



Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin

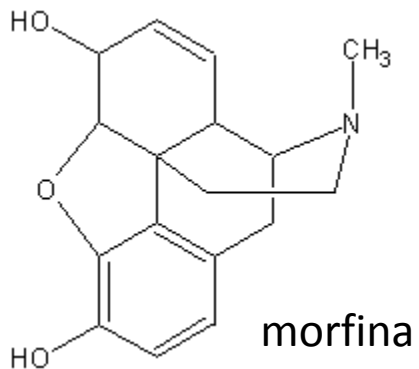
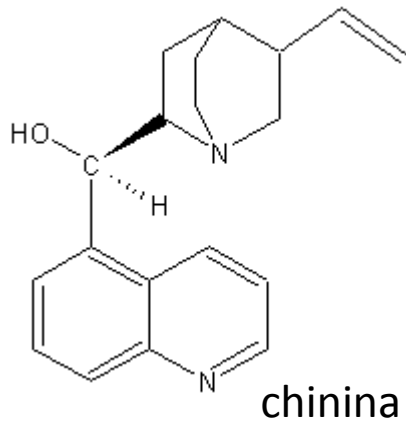
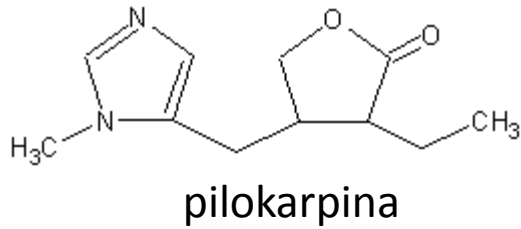
Anna Trojak-Goluch, Marta Koziara

# Główne alkaloidy tytoniu i hodowla w kierunku ograniczania szkodliwych prekursorów nitrozoamin (TSNA)

„Aktualne kierunki i osiągnięcia polskiej hodowli tytoniu”

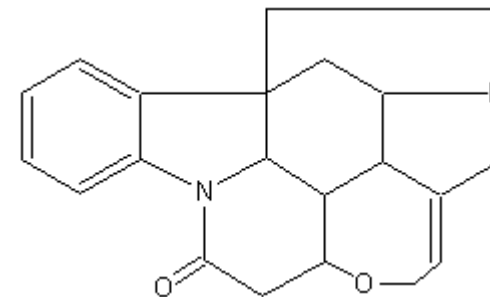
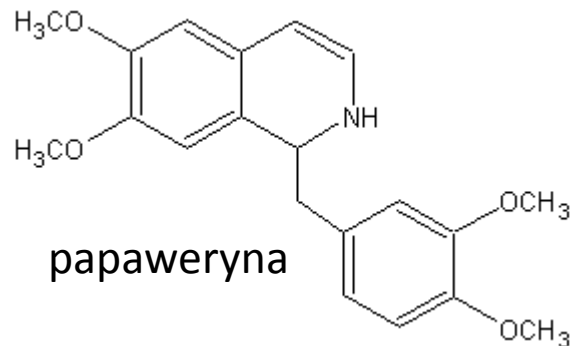
Prezentacja w ramach realizacji zadania 1.5.2 rezerwy celowej budżetu państwa MRiRW 2023  
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB, Puławy

To naturalnie występujące w przyrodzie związki organiczne, głównie pochodzenia roślinnego, charakteryzujące się obecnością jednego lub więcej atomów azotu zazwyczaj w pierścieniach heterocyklicznych. Występują zarówno w postaci wolnych zasad, rozpuszczalnych w wodzie soli kwasów organicznych, estrów jak i w połączeniu z taninami czy cukrami.



**Właściwości alkaloidów:**

- wykazują silne oddziaływanie na organizmy ludzkie i zwierzęce, mają działanie rozkurczowe, znieczulające, przeciwbólowe, przeciwkaszlowe, przeciwreumatyczne, żółciopędne, przeciwzapalne i przeciwgorączkowe
- niektóre przejawiają właściwości antybakteryjne i przeciwgrzybicze
- pełnią również rolę „broni chemicznej” przed patogenami i szkodnikami
- odgrywają rolę w detoksykacji szkodliwych czynników poprzez metylowanie, kondensację i cyklizację związków, których nagromadzenie w komórkach prowadzi do uszkodzenia rośliny.
- stanowią prekursorzy do produkcji białek w roślinie
- biorą udział w procesie formowania nasion







rośliny makowate



rośliny bobowate

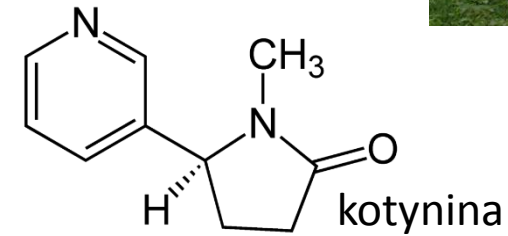
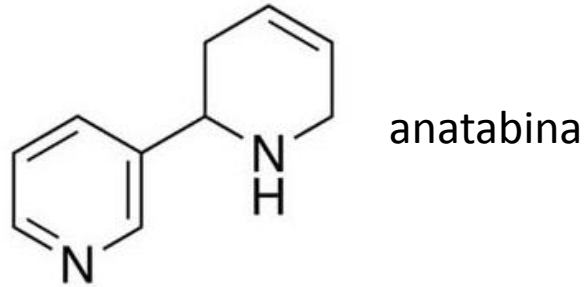
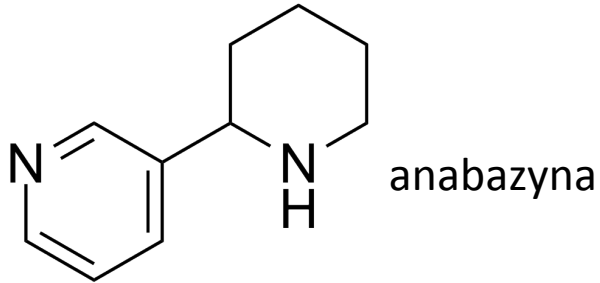
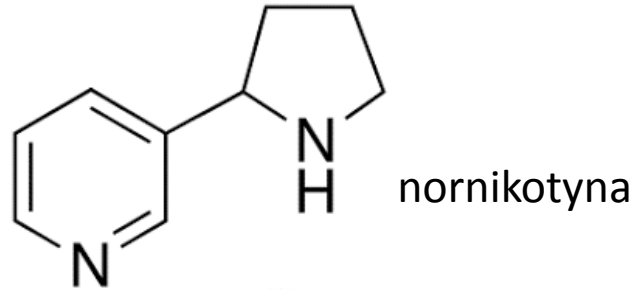
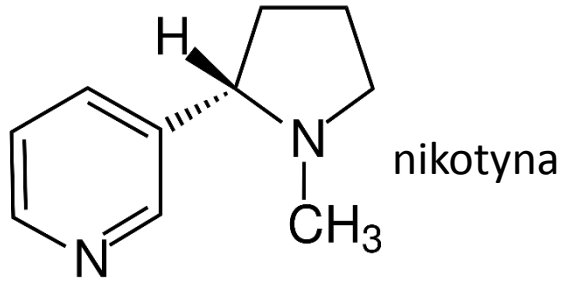


