

营养对菜心核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶动力学的影响

宁正祥¹ 李明启¹ 曹健² 关佩聪²

(农业生物系光合作用研究室¹ 园艺系蔬菜教研室²)*

摘要 对生长在高、中、低不同氮、钾营养条件下的菜心 (*Brassica parachinensis* Bailey) 叶片中的核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (RubisCO) 动力学特性及菜心产量进行了测定。不同营养处理之间, 菜心产量差异极为显著, 变化范围为 0.57~4.38 g (干重)/株; RubisCO 动力学特性则无显著性差异。相关分析结果表明, 氮素营养能显著增强 RubisCO 的羧化作用和加氧作用, 与 $V_{max} (CO_2) (V_c)$ 、 $V_{max} (O_2) (V_c)$ 和 $V_c/K_m (CO_2) (K_c)$ 、 $V_c/K_m (O_2) (K_c)$ 值三间的相关系数极显著 ($P<0.01$)。钾素营养则能明显提高 RubisCO 的加氧作用, 与 K_c 值之间存在极显著的相关, 与 V_c 值间存在极显著的正相关。专一性因子 $V_c K_c / V_c K_m$ 与菜心产量之间有极显著的直线回归关系。在适宜的氮、钾营养水平下, 菜心的产量及 RubisCO 的专一性因子都最高。

关键词 菜心; 核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶; 氮; 钾

光合作用是作物的有机物来源, 与作物产量有密切关系。氮、磷、钾对作物的生长、发育具有极其重要的作用, 很早就被称作植物营养三大要素。为了解这些营养元素对光合作用的影响, 人们已作了大量的研究工作。菜豆^[9]、大豆^[6]、马铃薯^[8]、黄麻^[2]和小麦^[9]等作物的光合作用与氮素营养水平关系极为密切。氮肥过多或过少^[5], 都会导致光合速率下降。核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (RubisCO, EC. 4. 1. 1. 39) 是光合作用的关键性酶, 其羧化活性启动植物的光合作用碳素同化, 加氧活性则启动光呼吸消耗有机碳。故研究 RubisCO 的羧化与加氧活性变化有重要意义。已知 RubisCO 含量与羧化活性同氮素营养水平之间存在明显的正比关系^[5, 8]。钾素能提高叶绿素含量, 增强作物的光合机能, 从而影响作物生长和物质积累^[3]。但氮素和钾素的吸收存在着竞争性的抑制作用^[4]。因此, 研究氮、钾营养的配合施用对作物光合作用的影响, 探讨氮、钾营养的生理机制和指导生产实践等方面, 都有着重要的意义。本文从酶动力学角度报告不同氮、钾营养水平下, 菜心 (*Brassica parachinensis* Bailey) RubisCO 的动力学特性及与生产能力的关系。

1 材料和方法

1. 1 营养处理和栽培

将四九—19 号菜心品种直播于栽培盆中, 萌发后每盆选留 6 株。栽培盆的规格为直径 30 cm, 高 37 cm。盆栽土壤为华南农业大学蔬菜试验场的菜园土。三要素含量为: 有效氮 81 ppm, 有效磷 58 ppm; 有效钾 49 ppm。氮、钾营养设置 5 个组合: $N_0 K_1$: 15g KC1/盆, $N_1 K_0$

* 宁正祥现在工作单位为华南理工大学食品工程系。

1990—10—31 收稿

· 20 g 尿素/盆, N_1K_1 : 20 g 尿素 + 15 g KCl/盆, N_1K_2 : 20 g 尿素 + 30 g KCl/盆, N_2K_1 : 40 g 尿素 + 15 g KCl/盆。每处理分 4 个小区, 每小区 11 盆。以各处理的总肥量的 10% 作基肥, 其余作追肥, 幼苗期追肥 2 次, 每次为总肥量的 5%; 叶片生长期追肥 4 次, 分别为总肥量的 5%, 10%, 10% 和 15%; 莱苔形成期追肥 3 次, 依次为总肥量的 15%, 15% 和 10%。播种 42 天后收获。洗净根部土壤后, 置 110℃ 烘箱内杀青 5~10 min, 再降到 60℃ 烘至恒重, 测定单株干重。

