Występowanie nornikotyny w *N. glutinosa*

Occurrence of nornicotine in N. glutinosa

K. BLAIM

Nornikotyna należy obok nikotyny do najbardziej rozpowszechnionych alkaloidów spotykanych w rodzaju *Nicotiana*. Jest zjawiskiem zastanawiającym, że nornikotyna charakterystyczna jest przede wszystkim dla roślin dzikich. U roślin uprawnych następuje zmniejszanie się zawartości nornikotyny przy jednoczesnej tendencji zwiększania ogólnej zawartości alkaloidów (Henry 1949). Z drugiej znów strony, zauważono u tytoni szlachetnych (*N. tabacum*), że w liściach niektórych roślin w czasie ich odpowiedniego suszenia, pojawia się nornikotyna przy równoległym zmniejszaniu się nikotyny (Griffith, Valleau, Stokes 1955; Stepka, Dewey 1961; Wada 1957).

Fakt ten nie jest bez znaczenia praktycznego, ponieważ nornikotyna w porównaniu z nikotyną jest o wiele mniej szkodliwa dla zdrowia, wartość zaś technologiczna takich tytoni nie ulega zasadniczym zmianom (Binopoulos 1958; Kuhn 1958).

Współzależność w występowaniu nikotyny i nornikotyny staje się zrozumiała, jeśli zwrócimy uwagę na powiązanie biogenetyczne obu alkaloidów.

Jak wykazały badania Dowsona (1945, 1948), Iljina (1958), biosynteza nornikotyny odbywa się w liściach w wyniku demetylacji nikotyny. Sam jednak mechanizm tego procesu nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony. Istnieją dwie zasadnicze możliwe drogi, którymi może przebiegać przemiana nikotyny w nornikotynę (Stepka, Dewey 1961): 1) poprzez proces transmetylacji oraz 2) poprzez demetylację oksydacyjną. Możliwość pierwsza wydaje się mniej prawdopodobna i ma stosunkowo słabe poparcie eksperymentalne, chociaż Bose i współpracownicy (1956) stwierdzili pewien niewielki przyrost nornikotyny, jeśli nikotynę dodawano do homogenizatów tkanek tytoniu w obecności aminoetanolu. Nie stwierdzono natomiast żadnych przemian alkaloidów w przypadku nieobecności aminoetanolu. Przebieg demetylacji oksydacyjnej jest bardziej udokumentowany aniżeli transmetylacja.

Wenkert (1954) na drodze rozważań teoretycznych sugeruje, że oksynikotyna stanowi produkt pośredni w przemianie nikotyny w nornikotynę.

Egri (1957) i Iljin (1958) na podstawie swych prac doświadczalnych rozważają możliwość zachodzenia procesów oksydacyjnych. Egri podaje, że oksynikotyna infiltrowana do liści tytoniowych potęguje powiększanie się zawartości nornikotyny. Iljin natomiast wykazał, że demetylacja nikotyny wiąże się ze zwiększaniem pobierania tlenu.

Innym zagadnieniem, które zdaje się być powiązane z występowaniem nornikotyny, jest zjawisko odporności roślin na niektóre choroby wirusowe. Zostało mianowicie stwierdzone, że u *N. glutinosa*, typowej rośliny nornikotynowej, przy zakażeniu mozaiką tytoniową w miejscach zakażenia pojawiają się niewielkie plamki zamierającej tkanki (nekrozy), które zawierają wirus. Choroba jednak dalej się nie rozprzestrzenia i jest zlokalizowana w miejscach zakażenia (Suchow i Razwajzki na 1955).

Tierniowski (1940) prowadząc hodowlę w kierunku zwiększenia odporności otrzymał, w wyniku skrzyżowania *N. glutinosa* z *N. tabacum*, nową odmianę tytoniu praktycznie odporną na mozaikę. Późniejsze badania biochemiczne wykazały, że otrzymane na tej drodze krzyżówki nie różnią się swym składem alkaloidowym od *N. glutinosa* (Paech 1952). Nie jest więc wykluczone, że mamy do czynienia z powstawaniem jakiejś współzależności pomiędzy cechą odporności a występowaniem nornikotyny.

