

烟草烟碱去甲基化研究进展

史宏志

(河南农业大学农学院国家烟草栽培生理生化研究基地, 郑州, 450002)

摘要: 栽培烟草群体中由于基因突变可出现具有烟碱向降烟碱转化能力的转化株, 导致烟叶降烟碱含量增加, 烟碱含量降低, TSNA 含量大幅度增加, 并严重影响烟叶香味品质。在总结笔者近些年研究结果的基础上, 对烟碱转化与 NNN 含量和烟叶香味品质的关系, 烟碱转化的遗传控制和生化过程, 栽培品种中烟碱转化的频率和时期, 以及转化株的早期鉴别等进行了综述。

关键词: 烟草; 生物碱; 烟碱; 去甲基化; 转化

中图分类号: S572.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5280(2006)03-0276-05

生物碱是烟草植物含有的一类重要化学成分, 主要包括烟碱、降烟碱、新烟草碱和假木贼碱 4 种。在烟草属中, 有栽培利用价值的普通烟草 (*N. tabacum* L.) 和黄花烟草 (*N. rustica* L.) 都是烟碱积累型, 其烟碱含量占总生物碱含量的 94% 以上 (史宏志等, 2004)。但在栽培品种的烟株群体中, 个别植株会因为基因突变而形成烟碱去甲基能力, 导致烟碱含量显著降低, 降烟碱含量相应增加, 这种具有烟碱向降烟碱转化能力的烟株称为转化株。由于烟碱转化与烟叶香味改变和烟草亚硝酸胺含量增加密切相关, 近年来成为国际学术界研究的热点。现结合本人的研究结果将烟碱向降烟碱转化方面的研究进展作一综述。

1 烟碱向降烟碱转化对烟叶品质和 TSNA 的影响

烟碱转化导致烟叶降烟碱含量异常升高。降烟碱易于在烟叶调制过程和调制后的陈化过程中发生生化转化形成许多不利成分, 如麦斯明 (myosmine)、酰化降烟碱 (acylnornicotines) 和 N-亚硝基降烟碱 (NNN), 因而影响烟叶香味品质和可用性。

1.1 对烟叶香味品质的影响

烟草群体中烟碱转化株的出现和积累导致烟叶化学成分组成发生显著变化。降烟碱的氧化可产生麦斯明。随着烟叶中降烟碱含量的增加, 调制后烟叶的叶片和主脉中的麦斯明含量直线增加 (Shi et al, 2003; 史宏志等, 2004)。降烟碱的酰基化形成一系列含有 1~8

个碳原子酰基部分的降烟碱衍生物。N-甲酰降烟碱是烟叶中的主要酰化降烟碱。Anderson 等 (1989) 比较了具有不同降烟碱水平的 3 个白肋烟品系的酰化降烟碱含量, 发现具有烟碱转化能力, 含有较高降烟碱的品系在烟叶调制过程及调制后比其它品系含有较高的 N-甲酰降烟碱及其它酰化降烟碱。

烟叶降烟碱含量的增加导致香味品质的下降。Roberts (1988) 研究发现, 在热解过程中降烟碱产生麦斯明及吡啶化合物, 使烟气具有诸如碱味、鼠臭味等异味。在烤烟烟叶中, 具有较高降烟碱含量的转化型烟叶在外观上表现出“樱红” (cherry red) 特征。这类烟叶由于香味较差, 所以收购时单独列级, 售价极低。具有不同烟碱转化能力的白肋烟 TN90 品系, 农艺性状无显著差异, 但烟叶香味品质随降烟碱含量增加显著下降, 转化型烟叶一般白肋烟风格下降, 香味不正, 口腔残留严重 (史宏志等, 2005)。

