

# 单倍性烟草 Hyp 抗性愈伤组织变异系的选择 及其生理生化特性的研究

## II. Hyp抗性变异系内游离脯氨酸的积累

许 耀

(兰州大学生物系, 兰州)

朱 庆 麟

(西北农业大学植物组织培养实验室, 咸阳)

在正常条件下,烟草Hyp抗性变异系愈伤组织内的游离脯氨酸含量是其野生型的4倍多。这种积累游离脯氨酸的特性在愈伤组织的转代、再生及次生过程中均十分稳定。虽然其他多种氨基酸含量也有所改变,但变异系内游离脯氨酸的积累具有特异性。由于脯氨酸对Hyp抑制效应具有部分的逆转作用,所以游离脯氨酸的积累是变异系抗Hyp抑制作用的重要原因。然而,变异系内蛋白质组成中的脯氨酸并没有特异性地增加。在Hyp存在条件下,变异系内的硝酸还原酶、转化酶及过氧化氢酶活性均显著地高于野生型。表明变异系对培养基中的碳源和氮源具有较高的利用能力。

**关键词** 羟基脯氨酸抗性; 脯氨酸积累; 体细胞突变体选择; 组织培养; 单倍体烟草

近年来,从植物培养细胞中选出的生化突变体的数目日益递增<sup>[1-5]</sup>。在选择抗氨基酸或氨基酸类似物的突变体方面特别诱人,因为分离出的抗氨基酸或氨基酸类似物的突变体或细胞系不仅在代谢研究和遗传操作中具有重要的应用价值,并且大都能够积累相应的天然氨基酸<sup>[6-14]</sup>。

我们以Hyp(L-羟基脯氨酸)作为选择压力,利用多步正筛选系统,对<sup>60</sup>Co  $\gamma$ -射线诱变的单倍性愈伤组织系经过连续八轮的分离与选择,获得了抗脯氨酸类似物Hyp的烟草愈伤组织系C<sup>r</sup>-2、H<sup>r</sup>-4和X<sup>r</sup>-1。前文<sup>[15]</sup>考察了其继代愈伤组织系、次生培养物以及再生植株的抗性表现。本文报道Hyp抗性变异系C<sup>r</sup>-2和X<sup>r</sup>-1的有

关生化特性。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

建立单倍性体细胞离体无性系所用的供体材料为普通烟草(*Nicotiana tabacum* L.) CC77046、杂(35)和许五小叶等3个品种及品系。本实验所用材料为单倍性烟草Hyp抗性愈伤组织变异系C<sup>r</sup>-2和X<sup>r</sup>-1及其相应的野生型C<sup>w</sup>和X<sup>w</sup><sup>[15]</sup>。

本文于1986年4月21日收到。

本工作完成于西北农业大学。承蒙郑国锟和贾敬芬教授审阅本文,特此致谢。

## (二) 培养条件

参见文献[15]。

## (三) 氨基酸逆转作用的测定

将继代培养到第八代日龄为 14 天的 X<sup>+</sup>愈伤组织系均切成平均鲜重约为 15mg 的小块。接入含 0.2、0.6 和 1.0mM Hyp 及含不同浓度脯氨酸、谷氨酸、酪氨酸、苏氨酸和天冬氨酸等的培养基中。培养一月后分析鲜重。以不加Hyp和这些氨基酸(该处理为Ck)的均值为100%。每处理重复3—5次,每重复接10—15块培养物。

## (四) 游离氨基酸分析

取1—2g新鲜组织,用80%乙醇离心提取游离氨基酸。再生植株的叶片分析为随机取样。根据分析项目,将在80℃条件下蒸去乙醇的残物用蒸馏水或1%(V/V) HCl溶解并定容至50ml。取一定量用蒸馏水定容的滤液,利用酸性茚三酮比色法<sup>[16]</sup>测定游离脯氨酸的含量。游离总氨基酸的测定用普通茚三酮比色法<sup>[17]</sup>。游离氨基酸总量以每克鲜样中含氨基氮的微克数表示,即为总游离氨基氮(TFA-N)。根据脯氨酸的含氮量12.17%,由游离脯氨酸含量折算游离脯氨酸氮(PRO-N)。取用1% HCl定容的滤液10ml,于60—80℃水浴中蒸干。加1ml 5%磺基水杨酸和4ml pH2.2的柠檬酸缓冲液,充分溶解残渣。在4000rpm条件下离心15min。取上清液在121MB型氨基酸分析仪上测定游离氨基酸的组成及含量。

