

# 烟草烟碱转化株早期诱导鉴定的有效性研究

史宏志<sup>1</sup>, 于建军<sup>1</sup>, 刘国顺<sup>1</sup>, Bush L P<sup>2</sup>, 江 凯<sup>3</sup>

(1. 河南农业大学 国家烟草栽培生理生化研究基地, 河南 郑州 450001;

2. University of Kentucky, KY 40546; 3. 洛阳烟草公司, 河南 洛阳 471000)

**摘要:**以白肋烟为材料研究了采用乙烯利处理对烟碱转化株进行早期鉴定的有效性以及取样时间和部位对鉴定效果的影响。结果表明, 乙烯利处理早期鉴定的转化株包括了所有调制后自然形成的转化株, 还可以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。根据鉴定结果将非转化株、低转化株和高转化株分别自交留种, 后代群体分别有 8.6%, 59.8% 和 100% 的转化株, 表明鉴定方法是有效的, 且通过转化株的鉴别和清除可以对品种进行有效改良。对转化株的鉴定从苗期到开花前都可以进行, 移栽后 4~6 周取样测定更利于大批量处理和检测。不同部位叶片都可用于早期诱导和鉴定, 但下部叶诱导时间短, 便于操作。

**关键词:**烟草; 烟碱; 降烟碱; 转化株; 乙烯利; 鉴定

中图分类号: S572 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)03-0071-05

## A Study on the Availability of Early Identification of Nicotine Converters by Etheryl Treatment

SHI Hong-zhi<sup>1</sup>, YU Jian-jun<sup>1</sup>, LIU Guo-shun<sup>1</sup>, BUSH Lowell<sup>2</sup>, JIANG Kai<sup>3</sup>

(1. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450001, China;

2. University of Kentucky, KY 40546, USA; 3. Luoyang Tobacco Company, Luoyang 471000, China)

**Abstract:** Burley tobacco was used to investigate the availability of early identification of nicotine converters by etheryl treatment, and the effects of sampling time and leaf position on the identification results. The results showed that the early-identified converters by etheryl treatment matched all the converters identified after normal air-curing, and was able to identify some low converters which was hard to be identified normally. The percent nicotine conversion by early identification was higher than that measured after air-curing, so as to increase the accuracy and availability of identification. Based on the early identification, the non-converters, low converters and high converters were self-crossed respectively and seeds were produced. The 3 populations present 8.6%, 59.8% and 100% converters, respectively, in next generation, indicating the high effectiveness of the identification method. The variety was able to be improved by identification and removal of converters from the population. The identification process could be carried out from seedling stage to pre-flowering, although sampling at 4-6 weeks after transplanting was easier to handle. Leaves from all positions could be used in the early identification, while the bottom leaves were ideal because of their shorter inducing time.

**Key words:** Tobacco; Nicotine; Nicotinic; Converter; Etheryl; Identification

在栽培烟草中, 烟碱是最主要的生物碱, 正常情况下烟碱含量占总生物碱含量的 93% 以上<sup>[1]</sup>。但在烟株群体中, 个别植株会因为基因突变而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 N-亚硝基降烟碱(NNN), 其是烟叶中主要的烟草特有亚硝胺(TSNA)之一。有研究表明, 烟叶的降烟碱含量和烟碱转化率与 NNN 含量呈显著正相关<sup>[2-4]</sup>。降烟碱的酰基化形

收稿日期: 2006-11-15

基金项目: 国家烟草专卖局烟草栽培重点实验室资助项目

作者简介: 史宏志(1963-), 男, 河南滑县人, 教授, 博士, 主要从事烟草生理生化研究

通讯作者: 刘国顺(1954-), 男, 河南叶县人, 教授, 博士生导师, 主要从事烟草栽培生理生化方面的研究。

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<sup>[5,6]</sup>。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,口腔残余严重<sup>[7]</sup>。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<sup>[6]</sup>。

