

一些栽培作物的核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶动力学特征

宁正祥* 李明启

(农业生物系光合作用研究室)

摘要 在相同条件下,对 C_3 植物中的 9 种双子叶植物和 3 种单子叶植物的核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 动力学特性进行了测定。 K_m (CO_2) (K_c)和 K_m (O_2) (K_o)的变化范围分别为 7.3~30 $\mu\text{mol/L}$ 和 300~1 000 $\mu\text{mol/L}$ 。变异系数分别为 52%和 38%。 K_c 值的变异明显高于 K_o 值。 V_{max} (CO_2) (V_c) 和 V_{max} (O_2) (V_o) 分别为 50~1 500 和 16~500 $\text{n mol/mg 酶蛋白} \cdot \text{min}$, 变异系数相应为 97%和 87%。专一性因子的变化相对较小,为 78~121,变异系数为 15%。说明在 C_3 植物中, Rubisco 动力学特性的差异主要反应在 V_{max} 值上,核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶 (Rubisc) 的动力学特性变化大于核酮糖-1, 5-二磷酸加氧酶 (Rubiso)。随着物种的进化, K_c 、 K_o 值明显降低,而 V_c 、 V_o 值显著增加,致使 Rubisco 活性显著提高。Rubisco 的羧化/加氧比也依物种的进化而上升。 K_c 与 K_o 、 V_c 与 V_o 之间具有显著的同步变化趋势,相关系数均超过极显著水平。

关键词 核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶; 进化度

Delaney 和 Walker 曾报告菠菜、向日葵等 6 种 C_3 植物中, Rubisc 的 K_c 值存在较大的变异^[3]。为了系统了解 K_c 值的变异规律, Yeoh 等测定了 115 种植物的粗提 Rubisc 的 K_c 值,揭示 K_c 值与光合途径关系十分密切,而与植物的生长习性和生长条件无关^[8,9]。Bird 等测定了 16 种植物的纯化 Rubisc 的动力学特性,表明在分类学上亲缘关系差异大的 C_3 植物中, Rubisc 的动力学数间亦存在较大变异^[2]。Paul 和 Yeoh 则测定了 16 个木薯栽培品种的 K_c 值,结果说明在不同品种之间, K_c 值也存在较大的差异^[8]。由于 Rubisco 是一种双功能酶,其实际羧化效率决定于羧化和加氧作用的相对强度。因此,在研究其动力学特性在不同物种间的变化规律及与物种进化的关系的,若能在一致条件下同时考虑羧化和加氧动力学,这样得出的结论则更符合 Rubisco 的实际情况,也更能说明问题。但由于同时测定羧化和加氧活性在技术上的困难性和极大的工作量,因而在同一条件下系统测定、比较不同物种的 Rubisco 动力学常数的报告,到目前为止,仅见 Jordan 和 Ogren 一篇^[4]。

本文报告在相同条件下,采用变色酸法^[1]测定 12 种栽培植物的 Rubisco 动力学特性的结果,以探讨 Rubisco 动力学特性在不同物种间的变化规律及与物种进化的关系,为人工降低光呼吸,提高光合效率而进行的 Rubisco 遗传工程及常规育种等提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料均为田间栽种,作物种类为:疣粒野生稻 (*Oryza meyeriana*), 药用野生稻 (*O.*

* 现工作单位: 广州, 五山, 华南理工大学食品工程系。

1990-10-31 收稿

officinalis), 栽培稻 (*O. Sativa subsp. indica*), 南瓜 (*Cucurbita pepo*), 黄瓜 (*Cucumis sativus*), 西瓜 (*Citrullus vulgaris*), 瓠瓜 (*Lagenaria siceraria*), 芋 (*Colocasia esculenta*), 菜心 (*Brassica chinensis* var. *tsai-tai*), 鸡蛋果 (*Passiflora edulis*), 番茄 (*Lycopersicon esculentum*), 甜橙 (*Citrus sinensis*).

