

INVLOED VAN RUSVERBREKING DEUR SUURSTOF OP
SEKERE ASPEKTE VAN DIE RESPIRATORIESE
METABOLISME VAN SAAD VAN *STRELITZIA JUNCEA*

deur

STEPHANUS DE MEILLON

Voorgelê ter vervulling van 'n deel van die
vereistes vir die graad

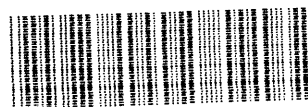
MAGISTER SCIENTIAE (PLANTFISIOLOGIE)

in die Fakulteit Wis- en Natuurkunde
Departement Plantkunde
Universiteit van Pretoria
Pretoria

Desember 1985

Leier: Prof. dr. H.A. van de Venter

Medeleier: Prof. dr. J.G.C. Small



1365346

OPGEDRA AAN RITA ...

INHOUDSOPGAWE

1.	INLEIDING	1
2.	ALGEMENE MATERIAAL EN METODES	7
3.	DIE INVLOED VAN DORMANSIEVERBREKING DEUR SUURSTOF OP ENKELE ASPEKTE VAN DIE SITOSOLIESE METABOLISME VAN STRELITZIA JUNCEA- SADE	21
4.	DIE INVLOED VAN DORMANSIEVERBREKING DEUR SUURSTOF OP DIE PENTOSEFOSFAATMETABOLISME VAN STRELITZIA JUNCEA- SADE	73
5.	DIE INVLOED VAN DORMANSIEVERBREKING DEUR SUURSTOF OP DIE AKTIWITEIT VAN BEPAALDE MITOCHONDRIALE ENSIEME VAN DIE EMBRIO'S VAN STRELITZIA JUNCEA- SADE	90
6.	DIE INVLOED VAN SUURSTOF OP DIE ADENILAAT-METABOLISME VAN STRELITZIA JUNCEA- SADE	157
7.	OORSIGTELIKE BESPREKING VAN DIE RESPIRATORIESE METABOLISME VAN STRELITZIA JUNCEA- SADE	189
8.	OPSOMMING/SUMMARY, DANKBETUIGINGS, CURRICULUM VITAE EN LITERATUURLYS	207

LYS VAN AFKORTINGS

Hierdie lys van afkortings sluit nie afkortings van SI-eenhede of van algemeen aanvaarde afkortings vir terme in die algemene taalgebruik in nie.

In sekere gevalle kan 'n afkorting na meer as een bepaalde vorm of sout van die verbinding verwys. Een so 'n geval is byvoorbeeld NADH wat soms vir (NADH + H⁺) gebruik is. Die bepaalde bedoeling behoort uit die teks te blyk.

Simbole wat by wiskundige manipulasies gebruik is, word in die teks verklaar.

ADH	:	alkoholdehidrogenase (alkohol: NAD oksidoreduktase, EC 1.1.1.1)
AdN	:	adenosiennukleotiede
akt.	:	aktiwiteit
ADP (of ADP-Na ₂)	:	adenosindinukleotiedfosfaat (dinatrium-sout)
AEC	:	adenilaatenergielading ("adenylate energy charge")
AK	:	adenilaatkinase (ATP: AMP fosfotransferase, EC 2.7.4.3)
AMP (of AMP-Na ₂ . 6H ₂ O)	:	adenosienmonofosfaat (dinatriumsout)
ATP (of ATP-Na ₂ H ₂ . 3H ₂ O)	:	adenosientrifosfaat (dinatriumsout)
BSA	:	beesserumalbumien
Cyt C	:	sitochroom C
Cyt ox	:	sitochroomoksidase
DCIP	:	2,6-dichlorofenolindofenol (natriumsout)
DTT	:	ditiotreitol
E	:	ensiem
EDTA	:	etileendiamientetra-asynsuur (dinatrium-sout)
EGTA	:	1,2-di(2-aminoetoksie)etaan-NNN'-N'-tetra-asynsuur
eksp.	:	eksperiment

emb.	: embryo
EMP	: Embden-Meyerhof-Parnas-weg
EOS	: elektronoordragsisteen
ES	: ensiemsubstraatkompleks
fr _{2,6} P ₂	: D-fruktose-2,6-bisfosfaat (dinatriumsout)
GA ₃	: gibberellien A ₃
GDH	: gliserol-3-fosfaat-dehidrogenase (sn-gliserol-3-fosfaat: NAD 2-oksido-reduk-tase, EC 1.1.1.8)
gered.	: gereduseer
G6PDH	: glukose-6-fosfaat-dehidrogenase (D-glukose-6-fosfaat: NADP 1-oksido-redukta-se, EC 1.1.1.49)
HEPES	: 4-(2-hidroksie-etiel)-1-piperasien-etaansulfoonsuur
ICDH	: isositraatdehidrogenase (L _S -isositraat: NAD oksido-reduktase (dekarboks.), 1.1.1.41)
ICL	: isositraatliase (L _S -isositraat glioksa-laas-liase, 4.1.3.1)
ink.	: inkubering
K _{eq}	: ewewigskonstante
ITP	: inosientrifosfaat
K _M	: Michaelis-konstante
LDH	: laktaatdehidrogenase (L-laktaat: NAD oksido-reduktase, EC 1.1.1.27)
MDH	: malaatdehidrogenase (L-malaat: NAD oksido-reduktase, EC 1.1.1.37)
MDH _{cyt}	: sitosoliese MDH
MDH _{gly}	: glioksisomale MDH
MDH _{mit}	: mitochondriale MDH
mRNA	: boodskapper RNA
NAD	: β-nikotienamiedadeniendinukleotied
of NAD ⁺	
NADP	: β-nikotienamiedadeniendinukleotiedfosfaat
of NADP ⁺	(dinatriumsout)

(vi)

TRIS : tris (hidroksiemetiel)-aminmetaan
 V_{\max} : maksimum ensiemreaksietempo
varsm. : varsmassa
voorafink. : voorafinkubering
S : substraat
v of v_0 : reaksietempo (of aanvanklike reaksie-
tempo)
v/v : volume per volume

"There can be little doubt that for termination of dormancy a critical supply of ATP is required."

Bewley & Black, 1982

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Alhoewel *Strelitzia juncea* van *Strelitzia reginae* onderskei kan word op grond van blaarmorfologie (Van de Venter *et al.* 1975), is daar geen opvallende verskil in die blommorfologie nie en het die blomme van beide spesies die ongewone en treffende voorkoms wat dit so 'n gewilde snyblom maak. Die sade van beide spesies toon 'n sterk ooreenkoms deurdat dit rond en swart gekleur is, oor 'n helder oranjekleurige arillus beskik en dormant is (Van de Venter & Small 1974).

Sover bekend, is daar nie 'n ooglopende funksie vir die aantreklike arillus in die geval van *S. juncea* en *S. reginae* nie. Gewoonlik word so 'n helderkleurige aanhangsel gesien as 'n lokmiddel vir die verspreiding van die saad deur voëls (Harper 1977). In sodanige gevalle sou verwag word dat die dormansie van die saad ná deurgang deur die spysverteringskanaal van die voëls opgehef sou word. Vir *Strelitzia nicolai* egter, is 'n waarneming in die Oos-Kaapgebied gemaak (persoonlike mededeling^a, Robbertse, 1985) dat voëls die saad uit die vrug verwyder, die arillus afgebyt en verorber en in die proses die saad op die grond laat val het. Ornitologiese waarnemings (persoonlike mededeling^a, Nichols 1985) in Natal, is dat sekere soorte voëls slegs die arillus van *S. nicolai* benut terwyl ander soorte die saad mèt die arillus verorber; tydens die waterdrinkproses kan die sade weer uitgebraak word. *S. nicolai* -sade kiem baie maklik en jong saailinge word dikwels in die natuur aangetref.

In teenstelling hiermee, word jong saailinge van *S. reginae* en *S. juncea* selde in die veld aangetref en versprei die plante hoofsaaklik deur vegetatiewe voortplanting (persoonlike mededelings^a

- a
- | | | |
|---------------------|---|---|
| Dorfling A.M., mev. | - | Brakhill, Kirkwood |
| Nichols, G. | - | Kurator (Natuurgebiede), Durbanse Parke-afdeling |
| Robbertse, P.J. | - | Professor, Direkteur van Margaretha Mes Instituut vir Saadnavorsing, U.P. |
| Small, J.G.C. | - | Professor, Hoof van Departement Plantkunde, U.O.V.S. |
| Van de Venter, H.A. | - | Professor, Departement Plantkunde, U.P. |

van Dorfling, Small & Van de Venter 1984). Volgens mev. Dorfling word die vrugte reeds in die onryp stadium deur spreesus en muisvoëls gevreet en in die proses word die sade vernietig. Moontlike leidrade oor die opheffing van die saaddormansie van *S. reginae* en *S. juncea* kom volgens huidige inligting dus nie uit die natuurlike situasie na vore nie.

In die laboratorium kan die dormansie van *S. reginae* (Van de Venter 1974) en van *S. juncea* (Ybema *et al.* 1984) opgehef word deur die sade onder hoë suurstofkonsentrasie te inkubeer en in die geval van *S. reginae* is vasgestel dat dormansie in 'n mindere mate opgehef kan word deur die toediening van tio-ureum, verskeie merkaptane, askorbiensuur en "ethrel" (Van de Venter 1978). Ander behandelings soos die toediening van koolsuurgas, ureum, indoolasynsuur, gibberelliensuur, kinetien, sekere oksideermiddels en respiratoriese remstowwe is onsuksesvol.

Die saaddormansie van *S. reginae* en *S. juncea* kan as "vertraagde kieming" omskryf word (Van de Venter & Small 1974, 1975), aangesien die embrio's self nie dormant is nie en 'n lae persentasie kieming tog onder normale vog- en belugtingstoestande moontlik is. 'n Belangrike waarneming is dat die weefsel wat die embrio omring, nl. die endosperm en testa, 'n remmende uitwerking op die groei van geïsoleerde *S. reginae* embrio's het (Van de Venter & Small 1975). Die situasie geld ook vir *S. juncea* en daar is vasgestel dat die teenwoordigheid van die endosperm in die inkuberingsmedium tot 'n verlaging in die suurstofkonsentrasie van die medium gelei het en daardeur ook tot 'n verlaging in die α -amilase-aktiwiteit van die embrio's (Ybema *et al.* 1984). Suurstofinkubering van die sade het tot 'n hoër α -amilase-aktiwiteit in die embrio's gelei en die terugplasing van die sade vanuit 'n atmosfeer met 'n hoë suurstofkonsentrasie na 'n lugatmosfeer, het 'n verlaging in die α -amilase-aktiwiteit van die embrio's veroorsaak.

Uit die beskikbare gegewens oor *S. reginae* en *S. juncea* (proefskrif deur Van de Venter 1974 en verhandeling van Ybema 1983 en publikasies wat daaruit voortgespruit het), sou maklik gepostuleer kon word dat een of ander proses in die endosperm 'n hoë vereiste vir

suurstof het en dat dit in die intakte saad daartoe lei dat die embrio 'n suurstofgebrek ondervind. Daardeur word die funksionering van die elektronoordragsisteen (EOS) belemmer, waardeur die algemene respiratoriese metabolisme (glikolise, Krebs siklus) nadelig geraak word. Op een of ander wyse voorkom die byvoeging van sekere genoemde verbindings soos tio-ureum moontlik dat die suurstofbenodigende prosesse nie meer in die endosperm verloop nie. Die moontlikheid van so 'n situasie moet aan die hand van die volgende literatuuragtergrond bekyk word.

In die saadfisiologie is die begrip van 'n weefsellag om die embrio wat vir suurstofindiffundering beperkend is algemeen bekend, soos ook blyk uit die resultate vir *Erythrina caffra* en die gepaardgaande literatuurbespreking (Small *et al.* 1977). In die geval van die eensaadlobbige *Strelitzia juncea* sade, is die suurstofopnametempo vir die luggeïnkubeerde sade laag (ca $6 \text{ mm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ volgens Ybema 1983) en is vergelykbaar met dié van *Erythrina caffra* (ca $11 \text{ mm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) wat as tipies van peulplantsade beskou kan word (Small *et al.* 1977). Waar suurstofinkubering egter tot 'n vyfvoudige toename in die suurstofopnametempo van *Erythrina caffra* sade gelei het, het dit by *Strelitzia juncea* sade nie eers 'n verdubbeling in die suurstofopnametempo tot gevolg gehad nie. Dit laat die vraag ontstaan of die inkubering van *S. juncea* sade in 'n vyfvoudig-hoër suurstofkonsentrasie (100% suurstof versus lug) enigsins tot 'n betekenisvolle verhoging in die aërobiese respirasie van die embrio's kon gelei het.

