


DOI 10.36074/grail-of-science.17.06.2022.025

ПОШУК ЗДЕШЕВЛЕННЯ СЕЛЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ ТЮТЮНУ НА ДОБІР ФОРМ ІЗ ЗНИЖЕНИМ ВМІСТОМ НІКОТИНУ


НАУКОВО-ДОСЛІДНА ГРУПА:

Глюдзик-Шемота Маргарита Юріївна 


кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології біологічного факультету
Ужгородський національний університет, Україна

Савіна Олена Іванівна 

доктор сільськогосподарських наук, професор кафедри плодовоовочівництва і виноградарства біологічного факультету
Ужгородський національний університет, Україна

Вакерич Михайло Михайлович 

кандидат біологічних наук, доцент кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології біологічного факультету
Ужгородський національний університет, Україна

Кишко Каріна Миколаївна 

кандидат біологічних наук, доцент кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології біологічного факультету
Ужгородський національний університет, Україна

Анотація. У статті розкрито питання генотипу рослин тютюну, проведено покрововий аналіз множинної кореляції кута прикріплення листка тютюну до стебла на вплив вмісту нікотину та вуглеводів.

Ключові слова: тютюн, нікотин, вихідний матеріал, колекція, селекція, сорти.

Нікотин – це добре вивчений натуральний рослинний продукт, який у значних кількостях продукується видом *Nicotiana tabacum L.*, широко відомим, як тютюн та багатьма іншими представниками роду *Nicotiana*. Цей піридиновий алкалоїд синтезується в коренях тютюну і згодом переміщується в надземні частини рослин у процесах, які стимулюються ушкодженням рослин або втратою верхівкового суцвіття. Накопичення нікотину відіграє певну роль у природному захисті рослин від травоядних тварин. Нікотин також відіграє важливу роль у людському суспільстві, оскільки він є основною речовиною, що викликає звикання у промислових тютюнових виробках, таких як горючі сигарети, які мають добре вивчені профілі токсичних речовин. Нікотин сам по

собі не визнається канцерогеном. Конкретні концентрації, при яких нікотин не викликає звикання в горючих сигаретах важко визначити і вони можуть відрізнитися у різних людей, але Benowitz і Henningfield передбачили, що вміст нікотину в тютюновому наповнювачі від 0,02 до 0,03% буде нижче «під пороговий рівень залежності». Відсоток нікотину на основі сухої ваги у звичайних сортах тютюну зазвичай коливається від 1,0 до 5,0%, причому спостерігається мінливість пов'язана з типом ринку (берлі, димове висушування, темний, сигарний або східний), генетикою рослин, середовищем вирощування та положення стебла. Виробники змішують отримане висушене листя для виробництва сигаретного тютюнового наповнювача з вмістом нікотину від 1,0 до 2,0% на суху вагу [1].

Відомо, що різні методи хімічної екстракції використовувалися для досягнення зниження вмісту нікотину в тютюновому наповнювачі на 80–98% для спільного вилучення сполук, які позитивно впливають на органолептичні властивості, роблять ці підходи непривабливими [8]. Використання модифікованої генетики рослин є кращим шляхом досягнення зниженого рівня нікотину в сигаретах, якщо сорти з низьким вмістом нікотину можна вивести без істотного зниження врожайності листя або інших небажаних змін хімічного складу.

Генетичні підходи до розробки нових сортів тютюну зі зниженим потенціалом накопичення нікотину включають використання генетичної мінливості, яка в природі існує всередині *N. tabacum* або близькоспоріднених видів, генетична мінливість, спричинена редагуванням генів або лікуванням мутагеном, або нова варіація, створена за допомогою генної інженерії. Накопичення алкалоїдів серед різноманітних тютюнових матеріалів у колекції зародкової плазми *Nicotiana* в Сполучених Штатах варіюється від 0,02 до 6,55% на основі сухої маси. Проте наднизькі рівні нікотину в 0,04%, рекомендовані Всесвітньою організацією охорони здоров'я, зазвичай не спостерігаються серед матеріалів з найнижчим вмістом алкалоїдів. Рецесивні алелі в локусах *Nic1* і *Nic2* (також відомі як *A* і *B*) сприяють значному зниженню нікотину та пов'язаних з ним алкалоїдів (норнікотин, анабазин і анатабін) від 1,5 до 4,5% до приблизно 0,20–0,45% [5]. Однак добре відомо, що ця алельна мінливість пов'язана зі зниженням урожайності та якості затверденого листя.

