

OCENA ZAWARTOŚCI NIEPOŻĄDANYCH ALKALOIDÓW W WYBRANYCH ODMIANACH I LINIACH HODOWLANYCH TYTONIU UPRAWNEGO


Anna Trojak-Goluch , Karolina Kursa, Teresa Doroszevska
IUNG-PIB w Puławach

Streszczenie. Jednym z podstawowych kryteriów oceny jakości surowca tytoniowego jest zawartość nikotyny i normikotyny. Obecność nikotyny w liściach w uznanych granicach jest korzystna i oczekiwana. Normikotyna obniża jakość tytoniu, ponieważ stanowi prekursor do produkcji N-nitrozonornikotyny, wykazującej silne właściwości rakotwórcze. Celem badań była ocena zawartości nikotyny i normikotyny oraz stopnia konwersji nikotyny w normikotyne w odmianach i liniach hodowlanych tytoniu należących do typu użytkowego Burley i Virginia. Metodą chromatografii gazowej wykonano badania profilu alkaloidowego liści. Stwierdzono istotne zróżnicowanie międzyodmianowe pod względem zawartości badanych alkaloidów. Analiza danych wykazała istotną ujemną korelację między zawartością nikotyny i normikotyny oraz między zawartością nikotyny a stopniem konwersji. Ustalono, że stopień konwersji nikotyny w odmianach typu Burley był zdecydowanie wyższy od notowanego w odmianach typu Virginia, co pozwala wnioskować, że wykorzystanie tych odmian do produkcji wyrobów tytoniowych stanowi dużo większe zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Wskazano odmiany i linie hodowlane tytoniu wymagające usunięcia osobników konwertujących w celu poprawy jakości surowca.

Słowa kluczowe: nikotyna, normikotyna, tytoń uprawny, stopień konwersji nikotyny w normikotyne

WSTĘP

W ostatnich latach w przemyśle tytoniowym zwraca się coraz większą uwagę na jakość surowców wykorzystywanych do produkcji wyrobów tytoniowych. Uwaga przetwórców koncentruje się na ocenie składu chemicznego liści. Najistotniejszymi związkami chemicznymi podlegającymi analizie są cukry redukujące, białka właściwe i alkaloidy.

 anngol@iung.pulawy.pl

Cukry stanowią w zależności od typu użytkowego tytoniu, odmiany, zasobności stanowiska, sposobu suszenia i fermentacji liści od około 1 do 22% suchej masy [Tso 1990]. Nadają liściom łagodny i słodkawy smak, wpływają również na kwaśny odczyn dymu papierosowego. Podstawowym składnikiem surowca tytoniowego są także białka, których zawartość w suchej masie nie powinna przekraczać 13%, ponieważ zbyt duża ich ilość sprawia, że podczas palenia uwalniany jest drażniący, niemiły zapach [Tomilo i in. 2014].

O jakości technologicznej surowca tytoniowego decydują także alkaloidy z grupy pirydyny [Jinchao i Xueguang 2006]. Stanowią one ważną grupę zasadowych związków organicznych, metabolitów wtórnych, zawierających co najmniej jeden atom azotu wbudowany w pierścień heterocykliczny [Kolińska i in. 2016]. Wykazują silne działanie stymulujące 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 z tej grupy powodują nudności, wymioty, zaburzenia rytmu serca, porażenie układu oddechowego i nerwowego oraz powstawanie procesów nowotworowych [Kotuła i in. 2004]. Zawartość alkaloidów w liściach tytoniu uprawnego jest mocno zróżnicowana. Zmienna zawartość alkaloidów zależy od wielu czynników, w tym od zmienności genetycznej odmian, nawożenia azotem, uszkodzeń mechanicznych, agrotechniki, jak również temperatury powietrza czy nasłonecznienia [Tso 1990]. Należy podkreślić, że wpływ na ilość i skład alkaloidów w tytoniu ma także sposób suszenia liści i proces obróbki technologicznej surowca [Wernsman i Matzinger 1968]. Suszone w sposób naturalny odmiany należące do typu użytkowego Burley zawierają zdecydowanie więcej alkaloidów niż suszone w suszarniach ogniowo-rurowych odmiany typu Virginia.

