

农 业

碳酸氢钾和氯化钠对烟草转化株烟碱转化的诱导作用

史宏志¹, 杨 辉², 李传玉², 刘国顺¹, 范艺宽³, 李 超¹

1 河南农业大学国家烟草栽培生理生化研究基地, 郑州市文化路 95 号 450002;

2 贵州中烟工业公司, 贵阳 550003; 3 河南省烟草公司, 郑州 450000

摘 要: 以白肋烟 TN90 高转化株为材料研究了无机盐处理烟株早期叶片对烟碱转化的诱导作用及机理。结果表明, 1.2% 的碳酸氢钾水溶液和 1.2% 的氯化钠水溶液均具有显著的诱导转化株早期叶片烟碱转化作用, 碳酸钠效果较差。比较碳酸氢钾处理、氯化钠处理分别对常规 TN90 品种烟株转化株的早期鉴定结果和自然晾制后烟叶的烟碱转化率发现, 采用 2 种无机盐鉴别出的转化株均包括了所有在自然晾制后产生的转化株, 且还可鉴别出一些在正常晾制条件下不能有效鉴别的低转化株; 早期测定的烟碱转化率一般高于烟叶自然晾制后的烟碱转化率, 有利于提高鉴定的准确性和有效性。碳酸氢钾可显著促进叶片内源乙烯的释放, 在处理溶液中添加 10^{-4} mol/L AVG 抑制乙烯的合成可逆转碳酸氢钾对烟碱转化的诱导。

关键词: 烟草; 烟碱转化; 碳酸氢钾; 氯化钠; 乙烯; 转化株鉴别

中图分类号: S572.03

文献标识码: A

文章编号: 1004-5708(2007)04-0026-05

Stimulating effect of KHCO_3 and NaCl on nicotine conversion of burley convertersSHI Hong-zhi¹, YANG Hui², LI Chuan-yu², LIU Guo-shun¹, FAN Yi-kuan³, LI Chao¹

1 Centre for Tobacco Physiology and Biochemistry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2 Guizhou Tobacco Industry Company, Guiyang 550003, China;

3 Henan Tobacco Company, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Burley variety TN90 converters were used to investigate the stimulating effect of inorganic salts on nicotine conversion of fresh leaves and the stimulating mechanism. It has been showed that the 1.2% potassium bicarbonate and 1.2% sodium chloride aqueous solutions both had significant stimulating effect on nicotine conversion of early stage converter leaves. Sodium carbonate didn't show much stimulating effect. Comparing the early identification results achieved by using potassium bicarbonate and sodium chloride solution with the identification results after air-curing, we found that the early identified converter by potassium bicarbonate and sodium chloride matched all the converters identified after normal air-curing, and the method was able to identify some minor converters which were hard to be identified normally. The percent nicotine conversions obtained at early identification were higher than that measured after air-curing, which was conducive to increasing the accuracy and availability of identification. Potassium bicarbonate significantly increased the production and release of endogenous ethylene. The addition of 10^{-4} M AVG (an ethylene producing inhibitor) to the potassium bicarbonate solution reversed the stimulation of nicotine conversion resulting in the conversion level comparable to control (pure water).

Key words: tobacco; nicotine conversion; potassium bicarbonate; sodium chloride; ethylene; converter identification

烟碱是烟草中最主要的生物碱, 正常情况下烟碱含量占总生物碱含量的 93% 以上^[1]。但在烟株群体

中, 由于基因返祖突变, 个别植株会形成烟碱去甲基能力, 烟碱在烟碱去甲基酶的作用下脱去甲基而转化成降烟碱, 导致烟碱含量显著降低, 降烟碱含量相应增加。在转化株的调制过程中, 降烟碱极易发生亚硝化反应形成主要的烟草特有亚硝胺—N-亚硝基降烟碱 (NNN)。研究表明, 烟叶的降烟碱含量和烟碱转化率与 NNN 含量呈显著正相关^[2-4]。最近的研究还表明,