上述材料中, 稻属植物由本校农学系万邦惠研究员提供; 菜心由本校园艺系曹健硕士提供; 番茄由本校园艺系吴定华副教授提供种子; 黄瓜和西瓜材料由广东省农科院经作所蔬菜室卓齐勇高级农艺师提供。

1.2 Rubisco 的制备及活性测定

Rubisco 的制备和活性测定详见前文^[1]。

2 结果

2.1 Rubisco 动力学特性在不同物种间的差异

表1 一些栽培植物的核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶动力学特性

物种	K_m	V_m	K_m	V_m	V_m/K_m (10^{-3})	V_m/K_m (10^{-3})	V_m/V_m	K_m/K_m (10^{-3})	$V_m K_m/V_m K_m$
疣粒野稻	9.0 ± 1.0	55 ± 3	548 ± 12	39 ± 1.4	5.6	7.2	1.4	1.8	78
药用野稻	7.3 ± 0.9	407 ± 27	340 ± 20	210 ± 12	55.8	63.5	1.0	2.1	88
水稻	7.6 ± 0.7	1508 ± 113	301 ± 60	494 ± 44	198.4	164.1	3.1	2.5	121
南瓜	8.1 ± 0.8	731 ± 33	400 ± 24	330 ± 17	80.3	82.5	2.2	2.0	109
黄瓜	13.8 ± 0.9	300 ± 20	682 ± 23	180 ± 21	20.7	26.9	2.1	2.0	107
瓠瓜	15.8 ± 0.5	819 ± 78	967 ± 78	480 ± 24	51.8	60.7	1.7	1.6	102
西瓜	9.0 ± 1.1	645 ± 40	555 ± 21	371 ± 21	65.1	66.8	1.7	1.8	102
芋	9.5 ± 0.3	184 ± 13	389 ± 13	82 ± 7.3	18.4	21.0	2.2	2.4	92
菜心	24.1 ± 2.0	196 ± 15	875 ± 41	83 ± 5.6	8.1	10.3	2.3	2.8	83
鸡蛋果	10.8 ± 0.9	83 ± 6.4	516 ± 16	54 ± 6.8	8.6	10.5	1.7	2.1	92
番茄	30.0 ± 1.9	219 ± 12	807 ± 64	72 ± 4.0	7.6	8.9	3.0	3.7	81
甜橙	19.7 ± 1.2	52 ± 4.2	485 ± 41	10 ± 1.2	2.6	3.3	3.1	4.1	80
SD/X (%)	52.3	96.7	37.9	87.0	124.9	109.1	20.0	32.2	15.0

* 酶反应在 pH 8.2, 25℃ 进行; 数据表示为: $\bar{x} \pm SD$; K_m 单位为 $\mu\text{mol/L}$; V_m 为 $\text{nmol/mg 酶蛋白} \cdot \text{min}$ 。

对不同物种 Rubisco 动力学特性的测定结果表明 (表1), Rubisco 动力学常数依物种不同而异。 K_m 值在不同物种间的变化范围为 $7.3 \sim 30 \mu\text{mol/L}$, 变异系数为 52.3%。稻属植物、南瓜、西瓜、芋和鸡蛋果等植物对 CO_2 的亲合力较高, K_m 值为 $7 \sim 10 \mu\text{mol/L}$, 番茄、菜心和甜橙等植物对 CO_2 的亲合力比较低, K_m 值较高, 为 $20 \sim 30 \mu\text{mol/L}$ 。

K_m 值的变化范围为 $300 \sim 1000 \mu\text{mol/L}$, 变异系数为 38%, 明显低于 K_m 值, 说明 Rubisco 对 O_2 的亲合力在不同物种中间相对比较稳定。瓠瓜、菜心和番茄对 O_2 的亲合力低, K_m 值在 $800 \mu\text{mol/L}$ 以上。药用野生稻、栽培稻、南瓜和芋等植物的 K_m 值相对较低, 均在 $400 \mu\text{mol/L}$ 以下。

除甜橙具有较高的 K_m 值和较低的 K_m 值以外, 在其余 11 种植物中, K_m 值和 K_m 呈现出

同步变化的趋势(表1,2)。相关系数为0.7,已达到显著水平($P < 0.05$)。

从表1可看出, V_{max} 的变异显著高于 K_m 。 V_c 和 V_o 的变化范围分别为 50~1 500 nmol/mg 蛋白·min 和 16~500 nmol/mg 蛋白·min。变异幅度比 K_m 高一个数量级,高低相差近30倍。 V_c 和 V_o 的变异系数也明显高于 K_m 值,依次为97%和87%,分别为 K_m 和 K_o 变异系数的1.8倍和2.3倍。栽培稻、瓠瓜、南瓜和西瓜的生长速度相对比较快, V_{max} 值都比较高,特别是栽培稻,经济系数和经济学产量都非常高, V_{max} 值也最大,为1 508 nmol/mg 蛋白·min。而甜橙和疣粒野生稻的生长速度相对很慢, V_{max} 值也最低,还不到60 nmol/mg 蛋白·min。