Pośród najważniejszych alkaloidów syntetyzowanych w tytoniu należy wymienić nikotynę, normikotynę, anabazynę, anatabinę, miozminę i kotyninę. Zbudowana z pierścienia pirydynowego i pirodolidynowego nikotyna jest uznawana za alkaloid główny. Stanowi ona zazwyczaj 90–95% ogólnej puli alkaloidów tytoniowych [Cai i in. 2010]. Jest produkowana przede wszystkim w korzeniach i wraz ze wzrostem roślin transportowana ksylemem do liści i kwiatostanów [Kolińska i in. 2016]. Nikotyna podobnie jak anabazy-na pełni funkcję naturalnego insektycydu. Mechanizm jej działania polega na trwałym łą-czeniu się z receptorem acetylocholinowym w układzie nerwowym owadów, co prowadzi do zakłócenia przewodzenia bodźców, paraliżu mięśni i śmierci. Nikotyna działa także na organizm człowieka – wpływa na wzrost wydzielania dopaminy w mózgu, powodując poprawę samopoczucia [Kołodziejczyk 2004]. Z tego względu jest coraz częściej wykorzystywana w terapii pacjentów chorych na schizofrenię. Jest ona również stosowana w walce z innymi chorobami, takimi jak: nocny bezdech, otępienie Alzheimera czy zespół Tourette’a [Benowitz 1996]. Stosowana w dużych dawkach podwyższa ciśnienie krwi, przyspiesza akcję serca i powoduje podrażnienie układu pokarmowego [Kołodziejczyk 2004, Depta i in. 2012]. Odpowiada także za uzależnienie od palenia papierosów, które sprzyja rozwojowi chorób nowotworowych i układu sercowo-naczyniowego.

Kolejnym metabolitem wtórnym występującym w liściach tytoniu jest normikotyna. Powstaje ona w wyniku konwersji oksydacyjnej N-demetylacji nikotyny w normikoty-nę podczas dojrzewania i suszenia liści tytoniu [Siminszky i in. 2005, Chakrabarti i in. 2008]. Proces przemiany alkaloidów jest katalizowany przez N-demetylazę nikotyny

– enzym kodowany przez geny należące do grupy *CYP82E* cytochromu P450. Badania dowiodły, że geny te znajdują się w niestabilnym *locus* odpowiedzialnym za spontaniczne pojawianie osobników konwertujących w populacji niekonwerterów. Produkcja i gromadzenie nornikotyny w materiale roślinnym jest bardzo niepożądane, gdyż podczas suszenia surowca alkaloid ten wchodzi w reakcję z reaktywnymi formami tlenu azotu, dając w efekcie N-nitrozonornikotyne (NNN), związek z grupy nitrozoamin tytoniowych – TSNA (ang. *tobacco-specific nitrosamines*) [Cai i in 2010]. Nitrozoaminy to związki wykazujące działanie kancerogenne. Odpowiadają za występowanie nowotworów jamy ustnej, gardła, krtani i przełyku, a także powstawanie złośliwych nowotworów płuc [Starek i Podolak 2009].

Zawartość nornikotyny w tytoniu waha się zazwyczaj od 3 do 5% ogólnej sumy alkaloidów [Chakrabarti i in. 2008]. Rośliny, które gromadzą nikotyne jako alkaloid główny, nazywane są niekonwerterami, a te, u których znaczna część nikotyne przekształcana jest w nornikotyne, określane są jako konwertery. Wysoką frekwencję konwerterów zaobserwowano przede wszystkim w odmianach należących do typu użytkowego Burley, w przypadku których proces suszenia prowadzony na powietrzu, w nieogrzewanych wiatkach sprzyja oksydacyjnej N-demetylacji nikotyne. Mniejszy udział konwerterów notuje się natomiast wśród suszonych gorącym powietrzem odmian w typie Virginia, u których oddziaływanie wysokiej temperatury inaktywuje gen warunkujący przebieg konwersji [Nielsen i in. 2002]. Problem konwersji nikotyne do nornikotyne i eliminacji potencjalnie kancerogennej N-nitrozonornikotyne w tytoniu uprawianym w Polsce nie był dotychczas podejmowany. Istnieje zatem potrzeba analizy profilu alkaloidowego odmian i linii hodowlanych tytoniu w celu poprawy wartości technologicznej surowca, jak również eliminacji konwerterów z odmian uprawnych tytoniu.