1.2 对烟叶 TSNA 形成的影响

NNN 是烟叶和烟气中主要的烟草特有亚硝酸 (TSNA)。动物试验表明, NNN 具有显著的致癌活性 (Hoffmann et al, 1986)。最初由 Hecht 等 (1978) 的研究表明, 烟碱和降烟碱均为 NNN 的前体物。Caldwell 等 (1991) 根据由烟碱和降烟碱形成 NNN 的动力学研究结果, 提出降烟碱是 NNN 的主要前体物。Djordjevic 等 (1989) 应用具有不同生物碱合成能力的品系研究表明, 降烟碱与 NNN 含量呈显著正相关关系。Anderson 等 (1989) 也证明 NNN 与降烟碱的相关系数高于 NNN 与烟碱的相关系数。

在烟碱转化株的调制过程中降烟碱极易发生亚硝化反应形成 NNN。Shi 等 (2000) 选择了 30 株具有不同降烟碱含量的烟株 (降烟碱含量从 0.05% 到 3.0%), 分

收稿日期: 2006-06-18

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

别测定烟叶中TSNA含量,发现降烟碱与NNN含量呈显著正相关关系;相关系数为0.9;用我国不同类型烟叶测定也表明二者具有类似的相关关系(Shi et al, 2000;史宏志等,2002)。在另一项试验中,通过比较转化株和非转化株烟叶叶片和主脉中生物碱和TSNA含量的差异,发现NNK,NAT和NAB在转化株和非转化株间无显著差异,但NNN含量随降烟碱含量增高而大幅度增加,NNN占总TSNA含量比例也随之增加(Shi et al,2002;2003)。Miller和Bush(2002)测定了种植在3个地点的30个白肋烟品种的TSNA和生物碱含量,分析表明,NNN与降烟碱的相关系数在所有关系中最,为0.844。这些结果充分表明由烟碱转化导致降烟碱含量增高是烟叶NNN形成和积累的重要因素,从群体中去除转化株是降低烟叶和产品中TSNA含量及提高和改善烟叶香味品质的有效途径。

2 烟碱转化的遗传控制

烟属有60多个种,其中60%为烟碱积累型,在干烟叶中烟碱为主要生物碱;30%~40%的种为降烟碱积累型,具有烟碱去甲基而转化为降烟碱的能力。普通烟草(*N. tabacum*)是由野生烟草杂交后经自然加倍而形成的异源四倍体,其野生种祖先一般认为有美花烟草(*N. sylvestris*)、绒毛状烟草(*N. tomentosiformis*)和耳状烟草(*N. otophora*)。所有这3种野生烟草均为烟碱转化型种,降烟碱是烟叶中生物碱的最终积累形式。因此,当普通烟草最初形成时,应该也具有烟碱转化能力,在干烟叶中含有较高的降烟碱。在进化过程中,人类选择了不具烟碱转化能力的突变株进行栽培利用。因此在目前的栽培烟草中,正常情况下烟叶不具有烟碱去甲基酶活性,烟碱为烟叶中生物碱的主要积累形式。

Griffith等(1955)提出烟草的烟碱向降烟碱转化性状属简单遗传,由1个或2个基因所控制。Mann和Weybrew(1958)研究了普通烟草与野生烟草杂交后代的分离情况,发现普通烟草与人工合成的异源四倍体在2个位点存在差异,这2个位点决定烟叶的降烟碱含量。两个基因分别定义为*Cs*和*Ct*,它们分别来自祖先美花烟草和绒毛状烟草的基因组中(Mann et al, 1964)。每个基因都可编码烟碱去甲基酶的合成,或者至少弥补了烟碱向降烟碱转化过程中缺失的步骤。来自绒毛状烟草的去甲基基因*Ct*引起烟叶衰老前烟碱向降烟碱的转化,而来自美花烟草的基因*Cs*引起烟叶衰老过程中烟碱的转化(Wernsman et al,1968)。在商用栽培烟草中,来自绒毛状烟草的*Ct*位点的基因似乎