rośliny jaskrowate



rośliny psiankowate





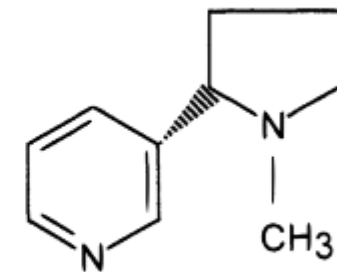
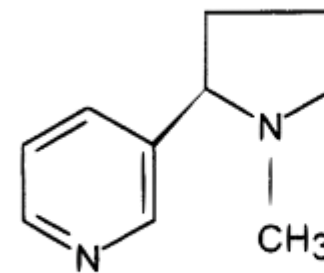
tytoń

## NIKOTYNA



nikotyna

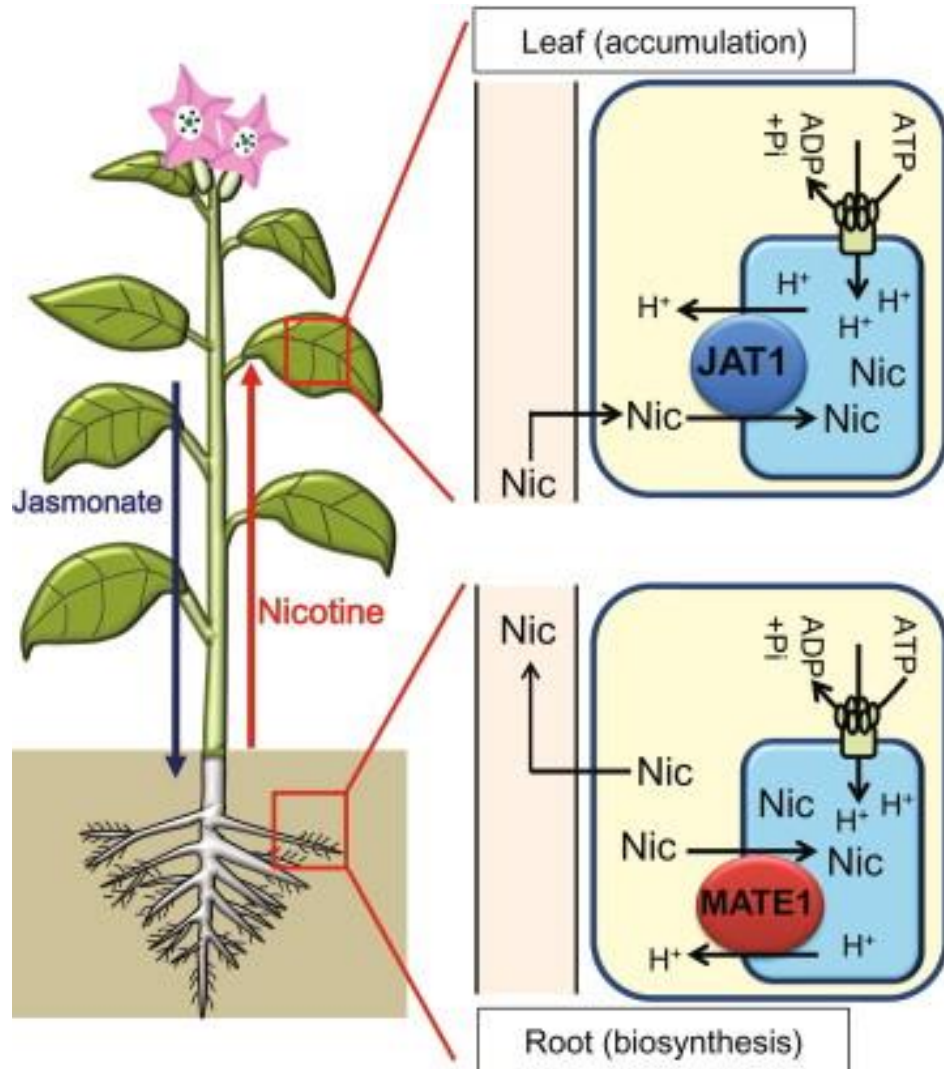
- bezbarwna oleista ciecz ciemniejąca na powietrzu
- niemal bezwonna
- charakteryzuje się długo utrzymującym się ostrym smakiem
- temperatura wrzenia 246-247°C
- rozpuszczalna w większości rozpuszczalników organicznych i w wodzie o temperaturze < 60 °C



izomery optyczne nikotyny

Jest związkiem chemicznym o silnym działaniu psychoaktywnym i uzależniającym !!!