作者简介: 史宏志 (1963—), 男, 博士, 教授, 主要从事烟草生理生化研究。E-mail: shihongzhi88@163.com

刘国顺 (通讯作者), 男, 教授, 从事烟草栽培生理研究。

基金项目: 国家烟草专卖局烟草行业栽培重点实验室资助。

收稿日期: 2007-01-30

降烟碱本身对人体也有一定的危害性^[5]。降烟碱的酰基化形成一系列含有 1~8 个碳原子酰基部分的降烟碱衍生物。降烟碱的氧化还可产生麦斯明^[6-7]。这些产物可改变烟叶和烟气化学成分组成和协调性,进而对烟叶的香味品质产生不利影响。具有不同烟碱转化能力的白肋烟品系,农艺性状无显著差异,但烟叶香味品质随降烟碱含量增加显著下降,转化型烟叶一般白肋烟风格下降,香味不正,口腔残留严重^[8]。这些结果表明由烟碱转化导致降烟碱含量增高对烟叶品质 and 安全性有重要影响,从群体中去除转化株是降低烟叶和产品中 TSNA 含量及提高和改善烟叶香味品质的有效途径^[1]。

国外未经纯化的白肋烟品种一般在群体中含有 15%~20% 的转化株,其中约一半转化株的烟碱转化率在 20% 以上^[2,9]。目前,美国所有白肋烟品种都必须经过转化株的清除和品种的纯化,才能在生产上应用。我国白肋烟由于在品种选育和种子繁育过程中没有进行降烟碱含量的测定和选择,所以群体中存在大量转化株^[10]。因此,通过对转化株鉴别和清除,进行品种的改良是当务之急。群体中的转化株必须在烟叶生长的早期阶段被鉴别和清除,以保证新品种选育、良种繁育或杂交种制种中严格选取非转化株进行杂交或自交。转化株的烟碱转化主要是在烟叶调制过程中发生的^[3],所以转化株的早期鉴别首先需要对转化株的烟碱转化进行诱导,以便早期表达转化性状。目前采用的诱导转化株的烟碱转化性状在绿叶中早期表达的方法是采用乙烯利处理^[11]。虽然乙烯对烟碱转化有显著的诱导作用,但由于乙烯利为植物生长调节剂,使用不当易造成效果不稳定,且成本较高,不利于环保,很有必要研究筛选温和的、稳定的、有效的、低廉的、环境友好型的材料和方法。本试验研究了无机盐类的碳酸氢钾、氯化钠等对白肋烟烟碱转化的诱导作用,其对转化株的鉴定效果以及作用机理,为在育种和生产中有效鉴别转化株提供新方法。

1 材料与方法

1.1 盆栽试验

以白肋烟 TN90 高转化株系为材料,以喷清水为对照,研究了无机盐类处理离体叶片对烟碱转化的诱导效果。试验采用盆栽方法,共 32 盆,在移栽后 30 d,每棵烟株取下部烟叶 1 片,分别进行处理。共分 5 个主处理,即喷清水(对照)、喷碳酸氢钾、喷氯化钠、喷碳酸钠、喷乙烯利。每个喷无机盐的处理分 2 个浓度,即 1.0% 和 1.2%。处理后在 30 °C 条件下保湿晾制 4 d,

然后烘干进行生物碱含量测定,计算烟碱转化率。

1.2 大田试验

以白肋烟 TN90 常规品种为材料研究碳酸氢钾对烟株早期处理方法鉴定大田群体转化株的有效性。烟叶移栽后 3 周进行定株,取下部叶 1 片,标记后采用碳酸氢钾处理,保湿晾制,4 d 后烘干,测定生物碱,计算烟碱转化率。在烟株成熟后,按常规方法进行半整株晾制,6 周后采样,进行第 2 次生物碱含量测定,计算烟碱转化率,比较 2 次对转化株鉴别的一致性。

1.3 室内试验

以 TN90 高转化株为材料研究碳酸氢钾处理对叶片乙烯释放的影响及去除乙烯对烟碱转化的影响。将同一叶片同样面积的鲜烟叶圆片分为 2 等份,1 份喷 1.2% 的碳酸氢钾,另 1 份喷清水为对照,分别置于广口玻璃瓶中,用橡胶盖盖紧,按时用气体取样针管取空气样品测定乙烯浓度。乙烯测定采用气相色谱法。