Знання конкретних генів, визначених як залучені до біосинтезу нікотину, дозволяє використовувати такі технології, як інтерференція РНК, щоб знизити їх експресію та досягти відповідного зниження накопичення нікотину. Однак комерціалізація сортів тютюну «ГМО» піддається різним рівням ускладнень регуляторного нагляду в усьому світі. Як альтернативу генній інженерії, приглушення генів, досягнуте за допомогою індукованої мутації або редагування генів, може використовуватися для зниження рівня нікотину. Через поліплоїдну природу *N. tabacum* для досягнення бажаного фенотипу часто необхідні мутації в кількох копіях генів. Збільшення складності мутаційної селекції у поліплоїдних видів може бути компенсовано тим, що результати таких підходів до розведення не вважаються регламентованими статтями у багатьох частинах світу.

Можливість обов'язкового зниження рівня нікотину в звичайних сигаретах регуляторними органами викликала зростаючий інтерес до генетичних методологій, які можуть бути використані для зниження рівня цього

алкалоїду в тютюновій рослині. Наразі рекомендуються наднизькі рівні нікотину (0,04% або нижче) для наповнювача тютюну для сигарет, але немає комерційно доступних або публічно оприлюднених сортів тютюну будь-якого ринкового типу, які зазвичай виробляють висушене листя з таким низьким вмістом нікотину за звичайних режимів виробництва.

В даний час існують дані про ферменти, які безпосередньо беруть участь у біосинтезі нікотину. Тому може здатися простим втручатися в експресію асоційованих генів, щоб знизити нікотин до нуля або близько до нуля. Є дані, що «тютюн без нікотину», розроблений за допомогою редагування генів на основі CRISPR-Cas9 членів сімейства генів BBL. Однак ця робота була виконана з використанням погано описаних зразків листя з неверхневих рослин невідомого сорту тютюну, які вирощували в горщиках у теплиці. Крім того, ці попередні дослідження не визначили відносну важливість шести відомих генів BBL для накопичення алкалоїдів, і суворі оцінки відповідного впливу на вихід та якість тютюну не проводилися. На даний момент не було опублікованих повідомлень, де б приглушення однієї сім'ї цільових генів призвело до безнікотинового генотипу тютюну при вирощуванні в польових умовах і звичайних режимах виробництва. Також, є дані, що комбінації мутантних BBL з найнижчим вмістом нікотину призвели до зниження від 5,8 до 17 разів. У середньому за всіма позиціями стебла, комбінація мутантів BBL з найнижчим вмістом нікотину виявила 0,29% нікотину в листі. Різке зниження накопичення нікотину спостерігалось лише в матеріалах, гомозиготних за мутаціями в двох найбільш вискоекспресованих генах BBL, BBL-a і BBL-b. Мутації в BBL-c призвели лише до незначного додаткового зниження нікотину в поєднанні з мутаціями в BBL-a і BBL-b. Виявилось, що мутації в BBL-d1, BBL-d2 і BBL-e не мають істотного впливу на рівень нікотину, як окремо, так і в комбінації з іншими мутаціями в генетичному фоні TN 90 SRC. За жодним генетичним фоном комбінація мутантів з найнижчим вмістом нікотину BBL не виявила відсоток нікотину, який був чисельно нижчим, ніж для традиційно розроблених ліній розведення *nic1/nic1 nic2/nic2* з низьким вмістом алкалоїду LA Burley 21 і LAF53. Навіть найнижча позиція ніжки нікотину найкращої комбінації мутантів не була нижче рекомендованого цільового рівня нікотину в 0,04% [7].