Celem badań było określenie zawartości nikotyne i nornikotyne w 13 odmianach i liniach hodowlanych tytoniu, określenie stopnia konwersji nikotyne w nornikotyne oraz poszukiwanie zależności między badanymi parametrami. Uzyskane wyniki znajdują zastosowanie w programach hodowlanych zmierzających do uzyskania odmian o zmniejszonej zawartości nornikotyne, a także przy ocenie jakości marketingowej surowca.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy i schemat doświadczenia

Materiał badawczy stanowiły odmiany i linie hodowlane tytoniu w typie Virginia: Sybilla, HTR2, Wentura, WGLA × WABPA3, WABPA3 × WGLA, WGLB, oraz odmiany i linie hodowlane w typie Burley: TN90, BPTN151, ZD2, BPTN155, TNSB1, TN35/1, TNSB4. Badania prowadzono w 2014 roku w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB w Puławach, w ścisłym doświadczeniu polowym założonym metodą bloków losowanych. Wielkość poletka wynosiła 17,82 m², liczba roślin na poletku 44, w rozstawie 90 × 45 cm, liczba powtórzeń 4. Rozsadę przygotowano w warunkach szklarniowych w paletach wielokomórkowych wypełnionych substratem torfowym. Sadzenie roślin przeprowadzono 25 maja 2014 roku. Zastosowano nawożenie azotem w ilości 96 kg·ha⁻¹. Połowę dawki zaaplikowano 3 dni przed sadzeniem tytoniu,

drugą zaś w fazie 4–5 liści. Dodatkowo zastosowano K_2O $150 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ i P_2O_5 $60 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. W trakcie wzrostu roślin stosowano agrotechnikę przewidzianą dla odpowiedniego typu użytkowego tytoniu z wyłączeniem usunięcia kwiatostanu głównego i pędów bocznych. Dojrzałe liście zbierano z losowo wybranych 11 roślin na poletku, a następnie niezależnie od typu użytkowego suszono na powietrzu w celu zapewnienia warunków sprzyjających oksydacyjnej N-demetylacji nikotyny.

Przygotowanie prób do analiz

Materiał do analiz chemicznych stanowiły liście z pojedynczych roślin [Jack i in. 2003]. Wysuszone i zmielone liście w ilości 1000 mg inkubowano przez 15 min w temperaturze pokojowej w 7 ml 2M NaOH, a następnie poddano ekstrakcji w 25 ml eteru tetr-butylowo-metylowego (czystość HPLC) z dodatkiem chinoliny (stężenie chinoliny $0,4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Próby wytrząsano przez 2 h przy prędkości $130 \text{ obr} \cdot \text{min}^{-1}$. Warstwę organiczną oddzielono, a następnie w ilości 1 ml przeniesiono do vialek w celu oceny stężenia alkaloidów przy zastosowaniu chromatografii gazowej GC/MS.

Analiza zawartości alkaloidów w surowcu

Rozdział chromatograficzny alkaloidów prowadzono na aparacie Agilent Technologies GC System 7890A sprzężonym z detektorem mas MS 5975C. Wykorzystano kolumnę chromatograficzną HP-5MS Model Agilent Technologies 19091S-433UI ($30 \text{ m} \times 0,250 \text{ mm}$, $0,25 \mu\text{m}$). Zastosowano program temperaturowy: temperatura początkowa 115°C przez 10 min, przyrost $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do 200°C utrzymywane przez 2 min, po czym $50^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ do 280°C utrzymywane przez 10 min. Rozdział prowadzono z użyciem helu przy prędkości przepływu $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Próbkę wstrzykiwano przez iniektor rozgrzany do temperatury 220°C na kolumnę chromatograficzną w ilości $1 \mu\text{l}$ (split, 20 : 1).