### Model biosyntezy i transportu nikotyny w tytoniu

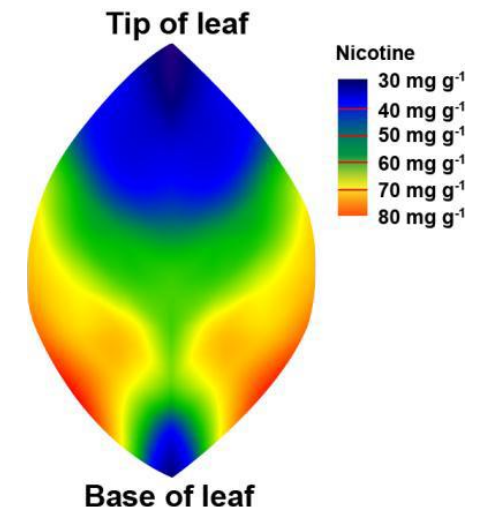
źródło: Shitan and Yakazaki (2013) Chapter nine- New Insights into the Transport Mechanisms in Plant Vacuoles. International Review of Cell and Molecular Biology 305: 383-433

### Akumulacja nikotyny

- w fazie pąkowania i kwitnienia
- niejednakowa koncentracja w roślinie, największa występuje w górnych liściach
- niejednakowa koncentracja w liściu, największa w brzeżnej części blaszki liściowej, a najmniejsza u podstawy i w końcowym fragmencie liścia
- duże ilości zawiera skórka i miękisz gąbczasty liści, mniejsze ilości miękisz palisadowy liści
- wpływ na produkcję i gromadzenie nikotyny zależy od właściwości genetycznych odmian i przynależność do typu użytkowego

### Rozmieszczenie nikotyny w liściach tytoniu

źródło: Burton HR, Dye NK, Bush LP (1992) Distribution of tobacco constituents in tobacco leaf tissue. Tobacco-specific nitrosamines, nitrate, nitrite, and alkaloids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 1050–1055





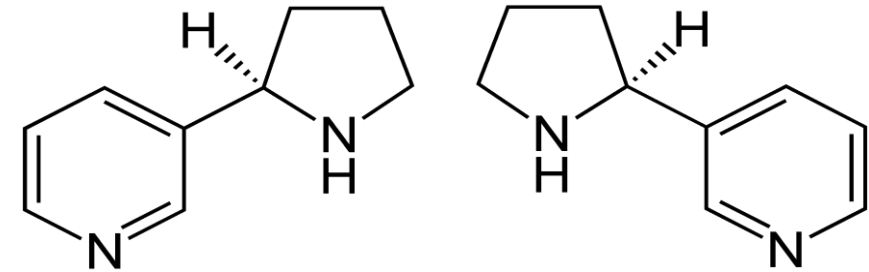
## Czynniki modyfikujące kumulację nikotyny w roślinie:

- temperatura
- nasłonecznienie
- wilgotność gleby
- zasobność gleby w składniki pokarmowe
- stres biotyczny
- rozstawa roślin na polu
- zabiegi agrotechniczne tj. usuwanie głównego kwiatostanu „ogławianie” i pędów bocznych
- termin zbioru liści





- bezbarwna, higroskopijna, oleista ciecz o lekkim zapachu aminy, mniej ostrym niż zapach nikotyny
- rozpuszczalna w większości rozpuszczalników organicznych i w wodzie
- mniej lotna niż nikotyna
- dominuje forma R, która w korzeniach stanowi 60-80%, a w liściach 50-80%



S-nornikotyna

R-nornikotyna

izomery optyczne nornikotyny (S- i R-)

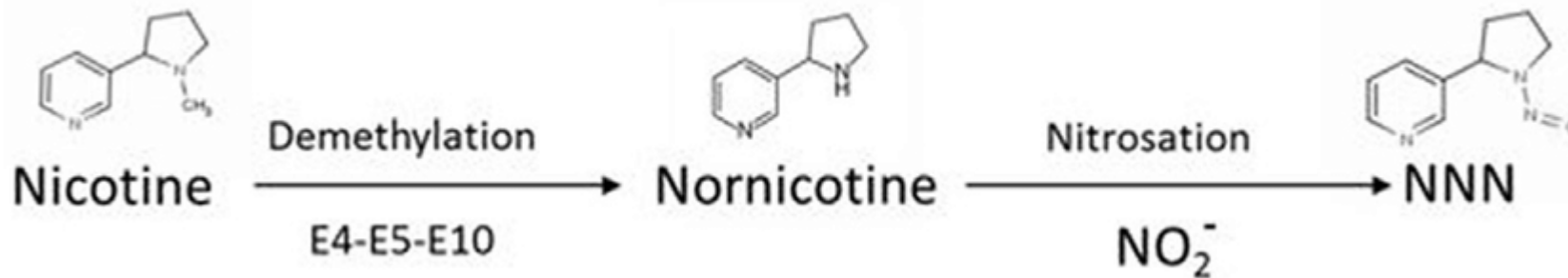
### Właściwości nornikotyny

- uwalnia dopaminę w mózgu przez co wzmacnia działanie nikotyny i przyspiesza proces uzależnienia
- jest prekursorem specyficznej dla tytoniu N-nitrozonornikotyny (NNN) z grupy nitrozoamin (TSNA) odpowiedzialnych za powstawanie nowotworów
- zmienia profil lipidowy krwi przez co sprzyja rozwojowi miażdżycy i choroby wieńcowej
- obniża poziom enzymów usuwających wolne rodniki