Типовою метою метаболічної інженерії є досягнення бажаної хімічної зміни без впливу на інші хімічні властивості, підвищення ефективності або якості отриманого продукту. Попередні дослідження виявили великі труднощі у використанні модифікованої генетики рослин для зниження рівня нікотину без зміни метаболічних профілів або негативного впливу на врожайність або якість листя, висушеного тютюном [2]. Подібно до системи зниження нікотину *nic1/nic2*, мутантна система BBL також знижує врожайність затверденого листя до 29%, з пов'язаним зниженням якості затверденого листя до 15%. Причини спостережуваних зв'язків між зниженим нікотинном та цими показниками комерційного значення невідомі, але такі дані свідчать про складність, пов'язану з біохімічними та фізіологічними процесами рослин, які не слід недооцінювати. Цілком можливо, що модифіковані режими збирання та загартовування можуть зменшити негативний вплив цієї алельної мінливості на якість затверденого листя в матеріалах з низьким вмістом нікотину. Також може бути важливим вивчити потенціал збільшення травоїдності комах на

рослинах тютюну зі зниженим накопиченням нікотину, оскільки на рослинах *Nicotiana* з приглушеними біосинтетичними генами нікотину спостерігалось посилене харчування комахами.

Нольке та співавтори повідомили про збільшення вмісту поліаміну, яке корелює із затримкою дозрівання та старінням у дослідженні ізоліній *nic1/nic2* тютюну Берлі, причому проблеми найбільш очевидні в матеріалі з найнижчим алкалоїдом. Відстрочене дозрівання тютюну може призвести до зниження якості висушеного листа. Варто зазначити, що підвищений зелений колір листа, який часто асоціюється з типом генетичної варіації *nic1/nic2*, не був таким очевидним у мутантному матеріалі BBL. Це могло сприяти менш серйозному зниженню якості затверденого листа для мутантного матеріалу BBL в порівнянні з тим, що спостерігається для деяких генетичних запасів *nic1/nic2* [6].

Жодна комбінація мутантів BBL не виявила відсотка нікотину нижчого, ніж той, який виявили NIL *nic1/nic1 nic2/nic2*. Були поєднані мутації в BBL-a, BBL-b і BBL-c з рецесивними алелями в локусах *Nic1* і *Nic2*. Виявлено, що такі генотипи в середньому демонструють рівень нікотину у верхніх листках, зібраних через 21 день після верхівки, нижчі, ніж ті, що спостерігалися для потрібних BBL-мутантних матеріалів самі по собі. Очевидно, що ферменти BBL відіграють важливу роль у біосинтезі нікотину, але їх точна функція ще належить до кінця. Генотипи тютюну з шкідливими мутаціями в трьох найбільш вискоекспресованих генах BBL також демонструють значне зниження вмісту анатабіну та помірне зниження рівня анабазину, що вказує на роль ферментів BBL-a, BBL-b та BBL-c у біосинтезі цих алкалоїдів. Оскільки біосинтез нікотину, анатабіну та анабазину пов'язаний з реакціями конденсації з похідним нікотинової кислоти, доцільно припустити, що BBL-a, BBL-b і BBL-c кодують ферменти, які беруть участь у активації нікотинової кислоти або відтворенні ролі у завершенні реакцій конденсації за участю піридинового кільця. Раніше повідомлялося, що новий алкалоїд, позначений як дигідрометанікотин (DMN), накопичувався в коренях рослин тютюну з перерваною активністю ферменту BBL [4]. Хімічна структура DMN припускає, що конденсація катіону N-метилпіролінію та піридинових кілець може передувати біохімічному етапу, який каталізується ферментами BBL. Хоча можливо, що DMN може бути субстратом для ферментів BBL, його нездатність окислюватися до нікотину або інших відомих алкалоїдів у аналізах *in vitro* свідчить про можливість того, що DMN замість цього є стабільним похідним автентичного, імовірно нестабільного субстрату BBL.