Die afleiding dat saadomhulsels suurstofopname sodanig kan beperk dat aërobiese respirasie nie moontlik is nie en dat sodanige sade as gevolg hiervan in 'n rustoestand voorkom, moet met omsigtigheid gemaak word. Reeds in 1969 het Roberts beweer dat "At one time it was commonly thought that in many species covering structures of the seed impose a limitation on oxygen uptake, and germination is prevented by a restriction of respiration. In most cases, however, there is little evidence for this view."

Die klassieke geval waar dormansie deur suurstofinkubering opgehef kan word, is sekerlik dié van *Xanthium pennsylvanicum* (Khan 1977a). Aanvanklik is veronderstel dat die dormante toestand deur die saadhulsel se ondeurlatendheid vir suurstof veroorsaak word, maar Porter & Wareing (1974) het vasgestel dat die suurstofopname-tempo van die saad laer was as die maksimum deurlatendheid vir suurstof wat deur die omhulsels moontlik is. Hulle afleiding was dat daar kiemingsremstowwe in die omhulsels was wat eers by 'n hoë partiële suurstofdruk geoksideer kon word. Esashi *et al.* (1976) het egter daarop gewys dat die suurstofgeïnduseerde kieming abnormaal was en dat die positiewe invloed van loging aan 'n obligate anaërobiese voorinkubering van die sade eerder as aan die uitloeg van 'n remstof toegeskryf kon word. Boonop kan die saad tot kieming gestimuleer word deur die toediening van etileen en dit sonder om van hoë suurstofkonsentrasies gebruik te maak (Katoh & Esashi 1975).

'n Ander bekende geval waar dormansie aan 'n beperking van suurstofopname deur die omhulsels toegeskryf is, is dié van *Sinapis arvensis*. Deur gebruikmaking van wiskundige modelle in samehang met sekere eksperimentele tegnieke, het Edwards (1969) tot die slotsom gekom dat die beperkte hoeveelheid suurstof wat wél die embryo's deur die omhulsels bereik, voldoende sou wees om die groei daarvan moontlik te maak en dat die dormansie van die sade aan die vorming van remstowwe as gevolg van die lae interne suurstofkonsentrasie toegeskryf moes word. Porter & Wareing (1974) het egter daarop gewys dat Edwards (1969) se data ook ander interpretasies toelaat terwyl Collis-George & Melville (1974) haar gebruik van die betrokke wiskundige modelle vir klein voorwerpe soos sade gekritiseer het. Volgens Collis-George & Melville (1974) se berekenings is daar 'n te lae konsentrasie suurstof om die embryo's in die saad om groei moontlik te maak. Die feit bly egter staan dat Edwards (1968) bevind het dat dormansie van *S. arvensis* deur GA₃ opgehef kon word sonder dat die GA₃ die berekende suurstofdiffusiekonstante vir die omhulsels beïnvloed het.

Vir *Betula pubescens* en *B. verrucosa* is gevind dat die saadomhulsels nie net suurstofdiffusie beperk het nie, maar ook 'n remstof bevat en dat die nadelige uitwerking van die remstof deur hoë suurstofkonsentrasies oorkom kan word.

Brown & Van Staden (1973) het gevind dat 'n hoë suurstofkonsentrasie 'n verandering in die sitokinien- en gibberellienkonsentrasie van *Leucadendron daphnoides* sade veroorsaak het.

Die onlangse werk van Rumpho & Kennedy (1983) is ook ter sake. Dit blyk dat *Echinochloa crus-galli* sade oor 'n anaërobiese respiratoriese sisteem beskik en gevolglik in die afwesigheid van suurstof kan ontkiem. Alhoewel hierdie spesie, net soos *Oryza sativa* 'n uitsonderlike geval mag verteenwoordig ten opsigte van aanpassing by 'n suurstofgebrekige habitat, kan die vraag gestel word of dormante sade met digte omhulsels nie ook metabolies aangepas is vir hulle situasie nie.

Uit hierdie kort literatuurbespreking volg dat die beperking van suurstofdiffusie *per se* nie noodwendig vir die dormante toestand van sade waarvan die dormansie deur suurstof opgehef is, verantwoordelik is nie. Suurstofbehandeling mag wel tot 'n verhoogde aërobiese respirasie lei, maar dit kan ook die gevolg van 'n interaksie tussen suurstof en remstowwe in die saad wees. Hierdie gevolgtrekking het 'n opvallende verband met die situasie by *Strelitzia* spp. waar 'n remstof in die endosperm voorkom (Van de Venter & Small 1975), die teenwoordigheid van endospermweefsel tot 'n verlaging in die suurstofkonsentrasie van die inkuberingsmedium kan lei (Ybema *et al.* 1984), en 'n relatief klein verhoging in die suurstofopnametempo van ongeskonde sade verkry word tydens suurstofinkubering.

Dit alles in ag genome, is 'n eksperimentele ondersoek na die respiratoriese metabolisme van *Strelitzia juncea* sade tydens dormansieverbreking deur suurstof sekerlik geregverdig.

Eksperimente en resultate oor die verskillende respiratoriese prosesse word in afsonderlike hoofstukke bespreek. Die bedoeling was nie om 'n omvattende en diepgaande ondersoek te loods nie, maar om slegs enkele "sleutel"-ensiemaktiwiteite en -metaboliet-konsentrasies te bepaal. Wat glikolise en fermentasie betref, is die aktiwiteite van aldolase, PK, ADH, MDH_{cyt} en die "tempobepalende" PFK en PFP bepaal. Daarbenewens is die etanol-, glukose- en fruktose-inhoud van die embryo's ook bepaal (hoofstuk 3). Tegnieke en resultate vir ander sitosoliese ensieme wat in die pentosefosfaatweg optree (G6PDH, 6PGDH) is in hoofstuk 4 opgeneem. Hoofstuk 5 handel oor die mitochondriale ensiemaktiwiteite (SDH, cyt ox, MDH_{mit}, ICDH, fumarase) en dit word gevolg deur 'n studie van die adenilaatmetabolisme (hoofstuk 6). Daarin handel dit oor die AMP-, ADP- en ATP-inhoud van die embryo's en 'n ondersoek na 'n sitosoliese ATP-sintesisisteam. In die laaste hoofstuk (7) word gepoog om al die resultate te integreer om 'n oorsigtelike beeld van die respiratoriese metabolisme van die embryo's van *Strelitzia juncea* sade te verkry. Alhoewel ATP-sintese tydens kieming nie in hierdie inleiding bespreek is nie, sal die toepaslikheid van die motto vir hierdie hoofstuk blyk ná die deurlees van die slothoofstuk (7).

Wat nou volg, is 'n beskrywing van die algemene tegnieke wat in hierdie studie gebruik is (hoofstuk 2). 'n Lys van afkortings word op p (iii) aangegee.

HOOFSTUK 2ALGEMENE MATERIAAL EN METODES

2.1	HERKOMS EN BERGING VAN SADE	8
2.2	ONTSMETTING EN INKUBERING VAN SADE	8
2.3	LUG- EN SUURSTOFINKUBERING VAN DIE SADE	9
2.4	VERWYDERING VAN DIE EMBRIO'S UIT DIE SADE	11
2.5	HERHALINGS TOEGEPAS	11
2.6	BEPALING VAN ENSIEMAKTIWITEIT	12

2.1 HERKOMS EN BERGING VAN SADE

Twee *Strelitzia juncea* saadlotte is bekom. Beide is afkomstig van plante wat 'n natuurlike, homogene bevolking naby Uitenhage vorm. Die saad is gedurende 1983 en 1984 onderskeidelik geoes. Die saad is van dieselfde bevolking afkomstig as dié wat deur Ybema (1983) in sy studie gebruik is. Die arillusse van die saad is verwyder en die saad is in verdonkerde vrugteflesse verseël en in 'n kouekamer (5°C) geberg.

2.2 ONTSMETTING EN INKUBERING VAN SADE

Die oppervlakontsmettings- en inkuberingsmetode is op dié van Van de Venter & Small (1975) gebaseer. Vyf-en-twintig sade in 'n Gooch-kroesie is vir 2 minute in gekonsentreerde H_2SO_4 gehou, daarna vir 2 minute in lopende kraanwater gespoel, en vir 30 minute in 0,2% $HgCl_2$ gehou. Hierdie oppervlakontsmettingsmetode was doeltreffend om die groei van mikroorganismes op die saad te voorkom.

Ná die $HgCl_2$ -behandeling, is die sade asepties met 500 cm³ steriele gedistilleerde water gespoel, vir 2 minute in 200 cm³ steriele gedistilleerde water gehou en daarna weer met 800 cm³ steriele water gespoel. Hierdie prosedure is gevolg omdat met die aanvanklike prosedure van Van de Venter & Small (1975) variërende kiemingsresultate soms verkry is; die teenwoordigheid van kwikione is met Feigl (1946) se toetsprosedure in die inkuberingsmedium van flesse waarin nie-dormante sade swak kieming getoon het, aangedui.

Na afloop van die wasprosedure, is die sade asepties na steriele 500 cm³-koniese flesse met 20 cm³ gedistilleerde water oorgedra en in lug of suurstof geïnkubeer.

Vanaf die aanvang van die ontsmettingsproses tot plasing van die flesse met sade in die broeikas, het hoogstens 1 uur verloop. Die tyd waarop die flesse in die broeikas geplaas is, is as die aanvangstyd van inkubering beskou. In sommige gevalle word daar

in die teks na bepalings op embrio's van "dag 0" inkuberingstyd verwys. Hiermee word bedoel dat die embrio's van lugdroë sade wat nie ontsmetting of inkubering ondergaan het nie, verkry is.

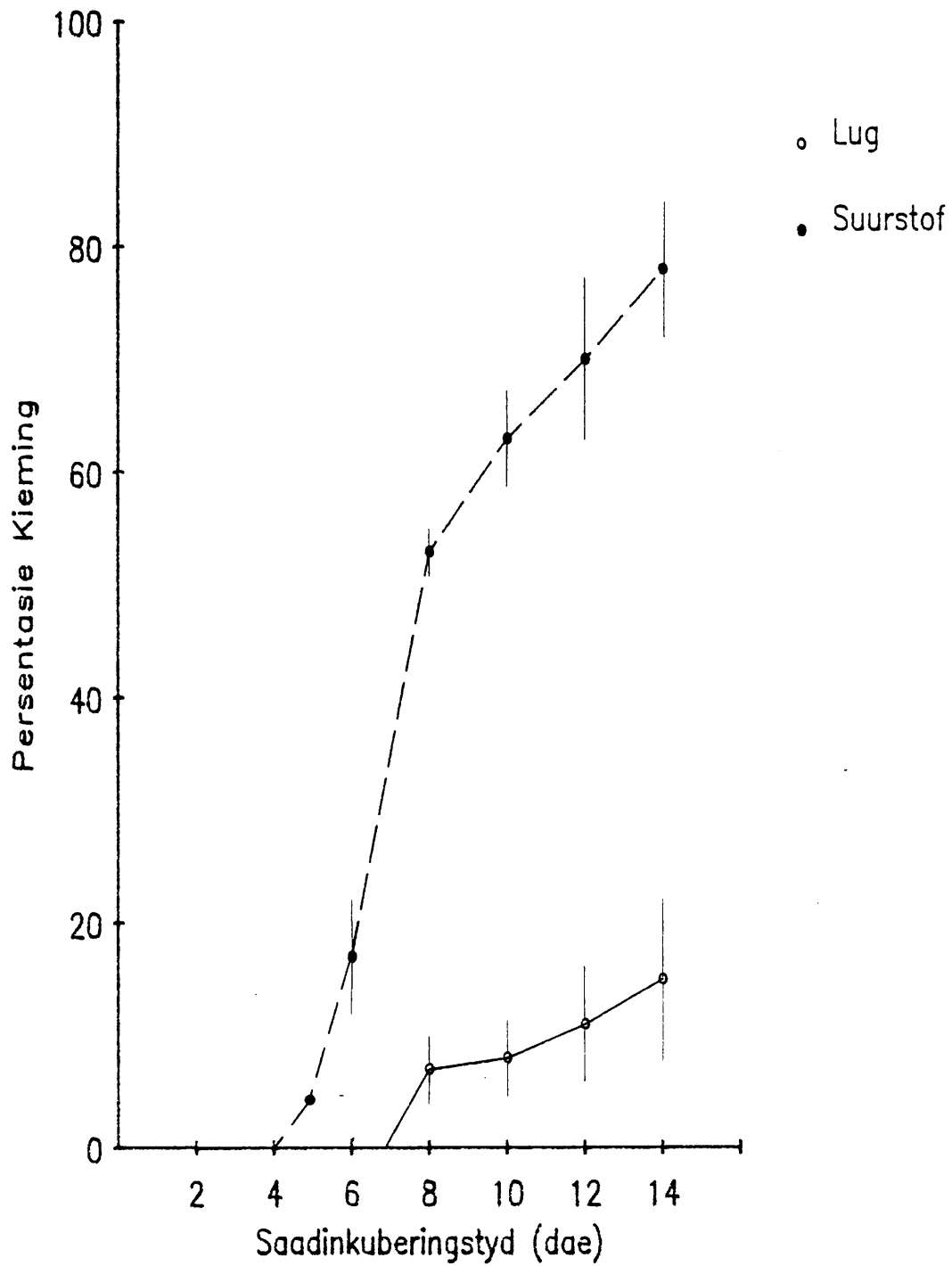
In aanvanklike eksperimente is die sade voor ontsmetting eers met 'n "Emery"-skuurwiel geskuur (Van de Venter 1974, Ybema 1983) maar hierdie behandeling is in die finale prosedures weggelaat.