Celem niniejszej pracy było zbadanie zawartości oraz rozmieszczenia nornikotyny w *N. glutinosa* w ontogenetycznym rozwoju rośliny.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Materiał i metodyka badań

Badania nad występowaniem nornikotyny w *N. glutinosa* obejmowały:

1. Oznaczanie zawartości nornikotyny w poszczególnych częściach rośliny w zależności od wieku.
2. Oznaczanie zawartości nornikotyny w liściach poszczególnych pięter w zależności od wieku.
3. Rozmieszczenie nornikotyny w liściu.

Do badań brane były rośliny 4, 8 i 10-tygodniowe, pochodzące z hodowli Pracowni Tytoniu IUNG w Puławach. Oznaczanie nornikotyny prowadzono oddzielnie w liściach, ogonkach liściowych, kwiatostanach, łodygach i korzeniach. U roślin 8- i 10-tygodniowych, liście dzielono według pięter, przy czym rośliny 8-tygodniowe dzielono na 3, rośliny zaś 10-tygodniowe na 4 piętra.

Oznaczanie rozmieszczenia nornikotyny w liściu przeprowadzono w ten sposób, że blaszki liściowe dolnych liści z roślin 10-tygodniowych dzielono na 3 części: jedna z nich stanowiła zewnętrzny, peryferyjny pas liścia o szerokości około 1,5 cm, część druga podobny pas przyle-

gający do poprzedniego, część zaś trzecia stanowiła środkową część liścia z nerwem głównym (ryc. 3).

Przy oznaczaniu nornikotyny posługiwano się metodą chromatograficzną i kolorymetryczną. Wszystkie oznaczenia prowadzone były w trzech powtórzeniach, przy czym próbki do analiz stanowiły zawsze średni materiał z 10 roślin.

A. Metoda chromatograficzna

100 mg wysuszonego w 60°C i rozdrobnionego materiału ekstrahowano w ciągu 10 godzin przy pomocy 1n H₂SO₄. Ekstrakt sączono, alkaliczowano i ekstrahowano eterem. Wyciąg eterowy zakwaszano kilkoma kroplami stężonego kwasu octowego i zagęszczano do niewielkiej objętości. Pozostałość nanoszono ilościowo na bibułę chromatograficzną

Ryc. 1. Chromatogram liści *N. glutinosa* na zawartość alkaloidów

I — liście górne (najmłodsze); II — liście środkowo-górne; III — liście środkowo-dolne; IV — liście dolne (najstarsze)

Chromatogram of *N. glutinosa* leaves concerning the content of alkaloids

I — uppermost (the youngest) leaves; II — middle — upper leaves; III — middle — lower leaves; IV — the lowest leaves (the oldest)

Whatmana Nr 3, buforowaną uprzednio za pomocą buforu cytrynianowego o pH = 5,9. Jako rozpuszczalnika używano nasyconego wodą n-butanolu. Stosowano dwukrotną chromatografię wstępującą. Przy zastosowaniu takiej chromatografii otrzymywano bardzo dobry rozdział alkaloidów.

Chromatogram wywoływano przy użyciu zwykłego odczynnika Dragendorfa (Linskens 1955) lub przy zastosowaniu rozpuszczonej w kwasie octowym i toluenie izatyny (Kuhn 1958). W tym ostatnim przypadku wywoływano jedynie nornikotyne.

B. Metoda kolorymetryczna

W metodzie kolorymetrycznej początkową ekstrakcję prowadzono jak w przypadku metody chromatograficznej. Następnie w miejsce eteru stosowano chloroform. Ekstrakt chloroformowy umieszczano w kolbce

miarowej i uzupełniano do kreski. Dalszy ciąg oznaczenia prowadzono według metody W a l t z a (1960). Pomiarów ekstynkcji dokonywano fotometrem Pulfricha przy użyciu filtra $S = 60$ i kiuwety o średnicy 1 cm.

2. Wyniki badań

W tabeli 1 zestawiono wyniki dotyczące występowania nornikotyny w poszczególnych częściach. *N. glutinosa*. Jak widać, alkaloid ten pojawia się dopiero w określonym stadium rozwoju ontogenetycznego rośliny. Rośliny 4-tygodniowe są całkowicie pozbawione nornikotyny.

Ryc. 2. Krzywa ekstynkcji nikotyny (1) i substancji X (2) w 0,5% wodnym roztworze kwasu solnego

Curve of extinction of nicotine (1) and of X substance (2) in 0.5% water solution of hydrochloric acid

Związek ten pojawia się w liściach dopiero u roślin starszych. Inne części rośliny nie zawierają nornikotyny. Nikotyna natomiast występuje we wszystkich częściach rośliny.