1. 2 RubisCO 的制备及活性测定

在抽苔中期, 每处理采样 40 株、取成熟叶片的叶肉部分切碎, 加入 0.5 倍叶重的预冷 (4℃) 提取液 (Tris, 50 mmol/L; 氯基乙醇, 80 mmol/L; EDTA, 6 mmol/L; NaCl, 2 mmol/L) 匀浆, 4 层 200 目尼龙布过滤, 调节滤液至 pH 8.0, 加硫酸铵至 20% 饱和度。20 000 g, 4℃, 离心 15 min, 上清液中加入硫酸铵至 50% 饱和度, 调至 pH 7.6, 20 000 g, 4℃, 离心 10 min, 用 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0, 内含 $MnCl_2$ 0.1 mol/L) 溶解沉淀。20 000 g, 4℃, 离心 20 min。上清液过 Sephadex G-100 柱 (3.3 cm × 40 cm, 装柱高度 37 cm, 用 25 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 缓冲液平衡和洗脱、上柱样品体积为 5 ml), 收集第一蛋白主峰。

RubisCO 的活化基本依 Kung 等^[7]的方法。40℃ 活化 25 min, 20 000 g, 25℃, 离心 20 min。上清液 (A_{260}/A_{280} 为 1.50~1.70, 4%~7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳为一条蛋白带) 用于活性测定和酶蛋白含量测定。

RubisCO 的活性测定采用变色酸法^[1]。其动力学常数的计算采用双倒数作图法和最小二乘法。反应介质中 CO_2 浓度的计算按 Henderson-Hasselbach 公式^[10]。 O_2 浓度以 25℃, 100% O_2 的溶解浓度为 1.24 mmol/L 为标准计算。

2 试验结果

2. 1 氮、钾营养对 RuBP 羧化酶动力学的影响

对抽苔中期菜心叶片中的 RubisCO 动力学测定结果列于表 1。从相关分析结果看出, 菜心 RuBP 羧化酶的 K_m 值与氮素和钾素营养水平之间无相关, 相关系数分别为 0.064 和 0.436。氮、钾营养的组合情况则对 K_m 值有较大的影响。 N_1K_1 是菜心生长发育比较适宜的营养组合水平, 其 K_m 值为 $25.1 \mu mol/L$ 。在其它 4 个不适应的氮、钾组合中, K_m 值表现为一致的下降趋势, 特别是在低氮或高氮条件下, 下降幅度更为明显, 比 N_1K_1 的 K_m 值低近 1/5。

V_m 值与氮、钾营养水平之间具有极显著的正相关性。与氮素营养水平的相关系数为 0.961^{**} ($P < 0.01$)。不论是氮、还是钾, 当缺乏时, 都明显地降低 V_m 值。而在过量时, 钾有轻微的抑制作用, 氮则仍有一定的增效作用, V_m 值的变异系数比较高, 为 15.5%。但方差分析结果表明, 各处理之间无显著性差异。

V_m/K_m 值的变化范围较广, 为 6.5×10^{-3} ~ 9.9×10^{-3} , 变异系数最高, 为 17%。 N_2K_1 的 V_m/K_m 值最高, 为 9.9×10^{-3} , 比 N_1K_1 高 52%, 也显著高于除 N_1K_1 外的其它处理。氮素营养水平与 V_m/K_m 值之间存在极显著的相关。 r_{Nx} 为 0.984^{**}。

