.: Chapter 2 – Biosynthesis of nicotine and related compounds. In: Analytical determination of Nicotine and related compounds and their metabolites, J.W. Gorrod, P. Jacob (eds). Elsevier Science, 1999, pp. 13-44.
9. Cai B.: Enantioselective demethylation: the key to the normicotine enantiomeric composition in tobacco leaf. University of Kentucky. PhD Dissertation, 2012, p. 20-23.
10. Chakrabarti M., Meekins K.M., Gavalano L.B., Siminszky B.: Inactivation of the cytochrome P450 gene CYP82E2 by degenerative mutations was a key event in the evolution of the alkaloid profile of modern tobacco. *New Phytologist*, 2007, **175**(3): 565-574.
11. Chakrabarti M., Bowen S.W., Coleman N.P., Meekins K.M., Dewey R.E., Siminszky B.: CYP82E4-mediated nicotine to normicotine conversion in tobacco is regulated by a senescence-specific signaling pathway. *Plant Molecular Biology*, 2008, **66**: 415-427.
12. Chaze J.: The alkaloids of tobacco. *Annales des Sciences Naturelles Botaniques* 1932, **14**: 5-116.
13. Chelvarajan R.L., Fannin F.F., Bush L.P.: *In vitro* demethylation of nicotine. *Tob Chemists' Res. Conf.*, 1991, **45**: 18.
14. Chintapakorn Y., Hamill J.D.: Antisense-mediated down-regulation of putrescine N-methyltransferase activity in transgenic *Nicotiana tabacum* L. can lead to elevated levels of anatabine at the expense of nicotine. *Plant Molecular Biology*, 2003, **53**(1-2): 87-105.

15. Collins W.F., Hawks S.N.: Principles of flue-cured tobacco production. North Carolina State Univ. Raleigh., USA, 1993.
16. Congleton W.F., Collins W.K., Hawks S.N.: Effect of transplanting date on the yield, grade index, and sugar and total alkaloid concentration of flue-cured tobacco. Tobacco Science, 1980, **24**: 148-149.
17. Dalton D.R.: Biosynthesis of nicotinic acid. In: Studies in organic chemistry, P. Gassman (ed.). Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 1980, pp. 147-149.
18. DeBoer K.D., Lye J.C., Aitken C.D., Su A.K.K., Hamill J.D.: The A622 gene in *Nicotiana glauca* (tree tobacco): evidence for a functional role in pyridine alkaloid synthesis. Plant Molecular Biology, 2009, **69**: 299-312.
19. Dewey R.E., Xie J.: Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry, 2013, **94**: 10-27.
20. Djordjević M.V., Brunemann K.D., Hoffmann D.: Identification and analysis of a nicotine-derived N-nitrosamino acid and other nitrosamino acids in tobacco. Carcinogenesis, 1989, **10(9)**: 1725-1731.
21. Djordjević M.V., Doran K.A.: Nicotine content and delivery Across Tobacco Products. In: Nicotine Psychopharmacology, J.E. Henningfield (ed.). Handbook of Experimental Pharmacology 192. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2009, pp. 61-82.
22. Donaldson R.P., Luster D.G.: Multiple forms of plant cytochrome P450. Plant Physiology, 1991, **96**: 669-674.
23. Drake M.P., Vann M.C., Fisher L.R.: Nitrogen application rate influence on yield, quality and chemical constituents of flue-cured tobacco, part I: Application timing. Tobacco Science, 2015, **52**: 11-17.
24. Farady A., Cuzn J., Schwartz D.: La nicotinogénese chez *Nicotiana tabacum* L. Resultats obtenus par la technique des micro-greffes at la culture de radicules d'embryons. Annales de l'institut expérimental du Tabac de Bergerac, 1953, **1**: 101-127.
25. Flores H.E., Filner P.: Metabolic relationship of putrescine, GABA and alkaloids in cell and rootcultures of *Solanaceae*. Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. In: K.H. Neumann, W. Barz, E. Reinhard (eds). Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1985, pp. 174-185.
26. Flower K.C.: Field practices. In: Tobacco: Production, chemistry, and technology, D.L. Davis and M.T. Nielsen (eds). Blackwell Science, London, UK, 1999, pp. 76-103.
27. Gaines J.G., Stephenson M.G., Gooden D.T.: Effects of nutrient deficiencies on chemical constituents on flue-cured tobacco. Tobacco Science, 1976, **20**: 95-97.
28. Gavilano L.B., Coleman N.P., Burnley L.E., Bowman M.L., Kalengamaliro N.E., Hayes A., Bush L., Siminszky B.: Genetic engineering of *Nicotiana tabacum* for reduced nornicotine content. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, **54(24)**: 9071-9078.
29. Gršić K., Butorac J., Čavlek M.: Effects of topping height, maturity and cultivar on the yield and chemical characteristics of flue-cured tobacco. Agriculturae Conspectus Scientificus, 2014, **79(3)**: 167-173.
30. Haberal M., Korpe D.A., Iseri O.D., Sahin F.I.: Grafting tomato onto tobacco rootstocks is a practical and feasible application for higher growth and leafing in different tobacco-tomato unions. Biological Agriculture Horticulture, 2016, **32**: 1-10.
31. Hawks S.N., Collins W.K., Kittrell B.U.: Effects of transplanting date, nitrogen rate and rate of harvest on extending the harvest of flue-cured tobacco. Tobacco Science, 1976, **20**: 51-54.
32. Hecht S.: Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. Nature Reviews Cancer, 2003, **3**: 733-744.
33. Henry J.B., Vann M.C., Lewis R.: Agronomic practices affecting nicotine concentration in flue-cured tobacco: a review. Agronomy Journal, 2019, **111**: 3067-3075.

