شرکت دخانیات ایران

معاونت برنامه ریزی و تحقیق و توسعه
مدیریت تحقیقاتی

نقش مدیریت زراعی بر مقدار نیکوتین برگ توتون

تهیه‌کننده:

دکتر رحمت‌اله رنجبر

اسفند ماه ۱۳۹۹

بسم الله الرحمن الرحيم

پیش‌گفتار

گیاه توتون آلکالوئیدهایی از جمله نیکوتین را سنتز می‌کند که از لحاظ تجاری اهمیت زیادی دارند. در سال‌های اخیر، صنعت دخانیات تغییرات گسترده‌ای را در زمینه تولید محصولات مدرن از جمله سیگارت الکترونیکی و سیگارت حرارتی- بدون اشتعال یا ویپ تجربه کرده است که همه این محصولات دخانی همانند محصولات دخانی قابل اشتعال، مقدار نیکوتین مورد نیاز فرد سیگاری را تامین می‌کنند ولی اهمیت کیفیت برگ توتون در تولید سیگارت معمولی و ویپ بیشتر است. با توجه به تولید محصولات متنوع دخانی، لازم است پارامترهای کیفی برگ توتون از جمله نیکوتین آن، با نیاز هر کدام از محصولات دخانی مطابقت داشته باشد. از طرف دیگر، صنعت دخانیات در سراسر دنیا با چالش‌های مقررات بهداشتی روبرو است. در سال‌های اخیر، این مقررات بیشتر به کاهش محتوای نیکوتین در محصولات دخانی تاکید دارند. از راه‌های دستیابی به محصولات دخانی کم‌نیکوتین می‌توان به کاشت واریته‌های کم نیکوتین توتون و تغییر روش‌های زراعی معمول اشاره نمود که سبب تولید توتون پرکننده (فیلر) در مزرعه می‌شوند.

در کشور ما، غلظت نیکوتین در برگ توتون گرمخانه‌ای کمتر از حد استاندارد است که لازم است این مشکل حل شود. خوشبختانه بسیاری از عملیات زراعی از جمله عملیات مناسب کشت و کار، مصرف کودها، تراکم مناسب بوته، گل‌زنی، کنترل جوانه‌های جانبی و برداشت به موقع برگ که عملکرد گیاه را بهبود می‌بخشند، سبب افزایش نیکوتین برگ نیز می‌شوند.

این کتاب در دو فصل تهیه شده است که در فصل اول، راهکارهای زراعی جهت تغییر غلظت نیکوتین برگ توتون ارائه شده است و در فصل دوم، بیوسنتز نیکوتین در ریشه و انتقال آن به برگ شرح داده شده است همچنین در این فصل، مطالبی در مورد سرنوشت نیکوتین در حین سوختن سیگارت ارائه شده است تا مطالب این فصل نیز برای خواننده جذاب‌تر شود. امیدوار است مطالب این کتاب مورد عنایت محققان و کارشناسان کشاورزی قرار گیرد تا با کمک از مطالب جدید و ارزنده این کتاب، علل کمی مقدار نیکوتین را در برگ توتون گرمخانه‌ای بررسی نموده و راهکارهایی را جهت رفع مشکل ارائه دهند. با اطمینان می‌توان گفت که با مدیریت تغذیه گیاه، گل‌زنی بوته توتون گرمخانه‌ای در زمان مناسب و حفظ تعداد مناسب برگ روی بوته و غیره می‌توان به غلظت مورد دلخواه نیکوتین در برگ، دست یافت. در پایان از جناب آقای دکتر شامل‌رستمی مدیر محترم امور تحقیقاتی شرکت به خاطر راهنمایی‌ها و رغبت ایشان در تهیه و چاپ این کتاب، سپاسگزاری می‌نمایم. مولف پذیرای راهنمایی‌های ارزنده خوانندگان محترم در اصلاح و تکمیل مطالب کتاب حاضر می‌باشد.

دکتر رحمت‌اله رنجبر
کارشناس آب و خاک اداره امور تحقیقاتی
اسفند ماه سال ۱۳۹۹

فهرست مطـالب

عنوان	صفحه
۱-۱- مقدمه	۱
۱-۲-عوامل موثر بر غلظت نیکوتین برگ توتون	۴
۱-۲-۱-تاثیر انتخاب واریته و ژنتیک گیاهی	۴
۱-۲-۲- تاثیر کوددهی مزرعه	۷
الف- کود نیتروژنی	۷
۱-۲-۲-۱- تاثیر شکل جذبی نیتروژنِ کود بر غلظت نیکوتین برگ	۸
۱-۲-۲-۲- تاثیر مقدار کود نیتروژنی بر غلظت نیکوتین برگ	۹
۱-۲-۲-۳- تاثیر نحوه مصرف کود نیتروژنی بر غلظت نیکوتین برگ	۱۳
۱-۲-۲-۴- تاثیر زمان مصرف کود نیتروژنی بر غلظت نیکوتین برگ	۱۳
ب- سایر عناصر غذایی	۱۵
۱-۲-۳- تاثیر تراکم بوته در مزرعه بر غلظت نیکوتین برگ	۱۵
۱-۲-۴- تاثیر عملیات گل‌زنی بوته بر غلظت نیکوتین برگ	۱۶
۱-تاثیر زمان گل‌زنی	۱۹
۲-تاثیر تعداد برگ روی بوته	۱۹
۱-۲-۵- تاثر کنترل جوانه‌های جانبی بر غلظت نیکوتین برگ	۲۱
۱-۲-۶-تاثیر رسیدگی برگ و برداشت آن بر غلظت نیکوتین برگ	۲۳
۱-۲-۶- تاثیر آبیاری بر غلظت نیکوتین برگ	۲۶
منابع فصل اول	۲۹
۲-۱- مقدمه	۳۳
۲-۲- ترکیبات نیتروژن‌دار برگ توتون	۳۴
۲-۳-آلکالوئیدها	۳۷
۲-۴-سنتز نیکوتین	۴۰
الف) تشکیل حلقه پیریدین	۴۱
ب)- تشکیل حلقه پیرولیدین	۴۶
ج)- تشکیل نیکوتین	۵۰
۲-۵- عوامل موثر بر مراحل تنظیمی سنتز نیکوتین	۵۱
۲-۵-۱-میزان فراهم بودن پوترِسین	۵۱

بقیه فهرست مطـالب

عنوان	صفحه
۲–۵–۲– میزان فراهم بودن اس–آدنوزیل متیونین (SAM)	۵۲
۲–۵–۳– میزان فعالیت آنزیم پوترِسین ان–متیل ترانسفراز (PMT)	۵۳
۲–۵–۴–فعالیت آنزیم کینولینیک اسید فسفوریبوزیل ترانسفراز (QPT)	۵۳
۲–۵–۵–میزان فعالیت آنزیم اِن– متیل پوترِسین اکسیداز (MPO)	۵۴
۲–۶– سنتز سایر آکالوئیدها	۵۵
۲–۷– تاثیر ژنتیک گیاهی بر سنتز نیکوتین	۵۷
۲–۸– انتقال نیکوتین از محل بیوسنتز (ریشه) به بخش هوایی گیاه توتون	۶۰
۲–۹–توزیع آلکالوئیدها در اندام‌های مختلف گیاه	۶۳
۲–۱۰–سیگارت و اجزای دود آن	۶۵
۲–۱۰–۱– دود کردن سیگارت در ماشین دود	۶۵
۲–۱۰–۲– بخش‌های مختلف سیگارت روشن	۶۷
۲–۱۰–۳– جریان‌های دود سیگارت	۷۰
۲–۱۰–۴– نحوه تشکیل جریان اصلی دود	۷۰
الف– انتقال محصولات فرآیند تقطیر به دود	۷۱
ب– انتقال محصولات فرآیند پیرولیز به دود	۷۲
۲–۱۰–۵– فرآیندهای بخش توتون‌خور سیگارت (حین پک زدن سیگارت)	۷۳
۲–۱۱–سرنوشت نیکوتین در جریان اصلی دود	۷۴
۲–۱۲–اثرات بیولوژیکی نیکوتین و pH دود توتون	۷۷
۲–۱۳–کربوهیدرات‌ها و pH دود	۸۰
منابع فصل دوم	۸۲

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۲–۱–میزان تغییر ترکیبات نیتروژنی در طی عمل‌آوری توتون هواخشک...	۳۶
جدول ۲–۲ – برخی از آلکالوئیدهای موجود در برگ توتون	۳۹

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱–۱– تاثیر مقادیر مختلف کود نیتروژنی بر غلظت آلکالوئیدها و عملکرد توتون	۱۱
شکل ۱–۲– تاثیر مقادیر مختلف کود نیتروژنی بر غلظت نیکوتین برگ توتون ...	۱۲
شکل ۱–۳– مقایسه سیستم ریشه‌ای در بوته‌های بدون گل‌زنی (الف) و بوته‌های...	۱۸
شکل ۱–۴– تاثیر تراکم بوته و تعداد برگ روی بوته بر میانگین غلظت آلکالوئید توتون	۲۰
شکل ۱–۵– تغییر غلظت نیکوتین در برگ‌های مختلف توتون بعد از گل‌زنی بوته	۲۴
شکل ۱–۶– میانگین غلظت نیکوتین توتون گرمخانه‌ای بر اساس تعداد چین	۲۶
شکل ۱–۷– میانگین غلظت نیکوتین توتون گرمخانه‌ای تحت سطوح مختلف رطوبت	۲۸
شکل ۲–۱– درصد وزنی ترکیبات نیتروژن‌دار و کربوهیدرات‌ها در برگ توتون سیگارت...	۳۵
شکل ۲–۲ – آلکالوئیدهای توتون	۴۰
شکل ۲–۳– سنتز نیکوتین در سلول پوست ریشه توتون	۴۵
شکل ۲–۴– شماتیک چرخه پیریدین نوکلئوتید	۴۶
شکل ۲–۵– نقش پوترِسین در مسیرهای متابولیکی توتون	۵۲
شکل ۲–۶– مسیر بیوسنتز آلکالوئید در توتون	۵۶
شکل ۲–۷– انتقال نیکوتین از واکوئل سلول پوست ریشه به واکوئل سلول اپیدرمی...	۶۱
شکل ۲–۸– توزیع نیکوتین در برگ عمل‌آوری شده	۶۵
شکل ۲–۹ – سیگارت روشن	۶۹
شکل ۲–۱۰– رابطه بین گونه‌های مختلف شیمیایی نیکوتین و pH دود	۷۸
شکل ۲–۱۱– pH دود سیگارت (پک‌های تجمعی)	۸۰
شکل ۲–۱۲– پیک تولید گرمایی اسید فرمیک در دمای مختلف پیرولیز در توتون بارلی...	۸۱

فصل اول

تاثیر عملیات زراعی بر غلظت نیکوتین برگ توتون

۱-۱-مقدمه

گیاه توتون هزاران ترکیب شیمیایی مختلف را سنتز می‌کند که برخی از آنها از جمله آلکالوئیدها و بخصوص نیکوتین از لحاظ تجاری اهمیت زیادی دارند (Bush, 2001). غلظت نیکوتین در برگ توتون با توجه به عوامل زراعی، محیطی و واریته‌ای بین ۰/۵ تا ۸ درصد می‌باشد (Leffingwell, 2001). برای مثال در برگ توتون گرمخانه‌ای، غلظت نیکوتین ۱/۵ تا ۳/۵ درصد می‌باشد (Collins and Hawks, 1993).

ابتدا نیکوتین در ریشه سنتز شده و سپس به برگ‌ها منتقل می‌گردد که در فصل دوم کتاب، به طور مفصل شرح داده شده است (Zenkner et al., 2019). بیشترین مقدار سنتز نیکوتین در اواخر فصل زراعی یعنی بعد از انجام عملیات گل‌زنی بوته، صورت می‌گیرد. عوامل مختلفی ممکن است فرآیند سنتز نیکوتین و در نتیجه غلظت نهایی نیکوتین برگ را تحت تاثیر قرار دهند برای مثال عملیات کشت و کار، مصرف کودها، تراکم بوته، گل‌زنی، کنترل جوانه‌های جانبی و برداشت برگ همگی بر رشد گیاه توتون و سنتز و تجمع نیکوتین در برگ آن تاثیر دارند. بنابراین، تعیین این که کدام عملیات زراعی ضمن حفظ عملکرد و کیفیت توتون، سبب می‌شود غلظت نیکوتین برگ به حد مورد دلخواه تغییر یابد؛ جالب خواهد بود (Henry et al., 2019; Bush, 2001).

در سال‌های اخیر، صنعت دخانیات تغییرات گسترده‌ای را تجربه کرده است که بخشی از این تغییرات در زمینه ایجاد و پیشرفت سیستم‌های عرضه الکترونیکی نیکوتین[۱] (ENDS) از جمله سیگارت الکترونیکی بوده است. اگر چه عمده برگ توتون تولید شده در جهان در جهت ساخت محصولات

۱- electronic nicotine delivery systems (ENDS)

دخانی قابل اشتعال[۱] از جمله سیگارت‌ها، سیگار برگ و تنباکو مصرف می‌شود و میزان فروش سیگارت معمولی (قابل اشتعال) بالغ بر ۶۰ برابر، بیش‌تر از فروش سیگارت الکترونیکی است ولی باید به این نکته نیز توجه داشت که در سال‌های اخیر، روند فروش یا مصرف سیگارت معمولی کاهشی بوده در حالی که، فروش سیگارت الکترونیکی روز به روز افزایش می‌یابد (Marynak و همکاران، ۲۰۱۷). محصولات دخانی قابل اشتعال و همچنین سیگارت الکترونیکی هر دو مقدار نیکوتین مورد نیاز فرد سیگاری را تامین می‌کنند ولی باید توجه داشت که برای تولید هر کدام از آنها، به توتون‌هایی با خصوصیات متفاوت نیاز می‌باشد. برای مثال، کیفیت سیگارت‌های قابل اشتعال بیشتر به کیفیت برگ توتون و بسیاری از ترکیبات شیمیایی موجود در آن بستگی دارد ولی در سیگارت‌های الکترونیکی، سهم ترکیبات شیمیایی برگ به غیر از نیکوتین ناچیز است که نیکوتین هم از برگ توتون عصاره‌گیری و استخراج شده و سپس در ساخت این محصولات مصرف می‌شود. امروزه علاوه بر سیگارت‌های الکترونیکی، محصولات دخانی با عنوان سیگارت حرارتی- بدون اشتعال (HNB)[۲] یا ویپ تولید می‌شوند. در تولید ویپ نیز برگ توتون به طور مستقیم به کار می‌رود لذا در این سیگارت‌ها بر خلاف سیگارت الکترونیکی، کیفیت برگ توتون اهمیت خود را حفظ می‌کند و برخلاف سیگارت معمولی، توتون در داخل ویپ نمی‌سوزد بلکه حرارت می‌گیرد (Farsalinos et al., 2017).[۳] بنابراین با توجه تولید محصولات متنوع دخانی، ضروری است که پارامترهای کیفی برگ توتون از جمله نیکوتین آن مطابق با نیاز هر کدام از سیستم‌های عرضه نیکوتین باشد.

۱ combustible cigarette

۲ heat-not-burn (HNB) products

۳ - یکی از جدیدترین محصولات دخانی، عرضه محصولی به نام سیگارت IQOS توسط شرکت فیلیپ موریس، سیگارت Ploom TECH توسط شرکت بین‌المللی توتون ژاپن (JTI)، سیگارت Glo توسط شرکت BAT و سیگارت PAX توسط شرکت PAX است که توتون داخل سیگارت با فندک مخصوص (دارای باطری) تا حدود ۳۵۰ درجه سلسیوس حرارت داده می‌شود (در سیگارت

از طرف دیگر، صنعت دخانیات در سراسر دنیا با چالش‌های مقررات بهداشتی روبرو است. در سال‌های اخیر، این مقررات بیشتر به کاهش وابستگی افراد به نیکوتین تاکید دارند که برای کاهش آن لازم شده است محتوای نیکوتین در محصولات دخانی کاهش یابد (Ashley and Backinger, 2012; Benowitz and Henningfield, 2013; Lewis, 2018). در واقع، سازمان بهداشت جهانی تولید سیگارت‌هایی با مقدار نیکوتین بسیار کم را (۰/۴ میلی‌گرم بر گرم) پیشنهاد داده است (World Health Organization, 2015).

یکی از راه‌های دستیابی به محصولات دخانی کم‌نیکوتین، اصلاح خرمن می‌باشد. برای مثال با استفاده از توتون پرکننده و کم نیکوتین[۱] در خرمن سیگارت می‌توان غلظت نیکوتین را در آن کاهش داد (Fisher, 1999). روش دیگر طراحی سیگارت‌هایی است که مقدار عرضه نیکوتین در آنها کمتر باشد که این کار را می‌توان با افزایش تهویه سیگارت و سوزش سریع آن انجام داد با این حال، این روش ضرورتا نمی‌تواند تاثیر مورد نظر را داشته باشد چون مصرف‌کنندگان سیگارت ممکن است عرضه پایین نیکوتین این سیگارت‌ها را با کشیدن تعداد زیادی از آنها، جبران کنند (Benowitz and Henningfield, 2013). راهکار سوم تولید توتون پرکننده یا فیلر در مزرعه است که به طور طبیعی نیکوتین کمتری دارد. تولید توتون کم‌نیکوتین مستلزم کشت واریته‌های کم نیکوتین توتون و تغییر روش‌های زراعی معمول است تا علاوه بر حفظ عملکرد و کیفیت برگ توتون، نیکوتین آن را نیز کاهش دهند. عملیات زراعی تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر سنتز و تجمع نیکوتین در برگ توتون

معمولی، دما موقع اشتعال به ۶۰۰ تا ۹۰۰ درجه سلسیوس می‌رسد) و برگ توتون داخل آن مشتعل نمی‌شود و نیکوتین و سایر اجزای دود به صورت ائروسول از آن خارج می‌گردد لذا با واژه "Heat Not Burn" وصف می‌شود و به آن ویپ نیز گویند. ویپ حس و طعمی شبیه سیگارت معمولی را دارد از این رو در مقایسه با سیگارت الکترونیکی، محصول مناسبی برای افراد سیگاری محسوب می‌گردد و مضرات کمتری در مقایسه با سیگارت معمولی دارد.

۱ Lower nicotine filler

گرمخانه‌ای دارند ولی نکته قابل ذکر این است که بسیاری از عملیات زراعی که سلامت و عملکرد گیاه را بهبود می‌بخشند سبب افزایش تولید و تجمع نیکوتین در برگ توتون نیز می‌شوند. این نکته، انجام عملیات زراعی را که سبب افزایش عملکرد توتون و کاهش همزمان غلظت نیکوتین برگ شود، سخت می‌کند ولی اگر هدف، افزایش نیکوتین برگ باشد یک مزیت محسوب می‌گردد و این موضوع برای افزایش میزان نیکوتین در برگ توتون گرمخانه‌ای کشور ما، خوشحال کننده است. در تغییر نیکوتین برگ توتون در مزرعه باید به این نکته نیز توجه داشت که قندهای احیاء در توتون گرمخانه‌ای به طور تیپیک حدود ۲۲ درصد می‌باشد که مقادیر بسیار بالا و پایین‌تر از آن سبب کاهش کیفیت توتون خواهد شد. همچنین نسبت مناسب قند به نیکوتین در برگ عمل‌آوری شده نیز بسیار مهم می‌باشد (Tso, 1999) بنابراین زمانی که تغییر غلظت نیکوتین در برگ مدنظر باشد لازم است به نسبت قند به نیکوتین آن نیز توجه شود تا کیفیت برگ حفظ شود. برای بررسی امکان تغییر مقدار نیکوتین برگ توتون در مزرعه لازم است یک مروری از عملیات زراعی موثر بر غلظت نیکوتین برگ توتون انجام گیرد. با خلاصه چنین اطلاعات، تا حدی می‌توان به غلظت دلخواه نیکوتین در برگ توتون دست یافت.

۱-۲-عوامل موثر بر غلظت نیکوتین برگ توتون

۱-۲-۱-تاثیر انتخاب واریته و ژنتیک گیاهی

استفاده از واریته‌های کم‌نیکوتین توتون مهمترین تصمیم زراعی در جهت کاهش غلظت نیکوتین در برگ توتون است. ژنتیک گیاهی تاثیر عمده روی تجمع نیکوتین داشته و حتی اثر عملیات مختلف زراعی بر غلظت نیکوتین برگ نیز تحت تاثیر ژنتیک گیاهی قرار می‌گیرد. به طور طبیعی، تنوع

ژنتیکی قابل‌ملاحظه‌ای در بین ارقام مختلف ژنتیکی توتون برای انباشت آلکالوئیدها وجود دارد و میزان آلکالوئید در آنها بین ۰/۰۲ تا ۶/۵۵ درصد وزن خشک می‌باشد (Sisson and Saunders, 1982). طبق نظر Lewis (۲۰۱۸)، میانگین نیکوتین در برگ واریته‌های جدید توتون گرمخانه‌ای کمتر و در حدود ۱/۷ تا ۳/۴ درصد است در حالی که در واریته‌های قبلی بیش از این ارقام بوده است که دامنه زیاد تغییر غلظت نیکوتین برگ بیشتر به دلیل تغییر شرایط محیطی است. در کشور ما، توتون گرمخانه‌ای رقم PVH19 در استان گیلان و رقم K326 عمدتا در استان‌های مازندران و گلستان کشت می‌شوند. در سال ۲۰۰۷، Nicolova در کشور بلغارستان جهت معرفی رقم PVH19 نشان داد که میزان نیکوتین این رقم در ایالت‌های استارا زاگورا، یامبول، پاروومای و پازاردجیک به ترتیب ۱/۱۶، ۲/۴۳، ۱/۱۷ و ۱/۳۵ بوده است و خصوصیات شیمیایی آن تنها در منطقه یامبول به خصوصیات شیمیایی تیپیک توتون گرمخانه‌ای نزدیک است چون در این ایالت، نیکوتین برگ ۲/۴ درصد، نسبت نیتروژن به نیکوتین پایین (۰/۹۳) و نسبت قند احیاء به نیکوتین نسبتا پایین (۶/۴۶) است. این مطالعه نشان داد خصوصیات شیمیایی برگ از جمله مقدار نیکوتین آن در یک رقم معین توتون، در مناطق مختلف رشد آن متفاوت هست و برای انتخاب ارقام در یک منطقه، لازم است علاوه بر عملکرد و کیفیت ظاهری برگ، خصوصیات شیمیایی برگ توتون نیز لحاظ گردد.

فرآیند ثبت واریته گیاهی در ایالات متحده که از سال ۱۹۶۴ رواج دارد، مستلزم این است که مقدار نیکوتین واریته‌های تجاری مورد نظر توتون در محدوده معینی باشد که آن محدوده با استفاده از واریته‌های شاهد و مورد پذیرش صنعت دیکته و اعمال شده است (Bowman, 1996) و این باعث شده که از بین واریته‌های توتون گرمخانه‌ای، فقط چندین واریته توتون در کارولینای شمالی کشت و تولید شود به طوری که در سال ۲۰۱۸، هفت واریته توتون گرمخانه‌ای کشت گردید که حدود ۸۷

درصد تولید توتون گرمخانه‌ای این ایالت را به خودشان اختصاص دادند و واریته بسیار معروف NC196 حدود ۵۰ درصد از سطح کشت توتون گرمخانه‌ای را در این ایالت به خود اختصاص داد (Fisher, 2019).

هر چند غلظت نیکوتین در برگ توتون تا حدی تحت تاثیر محیط قرار می‌گیرد ولی غلظت آن توسط تعدادی ژن کنترل می‌گردد. چندین مکان کرموزومی بسیار موثر (اثر-بزرگ[۱]) شناسایی شده است که ممکن است برای کاهش مقدار نیکوتین در توتون به کار روند. در یک تحقیق، آلل‌های مغلوب در مکان‌های کرموزومی NIC1 و NIC2 (که با A و B نیز مشخص می‌شوند) از توتون سیگار برگ به توتون گرمخانه‌ای منتقل شد که در نتیجه آن، مقدار نیکوتین برگ حدود ۰/۲ تا ۰/۴ درصد کاهش یافت (Lewis, 2018; Lewis et al., 2015). البته این تغییرپذیری سبب کاهش عملکرد و کیفیت برگ توتون گردید لذا این رقم در حال حاضر به طور تجاری کشت نمی‌شود.

دومین مکانیسم ژنتیکی که به طور طبیعی وجود دارد و از آن می‌توان برای کاهش مقدار نیکوتین برگ توتون استفاده کرد، رمزگذاری ژن‌ها برای فعال‌سازی آنزیم‌های نیکوتین دمتیلاز می‌باشد که با فعال شدن آنها، غلظت نیکوتین برگ به کمتر از ۰/۸ درصد کاهش می‌یابد با این حال، چنین واریته‌هایی به دلیل داشتن غلظت بالای نورنیکوتین غیرقابل قبول تلقی می‌شوند چون نورنیکوتین به عنوان پیش‌ماده لازم برای تشکیل یک ماده سرطان‌زا به نام ان- نیتروزو نورنیکوتین[۲] می‌باشد.

همچنین برای ایجاد تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی جدید به منظور کاهش غلظت نیکوتین برگ توتون می‌توان از اصلاح نباتات موتاسیونی یا جهشی[۳] ویرایش ژن و مهندسی ژنتیک استفاده نمود.

۱- large-effect loci

۲- N'-nitrosonornicotine

۳- Mutation breeding

مجموعه‌ای از ژن‌های دخیل در بیوسنتز نیکوتین شناسایی شده‌اند (Dewey and Xie, 2013) و با روش‌های کاهش یا متوقف کردن بیان این ژن‌ها، غلظت نیکوتین در برگ توتون کاهش پیدا می‌کند (Lewis, 2018). به عنوان مثال، تحقیقات نشان داده است که از طریق اصلاح نباتات موتاسیونی یا مهندسی ژنتیک می‌توان ژن خانواده BBL را غیرفعال نمود (به فصل دوم مراجعه شود) و غلظت نیکوتین برگ توتون را حدود ۰/۴ درصد کاهش داد (Lewis et al., 2015). با این حال، مقرراتی که در سراسر دنیا در زمینه ویرایش ژن و یا مهندسی ژنتیک وجود دارد تولید تجاری واریته‌های گیاهی از طریق ویرایش ژن و یا مهندسی ژنتیک را با چاش روبرو ساخته است.

علاوه بر واریته، برخی از عوامل بسیار مهم زراعی که غلظت نیکوتین برگ را تحت تاثیر قرار می‌دهند شامل مقدار و نحوه مصرف کود نیتروژنی، تراکم بوته، عملیات گل‌زنی، کنترل جوانه‌های جانبی و عملیات برداشت برگ توتون می‌باشند که به ترتیب اهمیت شرح داده می‌شوند.