На даний момент немає жодних повідомлень про експерименти, в яких генетичні маніпуляції з рослиною тютюну призвели до зниження рівня нікотину до невимірних рівнів у рослинах, вирощених у польових умовах. Використання РНК-інтерференції для різкого зниження експресії альтернативних сімейств генів, які беруть участь у біосинтезі нікотину, не призводить до зниження вмісту нікотину в тютюні до невизначених рівнів. Рослини тютюну, гомозиготні щодо шкідливих мутацій у всіх відомих генах нікотиндеметилази, які зазвичай експресуються в листках або коренях, також так само все ще накопичують значну кількість норнікотину. Це призводить до цікавих спекуляцій про повну генетичну та біохімічну основу виробництва та накопичення нікотину та норнікотину в тютюні. Конкретні ферментативні або хімічні стадії, які беруть участь у реакції конденсації між проміжним продуктом, отриманим від нікотинової кислоти, та катіоном N-

метилпіролінію в утворенні нікотину досі не зрозумілі. Накопичення значної кількості нікотину за відсутності будь-якої функціональної активності ферменту BBL свідчить про те, що деякий нікотин та його деметильований аналог, норнікотин, можуть бути синтезовані альтернативним шляхом. Була запропонована можливість альтернативного шляху біосинтезу норнікотину, який безпосередньо включає путресцин і який не залежить від нікотину. Спостерігались значно підвищені рівні норнікотину в тютюнових лініях, що мають специфічні комбінації мутантів BBL, що підтверджує можливу роль неохарактеризованого на даний момент шляху біосинтезу цього алкалоїду. Не можна виключити можливу роль нерозбірливої активності ферментів, які в даний час не були визначені як пов'язані з біосинтезом нікотину, оскільки вони впливають на накопичення нікотину, що залишився в генотипах тютюну, приглушених для однієї сім'ї генів. Проте мутації в BBL-a, BBL-b і BBL-c поєднувалися з рецесивними алелями в локусах Nic1 і Nic2. Це свідчить про те, що гени, що контролюють накопичення більшості нікотину, що залишився в генотипах, гомозиготних щодо мутацій BBL, ймовірно, позитивно регулюються транскрипційними факторами, які, як повідомляється, знаходяться в локусах Nic1 і Nic2 [3].

У практичній селекції дуже важливо на основі колекції основних та другорядних ознак проводити ефективний добір бажаних форм не лише генотипово, а й з бажаними ознаками хімічного складу, серед яких вміст нікотину є дуже важливим. Одним із найбільш вагомих аспектів продуктивності є залежність кута кріплення листа до стебла та вмісту нікотину і вуглеводів. При обстеженні селекційного матеріалу встановлено, що кут кріплення листка до стебла не залежить від особливостей сортотипу, ця ознака характерна особливість сорту.

При запровадженні нових сортів тютюну ще недостатньо звертається увага таким показникам як ярусність досягання листка, кут прикріплення листка до стебла, забарвлення листка, тощо. Ступінь матеріальності та щільності листка визначається тривалістю вегетаційного періоду сорту: чим більш ранньостиглий сорт, тим нижче його матеріальність і щільність листа (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив строків дозрівання та забарвлення листа сортів тютюну на рівень матеріальності

Сорти	Сорт за стиглістю	Колір сирого листка	Матеріальність, г/дм ²	Щільність листка
Тернопільський 7	середньо-пізній	світло-зелений	0,3127	середня
Берлей 38	пізній	світло-зелений	0,3824	середня
Вірджинія 27	середньо-пізній	зелений з крапчастістю	0,3220	середня
Тернопільський 14	середньо-стиглий	Жовтий	0,2976	середня
Соболчський 33	середньо-стиглий	зелений з крапчастою жовтизною	0,4898	висока
Соболчський 15/21	пізній	темно зелений	0,4950	дуже висока
Жовтолистий 36	скоростиглий	Жовтий	0,2944	низька

Чим більш пізньостиглий сорт тютюну, тим більша щільність та матеріальність листа. Так, у пізньостиглого сорту Соболчський 15/21 була як висока матеріальність (0,4950г/дм²), так і висока щільність. Це стосується як зеленолистих, так і жовтолистих сортів. Сорт Жовтолистий 36 хоча за врожайністю істотно поступався іншим (18,6 ц/га), але за виходом вищих товарних сортів (90 %) він був кращим за них; за рахунок же вищої ціни реалізації недобір урожаю має певну грошову компенсацію.