## Nornikotyna – synteza i akumulacja w roślinie

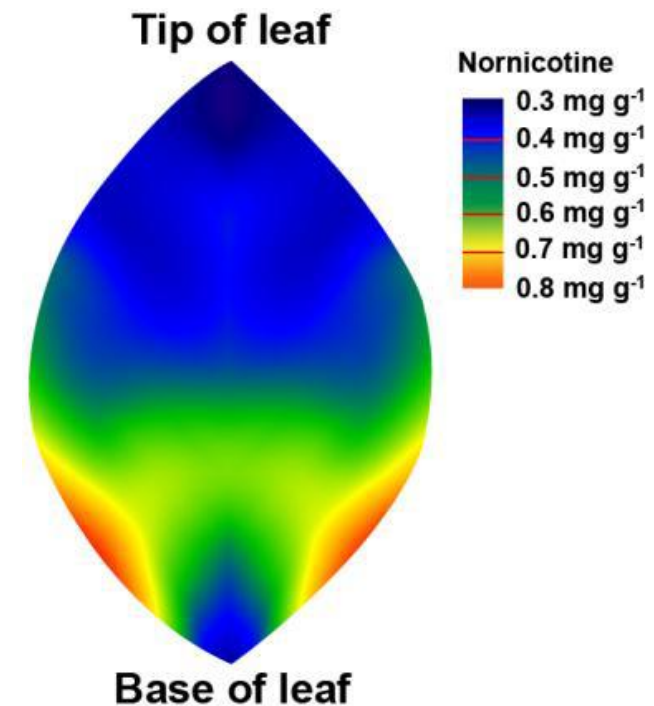
konwersja nikotyny w nornikotynę i powstawanie nitrozoamin tytoniowych



N-nitrozonornikotyna

### Akumulacja nornikotyny

- młode siewki są pozbawione nornikotyny
- nikotyna zgromadzona w komórkach starszych roślin tytoniu ulega przemianom biochemicznym do nornikotyny
- liście dolne zawierają największe ilości nornikotyny, natomiast liście środkowe są mniej zasobne w ten alkaloid
- niejednakowe rozmieszczenie nornikotyny w liściu
- zawartość nornikotyny zależy od właściwości genetycznych odmian i przynależność do typu użytkowego (odmiany Burley charakteryzują się wysoką zawartością nornikotyny, natomiast odmiany Virginia niskim poziomem tego alkaloidu)



Rozmieszczenie nikotyny w liściach tytoniu źródło:

Burton HR, Dye NK, Bush LP (1992) Distribution of tobacco constituents in tobacco leaf tissue. Tobacco-specific nitrosamines, nitrate, nitrite, and alkaloids. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40: 1050–1055



## Nikotyna, nornikotyna – wyzwania dla hodowli tytoniu



**W 2015 roku WHO opublikowała rekomendacje dotyczące obniżenia stężenia nikotyny w krajance papierosowej do poziomu 0,04 %. !!!**

## Strategia ograniczania szkodliwych alkaloidów w tytoniu z wykorzystaniem prac hodowlanych i badań genetycznych

### Klasyczna hodowla

- odpowiedni dobór form rodzicielskich do krzyżowania (tj. < 3% konwersji nikotyny do nornikotyny w formach rodzicielskich) oraz selekcja osobników wykazujących niską zawartość niepożądanych alkaloidów
- geny z rodziny CYP 450 regulujące konwersję nikotyny, znajdują się w niestabilnym locus w genomie sprzyjającym ich przemieszczaniu się co sprzyja spontanicznemu pojawianiu się osobników przekształcających nikotynę w nornikotynę

### Hodowla mutacyjna

- generowanie trwałych zmian w materiale genetycznym z wykorzystaniem czynników chemicznych lub fizycznych
- zmiany w genach warunkujących produkcję enzymów zaangażowanych w szlak biosyntezy nikotyny i konwersji nikotyny do nornikotyny
- krzyżowanie linii zawierających mutacje pojedyncze w celu uzyskania kombinacji mutacji w jednym osobniku
- uzyskane w wyniku mutacji zmiany genetyczne są powszechnie akceptowane przez społeczeństwo



## Strategia ograniczania szkodliwych alkaloidów w tytoniu z wykorzystaniem prac hodowlanych i badań genetycznych

### Potranskrypcyjne wyciszenie genów

- wprowadzenie małych, syntetycznych interferujących dwuniciowych fragmentów RNA (RNAi) homologicznych (antysensownych) do genów endogennych co powoduje degradację (mRNA) i wyciszenie ekspresji genu endogenego np.: zahamowanie ekspresji genów warunkujących kondensację pierścienia pirolidyny i pirydyny zachodzącą podczas finalnego etapu biosyntezy nikotyny

### Edytowanie genomu

- narzędzie biologii molekularnej CRISPR-Cas (ang. clustered regularly interspaced short palindromic repeats - Cas)
- precyzyjne wprowadzanie zmian genetycznych w DNA komórkowym, bez wprowadzania obcych genów
- zmiany sekwencji nukleotydów DNA wybranego genu przy pomocy kompleksu naprowadzającego RNA i enzymu Cas9



## Strategia ograniczania szkodliwych alkaloidów w tytoniu z wykorzystaniem prac hodowlanych w IUNG-PIB Puławy

### Materiał badawczy

**Odmiany i linie hodowlane tytoniu w typie Virginia:**

HTR2, Wentura, Sybilla, WGLB

**Odmiany i linie hodowlane tytoniu w typie Burley:**

TN90, BPTN 151, BPTN 155, ZD2, TNSB1, TNSB4.

### Metody

Doświadczenie prowadzono w warunkach polowych. Dojrzałe liście pojedynczych roślin tytoniu zbierano, a następnie suszono powietrznie, po czym prowadzono ocenę zawartości nikotyny i nornikotyny metodą GC/MS



Chromatograf gazowy (Agilent 7890A) sprzężony z detektorem mas MS 5975C

Rośliny gromadzące nikotynę jako alkaloid elementarny uznano za „*niekonwertery*”, natomiast te, które znaczną część nikotyny przekształciły w nornikotynę uznano za „*konwertery*”



## Strategia ograniczania szkodliwych alkaloidów w tytoniu z wykorzystaniem prac hodowlanych w IUNG-PIB Puławy

$$\text{Stopień konwersji (\%)} = 100 \times \frac{\text{zawartość nornikotyny}}{(\text{zawartość nikotyny} + \text{zawartość nornikotyny})}$$

Pojedyncze rośliny poszczególnych odmian i linii hodowlanych wykazujące najniższy stopień konwersji poddano samozapyleniu. Uzyskane nasiona wysiewano w kolejnym roku, a dojrzałe rośliny ponownie oceniono pod względem zawartości alkaloidów głównych i zdolności do konwersji.