表2 不同植物间 Rubisco 动力学常数间的相关性

相关系数	不同栽培植物间 (n=10)	相关程度	稻属植物间 (n=1)	相关程度
r_{K_m, K_o}	0.700	显著 a	0.968	不显著 N
r_{V_c, V_o}	0.923	极显著 A	0.987	不显著 N
r_{V_c, V_c}	-0.381	不显著 N	-0.607	不显著 N
r_{K_m, V_c}	-0.032	不显著 N	-0.876	不显著 N
$r_{K_m}^{0.01}$	0.576 0		0.996 9	
$r_{K_m}^{0.01}$	0.707 9		0.999 8	

从表1也可清楚地看到,和 K_m 值相似, V_c 和 V_o 值之间也具有同步变化的趋势。相关系数为0.923,已远远超过极显著水平($r_{0.01}^{0.01} = 0.7079$)也显著高于 K_c 和 K_o 的相关程度。

相关分析结果还表明, K_m 值与 V_{max} 值之间存在轻微的负相关, $r_{K_m, V_c} = -0.381$, $r_{K_m, V_o} = -0.0323$, K_c 与 V_c 值之间的相关程度明显高于 K_o 与 V_o 。后二者之间几乎没有相关性(表2)。

V_c/K_c 和 V_o/K_o 比值在不同物种间差异极大(表1)。变异系数分别高达125%和109%;变化幅度依次为 $2.64 \times 10^{-3} \sim 198.42 \times 10^{-3}$ 和 $3.3 \times 10^{-3} \sim 164.12 \times 10^{-3}$, 高低相差50和75倍。这说明 Rubisco 和 Rubisco 活性在不同物种之间差异极为显著。

K_c/K_o 值在物种间的变化较小,变异系数为32%,变化范围为 $1.6 \times 10^{-2} \sim 4.1 \times 10^{-2}$ 。甜橙、番茄等生长缓慢的作物,因具有较高的 K_c 值,所以 K_c/K_o 值也较高。瓜类和稻属植物因 K_o 值较低,致使 K_c/K_o 比值也较小。即对 CO_2 和 O_2 的相对亲和力之比,甜橙、番茄较低,瓜类和稻属植物较高。

V_c/V_o 比值在不同植物间则相对比较恒定,如甜橙和栽培稻, Rubisco 动力学常数相差极大,但 V_c/V_o 值却相等,均为3.1。这说明 Rubisco 的羧化作用和加氧作用相对强度之比,在不同物种之间,并不存在大的差异。光呼吸最大速度占总光合作用最大速度的比例,在不同的 C_3 植物之间,差异并不十分明显。

从表1中变异系数的统计分析可以明显地看到,专一性因子 $V_c K_o / V_o K_c$ 是 Rubisco 在不同物种间最为稳定的一项动力学常数,变异系数最小,仅为15%,变化范围为78~121。

这些结果表明, Rubisco 的羧化/加氧比是相对比较稳定的,和其他动力学特性相对比较,加氧作用,即光呼吸的相对强度在不同 C_3 植物中间的变化相对较小。物种间比较保守

的羧化/加氧比,对维持植物正常的生长发育具有重要生理意义和功能。对 C_3 植物来讲,并非象一般人所想象那样的,光合作用中碳素同化功能愈强,光呼吸愈低,光合效率就愈高。上述对不同植物 Rubisco 动力学特性分析的结果揭示,要提高植物的光合效率,获得尽可能高的生物和经济学产量,关键在于提高 Rubisco 的 V_m 值和 V_m/K_m 值,即提高 Rubisco 的绝对活性。

2.2 稻属物种进化程度与 Rubisco 动力学特性变化的关系

稻属植物的进化程度与 Rubisco 的动力学特性变化关系极密切,我们测定了疣粒野生稻、药用野生稻和栽培稻三种稻属植物的 Rubisco 动力学特性。这三种水稻在亲缘关系及进化程度上相差均比较远。在生长习性上,疣粒野生稻生长缓慢,为匍匐性,穗极短。药用野生稻与栽培稻在生长习性上则比较接近,均为强直立性,但野生稻的生物学产量,特别是经济学产量,均显著低于栽培稻,对 Rubisco 动力学常数的测定结果表明(表1), K_m 值随进化程度的提高而稍有下降,疣粒野生稻、药用野生稻和栽培稻的 K_m 值分别为 9.9, 7.3, 7.6, V_m 值分别为 548, 340, 301。可以看出,只有疣粒野生稻的 K_m 值相差最大,其余两种的 K_m 值基本相同。 V_m 值的变化趋势则恰好与 K_m 相反,是依进化程度的提高而增加。 V_m 值依次为 55, 407, 1508, V_o 值依次为 39, 126, 494。不同稻种之间差异极大。栽培稻的 V_m 和 V_o 值分别是疣粒野生稻的 27 倍和 13 倍;是药用野生稻的 3.7 倍和 2.3 倍。