Identyfikację nikotyny i nornikotyny prowadzono poprzez porównanie czasu retencji oraz widma masowego badanych związków z zastosowanymi standardami (nikotyna Sigma Aldrich CAS 54-11-5, nornikotyna Toronto Research Chemicals CAS 5746-86-1). Analiza ilościowa została wykonana metodą wzorca wewnętrznego – chinoliny (Sigma-Aldrich CAS 91-22-5). W obliczeniach statystycznych wykorzystano zawartość nikotyny i nornikotyny uzyskaną z 11 roślin jako średnią z poletka.

Analiza zdolności konwersji nikotyny w nornikotyne

Na podstawie danych dotyczących zawartości nikotyny i nornikotyny w suchej masie liści obliczono stopień konwersji. Do obliczeń wykorzystano formułę [Jack i in. 2003]:

$$\text{stopień konwersji [\%]} = 100 \cdot \frac{\text{zawartość nornikotyny}}{(\text{zawartość nikotyny} + \text{zawartość nornikotyny})}$$

Na podstawie uzyskanych wyników dokonano podziału badanych odmian i linii hodowlanych tytoniu na następujące grupy: słabe konwertery, tj. obiekty, w których stopień konwersji wynosił od 0 do 10%, średnie konwertery – obiekty, w których stopień konwer-

sji utrzymywał się na poziomie 10–60%, i silne konwertery – obiekty charakteryzujące się dużą zdolnością konwersji powyżej 60% (tab. 1). Następnie dla każdej odmiany i linii hodowlanej określono procentowy udział roślin wykazujących stopień konwersji mieszczący się w zakresach: ≤ 3 , od 3 do 10, od 10 do 30, od 30 do 60, od 60 do 90, $> 90\%$.

Tabela 1. Zakres konwersji nikotyny w normikotyne oraz odpowiadająca mu grupa konwersyjna

Table 1. Range of conversion of nicotine to normicotine and the corresponding group of conversion

Zakres konwersji Range of conversion [%]	Grupa konwersyjna Group of conversion
≤ 3	słaba
3–10	weak
10–30	średnia
30–60	average
60–90	silna
> 90	strong

Metody statystyczne

Analiza statystyczna obejmowała obliczenie średnich wartości badanych cech. Określono także zależności między badanymi cechami jakościowymi surowca, wyliczając współczynniki korelacji liniowej. Dane analizowano, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Przy porównywaniu odmian pod względem zawartości alkaloidów zastosowano test NIR Fischera przy poziomie istotności 0,05. W przypadku analizy stopnia konwersji nikotyny w normikotyne zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallis. Obliczenia wykonano z użyciem oprogramowania Statistica 9 firmy StatSoft.

WYNIKI I DYKUSJA

Istnieje wiele czynników determinujących zawartość i skład chemiczny alkaloidów w liściach tytoniu. Wśród nich najważniejszymi wydają się być genotyp, sposób uprawy i suszenia surowca [Wernsman i Matzinger 1968, Kajikawa i in. 2017]. Suszenie w sposób naturalny sprzyja procesowi oksydacyjnej N-demetylacji nikotyny i koncentracji normikotyny w liściach tytoniu. Z kolei suszenie w komorach ogrzewanych gorącym powietrzem ogranicza ten proces. Zastosowana w badaniach własnych technika chromatografii gazowej wykazała, że u większości odmian suszonych w sposób naturalny dominującym alkaloidem była nikotylna. Odmiany należące zarówno do typu użytkowego Virginia, jak i Burley wykazywały jednak istotne zróżnicowanie pod względem zawartości tego alkaloidu w liściach (tab. 2). Średni poziom nikotyny w odmianach typu Burley wynosił $6,29 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ i był nieco niższy od notowanego w odmianach Virginia ($8,24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Największą zawartość nikotyny obserwowano w odmianie Wentura ($15,76 \pm 76 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Dużą zawartością tego związku charakteryzowały się także linie i odmiany HTR2 ($12,82 \pm 1,84 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) oraz BPTN151, TN90 i ZD2 (od $10,85 \pm 1,62$ do $11,56 \pm 1,25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Cztery obiekty badawcze: TN35/1, NSB1, TNSB4 i Sybilla wyróżniały