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<sup>[2,8]</sup>。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,如主栽品种鄂烟 1 号群体的转化株比例高达 40% 以上<sup>[9]</sup>。因此,通过对转化株鉴别和清除,进行品种改良是当务之急。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<sup>[2]</sup>,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。目前有 2 种方法可诱导转化株的烟碱转化性状在绿叶中早期表达。一是采用乙烯利(2-氯乙基磷酸)处理<sup>[10]</sup>。乙烯对烟碱转化株的烟碱转化有显著的诱导作用。二是碳酸氢钠处理<sup>[11,12]</sup>。碳酸氢钠对烟碱转化的诱导作用可能与其促进乙烯形成有关<sup>[13]</sup>。本试验以我国白肋烟为材料,进一步研究了采用乙烯利处理进行烟碱转化株早期鉴定的有效性,以及取样时期、取样部位对鉴定效果的影响,为在育种和生产实践中有效鉴别转化株提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 田间试验

2006 年,以白肋烟 TN90 为材料,研究了乙烯利处理进行转化株早期鉴定结果与调制后烟叶烟碱转化率的一致性。在移栽后 30 d 选 60 株正常烟株挂牌定株,摘取 1 片下部叶,用乙烯利水溶液均匀喷洒,保湿晾制 7 d 后,进行烟碱和降烟碱含量测定,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,38 d 后采样进行第 2 次烟碱和降烟碱含量测定,计算烟碱转化率。

在另一个试验中,以常规品种 TN90 为材料,研

究了早期鉴定的不同转化程度烟株自交后代的表现,以确定根据早期鉴定结果,进行品种改良的效果。在移栽后 40 d 选择 35 株生长正常的烟株挂牌定株,每株取 1 片叶按上述方法进行乙烯利处理,计算烟碱转化率。根据转化程度分为高转化株、低转化株和非转化株 3 个类型,每个类型选择代表性烟株分别自交留种,于下个季节分别种植,得到 3 个类型的自交后代群体,并按同样的方法进行转化株的鉴定。

### 1.2 温室试验

在温室条件下,以上一代鉴定的 TN90 高转化株、低转化株和非转化株株系为材料研究了苗期到开花的不同时期进行转化株早期鉴定的一致性。共分苗期(8 片真叶期)、移栽后 2, 4, 6 周和开花前 5 个诱导和鉴定时期。苗期取最大一片真叶测定,其他取下部第 2 片完整叶测定。为了研究不同部位叶片对乙烯利诱导的反应,还在移栽后第 7 周以高转化株为材料,同时摘取烟株所有叶片进行试验,双数叶片在乙烯利处理后保湿晾制,单数叶片作为对照,喷清水后保湿晾制,10 d 后同时烘干,测定烟碱和降烟碱含量,计算烟碱转化率。

### 1.3 转化株的鉴定

早期对转化株烟碱转化的诱导按 Shi 等<sup>[10]</sup>的方法进行,摘取烟叶后,喷施乙烯利水溶液后保湿晾制,待烟叶变黄后,测定烟叶的烟碱和降烟碱含量。

烟碱转化能力用烟碱转化率表示,可由下式计算:

$$\text{烟碱转化率} = \left[ \frac{\text{降烟碱含量}}{\text{烟碱含量} + \text{降烟碱含量}} \right] \times 100\%$$

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%)。

### 1.4 化学成分测定

烟碱、降烟碱含量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<sup>[14]</sup>的方法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 早期鉴定结果与调制后烟叶烟碱转化率比较

对 60 株烟株用乙烯利处理方法进行转化株的诱导鉴定,结果发现,23 株烟叶的烟碱转化率达到 5% 以上,为烟碱转化株,占总测定株数的 38.3%,其中 10 株的烟碱转化率超过 20%,为高转化株,占总测定株数的 16.7%。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,在所测烟株群体中有18株烟叶的烟碱转化率达到5%以上。图1为2次测定结果的比较,从中可以看出,通过乙烯利处理早期鉴定的转化株包括了所有在调制后自然形成的18株转化株,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,进一步说明乙烯利处理可以刺激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,采用乙烯利处理方法进行诱导,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,有5个低转化株只在早期诱导条件下才被鉴别出来,因此,通过乙烯利处理可以有效地鉴别低转化株,从而提高鉴定的效果。