在另一试验中,将 3 等份的转化株叶片圆片分别用 3 种液体处理:1. 喷清水为对照;2. 喷 1.2% 的碳酸氢钾溶液;3. 喷 1.2% 的碳酸氢钾溶液 + 10^{-4} mol/L AVG 溶液。在 30 °C 条件下保湿晾制 4 d,然后烘干进行生物碱含量测定,计算烟碱转化率。

1.4 烟碱转化率的计算

烟碱转化能力用烟碱转化率表示,即降烟碱含量占烟碱和降烟碱含量之和的百分比,可由下式计算:

$$\text{烟碱转化率}(\%) = [\text{降烟碱含量} / (\text{烟碱含量} + \text{降烟碱含量})] \times 100\%$$

根据烟碱转化率将烟株分为非转化株(烟碱转化率低于 5%)、低转化株(烟碱转化率 5%~20%)和高转化株(烟碱转化率大于 20%)。

1.5 生物碱测定

生物碱测定采用气相色谱法。样品经烘干后粉碎,每样品称取 100 mg,用甲基丁醚提取生物碱。气相色谱仪为 Agilent-6890,检测器为 FID,具体操作和参数设定按 Burton 等^[12]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 无机盐处理转化株早期离体烟叶对烟碱转化的诱导

40 棵盆栽转化型烟株共分为 5 个主处理(不同无机盐),每个无机盐处理分为 2 个副处理(2 个浓度)。在移栽后 1 个月每株取 1 片叶分别按既定的无机盐和浓度处理进行烟碱转化的诱导。处理 4 d 后,分别进行烟碱和降烟碱的测定,结果见表 1。

表 1 无机盐处理对转化株离体烟叶烟碱转化的诱导作用

无机盐	无机盐浓度/(%)	烟碱/(%)	降烟碱/(%)	烟碱+降烟碱/(%)	烟碱转化率/(%)
CK (water)	100	2.32	0.28	2.60	10.8
KHCO ₃	1.0	0.35	2.10	2.45	85.7
	1.2	0.27	2.39	2.66	89.8
NaCl	1.0	0.46	2.04	2.50	81.6
	1.2	0.25	1.98	2.23	88.8
NaCO ₃	1.0	1.96	0.45	2.41	18.7
	1.2	1.85	0.35	2.20	15.9
乙烯利	0.2	0.26	2.22	2.48	89.5

结果表明, 碳酸氢钾和氯化钠均表现显著的诱导烟碱转化的作用, 处理 4 d 后烟叶外观变黄, 烟碱转化率达到 80% 以上, 其中以 1.2% 的浓度为佳, 1.2% 的碳酸氢钾水溶液处理的烟叶烟碱转化率和乙烯利处理的相当, 接近 90%, 因此, 碳酸氢钾可以代替乙烯利在群体烟株转化株的早期诱导鉴定中使用。试验表明, 碳酸钠诱导烟碱转化的作用不明显。

2.2 碳酸氢钾和氯化钠处理对烟碱转化株早期诱导鉴定的效果

将未经纯化的白肋烟 TN90 在大田种植, 移栽后 1 个月定株 100 株。其中 50 株用 1.2% 碳酸氢钾处理进行转化株早期鉴定, 另外 50 株用 1.2% 氯化钠进行早期鉴定。结果分别发现 18 株和 21 株烟叶的烟碱转化率达到 5%, 为烟碱转化株(图 1 和图 2)。在烟叶成熟后, 按正常方式进行半整株晾制, 干叶期对田间定株的烟株进行第 2 次取样, 测定烟碱和降烟碱含量, 计算烟碱转化率。结果表明, 在所测 2 个烟株群体中分别有 12 和 16 株烟叶的烟碱转化率达到 5% 以上。从 2 次测定结果的比较可以看出, 通过碳酸氢钾和氯化钠处理早期鉴定的转化株包括了所有在调制后自然形成的转化株, 而且 2 次测定所得的烟碱转化率的株间分布趋势具有较高的一致性, 说明通过诱导方法早期鉴定转化株是十分有效的。