## (五) 水解氨基酸分析

将上述80%乙醇反复浸提过的残渣,于80℃条件下烘干。转入水解管底部。加入8ml 6N HCl。真空封管后,于110±1℃条件下水解22h。将水解液转于25ml量瓶中,用0.01N HCl定容。取滤液2ml蒸干。反复用去离子水溶解蒸干除去HCl。加入pH2.2柠檬酸缓冲液5ml。离心后,

取上清液在氨基酸分析仪上测定非醇溶蛋白样品水解氨基酸的组成及含量。

## (六) 酶活性和蛋白质含量的测定

依次用对-氨基苯磺酸试剂反应法<sup>[18]</sup>、砷钼酸比色法和碘量滴定法<sup>[17]</sup>测定愈伤组织内硝酸还原酶、转化酶和过氧化氢酶的活性。以0.1 N NaOH提取蛋白质样品。利用紫外吸收法<sup>[17]</sup>在UVIKON 810 型紫外-可见分光光度计上分析愈伤组织内碱溶性蛋白质含量。

各生化分析项目测定重复2—3次,并用t-测验法统计处理有关数据。

## 结果与讨论

### (一) Hyp 抗性变异系愈伤组织内的游离脯氨酸含量

迄今报告过的氨基酸类似物抗性突变体和细胞系,有相当一部分表现为过量合成相应的天然氨基酸<sup>[6]</sup>。为鉴定抗Hyp的烟草愈伤组织变异系是否也积累相应的天然氨基酸-脯氨酸,分别测定了Hyp抗性变异系C<sup>-</sup>-2、X<sup>-</sup>-1及其相应野生型C<sup>+</sup>、X<sup>+</sup>的继代愈伤组织系和次生愈伤组织内游离脯氨酸的含量。由表1可见,离开选择剂转代培养到第四轮日龄为14天的C<sup>-</sup>-2和X<sup>-</sup>-1愈伤组织内游离脯氨酸含量分别是C<sup>+</sup>和X<sup>+</sup>愈伤组织内含量的4.68倍和4.32倍。类似地,从Hyp抗性变异系C<sup>-</sup>-2和X<sup>-</sup>-1再生的抗性植株之茎段诱发的次生愈伤组织内游离脯氨酸含量仍均显著地高于其野生型C<sup>+</sup>和X<sup>+</sup>次生愈伤组织内的含量。

Hyp抗性变异系C<sup>-</sup>-2和X<sup>-</sup>-1愈伤组织内的总游离氨基酸含量也有所提高,分别为各自野生型C<sup>+</sup>和X<sup>+</sup>愈伤组织的1.44倍和3.24倍(表2)。

在正常条件下,C<sup>+</sup>和X<sup>+</sup>愈伤组织内的PRO-N在TFA-N中占的比例均较小。但

表 1 烟草Hyp抗性变异系及其野生型不同愈伤组织内游离脯氨酸的含量

Table 1 Free proline contents of callus cultures of Hyp-resistant variants and their wild types

愈伤组织系 Callus clones	继代愈伤组织系 Callus clones subcultured	次生愈伤组织 Secondary cultures
	游 离 脯 氨 酸 含 量 Free proline levels( $\mu\text{g/g F.W.}$ )	
C <sup>w</sup>	45.5 $\pm$ 4.2	78.0 $\pm$ 7.8
C <sup>r-2</sup>	212.8 $\pm$ 9.5	291.5 $\pm$ 23.3
X <sup>w</sup>	53.3 $\pm$ 3.9	59.0 $\pm$ 5.7
X <sup>r-1</sup>	230.0 $\pm$ 10.6	198.8 $\pm$ 19.4