۱-۲-۲- تاثیر کوددهی مزرعه

الف- کود نیتروژنی

تغذیه معدنی توتون علاوه بر تاثیر بر رشد گیاه، در سنتز نیکوتین هم موثر است و نیتروژن در مقایسه با سایر عناصر غذایی اهمیت زیادی در سنتز نیکوتین دارد (Collins and Hawks, 1993). مولفه‌های کوددهی شامل شکل جذبی عنصر در کود، مقدار، زمان و نحوه مصرف کود هستند (Tso, 1999). حالت‌های مختلف کود (پودری، گرانوله، مایع، گاز، پوشش‌دار، درجه حلالیت و ...) ممکن است بر مقدار، نحوه و زمان مصرف یک کود شیمیایی تاثیر بگذارد.

۱-۲-۲-۱- تاثیر شکل جذبی نیتروژنِ کود بر غلظت نیکوتین برگ

نیتروژن عمدتا به صورت یون نیترات (NO_3^-) و یون آمونیوم (NH_4^+) توسط ریشه گیاهان عالی جذب می‌شود (Marschner، ۱۹۹۵). کودهای نیتروژنی ممکن است شامل یکی یا هر دو شکل جذبی نیتروژن (نیتروژن-نیتراتی و نیتروژن- آمونیومی) باشند و حتی ممکن است برخی از آنها مانند اوره و آمونیاک خالص هیچ کدام از شکل‌های جذبی نیتروژن را نداشته باشند و پس از مصرف در خاک، به یون آمونیوم و سپس به نیترات تبدیل شوند.

امکان استفاده از انواع کود نیتروژنی در مزارع توتون از لحاظ شکل نیتروژن (نیتروژن نیتراتی یا نیتروژن آمونیومی و اوره) و نسبت مناسب آنها در کود بیشتر بحث شده است. در زراعت توتون بهتر است ۳۰ تا ۵۰ درصد نیتروژن کود به شکل نیتروژن نیتراتی باشد (Fisher, 2019) و از این لحاظ، نیتراتآمونیوم با داشتن نسبت مساوی نیتروژن-نیتراتی و نیتروژن-آمونیومی، منبع اصلی کود نیتروژنی در مزارع توتون می‌باشد چون نیتروژن مورد نیاز گیاه را در طی فصل رشد فراهم می‌کند و در طی زمان رشد گیاه، مقدار نیتروژن قابل جذبی که در خاک رها می‌سازد با الگوی جذب نیتروژن توسط گیاه مطابقت دارد. با این حال، تولید این کود در دنیا به لحاظ امنیتی متوقف یا محدود شده است و به جای آن می‌توان از برخی کودهای نیتروژنی مانند اوره استفاده کرد (Pearce و همکاران، ۲۰۰۶). اوره قبل از جذب، ابتدا توسط آنزیم‌ها و میکروارگانیسم‌ها به آمونیوم و سپس به نیترات تبدیل می‌شود و به طور کلی ۳ هفته بعد از مصرف اوره، ۵۰ درصد نیتروژن آن به نیترات تبدیل می‌شود که ۶ هفته پس از مصرف، این رقم به ۷۵ درصد می‌رسد. لذا تبدیل اوره به نیترات ممکن است جذب نیتروژن گیاه و رسیدگی برگ‌های توتون را به تاخیر اندازد لذا معمولا مصرف سرک این کود در فصل رشد توتون گرمخانه‌ای توصیه نمی‌شود (Pearce و همکاران، ۲۰۰۶). در سال ۲۰۰۹

Parker با بررسی کودهای نیترات کلسیم گرانوله، نیترات آمونیوم گرانوله و نیترات-آمونیم اوره مایع نشان داد که نوع منبع نیتروژن تاثیری بر عملکرد، شاخص سطح برگ توتون، قیمت برگ توتون، میزان کل آلکالوئیدها، کل قند احیاء و رنگ برگ توتون و شیمی برگ توتون عمل‌آوری شده ندارند.

با بررسی‌هایی که سال ۱۳۹۷ در مراکز تحقیقات توتون ایران انجام گرفت نشان داد که در مزارع توتون می‌توان از کود اوره به جای نیترات‌آمونیم استفاده نمود به شرطی که اوره به صورت سرک مصرف نشود و یا این که مقدار مصرف سرک آن با در نظر گرفتن مقدار آبشویی نیتروژن در خاک، کاهش یابد.

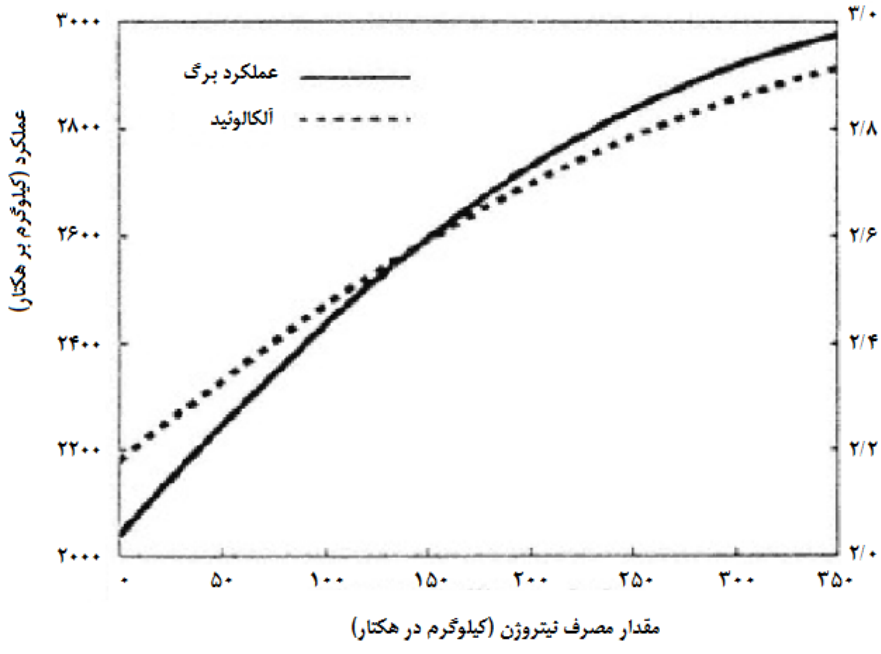
در تناسب شکل نیتروژن و نسبت اشکال مختلف آن در یک کود باید به شرایط محیطی بخصوص میزان بارندگی نیز توجه داشت (Fisher, 2019). در فصل کشت پرباران توتون، مصرف شکل آمونیومی نیتروژن بازدهی یا راندمان بالایی دارد چون آبشویی آن در خاک در مقایسه با یون نیترات، کمتر است (Henry et al., 2019). بر عکس، مصرف کودهای حاوی نیتروژن نیتراتی در فصل خشک راندمان بالایی دارند (Flower, 1999).

۱-۲-۲-۲- تاثیر مقدار کود نیتروژنی بر غلظت نیکوتین برگ

مقدار نیتروژن قابل دسترس خاک و عوامل موثر بر جذب آن توسط گیاه، تاثیر بسیار زیادی بر غلظت نیکوتین برگ توتون دارد چون نیتروژن یکی از اجزای اصلی مولکول نیکوتین می‌باشد و میزان جذب نیتروژن توسط گیاه با غلظت نیکوتین برگ همبستگی مثبت و با غلظت قند و نشاسته آن همبستگی منفی دارد (Flower, 1999).

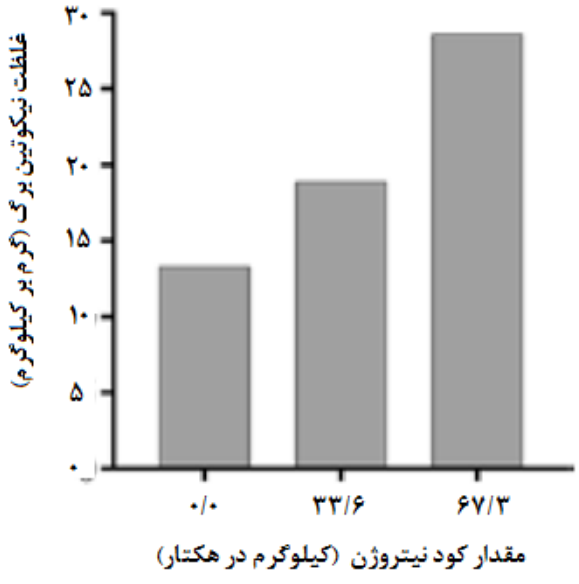
همچنین، مصرف کود نیتروژنی نیز تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر مقدار نیکوتین برگ دارد. مصرف کود نیتروژن علاوه بر این که سبب افزایش رشد گیاه می‌شود غلظت نیکوتین و مقدار کل نیکوتین را در برگ‌ها افزایش می‌دهد (Henry et al., 2019). در واقع طبق شکل ۱-۱ و شکل ۱-۲، مصرف کود نیتروژنی عموما سبب افزایش مقدار آلکالوئیدها و نیکوتین در برگ می‌شود (Tso, 1990). قلیزاده و همکاران (۱۳۹۱) در تعیین حد بحرانی نیتروژن برای توتون رقم K326 نشان دادند که میانگین غلظت نیکوتین در برگ توتون در شاهد (بدون مصرف کود نیتروژن) ۰/۴ درصد بود که با مصرف تنها ۳۴/۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، میانگین غلظت آن به طور چشمگیر به ۱/۱ درصد افزایش یافت.

الگوی تجمع نیتروژن و نیکوتین در گیاه مشابه می‌باشند (Miner, 1980) و با توجه به این که در مزارع توتون گرمخانه‌ای، مقدار کمتری کود نیتروژنی مصرف می‌گردد لذا بین نیتروژن برگ و غلظت نیکوتین همواره همبستگی مثبتی وجود دارد ولی در مزارع توتون بارلی که مقدار بیشتری کود نیتروژنی مصرف می‌گردد ممکن است ارتباطی بین نیتروژن بافت گیاه و مقدار کل آلکالوئیدها در آن برقرار نباشد (Bush, 2001).



شکل ۱-۱- تاثیر مقادیر مختلف کود نیتروژنی بر غلظت آلکالوئیدها و عملکرد توتون
(Bush, 2001)

گاهی علی‌رغم این که برخی عوامل مانند کود نیتروژنی سبب بیوسنتز زیاد نیکوتین در گیاه می‌شود با این حال، غلظت نیکوتین در برگ به دلیل افزایش زیاد ماده خشک گیاهی ممکن است تحت تاثیر قرار نگیرد.



شکل ۱-۲- تاثیر مقادیر مختلف کود نیتروژنی بر غلظت نیکوتین برگ توتون گرمخانه‌ای
(منبع: Collins and Hawks, 1993)

هر گاه کود نیتروژنی به مقدار کمتر از نیاز واقعی گیاه توصیه و مصرف شود و یا نیتروژن خاک در اثر آبیاری و یا بارندگی بیش از حد، آبشویی گردد، غلظت نیکوتین در برگ توتون کاهش خواهد یافت و بر عکس، غلظت نیکوتین برگ در شرایط مصرف بیش از حد کود نیتروژنی و شرایط خشکی، افزایش می‌یابد (Flower, 1999). باید توجه داشت که مصرف زیاد کود نیتروژنی می‌تواند رسیدگی برگ را به تاخیر انداخته و کیفیت برگ عمل‌آوری شده توتون را کاهش دهد (Tso, 1999).

مقدار کود نیتروژنی توصیه شده برای مزارع توتون به شرایط اقلیمی و خاک، مقدار ماده آلی خاک، سرعت معدنی شدن مواد آلی یا نیتروژن آلی خاک، عملکرد مورد انتظار، رقم توتون و غیره بستگی دارد به طوری که برای تولید توتون گرمخانه‌ای K326، مقدار نیتروژن خالص توصیه شده در استان

مازندران و گلستان ۳۴ کیلوگرم در هکتار بوده در حالی که برای ارقام توتون گرمخانه‌ای در آمریکا ۵۰ تا ۹۰ کیلوگرم در هکتار است (Fisher, 2019).

با توجه به این که غلظت نیکوتین در برگ توتون گرمخانه‌ای کشور پایین‌تر از حد استاندارد می‌باشد لذا به نظر می‌رسد در مواقع بارندگی زیاد، مقداری کود نیتروژنی مازاد بر مقدار توصیه شده، مصرف گردد و از آبیاری بیش از حد مزارع توتون جلوگیری شود.

۱-۲-۲-۳- تاثیر نحوه مصرف کود نیتروژنی بر غلظت نیکوتین برگ

نحوه مصرف یا جایگذاری کود و توزیع آن در خاک تاثیر قابل ملاحظه‌ای روی غلظت نیکوتین برگ دارد به طوری که پخش سطحی کود نیتروژنی و سپس مخلوط آن در عمق توسعه ریشه سبب هدررفت نیتروژن می‌شود و درنتیجه راندمان جذب نیتروژن توسط گیاه کم شده و در نتیجه سنتز و غلظت نیکوتین در گیاه کاهش پیدا می‌کند (Henry et al., 2019; Wilkinson et al., 2008). در حالی که در مصرف نواری کود نیتروژنی در کنار بوته و خاک کردن آن، راندمان جذب نیتروژن توسط گیاه زیاد شده و لذا غلظت و مقدار کل نیکوتین برگ افزایش می‌یابد (; Flower, 1999 Henry et al., 2019).

۱-۲-۲-۴- تاثیر زمان مصرف کود نیتروژنی بر غلظت نیکوتین برگ

با مصرف سرک کود نیتروژن و در نتیجه افزایش بازیافت کود می‌توان مقدار مصرف کود نیتروژن را به طور قابل ملاحظه کاهش داد (Pearce و همکاران، ۲۰۰۶) ولی در زراعت توتون بخصوص توتون گرمخانه‌ای، این موضوع متفاوت است به طور کلی جهت تضمین رشد گیاه، نیتروژن خاک در اوایل

و اواسط دوره رشد باید به حدکافی در اختیار گیاه قرار گیرد ولی با شروع مرحله گل‌دهی توتون گرمخانه‌ای، لازم است نیتروژن خاک تخلیه شود تا رسیدگی برگ به طور مناسب صورت گیرد و کیفیت برگ عمل‌آوری شده افزایش یابد (Parker، ۲۰۰۹) در چنین شرایطی، جذب نیتروژن توسط گیاه قبل از این که بیوسنتز آلکالوئید همزمان با گل‌زنی بوته، به اوج خود برسد، تقریبا متوقف می‌شود ولی در توتون بارلی، مقدار آلکالوئیدها همزمان با جذب مداوم نیتروژن از خاک به تدریج افزایش می‌یابند (Bush, 2001).

اگر کمبود نیتروژن در اوایل رشد سریع بوته توتون رخ دهد و سپس کمبود نیتروژن با مصرف مقدار کافی کود نیتروژن برطرف شود، غلظت نیتروژن و قند در بخش هوایی گیاه بهبود خواهد یافت در حالی که غلظت نیکوتین برگ تا حد معمول خود افزایش پیدا نمی‌کند چون بلافاصله پس از شروع کمبود نیتروژن و قبل از این که گیاه علائم کمبود نیتروژن را بروز دهد، سنتز نیکوتین متوقف شده است و برگ‌های در حال توسعه برای مدتی از نیکوتین بهره‌مند نمی‌شوند. ضمن این که در زمان بروز کمبود نیتروژن در گیاه، غلظت نیکوتین در برگ‌های رسیده توتون به ندرت تحت تاثیر این کمبود قرار می‌گیرد (Raper and McCants, 1970; Henry et al., 2019). در سال ۲۰۱۵، Drake و همکاران با مصرف مقدار ۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار به عنوان مقدار توصیه شده در دو نوبت یعنی ۴۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در زمان نشاکاری و ۴۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در زمان ۴ هفته بعد از نشاکاری (قبل از شروع مرحله رشد سریع بوته) نشان دادند که هرگاه مقدار ۲۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار به عنوان نیتروژن مازاد بر مقدار توصیه شده در زمان ۸ هفته بعد از نشاکاری (در زمان گل‌دهی بوته) به صورت سرک مصرف شود، غلظت نیکوتین در برگ توتون به حداکثر می‌رسد (Drake et al., 2015).

ب- سایر عناصر غذایی

پتاسیم سبب ورود ازت معدنی به ساختمان پروتئین می‌شود در یک تحقیق بنیادی، میزان ۳۲ درصد ازت جذب شده توسط توتون در طی ۵ ساعت به ساختمان پروتئین وارد شده در حالی که در گیاهان دچار کمبود پتاسیم تنها ۱۱ درصد آن وارد ترکیب پروتئین‌ها شد لذا ازت معدنی جذب شده توسط گیاه در جهت سنتز پروتئین‌ها پیش می‌رود و این ممکن است میزان تشکیل آلکالوئیدها از جمله نیکوتین را کاهش دهد (Marschner، ۱۹۹۵). مقدار بیش از حد کود پتاسیم، رسیدگی برگ توتون را به تاخیر انداخته (Tso, 1999) و سنتز نیکوتین را کاهش می‌دهد (رنجبر، ۱۳۹۱و Chaplin and Miner, 1980; Vann et al., 2012). فسفر تاثیری در مقدار نیکوتین برگ ندارد (Marschner، ۱۹۹۵) یا در واقع، مصرف کود فسفری تاثیری بر نیکوتین ندارد. مطالعات بر روی بُر، کلسیم، کلر و آهن نشان داده است که این عناصر غذایی بر غلظت نیکوتین برگ تاثیر ندارند با این حال نتایج ضد و نقیض نیز در این مورد وجود دارد برای مثال با مصرف کودهای کلسیم‌دار، مقدار نیکوتین به طور مستقیم تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد ولی مصرف آهک در خاک‌های اسیدی، مقدار آلکالوئیدهای برگ توتون را به طور قابل ملاحظه افزایش می‌دهد چون مصرف آهک به منظور افزایش pH خاک و بهبود شرایط رشد گیاه بخصوص رشد ریشه صورت می‌گیرد و در این کار، تامین کلسیم گیاه مدنظر نیست (Henry et al., 2019).

۱-۲-۳- تاثیر تراکم بوته در مزرعه بر غلظت نیکوتین برگ

به نظر می‌رسد ترکیب شیمیایی توتون تابعی از تراکم گیاه در مزرعه باشد (Tso, 1999). تراکم بوته تاثیر زیادی روی نیکوتین برگ بخصوص برگ‌های میانی و بالای بوته دارد (شکل ۱-۴) که با

افزایش تراکم بوته، مقدار نیکوتین برگ‌های میانی و بالای بوته کاهش می‌یابد (Flower, 1999) در حالی که با کاهش تراکم بوته و ایجاد فضا در اطراف بوته، غلظت نیکوتین افزایش پیدا می‌کند (Miner, 1980). چون تراکم بالای بوته سبب افزایش رقابت بر سر عناصر غذایی خاک از جمله نیتروژن خواهد شد و سرانجام باعث می‌شود سنتز و غلظت نیکوتین در گیاه کاهش یابد.

در مناطق کشت توتون کشور، تراکم بوته توتون گرمخانه‌ای و هواخشک ۲۰۰۰۰ بوته در هکتار تعیین شده است. در حالی که در برخی کشورها از جمله ایالات متحده، عملکرد و کیفیت مطلوب توتون گرمخانه‌ای با تراکم ۱۵ هزار بوته در هکتار حاصل می‌شود و تعداد مطلوب برگ در بوته توتون گرمخانه‌ای، ۲۰ برگ در هر بوته می‌باشد (Collins and Hawks, 1993).

۱-۲-۴- تاثیر عملیات گل‌زنی بوته بر غلظت نیکوتین برگ

گل‌آذین توتون تقریبا ۶۰ روز پس از شروع رشد رویشی بوته در مزرعه ظاهر می‌گردد که به آن گل‌دهی گویند. گل‌دهی گیاه و تولید جوانه‌های جانبی در آن جزو فرآیندهایی هستند که انرژی و سایر منابع گیاه را مصرف می‌کنند. لذا زمانی که گل‌آذین بوته توتون گرمخانه‌ای و هواخشک به مرحله دکمه‌ای شدن می‌رسد بوته توتون با حفظ ۱۸ تا ۲۲ برگ روی آن، گل‌زنی می‌گردد (Flower, 1999). با حذف گل‌آذین، مقدار زیادی از عناصر غذایی و سایر منابع مواد آلی به جای انتقال به گل‌آذین، به برگ‌های باقی مانده روی بوته منتقل می‌شوند (Tso, 1999). تاخیر در گل‌زنی بوته می‌تواند عملکرد برگ را به ازای هر روز تاخیر، ۱۶ تا ۳۰ کیلوگرم در هکتار کاهش دهد. در سال ۱۹۹۴، Stocks و Whitty گزارش دادند زمانی که گل‌زنی بیش از ۳۰ روز به تاخیر بیافتد عملکرد برگ توتون حدود ۳۴ درصد کاهش می‌یابد.

گل‌زنی بوته باعث می‌شود نیکوتین در برگ‌ها بخصوص در برگ‌های وسط و بالای بوته، افزایش یابد (Henry et al., 2019; Flower, 1999) به طوری که موقع برداشت برگ ممکن است غلظت نیکوتین در برگ‌های بالای بوته ۲ تا ۳ برابر بیشتر از برگ‌های پایین بوته باشد (Bush, 2001). برای مثال، مقدار نیکوتین در برگ‌های پایینی، میانی و بالایی بوته گل‌زنی شده توتون گرمخانه‌ای به ترتیب ۱/۸۷، ۲/۶۵ و ۳/۲۶ درصد می‌باشد (Tso, 1999). در واقع این وضعیت توزیع نیتروژن و نیکوتین در برگ‌های گیاه در شرایط معمول تولید توتون که در آن بوته‌ها گل‌زنی می‌شوند، اتفاق می‌افتد (Collins and Hawks, 1993; Tso, 1999) ولی در صورت عدم گل‌زنی صحیح و به موقع بوته‌ها، ممکن است غلظت نیکوتین در کمربرگ بیشتر از لچه برگ‌ها باشد (Henry et al., 2019). فیاض‌زرطلب و باطنی‌منش (۱۳۸۸) نشان دادند که با انجام گل‌زنی و کاهش تعداد برگ روی بوته می‌توان غلظت نیکوتین را در برگ توتون بارلی۲۱ افزایش داد. محسن زاده و همکاران (۱۳۹۰) در توتون هواخشک نشان دادند که غلظت نیکوتین کمربرگ در شاهد (بدون گل‌زنی بوته) ۱/۸۱ درصد بوده در حالی که با انجام گل‌زنی و حفظ ۲۳ برگ در بوته، غلظت نیکوتین کمربرگ به ۳/۲۱ درصد افزایش یافت. سراجی و همکاران (۱۳۸۸) در توتون گرمخانه‌ای گزارش نمودند که گل‌زنی بوته در مرحله دکمه‌ای شدن غنچه‌ها و حفظ ۲۲ برگ روی بوته از نظر عملکرد کمی و کیفی، بهترین تیمار بوده و غلظت نیکوتین کمربرگ در این تیمار ۱/۷ درصد و در تیمار بدون گل‌زنی، ۱/۱ درصد بود ایشان همچنین گزارش دادند که با کاهش ارتفاع گل‌زنی و حفظ تعداد کمتر برگ روی بوته، نیکوتین کمربرگ افزایش یافت به طوری که در تیمار گل‌زنی و حفظ ۱۸ برگ روی بوته، غلظت آن به ۲ درصد افزایش یافت.

عقیده بر این است که گل‌زنی بوته سبب القاء رشد ریشه می‌گردد (Henry et al., 2019) چون با انجام گل‌زنی بوته، مریستم انتهایی ساقه[۱] و در نتیجه منبع تولید هورمون اکسین[۲] در بوته حذف می‌شود و لذا رشد ریشه تحریک می‌گردد (Bush, 2001) و بدین ترتیب میزان بیوسنتز نیکوتین در ریشه افزایش می‌یابد (شکل ۱-۳). همچنین گل‌زنی به طور موثر سبب بیان ژنی می‌شود که با سنتز نیکوتین و انتقال آن از ریشه به بخش هوایی گیاه مرتبط است (Bowman, 1996; Henry et al., 2019).

شکل ۱-۳- مقایسه سیستم ریشه‌ای در بوته‌های بدون گل‌زنی (الف) و بوته‌های گل‌زنی شده توتون (ب)

(منبع: Li *et al*., 2016)

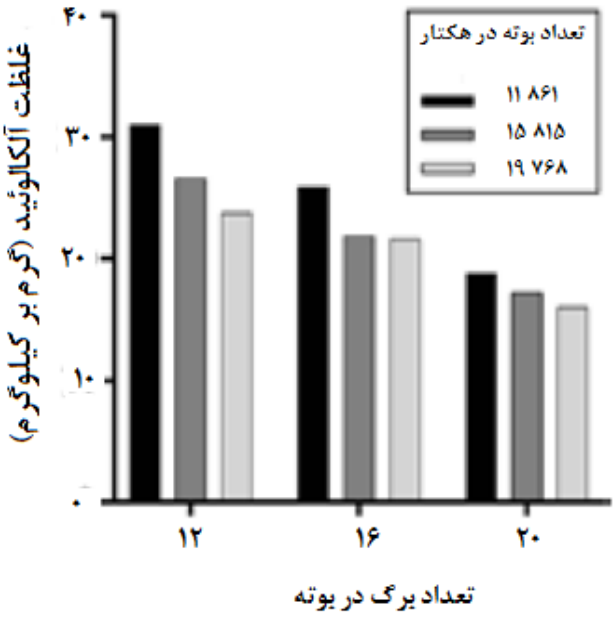
۱- Apical meristem

۲- Auxin

میزان تاثیر گل‌زنی بر نیکوتین برگ به زمان انجام گل‌زنی و تعداد برگی که روی بوته نگه داشته می‌شود، بستگی دارد که لازم است گلزنی در مرحله دکمه‌ای شدن (قبل از باز شدن غنچه گل) انجام گیرد و تعداد مناسب برگ روی بوته نگهداری شود.

۱-تاثیر زمان گل‌زنی: اگر گل‌زنی به طور زودهنگام (در مرحله دکمه‌ای شدن گل‌آذین) انجام گیرد عملکرد توتون بیشتر شده و غلظت نیکوتین در برگ‌های باقی مانده روی بوته افزایش خواهد یافت (Tso, 1999; Bush, 2001) و هر چه گل‌زنی به تاخیر بیافتد میزان نیکوتین برگ موقع رسیدگی آن، کم خواهد بود (Henry et al., 2019).

۲-تاثیر تعداد برگ روی بوته: در مقایسه با تراکم بوته، تعداد برگ روی بوته تاثیر بیشتری روی نیکوتین برگ دارد که با افزایش تعداد برگ روی بوته، غلظت نیکوتین در برگ رسیده کاهش خواهد یافت. حتی در تراکم بالای بوته، اگر تعداد کمتری برگ روی بوته نگهداری شود غلظت نیکوتین بیشتر خواهد بود (شکل ۱-۴) یا برعکس، با حفظ تعداد بیشتر برگ روی بوته، غلظت نیکوتین برگ حتی در تراکم کم بوته، پایین‌تر خواهد بود (Henry et al., 2019). با انجام گل‌زنی و حفظ ۱۸ تا ۲۲ برگ در بوته، غلظت نیکوتین برگ در حد متوسط خواهد بود (Peedin and McCants, 1977) در حالی که با کاهش ارتفاع گل‌زنی و حفظ ۱۴ برگ روی بوته، غلظت نیکوتین در برگ‌ها به طور قابل توجه افزایش خواهد یافت (Miner, 1980; Henry et al., 2019). در مناطق کشت توتون کشور توصیه می‌شود موقع گل‌زنی، تعداد ۲۲ برگ در هر بوته توتون گرمخانه‌ای باقی بماند (سراجی و همکاران، ۱۳۸۸). در تعیین تعداد برگ در بوته لازم است عملکرد و سایر خصوصیات کیفی برگ نیز مدنظر قرار گیرد.