Tabele 2 i 3 podają zawartość nornikotyny w liściach poszczególnych pięter u roślin 8- i 10-tygodniowych. Z tabeli tych wynika, że nornikotyna nie występuje u wszystkich liści, ale pojawia się tylko w liściach pięter dolnych, a więc w liściach najstarszych. U roślin 8-tygodniowych liście dolne zawierają około 0,24% nornikotyny, u roślin 10-tygodniowych ilość tego alkaloidu w tych liściach jest prawie dwukrotnie większa. U tych najstarszych przebadanych roślin nornikotyna występuje już w liściach pięter środkowo-dolnych. Jak widać natomiast z załączo-

T a b e l a 1 - T a b l e 1

Występowanie nornikotyny i nikotyny w poszczególnych częściach
N. glutinosa w zależności od wieku rośliny

Occurrence of nornicotine and nicotine in different parts
 of *N. glutinosa* in dependence on the plant age

Lp No	Części roślin Parts of the plants	Wiek rośliny Age of the plant					
		4-tygodniowe 4 weeks		8-tygodniowe 8 weeks		10-tygodniowe 10 weeks	
		norniko- tyna norni- cotine	nikoty- na nico- tine	norniko- tyna norni- cotine	nikoty- na nico- tine	norniko- tyna norni- cotine	nikoty- na nico- tine
1	Kwiatostan Inflorescence	-	-	-	-	b*	w**
2	Łodyga Stem	b	w	b	w	b	w
3	Korzenie Roots	b	w	b	w	b	w
4	Ogonki liściowe Petioles	b	w	b	w	b	w
5	Liście Leaves	b	w	w	w	w	w

** Symbol w oznacza występowanie nornikotyny czy nikotyny /present/.

* Symbol b oznacza brak /absent/.

nego chromatogramu (ryc. 1), wszystkie liście zawierają nikotyne. Liście dolne, które zawierają największe ilości nornikotyny, posiadają najmniej nikotyny. Liście środkowo-dolne z mniejszą ilością nornikotyny są zasobniejsze w nikotyne. Zjawisko to jest zrozumiałe, jeśli się zwróci uwagę, że prekursorem nornikotyny w liściach jest nikotyna.

Na chromatogramie obok nikotyny i nornikotyny widoczna jest jakaś substancja nazwana przez nas *x*, dająca barwną reakcję z odczynnikiem Dragendorffa. Substancja ta występuje jedynie w tych liściach, gdzie jest obecna nornikotyna, przy czym najwięcej jest jej w liściach najstarszych.

Na załączonej ryc. 2 przedstawiona jest krzywa ekstynkcji w UV nikotyny oraz substancji *x*.

T a b e l a 2 - T a b l e 2

Zawartość nornikotyny w liściach
poszczególanych pięter u roślin tygodniowych
Nornicotine content in the leaves of different
nodes on one week old plants

Lp. No.	Liście Leaves	% nornikotyny nornicotine %
1	Górne /najmłodsze/ Uppermost /the youngest/	0
2	Środkowe Middle	ślady traces
3	Dolne /najstarsze/ Lowest /oldest/	0,24

T a b e l a 3 - T a b l e 3

Zawartość nornikotyny w liściach poszczególnych
pięter u roślin 10 tygodniowych
Nornicotine content in the leaves of different
nodes on 10 weeks old plants

Lp. No.	Liście Leaves	% nornikotyny nornicotine %
1	Górne /najmłodsze/ Uppermost /the youngest/	0
2	Środkowo-górne Middle-upper	ślady traces
3	Środkowo-dolne Middle-lower	0,26
4	Dolne /najstarsze/ Lowest /the oldest/	0,45

Krzywa ekstynkcji tej substancji wykazuje pewne podobieństwo z krzywą ekstynkcji nikotyny. Nie jest więc wykluczone, że mamy tutaj do czynienia z występowaniem nowego, nie zidentyfikowanego alkaloidu, który odgrywa jakąś rolę w procesie przemiany nikotyny w norniko-

Ryc. 3. Rozmieszczenie nornikotyny w liściu
N. glutinosa

Distribution of nornicotine in the leaf of
N. glutinosa

tynę. Za taką hipotezą może przemawiać fakt pewnej widocznej korelacji w występowaniu substancji x , nikotyny i nornikotyny.