2.3 LUG- EN SUURSTOFINKUBERING VAN DIE SADE

Vir luginkubering, is die koniese flesse waarin die sade geplaas is (kyk 2.2), asepties met watteproppe afgesluit. Vir suurstofinkubering, is die koniese flesse asepties met 'n rubberseptum afgesluit en suurstofgas is teen 'n tempo van $500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ vir 10 minute deur die flesse gestuur soos deur Ybema (1983) beskryf. Die druk van die suurstofatmosfeer in die flesse is tot lugdruk gebring. Dit is bewerkstellig deur die onderpunt van die uitlaatbuis uit die fles nêr onder die vloeistofoppervlak van 'n bekertjie met water te hou totdat die gasborreling opgehou het. Direk daarna is die uitlaatbuis se naald uit die septum getrek. Die flesse met sade is in die donker in 'n broeikas by $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$ geïnkubeer vir 1, 2, 3 of 4 dae, behalwe in die gevalle waar kieming oor 14 dae van inkubering bepaal is.

Die kiemingsverloop (Figuur 2.1) stem ooreen met die resultate van Ybema *et al.* (1984). Kieming van die suurstofsade het op dag 5 'n aanvang geneem terwyl dit by die lugsade eers op dag 8 begin het. Die kieming van die suurstofsade het oor die 14 inkuberingsdae toegeneem tot 'n maksimum van 78%, terwyl die lugsade 'n maksimale kiemingspersentasie van 15% bereik het.

Soos uit die bogenoemde paragraaf blyk, word ter wille van gerief na sade wat in die teenwoordigheid van lug en water geïnkubeer is, as "lugbehandelde sade" of kortweg "lugsade" verwys. Sade wat in die teenwoordigheid van 'n aanvanklike konsentrasie van 100% suurstof en water geïnkubeer is, is "suurstofbehandelde sade" of kortweg "suurstofsade" genoem (Ybema 1983). Geen studies



Figuur 2.1. Die invloed van inkubering in 'n lug- of suurstof-atmosfeer op die kieming van *Strelitzia juncea*-sade. Gemiddeld \pm standaardafwyking ($n = 5$).

van geïsoleerde embrio's is gemaak nie, maar die embrio's is altyd net voor ekstrahering uit sade wat vir die gepaste tyd geïnkubeer is, verwyder.

2.4 VERWYDERING VAN DIE EMBRIO'S UIT DIE SADE

Na die verlangde tyd van inkubering, is sade vinnig met gedistilleerde water afgespoel, drooggeklad en op 'n papierdoek oopgesprei. Die embrio's van elke saad is verwyder deur met 'n skerp lem twee oorlangse snye te maak wat deur die endosperm dring maar nie so diep dat dit die embrio beskadig nie. In die geval van ensiemekstrahering, is elke embrio na verwydering in 'n weegbootjie geplaas totdat al die embrio's vir 'n ekstrak uitgehaal is. Enige stukkies endosperm of testa is vanaf en tussen die embrio's uit verwyder. Direk daarna is die embrio's geweeg. Die metode van ekstrahering van die embrio's word onder die betrokke hoofstukke aangedui.

Ter wille van herhaalbaarheid, is dieselfde vysel en stamper vir al die ekstraherings gebruik. Een ensiemekstrak op 'n keer is berei en eers nadat die aktiwiteitsbepalings daarvan afgehandel is, is 'n volgende fles se sade oopgesny en die embrio's verwyder vir 'n volgende ekstraksie. Uitsonderings is vanselfsprekend daardie gevalle waar ekstrakte vermeng is om die gesamentlike aktiwiteit te kan bepaal; bepaling is eers gedoen nadat die betrokke ensiemekstrakte berei is.

2.5 HERHALINGS TOEGEPAS

Die 25 sade van 'n inkuberingsfles het een herhaling uitgemaak. In sommige gevalle is egter 50 sade (2 flesse) se embrio's gebruik om een ekstrak te berei.

Die aantal herhalings wat vir die verskillende analises gebruik is, het gewissel na gelang van die omvang van die eksperiment en die moeilikheidsgraad daarvan. In sommige gevalle was die tydperk vir ekstrakbereiding en analise sodanig dat hoogstens twee ekstrakte per dag gemaak kon word. Dan is sorg gedra dat

die een ekstrak van lugbehandelde- en die ander ekstrak van suurstofbehandelde sade met 'n ooreenstemmende inkuberingstyd gemaak is. Die aantal herhalings wat in elke proef gebruik is, word in die betrokke beskrywings van die proewe aangedui.

2.6 BEPALING VAN ENSIEMAKTIWITEIT

Bepaling van ensiemaktiwiteit is op ru-ekstrakte gedoen deur gebruikmaking van 'n Cary spektrofotometer wat met temperatuur-regulering toegerus is. As standaardprosedure is kuvette met 1 cm deursnee gebruik en die totale reaksievolume was in die meeste gevalle 3,0 cm³. Die spesifieke essaiëringsprosedures vir die ensieme word in die gedetailleerde beskrywings van elke metode aangegee.

Vir sommige ensieme nl. ADH, PFK, G6PDH en 6PGDH is vasgestel of die remstof wat in die embryo-omhulsel voorkom (Van de Venter & Small 1975), nie 'n remmende uitwerking het nie. Dit is gedoen deur 50 sade se endosperm en testas in 20 cm³ water te roer en vir 'n halfuur te laat staan. Van hierdie suspensie is 100 mm³ by 'n reaksiemengsel gevoeg voor inisiëring van die reaksie. In geen geval kon enige nadelige uitwerking van die "remstof"-ekstrak op ensiemaktiwiteit waargeneem word nie.

Die ensiemaktiwiteit is uit die absorbansielyne wat op die spektrofotometer se registreerder aangeteken is, bereken. In al die gevalle is 'n kaartspoed van 50 s.cm⁻¹ en 'n absorbansieskaal van 0-0,2 A gerieflik gevind. Aanvanklik is van die "blokkies-tel" metode gebruik gemaak om die ensiemaktiwiteit te bepaal, maar later is dit veel vinniger en geriefliker gevind om die helling van die lyn met behulp van 'n gradeboog te bepaal. Daarvoor moes egter 'n ander berekeningsprosedure uitgewerk word. Die nodige gegewens vir die berekening van die ensiemaktiwiteit vir die registreerder van die Cary spektrofotometer word in Figuur 2.2 aangedui.

Dit volg dat:

$$(\tan A^*)^{-1} = \frac{a \times 2,5 \text{ mm}}{b \times 2,0 \text{ mm}} \dots\dots\dots (1)$$

$$\begin{aligned} \text{en die aktiwiteit as } \Delta A \cdot s^{-1} \text{ is } & \frac{a \times 0,002}{b \times 10} \\ & = \frac{a}{b} \times 0,012 \Delta A \cdot \text{min}^{-1} \dots\dots\dots (2) \end{aligned}$$

Uit (1) en (2) volg:

$$\text{aktiwiteit} = (\tan A^*)^{-1} \times 0,0096 \Delta A \cdot \text{min}^{-1} \dots\dots\dots (3)$$

Volgens die Lambert-Beer wet is:

$$\Delta A \cdot \text{min}^{-1} = E \cdot b \cdot \Delta C \dots\dots\dots (4)$$

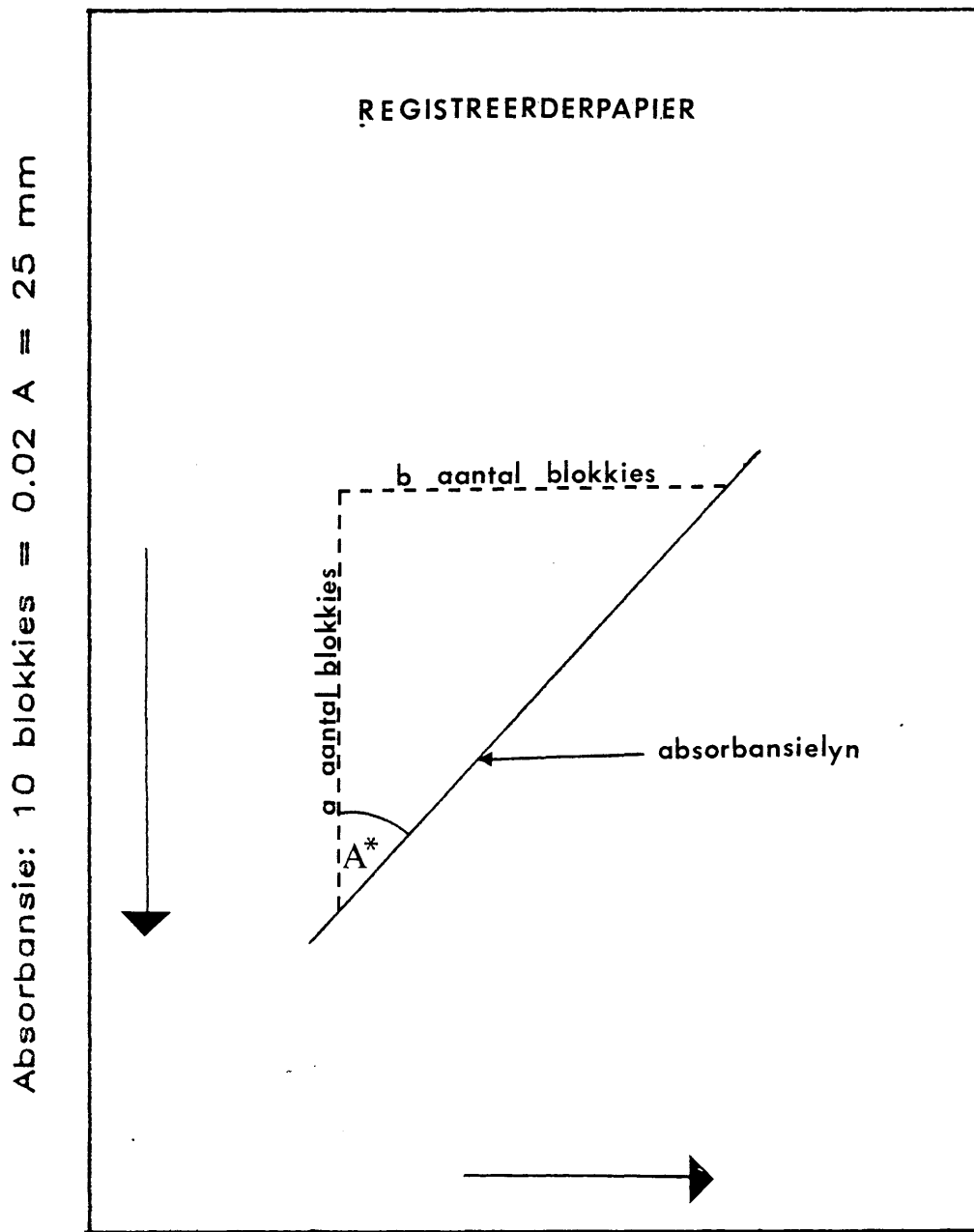
waar $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ = waargenome absorpsieverandering per minuut;
 b = optiese padlengte = 1 cm;
 ΔC = konsentrasieverskil wat waargenome absorpsieverandering veroorsaak het;
 E = molare absorbeer vermoë.