شکل ۱-۴- تاثیر تراکم بوته و تعداد برگ روی بوته بر میانگین غلظت آلکالوئید توتون

(منبع: Tso, 1990، با تقسیم داده‌های محور عمودی بر ۱۰، غلظت آلکالوئید بر حسب درصد به دست می‌آید)

وزن خشک برگ توتون از زمان گل‌زنی بوته تا زمان برداشت آن، افزایش پیدا می‌کند و علی‌رغم ایجاد رقت ناشی از افزایش عملکرد، غلظت نیکوتین در برگ نیز طی این مدت افزایش پیدا می‌کند و این نتیجه نشان می‌دهد سرعت افزایش مقدار نیکوتین در برگ بیشتر از سرعت افزایش عملکرد برگ می‌باشد.

اخیرا عملیات گل‌زنی توتون طوری انجام می‌گیرد که عملکرد، کیفیت و ترکیب شیمیایی مورد دلخواه در برگ توتون حاصل گردد. مقرراتی که توسط سازمان‌های بهداشتی برای کاهش غلظت

نیکوتین در برگ توتون اعمال می‌گردد سبب خواهد شد عملیات گل‌زنی به طور متناسب تغییر یابد تا غلظت مورد نظر نیکوتین حاصل شود. بدین ترتیب با تغییر این عملیات، بقیه خصوصیات مورد نظر برگ توتون نیز بالاجبار تغییر خواهد یافت. یعنی اگر هدف ما تولید برگ‌هایی با مقدار نیکوتین پایین باشد ارتفاع گل‌زنی بالاتر در نظر گرفته می‌شود تا مقدار نیکوتین برگ با افزایش تعداد برگ روی بوته، به مقدار ۰/۳ درصد کاهش پیدا کند ضمن این که افزایش ارتفاع گل‌زنی همزمان سبب افزایش عملکرد نیز خواهد شد (Grišić et al., 2014). بنابراین در آینده، گل‌زنی بوته یک عمل زراعی سودمند در جهت تغییر ترکیب مورد دلخواه برگ خواهد بود (Henry et al., 2019).

۱-۲-۵- تاثیر کنترل جوانه‌های جانبی بر غلظت نیکوتین برگ

وقتی که گیاه به بلوغ جنسی می‌رسد جوانه گل در آن تشکیل می‌شود و انرژی و منابع در گیاه به سمت گل جریان می‌یابد و با انجام گل‌زنی، علی‌رغم این که جریان انرژی و ماده به سمت برگ‌ها سوق پیدا می‌کند، جوانه‌های جانبی روی ساقه گیاه نیز رشد و توسعه می‌یابند یعنی با حذف غالبیت رشد جوانه انتهایی، جوانه‌های جانبی در بوته توسعه پیدا می‌کنند. جوانه‌های جانبی به عنوان مقصد انرژی عمل کرده و عناصر غذایی و سایر منابع گیاه را از سایر اندام‌ها از جمله ریشه و برگ‌ها به سمت خود جهت‌دهی می‌کنند بنابراین ادامه رشد جوانه‌های جانبی علاوه بر کاهش عملکرد برگ، از طرفی سبب می‌شود غلظت نیکوتین در برگ‌ها به دلیل اثر رقت، کاهش یابد چون مقدار نیکوتینی که لازم بود صرفا در برگ‌ها تجمع یابد در برگ جوانه‌های جانبی نیز تجمع پیدا می‌کند. از طرف دیگر، رشد جوانه‌های جانبی سبب محدود شدن سنتز نیکوتین در ریشه و در نتیجه کاهش غلظت نیکوتین در برگ‌ها خواهد شد.

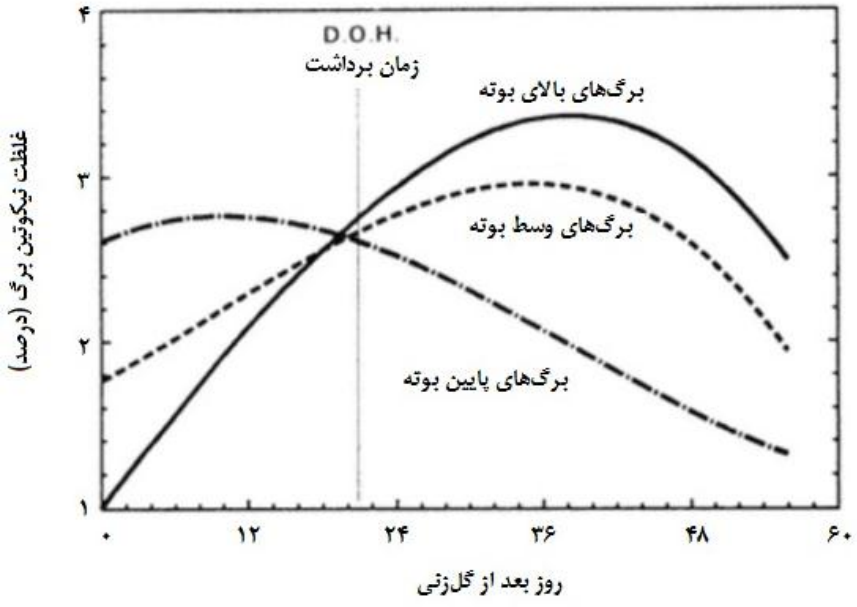
با کنترل صحیح رشد جوانه‌های جانبی می‌توان غلظت آلکالوئید کل را در برگ‌های توتون افزایش داد (Tobacco Research Board, 1996). البته تاثیر عملیات گل‌زنی بر غلظت نیکوتین برگ توتون بسیار چشمگیرتر از تاثیر کنترل جوانه‌های جانبی است. جوانه‌های جانبی توتون را می‌توان با استفاده از مواد شیمیایی مانند مالئیک هیدرازید (MH)، فلومترالین[۱] یا پرایم‌پلاس و الکل چرب به خوبی کنترل نمود. کنترل کننده‌های شیمیایی جوانه جانبی از جمله مالئیک هیدرازید (MH) با توقف تقسیم سلولی سبب کنترل رشد جوانه جانبی می‌گردد ولی الکل چرب جوانه‌های جانبی را خشک می‌کند (Henry et al., 2019).

روش کنترل جوانه‌های جانبی ممکن است بر غلظت نیکوتین برگ تاثیر داشته باشد (Tso, 1999). برای مثال، مصرف مالئیک هیدرازید اغلب سبب افزایش قند و کاهش غلظت نیکوتین برگ می‌شود در حالی که کنترل دستی جوانه‌های جانبی سبب افزایش درصد نیکوتین و آلکالوئید برگ می‌شود (Henry et al., 2019). البته مالئیک هیدرازید جزو موارد استثناء می‌باشد (Tso, 1999) چون سایر کنترل کننده‌های جوانه جانبی از جمله پرایم‌پلاس تاثیری بر غلظت نیکوتین برگ توتون گرمخانه‌ای ندارند (Rosa and Caughill, 1991). در سال‌های اخیر، در کشور ما ۱۵ میلی‌لیتر از محلول ۱/۳ درصد پرایم پلاس به ازای هر بوته توتون استفاده شده است و اکنون کنترل‌کننده جوانه‌جانبی در شرکت دخانیات ایران تولید می‌شود.

۱- Flumetralin

۱-۲-۶-تاثیر رسیدگی برگ و برداشت آن بر غلظت نیکوتین برگ

قبل از این که تاثیر زمان برداشت بر مقدار نیکوتین برگ شرح داده شود لازم است روند تغییر نیکوتین در برگ‌های مختلف روی ساقه توتون در مدت زمان بعد از گل‌زنی تا برداشت برگ درک شود چون عمده سنتز و تجمع نیکوتین در برگ، بعد از گل‌زنی بوته رخ می‌دهد به طوری که غلظت نیکوتین در برگ از زمان گل‌زنی تا زمان برداشت آن، ممکن است ۴ برابر افزایش یابد (Bush, 2001). لازم به ذکر است که تا یک مدت زمان معین بعد از گل‌زنی، غلظت نیکوتین در برگ به تدریج افزایش یافته و سپس با شروع روند پیری برگ، کاهش می‌یابد و این مدت زمان افزایش نیکوتین، به موقعیت برگ روی ساقه بستگی دارد (شکل ۱-۵). برای مثال در برگ‌های پایین بوته، میزان نیکوتین برگ تقریبا در دو هفته اول بعد از گل‌زنی به تدریج افزایش یافته و به حداکثر مقدار خود می‌رسد و در این مدت، برگ‌های پایین بوته قابل برداشت می‌شوند. دو هفته بعد از گل‌زنی، غلظت نیکوتین برگ با روند پیری آن، سریع کاهش پیدا می‌کند در حالی در برگ‌های جوان وسط و بالای بوته، غلظت نیکوتین برگ تا چند هفته بعد از گل‌زنی به تدریج افزایش می‌یابد و مدت زمان افزایش آن در برگ‌های بالای بوته بیشتر از برگ‌های وسط بوته می‌باشد (Bush, 2001). به طور کلی، مقدار نیکوتین برگ تا زمان رسیدگی کامل آن، افزایش می‌یابد (Gršić et al., 2014) ولی پس از آن، غلظت نیکوتین با گذشت زمان کاهش خواهد یافت (Tso, 1999).



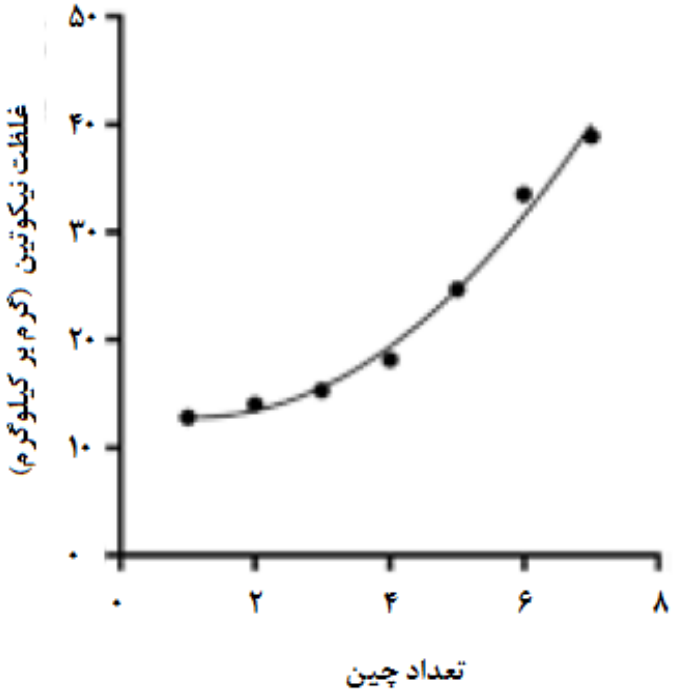
شکل ۱-۵- تغییر غلظت نیکوتین در برگ‌های مختلف توتون بعد از گل‌زنی بوته

(Date of harvest; D.O.H. زمان برداشت است)

داشتن تقویم کشاورزی در کشت توتون برای انجام به موقع هر عملیات زراعی از جمله برداشت برگ‌ها، از عوامل مهم ارتقاء کیفیت توتون می‌باشد. برگ‌های توتون گرمخانه‌ای در مراحل مختلف رشد گیاه و پس از رسیدگی صنعتی، برداشت می‌شوند و اولین برداشت برگ (پابرگ‌ها) تقریبا ۱۰ روز بعد از گل‌زنی شروع می‌شود (Henry et al., 2019). برگ توتون زمانی "رسیده" است که حدود ۱۲ روز از زمان رسیدگی فیزیولوژیکی آنها گذشته باشد که در این موقع، برگ به مرحله اولیه پیری نزدیک است (Weybrew, 1984). در زمان رسیدگی برگ، زاویه بین برگ و ساقه بیشتر شده و

کلروفیل برگ تجزیه می‌گردد همچنین سطح برگ رسیده حالت مخملی داشته و سطوح بین رگبرگ‌ها حالت برآمده یا تاولی به خود می‌گیرند.

برداشت توتون گرمخانه‌ای اغلب به صورت برگ‌چینی صورت می‌گیرد و مطابق با رسیدگی برگ‌ها، برداشت برگ‌ها از پایین بوته شروع شده و پس از چندین مرحله برداشت، برگ‌های بالای بوته نیز برداشت می‌شوند (Peedin and McCants, 1977). تعداد مراحل برگ‌چینی در مناطق مختلف دنیا فرق می‌کند و کلیه برگ‌های بوته ممکن است در ۲ تا ۱۰ مرحله یا چین برداشت شوند (Peedin and McCants, 1977). هر چه تعداد مرحله چین برگ‌ها کمتر باشد هزینه‌های کارگری کاهش خواهد یافت (Peedin and McCants, 1977) با این حال، هر چه تعداد چین برگ‌ها بیشتر باشد سبب خواهد شد برگ‌ها در زمان مناسب رسیدگی، برداشت شوند. در تئوری، هر چه تعداد چین برگ‌ها افزایش یابد میانگین غلظت نیکوتین برگ بوته نیز به دلیل رسیدگی یکنواخت برگ‌ها، افزایش می‌یابد (شکل۱-۶) با این حال تحقیقات همواره این موضوع را تایید نکرده‌اند چون مقدار آلکالوئید کل توتون تحت تاثیر اثرات متقابل بین تعداد چین و ارتفاع گل زنی قرار می‌گیرد. برای مثال در سال ۱۹۷۶، Gooden و همکاران گزاش دادند بوته‌هایی که با حفظ ۱۵ عدد برگ گل‌زنی شده و دو مرحله برگ چینی شدند و یا بوته‌هایی که با حفظ ۱۲ برگ گل‌زنی شده و تنها یک بار برگ چینی شدند، غلظت آلکالوئیدها در آنها به طور قابل ملاحظه بیشتر از بوته‌هایی بود که با حفظ ۱۸ برگ گل‌زنی شده و ۳ تا ۶ بار برگ چینی شده بودند.



شکل ۱-۶- میانگین غلظت نیکوتین توتون گرمخانه‌ای بر اساس تعداد چین

(تعداد زیاد چین مستلزم این بود که برگ‌های بالای بوته، دیرهنگام برداشت شوند)(منبع: Tso, 1990)

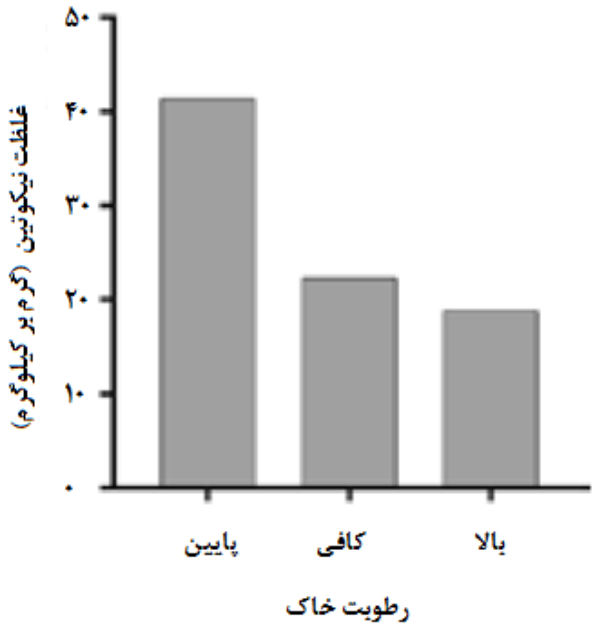
۱-۲-۶- تاثیر آبیاری بر غلظت نیکوتین برگ

توتون مقادیر مختلفی آب را در مراحل مختلف فصل زراعی نیاز دارد و بیشترین نیاز آن به آب در فاصله زمانی ۷ تا ۹ هفته بعد از نشاکاری می‌باشد (Flower, 1999). بنابراین، تامین آب در این فاصله زمانی بسیار سودمند است. در شرایط فاریاب، آبیاری سبک برای تولید توتون ایده‌آل می‌باشد (Henry et al., 2019). حفظ تورژسانس برگ برای رشد بهینه گیاه و سنتز نیکوتین اهمیت دارد (Tso, 1999). با این حال، تنش ملایم خشکی سبب افزایش سنتز نیکوتین در ریشه خواهد شد و

این موضوع ممکن است خرمن سیگارت و برنامه صادرات توتون یک کشور را تحت تاثیر قرار دهد به طوری که در برزیل، محصول توتون گرمخانه‌ای در سال ۲۰۲۰ تحت تاثیر خشکسالی قرار گرفت در نتیجه، میانگین نیکوتین برگ حتی به بیش از ۵ درصد نیز افزایش یافت به همین دلیل در کارخانجات سیگارت سازی این کشور، به جای استفاده از درجات لیف[1]برگ‌ها در خرمن، بیشتر از پابرگ‌ها و کمربرگ‌ها استفاده خواهد شد تا مقدار نیکوتین در خرمن سیگارت بالاتر نشود با این توصیف این کشور در حوزه بازار صادرات در سال ۲۰۲۰، کمبود توتون پرکننده (فیلر) خواهد داشت (Akca G. 2020).

طبق شکل ۱-۷، در خاک‌هایی که مقدار رطوبت بالاتر است یا به عبارتی در خاک‌هایی که بارندگی یا آبیاری بیشتر صورت می‌گیرد، نیتروژن خاک آبشویی شده در نتیجه ممکن است غلظت نیتروژن و نیکوتین در برگ توتون کاهش یابد (Tso, 1999) در چنین شرایطی، لازم است مقداری کود نیتروژنی (به تناسب میزان آبشویی) به عنوان نیتروژن مازاد بر مقدار توصیه شده مصرف گردد. همچنین آبیاری یا بارندگی بیش از حد در خاک‌هایی که نفوذپذیری کمتری دارند شرایط ماندابی ایجاد می‌کند و ۴ ساعت ماندابی می‌تواند تاثیر منفی بر رشد گیاه و فعالیت ریشه داشته باشد و در نتیجه ستز نیکوتین را مختل سازد (Tso, 1999). در مناطقی که کشت توتون به صورت دیم است، میانگین نیکوتین برگ توتون در منطقه بیشتر به میزان بارندگی بستگی دارد و ارقامی که از لحاظ ژنتیکی دارای نیکوتین برگ بالایی هستند مقدار نیکوتین در برگ آنها تابع میزان رطوبت خاک می‌باشد (Henry et al., 2019).

[1] - Leaf grades



شکل ۱-۷- میانگین غلظت نیکوتین توتون گرمخانه‌ای تحت سطوح مختلف رطوبت خاک

(منبع: Collins and Hawks, 1993)

منابع

رنجبر ر. ۱۳۹۱. تعیین حدبحرانی پتاسیم در خاک‌های مناطق کشت توتون بارلی۲۱ در مریوان تحت شرایط گلدانی. کارنامه پژوهشی مرکز تحقیقات توتون ارومیه.

سراجی .م، محسن زاده .ر، ۱۳۸۸. تاثیرارتفاع بوته (تعداد برگ)و زمان گلزنی بر عملکرد کمی و کیفی توتون گرمخانه‌ای . کارنامه پژوهشی مرکز تحقیقات وآموزش تیرتاش.

فیاض زرطلب ح. و باطنی‌منش ب. ۱۳۸۸. تاثیر ارتفاع گل‌زنی در افزایش خصوصیات کمی و کیفی توتون بارلی۲۱. کارنامه پژوهشی مرکز تحقیقات توتون ارومیه.

قلی‌زاده ع.غ.، مهدوی ع.ر. و مرادی غ.ر. ۱۳۹۱. تعیین حد بحرانی نیتروژن در خاک‌های مناطق توتونکاری استان‌های مازندران و گلستان برای توتون رقم K326 در شرایط گلدانی. کارنامه پژوهشی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش.

محسن زاده ر.، سراجی م. و احمدی م. ۱۳۹۰. تاثیر تعداد برگ و زمان گلزنی مناسب بر عملکرد کمی و کیفی توتون هواخشک به روش برگ چینی و ساقه‌بر. کارنامه پژوهشی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش.

Ashley, D.L., and C.L. Backinger. 2012. The food and drug administration's regulation of tobacco: The center for tobacco products' office of science. Am. J. Prev. Med. 43: S255–S263. doi: 10.1016/j.amepre.2012.08.004

Benowitz, N.L., and J.E. Henningfield. 2013. Reducing the nicotine content to make cigarettes less addictive. Tob. Control 22: i14–i17. doi:10.1136/tobaccocontrol-2012-050860

Bowman, D.T. 1996. History of the regional minimum standards program for the release of flue-cured tobacco varieties in the United States. Tob. Sci. 40(3):99–110.

Bush L.P. 2001. Leaf chemistry: Alkaloid biosynthesis. In: Davis D.L and Nielsen T., Editors. Tobacco: Production, Chemistry, And Technology. 1th ed. Blackwell Science, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA; pp. 285-291.

Chaplin, J.R., and G.S. Miner. 1980. Production factors affecting chemical compounds of the tobacco leaf. Recent Adv. Tob. Sci. 6:3–63.

Collins, W.K., and S.N. Hawks, Jr. 1993. Principles of flue-cured tobacco production. North Carolina State Univ., Raleigh.

Dewey, R.E., and J. Xie. 2013. Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry 94:10–27. doi: 10.1016/j.phytochem. 2013.06.002

Drake, M.P., M.C. Vann, and L.R. Fisher. 2015. Nitrogen application rate influence on yield, quality, and chemical constituents of fluecured tobacco, part I: Application timing. Tob. Sci. 52:11–17. doi:10.3381/14-041R.1

Farsalinos, K.E., N. Yannovits, T. Sarri, V. Voudris, and K. Poulas. 2017. Nicotine delivery to the aerosol of a heat-not-burn tobacco product: Comparison with a tobacco cigarette and e-cigarettes. Nicotine Tob. Res. 20:1004–1009. doi:10.1093/ntr/ntx138

Fisher, P. 1999. Cigarette manufacture: Tobacco blending. In: D.L. Davis and M.T. Nielsen, editors, Tobacco: Production, chemistry, and technology. Blackwell Sci., London, UK. p. 346–352.

Fisher, L.R. 2019. North Carolina State University: Flue-cured tobacco guide 2019 AG-187. Rev. ed. North Carolina Coop. Ext., Raleigh.

Flower, K.C. 1999. Field practices. In: D.L. Davis and M.T. Nielsen, editors, Tobacco: Production, chemistry, and technology. Blackwell Sci., London, UK. p. 76–103.

Gooden, D.T., R.C. Long, W.G. Woltz, G.R. Gwynn, and J.O. Rawlings. 1976. Influence of management systems, cultivars, and planting dates on flue-cured tobacco production: II. Chemical characters. Tob. Sci. 20:125–128.

Gršić, K., J. Butorac, and M. Čavlek. 2014. Effects of topping height, maturity and cultivar on the yield and chemical characteristics of fluecured tobacco. Agriculturae Conspectus Scientificus 79(3):167–173.

Henry J.B., Vann M.C. and Lewis R.S. 2019. Agronomic Practices Affecting Nicotine Concentration in Flue-Cured Tobacco: A Review. Agronomy Journal, 111 (6): 3067-3075.

Leffingwell, J.C. 2001. Basic chemical constituents of tobacco leaf and differences among tobacco types. In: D.L. Davis and M.T. Nielsen, editors, Tobacco: Production, chemistry, and technology. Blackwell Sci., London, UK. p. 265–284.

Lewis, R.S. 2018. Potential mandated lowering of nicotine levels in cigarettes: A plant perspective. Nicotine Tob. Res. 21(7):991–995.

Lewis, R.S., H.O. Lopez, S.W. Bowen, K.R. Andres, W.T. Steede, and R.E. Dewey. 2015. Transgenic and mutation-based suppression of a *Berberine Bridge Enzyme-Like* (*BBL*) gene family reduces alkaloid content in field-grown tobacco. PLoS One 10(2): e0117273. doi: 10.1371/journal.pone.0117273

Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. London: Academic Press.

Marynak, K.L., D.G. Gammon, B.A. King, B.R. Loomis, E.B. Fulmer, T.W. Wang, and T. Rogers. 2017. National and state trends in sales of cigarettes and e-cigarettes, US, 2011–2015. Am. J. Prev. Med. 53:96–101. doi: 10.1016/j.amepre. 2017.01.016

Miner, G.S. 1980. Effect of harvest method and related management practices on flue-cured tobacco II: Total N, total alkaloids, reducing sugars and particulate matter index. Tob. Sci. 24:81–84.

Parker, R.G. 2009. Evaluation of nitrogen sources and rates on the yield and quality of modern flue-cured tobacco cultivars. North Carolina State Univ., Raleigh.

Pearce B., Bailey A., and Palmer G. 2006. Alternative fertilizer nitrogen sources for tobacco production. Soil Science News & Views, 26 (3): 1-5.

Peedin, G.F., and C.B. McCants. 1977. Influence of soil applications of calcium on selected agronomic and chemical characteristics of fluecured tobacco. Tob. Sci. 21:17–21.

Raper, C.D., Jr., and C.B. McCants. 1970. Performance of flue-cured tobacco on selected soil nitrogen availability regimes. Tob. Sci. 14:22–25.

Rosa, N., and C.W.H. Caughill. 1991. Performance of sucker control material on agronomic and chemical quality of flue-cured tobacco. Tob. Sci. 35:54–56.

Sisson, V.A., and J.A. Saunders. 1982. Alkaloid composition of the USDA tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) introduction collection. Tob. Sci. 16:117–120.

Akca G. 2020. Crop report. Star Tobacco International agent. 2020.

Stocks, G.R., and E.B. Whitty. 1994. Delayed topping effects on the yield, value, and leaf chemical components of photoperiod-sensitive fluecured tobacco. Tob. Sci. 38:90–93.

Tobacco Research Board. 1996. Section D2 –Weeds, tops and suckers. In: Flue-cured recommendations. Tobacco Res. Board, Harare, Zimbabwe.

Tso, T.C. 1990. Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant. IDEALS, Inc., Beltsville, MD.

Tso, T.C. 1999. Seed to smoke. In: D.L. Davis and M.T. Nielsen, editors, Tobacco: Production, chemistry, and technology. Blackwell Sci, London, UK. p. 1–31.

Vann, M.C., L.R. Fisher, D.L. Jordan, D.H. Hardy, W.D. Smith, and A.M. Stewart. 2012. The effect of potassium on the yield and quality of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Tob. Sci. 49:14–20. doi:10.3381/12-019R.1

Nicolova V. 2007. Technological investigation on Virginia variety group tobacco. message I: technological investigation on Virginia type tobacco from different regions of south Bulgaria. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 13: 657-671.