się istotnie niższym poziomem nikotyny od pozostałych. U tych odmian/linii hodowlanych wiodącym alkaloidem była normikotyna. Najwyższy jej poziom odnotowano w linii TN35/1. Na szczególną uwagę zasługuje linia hodowlana WGLB, w przypadku której pomimo względnie wysokiego poziomu nikotyny ($5,85 \pm 1,89 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) odnotowano wysoki poziom normikotyny ($9,01 \pm 3,41 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), istotnie wyższy niż obserwowany u 11 pozostałych obiektów.

W badaniach własnych stwierdzono także znaczą zmienność międzyodmianową pod względem stopnia konwersji nikotyny w normikotynę. Siedem odmian/linii przypisano do grupy słabych konwerterów, dwie odmiany/linie do średnich konwerterów. Silne konwertery były reprezentowane przez pięć obiektów badawczych. Ustalono, że typ użytkowy tytoniu determinował stopień konwersji nikotyny w normikotynę. W grupie odmian w typie Burley średni stopień konwersji nikotyny był niemal dwukrotnie wyższy niż w grupie odmian w typie Virginia (tab. 2). Podobną zależność powiązania stopnia konwersji z typem użytkowym tytoniu zaobserwowali Siminszky i inni [2005], którzy podają, że frekwencja konwersji nikotyny w normikotynę w tytoniu typu Burley była zdecydowanie wyższa niż w typie Virginia i wyniosła około 20% badanej populacji.

Tabela 2. Średnia zawartość ($\pm SD$) nikotyny, normikotyny, zakres oraz stopień konwersji nikotyny w normikotynę w odmianach oraz liniach hodowlanych tytoniu w typie Burley i Virginia

Table 2. The average content ($\pm SD$) of nicotine, normicotine, range and degree of conversion of nicotine to normicotine in cultivars and breeding lines of Burley and Virginia type of tobacco

Typ tytoniu Tobacco type	Odmiana/ linia Cultivar/line	Nikotyna Nicotine [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]	Normikotyna Normicotine [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]	Stopień konwersji Conversion degree [%]	Zakres konwersji Conversion range [%]
Burley	BPTN151	11,03 \pm 1,52 ^f	0,23 \pm 0,03 ^a	2,10	1,49–6,22
	TN90	11,56 \pm 1,25 ^f	0,59 \pm 0,20 ^a	5,28	2,13–21,63
	ZD2	10,85 \pm 1,62 ^{ef}	0,91 \pm 0,37 ^a	8,17	1,43–55,73
	BPTN155	7,73 \pm 0,68 ^{cd}	0,98 \pm 0,89 ^a	10,70	2,04–85,67
	TNSB1	0,56 \pm 0,18 ^a	6,54 \pm 0,83 ^b	91,83	2,23–96,86
	TN35/1	1,75 \pm 0,26 ^a	12,14 \pm 1,63 ^d	87,55	69,71–95,93
	TNSB4	0,57 \pm 0,12 ^a	6,98 \pm 1,16 ^{bc}	92,75	83,51–95,20
\bar{x}	–	6,29	4,05	42,58	1,43–96,86
Virginia	HTR2	12,82 \pm 1,84 ^f	0,55 \pm 0,12 ^a	4,01	2,62–8,60
	Wentura	15,76 \pm 1,85 ^g	0,51 \pm 0,15 ^a	2,99	1,49–22,53
	WGLA \times \times WABPA3	5,55 \pm 0,60 ^b	0,18 \pm 0,04 ^a	3,28	2,95–3,59
	WABPA3 \times \times WGLA	8,88 \pm 1,54 ^{de}	0,26 \pm 0,05 ^a	4,92	2,61–23,29
	WGLB	5,86 \pm 1,89 ^{bc}	9,01 \pm 3,41 ^c	61,64	2,69–97,16
	Sybillia	0,59 \pm 0,32 ^a	6,30 \pm 1,68 ^b	94,82	89,88–96,99
\bar{x}	–	8,24	2,80	28,43	2,61–97,16

Prezentowane dane stanowią średnią z czterech powtórzeń. Wartości oznaczone tą samą literą w kolumnie nie różnią się istotnie statystycznie przy $\alpha \leq 0,05$ – Data represent the average of four replicates. Values marked with the same letter in the column do not differ significantly at $\alpha \leq 0.05$.