**Proces selekcji prowadzono od 2014 do 2018 roku**



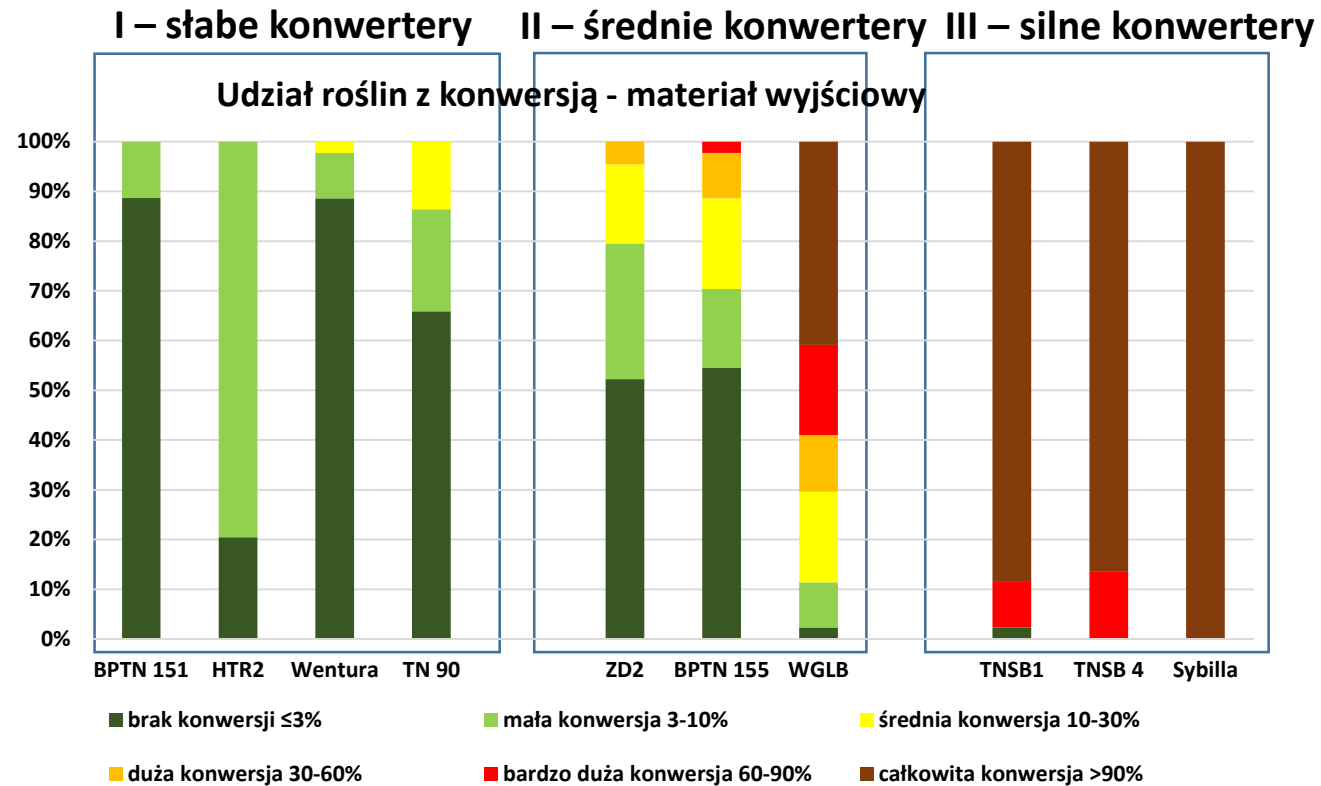
## Średnia zawartość nikotyny oraz nornikotyny w odmianach oraz liniach hodowlanych tytoniu w typie Burley i Virginia

Typ tytoniu	odmiana/ linia	Zawartość alkaloidów / Konwersja	2014	2015	2016	2017	2018
Burley	TN 90	Nikotyna (%)	1,16	2,28	1,56	1,00	1,73
		Nornikotyna (%)	0,06	0,07	0,06	0,09	0,08
	ZD2	Nikotyna (%)	1,09	1,49	0,99	0,83	1,45
		Nornikotyna (%)	0,09	0,04	0,13	0,04	0,04
	BPTN151	Nikotyna (%)	1,10	1,87	1,32	1,18	1,46
		Nornikotyna (%)	0,02	0,05	0,04	0,06	0,05
	BPTN155	Nikotyna (%)	0,77	1,75	0,68	0,99	1,64
		Nornikotyna (%)	0,10	0,05	0,02	0,05	0,05
	TNSB1	Nikotyna (%)	0,06	0,56	0,13	0,11	0,17
		Nornikotyna (%)	0,65	1,13	0,56	0,62	0,65
TNSB4	Nikotyna (%)	0,06	0,65	0,08	0,31	-	
	Nornikotyna (%)	0,70	1,37	0,56	0,86	-	
Virginia	HTR2	Nikotyna (%)	1,28	2,58	1,56	1,91	1,63
		Nornikotyna (%)	0,06	0,13	0,06	0,05	0,05
	Wentura	Nikotyna (%)	1,58	2,68	1,75	1,81	1,63
		Nornikotyna (%)	0,05	0,08	0,04	0,05	0,05
	WGLB	Nikotyna (%)	0,59	2,15	0,94	2,08	1,58
		Nornikotyna (%)	0,90	0,12	0,06	0,15	0,07
	Sybilla	Nikotyna (%)	0,06	0,13	0,09	0,05	0,04
		Nornikotyna (%)	0,63	1,04	0,90	0,51	0,63