Weybrew, J.A. 1984. Harvesting and curing of flue-cured tobacco. Tech. Bull. 275. North Carolina State Agric. Res. Serv., North Carolina State Univ., Raleigh.

Wilkinson, W.C., L.R. Fisher, W.D. Smith, and D.L. Jordan. 2008. Effects of stand loss, planting date, and replanting method on yield and quality of flue-cured tobacco. Tob. Sci. 47:44–52. doi:10.3381/1965.1

World Health Organization. 2015. Advisory note: Global nicotine reduction strategy. WHO Study Group on Tobacco Product Regulation (TobReg), Geneva, Switzerland.

Zenkner F.F., Margis-Pinheiro M. and Cagliari A. 2019. Nicotin biosynthesis in nicotiana: a metabolic nicotiana. Tobacco Science, 56: 1–9

فصل دوم

نیکوتین

(بیوسنتز آن در ریشه – سرنوشت آن در دود)

۲-۱- مقدمه

از ابتدای تمدن بشری، عصاره‌های گیاهی حاوی آلکالوئید[1] به عنوان دارو و سم استفاده می‌شدند (Kutchan, 1995). بیش از ۱۲ هزار نوع آلکالوئید در چندین گونه از گیاهان خانواده بادنجانیان[2] از جمله گونه‌های نیکوتیانا[3] سنتز می‌شوند (Oksman-Caldent, 2007; Mithofer and Boland, 2012). آلکالوئیدها به همان اندازه که در صنعت دخانیات مهم هستند در رشد و توسعه خود گیاه نقش ندارند به طوری که گیاه در غیاب آلکالوئیدها، به رشد و توسعه طبیعی خود ادامه می‌دهد (Bush, 2001). گونه‌های تجاری توتون (نیکوتیانا تاباکوم[4] و نیکوتیانا روستیکا[5]) به واسطه داشتن آلکالوئیدها، جزو گیاهان مهم اقتصادی هستند و مقدار این ترکیبات در برگ توتون، کیفیت آن را تعیین می‌کند. وجود آلکالوئیدها در محصولات دخانی سبب تحریک فیزیولوژیکی و ایجاد لذت در فرد مصرف‌کننده این محصولات می‌شود (Bush, 2001).

در گونه‌های نیکوتیانا، ریشه محل اصلی سنتز آلکالوئیدها است (Sisson and Severson, 1990 ; Shi et al., 2006) و نیکوتین[6] آلکالوئید اصلی در گونه نیکوتینا تاباکوم است که پس از بیوسنتز در سلول‌های پوست ریشه، توسط یک سری از ناقلین و از طریق آوند چوبی به بخش هوایی گیاه (عمدتا به برگ‌ها) منتقل شده تا این که در واکوئل سلولی ذخیره می‌شود.

بیوسنتز آلکالوئیدها یک فرایند پیچیده و شامل چندین مرحله آنزیمی است. نیکوتین شامل یک حلقه پیریدین[7] و یک حلقه پیرولیدین[8] است که حلقه پیریدین از اسید نیکوتینیک[9] و حلقه پیرولیدین از

1 -Alkaloid
2 -Solanaceae
3 -Nicotiana
4 -Nicotiana tabacum
5 -Nicotiana rustica
6 -Nicotine
7 -Pyridine ring
8 -Pyrrolidine ring
9 -Nicotinic acid

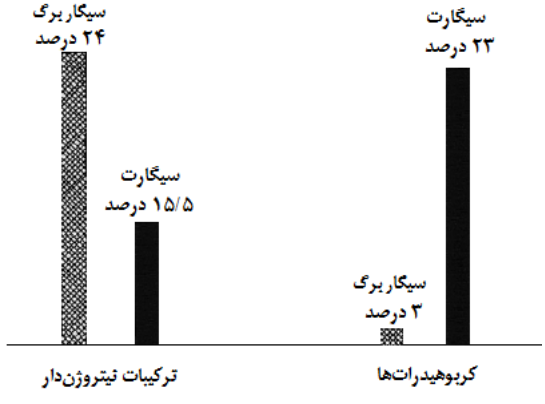
متابولیسم پلی‌آمین پوترِسین[1] و تغییر تدریجی آن به اِن-متیل پیرولینیوم[2] حاصل می‌شود (Häkkinen et al., 2007 Shoji and Kajikawa, Hashimoto, 2010). نورنیکوتین[3]به عنوان یک آلکالوئید، عمدتاً از طریق فرآیند اِن-دمتیلاسیون[4] (متیل‌زدایی) نیکوتین و سایر آلکالوئیدها مانند آناتابین[5] فقط از طریق مسیر حلقه پیریدین سنتز می‌شوند (Shoji and Hashimoto, 2008 ; Siminszky et al, 2005 ; Zenkner *et al.*, 2019). اگرچه اطلاعات زیادی در مورد سنتز آلکالوئیدها در توتون وجود دارد اما تحقیقات در مورد بیوسنتز، انتقال و متابولیسم آن هنوز کامل نشده و بعضی از بخش‌های فرآیند کاملاً ناشناخته باقی مانده است. لذا در این فصل مطالبی نیز در مورد سنتز آلکالوئیدهای اصلی توتون، مراحل تنظیمی سنتز نیکوتین بر اساس آخرین یافته‌های علمی آورده شده که توسط Zenkner و همکاران در سال ۲۰۱۹ گردآوری و در مجله Tobacco Science چاپ شده است که درک آنها برای انجام تحقیقات بیوتکنولوژی و تغییر مقدار و غلظت نیکوتین در برگ توتون می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، سرنوشت نیکوتین در دود توتون و تاثیر pH دود بر درک حسی نیکوتین مورد بحث واقع شده است تا مطالب نیکوتین در زمینه توتون و دود آن کامل‌تر شده و خستگی خوانندگان از مطالعه متن سنگین این فصل، رفع شود.

۲-۲- ترکیبات نیتروژن‌دار برگ توتون

آلکالوئیدها جزو ترکیبات نیتروژن‌دار گیاهی هستند لذا لازم دیده شد مطالبی نیز در مورد ترکیبات نیتروژن‌دار توتون آورده شود تا مقدار و نسبت آلکالوئیدها با سایر ترکیبات نیتروژن‌دار برگ مورد

1 -Putrescine
2 -N-methyl-pyrrolinium
3 -Nornicotine
4 -N-demethylation
5-Anatabine

مقایسه قرار گیرد (جدول ۲–۱). ترکیبات نیتروژن‌دار از جمله کاربازول‌ها[1] هارمن‌ها[2] هیدرازین‌ها[3] ایندول‌ها[4] نفتیل‌آمین‌ها[5] و پیرازین‌ها[6] نیکوتین، هیدروژن سیانید[7] و آمونیاک با فعالیت بیولوژیکی کاملاً مشخص، در برگ و دود توتون شناسایی شده‌اند. فراوانی قابل توجه ترکیبات نیتروژن‌دار در برگ توتون (شکل ۲–۱) باعث می‌شود که این ترکیبات در حین فرآوری برگ (عمل‌آوری، کهنه کردن، تخمیر برگ و غیره) یا در حین احتراق آن، منشاء تشکیل تعداد زیادی از ترکیبات باشند (Schmeltz and Hoffmann, 1977). برای مثال طی مدت عمل‌آوری برگ، بخشی از پروتئین برگ (به عنوان ترکیب نیتروژن‌دار نامحلول) هیدرولیز شده و اسیدهای آمینه[8] آزاد می‌شوند که با آزاد شدن آنها، آمیدها[9] نیز تشکیل می‌شوند (جدول ۲–۱) که افزایش مقدار ترکیبات نیتروژن‌دار محلول در برگ عمل‌آوری شده توتون، بیانگر این حقیقت می‌باشد (Leffingwell, 2001).



شکل ۲–۱– درصد وزنی ترکیبات نیتروژن‌دار و کربوهیدرات‌ها در برگ توتون سیگارت و سیگار برگ

(منبع: Tso, 1972)

1 - Carbazoles
2 - Harmanes
3 - Hydrazines
4 - Indoles
5 - Naphthylamines
6 - Pyrazines
7 - Hydrogen cyanide
8 -Amino acid
9 -Amide

جدول ۲-۱- میزان تغییر ترکیبات نیتروژنی در طی عمل‌آوری توتون هواخشک سیگار برگ (درصد در وزن خشک)

	نوع نیتروژن	روش برداشت			
		روش برگ‌چینی		روش ساقه‌بُر	
		قبل از عمل‌آوری	بعد از عمل‌آوری	قبل از عمل‌آوری	بعد از عمل‌آوری
	نیتروژن کل	۵/۶۱	۵/۳۴	۴/۷۰	۳/۸۰
اجزای نیتروژن کل	ترکیب نیتروژن‌دار نامحلول (به صورت پروتئین)	۳/۶۹	۱/۶۵	۳/۸۰	۱/۸۵
	ترکیبات نیتروژن‌دار محلول	۱/۹۲	۳/۶۹	۰/۹۰	۱/۹۵
ترکیبات نیتروژن‌دار محلول	آمینو	۰/۲۳	۰/۸۰	۰/۱۵	۰/۱۵
	آمونیاکی و آمیدی	۰/۱۵	۱/۰۷	۰/۰۵	۰/۸۰
	آلکالوئیدی	۰/۳۵	۰/۳۲	۰/۴۰	۰/۴۰
	نیتراتی	۰/۶۳	۰/۷۷	۰/۲۰	۰/۲۵
	سایر	۰/۵۶	۰/۷۳	۰/۱۰	۰/۳۵

داده‌های ۵ ردیف آخر جدول به عنوان ترکیبات نیتروژن محلول در گیاه، بر حسب معادل نیتروژن بیان شده‌اند. برای مثال در ستون دوم، عدد مربوط به نیتروژن نیتراتی (۰/۶۳ درصد) بیانگر درصد نیترات برگ نیست بلکه بیانگر بخشی از نیتروژن کل برگ است که به صورت نیترات وجود دارد و از مجموع ۱/۹۲ درصد نیتروژن محلول برگ، ۰/۶۳ درصد آن به شکل نیترات وجود دارد، منبع: Leffingwell, 2001

از لحاظ ساختار شیمیایی، ترکیبات نیتروژن‌دار برگ توتون شامل آمین‌های آلیفاتیک[1]، آمین‌های آروماتیک[2](ترکیباتی هستند که در آنها گروه آمین به حلقه آروماتیک یا ناجور–حلقه آروماتیک[3] متصل است)، ترکیبات ناجور–حلقه[4](ترکیبات حلقوی هستند که در آن اتم‌های تشکیل‌دهنده حلقه از دو یا چند اتم مختلف تشکیل شده است)، اسیدهای آمینه، پروتئین، نیتروزآمین‌ها[5] آمیدها،

1 -Alliphatic amines
2 - Aromatic amines
3 - Heterocyclic
4 - Heterocyclic compounds
5 -Nitrosamines

آمینوقندها[1] اِسترهای نیترات[2] ترکیبات معدنی (مانند آمونیاک) و غیره هستند. ترکیبات ناجور–حلقه با توجه به تعداد حلقه‌ها و ترتیب قرار گرفتن آنها در ساختار مولکولی، شامل سه گروه ترکیبات ناجور–حلقه تک‌حلقه‌ای (از جمله پیرول‌ها، پیریدین‌ها[3] پیرازین‌ها[4]، ناجور–حلقه چندحلقه‌ای منفصل (آلکالوئیدها) و ناجور–حلقه چندحلقه‌ای متصل از جمله کینولین‌ها[5] ایندول‌ها[6] کاربازول‌ها[7] آکریدین‌ها[8]هستند (Schmeltz and Hoffmann, 1977).

۲-۳-آلکالوئیدها

آلکالوئیدها جزو ترکیبات نیتروژنی ناجور–حلقه چندحلقه‌ای منفصل هستند که در آن حلقه‌ها به طور مستقیم به هم متصل نیستند (Schmeltz and Hoffmann, 1977). آلکالوئیدهای اصلی توتون شامل نیکوتین، کوتینین، نورنیکوتین، میوسمین، نیکوتیرین، آناباسین و آناتابین می‌باشد که در جدول ۲-۲ لیست شده‌اند (Leffingwell, 2001). در ۵۰ تا ۶۰ درصد از گونه‌های نیکوتیانا از جمله گونه‌های تجاری آن (نیکوتیانا تاباکوم و نیکوتیانا روستیکا)، ۴ آلکالوئید اصلی برگ به ترتیب مقدار نسبی آنها شامل نیکوتین، نورنیکوتین، آناتابین و آناباسین می‌باشند (Bush, 2001) و در این گونه‌ها، مقدار نیکوتین در برگ نسبتا زیاد و متغیر (از ۰/۵ تا ۸ درصد) است (Leffingwell, 2001) در حالی که در ۳۰ تا ۴۰ درصد از گونه‌های نیکوتیانا، نورنیکوتین آلکالوئید اصلی است و آناباسین تنها در ۴ گونه نیکوتیانا به عنوان آلکالوئید اصلی به شمار می‌آید. آناتابین معمولا به عنوان آلکالوئید عمده نیست و مقدار آن تنها در ۳ گونه نیکوتیانا نسبتا بالاتر است (Bush, 2001). هر چند مقدار آناتابین در برگ و

1 -Amino sugers
2 -Nitrate esters
3 -Pyridines
4 -Pyrazines
5 -Quinolins
6 - Indoles
7 - Carbazoles
8 - Acridines

ساقه توتون، کمتر است ولی بیشترین آلکالوئید فرعی در ریشه توتون محسوب می‌شود (Schmeltz and Hoffmann, 1977). غلظت بسیاری از این آلکالوئیدهای فرعی در برگ توتون کمتر از ۵۰ میکروگرم در گرم وزن خشک (برابر با ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم یا ۰/۰۰۵ درصد) است و غلظت برخی از آنها حتی در حد نانوگرم درگرم ماده خشک گیاهی می‌باشد (Bush, 2001). نیکوتین در توتون به شکل ایزومر چپ‌گرد (L) وجود دارد آناتابین و آنابازین هم به صورت مخلوط راسمیک[1] (مخلوط برابر از ایزومرها هستند) و هم به شکل ایزومر چپ‌گرد (L) وجود دارند. نورنیکوتین به شکل ایزومرهای راست‌گرد، چپ‌گرد و مخلوط هستند (Quan et al.,1965 و Pailer, 1965).

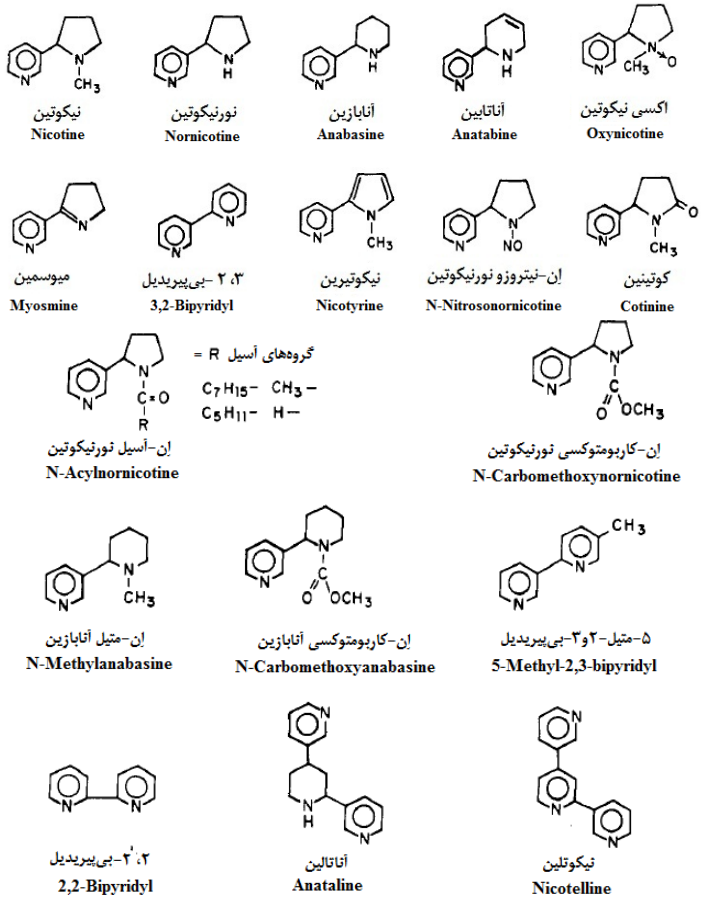
علاوه بر آلکالوئیدهای اصلی، آلکالوئیدهایی مانند اِن-هگزانویل نورنیکوتین[2] اِن-اکتانویل نورنیکوتین[3] اِن-فورمیل نورنیکوتین[4] اِن-استیل نورنیکوتین[5] اِن-کربومتوکسی نورنیکوتین[6] و اِن-کربومتوکسی آنابازین[7] ۵-متیل-۲،۳'-بی‌پیریدیل[8] و آناتالین[9] نیز وجود دارند که در آن‌ها به جای گروه متیل، گروه‌های دیگر (معمولاً گروه آسیل) روی نیتروژن حلقه پیرولیدین جایگزین شده است. آلکالوئیدهای برگ توتون در جدول ۲-۲ لیست و در شکل ۲-۲ نشان داده شده است (Schmeltz and Hoffmann, 1977).

1 - Racemic mixture
2 -N-hexanoylnornicotine
3 - N-octanoylnornicotin
4 - N-formylnornicotine
5 - N-acetylnornicotine
6 - N-carbomethoxynornicotine
7 - N-carbomethoxyanabasine
8 -5-methyl-2,3'-bipyridyl
9 - Anatalline

جدول ۲-۲ – برخی از آلکالوئیدهای موجود در برگ توتون

نیکوتین (Nicotine)	اِن-متیل آنابازین (N-Methylanabasine)
نورنیکوتین (Nornicotine)	اِن-متیل آناتابین (N-Methylanatabine)
آنابازین (Anabasine)	۵-متیل-۲،۳ً-بی‌پیریدیل (5-Methyl-2.3'-bipyridyl)
آناتابین (Anatabine)	اِن-متیل نیکوتون (N-Methylnicotone)
آناتالین (Anatalline)	میوسمین (Myosmine)
اِن-استیل نورنیکوتین (N-Acetylnornicotine)	نیکوتِلین (Nicotelline)
۲،۳ً-بی‌پیریدیل (ایزونیکوتئین) (2,3'-Bipyridyl)	نیکوتین اِن-اکسید (اکسی نیکوتین) Nicotine N-oxide
کوتینین (Cotinine)	نیکوتیرین (Nicotyrine)
اِن-فورمیل نورنیکوتین (N-Formylnornicotine)	نور نیکوتیرین (Nornicotyrine)
اِن-هگزانویل نورنیکوتین (N-Hexanoylnornicotine)	اِن-اکتانویل نورنیکوتین (N-Octanoylnornicotine)

منبع: Schmeltz and Hoffmann, 1977



شکل ۲-۲ – آلکالوئیدهای توتون

(منبع: Schmeltz and Hoffmann, 1977)

۲-۴-سنتز نیکوتین

نیکوتین برای اولین بار در سال ۱۸۰۹ توصیف و در سال ۱۸۲۸، جداسازی و خالص‌سازی گردید. ساختار شیمیایی نیکوتین و نحوه سنتز آن در گیاه در اواخر قرن ۱۸۰۰ تعیین گردید و تا آن زمان، بسیاری از گزارش‌ها به جزئیات سنتز نیکوتین و آلکالوئیدهای مربوط به آن معطوف بودند. بسیاری از

آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی نیکوتین از ریشه‌های توتون جداسازی شدند و خصوصیات آنها تا حدی مشخص شد. با این حال، سنتز تجدیدپذیر[1]نیکوتین در سیستم بدون سلول[2]گزارش نشده است (Bush, 2001).

نیکوتین و نورنیکوتین به دلیل اهمیتی که در کیفیت برگ توتون دارند، بیشتر مورد تحقیق قرار گرفته‌اند. مقدار نیکوتین برگ به دلیل نقش مثبت آن در کیفیت برگ، بسیار مهم است در حالی که نورنیکوتین بر خلاف نیکوتین، تاثیر منفی در کیفیت برگ توتون دارد. گونه‌هایی از نیکوتیانا مانند نیکوتیانا تاباکوم و نیکوتیانا روستیکا که نیکوتین در آنها آلکالوئید اصلی محسوب می‌شود، دارای مقدار بیشتری آلکالوئید هستند (Bush, 2001). نیکوتین دارای یک حلقه پیرولیدین و یک حلقه پیریدین است. مراحل تشکیل نیکوتین در ریشه توتون در شکل ۲–۳ خلاصه شده است.

الف) تشکیل حلقه پیریدین

اسید آسپارتیک[3]و قند ۳ کربنی فسفوگلیسرآلدئید[4]حاصل از فتوسنتز یا محصول واکنش این دو پیش‌ماده (یعنی کوئینولینیک اسید[5]) از بخش هوایی گیاه به ریشه منتقل می‌شوند تا در فرآیند سنتز نیکوتین شرکت کنند (Bush, 2001). واکنش‌های زیر به ترتیب زیر در ریشه صورت می‌گیرند:

۱–آسپارتیک اسید توسط آنزیم آسپارتات اکسیداز[6]اکسید شده و به آلفا–ایمینوسوکسونیک اسید[7] تبدیل می‌شود.

1 - Reproducible synthesis
2 - A cell-free system
3 - Aspartic acid
4 - Gly-3-P
5 - Quinolinic acid
6 -Aspartate oxidase
7 -α-iminosuccinic acid

۲– آلفا–ایمینوسوکسونیک اسید توسط آنزیم کوئینولینیک اسید سینتاز[1](QS) و با حضور قند سه کربنه به نام فسفوگلیسرآلدهید (یا گلیسرآلدهید–۳–فسفات) به کوئینولینیک اسید تبدیل می‌گردد (شکل ۲–۳).

فسفوگلیسرآلدئید احتمالا به طور مستقیم از تثبیت کربن طی فرآیند فتوسنتز حاصل می‌شود به طوری که طی مدت بیوسنتز سریع آلکالوئیدها، ۱۷ درصد از کربن تثبیت شده توسط گیاه، صرف سنتز نیکوتین می‌شود (Bush, 2001).

۴– در میتوکندری‌ها، کوئینولینیک اسید با کمک آنزیم کوئینولینیک اسید فسفوریبوزیل ترانسفراز (QPT) به نیکوتینیک اسید مونونوکلئوتید (NaMN) تبدیل می‌شود.

در سال ۱۹۷۴، Mann و Byerrum اولین کسانی بودند که گزارش کردند فعالیت آنزیم QPT در ریشه بسیار زیاد است و این آنزیم در بیوسنتز نیکوتین مهم است. سپس Saunders و Bush (۱۹۷۹) دریافتند که غلظت نیکوتین در برگ با فعالیت آنزیم QPT در ریشه متناسب است. آنزیم QPT به عنوان یک آنزیم متابولیکی اولیه برای سنتز NAD و به عنوان یک آنزیم متابولیکی ثانویه برای سنتز چندین نوع آلکالوئید ضروری است (Zenkner *et al.*, 2019 ; Wagner et al. 1986). آنزیم QPT توسط ژن‌های تکراری (QPT1 وQPT2) در گونه‌های نیکوتیانا تاباکوم، نیکوتیانا سیلوِستریس، نیکوتیانا تومِنتوسیفورمیس و نیکوتیانا گلاکا کدگذاری می‌شوند (Ryan et al., 2012). پس از زخم شدن بافت‌های هوایی گیاه، فعالیت آنزیم QPT2 چندین برابر افزایش می یابد و این امر با افزایش تولید نیکوتین در زمان زخم شدن گیاه ارتباط دارد (Zenkner *et al.*, 2019; Sinclair et al., 2000).

۵– NaMN در چرخه پیریدین نوکلئوتید[1]وارد شده و سرانجام، نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD)[2]و سپس اسید نیکوتینیک تشکیل می‌گردد (شکل ۲–۴).

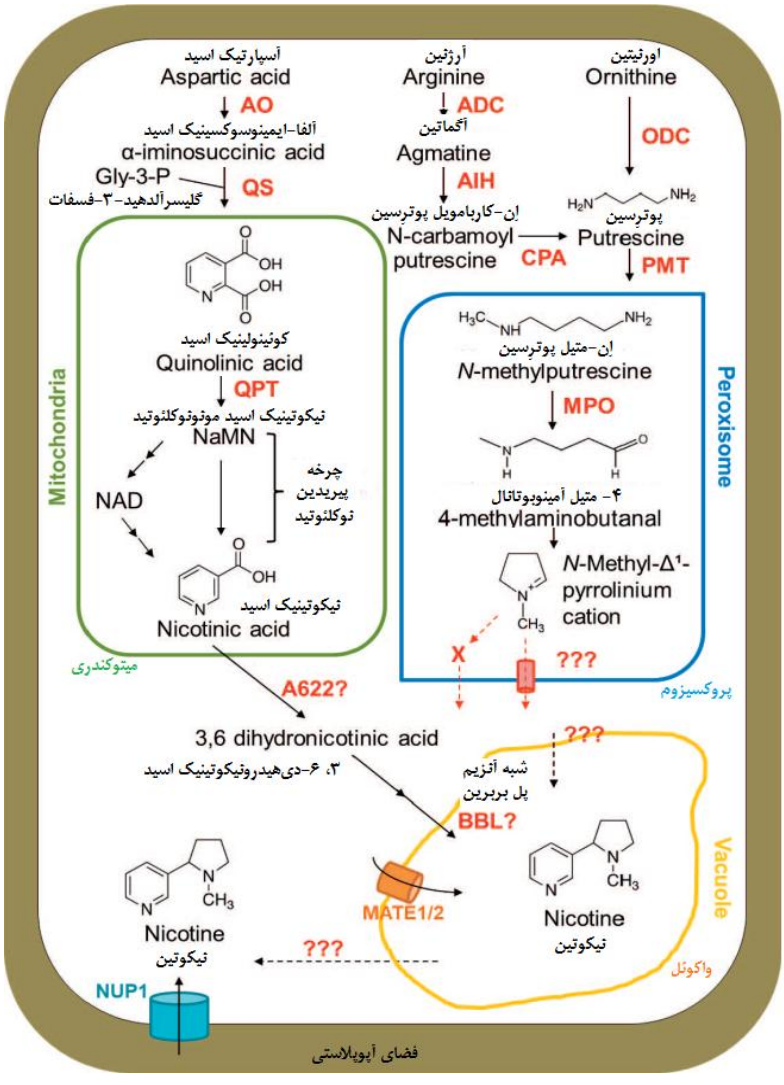
1 - Quinolinic acid synthase

۶– متابولیتی که از اسید نیکوتینیک مشتق می‌شود و در بیوسنتز نیکوتین به کار می‌رود دقیقا مشخص نیست (Zenkner *et al*., 2019). با این حال توافق بر این است که اسید نیکوتینیک ابتدا توسط اکسیدوردوکتاز (A622) که از اعضای خانواده فسفاتیدیل اینوزیتول فسفات[3](PIP) است، به ترکیب ۳،۶ –دی هیدرونیکوتینیک اسید[4]احیاء می‌شود (Leete, 1992). با این حال هنوز مشخص نیست که آیا آنزیم PIP به فرآیند احیاء اسید نیکوتینیک مربوط است (Kajikawa et al., 2009).