W badaniach własnych silnym konwerterem okazała się linia TNSB1. Udział roślin z konwersją całkowitą i bardzo silną wyniósł odpowiednio 88,37 oraz 9,30% (tab. 3). Równie silnymi konwerterami okazały się linie hodowlane TNSB4 i TN35/1, w których całkowite konwertery stanowiły odpowiednio 86,36 oraz 40,90%. Obiekty te wymagają eliminacji osobników zdolnych do konwersji nikotyny w normikotyne bądź wycofania z uprawy oraz programów hodowlanych. W pozostałych odmianach/liniach typu Burley problem konwersji nikotyny w normikotyne był zdecydowanie słabszy. Osobniki niekonwertujące stanowiły w zależności od odmiany od 52,27 do 88,64%. Stwierdzono także znaczny udział roślin wykazujących słabą i średnią konwersję. Obiektem o największym zróżnicowaniu osobniczym pod względem stopnia konwersji była linia BPTN155. Szczegółowa analiza danych dotyczących udziału konwerterów wśród odmian typu Virginia wykazała, że najsilniejszym konwerterem była odmiana Sybilla. W odmianie tej występowały niemal wyłącznie osobniki przejawiające całkowitą konwersję, co wskazuje na potencjalne problemy występujące przy eliminacji osobników zdolnych do konwersji, a także przy minimalizowaniu właściwości kancerogennych surowca. Znaczący udział konwerterów odnotowano także w linii hodowlanej WGL uzyskanej w wyniku krzyżowania tytoniu odmiany Wiślica z wykazującym wysoki poziom normikotynej gatunkiem *N. glauca* [Trojak-Goluch i Berbec 2011, Depta i in. 2012]. Uzyskane w tym przypadku zróżnicowanie udziału roślin z konwersją wskazuje, że brak stałej kontroli poziomu alkaloidów w materiałach roślinnych

Tabela 3. Udział konwerterów w odmianach oraz liniach hodowlanych tytoniu w typie Burley i Virginia

Table 3. Percentage of converters in cultivars and breeding lines of Burley and Virginia type of tobacco

Typ tytoniu Tobacco type	Odmiana / linia Cultivar /line	Udział niekonwerterów Non-converters proportion	Udział roślin z konwersją Proportion of plants with conversion [%]				
			3–10	10–30	30–60	60–90	> 90
Burley	BPTN151	88,64	11,36	0	0	0	0
	TN 90	65,91	20,45	13,64	0	0	0
	ZD2	52,27	27,27	15,91	4,55	0	0
	BPTN155	54,54	15,91	18,18	9,09	2,27	0
	TNSB1	2,33	0	0	0	9,30	88,37
	TN35/1	0	0	0	0	59,10	40,90
	TNSB4	0	0	0	0	13,64	86,36
Virginia	HTR2	20,45	79,55	0	0	0	0
	Wentura	88,64	9,09	2,27	0	0	0
	WGLA × × WABPA3	9,09	90,90	0	0	0	0
	WABPA3 × × WGLA	36,36	54,54	9,09	0	0	0
	WGLB	2,27	9,09	18,18	11,36	18,18	4,09
	Sybilla	0	0	0	0	2,43	97,56

wykorzystywanych w programach hodowlanych może prowadzić do kumulacji osobników konwertujących i obniżenia jakości uzyskiwanego surowca.