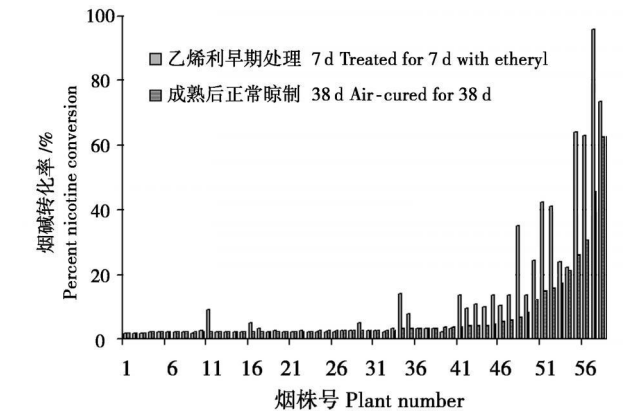


图1 乙烯利早期诱导后与调制后烟叶烟碱转化率的比较

Fig 1 Comparison of percent nicotine conversion of early-induced leaves with air-cured leaves

## 2.2 不同时期进行转化株诱导鉴定的效果

烟草从育苗到移栽再到现蕾开花要经历漫长的生长发育过程,为了明确不同生育阶段烟株的烟叶对乙烯利诱导处理的反应,在温室条件下分别种植不同类型烟株的后代烟苗,于不同时期取样进行烟碱转化的诱导,结果表明,不同生育时期进行烟碱转化诱导可以取得较为一致的定性结果,高转化株在5个时期测定所得到的烟碱转化率均在90%以上,低转化株的烟碱转化率在30%到43%之间,而非转化株各时期测定烟碱转化率均在3%以下(图2)。同时,我们注意到,在苗期取样进行转化株诱导可以得到较高的烟碱转化率,但由于苗期叶片小,生物碱测定难度较大。

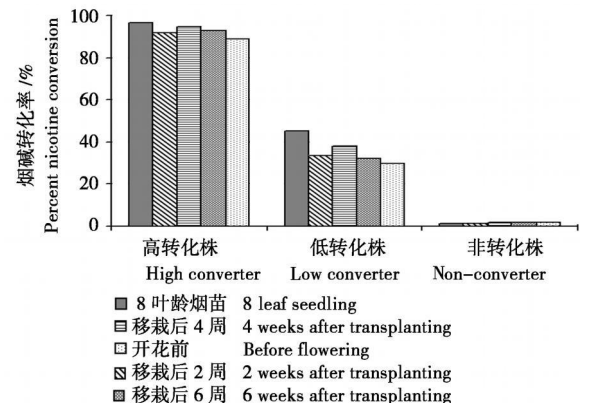


图2 不同时期取样进行转化株诱导的效果

Fig 2 Effect of sampling stages on the induction of conversion

## 2.3 不同叶位叶片进行烟碱转化诱导的效果

为了明确不同叶位的烟叶对乙烯利处理诱导烟碱转化的反应,我们以高转化株为材料,在移栽后第7周同时对所有部位的烟叶取样,双数叶片在乙烯利处理后保湿晾制,单数叶片喷清水后保湿晾制,10 d后测定烟碱转化率,结果如图2所示。虽然不同叶位的叶片生理年龄和发育程度存在很大差异,但在乙烯利处理后均可以使烟碱转化得到充分的诱导,基本达到基因型所规定的最大烟碱转化程度,说明任何部位的烟叶都可用来进行转化株的鉴别。但考虑到烟碱转化是与烟叶的衰老过程相伴随的,下部叶片发育时间较长,诱导所需时间较短,对烟叶产量影响小,所以以选用下部叶为宜。结果还表明,随着叶位的升高,在自然晾制条件下的烟叶的烟碱转化率呈明显的下降趋势,这主要与不同部位叶片的成熟度有关。