1 - The Pyridine nucleotide cycle
2 - Nicotine amid adenine dinucleotide (NAD)
3 -phosphatidylinositol phosphate
4 -3,6-dihydronicotinic acid

آنزیم A622 یکی از اعضای آنزیم‌های خانواده PIP مربوط به ردوکتازهای احیاءکننده NAD فسفات است که همسان با آنزیم فنیل‌کوماران بنزیلیک اتررودوکتاز (PCBER)، پتروکارپان ردوکتاز و ایزوفلاون ردوکتاز است (Min et al., 2003; Wang et al., 2006 ;). با این حال، با توجه به این که پتروکارپان‌ها و ایزو فلاونوئیدها، فیتوآلکسین‌هایی هستند که توسط نوع وحشی توتون تولید نمی‌شوند و هنوز ثابت نشده است که آنزیمA622 بتواند فعالیت آنزیم PCBER را انجام دهد، سوبسترای خاص آنزیم A622 هنوز نامشخص است (Yu et al., 2000 ; Shoji et al., 2002 ،Kajikawa et al., 2009). ولی به دلیل شباهت زیاد، این ژن‌ها ممکن است اخیراً متمایز شده باشند و احتمالاً سوبسترای آنزیم A622 از نظر ساختاری شبیه فیتوآلکسین‌ها باشد (Zenkner *et al.*, 2019). متوقف ساختن فعالیت آنزیم A622 در ریشه‌های توتون سبب می‌شود واکنش‌های تغلیظی در سنتز چندین آلکالوئید پیریدین متوقف گردد و در نتیجه نیکوتینیک اسید ان–گلوکوزید (NaNG) تجمع یابد. از آنجا که اسید نیکوتینیک خودش یک سوبسترا برای آنزیم A622 نیست و NaNG یک متابولیت اسید نیکوتینیک است، این سوال وجود دارد که آیا یکی از مشتقات اسید نیکوتینیک ممکن است به عنوان سوبسترای آنزیم A622 مورد استفاده قرار گیرد (Kajikawa et al., 2009؛ شکل ۲–۱).

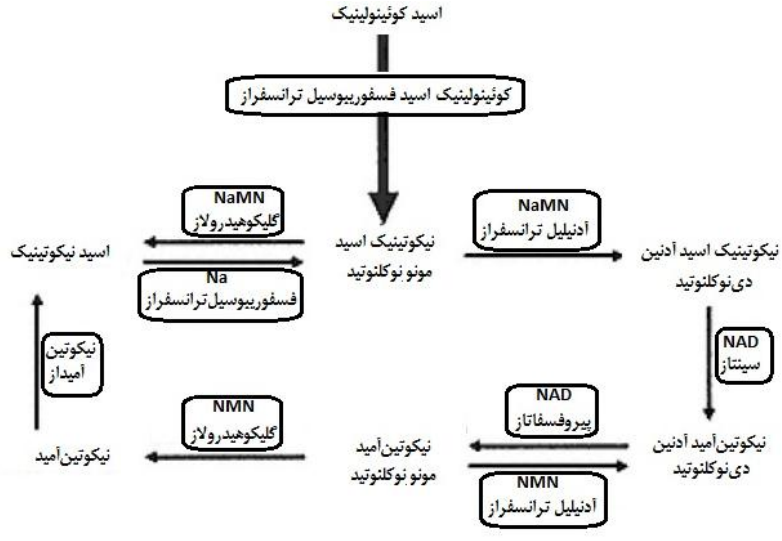
بیان ژن A622 مانند سایر ژن‌های ساختاری دخیل در سنتز نیکوتین، در ریشه رخ می‌دهد که شدت بیان آن در پوست نوک ریشه و در قشر خارجی پوست و آندودرم منطقه تمایز ریشه، بیشتر است (Kajikawa et al., 2009). در گونه نیکوتیانا سیلوِستریس، بیان A622 به شدت توسط متیل جاسمونات تنظیم می‌شود و اتیلن ممکن است به عنوان یک آنتاگونیست عمل کند و بیان A622 را متوقف سازد (Shoji et al., ; Shoji et al., 2002 2000).



شکل ۲- ۳- سنتز نیکوتین در سلول پوست ریشه توتون

AO: آسپارتات اکسیداز، QS: کوئینولینیک اسید سینتاز، QPT: کوئینولینات فسفوریبوزیل ترانسفراز ، ADC: آرژنین دکربوکسیلاز، ODC: اورنیتین دکربوکسیلاز، AIH: آگماتین ایمینوهیدرولاز، CPA: ان-کاربامویل پوترسین آمیدوهیدرولاز، PMT: پوترسین ان-متیل ترانسفراز، MPO: ان-متیل پوترسین اکسیداز، MATE1/2: ترکیبات چند دارویی و سمی خارج شده ۱ و ۲، NUP1: جذب نیکوتین ۱، ???: مرحله غیر متعارف، خانواده اکسیدوردوکتاز (A622)

منبع: Zenkner *et al.*, 2019



شکل ۲- ۴- شماتیک چرخه پیریدین نوکلئوتید

(منبع: Bush, 2001)

ب)- تشکیل حلقه پیرولیدین: برای تشکیل حلقه پیرولیدین مراحل زیر لازم است طی شود:

۱-برای شروع تشکیل حلقه پیرولیدین لازم است پوترِسین فراهم شود (Sun et al., 2013؛ شکل ۲-۳) پوترِسین ممکن است از طریق دو مسیر تشکیل گردد (Bortolotti *et al.*, 2004):

- **مسیر مستقیم:** اسید آمینه اورنیتین[1] توسط آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC)[2] به پوترِسین تبدیل می‌شود.

1 - Ornithine
2 - Ornithine decarboxylase (ODC)

فعالیت آنزیم ODC در ریشه بخصوص بعد از گل‌زنی بوته، بیشتر از فعالیت آن در برگ می‌باشد (Mizusaki, 1973). در ژنوتیپ‌هایی که مقدار آلکالوئید آنها در حد معمول و بیشتر است، فعالیت آنزیم‌های ODC و سیترات سینتاز موقع سنتز آلکالوئیدها، افزایش پیدا می‌کند (Pudliner, 1980). هر چند فعالیت ODC بیشتر در حیوانات و قارچ‌ها مشاهده می‌شود (Bortolotti et al., 2004) با این حال، نقش ODC در بیوسنتز نیکوتین برجسته‌تر است (DeBoer et al., 2011). در گیاهانی که ظرفیت تولید آناتابین در آنها بالاتر است فعالیت این آنزیم مختل می‌شود (DeBoer et al., 2011 ، Shoji et al., 2010) و این سبب می‌شود عرضه پوترِسین مورد نیاز برای تشکیل حلقه پیرولیدین غیرمتعادل و کمتر شود در نتیجه، مشتقات مسیر پیریدین به جای مصرف در مسیر بیوسنتز نیکوتین، تجمع یافته و در مسیر بیوسنتز آناتابین مصرف گردند (Chintapakorn and Hamill, 2007، Wang et al., 2009).

- **مسیر غیرمستقیم:** ابتدا اسید آمینه آرژنین[1] با دخالت آنزیم آرژنین دکربوکسیلاز (ADC)[2] دکربوکسیله شده و به آگماتین[3] تبدیل می‌شود. آگماتین توسط آنزیم آگماتین ایمینوهیدرولاز (AIH)[4] هیدرولیز شده و ان-کاربامویل‌پوترِسین[5] را تشکیل می‌دهد و این ترکیب توسط آنزیم ان-کاربامویل‌پوترِسین آمیدوهیدرولاز (CPA)[6] هیدرولیز شده و به پوترِسین تبدیل می‌گردد (Janowitz et al., 2003؛ شکل ۳). در گیاهان عالی، فعالیت ADC در بیوسنتز پوترِسین غالب است (Bortolotti et al., 2004).

1 - Arginine
2 -Arginine decarboxylase (ADC)
3 -Agmatin
4 -Agmatin iminohydrolase (AIH)
5 -N-carbamoyl putrescine
6 - N-carbamoyl putrescin amido hydrolase

۲– پس از تشکیل و فراهم شدن پوترِسین، تشکیل حلقه پیرولیدین توسط آنزیم‌های مختلف شروع می‌شود. ابتدا پوترِسین توسط آنزیم پوترِسین ان–متیل ترانسفراز (PMT)[1] به اِن–متیل پوترِسین[2] تبدیل می‌شود.

در چندین ژنوتیپ، میزان فعالیت آنزیم PMT در ریشه با مقدار نیکوتین برگ ارتباط دارد (Yoshida, 1973; Saunders & Bush, 1979). فعالیت آنزیم PMT در ریشه بخصوص بعد از گل‌زنی بوته، بیشتر از فعالیت آن در برگ می‌باشد (Mizusaki, 1973). در سال ۱۹۷۹، Saunders و Bush گزارش دادند که بعد از گل‌زنی بوته، فعالیت آنزیم PMT در ژنوتیپ‌هایی که مقدار آلکالوئید در آنها در حد معمول می‌باشد، افزایش می‌یابد.

آنزیم PMT در بافت دایره محیطیه (Pericycle) بیان می‌شود و فعالیت آن در قسمت نوک ریشه است (Xu and Timko, 2004 ; Shoji et al., 2002). نیکوتیانا تاباکوم برای رمزگذاری آنزیم فعال PMT دارای پنج ژن است که سه مورد از آنها شبیه ژن‌های گونه والد نیکوتیانا سیلوِستریس (یکی از والدهای گونه نیکوتیانا توبوکوم) است. در حالی که دو مورد دیگر شبیه ژن PMT موجود در گونه نیکوتیانا تومِنتوسیفورمیس می‌باشد (Riechers and Timko, 1999). البته ژن‌های مربوط به آنزیم PMTمنحصر به گونه‌های نیکوتیانا نیستند و در بسیاری از گونه‌های گیاهی که آلکالوئیدهای پیریدین و تروپان را بیوسنتز می‌کنند، شناسایی شده‌اند (Naconsie et al., 2014). شباهت‌های توالی نشان می‌دهد که در زمان تنوع‌سازی ژنتیکی در خانواده بادنجانیان، آنزیم PMT توتون از تکامل آنزیم اسپرمیدین سنتاز (SPDS) به وجود آمده است (Hashimoto et al., 1998).

1 - Putrescine N-methyltransferase (PMT)
2 - N-methylputrescine

۳- در پروکسی‌زوم سلولی[۱] آنزیم متیل‌پوترِسین اکسیداز (MPO)[۲]سبب تبدیل اِن-متیل پوترِسین به ۴-متیل آمینوبوتانال[۳] می‌گردد. آنزیم MPO، دآمیناسیون یا آمین‌زدایی اکسیداتیو ان-متیل پوترِسین را کاتالیز می‌کند (Naconsie et al., 2014).

فعالیت آنزیم MPO در ریشه بخصوص بعد از گل‌زنی بوته، بیشتر از فعالیت آن در برگ می‌باشد (Mizusaki, 1973). آنزیم MPO نوعی آنزیم آمین‌اکسیداز است که به کوفاکتور مس نیاز دارد (Heim et al., 2007 ; Katoh et al., 2007). اگرچه آنزیم MPO می‌تواند از سایر پلی‌آمین‌ها از جمله پوترِسین و کاداورین نیز به عنوان سوبسترا استفاده کند اما این آنزیم، ان-متیل پوترِسین را ترجیح می‌دهد (Moschou et al., 2012). در شرایط آزمایشگاهی اثبات شد که وقتی آنزیم MPO به جای ان-متیل پوترِسین از سوبسترای پوترِسین استفاده کند ابتدا نمک غیرمتیلی پیرولینیوم و سپس نورنیکوتین به طور مستقیم تولید می‌شود. اگر به جای ان-متیل پوترِسین از پیش ماده کاداورین استفاده شود، آنزیم MPO سبب سنتز آنابازین خواهد شد (Heim et al., 2007). پس، ترجیح سوبسترای ان-متیل پوترِسین نسبت به سایر سوبستراها توسط آنزیم MPO در گونه نیکوتیانا تاباکوم در تعیین ویژگی و نسبت آلکالوئیدهای آن نقش دارد، به طوری که در این گونه، نیکوتین آلکالوئید اصلی بوده و مقدار آلکالوئیدهای نورنیکوتین و آنابازین در مقام‌های بعدی قرار دارند (Heim et al., 2007).

آنزیم MPO1 نیکوتیانا تاباکوم (NtabMPO1) احتمالا از نسخه‌برداری ژنی و سپس تجدید عملکرد آنزیم دی‌آمین اکسیداز نیکوتیانا تاباکوم (NtabDAO1) حاصل شده باشد (Naconsie et al., 2014). در طی این فرآیند (تجدید عملکرد آنزیم)، عناصر سیس که آنزیم MPO را تحت کنترل جایگاه کروموزومی NIC2 در می‌آورند، در ناحیه پیش برنده این جایگاه کروموزومی ظاهر می‌شوند (Naconsie et al., 2014 ; Shoji and Hashimoto, 2011). علاوه بر این، در طی فرایند تجدید عملکرد آنزیم NtabDAO1، سوبسترای تخصصی آنزیم MPO1 به ان- متیل پوترِسین تغییر یافته است (Naconsie et al., 2014). با توجه به این که همولوگ‌های آنزیم MPO1 در ژنوم Solanum lycopersicum و Solanum tuberosum پیدا شدند لذا تکامل مولکولی MPO1 در اوایل تنوع‌سازی ژنتیکی خانواده بادنجانیان رخ داده است (Naconsie et al., 2014). در حقیقت در سایر گونه‌های بادنجانیان، آنزیم MPO در بیوسنتز چندین آلکالوئید مانند کالیستژین‌ها، هیوسی‌آمین و اسکوپول‌آمین نقش دارد (Bedewitz et al., 2014; Dräger, 2004).

[۱] در سلول گیاهی و جانوری، پراکسی‌زوم‌ها اندامک‌های تک‌غشایی پر از آنزیم درون سلولی هستند و فعالیت اکسیدازی و پراکسیدازی شدیدی دارند.

2 - Methylputrescine oxidase (MPO)

3 -4-methylaminobutanal

۴- سپس، ترکیب شیمیایی ۴-متیل آمینوبوتانال به طور خود به خود چرخش یافته و به کاتیون ان-متیل-دلتا-پیرولینیوم[1] تبدیل می‌شود که حاوی حلقه پیرولیدین است (Heim et al., 2007، شکل ۲-۳). کاتیون ان-متیل-دلتا-پیرولینیوم به عنوان یک کاتیون از غشاهای بیولوژیکی نفوذ نمی‌کند و برای انتقال آن به داخل سیتوپلاسم، یک ناقل لازم است (Naconsie et al., 2014؛ شکل ۱). احتمال دیگر این است که یک آنزیم پراکسی‌زومی ناشناخته ممکن است این کاتیون را با ترکیب دیگری متراکم یا تغلیظ کند و یک محصول نفوذپذیری را ایجاد کند که می‌تواند از غشاء سلولی عبور کند (Naconsie et al., 2014؛ شکل ۲-۱).

ج)- تشکیل نیکوتین: با دخالت شبه آنزیم پل بربرین (BBL[2])، ۳،۶ -دی هیدرونیکوتینیک اسید (حاصل از مسیر تشکیل حلقه پیریدین) و کاتیون ان- متیل-دلتا-پیرولینیوم (حاصل از مسیر تشکیل حلقه پیرولیدین) در واکوئل سلول تغلیظ یا متراکم شده و نیکوتین را تشکیل می‌دهند (Leete, 1992).

ژن‌های مربوط به BBL در واکوئل سلول‌های ریشه توتون بیان می‌شوند (Kajikawa et al., 2011). تمام ژن‌های رمزگذاری شده پروتئین آنزیم‌های دخیل در مسیر سنتز نیکوتین به عنوان ژن‌های ساختاری شناخته می‌شوند (Shoji et al., 2010). اخیراً، یک خانواده ژنی BBL در گونه نیکوتیانا تاباکوم شناسایی شده و که در انتهای مسیر بیوسنتز نیکوتین عمل می‌کنند (Lewis et al., 2015). با توقف ژن‌های BBL، بیوسنتز آناتابین متوقف می‌شود و این نشان می‌دهد که این ژن‌ها در مسیر پیریدین شرکت می‌کنند (Kajikawa et al., 2011).

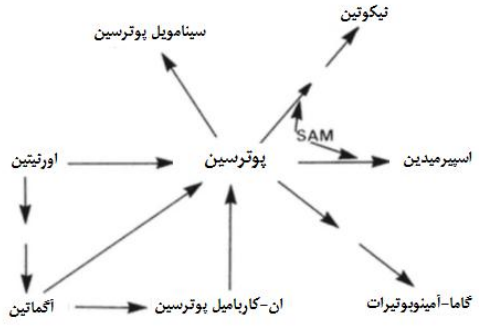
1 - N methyl-**Δ**'-pyrrolinium
2 - Berberine bridge enzyme-like (BBL)

۲-۵- عوامل موثر بر مراحل تنظیمی سنتز نیکوتین

۲-۵-۱-میزان فراهم بودن پوترِسین: مقدار نیکوتینی که در گیاه تشکیل می‌شود با قابلیت فراهمی پوترِسین ارتباط دارد (Bush, 2001). پوترِسین در چندین مسیر بیوسنتزی نقش اصلی را دارد و از آن محصولات مختلفی از جمله نیکوتین، سینامویل پوترِسین[1] پلی‌آمین‌ها[2]و گاما–آمینوبوتیریک اسید یا گابا[3](یکی از اجزای اصلی کروماتوگرام‌های توتون) تشکیل می‌شوند (شکل ۲– ۵).

در شرایطی که گیاه دچار کمبود بور، پتاسیم و گوگرد نیست، غلظت پوترِسین در توتون به طور معمول، پایین‌تر است و غلظت آن تنها در بافت‌هایی که فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC) در آنها بالاتر است، قابل توجه می‌باشد چه آنزیم ODC سبب تبدیل اورنیتین به پوترِسین می‌شود (Bush, 2001). پایین بودن غلظت پوترِسین در توتون همیشه به این معنی نیست که پوترِسین در گیاه به حد کافی سنتز نمی‌شود بلکه پوترسین ممکن است در چندین مسیر بیوسنتزی به طور سریع مصرف شده و به سایر ترکیبات شیمیایی تبدیل شود به طوری که علی‌رغم پایین بودن غلظت پوترِسین در توتون، تمام محصولات حاصل از پوترِسین در بافت‌های گیاه در برخی از مراحل رشد توتون، به مقدار زیاد (برای مثال، سینامویل پوترِسین در گل‌ها، برگ‌های جوان و خطوط سلولی[4]به مقدار ۵ تا ۹ درصد وزن خشک آنها) تجمع می‌یابند و در ژنوتیپ‌هایی از توتون که مقدار آلکالوئید در آنها به طور طبیعی پایین‌تر از سایر ژنوتیپ‌های توتون می‌باشد، پلی‌آمین‌هایی از جمله اسپریمیدین[5] بیشتر تجمع پیدا می‌کنند (Bush, 2001). بنابراین با در نظر گرفتن چندین مسیر بیوسنتزی برای تبدیل پوترِسین به سایر محصولات و پایین بودن غلظت آن در گیاه، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت پایین پوترِسین ممکن است سبب ایجاد محدودیت در سنتز نیکوتین شود.

1 - Cinnamoyl putrescine
2 - Polyamines
3 - γ-Aminobutyric acid (GABA)
4 - Cell lines
5 - Spermidine



شکل ۲-۵- نقش پوترِسین در مسیرهای متابولیکی توتون
(SAM مخفف اس-آدنوزیل متیونین می‌باشد)
(منبع:Bush, et al., 1993 با اجازه انتشار از Chapman & Hall)

۲-۵-۲- میزان فراهم بودن اس-آدنوزیل متیونین (SAM): در دو مسیر بیوسنتزی پوترِسین در گیاه یعنی مسیرهای تبدیل پوترِسین به نیکوتین (متیلاسیون[1]) و تبدیل پوترِسین به پلی‌آمین (آمینوپروپیلاسیون[2]) پیش‌ماده مشابهی به نام اس-آدنوزیل متیونین (SAM)[3] شرکت می‌کند. در مواقع تکثیر سریع سلولی مانند رشد تومور یا کالوز[4] پیش‌ماده SAM به جای صرف در تشکیل نیکوتین، صرف تشکیل پلی‌آمین می‌گردد و درنتیجه غلظت پلی‌آمین‌ها در گیاه افزایش و غلظت نیکوتین کاهش پیدا می‌کند. Purlliner در سال ۱۹۸۰ در گیاه توتون نشان داد که فعالیت کالوز در بوته‌هایی که گلزنی نمی‌شوند ۱۰ برابر بیشتر است (Bush, 2001).

هر گاه فعالیت آنزیم اورنیتین دکربوکسیلاز (ODC) در کالوز گیاه توتون بالاتر باشد پوترِسین به حد کافی سنتز می‌شود و برای بیوسنتز نیکوتین عامل محدود کننده نیست بلکه عامل محدود کننده،

1 - Methylation
2 - Aminopropylation
3 - S-adeno-sylmethionine
4 - Callus

غلظت پایین SAM است که در مسیر بیوسنتز پلی‌آمین مصرف شده و در نتیجه فراهمی آن برای سنتز نیکوتین دچار نقصان می‌شود (Bush, 2001).

۲-۵-۳- میزان فعالیت آنزیم پوترِسین ان-متیل ترانسفراز (PMT): فعالیت آنزیم پوترِسین ان-متیل ترانسفراز (PMT) که سبب تشکیل کاتیون ان-متیل-دلتا-پیرولینیوم می‌شود، عامل بسیار محدود کننده در مسیر سنتز نیکوتین می‌باشد بدین معنی که میزان فعالیت این آنزیم میزان تولید نیکوتین را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Bush, 2001) و جداسازی ژن مربوط به آنزیم PMT در توتون این گفته را تایید می‌کند (Hibi, et al., 1994).

۲-۵-۴-فعالیت آنزیم کوئینولینیک اسید فسفوریبوزیل ترانسفراز (QPT): چنان که قبلا اشاره شد، کوئینولینیک اسید با کمک آنزیم QPT ابتدا به نیکوتینیک اسید مونو نوکلئوتید تبدیل شده و سرانجام نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD) و نیکوتینیک اسید تشکیل می‌شود (Zenkner *et al.*, 2019) که اسید نیکوتینیک برای تشکیل بخش پیریدین مولکول نیکوتین مورد نیاز است. میزان فعالیت آنزیم QPT و در نتیجه میزان فراهمی و یا غلظت اسید نیکوتینیک در سلول‌های ریشه یک نقطه کلیدی جهت تنظیم سرعت بیوسنتز نیکوتین می‌باشد (Bush, 2001). عموما عقیده بر این است که آنزیم QPT عامل اصلی تنظیم کننده در فرآیند بیوسنتز نیکوتین می‌باشد و سایر آنزیم‌های چرخه پیریدین نوکلئوتید نیز نقش تنظیم‌کنندگی ثانویه بر سنتز اسید نیکوتینیک دارند که در شکل ۲-۴ نشان داده شده است (Bush, 2001).

طبق تحقیقات، فعالیت آنزیم QPT در اثر تحریک‌کنندگان خاص تجمع نیکوتین، افزایش یافته و سبب تجمع نیکوتین در تمامی ژنوتیپ‌ها به غیر از ژنوتیپ‌های هموزیگوت مغلوب (با غلظت پایین آلکالوئید) می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم QPT ظاهراً در بافت‌های تجمع کننده نیکوتین اختصاصی

است زیرا فعالیت سیترات‌سنتاز به عنوان یک آنزیم شاخص متابولیکی، تحت تاثیر ژنوتیپ‌ها و تیمارهای تحریک کننده تجمع الکالوئید قرار نمی‌گیرد (Pudliner, 1980).

نتیجه‌گیری بیوشیمی و فیزیولوژی این است که آنزیم QPT و آنزیم پوترِسین ان-متیل ترانسفراز (PMT) آنزیم‌هایی هستند که بیشترین محدودیت را در بیوسنتز دو پیش‌ماده مورد نیاز برای سنتز نیکوتین، ایجاد می‌کنند در حالی که سایر پیش‌ماده‌ها یا آنزیم‌های موجود در مسیر بیوسنتز نیکوتین ممکن است فقط در شرایط خاص، نقش تنظیم‌کنندگی داشته باشند (Bush, 2001).

۲-۵-۵-میزان فعالیت آنزیم اِن- متیل پوترِسین اکسیداز (MPO): اِن-متیل‌پوترِسین توسط آنزیم MPO به ۴-متیل آمینوبوتانال اکسید می‌شود. این آنزیم ممکن است در هماهنگی با آنزیم PMT تنظیم شود و یک کنترل ثانویه را در مسیر بیوسنتز نیکوتین ایفا کند (Bush, 2001). همراه با اکسیداسیون اِن-متیل‌پوترِسین و تبدیل آن به ۴-متیل آمینوبوتانال، مقداری ۴-آمینوبوتانال[1]نیز از اکسیداسیون مستقیم پوترِسین تشکیل می‌گردد که ممکن است پس از دهیدروژنه شدن[2]به اسید ۴-آمینوبوتیریک[3]و سپس به نورنیکوتین تبدیل شود در نتیجه مقداری نورنیکوتین از این مسیر نیز تشکیل گردد. با این واکنش ممکن است غلظت نیکوتین و نورنیکوتین در گیاه به طور نامتناسب افزایش یابد. فرض بر این است که دهیدروژنه شدن بسیار سریع ۴-آمینوبوتانال و تبدیل آن به نورنیکوتین، عامل اصلی غلظت نامتناسب نیکوتین و نورنیکوتین می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که پیش‌ماده ان-متیل‌پوترِسین عامل اصلی تنظیم کننده تجمع نیکوتین یا نورنیکوتین در

1 -4-aminobutanal
2 - Dehydrogenation
3 - 4-aminobutyric acid

گونه‌های نیکوتینا نیست بلکه این آنزیم MPO است که ممکن است در هماهنگی با آنزیم PMT تنظیم شود و یک کنترل ثانویه را در مسیر بیوسنتز نیکوتین ایفا کند (Bush, 2001).