W badaniach własnych odnotowano istotną ujemną zależność między zawartością nikotyny i nornikotyny w liściach tytoniu odmian/linii w typie Burley (tab. 4). W przypadku odmian w typie Virginia wartość współczynnika korelacji świadczyła o braku tego typu zależności. Analiza korelacji wykazała także istotną ujemną korelację między zawartością nikotyny w liściach tytoniu a stopniem konwersji nikotyny w nornikotyne. Najwyższymi współczynnikami korelacji między badanymi cechami charakteryzowały się odmiany/linie w typie Burley. Jednak wyliczone współczynniki korelacji wskazują także na znaczący udział procesu oksydacyjnej N-demetylacji nikotyny w odmianach/liniach typu Virginia.

Tabela 4. Współczynniki korelacji dla zawartości nikotyny, nornikotyny i stopnia konwersji nikotyny w nornikotyne w odmianach oraz liniach hodowlanych tytoniu w typie Burley i Virginia

Table 4. Correlation coefficients for nicotine and nornicotine content, degree of conversion in cultivars and breeding lines of Burley and Virginia type of tobacco

Typ tytoniu Tobacco type	Alkaloid	Nikotyna Nicotine	Nornikotyna Nornicotine	Stopień konwersji Conversion degree
Burley	nikotyna	1,000	-0,829*	-0,959*
	nornikotyna	-0,829*	1,000	0,892*
Virginia	nikotyna	1,000	-0,484	-0,742*
	nornikotyna	-0,484	1,000	0,804*

*Wartości istotne przy $p < 0,05$ – values significant at $p < 0.05$.

WNIOSKI

1. W badaniach wskazano odmiany i linie hodowlane tytoniu wykazujące duże skłonności konwersji nikotyny w nornikotyne. Uzyskane wyniki stanowią cenną informację dla hodowców i przetwórców tytoniu.

2. Biorąc pod uwagę stopień konwersji nikotyny w nornikotyne w odmianach/liniach hodowlanych zarówno w tytoniu typu Burley, jak i Virginia oraz duży potencjał rakotwórczy N-nitrozonornikotyny, istnieje potrzeba systematycznej kontroli profilu alkaloidowego odmian produkcyjnych tytoniu.

3. Prowadząc hodowlę selekcyjną opartą na eliminacji z populacji nasiennych osobników konwertujących nikotyne do nornikotyny, można spodziewać się poprawy przydatności technologicznej surowca tytoniowego.

LITERATURA

- Benowitz N.L., 1996. Pharmacology of nicotine: Addiction and Therapeutics. Annual Rev.
Cai B., Fannin F.F., Chappell J., Bush L.P., 2010. Nicotine is enantioselectively demethylated by cytochrome P450 enzyme CYP82E4. CORESTA Congress, Edinburgh, Agronomy/Phytopathology Groups AP 01.