Uit (4) volg dat:

$$\begin{aligned} \Delta C &= \Delta A \times \frac{1}{E} \times 10^3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{cm}^{-3} \dots\dots (5) \\ \text{indien } E \text{ se eenhede } \text{mol} \cdot \text{dm}^3 \text{cm}^{-1} \text{ is.} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Ook is} \\ \Delta C &= \Delta A \times \frac{1}{E} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{cm}^{-3} \dots\dots\dots (6) \\ \text{indien } E \text{ se eenhede } \text{mmol} \cdot \text{dm}^3 \text{cm}^{-1} \text{ is.} \end{aligned}$$

Indien $F \text{ cm}^3$ ekstrak wat $G \times$ verdun is, in 'n totale reaksievolume van $E \text{ cm}^3$ voorgekom het, kan maklik uit (3) en (6) aangetoon word dat die ensiemaktiwiteit H deur (7) gegee word indien J aantal (of massa) embrio's in $I \text{ cm}^3$ medium geëkstraheer is:



Figuur 2.2. 'n Skematiese voorstelling van 'n absorbansie/tydlyn wat met behulp van 'n Cary 219-spektrofotometer verkry is. Die skaal op die voorstelling aangedui geld vir die bepaalde grafiekpapier en 'n apparaatinstelling van 50 s.cm^{-1} en 'n absorbansievolskaal van $0,2A$.

$$H = \frac{(\tan A^*)^{-1} \times E \times G \times I \times 0,0096}{E' \times F \times J} \quad \begin{array}{l} \mu\text{mol.min.}^{-1} \text{emb.}^{-1} \\ \text{of } \mu\text{mol.min.}^{-1} \text{g}^{-1} \end{array}$$

Die aktiwiteit is feitlik deurgaans per 50 embrio's bereken. 'n Beter interpretasie van die resultate kon nie verkry word deur dit op 'n droëmassabasis of varsmassabasis uit te druk nie. In 'n paar gevalle (ADH- en MDH-aktiwiteit, etanolinhoud) is die resultate egter ook op 'n varsmassabasis uitgedruk. In Tabel 2.1 word die varsmassa en droëmassa van embrio's van sade wat vir 1 tot 4 dae geïnkubeer is, aangegee.

In sommige gevalle was dit nodig om rekenkundige bewerkings met 'n getal en 'n standaardfout uit te voer. Daarvoor is van die volgende prosedures soos in Aikens *et al.* (1978) uiteengesit, gebruik gemaak:

Indien die som (F) van twee getalle x en y met foutgrense e_x en e_y bepaal word, word die foutgrens (e_F) van die som gegee deur $e_F = \sqrt{e_x^2 + e_y^2}$ waar $F = x + y$.

Indien $F = \frac{x \cdot y}{z}$,

$$\text{is } \frac{e_F}{F} = \sqrt{\left(\frac{e_x}{x}\right)^2 + \left(\frac{e_y}{y}\right)^2 + \left(\frac{e_z}{z}\right)^2}$$

waar e_z die foutgrens van die deler z is.

Die hardheid van die saad en die voorkoms van die embrio word deur die inkuberingsperiode beïnvloed, soos blyk uit Tabel 2.1 waar die uitsnytyd vir embrio's aangegee word. Die relatief lang tye wat dit vir die uitsny van die embrio's neem, veroorsaak dat die embrio's van sowel lug- as suurstofsade vir relatief lang tye aan die lugatmosfeer blootgestel word. Hoe dit die ensiemaktiwiteit van die embrio's van lug- en suurstofsade kan beïnvloed, is onbekend.

Tabel 2.1 Die vars- en droëmassa van embrio's van sade wat vir verskillende tye aan lug- en suurstofinkubering blootgestel is en die tyd benodig vir die uitsny van die embrio's

Inkuberings-tyd (dae)	Inkuberings-atmosfeer	Tyd vir uitsny van 50 embrio's (min.)	Varsmassa van 50 embrio's (g)	Droëmassa ^c van 50 embrio's (g)
0 ^a	-	58	0,290	-
1	Lug	32±3 ^b	0,376±0,011	0,285±0,021
	Suurstof	32±5	0,394±0,020	0,292±0,026
2	Lug	22±2	0,460±0,023	0,260±0,015
	Suurstof	26±4	0,474±0,006	0,254±0,016
3	Lug	26±2	0,485±0,014	0,271±0,016
	Suurstof	23±2	0,499±0,010	0,283±0,012
4	Lug	24±2	0,517±0,028	0,254±0,031
	Suurstof	23±1	0,524±0,035	0,252±0,029

a Embrio's van lugdroë sade (n = 1)

b Gemiddeld ± standaard afwyking (n = 5)

c Die data vir vars- en droëmassa is van verskillende eksperimente afkomstig. Die data vir droëmassa is op groepe van 10 embrio's bepaal en omgewerk na waardes vir 50 embrio's.

In die geval van 'n paar bepalings (G6PDH, 6PGDH, ADH) is deur die kook van die ekstrakte vasgestel dat die waargenome reaksie waarskynlik van temperatuurgevoelige biomolekule afhanklik is. Die metode berus op die aanname dat nie-ensimatiese prosesse wat vir die reaksies verantwoordelik kon wees, nie nadelig deur die kookproses beïnvloed sal word nie. Die kookproses bring dikwels 'n radikale verandering in die samestelling van plantekstrakte soos die embryo-ekstrakte van *Strelitzia juncea* tewêg weens koagulering en uitvlokking. Vir sommige van die bestudeerde ensieme van hierdie studie is van aktiveerders of van remstowwe gebruik gemaak om vas te stel of die reaksie wel ensiemgekataliseerd is.

Moontlike belemmering van aktiwiteitsbepalings vir 'n bepaalde ensiem deur die gelyktydige verloop van ander ensiemreaksies (bv. NADH-dehidrogenase) is deur die gebruik van blankoreaksie-mengsels met geskikte samestelling uitgeskakel, en die besonderhede word by die essaiëringsprosedure vir die betrokke ensieme aangedui.

Vir al die ensiembepalings wat in hierdie studie gemaak is, is vasgestel dat daar 'n lineêre toename in die waargenome aktiwiteit is met toenemende ekstrakvolume.

Wat die weergee van resultate betref, is gebruik gemaak van die aanbevole definisie dat 1 internasionale eenheid (IU) beskou word as daardie hoeveelheid ensiemaktiwiteit wat die verbruik van $1 \mu\text{mol}$ substraat. min^{-1} veroorsaak (Dixon & Webb 1964; Bergmeyer 1974a). Die spesifieke aktiwiteit van 'n preparaat (ekstrak) verwys na die getal eenhede (IU). mg^{-1} proteïen van die ekstrak, terwyl ensiemkonsentrasie na die getal eenhede in 'n bepaalde volume-eenheid verwys, nl. $\text{IU}\cdot\text{cm}^{-3}$. In hierdie studie is die resultate aangegee as die totale eenhede (IU) wat in 50 *S. juncea*-embrio's voorkom. Weens verskillende arbitrêre eenhede wat dikwels in die literatuur voorkom, is die gebruik van "eenhede" egter vermy en is die aktiwiteit bloot aangegee as $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 50 embrio's $^{-1}$ (= $\text{IU}\cdot 50 \text{ embrio's}^{-1}$). 'n Uitsondering is die

mitochondriale ensieme waar die resultate soms as $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ 50 embryo's⁻¹ (= $\text{mIU}\cdot 50 \text{ emb.}^{-1}$) aangegee is. Die weergawe van aktiwiteit as spesifieke aktiwiteit ($\text{IU}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteïen) is nie in hierdie studie as sinvol beskou nie, omdat die embryo's ryk aan proteïenreserweliggaampies is (Ybema *et al.* 1984) en omdat die bepaling van proteïenkonsentrasie volgens spektrofotometriese prosedures op allerlei aannames gebaseer is (Dixon & Webb 1964; Butterworth 1983). Om die $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 50 emb.⁻¹-waardes om te reken na die onlangs-aanvaarde eenhede vir aktiwiteit (katal), moet die waardes met 16,7 vermenigvuldig word om 'n katal. 50 emb.⁻¹ te verkry.

Bepaling van ensiemaktiwiteite op ru-ekstrakte en afleidings van sodanige resultate berus op verskeie aannames. Die waargenome aktiwiteit by 'n bepaalde temperatuur is 'n funksie van die ensiemkonsentrasie, die konsentrasie van reguleerdermolekule, die pH,ioonsterkte en buffersamestelling (Butterworth 1983). In hierdie studie verteenwoordig die ekstrakte 'n groot verdunning van die weefselvloeistof (ca 0,45 g varsmassa in 40 cm³ medium) sodat moontlike substrate en reguleerders van die weefsel teen baie laer konsentrasies in die ekstrakte voorkom as in die selle.

Dit is moeilik om van die *in vitro* - na die *in vivo* situasie te ekstrapoleer vanweë die lae ensiemkonsentrasie waarmee *in vitro* geëksperimenteer word (Butterworth 1983). Boonop is die *in vitro* resultate heeltemal metode-afhanklik; onderlinge vergelyking tussen resultate is desnieteenstaande moontlik indien dieselfde tegniek goed toegepas is. Afleidings oor ensiemkonsentrasie in ekstrakte word gewoonlik uit aktiwiteitsbepalings gemaak. In dié verband beweer Butterworth (1983): "Implicit in the assumption that a change in activity is directly related to a change in the number of molecules of enzyme present, is the assumption that every molecule of a particular enzyme has the same intrinsic activity as any other molecule. If the activity of the enzyme in a tissue is found to increase as a consequence of some perturbation, activity measurements alone are unable to

distinguish whether the increase represents a net increase in the number of molecules of enzyme present in the tissue, or whether new enzyme molecules of a higher intrinsic specific activity have appeared."

In hierdie studie is in sommige gevalle gebruik gemaak van ekstrakvermenging; indien die waargenome aktiwiteitsverskil tussen twee ekstrakte slegs die gevolg van 'n verskil in ensiem-konsentrasie is, behoort 'n gelyke vermenging van ekstrakte die aktiwiteit te lewer wat die numeriese som van die afsonderlike aktiwiteite is. Indien die mengsel se aktiwiteit hoër of laer as die verwagte somaktiwiteit is, kan dit 'n aanduiding van die optrede van aktiveerders of remstowwe in een of albei van die ekstrakte wees. In die geval van *Strelitzia juncea* ekstrakte was die probleem dat die ensiemaktiwiteit van die ekstrakte min verskil getoon het en dat die variasie in die waardes vir die mengsel se aktiwiteit relatief groot was.

'n Laaste aspek van belang in die gebruik van ru-ekstrakte, is die moontlike teenwoordigheid van isoënsieme in die ekstrakte: "Reports of differences between enzymes from different plant sources may be due to differences in ratios between the isozymes themselves. Also the extraction and assay conditions for each isozyme of one activity (e.g. pyruvate kinase) may be quite different so that a standard assay may be optimal for one isozyme and far from optimal for the other." (Dennis & Miernyk 1982). In hierdie studie is gewoonlik van sukrose-bevattende mediums gebruik gemaak om die ekstrahering van organellêre isoënsieme te probeer voorkom.

Samevattend blyk dit dus dat die gebruik van ru-ekstrakte problematies kan wees en dat dit slegs by benadering antwoorde oor die metabolisme van weefsel kan verskaf. Tog kan die gebruik van ru-ekstrakte geregverdig word vir so 'n aanvangstudie waar daar min inligting oor die metabolisme van die weefsel bestaan. Daarby moet in gedagte gehou word dat die gevorderde werk waaroor huidig in die vakliteratuur gerapporteer word, grootliks op kennis gebaseer is wat vroeër deur die gebruik van

ru-ekstrakte verkry is. Afleidings oor die moontlike betekenis van resultate wat so verkry is, maak die ontwikkeling van hipoteses moontlik waaruit verdere eksperimentering en kennisontwikkeling voortvloei. Miskien moet die vorige aanhalings tesame met dié van Henri Poincaré gelees word: "It is far better to foresee than not to foresee at all."