这些结果说明, 氮素营养水平的高低对菜心 RubisCO 的羧化活性具有显著的影响, 钾素的作用则相对比较小。

表1 氮、钾营养对菜心 RubisCO 动力学特性的影响

X 处 理	K _c ($\mu\text{mol/L}$)	V _c (n mol/mg protein · min)	K _o ($\mu\text{mol/L}$)	V _o ($\frac{\text{n mol}}{\text{mg protein} \cdot \text{min}}$) (10^{-4})	V _c /K _c (10^{-4})	V _o /K _o (10^{-4})	V _c /V _o	V _c K _c /V _o K _o
N ₁ K ₁	21.2±1.4	210±30	730±30	88.2±1.5	9.9*	1.2	2.4	82
N ₂ K ₁	20.9±1.6	146±15	872±21	81.4±2.0	7.0	0.9	1.8	75
N ₃ K ₁	25.1±2.0	194±13	911±41	83.2±1.7	8.0	1.0	2.3	83
N ₁ K ₀	24.2±1.3	152±18	1032±70	81.6±3.2	6.5	0.8	1.9	80
N ₂ K ₂	23.5±1.4	183±23	864±31	86.4±4.0	7.4	1.0	2.1	78
SD/X (%)	8.1	15.5	14.1	3.5	17.0	15.1	12.2	4.0
r _{nx}	0.064	0.961**	-0.745	0.965**	0.984* 0.982* 0.902**	0.803		
r _{ox}	-0.436	0.712	-0.967**	0.982**	0.596 0.866 0.552	-0.397		

注: 数据表示为: $\bar{X} \pm SD$, $n=3$. * 表示 $p<0.05$ ** 表示 $p<0.01$

2. 2 氮、钾营养对 RuBP 加氧酶动力学特性的影响

菜心 RubisCO 对 O_2 的亲和力比较低 (表 1)。K_o 值变化范围为 $700\sim 1030 \mu\text{mol/L}$, 变异系数比 K_c 值高 75%, 为 14.1%。与氮、钾营养的相关分析结果表明, K_o 值与氮营养水平之间的相关系数为 -0.745。钾素营养对 K_o 值则具有极显著的影响。随钾营养水平提高, RubisCO 对 O_2 的亲和力明显增加 (K_o 值降低)。相关系数为 -0.967**。

相对于其它动力学常数而言, 菜心 RubisCO 的 V_o 值最为稳定。变化范围为 $81\sim 88 \text{ n mol/mg}$ 蛋白质 · min, 变异系数很小, 仅为 3.5%。但 V_o 值与氮、钾营养水平间都存在极显著的相关, r 值分别为 0.965** 和 0.982**。

N₁K₁ 的 V_o/K_o 值为 1.2×10^{-4} , 明显高于其他处理。这说明高氮条件下, RubisCO 的加氧活性也较高。V_o/K_o 值与氮营养水平间有着极显著的正相关, 相关系数为 0.982**。

这些结果说明, 氮、钾营养对 RubisCO 的加氧作用都具有显著的促进作用, 钾对 RuBP 加氧酶的动力学常数的影响比氮显著, 而氮对 RuBP 加氧酶活性的影响略高于钾。

2. 3 不同营养条件下 RubisCO 的羧化/加氧比及与生产能力的关系

V_c/V_o 是反映光合作用与光呼吸最大酶反应速度之比的一个特征常数。表 1 的结果表明, N₂K₁ 和 N₁K₀ 的 V_c/V_o 值最低, 分别为 1.8 和 1.9。在氮素适宜或高氮情况下, V_c/V_o 值都较高, 约为 2.35 左右。这说明氮、钾营养缺乏时, 均使 V_c/V_o 值明显降低。与氮和钾之间的相关分析结果表明, 氮对 V_c/V_o 值有明显的作用, 相关系数显著, 为 0.902*, 而与钾的相关系数值仅为 0.552。