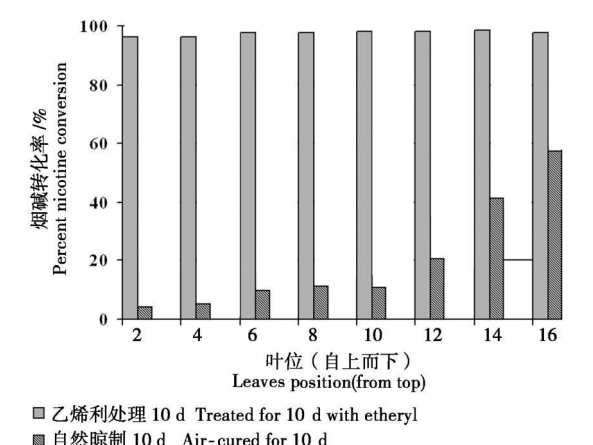


图3 高转化株不同部位叶片诱导后的烟碱转化率

Fig 3 Percent nicotine conversion of leaves from different stalk positions of high converters

## 2.4 早期鉴定后不同类型烟株的后代表现

目前对烟株群体进行转化株早期鉴定的目的主要是为了在杂交种的制种中,选用非转化株进行杂交制种,或在良种繁育中,去除群体中的转化株,留

取非转化株进行种子生产。为了验证早期转化株的鉴定和清除对后代大田群体烟株的净化作用,我们对白肋烟 TN90 进行了转化株的早期鉴定,并进一步研究了早期鉴定后不同类型烟株在自交后代的表现。图 4 为早期诱导后不同烟株的烟碱转化率,按烟碱转化率的高低将烟株分为非转化株、低转化株和高转化株,分别选取有代表性的烟株进行自交,次年对各类型烟株的自交后代进行种植,对各自交群体的烟株进行转化株的鉴定。结果表明,高转化株的自交后代群体 100% 均为高转化株,进一步说明烟碱转化性状为显性基因控制,且遗传比较稳定;低转化株后代群体出现分离现象,约有 28.5% 的高转化株,31.3% 的低转化株和 40.2% 的非转化株,说明控制烟碱转化的基因处于杂合状态;非转化株的后代群体有 91.4% 的烟株仍为非转化株,虽然出现了少数转化株,但转化程度较低,说明通过转化株的早

表 1 乙烯利处理早期鉴定后不同转化程度烟株自交后代的表现

母代 Parent plants	自交后代 Selfing 1 generation plants						
	株数 Number of plants	平均烟碱 含量/ % Nicotine content	平均降烟碱 含量/ % Norm nicotine content	平均烟碱 转化率/ % Percent conversion	总转化株 比例/ % Total converter	高转化株 比例/ % High converter	非转化株 比例/ % Non-converter
高转化株 High converters	35	0.41	2.23	84.5	100.0	100.0	0.0
低转化株 Low converters	36	1.74	0.86	33.2	59.8	28.5	40.2
非转化株 Non-converters	35	2.48	0.11	4.4	8.6	0.0	91.4

### 3 结论与讨论

由于转化株的烟碱转化主要发生在烟叶的调制期,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,乙烯利处理可以有效激活转化株的烟碱去甲基酶活性,使烟碱转化达到基因型所规定的程度。对同一个转化株而言,乙烯利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。

对转化株的鉴定从苗期到开花前都可以进行,苗期鉴定的好处在于可以提前在移栽前将转化株去除,避免其进入大田,但由于苗期鉴定叶片小,样品量少,加大了分析测定的难度,因而以移栽后 4~6 周取样测定为好,便于大批量处理和检测。不同部位叶片都可用于早期诱导和鉴定,但下部叶由于发育程度较高,诱导时间短,便于操作。