HOOFSTUK 3

DIE INVLOED VAN DORMANSIEVERBREKING DEUR SUURSTOF OP ENKELE ASPEKTE VAN DIE SITOSOLIESE METABOLISME VAN STRELITZIA JUNCEA-SADE

3.1	INLEIDING	23
3.2	MATERIAAL EN METODEDES	26
3.2.1	Bereiding van 'n ru-ekstrak	26
3.2.2	Bepaling van die aktiwiteit van bepaalde sitosoliese ensieme	26
3.2.2.1	Fosfofruktokinase (PFK)	26
3.2.2.2	Anorganiese pirofosfaat: D-fruktose-6-fosfaat: 1 fosfotransferase (PFP)	28
3.2.2.3	Aldolase	29
3.2.2.4	Piruvaatkinase (PK)	29
3.2.2.5	Alkoholdehidrogenase (ADH)	31
3.2.2.6	Sitosoliese malaatdehidrogenase (MDH _{cyt})	33
3.2.3	Metabolietekstrahering	33
3.2.4	Ensimatiese bepaling van sekere metaboliete	33
3.2.4.1	Etanol	33
3.2.4.2	D-glukose en D-fruktose	34
3.2.4.3	Piruvaat	34
3.2.4.4	D-glukose-6-fosfaat en D-fruktose-6-fosfaat	34
3.3	BEREKENINGS	36
3.3.1	PFK, PFP en aldolase	36
3.3.2	PK en ADH	36
3.3.3	Etanol- en piruvaatinhoud	36
3.3.4	D-glukose- en D-fruktose-inhoud	36
3.4	RESULTATE EN BESPREKING	37
3.4.1	Ensiemaktiwiteite van die sitosol	37

3.4.1.1	Fosfofruktokinase (PFK) en anorganiese pirofosfaat: D-fruktose-6-fosfaat: 1 fosfotransferase (PFK)	37
3.4.1.2	Aldolase	43
3.4.1.3	Piruvaatkinase (PK)	45
3.4.1.4	Alkoholdehidrogenase (ADH)	46
3.4.1.5	Sitosoliese malaatdehidrogenase (MDH _{cyt})	57
3.4.2	Metabolietinhoud	61
3.4.2.1	Etanol	61
3.4.2.2	D-glukose en D-fruktose	66
3.4.2.3	Piruvaat	69
3.4.2.4	D-glukose-6-fosfaat en D-fruktose-6-fosfaat ...	69
3.5	OPSOMMING	71

3.1 INLEIDING

Die ouer literatuur oor die glikolitiese ensieme in nie-dormante sade kan s6 saamgevat word (Bewley & Black 1978) dat die hekso-kinase-, aldolase- en PFK-aktiwiteite van saadlobbe tydens die v66rkiemingsperiode hoog is en dat dit later afneem soos wat die reserwevoedingstowwe uitgeput raak. In die saadlobbe en embryo's van *Cicer arietinum* is daar 'n toename in die glikolitiese- en fermentatiewe aktiwiteite oor die eerste 24 uur van inkubering waarna dit afneem (Burguillo & Nicolas 1974).

Volgens die oorsig van Morohashi (1978) is die glikolitiese- en fermentatiewe aktiwiteite tydens die heel vroe6 inkuberingstadium hoog; die Krebs-siklusaktiwiteite is heelwat laer maar die eintlike beperkende proses is die elektronoordragstelsel (EOS) van die mitochondrions. Morohashi skryf die ho6 fermentatiewe aktiwiteite van sade tydens die vroe6 inkuberingsfase daaraan toe dat daar waarskynlik 'n oorvoorsiening van piruvaat is vanwe6 die ho6 glikolitiese- maar beperkende EOS-aktiwiteit.

Fermentasie is 'n algemene verskynsel by imbiberende nie-dormante sade (Doireau 1969 volgens Morohashi 1978; Koll6ffel 1968). Leblov6 1978a, b). Leblov6 het vir verskeie soorte sade gevind dat die ADH-aktiwiteit n6 die aanvanklike styging tydens vroe6 inkubering weer afneem tot 'n lae waarde in die saailing. Hierdie afname in die ADH-aktiwiteit mag moontlik 'n artifak van die ekstraheringsprosedures wees, soos uit die latere bespreking (3.4.1.4) sal blyk. Alhoewel ana6robieuse toestande vir die embryo's van dormante sade al dikwels ge6mpliseer is, is geen indringende studie van hulle fermentatiewe aktiwiteit gemaak nie.

Slegs een verwysing na die moontlike rol van glikolise in saad-dormansie kon in die standaardbronne oor saaddormansie (Khan 1977b, Bewley & Black 1982) gevind word en dit staan in verband met Roberts (1969) se hipotese (4.5, p 87). Dit blyk volgens hom dat glikolitiese remstowwe in sommige gevalle dormansie kan ophef. Dit word volgens die hipotese s6 verklaar dat 'n verminderde glikolitiese vloed die PP-weg aktiveer waardeur dormansie opgehef word.

Dit word algemeen aanvaar dat fosfofruktokinase (PFK) en piruvaatkinase (PK) die twee vernaamste ensieme is waardeur die glikolitiese vloed beheer word, aangesien beide onder allosteriese beheer staan en "nie-ekwilibrium" reaksies kataliseer (Turner & Turner 1980 se oorsig vir glikolise in plantweefsel). Volgens Rapoport *et al.* (1974) se wiskundige model is dit heksokinase en PFK wat die glikolitiese vloed in eritrosiete beheer. Deur die toepassing van die wiskundige model van Kacser & Burns (1973) is PFK ook as temporegulerend vir *Saccharomyces cerevisiae* aangewys (Fell 1984), alhoewel laasgenoemde outeur soos Bosca & Corredor (1984) voorspraak daarvoor maak dat meer aandag aan die begrip van verspreide beheer ("distributed control") gegee moet word. Uit bogenoemde bespreking blyk dat 'n studie van glikolise minstens die bepaling van PFK-aktiwiteit behoort in te sluit, maar dat die bepaling van al die ensiemaktiwiteite met gepaardgaande reguleerderkonsentrasies asook substraatkonsentrasies die ideale situasie sou wees. Onlangse literatuur dui daarop dat ook ander ensieme as PFK in 'n belangrike mate by die D-fruktose-6-fosfaat/D-fruktose-1,6-bisfosfaat omskakeling betrokke is. Waar PFK die fosforilering van fruktose-6-fosfaat deur ATP kataliseer, is dit PFP wat die fosforilering deur pirofosfaat kataliseer. Die teenwoordigheid van laasgenoemde ensiem is op "toevallige" wyse in *Strelitzia juncea* ekstrakte ontdek, soos uit die bespreking onder 3.2.2.2 sal blyk. PFP se aktiwiteit word sterk deur D-fruktose-2,6-bisfosfaat gestimuleer; laasgenoemde verbinding het 'n sterk remmende uitwerking op die hidrolise van D-fruktose-1,6-bisfosfaat deur fruktose-1,6-bisfosfatase (oorsig deur Cseke *et al.* 1984). Dit is dus nie verbasend dat D-fruktose-2,6-bisfosfaat beskou word as 'n sleutelverbinding in die beheer van glikolitiese en glikoneogeniese aktiwiteite in plante nie (Cseke *et al.* 1984).

Givan (1972) het vir ekstrakte van imbiberende ertjiesade vasgestel dat glikolise deur die konsentrasies van fosfaat en ATP beheer word - blykbaar vanweë die invloed wat fosfaat en ATP op PFK-aktiwiteit het. Dit is interessant dat Racker (1984) sterk voorspraak daarvoor maak dat in tumorselle dit nie PFK-aktiwiteit is wat die "tempobepalende" faktor vir die glikoli-

tiese vloed is nie, maar dat dit die fosfaat- en ATP-konsentrasies van die selle is wat die tempo van glikolise beheer. Volgens hom kom die hele probleem dáárop neer dat die vernaamste prosesse waardeur ATP in hierdie selle verbruik word, bepaal moet word, want sodoende sal vasgestel kan word wat die vernaamste intrasellulêre bron van ATP en fosfaat is. In hierdie studie oor die respiratoriese metabolisme van *Strelitzia juncea* sade, is die ATP-konsentrasie wel bepaal (hoofstuk 6), maar dit is moeilik in verband te bring met PFK-aktiwiteit. Fosfaat-konsentrasies is nie in hierdie studie bepaal nie; in imbiërende sade kan fitien die bron van fosfaat wees (Bewley & Black 1978). Die probleem met fosfaatbepaling van plantweefsel is dat daar metaboliese-onaktiewe poele van fosfaat (soos vakuole) mag voorkom wat moeilik van metaboliese-aktiewe poele onderskeibaar is met die normale ekstraheringstegnieke.

Uit bogenoemde bespreking blyk dat daar nie baie inligting oor die glikolitiese proses van nie-dormante en dormante sade as sodanig is nie en die huidige stand van sake word goed deur Bewley & Black (1978) opgesom: "There is only limited evidence from a small number of species of seeds for the existence of some of the enzymes of these pathways, but at present we shall assume that the pathways are active to varying degrees in most, if not all viable, imbibed seeds." Die metaboliese weë waarna verwys word, is dié van glikolise, die pentosefosfaatweg en die Krebs siklus.

Die hieropvolgende inleidende studie oor die dormante *Strelitzia juncea* sade wat deur suurstof tot kieming geïnduseer word, handel slegs oor die aktiwiteit van enkele glikolitiese ensieme (PFK, PFP, aldolase, PK) en ander sitosoliese ensieme (ADH, MDH_{cyt}) in ru-ekstrakte en die bepaling van enkele metaboliëte (glukose, fruktose, glukose-6-fosfaat, fruktose-6-fosfaat, piruvaat en etanol) van die embryo's. Die rede vir die bepaling van die "temporegulerende" PFK, PFP en PK-aktiwiteite volg uit die voorafgaande bespreking, terwyl aldolase-aktiwiteit as aanduidend van glikolise beskou word (Conn & Stumpf 1976). ADH-aktiwiteit is bepaal as 'n maatstaf van die fermentatiewe aktiwiteit terwyl MDH_{cyt}-

bepalings 'n uitvloeisel is van die bepaling van die malaat-dehidrogenase-aktiwiteit van die mitochondrions. Die metaboliese waarvan die konsentrasies bepaal is, is s6 gekies dat 'n maatstaf van die omvang van die vloed deur glikolise en fermentasie in die embrio's van lug- en suurstofbehandelde sade verkry kan word.

3.2 MATERIAAL EN METODEDES

mm EDTA) } Opnuut op
di' vlyk te -

3.2.1 Bereiding van 'n ru-ekstrak

Twee flesse (25 sade per fles, oppervlakontsmet en geïnkubeer soos onder 2.2 beskryf) se embrio's is verwyder (kyk ~~4.2.5~~) 2 2 en die geweegde embrio's is in 'n yskoue vysel in 2 cm³ yskoue ekstraksiemedium (0,4 mol.dm⁻³ sukrosebevattende 100 mmol.dm⁻³ TRIS-HCl pH 7,4) met 'n stamper vir 1 minuut fyngemaal. Die ekstrak is kwantitatief na 'n 50 cm³ maatsilinder oorgedra en met ekstraksiemedium tot 40 cm³ opgemaak. Daarna is die ekstrak by 23 000 g (4°C) vir 20 minute gesentrifugeer. Deur 'n spuit met 'n lang spuitnaald (90 x 0,8 mm) deur die drywende lipiedlaag te steek, is 10 cm³ van die waterige bovloeistof versigtig onttrek en vir ensiembepalings gebruik. Indien nodig, is ekstrakverdunnings met ekstraksiemedium gemaak.

3.2.2 Bepaling van die aktiwiteit van bepaalde sitosoliese ensieme

Alle biochemikalieë was van Boehringer Mannheim afkomstig, tensy anders vermeld.

3.2.2.1 Fosfofruktokinase (PFK)

Die bepaling van PFK is op die metodes van Stellwagen & Wilgus (1975) asook Hofmann & Kopperschläger (1982) gebaseer. Die essaiëringsstelsel berus daarop dat alle D-fruktose-1,6-bisfosfaat wat moontlik as gevolg van PFK-aktiwiteit in die reaksiemengsel kan ontstaan, deur die inwerking van 'n analitiese ensiemmengsel via dihidroksie-asetoon-fosfaat na α-L-gliserolfosfaat omgesit word met die gepaardgaande oksidering van NADH wat spektrofoto-

metries gevolg kan word.