结果还表明, 早期转化株的诱导后所得到的烟碱转化率一般高于烟叶自然晾制后的烟碱转化率, 进一步说明碳酸氢钾和氯化钠处理可以诱导和促进具有烟碱去甲基能力烟株的烟碱向降烟碱转化, 这对提高转化株鉴定的准确性和有效性十分有利。更有意义的是, 采用碳酸氢钾和氯化钠处理方法进行诱导, 可以鉴别出一些在正常晾制条件下无法有效鉴别的低转化

株。本试验中, 2 个群体中分别有 7 个和 5 个低转化株只在早期诱导条件下才被鉴别出来, 因此, 通过碳酸氢钾和氯化钠处理可以有效地鉴别低转化株, 从而提高鉴定的效果。

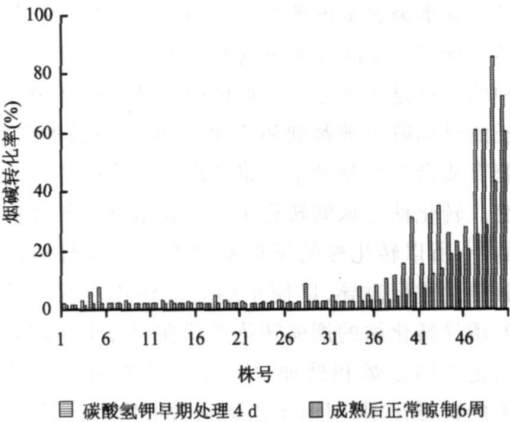


图 1 碳酸氢钾早期诱导后与调制后烟叶烟碱转化率的比较

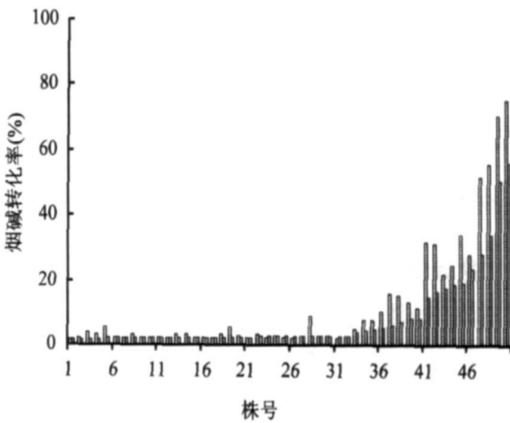


图 2 氯化钠早期诱导后与调制后烟叶烟碱转化率的比较

2.3 碳酸氢钾诱导烟碱转化与叶片内源乙烯释放的关系

2.3.1 碳酸氢钾处理对叶片内源乙烯释放的影响

由于碳酸氢钾诱导转化株烟碱转化的过程和烟叶外观变黄相连,而且大量研究表明乙烯利具有显著的诱导转化株烟碱转化的作用^[10],因此认为,碳酸氢钾诱导烟碱转化与促进烟叶内源乙烯的释放有关。本试验结果表明(图3),烟叶在碳酸氢钾处理2 h内,乙烯释放量急速增加,且在6 h左右达到最大值,此后缓慢下降。清水处理的对照,在最初的2 h乙烯释放也显著增加,但远低于碳酸氢钾处理的叶片,6 h后乙烯浓度逐渐下降,48 h内碳酸氢钾处理叶片所释放的乙烯浓度均高于对照,说明碳酸氢钾可显著促进叶片内源乙烯的合成和释放。