表 2 烟草Hyp抗性变异系及其野生型愈伤组织内游离脯氨酸氮 (PRO-N) 与总游离氨基酸氮 (TFA-N) 的关系

Table 2 Relation between free proline-nitrogen(PRO-N) and total free amino-nitrogen (TFA-N) of the Hyp-resistant variants and their wild types

愈伤组织系 Callus clones	PRO-N 含量 PRO-N contents ( $\mu\text{g/g F.W.}$ )	TFA-N 含量 TFA-N contents ( $\mu\text{g/g F.W.}$ )	PRO-N/TFA-N (%)
C <sup>w</sup>	5.54 $\pm$ 0.51	335 $\pm$ 21	1.65
C <sup>r-2</sup>	25.90 $\pm$ 1.16	482 $\pm$ 40	5.37
X <sup>w</sup>	6.49 $\pm$ 0.47	187 $\pm$ 10	3.47
X <sup>r-1</sup>	27.99 $\pm$ 1.29	605 $\pm$ 81	4.63

在C<sup>r-2</sup>和X<sup>r-1</sup>的愈伤组织系中, PRO-N占的百分数均较高, 分别为各自野生型的3.25倍和1.33倍。因此, 在Hyp抗性变异系C<sup>r-2</sup>的愈伤组织内, 游离脯氨酸的绝对量不仅显著提高, 而且其相对量也明显增加。

## (二) Hyp抗性变异系内游离氨基酸的组成及其水解产物含量的分析

由上述分析已知; 在正常条件下, Hyp抗性变异系的愈伤组织内积累较多的游离脯氨酸。那么, 除了脯氨酸外, 其他游离氨基酸是否也有积累? 这种氨基酸在蛋白质中的组成含量是否也有提高? 此外, 这种在培养物水平上表现的脯氨酸积累特

性, 能否在再生植株水平上得到表达? 为此, 对离开选择剂转培到第五代日龄为三周的 Hyp 抗性系C<sup>r-2</sup>和由之再生的完整植株的叶片组织及相应的野生型C<sup>w</sup>, 分别分析了游离氨基酸的组成及含量。同时, 比较了二者愈伤组织内非醇溶蛋白质样品的水解产物的组成及含量。

如表3所示, 除了天冬氨酸(Asp)、丝氨酸(Ser)、谷氨酸(Glu)和脯氨酸(Pro)外, 在C<sup>r-2</sup>愈伤组织内, 其他游离氨基酸的含量均低于C<sup>w</sup>愈伤组织内的含量。在上述四种氨基酸中, 只有Asp和Pro在C<sup>r-2</sup>愈伤组织内的含量显著地高于C<sup>w</sup>, 分别为野生型值的14.11倍和4.64

表 3 Hyp抗性变异系C<sup>r</sup>-2与野生型C<sup>w</sup>愈伤组织和再生植株叶片内游离氨基酸及非醇溶蛋白质氨基酸含量的比较

Table 3 Comparison of free-amino-acid pools and alcohol-indissoluble-protein amino acids levels in the callus cultures and leaves of regenerated plants between Hyp-resistant variant C<sup>r</sup>-2 and its wild type C<sup>w</sup>

氨基酸 Amino acids	游离氨基酸含量 Free-amino-acid pools (mg/100 g F. W.)				非醇溶蛋白质氨基酸含量 Alcohol-indissoluble-protein amino acids levels in the callus cultures (g/100g F. W.)	
	继代愈伤组织系 Callus clones subcultured		再生植株的叶片 Leaves of regenerated plants			
	C <sup>r</sup> -2	C <sup>w</sup>	C <sup>r</sup> -2	C <sup>w</sup>	C <sup>r</sup> -2	C <sup>w</sup>
Asp	94.684	6.710	95.404	53.369	0.221	0.133
Thr	微	微	微	微	0.094	0.060
Ser	29.343	29.003	128.170	108.960	0.100	0.062
Glu	47.880	31.718	200.037	167.334	0.232	0.145
Pro	27.979	6.032	40.635	9.424	0.102	0.086
Gly	1.212	4.005	1.987	1.381	0.099	0.063
Ala	5.929	7.101	12.212	3.726	0.107	0.065
Cys	微	微	微	微	0.002	0.002
Val	1.755	1.991	10.992	6.030	0.135	0.080
Met	微	微	0.231	0.799	0.007	0.004
Ileu	0.406	1.667	2.664	2.377	0.102	0.056
Leu	1.748	3.497	3.732	2.543	0.170	0.098
Tyr	0.411	2.296	1.655	1.527	0.066	0.044
Phe	0.360	1.094	2.598	3.131	0.095	0.054
Lys	1.190	1.860	4.725	3.738	0.175	0.110
His	0.666	1.148	11.668	7.892	0.048	0.032
Arg	微	1.226	11.414	7.621	0.117	0.073
Total	213.563	99.348	528.124	379.852	1.872	1.167