更为活跃,但此基因的高突变率引起烟叶衰老过程中降烟碱的形成,这与原始的基因行为不同。具有纯合双隐性基因型(*ctctcses*)的烟草不具有烟碱去甲基能力。

Wernsman等(2000)将杂交种F₁培养成单倍体,而后人工加倍成双倍体,通过测定双倍体株系的生物碱含量,得出具有*ctct*基因型的植株约含有3%~9%的仲胺类生物碱(主要为降烟碱);具有*Ctct*基因型的植株含有17%~51%的仲胺类生物碱;具有*CtCt*基因型的植株含有73%~94%的仲胺类生物碱。他们还指出栽培烟草中的*ct*隐性基因高度不稳定,极易发生显性突变形成去甲基能力。据估算,所培育的双倍体株系发生突变的机率高达14%。

我们对白肋烟栽培品种烟碱转化的遗传行为进行了初步研究。TN90烟草经早期鉴定和筛选分成非转化株、低转化株和高转化株3组。分别对它们的自交1代植株的烟碱转化能力进行测定,发现所有来自高转化株的后代仍为转化株,来自非转化株的后代大部分植株仍为非转化株,但可出现约10%左右的低转化株,这些新产生的转化株可能是由突变产生的。来自低转化株的后代,可分离出具有不同烟碱转化能力的植株。

由于烟碱转化是由隐性基因向显性基因的突变,其突变率较高,而且这一频率在组织培养中显著增加,因此不少学者认为烟碱转化基因可能有移动因子或跳跃因子的参与。

3 烟碱向降烟碱转化的生物化学

早期多数有关烟碱去甲基化的研究是在具有烟碱转化能力的野生烟草上进行的。早在20世纪40年代和50年代,Dawson(1952)就发现耳状烟草和粘毛烟草中降烟碱的主要来源是烟碱去甲基化。烟碱转化的主要部位为叶片,降烟碱含量的增加与烟碱含量的降低相伴随。

3.1 烟碱去甲基酶

烟碱去甲基酶在离体和活体内的部分定性已有报道(Chelvarajan et al,1993)。细胞破碎后,烟碱去甲基酶活性与微体组分和内质网等相联系。去甲基活动依赖于还原态核苷的出现。去甲基的速率在由NADPH作电子供体时比采用NADH做供体高15倍。在离体条件下,最适的pH值和温度分别为7.0~7.5和30℃。氧在烟碱去甲基活动中是必须的。试验中高的降烟碱浓度降低烟碱去甲基的速率。降烟碱与同等浓度的烟碱相比对烟碱去甲基具有更为有效的抑制,表明这种抑制在很大程度上属于产物抑制。磷、锰也具有抑制作用。Hao等(1996)报道,在烟草细胞培养中,

烟碱去甲基酶的最适 pH 在 9.0~9.5 之间,最适温度为 25~30℃;V_{max} 和表现 K_m 分别为 7.6×12 pkat 和 7.4 μm¹⁴C-烟碱。添加 NADPH(1 Mm)可增加酶的活性,但添加等量的 NADH, NAD 和 ATP 时则不表现酶活性增加。

烟碱去甲基酶满足细胞色素 P-450 类型酶的一些主要标准,如酶活性被四环素(tetracyclisis)所抑制,但此仅表现对一氧化碳的部分抑制。与其它由细胞色素 P-450 催化的反应一样,烟碱去甲基发生在微体部分,依赖于氧的出现和还原态电子供体,而且主要为 NADPH。因此,许多研究者相信烟碱去甲基酶属于细胞色素 P-450 类型的酶。但由于此酶与细胞膜系统相连,具有较大的不稳定性,目前酶的分离和纯化尚未取得突破性进展。