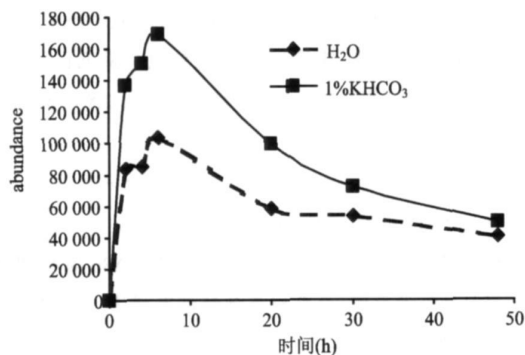


图3 碳酸氢钾处理对叶片内源乙烯释放的影响

2.3.2 乙烯释放抑制剂 AVG 处理对碳酸氢钾诱导烟碱转化作用的影响

为了进一步明确碳酸氢钾诱导转化株烟碱转化的作用机理,在1.2%的碳酸氢钾处理溶液中加入 10^{-4} mol/L AVG,以1.2%的碳酸氢钾不加AVG和用清水处理为对照,研究其烟碱转化率的影响。AVG是乙烯合成的抑制剂,根据乙烯合成受抑情况下的烟碱转化率变化可以明晰乙烯在诱导烟碱转化中的作用。结果表明(图4),用1.2%碳酸氢钾处理的转化株叶片4 d后烟碱转化率达到87%,而经1.2%碳酸氢钾加AVG的处理的叶片烟碱转化率仅为50%,和用清水处理的对照接近,充分说明碳酸氢钾促进烟叶内源乙烯合成增加是诱导烟碱转化的重要原因。

3 结语与讨论

转化株的烟碱转化主要是在烟叶的调制期发生

的,因此要对转化株进行早期鉴定,必须首先对转化性状进行诱导。研究表明,碳酸氢钾和氯化钠处理可以有效激活转化株的烟碱去甲基酶活性,使烟碱转化得到最大程度的表达。对同一个转化株而言,碳酸氢钾和氯化钠早期处理后所得到的烟碱转化率一般显著高于正常调制后烟叶的烟碱转化率,而且可以鉴定出一些在正常调制条件下无法有效鉴别的低转化株,提高鉴别的准确性和有效性,因而具有较高的应用价值。

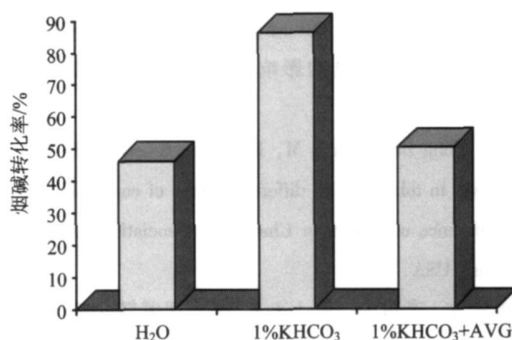


图4 乙烯释放抑制剂 AVG 处理对碳酸氢钾诱导烟碱转化的影响

碳酸氢钾和氯化钠对烟碱转化的诱导机理与这些无机盐促进离体叶片内源乙烯的合成和释放有关。我们的前期研究表明,乙烯对转化株的烟碱去甲基化有显著的诱导作用^[11],采用乙烯利对转化株进行早期诱导和鉴定已经在烟叶育种和研究中应用^[10-13]。本研究表明,采用碳酸氢钾和氯化钠处理为转化株的早期鉴定提供了更为安全、环保、低廉,且十分有效的方法。

目前我国栽培上应用的白肋烟品种主要有2类,一是利用雄性胞质不育系配制的杂交种,如鄂烟1号、鄂烟3号、达白1号、达白2号等,另一类为系统选育的常规品种,如TN90、TN86等,它们普遍存在烟碱转化株比例较高的问题,我们已对我国白肋烟主栽品种鄂烟1号进行了改良,取得了显著的效果^[14]。对其它品种和杂交种的改良也在进行之中。

参考文献

- [1] 史宏志, 张建勋. 烟草生物碱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [2] SHI Hong-zhi, Fannin F F, Burton H R, et al. Factors affecting nicotine to nornicotine conversion in burley tobacco[J]. 54th TSRC, 2000. Nashville, USA.