# Strategia ograniczania szkodliwych alkaloidów w tytoniu z wykorzystaniem prac hodowlanych w IUNG-PIB Puławy

## 2014



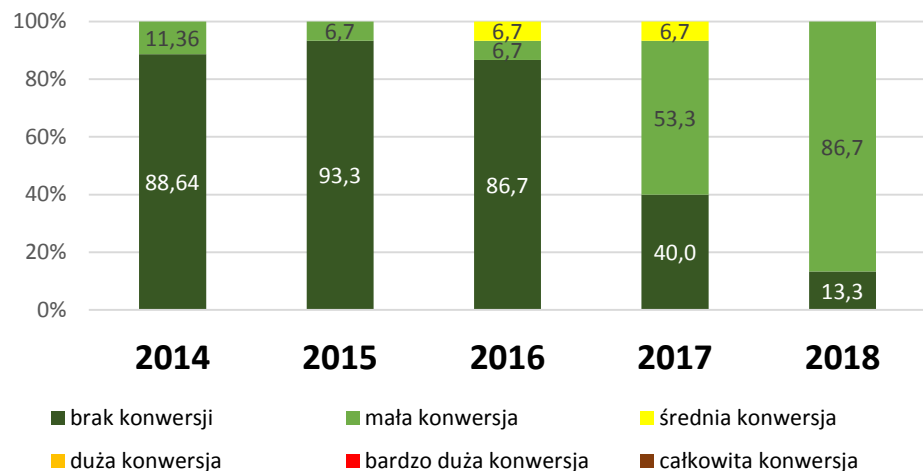
Udział roślin o różnym stopniu konwersji w wyjściowej populacji odmian/linii hodowlanych tytoniu