3.2 生化反应

尽管人们提出过一些烟碱转化为降烟碱的生化反应机理(Leete et al, 1974),但最近研究一致表明烟碱去甲基是烟碱的甲基部分氧化的结果(Hao et al, 1996; Botte et al, 1997)。其作用机理为,首先烟碱的甲基部分发生羟化,由于这一羟基化的衍生物不稳定,在非酶作用下可分解为降烟碱和甲醛。N-甲酰降烟碱在快速进行烟碱去甲基反应的细胞中可以检测得到(Hobbs et al, 1991),作者还有证据支持去甲基过程中甲醛的形成。此外,在细胞培养中饲喂(—)-2'S-烟碱,在去甲基后只形成(—)-降烟碱(Hao et al, 1996)。采用粉兰烟草和耳状烟草饲喂(—)-2'S-烟碱也只形成(—)-2'S-降烟碱,表明在烟碱去甲基过程中不包含吡咯环的开环,氧化部位发生在烟碱的甲基部位。细胞色素 P-450 的参与也支持烟碱的去甲基属于氧化反应的观点。

4 栽培烟草中烟碱转化的机率和时期

4.1 烤烟

Jeffrey 和 Tso(1955)首先报道了烟叶生物碱组分的质量差异。他们发现烤烟的“樱红”烟叶降烟碱含量大幅度增加,烟碱含量相应降低,表明这类烟叶具有将烟碱转化为降烟碱的能力。Weybrew 等(1960)也发现烤烟的高降烟碱含量与外观的“樱红”现象相连锁。这类烟叶一般具有较差的香味,因此对其单独收购。樱红色素被认为是由多酚类氧化的衍生物与降烟碱反应而形成的(Penn et al, 1958)。

Wada(1957)比较了转化株的鲜叶与调制后烟叶的生物碱含量,发现降烟碱积累主要发生在烟叶烘烤过程中。Wernsman 和 Matzinger(1968)通过对非转化

型品种 SC58、樱红 401 品系和两个分别包含 *Ct* 和 *Cs* 基因的品系相互嫁接,研究了烟碱转化的部位和时间,发现烟碱转化主要在叶片中发生。樱红 401 品系和含有 *Cs* 基因的品系的烟叶中烟碱转化发生在叶子衰老的后期阶段。Wernsman 和 Matzinger(1970)估测了在 401 品种中 *ct* 基因突变为显性的 *Ct* 基因的频率为 0.8%。

4.2 白肋烟

尽管早在 20 世纪 50 年代在白肋烟中也发现有烟碱转化的问题,但直到今天这一问题才引起重视。白肋烟调制后为深棕色,因此转化株的烟叶在外观上没有显著特征,这给研究带来很大不便。但近年来,由于发现烟碱转化与 NNN 形成密切有关,因此成为烟草界的研究热点。

Shi 等(2000)对白肋烟品种转化株的比例和转化程度进行了广泛研究。商用白肋烟品种一般在群体中含有 15%~20%的转化株,其中约一半转化株的烟碱转化率在 20%以上。白肋烟杂交种(如 Hy403, GR153, GR149)通常含有较少的转化株。史宏志等(2001)也发现在中国的白肋烟 TN90 品种中,含有约 20%的转化株,但不同转化株的烟碱转化程度不同,高转化株的烟碱转化率可达 80%。进一步研究发现(史宏志等, 2005),我国白肋烟主栽杂交种鄂烟 1 号的烟碱转化株比例高达 40%以上,这主要是由于作为母本的 B21 不育系含有大量转化株所致。

美国肯塔基大学应用不同的品种和品系对烟叶生长和调制过程中烟碱转化的规律进行了系统研究(Shi et al, 2000; Bush et al, 1999; Fanann et al, 2000)。烟碱转化在绿叶中即开始进行,但在收获前转化程度较低。一般来说,高转化株在收获时的烟碱转化率不超过 15%。烟碱转化主要发生在调制过程的前 3 个星期,变黄末期后变化较小。这与烟叶细胞的死亡导致去甲基酶活性终止有关。在另一项试验中,Shi 等(2002)发现在转化株调制后的烟叶中,主脉的烟碱转化率显著高于叶片的烟碱转化率。进一步研究表明,在叶片和主脉中烟碱转化率的变化具有不同的模式,叶片中烟碱转化高峰期显著早于主脉。在变黄末期中肋的烟碱转化率开始超过叶片,且在最终调制后仍保持较高的转化率。这是由于主脉失水较慢,干燥过程较长,使得有较大比例的烟碱转化为降烟碱。