Жовтолисті рослини у порівнянні з зеленолистими мали більшу площу асиміляційної поверхні та високий вміст вуглеводів (до 4,8 %). У більшості сортів тютюну (Соболчський 33, СВ-13, Жовтолистий 36 та ін.) листки прикріплені до стебла під кутом нахилу 60-75⁰ і тільки у сорту Соболчський 17 листки прикріплені до стебла в стані біологічної стиглості горизонтально з кутом нахилу 80-90⁰; спостерігаючи за якісними показниками сортів, висунули гіпотезу про залежність між кутом нахилу листка і вмістом в рослинах нікотину і вуглеводів, (табл. 2).

Між вмістом в сировині нікотину і вуглеводів та кутом прикріплення листа існує відповідно тісний і середній позитивний кореляційний зв'язок (рис.1, 2).

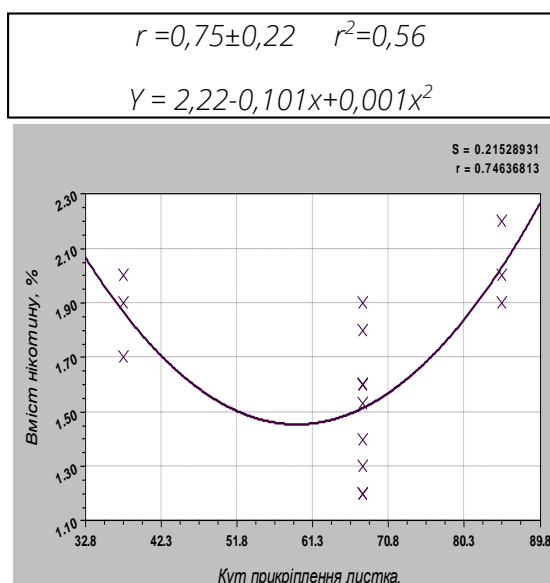


Рис. 1. Залежність між кутом прикріплення листа і вмістом нікотину

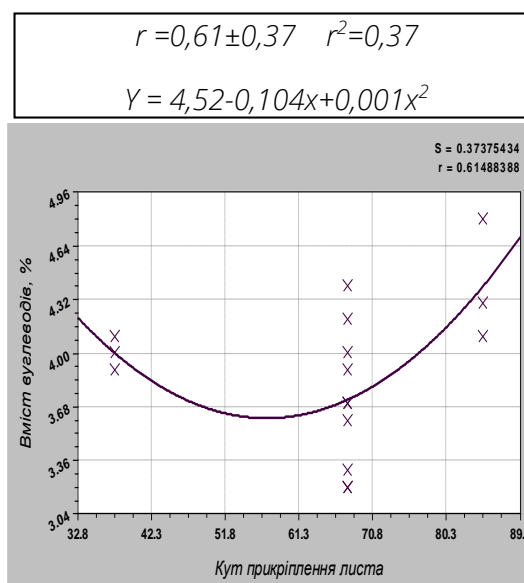


Рис. 2. Залежність між кутом прикріплення листа і вмістом вуглеводів

Виявлення тісного зв'язку між основними кількісними ознаками, які важко визначити у польових умовах, відкриває для селекціонерів великі можливості добору за вмістом нікотину і вуглеводів з поєднанням інших цінних господарських ознак.

За рівняннями регресії можна до певного рівня точності передбачити в якому напрямі зміниться вміст нікотину і вуглеводів у залежності від кута прикріплення листка. Більш того, встановлення таких залежностей дозволить внести певні зміни до добору компонентів при створенні сортів з оптимальним кутом прикріплення листків.