Rozmieszczenie nornikotyny w liściu przedstawiliśmy na ryc. 3.

Z rysunku tego widać, że badany związek nie jest równomiernie rozmieszczony w całym liściu. Największe ilości nornikotyny (powyżej 0,5%) występują wzdłuż brzegów blaszki liściowej, część centralna liścia wraz z ogonkiem pozbawiona jest tego alkaloidu.

DYSKUSJA

Przeprowadzone przez nas badania wskazują, że powstawanie i obecność nornikotyny w *N. glutinosa* wiąże się ściśle z rozwojem ontogenetycznym tej rośliny.

Rośliny młode pozbawione są całkowicie tego alkaloidu, który pojawia się dopiero u roślin starszych. Obecność nornikotyny wyłącznie w liściach najstarszych, jak i samo jej rozmieszczenie w blaszce liścio-

wej, zdaje się wskazywać, że proces demetylacji nikotyny do nornikotyny związany jest z procesem starzenia się rośliny. Prawdopodobnie proces ten jest charakterystyczny dla wszystkich roślin rodzaju *Nicotiana*, z tą jednak różnicą, że u roślin nikotynowych, takich jak np. *N. tabacum*, przekształcenie nikotyny w nornikotyne następuje dopiero w czasie więdnienia liści lub w czasie fermentacji. U roślin nornikotynowych, takich jak *N. glutinosa*, demetylacja nikotyny odbywa się już w liściach zielonych, a więc następuje stosunkowo wcześniej. Niemniej i tutaj nasilenie tego procesu wzrasta w tkankach starszych. Tym tłumaczyć można brak nornikotyny w tych częściach rośliny, gdzie procesy przemiany materii przebiegają intensywniej (kwiatostany, młode liście, kodyga).

Jak pisaliśmy na wstępie, mechanizm demetylacji nikotyny do nornikotyny nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniony. Stwierdzona w naszych badaniach obecność jakiegoś nie zidentyfikowanego alkaloidu o budowie zbliżonej prawdopodobnie do budowy nikotyny w tych liściach, które zawierają nornikotyne, może przemawiać za przemianami pośrednimi.

Wykazane w naszej pracy powiązanie, jakie zachodzi pomiędzy powstawaniem nornikotyny a procesem starzenia się rośliny, potwierdza również hipotezę demetylacji oksydatywnej. Jest bowiem zjawiskiem dość powszechnym fakt nasilania się procesów oksydacyjnych wraz z wiekiem organizmu. Dla przykładu podamy, że zdolność utleniania choline do betainy zwiększa się w widoczny sposób z wiekiem rośliny (Cromwell i Rennie 1954).

Wydaje się, że występowaniem procesów demetylacji oksydacyjnych w liściach *N. glutinosa* można by również w pewnym stopniu tłumaczyć mechanizm odporności tej rośliny na wirus mozaiki. Odporność ta polega, jak wiadomo, na pewnej nadwrażliwości *N. glutinosa* na mozaikę i w związku z tym następuje obumieranie zakażonych komórek (nekroza). Według dość rozpowszechnionych poglądów (Rubin i współpr. 1955) dużą rolę w odporności roślin odgrywają między innymi procesy oksydoredukcyjne. Sucharukow (1952) na przykład uważa, że powstawanie nekroz związane jest ze zwiększeniem aktywności szeregu enzymów oksydacyjnych (oksydaz). Współzależność, jaka zachodzi między występowaniem nornikotyny a odpornością rośliny na wirusa mozaiki, można by tłumaczyć odpowiednim przebiegiem procesów oksydoredukcyjnych. Przebieg tych procesów w *N. glutinosa* warunkuje prawdopodobnie powstawanie nornikotyny jeszcze w liściach zielonych, jak i stanowi o odporności tej rośliny na omawianą chorobę.

Panu mgr J. Łobażewskiemu, pracownikowi Katedry Biochemii UMCS w Lublinie składam serdeczne podziękowanie za wykonanie pomiaru ekstynkcji nikotyny i substancji α .