一些农艺和环境因素对烟碱转化具有一定的影响。未打顶植株的烟叶一般比打顶后的烟叶具有较高的烟碱转化率。在 Shi 等(2000)的研究中,转化系 78379 被用来比较不同调制环境条件下的烟碱转化

率,结果表明:高温高湿的调制条件有利于烟碱向降烟碱的转化。此外,氮肥施量较大时,烟碱基础含量增加,可导致烟碱转化率的降低(Shi et al, 2004)

5 转化株的鉴别和清除

在白肋烟中,由于非转化株向转化株突变率较高,以及缺乏外观可视的鉴别方法,烟草群体可积累一定比例的具有较高降烟碱含量的转化株。所以栽培品种的原始种必须定期进行转化株清除。美国烟草工业1977年制订了烟叶中仲胺类生物碱的最低限量标准,要求所有新育成的品种烟叶的仲胺类生物碱含量比例不能超过总生物碱的20%,这其中主要为降烟碱。最近此标准降低到了15%,其它不少国家也有烟叶混合样和单株选择中降烟碱含量比例的限制标准。我国目前品种选育过程中尚无此限量标准。

从实际意义上讲,群体中的转化株必须在烟叶生长的早期阶段被鉴别和清除,以保证新品种选育和良种繁育中留取纯的非转化株进行繁衍。由于在外观形态上非转化株与转化株没有显著差异,所以目前还必须依靠化学分析测定每一植株的烟碱转化能力。转化株的烟碱转化主要是在烟叶调制过程中发生的,所以转化株的早期鉴别首先需要对转化株的烟碱转化进行刺激,以便早期表达转化性状。过去几年内,我们对转化株早期鉴别技术进行了大量的探索研究(Shi et al, 2001;2002;2003)。

目前有两种方法可刺激转化株的烟碱转化性状在绿叶中早期表达:(1)2-氯乙基磷酸。2-氯乙基磷酸(ethephon)为植物生长调节剂,可在自然条件下释放乙烯。Shi等(2001)的研究表明,用其水溶液对绿叶进行处理可刺激转化株烟碱向降烟碱转化,从而保证早期对转化株的有效鉴别。此种方法已在育种和良种繁育过程中应用^[36]。(2)碳酸氢钠处理。Shi等(2002, 2003)研究表明,在最适条件下,碳酸氢钠可使转化株的烟碱转化达到特定基因型所决定的最大转化程度。一般在37℃温度条件下进行处理,高转化株的成熟烟叶达到95%以上烟碱转化所需的时间为2~3 d,绿叶为4~6 d。碳酸氢钠对烟碱转化的诱导作用主要是由于内源乙烯释放量增加所致(Shi et al, 2003)。由于碳酸氢钠对环境无不利影响,因此提供了在烟株生长期安全有效鉴别转化株的方法。

由于这两种方法仍需依赖化学分析,无法靠外观特征直接识别转化株,因此,这些方法工作量大,耗时费工,只适应于在小面积上应用,如育种田和种子繁育田。新的可适于大田应用的方便快捷的转化株鉴别方