34. Hibi N., Higashigushi S., Hashimoto T., Yamada Y.: Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell*, 1994, **6**: 723-735.
35. Hildreth S.B., Gehman E.A., Yang H., Lu R.H., Ritesh K.C., Harich K.C., Yu S, Lin J., Sandoe J.L., Okumoto S., et al.: Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**: 18179-18184.
36. Jack A., Fannin N., Bush L.P.: Implications of reducing nornicotine accumulation in burley tobacco. *Recent Advances in Tobacco Science*, 2007, **33**: 58-79.
37. Janowitz T., Kneifel H., Piotrowski M.: Identification and characterization of plant agmatine iminohydrolase, the last missing link in polyamine biosynthesis of plants. *FEBS Letters*, 2003, **544**: 258-261.
38. Jones J.L. Rideout J.W.: Application of flumetralin for axillary bud inhibition in flue-cured tobacco. *Tobacco Science*, 1986, **30**: 119-121.
39. Jeleško J.G.: An expanding role for purine uptake permease-like transporters in plant secondary metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 2012, **3**: 78.
40. Julio E., Laporte F., Reis S., Rothan C., Dorlac De Borne F.: Reducing the content of nornicotine in tobacco via targeted mutation breeding. *Molecular Breeding*, 2008, **21**: 369-381.
41. Kajikawa M., Hirai N., Hashimoto T.: A PIP-family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids. *Plant Molecular Biology*, 2009, **69**: 287.
42. Kajikawa M., Shoji T., Kato A., Hashimoto T.: Vacuole-localized berberine bridge enzyme-like proteins are required for a late step of nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 2011, **155**: 2010-2022.
43. Kato K., Shoji T., Hashimoto T.: Tobacco nicotine uptake permease regulates the expression of a key transcription factor gene in the nicotine biosynthesis pathway. *Plant Physiology*, 2014, **166(4)**: 2195-204.
44. Kolińska A., Marciniak P., Adamski Z., Rosiński G.: Alkaloidy – naturalne substancje kardioaktywne. *Kosmos*, 2016, **65(2)**: 247-256.
45. Kołodziejczyk A.: *Naturalne związki organiczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2004, s. 389-457.
46. Kurek J.: Introductory Chapter: Alkaloids – Their importance in nature and for human life. In: *Alkaloids – Their importance in nature and human life*, J. Kurek (ed.). London, IntechOpen, 2019.
47. Lee E.: The incorporation of (5, 6-¹³C) nicotinic acid into the tobacco alkaloids examined by the use of ¹³C nuclear magnetic resonance. *Bioorganic Chemistry*, 1977, **6**: 273.
48. Lee E.: Alkaloids derived from ornithine, lysine, and nicotinic acid. In: *Secondary plant products*. In: *Encyclopedia of plant physiology*, E.A. Bell, B.V. Charlwood (eds). New Series, Springer Verlag, 1980, pp. 65-91.
49. Lee E.: The methylation of nornicotine to nicotine, a minor biosynthetic pathway in *Nicotiana tabacum*. *Contributions to Tobacco & Nicotine Research*, 2014, **12(3)**: 113-116.
50. Lewis R.S., Jack A.M., Morris J.W., Robert V.J.M., Gavilano L., Siminszky B., Bush L.P., Hayes A., Dewey R.E.: RNAi-induced suppression of nicotine demethylase activity reduces levels of a key carcinogen in cured tobacco leaves. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, **6**: 346-354.
51. Lewis R.S., Bowen S.W., Keogh M.R., Dewey R.E.: Three nicotine demethylase genes mediate nornicotine biosynthesis in *Nicotiana tabacum* L.: Functional characterization of the CYP82E10 gene. *Phytochemistry*, 2010, **71(17-18)**: 1988-1998.
52. Lewis R., Lopez H.O., Bowen S.W., Andres K.R., Steede W.T., Dewey R.E.: Transgenic and Mutation-Based suppression of a Berberine Bridge Enzyme-Like (BBL) gene family reduces alkaloid content in field-grown tobacco. *PLoS ONE*, 2015, **10(2)**: e0117273 .
53. Lolas P.C., Collins W.K., Hawks S.M., Seltmann H., Weeks W.W.: Effects of phosphorus rate on the chemical composition on flue-cured tobacco grown in soil with varying phosphorus availability. *Tobacco Science*, 1979, **23**: 31-34.