倍。在再生植株的叶片内，游离Pro的积累趋势基本与愈伤组织水平上的表现一致。C<sup>r</sup>-2再生植株叶片内的游离Pro含量为C<sup>w</sup>的4.31倍。此外，除了丙氨酸(Ala)和蛋氨酸(Met)外，其他氨基酸的游离含量在变异体和野生型的再生植株叶片之间相差不大。虽然在愈伤组织水平上，C<sup>r</sup>-2的游离Asp含量是C<sup>w</sup>的14.11倍，但在植株水平上居然降为1.79倍。所以游离Asp含量的相对变化十分不稳定。至于在愈伤组织水平上C<sup>r</sup>-2的游离Asp异常增加的原因，尚不清楚。同样，Ala、

Met等的相对变化也很不稳定。只有游离Pro含量在变异系内稳定地提高了，因为Hyp抗性变异系C<sup>r</sup>-2无论是在离开选择剂转代培养到第四轮和第五轮的愈伤组织系再生植株的叶片内，还是在次生愈伤组织内。游离Pro含量均数倍于其相应时期的野生型C<sup>w</sup>(表1、3)。

烟草Hyp抗性变异系内游离脯氨酸的积累情况与胡萝卜Hyp抗性细胞系<sup>[19]</sup>和大麦Hyp抗性突变体<sup>[20,21]</sup>中的情形类似。然而，Hasegawa等<sup>[22]</sup>报道的水稻Hyp抗性突变体并无游离脯氨酸的积累。

他们认为, 这一现象可能与水稻突变体的Hyp抗性受隐性单基因控制有关。

从表 3 还可看出, 虽然C<sup>r</sup>-2愈伤组织内蛋白质组成中的脯氨酸的绝对含量(0.102g/100g鲜重)略高于C<sup>w</sup>(0.086g/100g鲜重), 但其相对比例(5.45%)还低于C<sup>w</sup>(7.37%)。因此, Hyp抗性变异系内组成蛋白质的脯氨酸并没有特异性地增加。类似地, 变异系内几乎所有的蛋白质氨基酸含量都比野生型高, 但没有任何一种

蛋白质组成中的氨基酸在变异系内表现为选择性地提高。此外, C<sup>r</sup>-2的总水解产物量是C<sup>w</sup>的1.6倍。表明变异系愈伤组织内蛋白质含量有所提高。这与利用紫外吸收法测定离开Hyp转代培养到第四轮日龄为两周的C<sup>r</sup>-2及相应转代培养的C<sup>w</sup>愈伤组织内碱溶性蛋白质含量的结果(表 4)基本一致。抗性变异系C<sup>r</sup>-2和X<sup>r</sup>-1愈伤组织内的碱溶性蛋白质含量分别是其野生型C<sup>w</sup>和X<sup>w</sup>的1.69倍和1.77倍。并且它们之

表 4 Hyp抗性变异系及其野生型愈伤组织内碱溶性蛋白质的含量

Table 4 Alkali-dissoluble protein contents of callus cultures of Hyp-resistant variants and their wild types