法和技术的有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 史宏志, Bush LP, Wang J, 等. 我国不同类型烟叶烟碱向降烟碱转化研究[J]. 中国烟草科学, 2001, (4): 6—8.
- [2] 史宏志, Bush LP, 黄元炯, 等. 我国烟叶和卷烟 TSNA 含量及与前体物的关系研究[J]. 中国烟草学报, 2002, (1): 14—19.
- [3] 史宏志, 张建勋. 烟草生物碱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [4] 史宏志, Bush LP, Krauss M. 烟碱向降烟碱转化对烟叶麦斯明和 TSNA 含量的影响[J]. 烟草科技, 2004, (10): 27—30.
- [5] 史宏志, 李进平, Bush LP, 等. 烟碱转化率与卷烟感官评吸品质和烟气 TSNA 含量的关系[J]. 中国烟草学报, 2005, (2): 9—14.
- [6] 史宏志, 李进平, Bush LP, 等. 白肋烟杂交种及亲本烟碱转化株的鉴别[J]. 中国烟草学报. 2005, (4): 28—31.
- [7] Anderson RA, Fleming PD, Burton HR. N'-Acyl- and N'-nitroso-pyridine alkaloids in alkaloid lines of burley tobacco during growth and air-curing[J]. J Agric Food Chem, 1989, 37: 44—50.
- [8] Botte M, Mabon F, Mouillour ML, et al. Biosynthesis of nornicotine in root cultures of *Nicotiana glauca* doesn't involve oxidation at C-5' of nicotine [J]. Phytochem, 1997, 46: 117—222.
- [9] Bush LP, Zhan Y, Yang H, et al. Time of nornicotine formation in burley tobacco [A]. CORESTA. Suzhou, China, 1999.
- [10] Caldwell WC, Greene JM, Plowchalk DR. The nitrosation of nicotine. A kinetic study[J]. Chem Res Tox, 1997, 4: 513—516.
- [11] Chelvarajan RL, Fannin FF, Bush LP. Study of nicotine demethylation in *Nicotiana glauca* [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 858—862.
- [12] Dawson RF. Alkaloid biosynthesis: Nicotine demethylation in excised leaves of *Nicotiana glutinosa* [J]. Am J Bot, 1952, 39: 250—253.
- [13] Djordjevic MV, Gay SL, Bush LP. Tobacco specific nitrosamine accumulation and distribution in flue-cured tobacco isolines[J]. J Agric Food Chem, 1989, 37: 752—756.
- [14] Fannin FF, Shi H, Burton HR, et al. Nicotine to nornicotine conversion in burley tobacco [A]. CORESTA. Lisbon, Portugal, 2000.
- [15] Griffith RB, Valleu WD, Stokes GW. Demethylation and inheritance of nicotine to nornicotine conversion in tobacco[J]. Science, 1955, 121: 343—344.