相关分析结果表明(表2), K_m 和 K_o 、 V_m 和 V_o 之间的相关系数分别为 0.968 和 0.987,这说明稻属植物在进化和驯化过程中,Rubisco 的 K_m 与 K_o 、 V_m 与 V_o 之间存在同步进化趋势,这与前面不同物种间 K_m 值和 V_m 值的变化趋势完全相同。 K_m 与 V_o 、以及 K_o 与 V_m 之间,则存在明显的负相关。随物种的进化和驯化, K_m 值降低,同时 V_m 值则增高。 K_m 与 V_o 之间的负相关程度高于 K_o 与 V_m 。这与前面不同物种间 K_m 与 V_m 的相关情况稍有不同。

V_m/V_o 、 K_m/K_o 和专一性因子的变化趋势均与 V_m 值相同。除 V_m/K_m 值依进化进程程度而提高的幅度比 V_m 的还要显著之外,其余各比值的变化幅度均相对较小。

就稻属植物来看,随着物种的进化、驯化,其 Rubisco 动力学特性变化主要体现在 V_m/K_m 及 V_m 值的显著增加上。这与前面不同 C_3 物种 Rubisco 动力学常数变异系数的分析结果是一致的。

3 讨论

Yeoh 等^[6,9]Jordan 和 Ogren^[4],以及 Seemann 等^[7]测定了共计百多种植物的 K_m 值。结果表明(见表3),高等植物的 K_m 值比低等植物低。在高等植物中, K_m 值与光合途径关系十分密切, C_3 、CAM 植物的 K_m 值一般低于 C_4 植物。陆生植物的 K_m 值低于水生植物。本文结果说明,同一种光合类型植物中,单子叶植物的 K_m 值低于双子叶植物。

Jordan 和 Ogren^[4]报告, C_4 植物的 K_m 值高于 C_3 植物。我们的结果表明, C_3 植物中,双子叶植物的 K_m 值高于单子叶植物。

从表3的统计数据很清楚地看出,Jordan 和 Ogren^[9]、Makino 等^[5]以及本文的结果,均一致表明,在不同物种中, V_m 、 K_m 值变化的幅度和变异系数均高于相应的 V_o 、 K_o 值;并且 V_m 的变异系数明显高于 K_m 值。 V_m 与 V_o 、 K_m 与 K_o 之间,又呈现出显著的同步变化趋势。这说明在物种进化过程中,Rubisco 动力学特性的变化主要在 V_m 值上,其次才是 K_m 值,进化的总趋势是, K_m 值明显降低, V_m 值则显著增加。Rubisco 和 Rubisco 的动力学特性同步变化,但前者居于明显的主导地位。

从单细胞物种进化到多细胞物种的过程中, $V_{\max}/V_{\max}$ 值明显降低^[4], 表明物种由低级向高级进化时, $V_{\max}$ 值增加的趋势高于 $V_{\max}$ 值。我们的结果则表明, 稻属植物由野生向栽培的驯化过程中, $V_{\max}/V_{\max}$ 则明显增加。即在驯化过程中, $V_{\max}$ 增加的趋势大于 $V_{\max}$ 。

在物种进化, 驯化过程中, 综合反应 Rubisco 双功能酶动力学特性的专一性因子 $V_{\max}K_m/V_{\max}K_m$, 表现最为稳定, 变异系数最小 (表 3)。但与物种的进化程度关系极为密切, 依物种的进化和驯化, 专一性因子稳步增加。

表 3 Rubisco 动力学特性在不同植物中的变化趋势

植 物	种数	K_m	K_m	$V_{\max}$	$V_{\max}$	$V_{\max}/V_{\max}$	$V_{\max}K_m/V_{\max}K_m$	参考文献
陆生植物	40 种	12~34						
水生植物	14 种	30~70						[9]
SD/ $\bar{x}$ (%)		46						
蓝细菌	2 种	105~121	990~1 220			4.7~5.1	47~48	
绿 藻	3 种	25~38	410~660			3.3~3.7	54~63	
C_3 植物	5 种	9~16	430~650			1.3~2.6	77~82	[4]
C_4 植物	2 种	16~34	640~810			2.0~3.3	78~82	
SD/ $\bar{x}$ (%)		104	37			41	20	
高等植物	16 种	10~27		180~840				
SD/ $\bar{x}$ (%)		27		41				[2]
单子叶 C_4 植物	2 种	8~11	335~383	1770~2630	580~750	3.0~3.5	120~128	
SD/ $\bar{x}$ (%)		24	9	28	18	10	5	[5]
绿藻	1 种	61						
C_3 植物	5 种	22~36						[7]
C_4 植物	11 种	38~67						
SD/ $\bar{x}$ (%)		30						
单子叶 C_3 植物	3 种	7~10	300~550	55~1508	39~494	1.4~3.1	78~121	本文
双子叶 C_3 植物	9 种	8~30	400~970	52~820	16~500	1.7~3.7	80~110	
SD/ $\bar{x}$ (%)		52	38	97	87	27	15	