Результати кількісного визначення вуглеводів і нікотину в сировині тютюну показують, що немає прямої залежності між вмістом хімічних елементів і забарвленням листка. Нами встановлено, що вміст нікотину в листках за ломками змінюється таким чином: в другій проти першої збільшується, а в третій – дещо знижується.

Таблиця 2

Динаміка вмісту хімічних елементів в листях тютюну в залежності від ярусів (ломок) і кута прикріплення листа

Сорти	Кут прикріплення листка до стебла, град.	Перша ломка, %		Друга ломка, %		Третя ломка, %	
		нікотин	вуглеводи	нікотин	вуглеводи	нікотин	вуглеводи
Американ 311	60-75	1,6	3,2	1,9	3,7	1,53	3,2
Соболчський 17	80-90	1,9	4,1	2,2	4,8	2,0	4,3
Жовтолистий 36	60-75	1,3	3,7	1,6	3,9	1,4	3,6
Соболчський 33	60-75	1,2	4,2	1,8	4,4	1,6	4,0
СВ-13	30-45	1,7	3,9	2,0	4,1	1,9	4,0

Нами проведено покроковий аналіз множинної кореляції кута прикріплення листка тютюну до стебла на вплив вмісту нікотину та вуглеводів. Високу залежність відмічено між кутом кріплення листка до стебла та вмістом вуглеводів. Залежність якісних показників від деяких морфологічних ознак наведено в табл. 3.

Таблиця 3

Залежність якісних і кількісних показників від кута кріплення листка на стеблі

Показники	Кут кріплення листка	
	коефіцієнт кореляції (r)	рівняння регресії
Нікотин	0,75±0,22	$Y = 0,001x^2 - 0,101x + 2,22$
Вуглеводи	0,61±0,37	$Y = 0,001x^2 - 0,104x + 4,52$
Врожай	0,63±0,26	$Y = 2,31546x + 48$

Значний матеріал оброблений кластерним методом для визначення простих евклідових відстаней між кутом кріплення листка до стебла та інших морфологічних ознак. Матеріал згрупований на 10 великих груп, які не мають залежності від належності до сортотипів, а виражають гами кольорів у свіжому вигляді. Це група сортів із зеленим кольором листка і малим кутом нахилу (18-38⁰), світло-зелені (40-55⁰) та жовті чи сильним жовтінням при дозріванні (вище 60⁰). Бажаним в селекції на якість є світло-зелений чи жовтий колір та сильне жовтіння листка при дозріванні, що значно корелює з високим вмістом вуглеводів (r = 0,52) і виходом вищих товарних сортів (r = 0,78).

При тривалому селекційному процесі нами встановлено, що більш цінним є зменшення висоти рослини та збільшення щільності розміщення продуктивних листків, з низьким розміщенням суцвіття, товстим стійким проти вилягання стеблом. При направленому доборі з використанням індексу можливо зменшити висоту рослини на 31 %, кількість технічних листків збільшити до 42 %.

Базуючись на вже проведених дослідженнях вчених світу, нами вибраний індекс добору на багатолістність та великолістність, що тісно корелює з урожайністю ($r = 0,86 \pm 0,34$) і менше з висотою рослин ($0,38 \pm 0,36$). Даний показник тісно корелює з тривалістю вегетаційного періоду ($r = 0,76 \pm 0,34$). Весь гібридний матеріал вирощували за методом педигрі. У F_2 починали детально аналізувати кращі рослини на багатолістність з коротким періодом досягання листка, але тривалим періодом закладання продуктивних листків. Листок тютюну придатний для збирання через 40- 45 днів, а продуктивний вегетаційний період в умовах клімату України триває не пізніше 15 вересня. Отже, крайній строк закладання продуктивних листків не пізніше 15-25 липня.