# Strategia ograniczania szkodliwych alkaloidów w tytoniu z wykorzystaniem prac hodowlanych w IUNG-PIB Puławy

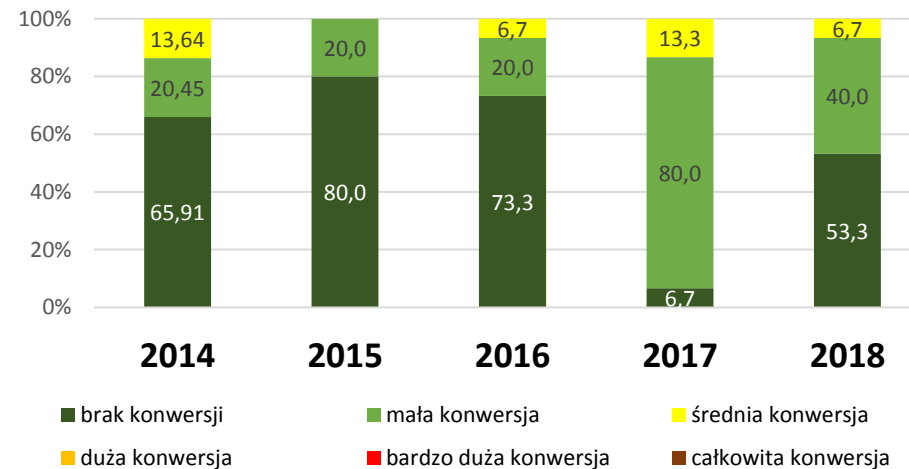
## I - słabe konwertery

typ  
Burley

BPTN151

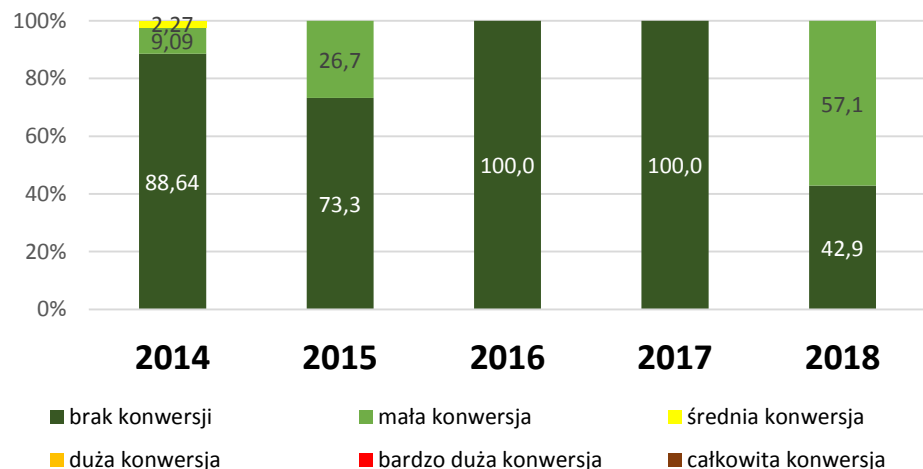


TN 90

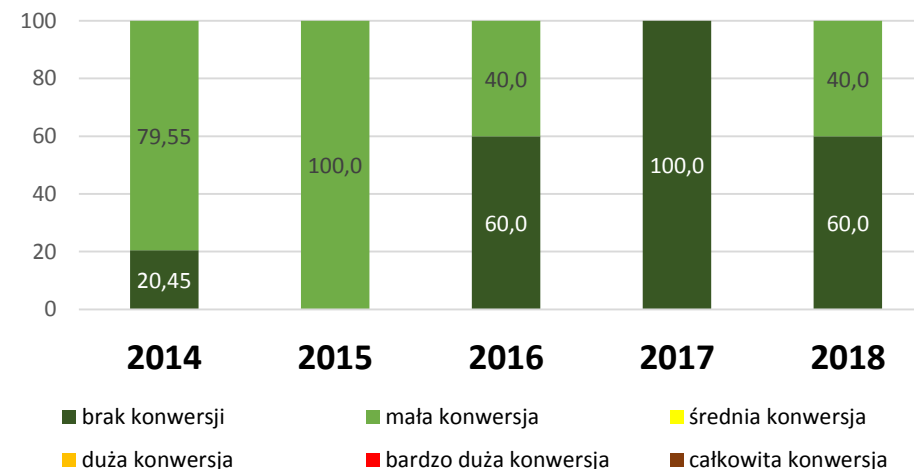


Wentura

typ  
Virginia



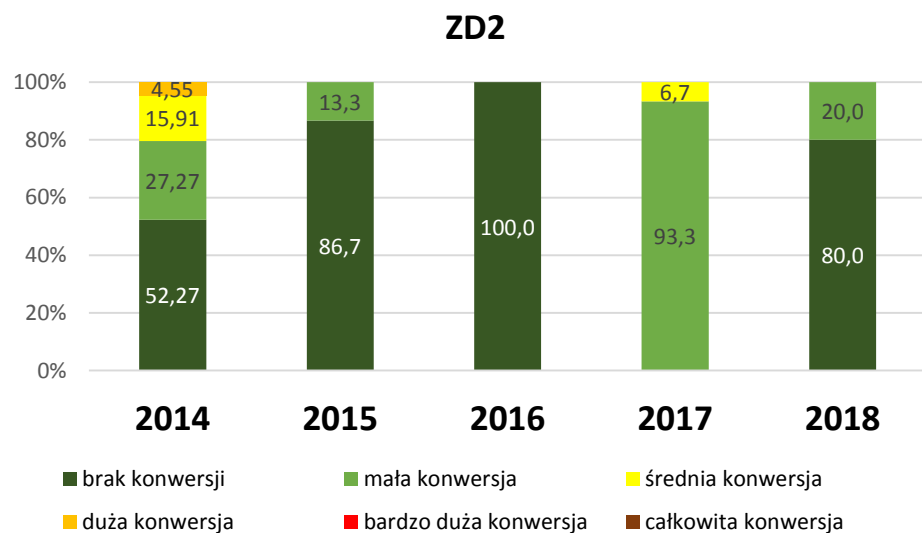
HTR2



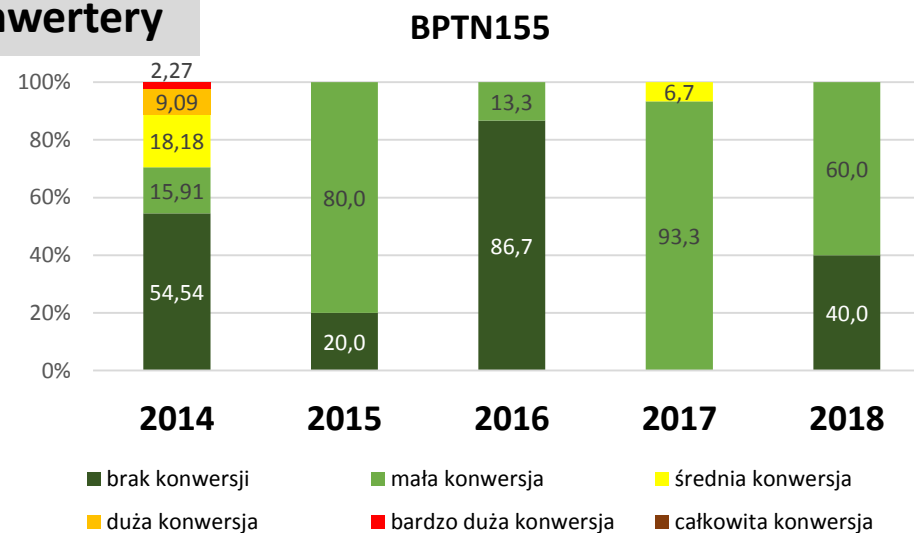
Udział roślin o różnym stopniu konwersji w odmianach i liniach hodowlanych tytoniu w latach 2014-2018