愈伤组织系 Callus clones	蛋白质含量 Protein contents (% of F.W.)	变异系/野生型 值 Variant/wild type value	差异显著性 * Test of significance*
C <sup>w</sup>	1.74 ± 0.03	1.69	S
C <sup>r</sup> -2	2.94 ± 0.20		
X <sup>w</sup>	1.32 ± 0.01	1.77	VS
X <sup>r</sup> -1	2.34 ± 0.11		

\* t测验结果 t-test; S 显著 Significant (P<0.05); VS 极显著 Very significant (P<0.01)

间的差异显著性分别达到了显著和极显著水平。

### (三) Hyp抗性变异系C<sup>r</sup>-2与其野生型C<sup>w</sup>之间酶活性的比较

由于所用培养基中的主要碳源是蔗糖、主要氮源是硝酸盐, 在含Hyp的培养基上Hyp抗性变异系与野生型愈伤组织的生长表现出明显差异<sup>[15]</sup>, 因此, 二者组织内的转化酶、硝酸还原酶活性就会表现出不同。此外, 过氧化氢酶活性也可能表现出差异, 因为植物组织中过氧化氢酶活力与植物的代谢强度及抗性能力有一定的联系。为此, 将在无选择压力条件下转代培养的Hyp抗性变异系C<sup>r</sup>-2及其相应转代培养的野生型C<sup>w</sup>的部分培养物转入含有

0.5mM Hyp的培养基上。培养 10 天时, 测定C<sup>r</sup>-2及C<sup>w</sup>愈伤组织内这些酶在活性方面的潜在差异(表 5)。结果表明, Hyp抗性变异系C<sup>r</sup>-2愈伤组织内的硝酸还原酶、转化酶以及过氧化氢酶活性分别约为其野生型的 2—3 倍。并且, 这种差异均达到了显著或极显著水平。说明在Hyp存在条件下, 变异系对培养基中的碳源和氮源的利用能力以及抗性能力均显著地高于其野生型。

### (四) 脯氨酸对Hyp抑制生长的逆转作用

选用了不同浓度的谷氨酸、酪氨酸、脯氨酸、苏氨酸和天冬氨酸来测试它们单独加入到培养基中时, 对0.2、0.6和1.0mM

表 5 Hyp抗性变异系C<sup>r</sup>-2与野生型C<sup>w</sup>之间酶活性的比较

Table 5 Comparison of enzyme activities between Hyp-resistant variant C<sup>r</sup>-2 and its wild type C<sup>w</sup>

愈伤组织系 Callus clones	硝酸还原酶活性 (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> μg/g鲜重/h) Nitrate reductase activity (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> μg/g F.W./h)	转化酶活性 (还原糖mg/g鲜重/h) Invertase activity (reducing sugar mg/g F.W./h)	过氧化氢酶活性 (分解的H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mg/g鲜重/min) Katalase activity (resolved H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mg/g F.W./min)
C <sup>w</sup>	27.3±3.3	4.019±0.088	5.394±0.094
C <sup>r</sup> -2	55.0±4.0	12.319±0.097	10.225±0.217
C <sup>r</sup> -2/C <sup>w</sup>	2.02*	3.07**	1.90**

t 测验结果 t-test, \* 显著 Significant (P<0.05);  
\*\* 极显著 Very significant (P<0.01)

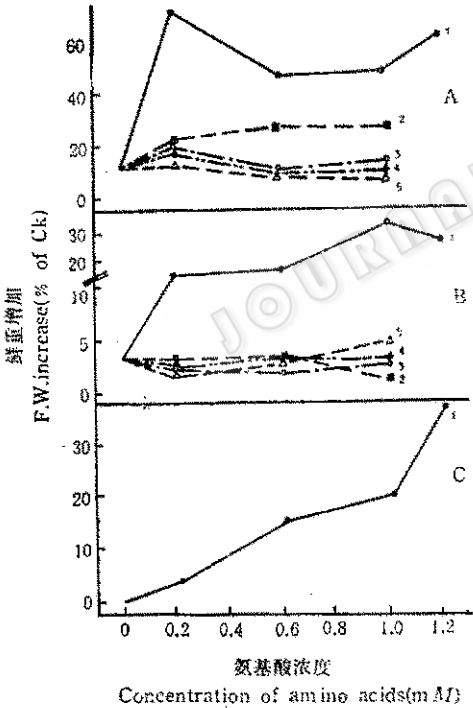


图1 氨基酸对Hyp抑制烟草愈伤组织生长的逆转作用

Fig. 1 Growth inhibition on callus cultures of haploid tobacco by Hyp and its relief by other amino acids