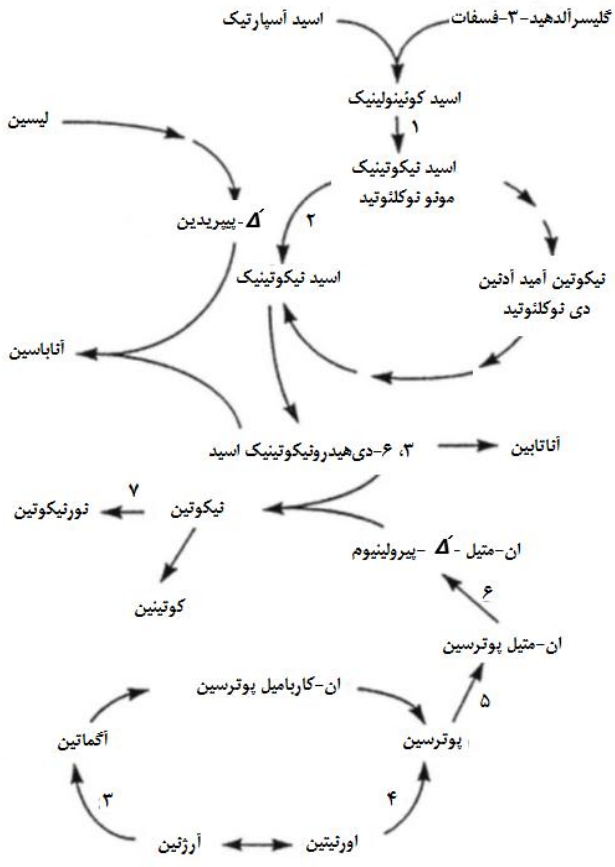
۲-۶- سنتز سایر آکالوئیدها

جالب است بدانید که هر کدام از آلکالوئیدهای موجود در توتون از یک سری اسیدهای آمینه خاصی تشکیل می‌شوند به طوری که نیکوتین و نورنیکوتین از اسید نیکوتینیک، متیونین[1] کولین[2] اورنیتین[3] و پرولین[4] آنابازین از اسید نیکوتینیک و لیسین[5] و آناتابین از دو مولکول اسید نیکوتینیک به وجود می‌آیند. هارمن‌ها از تریپتوفان[6] و پیروکل[7] از پیرولین[8] مشتق می‌شوند (Schmeltz and Hoffmann, 1977).

نورنیکوتین به عنوان یکی از چهار آلکالوئید اصلی توتون، عمدتا توسط آنزیم نیکوتین دمتیلاز و از طریق واکنش دمتیلاسیون نیکوتین در طی رسیدگی برگ و عمل‌آوری آن تشکیل می‌گردد که تقریباً یک واکنش برگشت‌ناپذیر است (Leete, 1984). هر چند که آنزیم نیکوتین دمتیلاز در کل بافت‌های گیاه یافت می‌شود ولی این واکنش در برگ اتفاق می‌افتد و این آنزیم فقط با وجود نیکوتین بیان و فعال می‌شود (Bush, 2001). در تعدادی از گونه‌های نیکوتینا مانند نیکوتیانا اوتوفورا[9] نورنیکوتین به عنوان آلکالوئید اصلی است در این گونه، مقدار قابل توجهی آنزیم نیکوتین دمتیلاز وجود دارد به طوری که برای بررسی خصوصیات آنزیم نیکوتین دمتیلاز، این آنزیم از گونه نیکوتیانا اوتوفورا استخراج و مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chelvarajan, et al., 1993). غیرفعال

1 - Methionine
2 - Choline
3 - Ornithine
4 - Proline
5 - Lysine
6 - Tryptophana
7 - Pyrocoll
8 - Piroline
9 - N. otophora

کردن آنزیم نیکوتین دمتیلاز در نیکوتیانا تاباکوم ممکن است سبب بهبود کیفیت آلکالوئیدهای آن شود (Bush, 2001). آناباسین و آناتابین مانند نیکوتین از طریق واکنش‌های تغلیظ دکربوکسیلاسیون[1] تشکیل می‌شوند ولی هنوز مشخص نیست که آیا این واکنش‌ها با همان آنزیم‌ها کاتالیز می‌شوند. مسیرهای بیوسنتز آلکالوئید توتون در شکل ۶ خلاصه شده است (Bush, 2001).



شکل ۲-۶- مسیر بیوسنتز آلکالوئید در توتون

آنزیم‌های دخیل در فرایند تشکیل آلکالوئیدها با شماره نشان داده شده است که شماره‌های ۱= کوئینولینیک اسید فسفوریبوزیل ترانسفراز، ۲= نیکوتینیک اسید مونونوکلئوتید گلیکوهیدرولاز، ۳= آرجینین دکربوکسیلاز، ۴= اورنیتین دکربوکسیلاز، ۵= پوترِسین متیل ترانسفراز، ۶= متیل‌پوترِسین اکسیداز، ۷= نیکوتین دمتیلاز، (منبع: Bush, 2001)

1 - Decarboxylation condensation reactions

به نظر می‌رسد بیوسنتز آناتابین کاملاً تابع فعالیت آنزیم کوئینولینیک اسید فسفریبوزیل ترانسفر (QPT) موجود در چرخه پیریدین نوکلئوتید و یک سنتاز باشد. در مقایسه با آنابازین، بیوسنتز آناتابین شباهت بیشتری به بیوسنتز نیکوتین دارد. بسیاری از آلکالوئیدهای فرعی احتمالا از متابولیسم فرعی[1] یا از محصولات کاتابولیکی آلکالوئیدهای اصلی تولید می‌شوند (Bush, 2001). علاوه بر این، نیکوتین احتمالا پیش‌ماده لازم برای تشکیل ترکیباتی است که حین عمل‌آوری و فرآوری برگ توتون تشکیل می‌شوند (Schmeltz, 1972).

۲-۷- تاثیر ژنتیک گیاهی بر سنتز نیکوتین

ژنتیک گیاهی تاثیر عمده روی غلظت و مقدار نیکوتین برگ دارد. به طور طبیعی، تنوع ژنتیکی قابل‌ملاحظه‌ای برای انباشت آلکالوئید در بین ارقام مختلف توتون وجود دارد و میزان آلکالوئید در آنها بین ۰/۰۲ تا ۶/۵۵ درصد وزن خشک می‌باشد (Sisson and Saunders, 1982). هر چند غلظت نیکوتین در توتون توسط تعدادی ژن کنترل می‌گردد ولی مقدار نیکوتین برگ توتون تا حد زیادی تحت تاثیر محیط قرار می‌گیرد (Henry *et al.*, 2019). میزان تجمع آلکالوئیدهای نیکوتین و نورنیکوتین در توتون از لحاظ ژنتیک گیاهی مورد بحث قرار گرفته است. کنترل ژنتیکی این دو نوع آلکالوئید از هم متفاوت می‌باشد و جهت موفقیت در برنامه‌های بیولوژی مولکولی، درک مکانیسم تنظیمی هر کدام از آنها بسیار مهم هست تا بتوان مقدار و نسبت هر کدام از آلکالوئیدهای برگ توتون را تغییر داد (Bush, 2001).

1 - Aberrant metabolism

دو جایگاه کرموزومی[1]به نام NICl و NIC2 یا A و B در توتون وجود دارند که به طور اختصاصی بیان ژن‌های ساختاری مربوط به سنتز نیکوتین را کنترل می‌کنند (Legg, et al., 1969، Zenkner *et al.*, 2019). در ارقام تجاری توتون، آلل‌های این دو جایگاه کروموزومی، غالب هموزیگوت هستند. در حالی در زمینه اصلاح نباتات موتاسیونی، آلل‌های جهش یافته[2]این دو جایگاه کروموزومی، مغلوب هستند و لذا غلظت نیکوتین را در حد پایین حفظ می‌کنند (Bush, 2001). در تحقیق Lewis در سال ۲۰۱۸، آلل‌های مغلوب جایگاه‌های کرموزومی nic1 و nic2 مربوط به توتون سیگار برگ به توتون گرمخانه‌ای منتقل شد و این کار سبب شد مقدار نیکوتین توتون گرمخانه‌ای حدود ۰/۲ تا ۰/۴ درصد کاهش یابد ولی این تغییر سبب کاهش عملکرد و کیفیت برگ عمل‌آوری شده توتون نیز گردید لذا این رقم توتون به طور تجاری کشت نگردید (Henry *et al.*, 2019).

چنانکه قبلا اشاره گردید نیکوتین در اثر دمتیلاسیون یا متیل‌زدایی به نورنیکوتین تبدیل می‌شود. علاوه بر دو جایگاه کروموزومی NICl و NIC2 در نیکوتیانا تاباکوم، دو جایگاه کروموزومی بالقوه نیز برای بیان فرآیند دمتیلاسیون[3]در این گونه وجود دارد که از دو گونه والد خود به نام نیکوتیانا تومِنتوسیفورمیس[4]و نیکوتیانا سیلوِستریس[5]به آن منتقل شده است. وجود تنها یک آلل غالب در هر یک از دو جایگاه کروموزومی بالقوه کافی است تا دمتیلاسیون اتفاق بیافتد و نیکوتین به نورنیکوتین تبدیل شود. ژن انتقال یافته از والد نیکوتیانا تومِنتوسیفورمیس به نیکوتیانا تاباکوم، سبب دمتیلاسیون نیکوتین قبل از عمل‌آوری برگ می‌شود در حالی که ژن انتقال یافته از والد نیکوتیانا سیلوِستریس سبب دمتیلاسیون نیکوتین در طی مدت عمل‌آوری برگ می‌گردد. به نظر می‌رسد ژن مربوط به والد نیکوتیانا تومِنتوسیفورمیس در ارقام تجاری نیکوتیانا تاباکوم فعال است که قبل از عمل‌آوری برگ،

1 - Two nonlinked loci
2 - Mutant alleles
3- Demethylation
4 - N. tomentosiformis
5 - N. sylvestris

سبب متیل‌زدایی نیکوتین و تبدیل آن به نورنیکوتین می‌شود. با توجه به این که نورنیکوتین تاثیر منفی روی کیفیت دود توتون دارد، لذا محققین اصلاح نباتات به طور مداوم، غلظت نورنیکوتین را در ژنوتیپ‌های توتون تحت نظر دارند (Bush, 2001). نورنیکوتین به عنوان پیش‌ماده لازم برای تشکیل یک ماده سرطان‌زا به نام ان– نیتروزو نورنیکوتین[1] می‌باشد (Henry *et al.*, 2019). لازم به ذکر است که غلظت و نسبت نیکوتین و نورنیکوتین در برگ توتون علاوه بر این که به ژنتیک گیاهی بستگی دارد، تحت تاثیر عوامل محیطی و عملیات زراعی نیز قرار می‌گیرد (Bush, 2001).

مکانیسم ژنتیکی که به طور طبیعی از آن می‌توان برای کاهش یا تغییر مقدار نیکوتین برگ استفاده کرد، رمزگذاری ژن‌ها و فعال‌سازی آنزیم‌های نیکوتین دمتیلاز می‌باشد که با فعال شدن آنها، غلظت نیکوتین برگ به کمتر از ۰/۸ درصد کاهش می‌یابد با این حال، چنین واریته‌هایی به دلیل داشتن غلظت بالای نورنیکوتین غیرقابل قبول تلقی می‌شوند. همچنین برای ایجاد تنوع و تغییرپذیری ژنتیکی جدید به منظور کاهش غلظت نیکوتین برگ توتون می‌توان از اصلاح نباتات موتاسیونی یا جهشی[2] ویرایش ژن و مهندسی ژنتیک استفاده نمود. مجموعه‌ای از ژن‌های دخیل در بیوسنتز نیکوتین شناسایی شده‌اند (Dewey and Xie, 2013) و با کاهش یا متوقف کردن بیان این ژن‌ها، غلظت نیکوتین در برگ توتون کاهش پیدا می‌کند (Lewis, 2018). به عنوان مثال، تحقیقات نشان داده است که از طریق اصلاح نباتات موتاسیونی یا مهندسی ژنتیک می‌توان ژن خانواده شبه آنزیم پل بربرین (BBL) را غیرفعال نمود و غلظت نیکوتین برگ توتون را حدود ۰/۴ درصد کاهش داد (Henry *et al.*, 2019). با این حال، مقرراتی که در دنیا وضع می‌شود تولید تجاری واریته‌های گیاهی را از طریق ویرایش ژن و یا مهندسی ژنتیک، با چالش مواجه کرده است.

1 - N'-nitrosonornicotine
2 - Mutation breeding

۲-۸- انتقال نیکوتین از محل بیوسنتز (ریشه) به بخش هوایی گیاه توتون

چنان که قبلا اشاره گردید نیکوتین در سلول‌های پوست ریشه سنتز می‌شود. تجمع زیاد نیکوتین در سلول‌های پوست ریشه ممکن است باعث مهار بازخورد یا فیدبک ژن‌های دخیل در سنتز آن شود (Wang et al., 2015) لذا لازم است نیکوتین از ریشه به بخش هوایی گیاه منتقل شود تا غلظت آن در سیتوپلاسم سلول‌های ریشه کاهش یافته و بیوسنتز نیکوتین در ریشه ادامه یابد (Shoji et al., 2009). در واقع، بخش عمده نیکوتین به بافت‌های بخش هوایی گیاه بخصوص برگ‌ها، منتقل می‌شود (Hildreth et al., 2011).

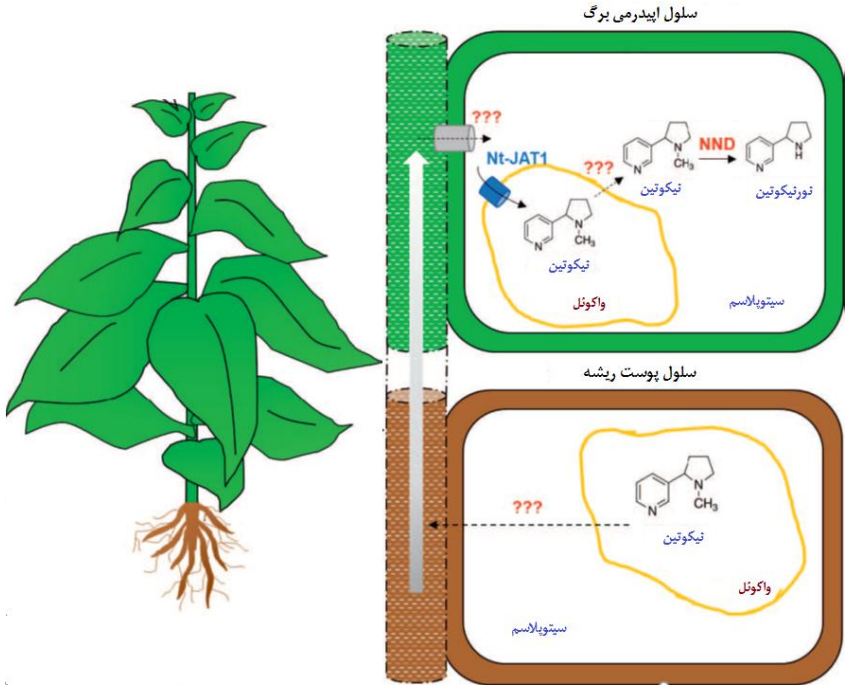
انتقال نیکوتین از ریشه تا برگ به عنوان انتقال مسیر طولانی[1] بوده که از طریق آوند چوبی صورت می‌گیرد و در این مسیر لازم است چندین ناقل به انتقال نیکوتین کمک کنند (Shitan et al., 2015).

ناقل‌های نیکوتین: نیکوتین بعد از سنتز در واکوئل سلول‌های پوست ریشه لازم است مسیری را طی کرده و در نهایت به واکوئل سلول‌های برگ منتقل شود در این مسیر، نیکوتین با کمک ناقل‌ها از چندین غشای سلولی (غشای پلاسمایی) و غشای واکوئلی (تونوپلاست) در ریشه و اندام‌های هوایی عبور می‌کند (Zenkner *et al.*, 2019).

ناقل‌های غشای واکوئلی (تونوپلاست) ریشه و برگ: در تونوپلاست واکوئل سلول پوست ریشه، دو ناقل خارج کننده ترکیب سمی نوع MATE[2] یعنی NtMATE1 و NtMATE2 شناسایی شده‌اند که در مجموع ناقل‌های NtMATE1/2 نامیده می‌شوند. این ناقل‌های آنتی‌پورت (پادبر)، نیکوتین را از واکوئل به سیتوپلاسم منتقل می‌کند (Zenkner *et al.*, 2019).

1 - Long-distance transport

2 - The multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type transporters



شکل ۲–۷– انتقال نیکوتین از واکوئل سلول پوست ریشه به واکوئل سلول اپیدرمی برگ توتون

(منبع: Zenkner *et al.*, 2019)

ناقل دیگر از خانواده MATE، ناقل ۱ الکالوئیدی در نیکوتیانا تاباکوم[1]است که در تونوپلاست سلول اپیدرمی بخش هوایی گیاه واقع است و توسط جاسمونات القاء و یا تحریک می‌شود و لذا با Nt-JAT1 نشان داده می‌شود (Zenkner *et al.*, 2019). در واقع این ناقل در تجمع نیکوتین در واکوئل سلول‌های بخش هوایی گیاه توتون دخیل است (شکل ۲–۷). بیان ژن ناقل Nt-JAT1 در ریشه، ساقه و برگ تشخیص داده شده است، اما در شرایط فعلی، محققان پی برده‌اند که محل درون سلولی این ژن در تونوپلاست سلول‌های برگ قرار دارد (Morita et al., 2009) و برای روشن شدن

1 - *N. tabacum* jasmonate-inducible alkaloid transporter 1 (Nt-JAT1)

نقش Nt -JAT1 و موقعیت آن در سلول‌های ریشه و ساقه، تحقیقات بیشتری مورد نیاز است (Zenkner *et al.*, 2019).

یک ناقل مشابه با Nt-JAT1 به نام Nt- JAT2، در تونوپلاست سلول‌های برگ توتون کشف شده است. ناقل Nt- JAT2 به طور خاص در انتقال نیکوتین از سیتوپلاسم به لومن یا حفره وکوئلی[1] سلول‌های برگ نقش دارد. نظر محققین بر این است که ناقل Nt -JAT1 در انتقال ماندگار آلکالوئید در تونوپلاست بافت‌های مختلف، نقش بازی می‌کند در حالی که Nt- JAT2 صرفا در انتقال نیکوتین به داخل واکوئل سلول‌های برگ و در نتیجه تجمع نیکوتین در برگ نقش دارد (Shitan et al., 2014).

ناقل‌های غشای سلولی ریشه و برگ: چنان چه بیان گردید، در سلول پوست ریشه، نیکوتین توسط ناقل‌های تونوپلاست به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. نیکوتین موجود در سیتوپلاسم سلول‌های ریشه ممکن است به خارج از سلول یعنی آپوپلاست ترشح یا منتقل شده و از آنجا به ریزوسفر مترشح شود ولی گیاه از ترشح نیکوتین به ریزوسفر جلوگیری می‌کند چون از نظر انرژی، این موضوع برای گیاه از اهمیت زیادی برخوردار است (Hildreth et al., 2011). برای این کار، یک ناقل پرماز جذب نیکوتین۱ (NUP1)[2]در غشایی پلاسمایی سلول ریشه قرار دارد که از خانواده پرماز جذب پورین[3]است (شکل ۲–۳) و عمدتا برای سوبسترای نیکوتین اختصاصی شده است (Hildreth et al., 2011، Kato et al., 2014). ناقل NUP1 با جلوگیری از ترشح نیکوتین از سیتوپلاسم به آپوپلاست سلول ریشه، از هدرروی نیکوتین ممانعت می‌کند یا حتی این ناقل ممکن است نیکوتین ترشح شده از سلول را در بافت‌های ریشه بازیابی کند (Kato et al., 2014). ناقل NUP1 سیمپورت یا همبر

1 - Vacuolar lumen
2 - Nicotine uptake permease 1 (NUP1)
3 - Purine uptake permease family

پروتون را برای جذب نیکوتین به داخل سلول به کار می‌برد (Hildreth et al., 2011) یعنی این ناقل نیکوتین را از آپوپلاست به داخل سیتوپلاسم منتقل می‌کند. اگرچه ناقل NUP1 در برگ و ساقه گیاهان توتون نیز تا حد کمی بیان می‌شود ولی بیان NUP1 در درجه اول در سلول‌های اپیدرمی نوک ریشه رخ می‌دهد.

در ریشه، ناقل‌های مسئول بارگیری نیکوتین از سیتوپلاسم به آوند چوبی ریشه و همچنین ناقل‌های تخلیه نیکوتین از آوند چوبی به سلول‌های برگ، ناشناخته باقی مانده‌اند (Wang et al., 2015، شکل ۲–۷). با توجه به این که شرایط فضای آپوپلاست سلولی، اسیدی است لذا آلکالوئیدها در آن پروتونه شده و با باردار شدن الکتریکی، آبدوست‌تر می‌شوند و در نتیجه انتقال آنها از طریق غشای پلاسمایی به درون سلول برگ سخت‌تر می‌شود (Morita et al., 2009). بنابراین، حدس زده می‌شود که یک ناقل مانند NUP1، در غشایی پلاسما سلول برگ واقع است که ممکن است نیکوتین را از آوند چوبی به داخل سلول‌های برگ وارد می‌کند (Jelesko, 2012). بنابراین، برای کشف کل مکانیسم انتقال نیکوتین، مطالعات بیشتری لازم است (Zenkner *et al.*, 2019).

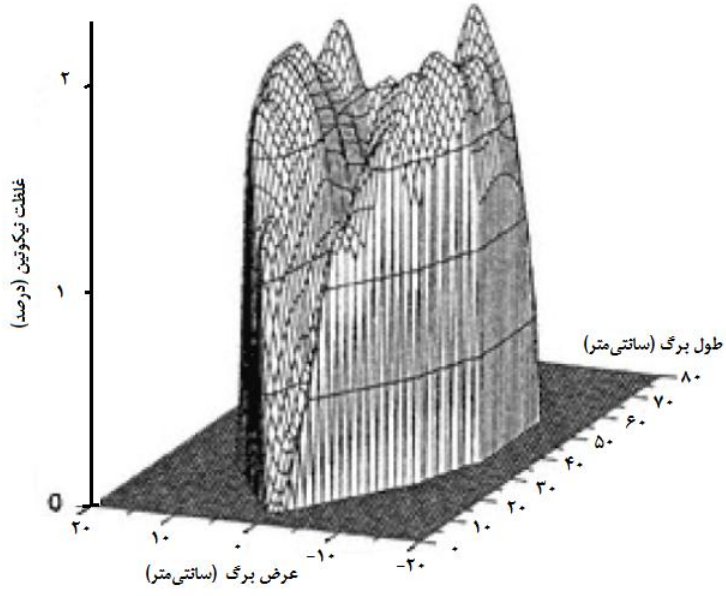
۲–۹–توزیع آلکالوئیدها در اندام‌های مختلف گیاه

توزیع نسبی نیکوتین و آلکالوئیدهای فرعی در نقاط مختلف برگ مشابه هم هستند. غلظت یا مقدار آلکالوئیدها در واحد وزن خشک اندام‌های مختلف توتون بسیار متفاوت است. معمولا غلظت آلکولوئیدها در پهنک برگ بیشترین است و غلظت آن در ریشه، رگبرگ اصلی، دمار، گل و بذر به ترتیب کاهش می‌یابد. هر چند، غلظت آلکالوئید در نوک ریشه‌ها (محل سنتز نیکوتین) معمولا بیشتر از پهنک برگ می‌باشد ولی میانگین غلظت آلکالوئید در ریشه‌ها کمتر از پهنک برگ می‌باشد. غلظت آلکالوئید در پهنک برگ حدود ۵ برابر بیشتر از غلظت آن در رگبرگ اصلی و ۸/۳ برابر بیشتر از

غلظت آن در دمارهای برگ بوده و در زمان گل‌دهی بوته، غلظت آلکالوئیدها در اندام گل حدود ۱۰ برابر کمتر از غلظت آن در برگ‌های بالای بوته می‌باشد. مقدار آلکالوئیدهای آزاد در بذر توتون بسیار پایین است ولی در روش عصاره‌گیری آنها با یک حلال اسید قوی، مقدار ۰/۳۷ میلی‌گرم آلکالوئید از هر گرم ماده خشک بذر استخراج می‌شود (Bush, 2001).

توزیع آلکالوئیدها در نقاط مختلف سطح برگ برای استفاده از آن در تولید محصولات دخانی، بسیار مهم است. رگبرگ اصلی برگ از قاعده تا نوک برگ ادامه دارد و غلظت آلکالوئید در رگبرگ اصلی از سمت قاعده تا به سمت نوک برگ، افزایش پیدا می‌کند (در شکل ۸ مشخص نیست) و با فرض فاصله از نوک برگ، بیشترین کاهش آن در فاصله ۲۵ تا ۳۰ درصدی طول برگ رخ می‌دهد (فرض کنید طول برگ ۸۰ سانتی‌متر باشد در این صورت بیشترین کاهش آلکالوئید رگبرگ اصلی از نوک برگ شروع شده و تا فاصله ۲۰ تا ۲۴ سانتی‌متری از نوک برگ ادامه می‌یابد پس از آن، شیب تغییرات کم می‌شود). غلظت آلکالوئید در رگبرگ‌های فرعی بیشتر از رگبرگ اصلی می‌باشد و غلظت آلکالوئید در رگبرگ‌های فرعی نزدیک نوک برگ بیشتر از غلظت آن در رگبرگ‌های فرعی نزدیک قاعده برگ است و همچنین غلظت آلکالوئید در رگبرگ فرعی از حاشیه برگ به سمت رگبرگ اصلی یا وسط برگ کاهش می‌یابد غلظت آلکالوئید در پهنک وسط برگ در مقایسه با پهنک حاشیه برگ کمتر است. غلظت آلکالوئید در حاشیه قاعده برگ بسیار بیشتر از سایر بخش‌های برگ است (Bush, 2001).

برای اندازه‌گیری میانگین غلظت آلکالوئید در برگ لازم است ۳ تا ۶ سانتی‌متر از بخش متقاطع در یک سوم از نوک برگ نمونه‌برداری شود (Bush, 2001).



شکل ۲-۸- توزیع نیکوتین در برگ عمل‌آوری شده

در محور طول برگ، اعداد نشان‌دهنده فاصله از نوک برگ است که عدد ۰ در این محور بیانگر نوک برگ است. در محور عرض برگ (محور افقی)، عدد صفر بیانگر وسط عرض برگ است که رگبرگ اصلی واقع است که اعداد منفی ۱۰- و ۲۰- نشان دهنده فاصله از وسط عرض برگ، در نیمه چپ برگ است و اعداد ۱۰ و ۲۰ نشان دهنده فاصله از وسط عرض برگ، در نیمه راست برگ است. برای اندازه‌گیری نیکوتین در رگبرگ اصلی نوک برگ، ۸ میلی‌متر از رگبرگ اصلی نوک برگ برداشته شد.