54. Malik S., Sara A.L., Andrade A., Sawaya C.H.F., Bottcher A., Mazzafera P.: Root-zone temperature alters alkaloid synthesis and accumulation in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum*. *Industrial Crops and Products*, 2013, **49**: 318-325.
55. Markwood L.N.: Division of Insecticide Investigations. In: A review of information on nornicotine, L.N. Markwood (ed.). 1942, **561**: 1-24.
56. Matusiewicz E.: Przyrodnicze podstawy tytoniu. W: Tytoń uprawa, hodowla, fermentacja, J. Skiendzielewski (red.). PWRiL, Warszawa, 1969, ss. 19-52.
57. Miner G.S.: Effect of harvest method and related management practices on flue cured II: Total N, total alkaloids, reducing sugars and particulate matter index. *Tobacco Science*, 1980, **24**: 81-84.
58. Morita M., Shitan N., Sawada K., Van Montagu M.C., Inzé D., Rischer H., Goossens A., Oksman-Caldentey K.M., Moriyama Y., Yazaki K.: Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, **106**: 2447-2452.
59. Nielsen M.T., Cui M., Midgett C., Owen J.K.: Frequency of nicotine conversion and its relationship to TSNA formation in air-cured tobacco varieties. CORESTA Congress. New Orleans, 2002, AP 01.
60. Othman L., Sleiman A., Abdel-Massih R.M.: Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in Middle Eastern plants. *Frontiers in Microbiology*, 2019, **10**: 911.
61. Pallardy S.G.: Physiology of woody plants. Chapter 9 – Nitrogen metabolism, 2008, p. 233-254.
62. Schachtsiek J., Stehle F.: Nicotine-free, nontransgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) edited by CRISPR-Cas9. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, **17(12)**: 2228-2230.
63. Shoji T., Ogawa T., Hashimoto T.: Jasmonate-induced nicotine formation in tobacco is mediated by tobacco COI1 and JAZ genes. *Plant and Cell Physiology*, 2008, **49**: 1003-1012.
64. Shoji T., Hashimoto T.: Why does anatabine, but not nicotine, accumulate in jasmonate-elicited cultured tobacco BY-2 cells? *Plant and Cell Physiology*, 2008, **49(8)**: 1209-1216.
65. Shoji T., Inai K., Yazaki Y., Sato Y., Takase H., Shitan N., Yazaki K., Goto Y., Toyooka K., Matsuoka K. et al.: Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant Physiology*, 2009, **149(2)**: 708-718.
66. Shoji T., Kajikawa M., Hashimoto T.: Clustered transcription factor genes regulate nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell*, 2010, **22(10)**: 3390-3409.
67. Siminszky B., Gavilano L., Steven W.B., Dewey R.E.: Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Biology*, 2005, **102(41)**: 14919-14924.
68. Stocks G.R., Whitty E.B.: Delayed topping effects on the yield, value, and leaf chemical components of photoperiod-sensitive flue-cured tobacco. *Tobacco Science*, 1994, **38**: 90-93.
69. Sun W., Zhou Z., Li Y., et al.: Differentiation of flue-cured tobacco leaves in different positions based on neutral volatiles with principal component analysis (PCA). *European Food Research and Technology*, 2012, **235**: 745-752.
70. Szymańska J., Frydrych B., Bruchajzer E.: Nikotyna. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy, 2007, **2(52)**: 121-154.
71. Tiburcio A.F., Ingersoll R., Galston A.W.: Modified alkaloid pattern in developing tobacco callus. *Plant Science*, 1985, **38**: 207-212.
72. Tso T.C., Kasperbauer M.J., Sorokin T.P.: Effect of photoperiod and end-of-day light quality on alkaloids and phenolic compounds of tobacco. *Plant Physiology*, 1970, **45(3)**: 330-333.
73. Tso T.C.: Seed to smoke. In: *Tobacco: Production, chemistry, and technology*, D.L. Davis, M.T. Nielsen (eds). Blackwell Sci., London, UK., 1999, pp. 1-31.