目前,我国栽培上应用的白肋烟品种主要有 2

期鉴定,严格选用非转化株进行种子生产,对降低后代群体烟碱转化株比例,降低烟叶烟碱转化率是十分有效的。

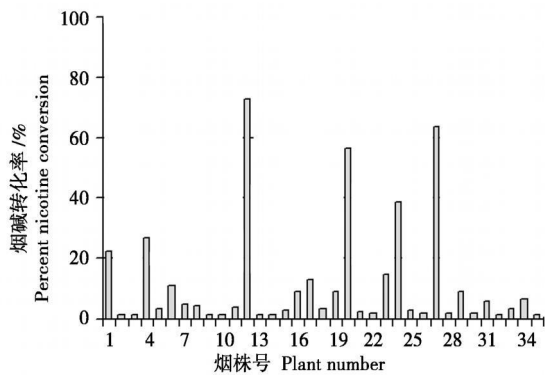


图 4 白肋烟 TN90 早期诱导后不同烟株的烟碱转化率

Fig. 4 Percent nicotine conversion of TN90 plants after early induction

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,因此对其进行改良是当务之急。对于杂交种的改良,主要是对亲本材料进行转化株的早期鉴定,并严格选择非转化株进行杂交制种;对于常规品种的改良,主要是在早期鉴定的基础上去除转化株,留取非转化株进行种子生产。本试验表明,乙烯利处理进行转化株的早期鉴定对品种的改良效果非常明显,非转化株的自交后代群体中,非转化株的比例达到 91.4%,而未改良的品种群体非转化株的比例仅为 60%。由于在非转化株的自交后代中仍会出现少量的低转化株,这些转化株会在以后的世代中积累扩散,因此,转化株的鉴别和品种的改良应成为一项经常性的工作。

#### 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 H Z, Fannin F F, Buton H R, et al. Factors affecting

- nicotine to normicotine conversion in burley tobacco [C] // 54<sup>th</sup> TSRC, Nashville, USA, 2000.
- [ 3 ] Bush L P, Cui M W, Shi H Z, *et al.* Formation of tobacco-specific nitrosamines in air-cured tobacco [ J ]. Recent Advances in Tobacco Science, 2001, 55: 23– 46.
- [ 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 ( 1 ): 8– 13.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] Shi H Z, Krauss M, Bokelman G, *et al.* TSNA and precursors in tobacco with different degree of conversion [ C ] // 225<sup>th</sup> Conference of American Chemistry Association. New Orleans, USA, 2003.
- [ 7 ] 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 ( 2 ): 9– 14.
- [ 8 ] Bush L P, Zhan Y, Yang H, *et al.* Time of normicotine formation in burley tobacco [ C ] // CORESTA. Suzhou, China, 1999.
- [ 9 ] 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 ( 4 ): 28– 31.
- [ 10 ] Shi H Z, Fannin F F, Burton H R, *et al.* Identification of nicotine to normicotine converters in burley tobacco [ C ] // 55<sup>th</sup> Tobacco Science Research Conference, Greensboro. NC, USA, 2001.
- [ 11 ] Shi H Z, Hempfling W P, Kalengamaliro N. Stimulation of nicotine to normicotine conversion by treatment of tobacco with sodium bicarbonate [ C ] // CORESTA. New Orleans, LA, USA, 2002.
- [ 12 ] Shi H Z, Kalengamaliro N, Krauss M, *et al.* Stimulation of nicotine demethylation by NaHCO<sub>3</sub> treatment using greenhouse-grown burley tobacco [ J ]. J Agric Food Chem, 2003, 51 ( 26 ): 7679– 7683.
- [ 13 ] Shi H Z, Krauss M, Gadani F. Ethylene formation in tobacco plants treated with sodium bicarbonate [ C ] // CORESTA. Bucharest, Romania, 2003.
- [ 14 ] 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 ]. V J Agric Food Chem, 1989, 37: 1372– 1377.