4 结论

在 C_3 植物的不同物种中, Rubisco 动力学特性的差异主要反应在 $V_{\max}$ 值上, $V_{\max}$ 、 K_m 值变化的幅度和变异系数均分别高于 $V_{\max}$ 、 K_m 值。 $V_{\max}$ 与 $V_{\max}$ 、 K_m 与 K_m 之间具有极显著的正相关。这说明, Rubisco 和 Rubisco 的动力学特性具有显著的同步变化趋势, 但前者居于明显的主导地位。

随着物种的进化和驯化, K_m 值明显减小, $V_{\max}$ 值显著增加, 专一性因子稳步提高。

参 考 文 献

- 1 宁正祥, 李明启. 变色酸显色法同时测定核酮糖-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 Bird IF, et al. Affinity of RuBP carboxylase for carbon dioxide and inhibition of the enzyme by oxygen. *J Exp Bot*, 1982, 33: 1004~1013
 - 3 Delaney MA, Walker DA. Comparison of the kinetic properties of ribulose biphosphate carboxylase in chloroplast extracts of spinach, sunflower and four other reductive pentose phosphate-pathway species. *Biochem J*, 1987, 171: 477~482
 - 4 Jordan DB, Ogren WL. Species variation in the specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. *Nature*, 1981, 291: 513~515
 - 5 Makino A, et al. Differences between wheat and rice in the enzymic properties of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the relationship to photosynthetic gas exchange. *Planta*, 1988, 174: 30~38
 - 6 Paul K, Yeoh HH. K_m values of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase of cassava cultivars. *Phytochemistry*, 1987, 26: 1965~1967
 - 7 Seemann JR, et al. Variation in the specific activity of ribulose-1,5, -bisphosphate carboxylase between species utilizing differing photosynthetic pathways. *Plant Physiol*, 1984, 74: 791~794
 - 8 Yeoh HH, et al. Variations in K_m (CO_2) of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase among grasses. *Plant Physiol*, 1980, 66: 1110~1112
 - 9 Yeoh HH, et al. Variations in kinetic properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylases among plants. *Plant Physiol*, 1981, 67: 1151~1155

SPECIES VARIATION IN THE KINETIC PROPERTIES OF RIBULOSE-1, 5-BISPHOSPHATE CARBOXYLASE/OXYGENASE

Ning Zhengxiang Li Mingqi

(Dept. of Agricultural Biology)

Abstract The kinetic properties of Rubisco purified from 12 species of C_3 plants (3 species of monocotyledon plants and 9 species of dicotyledon plants) were determined under standard condition of activation and assay. K_m (CO_2) values ranged from 7.3 to 30 $\mu\text{mol/L}$. K_m (O_2) values ranged from 300 to 1 000 $\mu\text{mol/L}$. The variation coefficients of K_m (CO_2) and K_m (O_2) were 52% and 38%, respectively. The variation of K_m (CO_2) was significantly higher than that of K_m (O_2). The values of $V_{\max}$ (CO_2) and $V_{\max}$ (O_2) ranged from 50 to 1 500, and from 16 to 500 $\text{n mol/mg enzyme protein} \cdot \text{min}$, the variation coefficients were 97% and 87%, respectively. These results showed that, in C_3 plants, the variations of the kinetic properties of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase existed mainly in the values of $V_{\max}$ and in RuBP carboxylase.

No differences in the ratio of either K_m (CO_2) / K_m (O_2) or $V_{\max}$ (CO_2) / $V_{\max}$ (O_2) were detected among the Rubisco enzymes from these C_3 plants. But, the results of correlation analysis showed that significant correlativity existed between K_m (CO_2) and K_m (O_2), as well as between $V_{\max}$ (CO_2) and $V_{\max}$ (O_2). The correlation coefficients were 0.700 and 0.923, respectively. The variations of the kinetic properties of RuBP carboxylase and oxygenase were synchronous.

The specificity factors were more stable than other kinetic constants, and ranged from 78 to 121, variation coefficient was 1.5%.

Key words Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; Evolution