A, Hyp 0.2mM; B, Hyp 0.6mM; C, Hyp 1.0 mM

- 1. 脯氨酸 proline 2. 谷氨酸 Glutamate
- 3. 酪氨酸 Tyrosine 4. 天冬氨酸 Aspartate
- 5. 苏氨酸 Threonine

三种浓度水平的 Hyp 抑制生长的逆转作用。图1的结果表明,在所试的氨基酸中,只有Hyp的相应天然氨基酸脯氨酸对Hyp的抑制作用具有部分的逆转作用。其他氨基酸不但没有逆转作用。反而还具一定程度的抑制作用。0.2—1.2mM 浓度范围的脯氨酸对0.2mM Hyp抑制生长的逆转作用为16.8—40.4%。其中加入与Hyp同样浓度(0.2mM)的脯氨酸对其抑制生长的逆转作用最大(40.4%)。当Hyp浓度为0.6mM时,它对生长的抑制程度也随之增强。相应地,脯氨酸的逆转作用有所降低。但较高浓度的脯氨酸仍具较大的逆转作用,其中1.0mM脯氨酸对Hyp抑制生长的逆转作用最大(31.1%)。在1.0mM Hyp的各处理中,除加入脯氨酸的处理外,Hyp完全抑制了培养物的生长。在此条件下,脯氨酸对Hyp抑制的逆转作用随着测试浓度范围内脯氨酸浓度的增加而提高。

如前所述,在正常条件下,Hyp抗性变异系内的游离脯氨酸积累特性十分稳定,它不仅能够在继代培养物水平上表

达, 而且能够通过再生传递, 在再生植株叶片水平以及次生培养物水平上表达(表1、3)。由于向培养基中加入脯氨酸可部分地逆转Hyp对愈伤组织生长的抑制作用, 因此可以认为, 过量积累游离脯氨酸是Hyp抗性愈伤组织变异系对Hyp具有抗性的重要原因。至于变异系是否减少对Hyp的吸收, 从而减少Hyp向蛋白质中的掺入量; 或是否钝化或破坏了培养基中的Hyp, 这些问题需要进行放射性示踪实验或其他实验加以研究。

由植物系统中脯氨酸生物合成途径的知识<sup>[23, 24]</sup>可知, 脯氨酸主要来自谷氨酸和鸟氨酸。至今对植物中脯氨酸合成

和催化的研究并不多, 尤其还不十分明确植物中脯氨酸生物合成途径的反馈调节系统。虽然尚无直接的实验证据证明烟草Hyp抗性愈伤组织变异系积累游离脯氨酸的生化基础及遗传学基础, 但可以设想, 变异系积累游离脯氨酸的原因有这样几种可能: (1) 脯氨酸生物合成途径中的某种酶(如调节酶)发生了改变, 表现出对反馈抑制作用不敏感, 从而刺激了脯氨酸的合成和积累; (2) 使脯氨酸分解的某种酶(如脯氨酰氧化酶或脯氨酸脱氢酶)发生了改变, 从而降低了脯氨酸的氧化速率; (3) 脯氨酸向蛋白质中的掺入受阻, 使脯氨酸得以积累。