# Strategia ograniczania szkodliwych alkaloidów w tytoniu z wykorzystaniem prac hodowlanych w IUNG-PIB Puławy

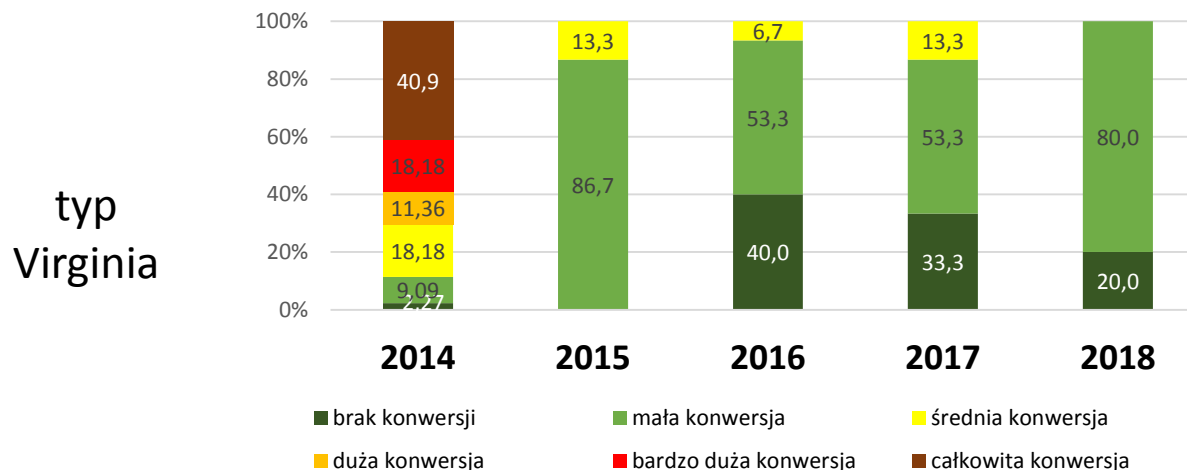
## II - średnie konwertery



typ  
Burley



## WGLB

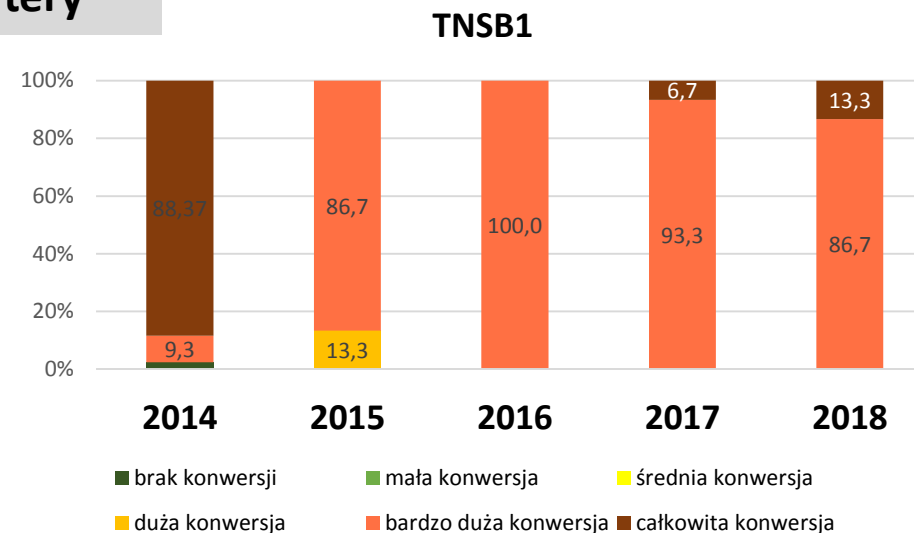
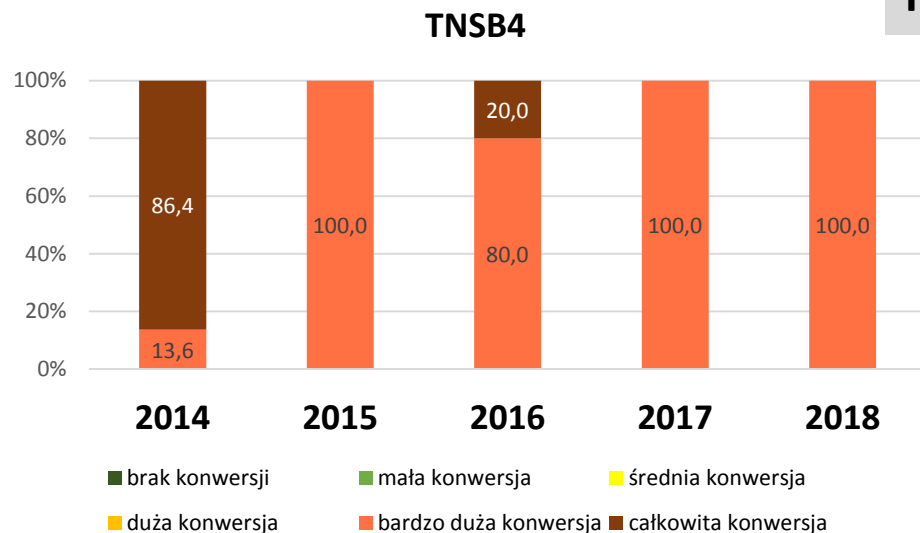


Udział roślin o różnym stopniu konwersji w odmianach i liniach hodowlanych tytoniu w latach 2014-2018

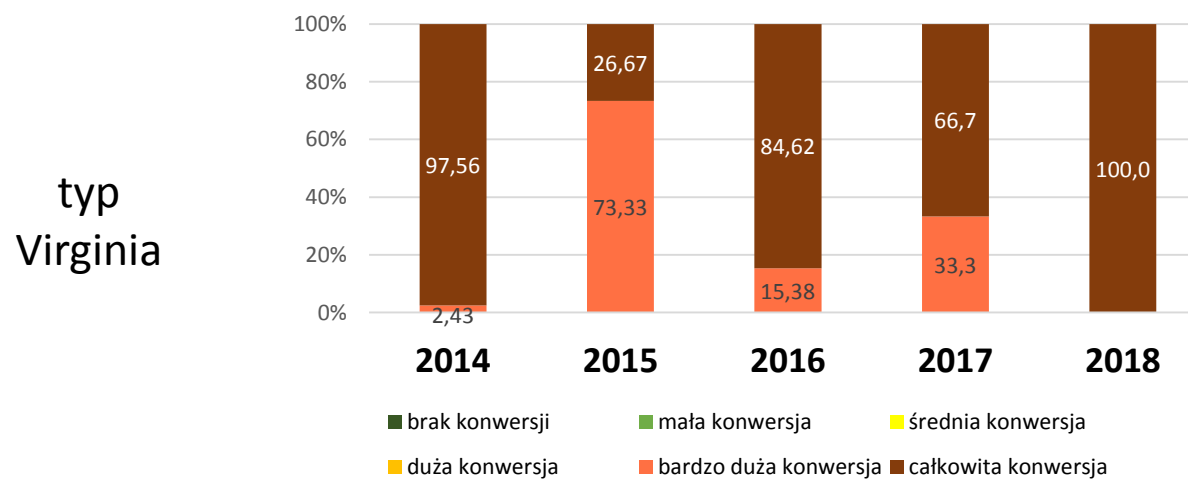


## Strategia ograniczania szkodliwych alkaloidów w tytoniu z wykorzystaniem prac hodowlanych w IUNG-PIB Puławy

### III - silne konwertery



### Sybilla



Udział roślin o różnym stopniu konwersji w odmianach i liniach hodowlanych tytoniu w latach 2014-2018

## WNIOSKI

1. Odmiany i linie hodowlane tytoniu zarówno w typie Burley jak i Virginia wykazują duże skłonności konwersji nikotyny w nornikotyne. Uzyskane wyniki stanowią cenną informację dla hodowców i przetwórców tytoniu.
2. Stopień konwersji nikotyny w nornikotyne w odmianach/liniach hodowlanych tytoniu Burley, jak i Virginia oraz duży potencjał rakotwórczy N-nitrozonornikotyny, wskazują na potrzebę systematycznej kontroli profilu alkaloidowego odmian produkcyjnych i linii hodowlanych tytoniu.
3. Prowadząc hodowlę selekcyjną opartą na eliminacji z populacji nasiennych osobników konwertujących nikotyne do nornikotyny, można oczekiwać poprawy przydatności technologicznej surowca tytoniowego.



Innowacyjno-Naukowe Centrum Badań Rolniczych, IUNG-PIB Puławy