In sekere opsigte het die metode wat in hierdie studie toegepas is, van die gepubliseerde metode afgewyk, veral wat die analitiese ensiemmengselbetref. Die analitiese ensiemmengsel is uit beskikbare reagense opgemaak, nl.:

- (a) Aldolase (Boehringer 102644; $10 \text{ mg proteïen.cm}^{-3}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ suspensie; 9 U.mg^{-1} en
- (b) gliserol-3-fosfaat-dehidrogenase/triosefosfaatisomerase (GDH/TIM van Boehringer 127787; $10 \text{ mg proteïen.cm}^{-3}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ suspensie; 10:1 proteïenverhouding en 1:2,9 aktiwiteitsverhouding).

Bogenoemde reagense (a) en (b) is verdun en sodanig met mekaar vermeng dat die aldolase-suspensie (a) 1:20 (v/v) en die GDH/TIM-suspensie (b) 1:100 (v/v) verdun in een oplossing (c) voorgekom het. Verdunnings is met gedeïoniseerde water uitgevoer en vir elke bepalingdag is 'n vars oplossing berei. Van hierdie verdunde oplossing (c) is 100 mm^3 by die reaksiemengsel gevoeg om in 'n totale volume van $3,0 \text{ cm}^3$ voor te kom.

Die doeltreffendheid van die analitiese mengsel (c) is getoets deur 'n reaksiemengsel saam te stel en die reaksie te monitor soos hieronder vir PFK uiteengesit, behalwe dat Na_2 -D-fruktose-6-fosfaat vervang is met $3,0 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ Na_3 -D-fruktose-1,6-bisfosfaat, en ekstras wegelaat is. Dat die analitiese ensiemmengsel bevredigend gefunksioneer het, blyk daaruit dat die reaksietempo ($\mu\text{mol NADH. min}^{-1}$) wat met die toetsprosedure verkry is, minstens 400 keer hoër was as wat met die ekstrasbevattende reaksiemengsel verkry is.

Vir die bepaling van die PFK-gekataliseerde reaksie, was die finale konsentrasies van die reagense in die finale reaksievolume van $3,0 \text{ cm}^3$ soos volg: $40 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ TRIS-HCl, pH 7,2; $5,0 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ MgSO_4 ; $0,20 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ NADH; $3,0 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ Na_2 -D-fruktose-6-fosfaat; $0,6 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ Na_2 -ATP; en analitiese

ensiemmengsel (c). Die voorraad-ATP-oplossing is in reaksiebuffer opgelos. Die blankokuvet se samestelling was dieselfde as vir die reaksiekuvet behalwe dat dit nie die substraat Na₂-D-fruktose-6-fosfaat bevat het nie. Die reaksie is geïnisieer deur die byvoeging van gelyke volumes ekstrak by die blanko en die reaksiemengsel om 'n finale volume van 3,0 cm³ vir elk te gee.

Die totale sulfaatioonkonsentrasie van die reaksiemengsel was 11 μmol.cm⁻³ met die MgSO₄ en (NH₄)₂SO₄-bevattende verdunde analitiese ensiemmengsel wat gebruik is, terwyl die NH₄⁺ ioon-konsentrasie 6 μmol.cm⁻³ was. Aangesien ITP nie beskikbaar was nie, is ATP in die reaksiemengsel gebruik en substraatremming van PFK deur ATP is dus 'n moontlikheid (Stellwagen & Wilgus 1975). In hulle prosedure, het Hofmann & Kopperschläger (1982) wel ATP gebruik maar AMP as 'n allosteriese effektor in die medium ingesluit. AMP het in hierdie studie egter nie as 'n positiewe effektor opgetree nie.

Oksidasie van NADH is spektrofotometries gevolg deur die absorpsieverandering met tyd by 340 nm en 25°C in 'n 1 cm-deursnee kuvet met behulp van 'n Cary 219 spektrofotometer te bepaal.

3.2.2.2 Anorganiese pirofosfaat: D-fruktose-6-fosfaat: 1 fosfotransferase (PFK)

PFK-bepalings is op die metode van Anderson & Sabularse (1982) gebaseer en die essaiëringsbeginsel is dieselfde as dié vir PFK. Die analitiese ensiemmengsel (c) was in samestelling en gebruikswyse soos wat vir PFK beskryf is, wat dus 'n afwyking van die gepubliseerde metode was; die analitiese ensiemoplossings is ook nie voor gebruik gedialiseer nie.

Die finale konsentrasies van die reagentie van die reaksiemengsel (3,0 cm³ finale volume) was 80 μmol.cm⁻³ HEPES-NaOH pH 7,8; 1,0 μmol.cm⁻³ EDTA; 10,0 μmol.cm⁻³ Na₂-D-fruktose-6-fosfaat; 6,0 μmol.cm⁻³ MgCl₂; 0,20 μmol.cm⁻³ NADH; 1,13 μmol.cm⁻³ natriumpirofosfaat (Merck) en analitiese ensiemmengsel (c).

Natriumpirofosfaatoplossing is berei deur die verbinding in water op te los en die pH met 1 mol.dm^{-3} HCl na 7,8 in te stel en die oplossing tot volume op te maak. In die gevalle waar Na-D-fruktose-2,6-bisfosfaat (Sigma) by die reaksiemengsels gevoeg is, was die finale konsentrasie daarvan $0,28 \text{ nmol.cm}^{-3}$. Die aktiwiteit wat met die toetsprosedure vir die analitiese ensieme verkry is, was ca 40 keer hoër as die aktiwiteit wat vir PFK ná fruktose-2,6-bisfosfaat byvoeging verkry is.

Die blankomengsel is net soos die reaksiemengsel opgemaak, behalwe dat pirofosfaat weggelaat is. Inisiëring van die reaksie en spektrofotometriese bepaling is soos vir PFK uitgevoer.

3.2.2.3 Aldolase

Aldolase-aktiwiteit se essaiëring (Horecker, 1975) berus op die gebruik van GDH/TIM analitiese ensiemengsel en die spektrofotometriese bepaling van NADH-oksidering, soos reeds bespreek vir PFK. In hierdie geval is 'n analitiese ensiemengsel (d) gebruik wat bestaan het uit 'n 1:100 (v/v) verdunning van die GDH/TIM suspensie (Boehringer 127787; kyk by PFK) maar met geen analitiese aldolase daarby nie. Van oplossing (d) is 100 mm^3 by die reaksiemengsel gevoeg om in 'n totaal van $3,0 \text{ cm}^3$ voor te kom.

Die finale samestelling van die reaksiemengsel was $39 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ triëtanolamienbuffer pH 7,5; $10,0 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ EDTA; $2,0 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ Na₂-D-fruktose-1,6-bisfosfaat; $0,1 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ NADH, analitiese ensiemoplossing (d) en ekstrak in 'n finale volume van $3,0 \text{ cm}^3$. Die blanko het 'n identiese samestelling gehad behalwe dat geen Na₂-D-fruktose-1,6-bisfosfaat daarin voorgekom het nie. Reaksie-inisiëring is gedoen deur die byvoeging van ekstrak by albei kuvette en die spektrofotometriese besonderhede is soos vir die PFK-bepaling.

3.2.2.4 Piruvaatkinase (PK)

Aanvanklik is die PK-aktiwiteit volgens Aust *et al.* (1975) bepaal, maar baie lae aktiwiteit is verkry en die analitiese besonderhede

word dus nie gegee nie. Aangesien die ensiem koudblaiel is (Aust *et al.* 1975), is 'n alikwot van die ekstrakte direk na bereiding by kamertemperatuur gehou maar lae aktiwiteit is eweneens verkry.

Perl (1980) het in sy ondersoek na 'n sitosoliese ATP-sintese-sisteem in sade, die PK-reaksie in verband daarmee nagegaan maar deur gebruikmaking van die bioluminessensietegniek. Hierdie prosedure van Perl (1980) is vir hierdie studie aangepas om dit as 'n spektrofotometriese bepalingmetode te gebruik. Goeie aktiwiteit is wel vir koudbereide ekstrakte deur die toepassing van hierdie bepalingmetode verkry, maar die spesifisiteit daarvan vir PK is nie krities ondersoek nie.

Die essaiëringsbeginsel berus soos in die geval van Aust *et al.* (1975) daarop dat enige piruvaat wat in die reaksiemengsel vanweë PK-aktiwiteit mag ontstaan, deur die inwerking van analitiese laktaatdehidrogenase (LDH) na laktaat toe omgesit sal word, met die gepaardgaande oksidering van NADH wat dan spektrofotometries gevolg kan word.

Analitiese LDH-oplossing vir gebruik in die spektrofotometriese bepaling is berei deur laktaatdehidrogenase (LDH: Boehringer 107077; 10 mg proteïen.cm⁻³ (NH₄)₂SO₄-suspensie; 550 U.mg⁻¹) te verdun (1:250 v/v) en 100 mm³ van die verdunning is in 'n finale volume van 3,0 cm³ reaksiemengsel gebruik. Die LDH-verdunning is met gedeïoniseerde water gedoen en die oplossing is daagliks aangemaak. Vir die kontrolering van die analitiese LDH-aktiwiteit, is die reaksie soos vir PK-essaiëring uitgevoer, behalwe dat 0,5 μmol.cm⁻³ geneutraliseerde pirodruiwesuur in plaas van PEP in die reaksiemengsel voorgekom het en ekstrak daaruit weggelaat is.

Vir die PK-bepaling het die reaksiemengsel (finale volume 3,0 cm³) bestaan uit finale konsentrasies van die komponente, soos volg:

16,67 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ K-fosfaatbuffer pH 6,4; 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ Na₂-ADP; 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ (C₆H₁₄N)₃-fosfoënolpiruvaat (PEP); 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ MgCl₂; 1,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ MnSO₄; 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ CoSO₄; 0,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ NADH; verdunde LDH-oplossing en ekstrak.

Die blankomengsel was soos vir die reaksiemengsel saamgestel, behalwe dat dit geen PEP bevat het nie. Deur ekstrak by sowel die blanko- as die reaksiemengsel te voeg, is die PK-reaksie geïnisieer. Spektrofotometriese besonderhede is soos vir PFK.

Bogenoemde blanko sou kon kompenseer vir enige NADH-oksidering deur die ekstrak wat nie deur bemiddeling van PEP-byvoeging geskied het nie. Indien Perl (1982c) se hipotetiese skema (kyk Figuur 6.5, p 185) egter geld, sal daar in die reaksiemengsel 'n NADH-oksidering kan plaasvind as gevolg van NADH₂-pirofosforilase en laasgenoemde NADH-oksidering sal volgens die skema versnel kan word in die teenwoordigheid van PEP. Die blanko korrigeer nie vir laasgenoemde NADH-oksidering in die reaksiemengsel nie, maar aangesien NADH-oksidasetempo as gevolg van die analitiese LDH-aktiwiteit sóveel hoër is as die waargenome reaksietempo, is aanvaar dat die genoemde NADH-oksidering deur die ekstrak 'n klein uitwerking op die betroubaarheid van die PK-bepalings uitgeoefen het.

3.2.2.5 Alkoholdehidrogenase (ADH)

Essaiëring van die ensiem is op die metodes van Leblova (1978b). Grondal *et al.*(1983) en Shimomura & Beevers (1983a) gebaseer.

Vir die terugwaartse reaksie (asetaldehydvorming uit etanol) het die reaksiemengsel (finale volume 3,0 cm³) bestaan uit die volgende komponente met finale konsentrasies soos aangedui: 0,1 mol.dm⁻³ K-fosfaatbuffer pH 8,9; 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ NAD ekstrak en 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ etanol. Die reaksie is begin deur die byvoeging van die etanol by die reaksiemengsel. Samestelling van die blanko het met die reaksiemengsel ooreengestem behalwe dat etanol nie bygevoeg is nie.

Vir die voorwaartse reaksie (etanolvorming uit asetaldehyd), het die reaksiemengsel (finale volume $3,0 \text{ cm}^3$) bestaan uit die volgende komponente met finale konsentrasies soos aangedui: $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ K-fosfaatbuffer pH 6,9; $0,27 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ NADH, ekstrak en $7 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ asetaldehyd, waarmee die reaksie ook geïnisieer is. Behalwe vir die asetaldehyd, het die blanko en die reaksiemengsel dieselfde komponente bevat met dieselfde finale konsentrasies. Die kuvette is van propies voorsien om asetaldehydvervlugting te beperk. Spektrofotometriese besonderhede is soos onder 3.2.2.1 aangegee.