На основі тривалого індивідуального добору нами виведено скоростиглий сорт тютюну Бактянський 4 із оптимальною продуктивною висотою 140-155 см, та 24-26 придатними для збирання світло-зеленими листками розміром 56x30 см, прикріпленими до стебла під кутом 56° , що сприяє одержанню врожаю до 24-26 ц/га, виходом вищих товарних сортів до 76 % згідно світових стандартних вимог, з умістом вуглеводів 4,3% та нікотину в межах 1,36%. Листки витривалі до перестоювання на стеблі і їх можливо збиратись у 3 прийоми. Навіть у посухостійкі роки даний сорт виділився високою пластичністю та стабільною продуктивністю.

Висновки. На основі тривалих досліджень встановлено важливі закономірності формування високої продуктивності при створенні нових сортів тютюну.

Потенціал продуктивності тютюну дуже високий і регулюється багатьма факторами, серед яких основними є морфологічні і біологічні властивості.

Швидкість росту листової поверхні, що тісно корелює з продуктивністю сортів тютюну може служити діагностикою для високої потенціальної продуктивності сортів. Дрібнолистовість є також характерною ознакою сорту і може компенсуватись агротехнічними прийомами;

Кожній ознаці, як генотипу в цілому властива специфічна норма реакції. Більшість якісних ознак має значну фенотипову мінливість, але завжди можливо виділити ознаки, варіабельність яких залишається незначною в умовах проведення експериментів. Отже висновки, проведені на основі кореляцій слід розглядати як тенденцію у взаємозв'язку багатьох ознак, властивих вивченій групі селекційного матеріалу. Накопичення такого матеріалу дасть змогу впорядкувати селекційний матеріал за окремими ознаками та виділити групу з комплексом ознак.

Важливе місце в селекції на продуктивність займає правильний науково-обґрунтований добір вихідних форм та їх місце в схрещуванні. При доборі вихідних форм та схем схрещування слід врахувати, що ряд ознак, що корелюють з урожайністю і якістю регулюються, здебільшого, материнською

формою. Кардинально покращити якість тютюнової сировини можливо використовуючи вдосконалений метод селекційного процесу базуючись на конвергентних схрещуваннях за принципом трансгресивної рекомбінації.

Між вмістом нікотину і кутом кріплення листка існує тісний взаємозв'язок та вуглеводами середній. За виведеними рівняннями регресії можна до певного рівня точності передбачити в якому напрямі зміниться вміст нікотину і вуглеводів у залежності від кута прикріплення листка. Більш того, встановлення таких залежностей дозволить внести певні зміни в доборі компонентів при створенні сортів з оптимальним кутом прикріплення листків.

Список використаних джерел:

- [1] Benowitz, N. L., and Henningfield, J. E. (1994). Establishing a nicotine threshold for addiction. The implications for tobacco regulation. *N. Eng. J. Med.* 331, 123–125.
- [2] Chaplin, J. F., and Weeks, W. W. (1976). Association between percent total alkaloids and other traits in flue-cured tobacco. *Crop. Sci.* 16, 416–418.
- [3] 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.
- [4] Kajikawa, M., Sierro, N., Kawaguchi, H., Bakaher, N., Ivanov, N. V., Hashimoto, T., et al. (2017). Genomic insights into the evolution of the nicotine biosynthesis pathway in tobacco. *Plant Physiol.* 174, 999–1011.
- [5] Legg, P. D., and Collins, G. B. (1971). Inheritance of percent total alkaloids in *Nicotiana tabacum* L. II. Genetic effects of two loci in Burley 21 LA Burley 21 populations. *Can. J. Genet. Cytol.* 13, 287–291.
- [6] Nolke, G., Volke, D., Chudobova, I., Houdelet, M., Lusso, M., Frederick, J., et al. (2018). Polyamines delay leaf maturation in low-alkaloid varieties. *Plant Direct.* 2018, 1–12.
- [7] Schachtsiek, J., and Stehle, J. (2019). Nicotine-free, non-transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) edited by CRISPR-Cas9. *Plant Biotech. J.* 17, 2228–2230.
- [8] Seligman, R. B. (1983). Philip Morris USA. Nicotine free cigarettes. Philip Morris Collection. Bates No. 2024545084.