74. W a g n e r R., W a g n e r K.G.: The pyridine-nucleotide cycle in tobacco enzyme activities for the de-novo synthesis of NAD. *Planta*, 1985, **165**: 532-537.
 75. W a g n e r R., F e t h F., W a g n e r K.G.: The pyridine nucleotide cycle in tobacco. Enzyme activities for the recycling of NAD. *Planta*, 1986a, **167**: 226-232.
 76. W a g n e r R., F e t h F., W a g n e r K.G.: Regulation in tobacco callus of enzyme activities of the nicotine pathway: II. The pyridine-nucleotide cycle. *Planta*, 1986b, **168**: 408-413.
 77. W a n g B., L e w i s R.S., S h i J., S o n g Z., G a o Y., L i W., C h e n H., Q u R.: Genetic factors for enhancement of nicotine levels in cultivated tobacco. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 17360.
 78. W e e k s W.W., B u s h L.P.: Alkaloid changes in tobacco seeds during germination. *Plant Physiology*, 1974, **53**: 73-5.
 79. W e y b r e w J.A., J o n e s G.L., M a n n T.J., W o l t z W.G., H u t c h e s o n T.B., N u s b a u m C.J., v a n B a v e l C.H.M.: Factors affecting the nicotine content of Flue-cured tobacco. *Research Report*, 1953, **8**: 1-20.
 80. W i l k i n s o n W.C., F i s h e r L.R., S m i t h W.D., J o r d a n D.L.: Effects of stand loss, planting, date, and replanting method on yield and quality of flue-cured tobacco. *Tobacco Science*, 2008, **47**: 44-52.
 81. V a n n M.C., F i s h e r L.R., J o r d a n D.L., H a r d y D.H., S m i t h W.D., S t e w a r t A.M.: The effect of potassium on the yield and quality of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Tobacco Science*, 2012, **49**: 14-20.
 82. X i e J., S o n g W., M a k s y m o w i c z W., J i n W., C h e a h K., C h e n W., C a r n e s C., K e J., C o n k l i n g M.A.: Biotechnology: A tool for reduced risk tobacco products – The nicotine experience from test tube to cigarette pack. 58th Meeting Tobacco Science Research Conference, 2004, NC:17
 83. Z e n k n e r F.F., M a r g i s - P i n h e i r o M., C a g l i a r i A.: Nicotine biosynthesis in *Nicotiana*: a metabolic overview. *Tobacco Science*, 2019, **56(1)**: 1-9.
-

Adres do korespondencji:

dr hab. Anna Trojak-Goluch; mgr Magdalena Kawka-Lipińska
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
IUNG-PIB

ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy

tel.: 81 4786 933; 81 4786 934

e-mail: Anna.Trojak-Goluch@iung.pulawy.pl;

Magdalena.Kawka@iung.pulawy.pl

| AUTOR | ORCID |
|--------------------------|---------------------|
| Anna Trojak-Goluch | 0000-0002-5191-4414 |
| Magdalena Kawka-Lipińska | 0000-0003-1039-5280 |