(منبع:Bush, 2001)

۲-۱۰-سیگارت و اجزای دود آن

۲-۱۰-۱- دود کردن سیگارت در ماشین دود: قبل از این که به سرنوشت نیکوتین در دود توتون پرداخته شود لازم است مطالبی مختصر در مورد نحوه تشکیل دود و فرآیندهایی که در یک سیگارت در حال احتراق اتفاق می‌افتد، بیان شود. افراد سیگاری محصولات دخانی را به شیوه‌های مختلف مصرف می‌کنند برای مثال در موقع مصرف سیگارت، برخی از پارامترها از جمله حجم دود، مدت زمان پک‌زدن و فاصله بین پک‌ها در افراد متفاوت است به طوری که دامنه تغییر حجم پک ۲۰ تا ۸۰ سانتی‌مترمکعب، مدت زمان پک ۰/۸ تا ۳ ثانیه، فاصله زمانی بین پک‌ها ۲۰ تا ۱۰۰ ثانیه و

طول ته سیگارت برای سیگارت‌های بدون فیلتر ۱۹ تا ۲۸ میلی‌متر می‌باشد در نتیجه مقدار یا راندمان دریافت هر کدام از ترکیبات شیمیایی موجود در دود از جمله نیکوتین، توسط آنها فرق خواهد کرد. به منظور مقایسه نتایج بین آزمایشگاه‌ها و نتایج بین سیگارت‌ها، برای دود کردن سیگارت‌ها از ماشین سیگارت دودکنی (ماشین دود) استفاده می‌شود که تحت شرایط استانداردهای بین‌المللی مورد توافق، سیگارت‌ها سوزانده می‌شوند تا محصولات دود آنها اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گیرد. حجم دود در ماشین دود ۳۵ سانتی‌مترمکعب، مدت زمان پک ۲ ثانیه، فاصله زمانی بین پک‌ها یک دقیقه، طول ته سیگارت ۲۳ میلی‌متر (برای سیگارت بدون فیلتر) و یا طول کاغذ چوب پنبه[1] به اضافه ۳ میلی‌لیتر (برای سیگارت‌های فیلتردار) است. دود خارج شده از انتهای ته سیگارت بلافاصله به درون فیلتر کمبریج وارد می‌شود. این فیلتر ذرات معلق بزرگتر از ۰/۱ میکرومتر موجود در دود را با راندمان ۹۹/۹ درصد جذب می‌کند که به این ذرات معلق، مواد معلق کل دود سیگارت[2] یا مواد معلق کل مرطوب یا کندانزات دود سیگارت[3] گویند که شامل قطران، آب و نیکوتین است. با این توصیف، قطران در واقع کندانزات خشک و عاری از نیکوتین است که به آن مواد معلق خشک عاری از نیکوتین[4] نیز می‌گویند (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵ و Baker, 2001). آلکالوئیدها از جمله نیکوتین، توسط فیلتر کمبریج جذب می‌شوند (نیکوتین ۸۵ تا ۹۰ درصد آلکالوئیدها را تشکیل می‌دهد).

به طور کلی دود توتون دارای دو فاز است:

–فاز ذرات دود: بخشی از ذرات معلق دود که بر روی فیلتر کمبریج جذب می‌شوند.

–فاز گاز دود: بخشی از ذرات معلق دود که از فیلتر کمبریج عبور می‌کنند.

1 - Tipping paper
2 - Total particulate matter, TPM
3 - Cigarette smoke condanzate
4 - Nicotine-free-dry-particulate-matter (NFDPM)

لازم به یادآوری است که برخی از مواد هم در فاز گاز دود و هم در فاز ذرات آن وجود دارند برای مثال، ۵۰ درصد از سیانید هیدروژن دود جذب فیلتر کمبریج شده و بقیه ۵۰ درصد آن از فیلتر عبور می‌کند در حالی که ۱۰۰ درصد نیکوتین جذب فیلتر کمبریج می‌شود. موادی با وزن مولکولی کمتر از ۶۰ گرم، عمدتا در فاز گازی دود و موادی با وزن مولکولی بیش از ۲۰۰ گرم در فاز ذرات دود موجود هستند. همچنین هر چه قطبیت مولکول بالاتر باشد، بیشتر به فیلتر جذب می‌شود.

–بخش نیمه فرار دود[1] به موادی در دود اطلاق می‌شود که در دمای معمولی اتاق، جذب فیلتر کمبریج می‌شوند ولی در دامنه دمایی معین (۱۰۰ تا ۲۰۰ درجه سلسیوس)، از روی فیلتر تبخیر می‌شوند. مقدار این ترکیبات در دود سیگارت نسبتا کم بوده و حدود ۵ درصد از مواد جذب شده روی فیلتر کمبریج را به خود اختصاص می‌دهند. این ترکیبات شامل هیدروکربن‌ها، الکیل بنزن‌ها[2] نفتالن‌ها[3] کتون‌ها[4] پیریدین‌ها، فنل‌ها[5] فوران‌ها[6] پیرازین‌ها[7] ایندن‌ها[8] ایندول‌ها و ایندان‌ها[9] هستند (Baker, 2001).

۲-۱۰-۲- بخش‌های مختلف سیگارت روشن

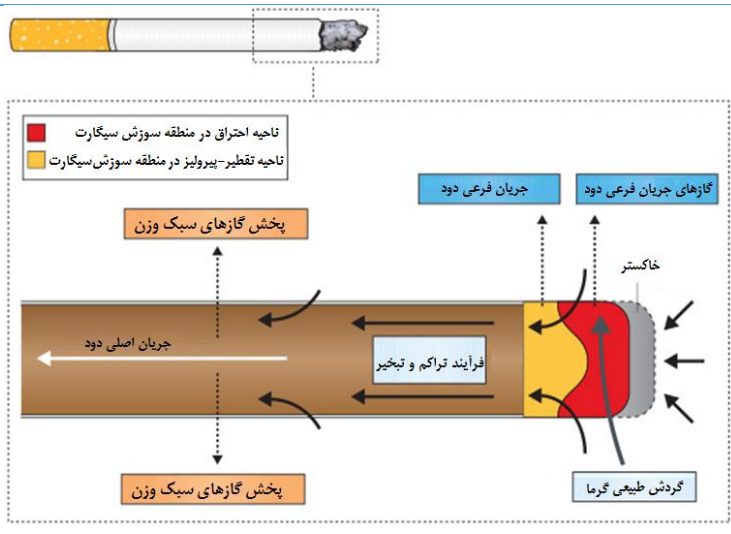
در یک سیگارت فیلتردار در حال روشن، سه منطقه مشخص فیلتر، توتون‌خور و سوزش وجود دارد. منطقه سوزش سیگارت[10] شامل دو ناحیه می‌باشد:

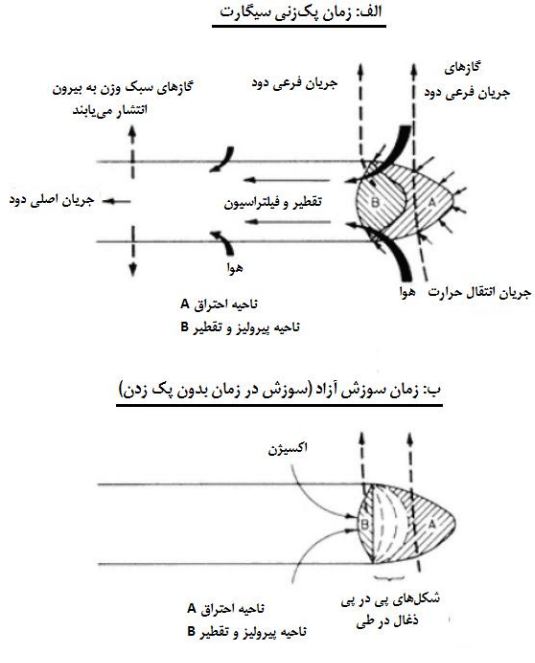
1 -The semi-volatile fraction
2 -Alkylbenzenes
3 -Naphthalen
4 - Ketones
5 - Phenols
6 - Furans
7 - Pyrazines
8 - Indenes
9 - Indanes
1 -Burning zone 0

۱- ناحیه احتراق:[1] این ناحیه در نوک منطقه سوزش سیگارت واقع است و دما در آن بالاتر (حدود ۷۰۰ تا ۹۵۰ درجه سلسیوس) می‌باشد در این ناحیه، خاکستر ذغالی (سرخ رنگ و داغ) با اکسیژن واکنش داده و به خاکستر غیرآلی (خاکستری رنگ) تبدیل می‌شود و در حین این واکنش، محصولات ساده احتراق از جمله کربن مونواکسید و کربن دی‌اکسید و آب تولید می‌شوند و گرمای حاصل از اکسیداسیون خاکستر ذغالی، سبب ادامه فرآیند سوزش سیگارت می‌شود (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵ و Baker, 2001) (در سیگارت‌های حرارتی، این ناحیه از منطقه سوزش حذف شده است).

۲- ناحیه پیرولیز و تقطیر:[2] این ناحیه بین بخش توتون‌خور سیگارت و ناحیه احتراق سیگارت واقع است دما در این ناحیه ۲۰۰ تا ۶۰۰ درجه سلسیوس بوده و غلظت اکسیژن در آن پایین‌تر است. محصولات دود در این ناحیه از طریق مکانیسم‌های گرماگیر (پیرولیز و تقطیر) تولید می‌شوند. آب و مواد فرار موجود در برگ توتون تقطیر شده و به دود وارد می‌شوند. همچنین در این ناحیه، بخشی از ترکیبات موجود در برگ توتون، تجزیه حرارتی (پیرولیز) شده و محصولات مهم حاصل از آن به صورت گازهای فرار وارد دود می‌شوند و در نهایت یک ذغال نیم‌سوز یا خاکستر ذغالی باقی می‌ماند (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵ و Baker, 2001). این که چه نسبتی از ترکیبات برگ تقطیر یا پیرولیز شود به میزان فرار بودن ترکیب شیمیایی و پایداری حرارتی آن نیز بستگی دارد برای مثال فراریت آلکالوئیدها از جمله نیکوتین بیشتر از قندها است لذا بخش زیادی از نیکوتین در سیگارت تقطیر شده و تنها حدود ۳۰ درصد آن پیرولیز می‌شود در حالی که قندها و پروتئین‌ها عمدتا پیرولیز می‌شوند.

1 - Combustion Zone
2 - Pyrolysis and distillation zone





شکل ۲-۹ – سیگارت روشن

(منبع: Baker, 2001)

۲-۱۰-۳- جریان‌های دود سیگارت

طبق شکل ۲-۹، دو حالت سوزش در سیگارت اتفاق می‌افتد که یک حالت آن زمانی است که سیگارت پک زده می‌شود و حالت دیگر سوزش سیگارت یعنی سوزش آزاد، در فاصله زمانی بین پک‌ها صورت می‌گیرد. تقریبا بر این اساس، دو نوع جریان دود ایجاد می‌شود که عبارت هستند از:

جریان اصلی دود[1] دودی است که هنگام پک زدن از انتهای سیگارت در درون دهان فرد سیگاری کشیده می‌شود یا به فیلتر کمبریج (نصب در ماشین دود) وارد می‌شود (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵).

جریان فرعی دود[2] دودی است که از منطقه سوزش سیگارت، بخصوص در زمان سوزش آزاد بین پک‌ها، خارج می‌شود. این جریان دود هم چنین شامل گازهای سبک وزنی است که هنگام پک زدن سیگارت، از روزنه‌های کاغذ سیگارت به بیرون پخش می‌شوند (شکل ۲-۹).

دود محیطی: این دود ترکیبی از جریان اصلی و فرعی دود است که بر اثر استعمال سیگارت به هوای محیط وارد شده و البته در آن رقیق می‌شود.

۲-۱۰-۴- نحوه تشکیل جریان اصلی دود

در زمان پک‌زنی، هوا درون سیگارت کشیده می‌شود و اکسیژن برای احتراق توتون به مصرف می‌رسد. در ناحیه احتراق گازهای ساده یعنی کربن مونواکسید، کربن دی‌اکسید و آب و گرما تولید می‌شود در حالی که در ناحیه پیرولیز و تقطیر که دما و اکسیژن کمتر از ناحیه احتراق است، هزاران محصول از فرآیند تقطیر و پیرولیز (فرآیندهای گرماگیر) تولید و وارد جریان دود می‌شوند. در واقع بخش عمده ترکیبات دود توتون یا سیگارت مربوط به ترکیبات حاصل از تقطیر و پیرولیز آن است که در ناحیه تقطیر–پیرولیز منطقه سوزش سیگارت اتفاق می‌افتد و به دلیل کمبود اکسیژن در این

1 - Mainstream smoke
2 - Sidestream smoke

ناحیه، محصولات حاصل از اکسایش ثانویه کمتر است (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵ و Baker, 2001). (محصولات حاصل از اکسایش از جمله کربن مونواکسید و کربن دی‌اکسید، در ناحیه احتراق سیگارت تولید می‌شود).

الف– انتقال محصولات فرآیند تقطیر به دود: ترکیباتی از توتون بخصوص ترکیبات فرار و نیمه فرار بر اثر تقطیر از توتون خارج شده و سپس به جریان اصلی دود وارد می‌شوند این ترکیبات شامل هیدروکربن‌های آلیفاتیک سیرشده (غیرحلقوی) و سیرنشده، هیدروکربن‌های ترپنوئید، لاکتون‌ها، اِسترها، ترکیبات کربنیل، الکل‌ها، استرول‌ها، آلکالوئیدها از جمله نیکوتین، اسیدهای آمینه و آمین‌های غیرحلقوی هستند. لازم به ذکر است که بخشی از این ترکیبات فرار ممکن است تقطیر نشده و تجزیه حرارتی (پیرولیز) شوند برای مثال ۷۰ درصد نیکوتین موجود در توتون سیگارت تقطیر شده و به صورت دست نخورده به جریان دود وارد می‌شود و ۳۰ درصد آن پیرولیز و اکسید می‌گردد و عمدتا پیریدین‌های دود را تشکیل می‌دهد.

انتقال این ترکیبات به جریان اصلی دود از طریق انتقال مستقیم، انتقال به مکانیسم تصفیه غیرحرارتی[1](انتقال جرم) و فوران سلولی برگ می‌باشد. نوع ترکیبات و نسبتی از آنها که از طریق انتقال مستقیم از ناحیه تقطیر سیگارت به دود آن وارد می‌شوند به میزان فرار بودن، نوع گروه عاملی و پایداری حرارتی آن بستگی دارد هر چه ماده فرارتر (مانند منتول) و در برابر حرارت پایدارتر باشد بیشتر به طور مستقیم به دود منتقل می‌شود. انتقال جرم ترکیبات بر اساس افت نسبی غلظت صورت می‌گیرد که در آن، ترکیبات از توتون تبخیر شده و به وسیله ذرات معلق به دام می‌افتند و به جریان اصلی دود وارد می‌شوند. در فیلتر سیگارت هم این فرآیند صورت می‌گیرد که در آن ترکیبات نیمه فرار روی فیلتر (که در پک‌های قبلی جذب سطحی فیلتر شده‌اند) تبخیر شده و بلافاصله توسط

1 -Non-thermal elution

ذرات معلقی که متعاقبا خارج می‌شوند به دام می‌افتند و به جریان اصلی دود وارد می‌شوند (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵ و Baker, 2001).

جالب این که، مقدار ناچیزی از ترکیبات غیرفرار مانند نمک‌های غیرآلی، فلزات، استرول‌ها، ترکیبات ناپایدار در برابر حرارت مانند اسید آمینه نیز به طور مستقیم و بدون تغییر به جریان اصلی دود وارد می‌شوند. باید به این نکته توجه داشت که برای خارج کردن ترکیبات غیرفرار از توتون، فرآیند تقطیر چندان نقشی ندارد بلکه این فوران سلولی است که در اثر حرارت زیاد اتفاق افتاده و بخشی از ترکیبات غیرفرار موجود در توتون را به طور مستقیم و با سرعت زیاد به جریان اصلی دود وارد می‌کند به طوری که زمان و فرصت کافی برای تجزیه حرارتی (پیرولیز) این مواد غیرفرار مهیا نمی‌شود و بدون تغییر به دود وارد می‌شوند. گاهی ذرات جامد حاصل از فوران سلولی ممکن است به عنوان یک هسته عمل کرده و مواد فرار دود روی آنها متراکم شده و ذرات معلق دود را تشکیل دهند (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵ و Baker, 2001).

ب– انتقال محصولات فرآیند پیرولیز به دود: بخش اعظم مواد غیرفرار و حتی بخشی از مواد فرار موجود در توتون سیگارت، قادر به تقطیر و خروج مستقیم از توتون نیستند لذا این ترکیبات تجزیه حرارتی (پیرولیز) می‌شوند و محصولات حاصل از پیرولیز آنها به جریان دود وارد می‌شود. این ترکیبات شامل کربوهیدرات‌ها (قندها، پلی‌ساکاریدهای سلولز، نشاسته، پکتین‌ها)، پلی‌فنل‌ها (لیگنین) و پروتئین‌ها هستند. برخی ترکیبات نیز در اثر واکنش‌های پیچیده در حین پیرولیز تشکیل می‌شوند که این ترکیبات شامل پیریدین، ایندول، نیتریل آمین‌های آروماتیک، فوران، فنل و ترکیبات کربونیل هستند. همچنین، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها یا محصولات حاصل از تجزیه حرارتی آنها، با هم واکنش داده و بخش قابل توجهی از ترکیبات دود را تشکیل می‌دهند (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵).

بدین ترتیب در حین پک زدن سیگارت روشن، بخار بسیار غلیظ و سیرشده در ناحیه تقطیر–پیرولیز منطقه سوزش سیگارت ایجاد می‌شود که این بخار همراه با گازهای کربن مونواکسید و کربن دی‌اکسید و بخار آب حاصل از ناحیه احتراق منطقه سوزش سیگارت به درون بخش توتون‌خور سیگارت کشیده می‌شود که به آن جریان اصلی دود گویند که در واقع یک سیستم ذرات معلق غلیظ و متحرک با قطر کمتر از ۰/۱ تا ۱ میکرومتر است که دارای حدود ۲۰ درصد رطوبت حجمی هستند و در هر سانتی‌مترمکعب جریان دود، حدود ۱ تا ۱۰ میلیارد عدد ذره کروی معلق وجود دارد.

۲-۱۰-۵- فرآیندهای بخش توتون‌خور سیگارت (حین پک زدن سیگارت)

دمای دود یا بخار بسیار غلیظ و داغ (۶۰۰ درجه سلسیوس) به محض ورود به داخل بخش توتون‌خور سیگارت در عرض چند میلی‌ثانیه به حدود ۲۵ درجه سیلسوس کاهش می‌یابد. لذا بخشی از بخار ترکیبات کم‌فرار دود به دلایل زیر روی سطوح رشته‌های توتون (در بخش توتون‌خور سیگارت) می‌نشیند:

- با کاهش ناگهانی دما، بخار ترکیبات کم‌فرار سریع به حالت اشباع رسیده و بخشی از بخارات به شکل مایع روی سطوح رشته‌های توتون متراکم می‌شوند و از جریان اصلی دود خارج می‌شوند (البته این تغییر حالت تا حدی دو طرفه است یعنی مقدار کمی از همین ترکیبات کم‌فرار یا نیمه فرار از روی رشته‌های توتون دوباره تبخیر شده و به وسیله ذرات معلق دود جذب می‌شوند و بدین ترتیب ترکیبات کم‌فرار روی آنها دوباره وارد جریان اصلی دود می‌شود)
- همچنین ذرات معلق با اندازه بزرگتر از ۰/۱ میکرومتر تحرک کمی داشته و قادر به رد شدن از مسیر پرپیچ بین رشته‌های توتون سیگارت نیستند لذا از جریان اصلی دود خارج می‌شوند.

همچنین بخشی از بخارات ترکیبات نیمه‌فرار در پیرامون هسته‌های موجود در دود قرار گرفته و ائروسول‌های دود را تشکیل می‌دهند. ائروسول‌ها شامل ذرات قطره‌ای حاوی ترکیبات مختلف هستند و با کاهش دما از ۶۰۰ به ۳۵۰ درجه سلسوس، بلافاصله تشکیل می‌شوند (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵ و Baker, 2001).

۲-۱۱-سرنوشت نیکوتین در جریان اصلی دود

نیکوتین یکی از عوامل دخیل در ارزیابی ذائقه‌ای سیگارت است و به دلیل تاثیر آنی و زنندگی[1]آن در دود توتون، بیشتر مورد مطالعه شده است. در ناحیه تقطیر-پیرولیز منطقه سوزش سیگارت، حدود ۷۰ درصد از نیکوتین موجود در توتون سیگارت از طریق فرآیند تقطیر از آن خارج می‌شود و حدود ۳۳/۴ درصد نیکوتین به بخش توتون‌خور سیگارت یعنی جریان اصلی دود و ۳۷ درصد آن به جریان فرعی دود وارد می‌شود (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵ و Baker, 2001).

بخارات داغ نیکوتین به محض ورود به داخل بخش توتون‌خور سیگارت در عرض چند میلی‌ثانیه خنک شده و دمای آن به حدود ۲۵ درجه سیلسیوس کاهش می‌یابد در این حالت بخار نیکوتین به دلیل کاهش دمای ناگهانی، متراکم شده و بخشی از بخارات آن به شکل مایع روی سطوح رشته‌های توتون نشسته و از جریان اصلی دود خارج می‌شوند و بخشی دور هسته‌های موجود در دود قرار گرفته و در جریان اصلی دود، به شکل ائروسول در می‌آیند با این حال، نیکوتین موجود در ائروسول‌ها نیز هنگام عبور از بخش توتون‌خور سیگارت، توسط رشته‌های توتون فیلتر شده و بخشی از آن بر روی رشته‌های توتون می‌نشیند. البته مقداری از نیکوتین روی رشته‌های توتون نیز دوباره تبخیر شده و به وسیله ذرات معلق دود جذب شده و در واقع به جریان اصلی دود وارد می‌شوند. در

1 - Impact and irritation

سیگارت‌های دارای فیلتر، چنین فرآیندهایی در فیلتر نیز اتفاق می‌افتد و در طی پک‌های متوالی، در نهایت حدود ۱۵ تا ۱۹ درصد (یعنی حداکثر حدود یک‌پنجم) از مقدار نیکوتین جذب شده روی الیاف فیلتر استات‌سلولزی تبخیر شده و دوباره به جریان اصلی دود وارد می‌شود به طوری که، از ۳۳/۴ درصد از نیکوتین سیگارت که همراه جریان اصلی دود وارد بخش توتون‌خور آن شده است، ۱۸/۵ درصد در ته سیگارت (در فیلتر و ۳ میلی‌متر انتهای بخش توتون‌خور سیگارت) باقی می‌ماند و تنها ۱۴/۹ درصد از نیکوتین سیگارت با جریان اصلی دود وارد دهان مصرف کننده یا وارد فیلتر کمبریج در ماشین دود می‌گردد. کل نیکوتین موجود در دود سیگارت در فاز ذرات آن قرار دارد و همه آن توسط فیلتر کمبریج قابل جمع‌آوری است (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵ و Baker, 2001).

در ناحیه تقطیر–پیرولیز منطقه سوزش سیگارت، حدود ۷۰ درصد از نیکوتین موجود در توتون سیگارت از طریق فرآیند تقطیر از آن خارج می‌شود و حدود ۲۷ درصد از آن از طریق فرآیند تجزیه حرارتی (پیرولیز) و اکسیداسیون، به سایر محصولات تبدیل می‌شود (سلیمانی‌فخر، ۱۳۸۵ و Baker, 2001). خصوصیات پیرولیتی نیکوتین نشان می‌دهد که پیرولیز نیکوتین منشاء تشکیل بسیاری از پیریدین‌ها در دود است (Schmeltz and Hoffmann, 1977) و بیش از ۱۱ درصد نیکوتین سیگارت بر اثر تجزیه ساده به پیریدین، ۱۲/۵ درصد به کربن دی‌اکسید و ۳ درصد به سایر مواد آلی فرار تبدیل می‌شود (Baker, 2001). پیریدین‌های استخلافی مانند استیل–پیریدین در دود توتون، مسئول عطر و طعم ماندگار در آن هستند (Weeks, 2001). همچنین، مواد مختلفی از جمله کینولین، آریل نیتریل و هیدروکربن‌های آروماتیک نیز از پیرولیز نیکوتین حاصل می‌شود (Baker, 2001). نقش نیکوتین در تشکیل اِن–نیتروزونورنیکوتین[1] و سایر نیتروزآمین‌های مرتبط توجه زیادی را به خود اختصاص داده است (Schmeltz and Hoffmann, 1977).

1 - N-nitrosonornicotine

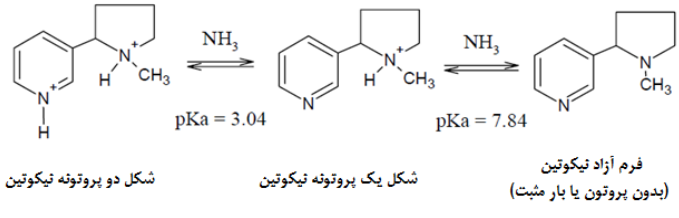
محصولات حاصل از پیرولیز ۴/۶ درصد از نیکوتین سیگارت به جریان اصلی دود (۴/۱ درصد به صورت فاز گاز دود و ۰/۵ درصد به صورت فاز ذرات دود) و محصولات حاصل از پیرولیز ۲۰/۴ درصد از نیکوتین سیگارت به جریان فرعی دود (۱۶/۳ درصد به صورت فاز گاز دود و حدود ۴ درصد به صورت فاز ذرات دود) وارد می‌شود. محصولات حاصل از پیرولیز ۱/۷ درصد از نیکوتین سیگارت نیز در ته سیگارت باقی می‌ماند (Baker, 2001).