Laboratorium Biochemiczne JUNG
w Puławach

(Wpłynęło 10.6.1962)

STRESZCZENIE

Przeprowadzono badania nad zawartością nornikotyny w *N. glutinosa* w rozwoju ontogenetycznym rośliny. Wykazano, że w 4-tygodniowych roślinach brak jest jeszcze tego alkaloidu i pojawia się on dopiero w liściach roślin starszych. Liście młode nawet u roślin będących już w okresie kwitnienia nie zawierają nornikotyny. Na drodze chromatograficznej stwierdzono występowanie jakiegoś nieznanego alkaloidu. Wyrażono sugestie, że jest to związek pośredni w przemianie nikotyny do nornikotyny. Dlatego został tu przedyskutowany mechanizm procesu demetylacji nikotyny oraz wyrażono przypuszczenie, że odporność *N. glutinosa* na mozaikę tytoniową związana jest z typem procesów oksydoredukcyjnych, które warunkują również powstawanie nornikotyny.

SUMMARY

Investigations have been carried out on nornicotine content in *N. glutinosa* during the ontogenetic development of the plant. It has been stated that a 4 weeks old plant does not yet contain this alkaloid, which appears in the leaves of older plants. Young leaves even on the flowering plants do not contain nornicotine. By means of chromatographic method the occurrence of an unknown alkaloid, connected with the presence of nornicotine, has been stated. For this reason the mechanism of the demethylation process of nicotine has been discussed in this paper and a hypothesis has been put forth, that the resistance of *N. glutinosa* against the tobacco mosaics is due to the type of oxidation-reduction processes which are essential also for the nornicotine formation.

LITERATURA

- Binopoulos X., 1958, Actes du 2e Congrès Scientifique Internat. du Tabac., Bruxelles.
- Bose B. C., De H. N., Sultan M., 1956, Biogenesis of alkaloids in tobacco plants., II Transmethylation of nicotine and nornicotine in *N. tabacum* and *N. glauca.*, Indian J. Med. Res., 44: 91.
- Cromwell B. T., Rennie S. D., 1954. The biosynthesis and metabolism of betaines in plants., Biochem. J. 58: 318.
- Dawson R. F., 1945. An experimental analysis of alkaloid production in *Nicotiana*, the origin of nornicotine. Am. J. Botan. 32: 416.
- Dawson R. F., 1948. Alkaloid biogenesis, Adv. Enzymol., 8, 203.
- Egri L., 1957. Untersuchung über die Alkaloide einiger Tabaksorten mit besonderer Berücksichtigung der Erforschung der Biosynthese von Nornikotin. Fachl. Mitt. oesterr. Tabakreg. 1: 19.
- Griffith R. B., Vallean W. D., Stokes G. W., 1955. Determination and Inheritance of nicotine to nornicotine conversion in tobacco. Science 121: 343.
- Henry T., 1949. The plant alkaloids, London.
- Iljin G. S., Serebrowskaja K. B., 1958. Demetilowanie nikotyna i ogłoszczenie kislороda rastenijami tabaka, Doklady Akad. Nauk SSSR, 118: 139.
- Kuhn H., 1958. Actes du 2e Congrès scientifique Internat. du Tabac., Bruxelles.

- Linskens H. F., 1955. Papierchromatographie in der Botanik, Springer Verlag.
- Paech K., 1952. Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Springer Verlag.
- Rubin B. H., Czetwierikowa E. P., 1955. Arcichowskaja E. W., Okislitel'naja sistiema i immunitet rastienij., Z. obszcz. biologii 16: 106.
- Sacharukow K. T., 1952, Fizjologija immuniteta rastienij, Moskwa.
- Suchow K. S., Razwjazkina G. M., 1955, Biologija wirusow i wirusnyje bolezni i rastienij, Moskwa.
- Stepka W., Dewey L. J., 1961. Conversion of nicotine to nornicotine in harvested tobacco; fate of the methyl group, Plant Physiology 36: 592.
- Wada E., 1957. Conversion of nicotine to nornicotine in cherry red tobacco during flue — curing, Tobacco sci. 1: 118.
- Waltz P., 1960, Nornikotin bei Inlandtabaken. Z. Schweiz. Forstv., 30: 265.
- Wenkert E., 1954. The role of oxidation in the biogenesis of alkaloids. Experimentia 10: 346.
- Tierniowski M. F., 1940, Wsiesojuznyj Nauczno-Issledowatielskij Instytut Tabaka i Machorki, Krasnodar.