## 参 考 文 献

- [1] Maliga, P., *Int. Rev. Cytol.*, 11A (Suppl.):225—250, 1980.
- [2] Chaloff, R. S., *Science*, 219:676—682, 1983.
- [3] Maliga, P., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35:519—542, 1984.
- [4] Negrutiu, I. et al., *Theor. Appl. Genet.*, 67:289—304, 1984.
- [5] 许 耀: 植物生理学通讯, 2:1—8, 1987.
- [6] 许 耀: 植物学通报, 印刷中, 1987.
- [7] Palmer, J. E. and Widholm, J., *Plant Physiol.*, 56:233—238, 1975.
- [8] Widholm, J. M., *J. Expt. Bot.*, 29:1111—1116, 1978.
- [9] Hibberd, K. A. and Green, C. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:559—563, 1982.
- [10] Schaeffer, G. W. and Sharpe, F. T., *In Vitro*, 17:345—352, 1981.
- [11] Ranch, J. P. et al., *Plant Physiol.*, 71:136—140, 1983.
- [12] 何卓培等: 实验生物学报, 17(2):171—176, 1984.
- [13] Gonzales, R. A. et al., *Plant Physiol.*, 74:640—644, 1984.
- [14] Cobsen, E. et al., *Plant Cell Rep.*, 4:151—154, 1985.
- [15] 许 耀、朱庆麟: 生物工程学报, 2(4):35—42, 1986.
- [16] 朱广廉等: 植物生理学通讯, 1:35—37, 1983.
- [17] 西北农学院植物生理生化室汇编: 基础生物化学实验指导, 1984.
- [18] 华东师范大学植物生理组主编: 植物生理学实验指导, 人民教育出版社, 1980.
- [19] Widholm, J. M., *Can. J. Bot.*, 54:1523—1529, 1976.
- [20] Kueh, J. H. S. and Bright, S. W. J., *Planta*, 153:166—171, 1981.
- [21] Kueh, J. H. S. and Bright, S. W. J., *Plant Sci. Lett.*, 27:233—241, 1982.
- [22] Hasegawa, H. and Mori, S., *Theor. Appl. Genet.*, 72:226—230, 1986.
- [23] Dashek, W. V. and Erickson, S. S., *Bot. Rev.*, 47:349—385, 1981.
- [24] 汤章城: 植物生理学通讯, 4:15—21, 1984.

# SELECTION OF HYDROXY-L-PROLINE-RESISTANT VARIANTS OF TOBACCO FROM CULTURED HAPLOID CALLUS AND STUDIES ON THEIR PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS

## II. FREE PROLINE ACCUMULATION OF Hyp-RESISTANT VARIANTS

Xu Yao

(Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou)

Zhu Qinglin

(Laboratory of Plant Tissue Culture, Northwestern University of Agriculture, Xianyang)

Three variant lines resistant to hydroxy-L-proline(Hyp) of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. CC77046, Hybrid (35) and Xuwu Xiaoye), denoted as C<sup>r</sup>-2, H<sup>r</sup>-4 and X<sup>r</sup>-1, have been selected from haploid callus cultures, which were submitted to <sup>60</sup>Co γ-ray irradiations before selecting for resistance to Hyp, by the multi-step direct selection system, and the corresponding non-irradiated callus cultures of these cultivars, which were subcultured on the normal medium, referred to as wild types, were designated respectively as C<sup>w</sup>, H<sup>w</sup> and X<sup>w</sup>.

The Hyp-resistant variants showed a apparent and specific increase in the level of free proline. Under normal conditions the callus cultures of variants contained more than four times as much free proline as did the wild types, and the proline overproduction trait could be expressed not only in the whole plants regenerated from the callus clones of variant but also in the secondary cultures induced from the regenerated plants through the transmission of regeneration. In addition, the percentage of free proline-nitrogen in total free amino-nitrogen was also evidently raised in the variant cultures, and the levels of several other amino acids were altered at the same time. Because the inhibition of haploid callus growth by Hyp could be partially reversed by proline, but not by other amino acids tested, the proline accumulation might be one of the important reasons why the variants were resistant to Hyp. The variant cultures contained elevated levels of protein, but the proline content of the total protein in the variant was not significantly and specifically increa-



sed.

The activities of nitrate reductase, invertase as well as katalase in the callus cultures of C'-2 were significantly higher than those of C" in the presence of 0.5 mM Hyp. It follows that the abilities of variant to utilize the carbon and nitrogen sources in the medium were much stronger than those of wild type in the presence of Hyp.

### Key words

Hydroxy-L-proline resistance; proline accumulation; somatic mutant selection; tissue culture; haploid tobacco