- [3] Bush L P, CUI Ming-wu, SHI Hong-zhi, et al. Formation of tobacco-specific nitrosamines in air-cured tobacco[J]. Recent Advances in Tobacco Science, 2001, Vol. 55.
- [4] 史宏志, 黄元炯, Bush L P, 等. 我国烟草及其制品中烟草特有亚硝胺含量及与前体物的关系[J]. 中国烟草学报, 2002, 8(1): 14-19.
- [5] Siminszky B, Gavilano L, Bowen S W, et al. Conversion of nicotine to nor nicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase [EB/OL]. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506581102
- [6] 史宏志, Bush L P, Krauss M. 烟碱向降烟碱转化对烟叶麦斯明和 TSNA 含量的影响[J]. 烟草科技, 2004(10): 27-30.
- [7] SHI Hong-zhi, Krauss M, Bokelman G, et al. TSNA and precursors in tobacco with different degree of conversion[R]. 225th Conference of American Chemistry Association, 2003, New Orleans, USA.
- [8] 史宏志, 李进平, Bush L P, 等. 烟碱转化率与卷烟感官评吸品质和烟气 TSNA 含量的关系[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(2): 9-14.
- [9] Bush L P, ZHAN Yi-shi, YANG Huan-wen, et al. Time of nor nicotine formation in burley tobacco[R]. CORESTA, 1999, Suzhou, China.
- [10] 史宏志, 李进平, Bush L P, 等. 白肋烟杂交种及亲本烟碱转化株的鉴别[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(4): 28-32.
- [11] SHI Hong-zhi, Fannin F F, Burton H R, et al. Identification of nicotine to nornicotine converters in burley tobacco[C]. 55th Tobacco Science Research Conference, 2001, Greensboro, NC, USA.
- [12] Burton H R, Bush L P, Djordjevic M V. Influence of temperature and humidity on accumulation of tobacco-specific nitrosamines in stored burley tobacco[J]. J Agric Food Chem, 1989, 37: 1372-1377.
- [13] Miller R D, Bush L P, Burton H R, et al. Screening for nornicotine conversion in burley tobacco[C]. 55th Tobacco Science Research Conference, 2001, Greensboro, NC, USA.
- [14] 史宏志, 李进平, 李宗平, 等. 遗传改良降低白肋烟杂交种烟碱转化率研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(1): 153-160.

[上接第 18 页]

参考文献

- [1] 宫长荣, 王爱华, 王松峰. 烟叶烘烤过程中多酚类物质的变化与化学成分的相关分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2316-2320.
- [2] 周冀衡, 朱晓平, 王彦亭, 等. 烟草生理与生物化学[M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 1996.
- [3] 杨虹琦, 周冀衡, 杨述远, 等. 不同产区烤烟中主要潜害型物质对评吸质量的影响研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2005, 31(1): 638-644.
- [4] Tso T C. Physiology and Biochemistry of Tobacco Plants[M]. Stroudsburg: Dowden, Hutchinson and Ross Inc, 1972: 259-271.
- [5] 阎新甫, 韩锦峰. 烟草多酚类化合物的研究进展[J]. 华北农学报, 1987, 2(2): 31-38.
- [6] 王麟, 谢复伟, 吴鸣, 等. 多酚在白肋烟生长、采收、调制过程中的变化研究[J]. 中国烟草学报, 2004, 10(5): 1-7.
- [7] 杨虹琦, 周冀衡, 郭紫明, 等. 湖南不同烟区烤烟中绿原酸和芸香苷的研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2005, 31(6): 616-619.
- [8] 温永琴, 徐丽芬, 陈宗瑜, 等. 云南烤烟石油醚提取物和多酚类与气候的关系[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2002, 28(2): 103-105.
- [9] 柴家荣, 李天飞, 杨宏光, 等. 白肋烟 TN86 凉制期 PPO、POD 活性及总酚、类黄酮类含量动态研究[J]. 中国烟草科学, 2003(1): 31-33.
- [10] 王瑞新. 烟草化学品质分析法[M]. 郑州: 河南科技出版社, 1998.
- [11] 张槐苓, 葛翠英, 穆怀静, 等. 烟草分析与检验[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1994.
- [12] 白宝璋. 植物生理学-测试技术[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1990.
- [13] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [14] 左天觉. 烟草的生产、生理与生物化学[M], 朱尊权, 等译. 上海: 上海远东出版社, 1993.
- [15] Chotinuchit P, Vorabheuk S. Studies on phenolic compounds in Thai flue-cured tobacco[J]. Thai J Agr Sci, 1986, 19: 147-154.
- [16] Schlotzhauer W S, Martin R M, Snook M E, et al. Pyrolytic studies on tobacco leaf constituents to the formation of smoke catechols[J]. Tob Sci, 1981, 30: 372-374.
- [17] Hecht S S, Camella S, et al. A study of tobacco carcinogenesis. XX. Role of catechol as a major cocarcinogen in the weakly acidic fraction of smoke condensate[J]. Natl Cancer Inst., 1981, 66: 163-169.