Om die moontlike teenwoordigheid van 'n ADH-remstof te ondersoek (Shimomura & Beevers 1983a,b) is $2,0 \text{ cm}^3$ van 'n bepaalde ekstrak met $2,0 \text{ cm}^3$ van 'n ekstrak wat uit droë embryo's berei is, vermeng. Die ADH-aktiwiteit van hierdie ekstrakmengsels is vergelyk met ooreenstemmende verdunnings van die bepaalde ekstrak wat met ekstraksiemedium uitgevoer is en met ooreenstemmende verdunnings van die droë-embrio ekstrak, wat ook met ekstraksiemedium uitgevoer is.

Verskillende reaksiebuffers word in die literatuur vir ADH-ekstrahering uit weefsel aangegee. In hierdie studie is van die volgende ekstraksiemediums gebruik gemaak:

$0,01 \text{ mol.dm}^{-3}$ TRIS-HCl pH 7,4 (soos Shimomura & Beevers 1983a), $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ K-fosfaatbuffer pH 8,9 met $0,4 \text{ mol.dm}^{-3}$ sukrose (soos Leblová 1978b, behalwe dat haar medium nie sukrose bevat het nie); en $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ TRIS-HCl pH 7,5 met $0,4 \text{ mol.dm}^{-3}$ sukrose. Laasgenoemde buffer is die algemene ekstraksiemedium wat in hierdie studie gebruik is. Weens die moontlikheid van ADH-remming deur chloriedione in die buffer, is die fosfaatbuffer en die meer verdunde trisbuffer ook vir ekstrahering gebruik en die latere bespreking sal aandui dat die genoemde ekstraksiebuffers tot soortgelyke aktiwiteit aanleiding gee.

3.2.2.6 Sitosoliese malaatdehidrogenase (MDH_{cyt})

Die MDH_{cyt} is op dieselfde ekstrakte as vir ADH bepaal. Die tegniese besonderhede word onder 5.5.1 (p 141) aangegee.

3.2.3 Metabolietekstrahering

'n Algemene metode vir die ekstrahering van metaboliete (Lowry & Passonneau 1972) is gevolg. Sade is vinnig oopgesny, die embryo's vinnig verwyder en dadelik in vloeistikstof gevoeg. Sodoende is embryo-vir-embryo na vloeistikstof oorgedra totdat 'n totaal van 25 embryo's in vloeistikstof versamel is. Na weging is die embryo's met 'n vysel en stamper (-5°C) in 4 cm^3 $3,0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ perchloorsuur- $1\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ EDTA (PCA-EDTA) vir 2 minute fyngemaal en met behulp van 10 cm^3 PCA-EDTA na 'n maatsilinder oorgedra. Vir verdere kwantitatiewe oordrag is yskoue gedeïoniseerde water gebruik om 'n totale volume van 30 cm^3 ekstrak te gee.

Nadat die ekstrak (4°C) vir 5 minute geroer is, is dit teen $40\ 000\text{ g}$ (4°C) vir 20 minute gesentrifugeer. Van die bovloeistof is $10,0\text{ cm}^3$ onttrek soos reeds beskryf (3.2.1) en die pH daarvan na 7,0 ingestel met behulp van neutraliseringsbuffer ($20\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH - $4\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ imidasool - $40\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl). Die volume neutraliseringsbuffer wat gebruik is, is genoteer.

Die geneutraliseerde alikwot is teen $40\ 000\text{ g}$ vir 10 minute geswaai, die bovloeistof is oor plastiek-"polytop"-buis verdeel, by -10°C geberg en binne 2 weke vir bepaalde metaboliete geanaliseer. Drie ekstrakte is vir elke behandeling gemaak.

3.2.4 Ensimatiese bepaling van metaboliete

3.2.4.1 Etanol

Die etanolkonsentrasie van die metabolietekstrakte is ensimaties, volgens voorskrifte, met behulp van 'n analisestel vanaf Boehringer (176290) bepaal.

3.2.4.2 D-glukose en D-fruktose

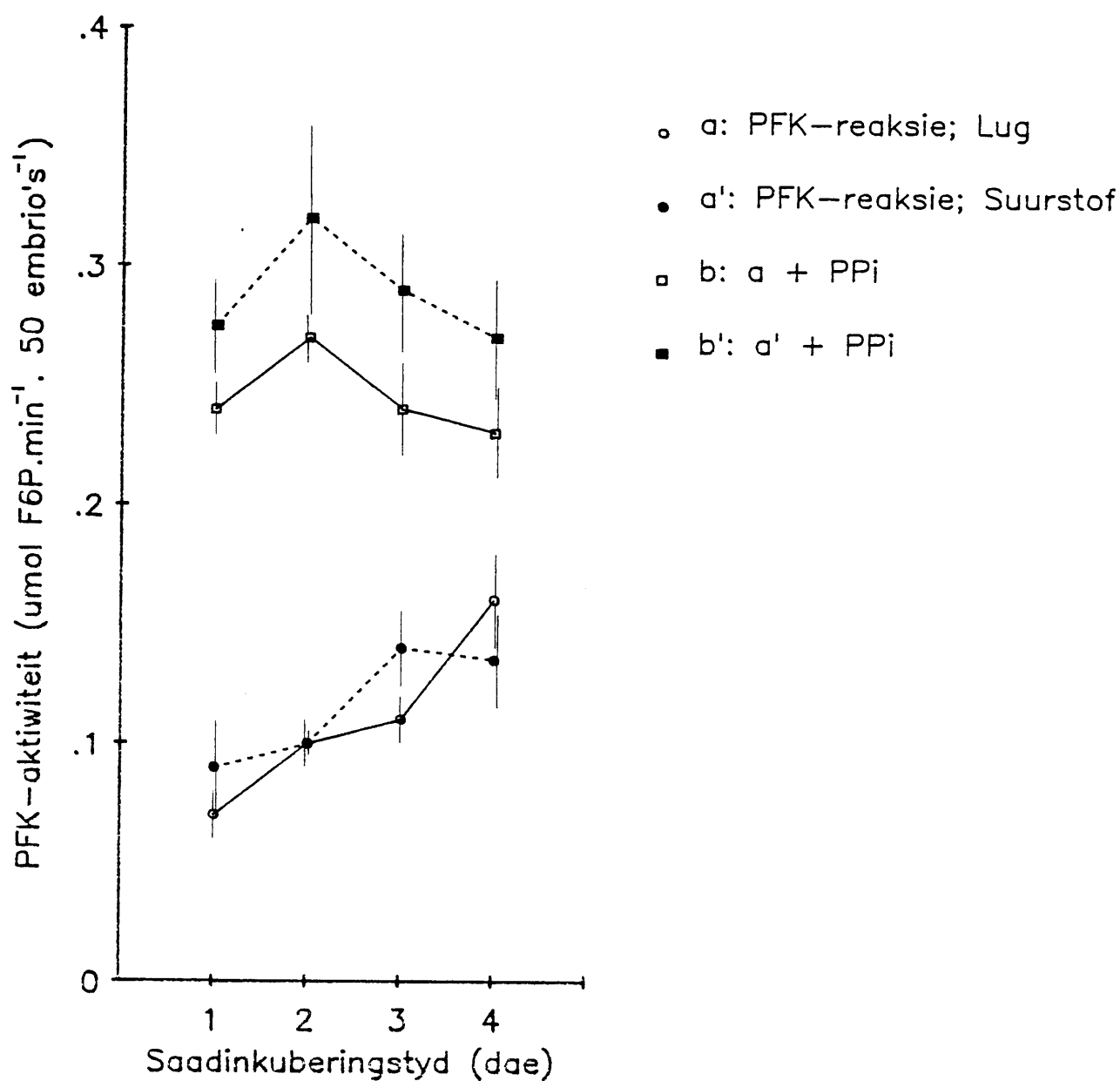
Die glukose- en fruktosekonsentrasies van die metabolietekstrakte is ensimaties, volgens voorskrifte, met behulp van 'n analisestel vanaf Boehringer (139 106) bepaal.

3.2.4.3 Piruvaat

Czok en Lamprecht (1974) se metode vir piruvaatbepaling is gebruik. 'n Reaksiemengsel is opgemaak (finale volume 2,06 cm³) bestaande uit die volgende verbindings met finale konsentrasies soos aangedui: 194 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ triëtanolamienbuffer pH 7,6; 1,94 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ EDTA; 0,117 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ NADH en ekstrak. Die absorbansie (A_1) by 340 nm (25°C) is bepaal. Dit het konstant oor tyd gebly. Hierna is 20 mm³ verdunde LDH-oplossing (1:20 v/v) bygevoeg en die absorbansie is weer na 5 minute bepaal; laasgenoemde A-waardes (A_2) het konstant gebly oor tyd. Die verdunde LDH-oplossing is berei uit laktaatdehidrogenase (LDH: Boehringer 107 077; 10 mg proteïen. $\cdot\text{cm}^{-3}$ (NH₄)₂SO₄-suspensie; 550 U.mg⁻¹).

3.2.4.4 D-glukose-6-fosfaat en D-fruktose-6-fosfaat

Bepaling van D-glukose-6-fosfaat en D-fruktose-6-fosfaat is volgens Lang & Michal (1974) se metode uitgevoer. In 'n finale volume van 2,07 cm³ het die volgende voorgekom teen finale konsentrasies soos aangedui: 193 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ triëtanolamienbuffer pH 7,6; 0,193 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ NADP; 4,83 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ MgCl₂ en ekstrak. Die absorbansie (A_1) by 340 nm (25°C) is bepaal en dit het konstant oor tyd gebly: Hierna is 10 mm³ G6PDH-suspensie (glukose-6-fosfaatdehidrogenase: Boehringer 127 671; 5 mg proteïen. $\cdot\text{cm}^{-3}$ (NH₄)₂SO₄-suspensie; 140 U.mg⁻¹) bygevoeg en die absorbansie (A_2) na 5 minute afgelees. A_2 het konstant met tyd gebly. Daarna is 20 mm³ PGI-suspensie (bottel 3 van die glukose/fruktose analisestel van Boehringer 139 106 is gebruik) bygevoeg en die absorbansie (A_3) is na 5 minute bepaal.



Figuur 3.1. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die fosfofruktokinase (PFK)-aktiwiteit van *Strelitzia juncea*-embrio's wat na verskillende tye van saadinkubering (Februarie 1983 saadlot) geëkstraheer is (a, a'). Na bepaling van die PFK-reaksietempo, is pirofosfaat (PP_i) by dieselfde reaksiemengsels gevoeg en die reaksietempoⁱ weer bepaal (b, b').

3.3 BEREKENINGS

3.3.1 PFK, PFP en aldolase

Die aktiwiteit is bereken as:

$$f(A^*, E, F, G, I, J) = \frac{(\tan A^*)^{-1} \times E \times G \times I \times 0,0096 \times 0,16077 \times 50}{2 \times F \times J} \mu\text{mol.min.}^{-1} \text{ 50 embryo's}^{-1}$$

waar die simbole hulle gewone betekenis het (kyk 2.6, p 13) en waar die absorbansieskaal 0,2A en die tydskaal 50 s.cm⁻¹ is.

Die syfer "2" verskyn in die deler omdat 2 μmol NADH vir elke μmol substraat in die essaiëringsstelsel gevorm word.

3.3.2 PK en ADH

Die aktiwiteit is soos hierbo bereken behalwe dat "2" uit die deler weggelaat is; die deler is dus slegs (F x J).

3.3.3 Etanol- en piruvaatinhoud

Etanolinhoud is bereken uit:

$$f(\Delta A, E, F, G, I, J, K) = \frac{\Delta A \times E \times G \times I \times 0,16077 \times 50 \mu\text{mol} \cdot 50 \text{ embryo's}^{-1}}{2 \times F \times J}$$

waar ΔA die absorbansieverskil tussen A₁ en A₂ is (kyk metode).

Piruvaatinhoud is bereken op soortgelyke wyse as wat etanolinhoud bereken is, behalwe dat die deler slegs (F x J) was omdat slegs 1 μmol NADH per μmol piruvaat in die essaiëringsstelsel van piruvaat geoksideer word.