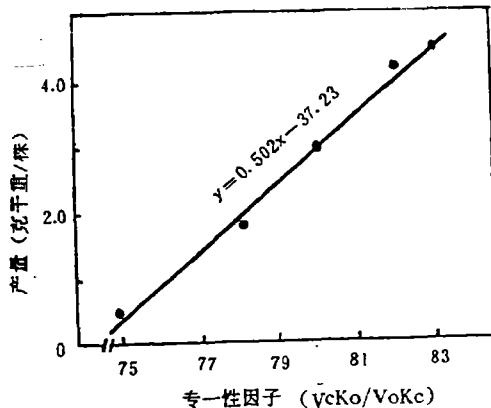


图 1 菜心 RubisCO 专一性因子与产量之间的关系

专一性因子 $V_{\text{K}_2}/V_{\text{K}_1}$ 则是全面反映作物光合作用/光呼吸的相对强度的一个重要的综合性特征常数, 其比值愈高, 则作物的光合能力愈强, 光合效率也愈高。从表 1 看出, 各处理间, 专一性因子的变化范围为 75~83。变异系数为 4%, 以 N_0K_1 最低, N_1K_1 最高, 二者相差约 1/10。

在产量上, 各处理之间差异极为显著(图 1)。 N_1K_1 产量最高, 为 4.38 g 干重/株, N_0K_1 最低, 仅为 0.57 g 干重/株。产量的变异系数高达 59.6%。

氮、钾营养与专一性因子及产量间的相关系数均不显著, 这说明影响菜心光合作用、光呼吸及菜心生产能力的因素相当复杂, 非少数几个因素所能决定。

从图 1 可看出, RubisCO 的专一性因子与菜心生产能力之间存在极显著的直线回归关系:

$$\text{克干重/株} = 0.502V_{\text{K}_2}/V_{\text{K}_1} - 37.23$$

相关系数亦极显著:

$$r = 0.993$$

这说明 RubisCO 的羧化/加氧比与菜心的生产能力关系极为密切, 氮、钾营养通过对光合/光呼吸相对比值的影响而成为制约菜心生产能力的重要因素之一。高的光合效率是充分发挥菜心生产能力的基本保证。

3 讨论

马铃薯^[8]和小麦^[6]等作物的 RubisCO 含量和羧化活性与氮素营养水平之间存在着明显的正比关系。Winter 等^[11]则报告, *Moricandia arvensis* 叶片的 RuBP 羧化酶活性不仅与氮素水平有关。而且还与氮素供应形态以及叶片的生理状态关系极为密切。供以硝态氮时, 幼叶 RuBP 羧化酶活性比供以氨态氮时要高, 在成熟叶片和老叶中的情况则恰好相反, 以氨态氮时 RuBP 羧化酶活性较高。

菜豆氮素营养不适宜时, RuBP 的再生能力和 RuBP 羧化酶活性明显降低, 使光合作用下降^[9]。我们的试验结果则表明, 菜心叶片中的 RuBP 羧化酶活性与氮素营养水平之间存在着显著的相关性, 与上述报告的结果一致。

在水稻上, 氮素和钾素的吸收之间存在着竞争性的抑制作用^[4]。对菜心叶片中的 RubisCO 动力学特性与氮、钾营养间的相关分析结果表明, 氮素营养对 RubisCO 的羧化作用和加氧作用都有显著的促进作用, 钾素营养则明显增强 RubisCO 的加氧作用。从 RubisCO 的专一性因子和不同营养条件下菜心的生产能力以及二者之间的相互关系上可以看出, 只有在氮素、钾素都比较适宜, RubisCO 的羧化和加氧作用都有一定强度时, 才能表现出高的专一性因子, 获得较高的生产能力。氮、钾过多或过少, 都不利于维持 RubisCO 的正常羧化、加氧强度和正常的羧化/加氧比, 致使菜心的生产能力得不到最大的发挥。菜心 RubisCO 正常的羧化/加氧比是保证菜心充分发挥生产能力, 获得高产的基本前提。这也说明光呼吸在 C₃ 植物中, 具有重要的生理功能, 氮、钾对 RubisCO 动力学特性的影响, 可能是氮、钾在光合作用, 以及生产能力等方面相互作用的生理机制之一。

4 小结

对生长在不同氮、钾营养条件下的菜心叶片中的 RubisCO 动力学特性及菜心生产能力的测定结果和它们之间的相关分析结果表明, 不同氮、钾营养水平下, 菜心 RubisCO 的 K_{m} 、