- Chakrabarti M., Bowen S.W., Coleman N.P., Meekins K.M., Dewey R.E., Siminszky B., 2008. CYP82E4-mediated nicotine to nornicotine conversion in tobacco is regulated by a senescence-specific signaling pathway. *Plant Mol. Biol.* 66, 415–427.
- Depta A., Kawka M., Kurska K., Doroszewska T., 2012. Nowoczesne metody i techniki w ulepszaniu genotypów tytoniu dla produkcji rolniczej i poprawy jakości surowca. *Studia i Raporty IUNG-PIB* 31 (5), 69–131.
- Jack A.M., Bush L.P., Fannin F.F., Miller R.D., 2003. Variability in nicotine conversion: site or smapling? CORESTA Congress, Bucharest, Agronomy/Phytopathology Groups A 02.
- Jinchao S., Xueguang S., 2006. Determination of tobacco alkaloids by gas chromatography-mass spectrometry using cloud point extraction as a preconcentration step. *Anal. Chim. Acta.* 561, 83–87.
- Kajikawa M., Sierro N., Kawaguchi H., Bakaher N., Ivanow N., Hashimoto T., Shoji T., 2017. Genomic insights into the evolution of the nicotine biosynthesis pathway in tobacco. *Plant Physiol.* 174, 999–1011.
- Kolińska A., Marciniak P., Adamski Z., Rosiński G., 2016. Alkaloidy – Naturalne Substancje Karдиоaktywne. *Kosmos* 65 (2), 247–256.
- Kołodziejczyk A., 2004. Naturalne związki organiczne. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Kotuła I., Kasicka-Jonderko A., Jonderko K., 2004. Nienowotworowe następstwa oddziaływania palenia papierosów na czynność układu trawiennego. *Wiad. Lek.* 57, 473–479.
- Nielsen M.T., Cui M., Midgett C., Owen J.K., 2002. Frequency of nicotine conversion and its relationship to TSNA formation in air-cured tobacco varieties. CORESTA Congress. New Orleans, AP 01.
- Siminszky B., Gavilano L., Steven W.B., Dewey R.E., 2005. Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Biol.* 102 (41), 14919–14924.
- Starek A., Podolak I., 2009. Rakotwórcze działanie dymu papierosowego. *Rocz. Państw. Zakł. Hig.* 60 (4), 299–310.
- Tomilo J., Dziki D., Polak R., 2014. Wybrane aspekty uprawy i przygotowania tytoniu do przetwórstwa na przykładzie odmiany Virginia. *Motrol.* 16 (1), 147–152.
- Trojak-Goluch A., Berbec A., 2011. Growth, development and chemical characteristics of tobacco lines carrying black root rot resistance derived from *Nicotiana glauca* (Grah.). *Plant Breed.* 130, 92–95.
- Tso T.C., 1990. Chemical Characteristics Production and Leaf Quality and Usability. In *Physiology and Biochemistry of Tobacco Plant*, IDEALS, Bestville Maryland, USA, 595–634.
- Wernsman, E.A., Matzinger D.F., 1968. Time and site of nicotine conversion in tobacco. *Tob. Sci.* 12, 226–228.

EVALUATION OF UNDESIRABLE ALKALOIDS CONTENT IN SELECTED CULTIVARS AND BREEDING LINES OF CULTIVATED TOBACCO

Summary. One of the basic criteria for assessing the quality of raw tobacco is the content of major alkaloids, such as nicotine and nornicotine. The presence of nicotine in the leaves, within recognized limits, is beneficial and expected. In contrast, the occurrence of nornicotine, resulting from oxidative N-demethylation (conversion) of nicotine, is undesirable. Nornicotine reduces the quality of tobacco because it is a precursor to the production of

N'-nitrosonicotinine (NNN), the main compound from the group of tobacco nitrosamines (TSNA). The nitrosamines show strong carcinogenic properties. The process of conversion of nicotine to nornicotine occurs mainly during the maturation and drying of tobacco leaves and has a genetic basis. The aim of the study was to assess the content of nicotine and nornicotine in the tobacco cultivars and lines belonging to the Burley and Virginia type of use. The alkaloid profile of leaves was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. Based on the data on the content of nicotine and nornicotine, the conversion rate was calculated on the dry weight of the leaves. The formula was used for calculations: $conversion\ rate\ [\%] = 100 \cdot content\ of\ nornicotine / (nicotine\ content + content\ of\ nornicotine)$. There was significant inter-cultivar difference in the content of tested alkaloids. The studies also showed significant inter-cultivar difference as regards the degree of conversion of nicotine to nornicotine. Seven cultivars/lines were assigned to the group of weak converters, and two varieties/lines to medium converters. Strong converters were included in five treatments. It was found that the type of tobacco determined the degree of conversion. In the group of Burley cultivars, the average conversion rate of nicotine was almost twice as high as in the Virginia group. Data analysis also showed significant negative correlation coefficients between the nicotine and nornicotine content and, as well as between nicotine content and the degree of conversion. It was found that the degree of conversion in cultivars of Burley type was definitely higher than that recorded in the Virginia type, which allows to conclude that the use of these cultivars for the production of tobacco products constitute a much greater threat to the health of consumers. Cultivars and breeding lines requiring purification from converters to improve the quality of the raw material have been indicated.

Key words: nicotine, nornicotine, cultivated tobacco, degree of conversion of nicotine to nornicotine