علاوه بر پیرولیز، اکسیداسیون نیکوتین نیز ممکن است تأثیر زیادی بر دینامیک شیمی دود داشته باشد، در اثر اکسیداسیون نیکوتین ترکیباتی مانند اسید نیکوتینیک[1] اکسی‌نیکوتین[2] نیکوتیرین[3] کوتینین[4] میوزمین و غیره تشکیل می‌شود همچنین، ویژگی‌های رداکس نیکوتین ممکن است ترکیب دود توتون را تحت تاثیر قرار دهد زیرا ممکن است باعث ایجاد واکنش‌ها بین نیکوتین و سایر اجزای قابل احیاءی دود شوند (Schmeltz and Hoffmann, 1977). نورنیکوتین از تجزیه آنزیمی نیکوتین در طی رسیدگی برگ توتون حاصل می‌شود. هر چند مقدار نورنیکوتین در توتون کمتر است ولی پیرولیز آن سبب تشکیل میوزمین و پیریدین‌های استخلافی می‌شود که عطر و طعم نامطبوع در دود ایجاد می‌کنند. عطر و طعم قلیایی در دود حاصل از پیرولیز توتون گرمخانه‌ای (با رنگ قرمز آلبالویی)، بیشتر به نورنیکوتین موجود در توتون مربوط است و همزمان میوزمین حاصل از پیرولیز توتون نیز بوی ناخوشایندی را در دود ایجاد می کند (Weeks, 2001)

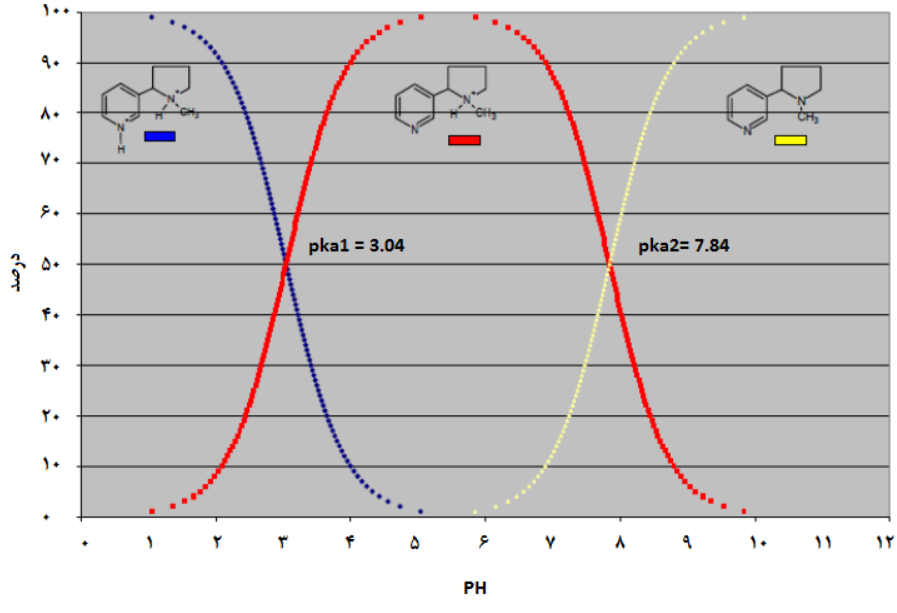
1 - Nicotinic acid
2 - Oxynicotine
3 - Nicotyrine
4 - Cotinine

۲-۱۲-اثرات بیولوژیکی نیکوتین و pH دود توتون

طی سال‌ها، در مورد شیمی و فعالیت بیولوژیکی نیکوتین مطالب زیادی نوشته شده است. مسمومیت و مسیرهای متابولیکی نیکوتین در سیستم‌های پستانداران و غیرپستانداران به خوبی مطالعه شده است و ثابت شده است که اثرات بیولوژیکی نیکوتین به pH دود توتون بستگی دارد چون که نیکوتین پروتونه نشده (یا نیکوتین آزاد) راحت‌تر از نیکوتین پروتونه شده از غشای مخاطی جذب می‌شود و این یک عامل موثر در تعیین سمیت این آلکالوئید است (Armitage and Turner, 1970). در واقع PH دود توتون، توزیع نسبی نیکوتین پروتونه شده و نیکوتین آزاد را در دود تعیین می‌کند و با افزایش pH دود توتون، مقدار نیکوتین آزاد در دود بیشتر و مقدار نیکوتین پروتونه شده در آن کمتر می‌شود (Schmeltz and Hoffmann, 1977). خاصیت بازی حلقه پیرولیدین مولکول نیکوتین در مقایسه با حلقه پیریدین آن، بیشتر است. لذا این حلقه در pH دود کمتر از ۹/۵، پروتون را از محیط دود دریافت می‌کند و نیکوتین یک پروتونه شکل می‌گیرد به طوری که در PH برابر با ۷/۸۴ دود، ۵۰ درصد از نیکوتین دود به شکل آزاد و ۵۰ درصد از آن به شکل نیکوتین یک پروتونه است. خاصیت بازی حلقه پیریدین در مقایسه با پیرولیدین کمتر است و برای این که حلقه پیریدین نیز پروتونه شود لازم است pH دود به کمتر از ۴/۵ کاهش یابد در این شرایط بخشی از نیکوتین یک پروتونه به نیکوتین دو پروتونه تبدیل می‌شود و در pH برابر ۳/۰۴ دود، ۵۰ درصد از نیکوتین به شکل نیکوتین یک پروتونه و ۵۰ درصد از آن به شکل نیکوتین دو پروتونه وجود دارد (شکل ۱۰).



طبق شکل ۲–۱۰، هر گاه pH دود به بیش از ۷ ارتقاء یابد نیکوتین آزاد نیز به تناسب افزایش آن، بیشتر می‌شود به طوری که در pH حدود ۹/۵ به بالا، کل نیکوتین در دود به شکل آزاد است و بدون بار الکتریکی است. در pH دود کمتر از۹/۵، نیکوتین آزاد پروتون را از محیط دود دریافت می‌کند و نیکوتین یک پروتونه شکل می‌گیرد و در pH حدود ۵ تا ۵/۵، کل نیکوتین موجود در محیط به شکل نیکوتین یک پروتونه است. در pH دود کمتر از ۴/۵، بخشی از نیکوتین یک پروتونه به نیکوتین دو پروتونه تبدیل شده و با کاهش pH به کمتر از ۱/۵ کل نیکوتین دود به شکل نیکوتین دو پروتونه خواهد بود (Schmeltz and Hoffmann, 1977).

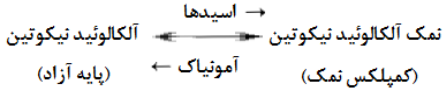


شکل ۲–۱۰– رابطه بین گونه‌های مختلف شیمیایی نیکوتین و pH دود

هر چند که نیکوتین یک باز فرار یا بخار شونده عمده در دود سیگارت می‌باشد با این حال، pH دود نقش بسیار مهمی در ادراک حسی آن دارد (Leffingwell, 2001). نیکوتین آزاد به دلیل نداشتن بار

الکتریکی مثبت، قادر به واکنش با آنیون‌ها و تشکیل کمپلکس نمک نیست. در حالی که در شرایط اسیدی دود، نیکوتین یک پروتونه یا دو پروتونه با آنیون‌ها کمپلکس نمک تشکیل می‌دهد (Schmeltz and Hoffmann, 1977).

در توتون هواخشک، مقدار آمونیاک بیش‌تر و مقدار قند کمتر یا ناچیز هست لذا دود حاصل از آن قلیایی خواهد بود در حالی که در توتون گرمخانه‌ای که مقدار قند بالایی دارد، دود حاصله بسیار اسیدی است و نیکوتین در آن به شکل نیکوتین پروتونه است لذا نیکوتین در دود توتون گرمخانه‌ای بیش‌تر به صورت کمپلکس نمک وجود دارد. یکی از اثرات توتون هواخشک در مخلوط با این توتون‌ها این است که سبب افزایش نیکوتین آزاد در دود و در نتیجه افزایش نسبت نیکوتین به نمک‌ها یا کمپلکس‌های نیکوتین می‌گردد (Leffingwell, 2001).

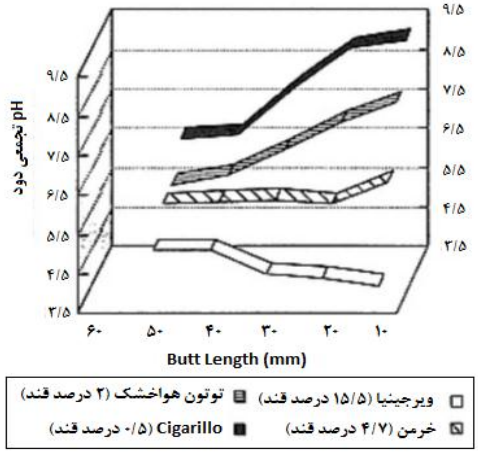


pH دود در توتون هواخشک در مقایسه دود توتون گرمخانه‌ای و توتون شرقی، بسیار قلیایی است و باید خاطر نشان ساخت که pH دود آن با پک‌های متوالی سیگارت به تدریج افزایش می‌یابد. استفاده از توتون هواخشک در خرمن سبب افزایش نسبت نیکوتین آزاد به نمک‌های نیکوتین شده و این امر باعث درک حسی و فیزیولوژیکی زیاد نیکوتین (تندی و زنندگی) می‌شود. بر این اساس، قلیائیت زیاد سیگارت‌های حاصل از توتون هواخشک سبب می‌شود این سیگارت‌ها تقریبا بین تمامی افراد سیگاری، خواهان نداشته باشد (Leffingwell, 2001) چون تندی و قدرت دود حاصل از توتون هواخشک از قلیائیت نیکوتین آن ناشی می‌شود (Weeks, 2001) و قلیائیت بالای دود این سیگارت‌ها بیانگر تندی و زنندگی آلکالوئیدی آنها بوده که به دلیل بر هم زدن عطر سیگارت، می‌تواند ناخوشایند باشد. البته، بسیاری از افراد سیگاری که سیگارت برند آمریکایی مصرف می‌کنند دود اسیدی

سیگارت‌های خرمن توتون‌های ویرجینیا را نامتعادل می‌دانند. بنابراین، شکل نیکوتین موجود در دود، به تنهایی نمی‌تواند عطر و طعم دود را تعیین کند (Leffingwell, 2001).

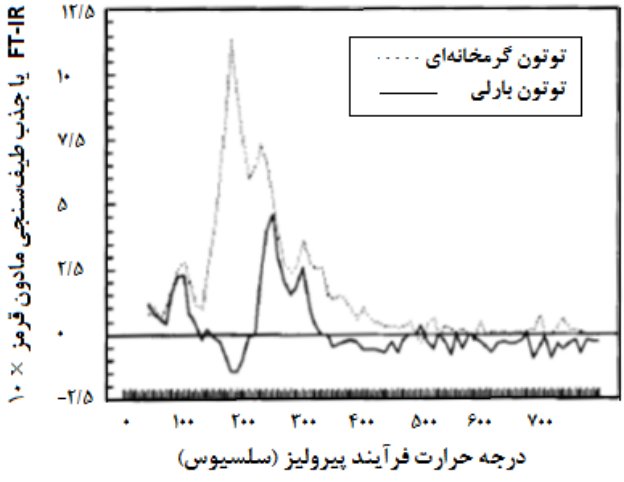
۲-۱۳-کربوهیدرات‌ها و pH دود

در سال ۱۹۷۲، Elson با مطالعه ۱۵۰ برند سیگارت نشان داد برند سیگارت‌هایی که مقدار قند پایین‌تر از ۰/۵ درصد دارند، دود آنها بسیار قلیایی (pH بیش از ۸/۵) بوده و pH دود آن با پک‌های متوالی سیگارت به تدریج افزایش می‌یابد. در حالی که برند سیگارت‌های که قند بالاتری (۱۷/۸ درصد) دارند pH دود آنها در حدود ۴ است و با پُک‌های متوالی، دود حاصل از آن به تدریج اسیدی‌تر نیز می‌شود. شکل ۲-۱۱، تاثیر تجمعی پُک‌های پی در پی را بر pH آب نشان می‌دهد که دود حاصل از پُک‌ها از داخل آب عبور داده می‌شود (Leffingwell، ۲۰۰۱).



شکل ۲-۱۱- pH دود سیگارت (پک‌های تجمعی)
(منبع: Elson و همکاران، ۱۹۷۲)

مقدار قندها در برگ توتون گرمخانه‌ای زیادتر بوده و با هیدرولیز قندها، مقدار زیادی اسیدهای کربوکسیلیک در برگ توتون تولید می‌شود و همچنین با پیرولیز قندهای موجود در توتون، غلظت اسیدهای کل در جریان اصلی دود نیز بیشتر می‌شود لذا دود حاصل از آن بسیار اسیدی است (شکل ۲– ۱۲).



شکل ۲–۱۲– پیک تولید گرمایی اسید فرمیک در دمای مختلف پیرولیز در توتون بارلی و گرمخانه‌ای
(منبع: Fenner، ۱۹۸۸)

منابع مورد استفاده

سلیمانی‌فخر ف. ۱۳۸۵. توتون: تولید، شیمی و تکنولوژی، شیمی دود. امور تحقیقاتی، شرکت دخانیات ایران، ۱۲۸ص.

Baker, R.R. 2001. Smoke chemistry. In: Davis D.L and Nielsen T., Editors. Tobacco: Production, Chemistry, And Technology. 1th ed. Blackwell Science, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA; pp. 1080-1197.

Bedewitz M.A., Góngora-Castillo E., Uebler J.B., Gonzales-Vigil E., Wiegert-Rininger K.E., Childs K.L., Hamilton J.P., Vaillancourt B., Yeo Y.S. and Chappell J. 2014. A root-expressed L-phenylalanine:4-hydroxyphenylpyruvate aminotransferase is required for tropane alkaloid biosynthesis in *Atropa belladonna. Plant Cell*, 26: 3745–3762.

Bortolotti C., Cordeiro A., Alcázar R., Borrell A., Culiañez-Macià F.A., Tiburcio A.F. and Altabella T. 2004. Localization of arginine decarboxylase in tobacco plants. *Physiologia Plantarum*, 120: 84–92.

Burk L.G. and Jeffrey R.N. 1958. A study of the inheritance of alkaloid quality in tobacco. *Tobacco Science*, 2: 139–141.

Bush L.P. 2001. Leaf chemistry: Alkaloid biosynthesis. In: Davis D.L and Nielsen T., Editors. Tobacco: Production, Chemistry, And Technology. 1th ed. Blackwell Science, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA; pp. 285-291.

Chelvarajan, R.L., Fannin, F.F. & Bush, L.P. (1993) Study of nicotine demethylation in Nicotiana otophora. J. Agric. Food Chem., 41: 85862.

Chintapakorn Y. and Hamill J.D. 2007. Antisensemediated reduction in ADC activity causes minor alterations in the alkaloid profile of cultured hairy roots and regenerated transgenic plants of *Nicotiana tabacum. Phytochemistry*, 68: 2465–2479.

DeBoer K.D., Dalton H.L., Edward F.J. and Hamill J.D. 2011. RNAi-mediated down-regulation of ornithine decarboxylase (ODC) leads to reduced nicotine

and increased anatabine levels in transgenic Nicotiana tabacum L. Phytochemistry, 72: 344–355.

Dewey R.E. and Xie J. 2013. Molecular genetics of alkaloid biosynthesis in *Nicotiana tabacum. Phytochemistry,* 94: 10–27.

Dräger B. 2004. Chemistry and biology of calystegines. *Natural Products Reports,* 21: 211–223.

Elson L.A., Betts T.E. and Passey R.D. 1972. The sugar content and the pH of the smoke of cigarette, cigar and pipe tobaccos in relation to lung cancer. Int. J. Cancer, 9(3), 66675.

Fenner R.A. 1988. Thermoanalytical characterization of tobacco constituents. Rec. Adv. Tob. Sci., 14, 82113.

Häkkinen S.T., Tilleman S., Swiatek A., De Sutter V., Rischer H., Vanhoutte I., Onckelen H.V., Hilson P., Inzé D. and Oksman-Caldentey K.M. 2007. Functional characterization of genes involved in pyridine alkaloid biosynthesis in tobacco. *Phytochemistry,* 68: 2773–2785.

Hashimoto T., Tamaki K., Suzuki K. and Yamada Y. 1998. Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant and Cell Physiology,* 39: 73–79.

Heim W.G., Sykes K.A., Hildreth S.B., Sun J., Lu R.H. and Jelesko J.G. 2007. Cloning and characterization of a *Nicotiana tabacum* methylputrescine oxidase transcript. *Phytochemistry,* 68: 454–463.

Henry J.B., Vann M.C. and Lewis R.S. 2019. Agronomic Practices Affecting Nicotine Concentration in Flue-Cured Tobacco: A Review. Agronomy Journal, 111 (6): 3067- 3075.

Hibi N., Higashiguchi S., Hashimoto T. and Yamada Y. 1994. Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. *Plant Cell,* 6: 723–735.

Hildreth S.B., Gehman E.A., Yang H., Lu R.H., Ritesh K.C., Harich K.C., Yu S., Lin J., Sandoe J.L. and Okumoto S. 2011. Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America,* 108: 18179–18184.

Janowitz T., Kneifel H. and Piotrowski M. 2003. Identification and characterization of plant agmatine iminohydrolase, the last missing link in polyamine biosynthesis of plants. *FEBS Letters* ,544: 258–261.

Jelesko J.G. 2012. An expanding role for purine uptake permease-like transporters in plant secondary metabolism. *Frontiers in Plant Science,* 3: 78.

Kajikawa M., Hirai N. and Hashimoto T. 2009. A PIP-family protein is required for biosynthesis of tobacco alkaloids. *Plant Molecular Biology,* 69: 287–298.

Kajikawa M., Shoji T., Kato A. and Hashimoto T. 2011. Vacuole-localized berberine bridge enzyme-like proteins are required for a late step of nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology,* 155: 2010–2022.

Kato K., Shoji T. and Hashimoto T. 2014. Tobacco nicotine uptake permease regulates the expression of a key transcription factor gene in the nicotine biosynthesis pathway. *Plant Physiology*, 166: 2195–2204.

Katoh A., Shoji T. and Hashimoto T. 2007. Molecular cloning of *N*-methylputrescine oxidase from tobacco. *Plant and Cell Physiology,* 48: 550–554.

Kutchan T.M. 1995. Alkaloid biosynthesis—The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell,* 7: 1059–1070.

Leffingwell J.C. 2001. Chemical Constituents of Tobacco Leaf and Differences Among Tobacco Types. In: Davis D.L and Nielsen T., Editors. Tobacco: Production, Chemistry, And Technology. 1th ed. Blackwell Science, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA; pp. 173-232.

Legg P.D., Chaplin J.F. and Collins G.B. 1969. Inheritance of percent total alkaloids in Nicotiana tabacum L. opulations derived from crosses of low alkaloid lines with burley and fluecured varieties. J. Hered, 60, 21317.

Leete E. 1992. The biosynthesis of nicotine and related alkaloids in intact plants, isolated plant parts, tissue cultures, and cell-free systems. Pages 121–

139, in: *Secondary-metabolite biosynthesis and metabolism*. R.J. Petroski and S.P. McCormick, eds. Springer, Boston.

Leete E. 1984. The methylation of nornicotine to nicotine, a minor biosynthetic pathway in Nicotiana tabacum. Beit. Tabak., 12: 11316.

Lewis R.S. 2018. Potential mandated lowering of nicotine levels in cigarettes: A plant perspective. Nicotine Tobacco Research, 21(7): 991–995.

Lewis R.S., Lopez H.O., Bowen S.W., Andres K.R., Steede W.T. and Dewey R.E. 2015. Transgenic and mutationbased suppression of a berberine bridge enzyme-like (BBL) gene family reduces alkaloid content in field-grown tobacco. *PLoS One*. 10: e0117273.

Min T., Kasahara H., Bedgar D.L., Youn B., Lawrence P.K., Gang D.R., Halls S.C., Park H., Hilsenbeck J.L. and Davin L.B. 2003. Crystal structures of pinoresinol-lariciresinol and phenylcoumaran benzylic ether reductases and their relationship to isoflavone reductases. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 50714– 50723.

Mithofer A. and Boland W. 2012. Plant defense against herbivores: chemical aspects. Annual Review of Plant Physiology, 63: 1-20. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042110-103854

Morita M., Shitan N., Sawada K., Van Montagu M.C., Inzé D., Rischer H., Goossens A., Oksman-Caldentey K.M., Moriyama Y. and Yazaki K. 2009. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 106: 2447–2452.

Moschou P.N., Wu J., Cona A., Tavladoraki P., Angelini R. and Roubelakis-Angelakis K.A. 2012. The polyamines and their catabolic products are significant players in the turnover of nitrogenous molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63: 5003–5015.

Naconsie M., Kato K., Shoji T. and Hashimoto T. 2014. Molecular evolution of *N*-methylputrescine oxidase in tobacco. *Plant and Cell Physiology,* 55: 436–444.

Oksman-Caldentey K.M. 2007. Tropane and nicotine alkaloid biosynthesis—Novel approaches towards biotechnological production of plant-derived pharmaceuticals. *Current Pharmaceutical Biotechnology,* 8: 203–210.

Pudliner H.J. 1980. Nicotine accumulation in tobacco and tobacco callus. MSc thesis, University of Kentucky, Lexington.

Riechers D.E. and Timko M.P. 1999. Structure and expression of the gene family encoding putrescine *N*methyltransferase in *Nicotiana tabacum*: new clues to the evolutionary origin of cultivated tobacco. *Plant Molecular Biology,* 41: 387–401.

Ryan S.M., Cane K.A., DeBoer K.D., Sinclair S.J., Brimblecombe R. and Hamill J.D. 2012. Structure and expression of the quinolinate phosphoribosyltransferase (QPT) gene family in *Nicotiana. Plant Science,* 188–189: 102–110.

Schmeltz I. and Hoffmann D. 1977. Nitrogen-containing compounds in tobacco and tobacco smoke. Chemical Reviews, 77 (3): 295-311.

Schmeltz I., Ed., "The Chemistry of Tobacco and Tobacco Smoke", Plenum Press, New York, N.Y., 1972.

Shi Q., Li C. and Zhang F. 2006. Nicotine synthesis in *Nicotiana tabacum* L. induced by mechanical wounding is regulated by auxin. *Journal of Experimental Botany,* 57: 2899–2907.

Shitan N., Hayashida M. and Yazaki K. 2015. Translocation and accumulation of nicotine via distinct spatio-temporal regulation of nicotine transporters in *Nicotiana tabacum. Plant Signaling & Behavior,* 10:e1035852.

Shitan N., Minami S., Morita M., Hayashida M., Ito S., Takanashi K., Omote H., Moriyama Y., Sugiyama A. and Goossens A. 2014. Involvement of the leaf-specific multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter

Nt-JAT2 in vacuolar sequestration of nicotine in *Nicotiana tabacum*. *PLoS One* 9: e108789.

Shoji T. and Hashimoto T. 2008. Why does anatabine, but not nicotine, accumulate in jasmonateelicited cultured tobacco BY-2 cells? *Plant and Cell Physiology*, 49: 1209–1216.

Shoji T. and Hashimoto T. 2011. Recruitment of a duplicated primary metabolism gene into the nicotine biosynthesis regulon in tobacco. *Plant Journal*, 67: 949– 959.

Shoji T., Inai K., Yazaki Y., Sato Y., Takase H., Shitan N., Yazaki K., Goto Y., Toyooka K. and Matsuoka K. 2009. Multidrug and toxic compound extrusiontype transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant Physiology*, 149: 708–718.

Shoji T., Kajikawa M. and Hashimoto T. 2010. Clustered transcription factor genes regulate nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell*, 22: 3390–3409.

Shoji T., Nakajima K. and Hashimoto T. 2000. Ethylene suppresses jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 41: 1072– 1076.

Shoji T., Winz R., Iwase T., Nakajima K., Yamada Y. and Hashimoto T. 2002. Expression patterns of two tobacco isoflavone reductase-like genes and their possible roles in secondary metabolism in tobacco. *Plant Molecular Biology*, 50: 427-440.

Siminszky B., Gavilano L., Bowen S.W. and Dewey R.E. 2005. Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 102: 14919–14924.

Sinclair S.J., Murphy K.J., Birch C.D. and Hamill J.D. 2000. Molecular characterization of quinolinate phosphoribosyltransferase (QPRtase) in *Nicotiana*. *Plant Molecular Biology*, 44: 603–617.

Sisson V.A., and J.A. Saunders. 1982. Alkaloid composition of the USDA tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) introduction collection. Tob. Sci. 16:117–120.

Sisson V. and Severson R. 1990. Alkaloid composition of the *Nicotiana* species. *Beiträge zur Tabakforschung International*, 14: 327–339.

Sun B., Zhang F., Zhou G.J., Chu G.H., Huang F.F., Wang Q.M., Jin L.F., Lin F.C. and Yang J. 2013. Genetic variation in alkaloid accumulation in leaves of *Nicotiana. Journal of Zhejiang University Science, B* 14: 1100–1109.

Wagner R., Feth F. and Wagner K.G. 1986. Regulation in tobacco callus of enzyme activities of the nicotine pathway: II. The pyridine-nucleotide cycle. *Planta,* 168: 408–413.

Wang B., Lewis R.S., Shi J., Song Z., Gao Y., Li W., Chen H. and Qu R. 2015. Genetic factors for enhancement of nicotine levels in cultivated tobacco. *Science Reports*, 5: 17360.

Wang P., Zeng J., Liang Z., Miao Z., Sun X. and Tang K. 2009. Silencing of PMT expression caused a surge of anatabine accumulation in tobacco. *Molecular Biology Reports*, 36: 2285–2289.

Wang X., He X., Lin J., Shao H., Chang Z. and Dixon R.A. 2006. Crystal structure of isoflavon reductase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Molecular Biology,* 385: 1341–1352.

Weeks W.W. 2001. Leaf chemistry: Relationship between Leaf Chemistry and Organoleptic properties of Tobacco Smoke. In: Davis D.L and Nielsen T., Editors. Tobacco: Production, Chemistry, And Technology. 1th ed. Blackwell Science, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, USA; pp. 842-866.

Xu B. and Timko M. 2004. Methyl jasmonate induced expression of the tobacco putrescine *N*methyltransferase genes requires both G-box and GCC-motif elements. *Plant Molecular Biology*, 55: 743– 761.

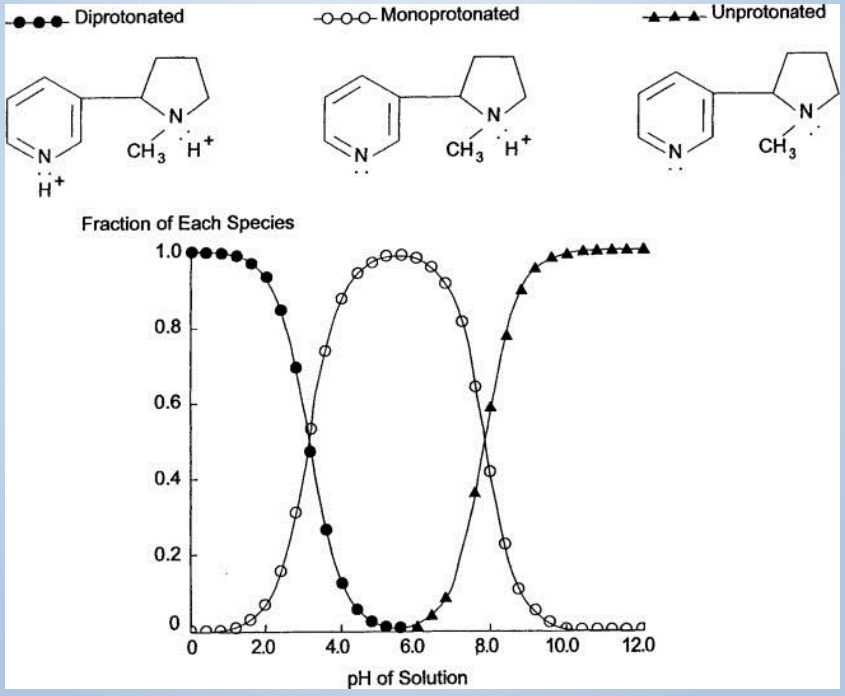
Yu O., Jung W., Shi J., Croes R.A., Fader G.M., Mc-Gonigle B. and Odell JT. 2000. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiology*, 124: 781–794.

Zenkner F.F., Margis-Pinheiro M. and Cagliari A. 2019. Nicotin biosynthesis in nicotiana: a metabolic nicotiana. Tobacco Science, 56: 1–9.

Iranian Tobacco Company

Deputy of Planning, Research and Development
Research Sector

The Role of Agronomic Management on Leaf Nicotine concentration



By:
Dr. Rahmatollah Ranjbar

2021