V_{max} 以及专一性因子相互之间无显著性差异。但 RubisCO 的动力学常数与氮、钾营养水平之间存在明显的相关性。氮素营养对 RubisCO 的羧化和加氧作用都具有极显著的促进作用, 与 V_{max} 之间的相关系数均极显著。钾素则明显地提高 RubisCO 的加氧作用, 与 K_m 值间存在极显著的负相关, 与 V_0 值则为极显著的正相关。

RubisCO 的专一性因子与生产能力间存在极显著的直线回归关系。在适宜的氮、钾营养水平下, RubisCO 的羧化作用和加氧作用都比较强。专一性因子和产量均最高。

参 考 文 献

- 1 宁正祥, 李明启。变色酸法同时测定核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶活性。植物生理学报, 1990, 16 (2): 131~138
- 2 陈锦强, 李明启。不同氮素营养对黄麻光合作用、光呼吸的影响及光呼吸与硝酸还原酶的关系。植物生理学报, 1983, 9 (3): 251~257
- 3 沈伟其。钾素对杂交水稻个体及群体的生理效应。浙江农业大学学报, 1988, 14 (1): 101~106
- 4 倪晋山, 安林升。三系杂交水稻幼苗 NH_4^+ 、 K^+ 吸收的动力学分析。植物生理学报, 1984, 10: 381~390
- 5 Evans JR. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 1983, 72: 297~302
- 6 Imsande J. Enhanced nitrogen fixation increases net photosynthetic output and seed yield of hydroponically grown soybean. *J Exp Bot.* 1988, 39: 1313~1321
- 7 Kung SD, et al. Crystallization and assay procedures of tobacco ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. In: Pietro A S. ed. *Method In Enzymology*. New York: Academic Press. 1980, 69: 326~336
- 8 Millard P, and Catt JW. The influence of nitrogen supply on the use of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as leaf nitrogen stores for growth of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *J Exp Bot.* 1988, 39: 1~11
- 9 Seemann, JR, and Sharkey TD. Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase and metabolite pool sizes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 1986, 82: 555~560
- 10 Umbreit WW. *Manometric Techniques*. New York: Academic Press, 1964. 20~29
- 11 Winter K, et al. Influence of nitrate and ammonia on photosynthetic characteristics and leaf anatomy of *Moricandia arvensis*. *Plant Physiol.* 1982, 70: 616~625

EFFECTS OF NITROGEN AND POTASSIUM ON THE KINETIC PROPERTIES
OF RIBULOSE-1, 5-BISPHE SPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE AND
PRODUCTIVE CAPACITY OF *Brassica parachinensis* Blailey

¹Ning Zhengxiang ¹Li Minqi ²Cao Jian ²Guan Peicong

(¹Photosynthesis Research Laboratory, Dept. of Agricultural Biology, ²Dept. of Horticulture)

Abstract *Brassica parachinensis* Blailey plants were grown with various concentrations of nitrogen and potassium. Yields among treatments were significantly different ($P=0.01$), ranging from 0.57 to 4.38 g (Dry wt)/plant. The kinetic properties of ribulose-1, 5-bisphosphate (RuBP) carboxylase/oxygenase (Rubisco, EC. 4.1.1.39), purified from the leaves exhibited no statistical difference. The results of correlation analysis showed that, nitrogen enhanced markedly both the carboxylation and the oxygenation of RuBP, catalyzed by Rubisco, nitrogen correlated with V_{max} (CO_2) and $K_m(O_2)$ of Rubisco significantly, respectively. Potassium enhanced the oxygenation of RuBP. The correlation coefficient between potassium and $K_m(O_2)$ of Rubisco was over the level of negative significance, and that between potassium and V_{max} (O_2) was over the level of positive significance.

Yields correlated significantly with specificity factor of Rubisco ($P<0.01$).

The various effects of nitrogen and potassium on Rubisco kinetics may be one of the biochemical mechanism of the interaction between nitrogen and potassium in photosynthesis and yield of crops.

Key words *Brassica parachinensis* Blailey; Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase; Nitrogen nutrition; Potassium nutrition.