- [16] Hao DY, Yeoman MM. Mechanism of nicotine N-demethylation in tobacco cell suspension cultures [J]. *Phytochem*, 1996, 41: 477–482.
- [17] Hecht SS, Chen CB, Hirota N. Tobacco specific nitrosamine; Formation from nicotine in vitro and during curing and carcinogenicity in strain A mice [J]. *J Nat Cancer Inst*, 1978, 60: 819–824.
- [18] Hobbs MC, Yeoman MM. Biotransformation of nicotine to nornicotine by cell suspensions of *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin-38 [J]. *New phytol*, 1991, 119: 477–482.
- [19] Hoffmann D, Hecht SS, Melikian AA, et al. Tumorigenic agents in tobacco products and their uptake by chewers, smokers, and nonsmokers [J]. *Biochem Molec Epid Cancer*, 1986: 191–204.
- [20] Jeffery RN, Tso TC. Qualitative differences in the alkaloid fraction of cured tobaccos [J]. *J Agricultural and Food Chemistry*, 1955, 3: 680.
- [21] Leete E, Chedekel MR. Metabolism of nicotine in *Nicotiana glauca* [J]. *Phytochem*, 1974, 13: 1853–1859.
- [22] Mann TJ, Webrew JA. Inheritance of alkaloids in hybrids between flue-cured tobacco and related amphidiploids [J]. *Tobacco Science*, 1958, 2: 29–34.
- [23] Mann TJ, Webrew JA, Matzinger DF. Inheritance of the conversion of nicotine to nornicotine in varieties of *Nicotiana tabacum* L. and related amphidiploids [J]. *Crop Sci*, 1964, 4: 349–353.
- [24] Miller RD, Bush LP, Burton HR, et al. Screening for nornicotine conversion in burley tobacco [A]. 55th Tobacco Science Research Conference. Greensboro, NC, USA, 2001.
- [25] Miller RD, Bush LP. Alkaloid and tobacco specific nitrosamine content of commercial burley tobacco varieties [A]. 56th Tobacco Science Research Conference. Lexington, KY, USA, 2002.
- [26] Penn P, Stephens RL, Weybrew JA. The in vitro synthesis of a “cherry-red pigment” [J]. *Tobacco Science*, 1958, 2: 102–105. [27] Roberts DL. Natural tobacco flavonoid advances [J]. *Tobacco Science*, 1988, 14: 49–81.
- [28] Shi H, Fannin FF, Burton HR, et al. Factors affecting nicotine to nornicotine conversion in burley tobacco [A]. 54th Tobacco Science Research Conference. Nashville, TN, USA, 2002.
- [29] Shi H, Huang Y, Bush LP, et al. Alkaloid and TSNA contents in Chinese tobacco and cigarettes [A]. CORESTA. Lisbon, Portugal, 2000.
- [30] Shi H, Fannin FF, Burton HR, et al. Identification of nicotine to nornicotine converters in burley tobacco [A]. 55th Tobacco Science Research Conference. Greensboro, NC, USA, 2001.
- [31] Shi H, Fannin FF, Burton HR, et al. Stimulating effect of ethylene on nicotine to nornicotine conversion in burley tobacco [A]. CORESTA. Capetown, South Africa, 2001.
- [32] Shi H, Kalengamaliro N, Hempfling WP, et al. Difference in nicotine to nornicotine conversion between lamina and midrib in burley tobacco and its contribution to TSNA formation [A]. 56th Tobacco Science Research Conference. Lexington, USA, 2002.
- [33] Shi H, Hempfling WP, Kalengamaliro N. Stimulation of nicotine to nornicotine conversion by treatment of tobacco with sodium bicarbonate [A]. CORESTA. New Orleans, USA, 2002.
- [34] Shi H, Krauss M, Bokelman G, et al. TSNA and precursors in tobacco with different degree of conversion [A]. 225th American Chemistry Conference. New Orleans, USA, 2003.
- [35] Shi H, Kalengamaliro N, Krauss M, et al. Stimulation of nicotine demethylation by NaHCO₃ treatment using greenhouse-grown burley tobacco [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(26): 7679–7683.
- [36] Shi H, Krauss M, Gadani F. Ethylene formation in tobacco plants treated with sodium bicarbonate [A]. CORESTA. Bucharest, Romania, 2003.
- [37] Shi H, Bush LP. Impact of nicotine content on the conversion level of nicotine to nornicotine in converter tobacco plants [A]. CORESTA. Kyoto, Japan, 2004.
- [38] Wada E. Conversion of nicotine to nornicotine in cherry red tobacco during flue-curing [J]. *Tobacco Science*, 1957, 1: 118–119.
- [39] Wernsman EA, Matzinger DF. Time and site of nicotine conversion in tobacco [J]. *Tobacco Science*, 1968, 12: 226–228.
- [40] Wernsman EA, Matzinger DF. Relative stability of alleles at the nicotine conversion locus of tobacco [J]. *Tobacco Science*, 1970, 14: 34–36.
- [41] Wernsman EA, Davis DL, Beeson D. Genetic instability at a nicotine to nornicotine locus in burley tobacco and its consequences on secondary amine alkaloids and TSNA's [A]. CORESTA. Lisbon, Portugal, 2000.
- [42] Weybrew JA, Mann TJ, Moor EL. Nicotine conversion and cherry redness [J]. *Tobacco Science*, 1960, 4: 190–193.