3.3.4 D-glukose- en D-fruktose-inhoud

Soos vir piruvaat bereken. Vir glukose was ΔA = (A₂ - A₁) en vir fruktose was ΔA = (A₃ - A₂). Die betekenis van A₁, A₂ en A₃ is net soos in die voorgeskrewe analise vir die glukose/fruktose analisestel van Boehringer (139 106).

3.4 RESULTATE EN BESPREKING

3.4.1 Ensiemaktiwiteite van die sitosol

Aangesien die ekstraksiemediums gewoonlik sukrose as osmotikum bevat het, word aanvaar dat die waargenome ensiemaktiwiteite verteenwoordigend van die sitosol is. Die G6PDH- en 6PGDH- ensieme wat ook hoofsaaklik sitosolies is, word egter afsonderlik in hoofstuk 3 bespreek vanweë die vermeende belangrikheid van die PP-weg in saaddormansie.

3.4.1.1 Fosfofruktokinase (PFK) en anorganiese pirofosfaat: D-fruktose-6-fosfaat: fosfotransferase (PFP)

Die PFK-aktiwiteit vir *Strelitzia juncea* embrio's het 'n geleidelike styging oor die vier saadinkuberingsdae getoon (Figuur 3.1a en a') en die waardes was soortgelyk aan dit wat vir die pentosefosfaatwegensiem G6PDH gevind is (Figuur 4.1, p 80). Daar was weinig verskil tussen lug- en suurstofsade maar dit moet in aanmerking geneem word dat die resultate van Figuur 3.1 verkry is met 'n saadlot wat slegs 40% kieming na 14 dae suurstofinkubering gegee het.

In ooreenstemming met ander werkers se bevindings vir plantweefsel (volgens die oorsig deur Turner & Turner 1980) het AMP geen verhoging van die ensiemaktiwiteit veroorsaak nie (resultate nie getoon nie). Dit moet egter in aanmerking geneem word dat die teenwoordigheid van sulfaatione in die medium volgens Hofmann & Kopperschläger (1982) die stimulering van PFK deur allosteriese effektors kan beperk. Omdat die analitiese ensieme in hierdie studie nie gedialiseer is nie, was daar volgens berekening $11 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ sulfaatione in die reaksie-medium (3.2.2.1).

Verskeie ander verbindings is by die PFK-reaksiemengsels gevoeg en die uitwerking daarvan op die ensiemaktiwiteit is waargeneem. Sodoende is vasgestel dat fosfaatbyvoeging geen stimulerende uitwerking gehad het nie, maar dat die byvoeging van pirofosfaat wel tot verhoogde aktiwiteit gelei het (Figuur 3.1b en b').

Tabel 3.1 Die fosfofruktokinase (PFK)- en anorganiese pirofosfaat: D-fruktose-6-fosfaat: fosfotransferase (PFP)-aktiwiteit van *Strelitzia juncea* embryo-ekstrakte na verskillende tye van saadinkubering (Saadlot van Mei 1984)

Saad-inkuberingstyd (dae)	Reaksiemengsel gebruik	Ensiemaktiwiteit as $\mu\text{mol fruktose-6-fosfaat}\cdot\text{min.}^{-1} 50 \text{ embryo's}^{-1}$ van embryo-ekstrakte							
		Lugsade: Eksperiment:			Suurstofsade: Eksperiment:			Gemengde ekstrak van lugsade + suurstofsade. Eksperiment C.	
		A	B	C	A	B	C	Eksperimenteel	Verwagte numeriese som
1	PFK	-	-	0,159	-	-	0,177	0,350	0,336
	PFK + PP_i	0,29±0,02 ^a	-	0,246	0,45±0,02	-	0,290	0,469	0,536
	PFK+ PP_i + fr2,6P ₂	-	-	1,484	-	-	1,704	3,194	3,188
	PFP	-	-	0,192	-	-	0,215	0,340	0,407
	PFP+fr2,6P ₂	-	-	1,463	-	-	1,704	3,510	3,167
2	PFK	-	0,09±0,01	-	-	0,07±0,03	-	-	-
	PFK + PP_i	0,31±0,04	0,26±0,02	-	0,40±0,01	0,27±0,02	-	-	-
3	PFK	-	0,43±0,03	-	-	0,34±0,03	-	-	-
	PFK + PP_i	0,31±0,02	0,45±0,03	-	0,42±0,04	0,43±0,03	-	-	-
4	PFK	-	0,38±0,03	0,221	-	0,41±0,03	0,258	0,567	0,479
	PFK + PP_i	-	0,41±0,02	0,321	0,46±0,03	0,36±0,02	0,365	0,732	0,686
	PFK+ PP_i + fr2,6P ₂	-	-	1,635	-	-	1,689	3,058	3,324
	PFP	-	-	0,350	-	-	0,345	0,695	0,695
	PFP+fr2,6P ₂	-	-	1,800	-	-	1,943	3,811	3,743
4	PFK	-	-	0,175	-	-	0,241	-	-
	PFK + KPB	-	-	0,148	-	-	0,211	-	-
	PFK+KPB+fr2,6P ₂	-	-	0,274	-	-	0,280	-	-

a: gemiddelde ± standaard afwyking van 3 bepalinge van een ekstrak. Syfers sonder standaardafwykings verteenwoordig die gemiddeld van twee bepalinge op een ekstrak. PP_i = pirofosfaat; KPB = kaliumfosfaatbuffer; fr2,6P₂ = D-fruktose-2,6-bisfosfaat; Eksperimente A en C is met 0,1 mol.dm⁻³ TRIS-HCl pH 7,4 as ekstraheringsmedium uitgevoer. Vir eksperiment B was 0,1 mol.dm⁻³ k-fosfaat pH 7,4 gebruik. Albei mediums het 0,4 mol.dm⁻³ sukrose bevat. Eksperimente A, B en C is in chronologiese volgorde uitgevoer, met omtrent 6 maande tydsintervalle.

Oor die vier inkuberingsdae gesien, was die neiging dat pirofosfaatbyvoeging tot 'n hoër ensiemaktiwiteit in die geval van die suurstofsade as vir die lugsade gelei het.

In opvolgekseperimente met 'n kiemkragtiger saadlot is vasgestel dat PFK-aktiwiteit in die teenwoordigheid van pirofosfaat hoër was vir die embryo's van suurstofsade as vir dié van lugsade (Tabel 3.1, eksp. A; vgl. waardes vir lugsade en suurstofsade vir inkuberingsdae 1, 2 en 3). Weer eens kon geen opvallende styging in aktiwiteit met toenemende inkuberingstyd van die sade verkry word nie.

Waar die vorige twee eksperimente met trisbuffer as ekstraheringsmedium uitgevoer is, is fosfaatbuffer vervolgens gebruik (Tabel 3.1, eksp. B; vgl. lug- en suurstofsade vir inkuberingsdae 2, 3 en 4). Hierdie ekstrakte het stimulering van ensiemaktiwiteit deur PP_i slegs vir inkuberingsdag 2 getoon maar nie vir dae 3 en 4 nie. Vir laasgenoemde twee dae was die aktiwiteit voor PP_i -byvoeging alreeds relatief hoog nl. tussen $0,34$ en $0,45$ $\mu\text{mol fruktose-6-fosfaat}\cdot\text{min.}^{-1}50$ embryo's $^{-1}$.

Uit die beperkte aantal eksperimente het dit dus geblyk dat AMP en P_i nie PFK van trismediumekstrakte gestimuleer het nie maar wel PP_i . Stimulering deur PP_i kon nie verkry word vir die PFK van fosfaatmediumekstrakte op inkuberingsdae 3 en 4 nie.

Hierna is 'n literatuurstudie onderneem waaruit dit geblyk het dat die stimulerende uitwerking van pirofosfaat moontlik die gevolg kon wees van die teenwoordigheid van PFP in die ru-ekstrakte. Die PFP-ensiem word geaktiveer deur die teenwoordigheid van D-fruktose-2,6-bisfosfaat maar hierdie verbinding het geen uitwerking op die PFK-aktiwiteit nie (Kruger *et al.* 1983). Die belangrikste verskil in die reaksiemengsels vir die twee ensieme is dat die PFK-reaksiemengsel ATP as fosforileringsagens van D-fruktose-6-fosfaat bevat, terwyl die PFP-reaksiemengsel PP_i as fosforileringsagens bevat (kyk 3.2.2.1 en 3.2.2.2).

Vervolgens is die moontlikheid dat die stimulering van PFK-aktiwiteit deur PP_i moontlik 'n manifestering van PFP-aktiwiteit van die ekstrakte is, ondersoek. Trismediumekstrakte van die embrio's van *S. juncea* sade (dae 1 en 4 van inkubering) is berei en die invloed van PP_i en D-fruktose-2,6-bisfosfaat ($fr26P_2$) op die PFK- en PFP-aktiwiteite is nagegaan (kyk Tabel 3.1; eksp. C; vgl. lug- en suurstofsade vir dag 1 en 4).

Soos reeds vir trismediumekstrakte bespreek (Figuur 3.1 en Tabel 3.1; eksp. A), het die byvoeging van PP_i by die PFK-reaksiemedium weer tot 'n verhoging in die reaksietempo gelei. Nog 'n verdere verhoging in aktiwiteit (negevoudig) is verkry deur die byvoeging van $fr26P_2$ tot die reaksiedium. Hierdie uitwerking van $fr26P_2$ kon slegs verkry word indien PP_i in die PFK-reaksiemedium teenwoordig was. Indien aanvaar word dat $fr26P_2$ nie PFK-aktiwiteit stimuleer nie, soos hier gevind is en ook volgens literatuur wat deur Wu *et al.* (1983) gerapporteer is, kan die afleiding gemaak word dat die stimulerende uitwerking van PP_i die gevolg is van PFP-aktiwiteit in die ekstrakte.

Eksperimenteel is vasgestel dat die ekstrakte wel PFP-aktiwiteit besit het en is daar 'n goeie ooreenkoms tussen die aktiwiteit wat met PFK-reaksiemedium + PP_i + $fr26P_2$ verkry is en dit wat met PFP-reaksiemedium + $fr26P_2$ verkry is (Tabel 3.1; eksp. C). Hierdie bevinding dien as ondersteuning van die afleiding dat die aktiwiteitstoename wat deur PP_i -byvoeging by PFK-reaksiemediums verkry is, inderwaarheid die gevolg van die inisiëring van die PFP-gekataliseerde reaksie was.

Volgens die oorsig van Cseke *et al.* (1984), is daar 'n komplekse interaksie tussen PFP en PFK deurdat die een ensiem na die ander omgeskakel kan word deur metabolietkatalisering ("metabolite-mediated catalyst conversion"). Meer onlangse werk (Kruger & Dennis 1985) dui egter daarop dat hierdie siening foutief is en die gevolg is van die gebruikmaking van gekontameneerde reagense.

Hoë fr26P₂-konsentrasies lei tot die stimulering van PFP en die remming van fruktosebisfosfatase en sodoende word bepaal of glikolise of glukoneogenese die oorwegende metaboliese roete sal wees. Die sintese en afbraak van fr26P₂ staan onder komplekse beheer van sekere glikolitiese metaboliete.

Dit blyk dat die embryo's van suurstofsade sowel 'n hoër PFK- as 'n hoër PFP-aktiwiteit as die embryo's van lugsade gehad het. Vir elke behandeling het gegeld dat die PFP-aktiwiteit (sonder fr26P₂ stimulering) hoër as die PFK-aktiwiteit was. Indien die PFK-waardes van Tabel 3.1 omgewerk word na 'n varsmassabasis, stem die waardes goed ooreen met die hoogste PFK-waardes wat Kruger *et al.* (1983) vir die 4-dae-oue saailinge van *Ricinus communis* gevind het. Ook vergelyk die waardes op 'n varsmassabasis van die fr26P₂-gestimuleerde PFP-aktiwiteit van die *Strelitzia juncea*-embryo's (sowat 4,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) goed met die hoogste waarde wat Kruger *et al.* (1983) gevind het (6,516 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), indien dit in aanmerking geneem word dat hulle saailingweefsel gebruik het.

Die aktiwiteit wat met PFK-reaksiemengsels +PP_i verkry is (Tabel 3.1; eksp. A en eksp. C), verteenwoordig na aanleiding van die voorafgaande bespreking, na alle waarskynlikheid, die gesamentlike aktiwiteit van PFK en PFP. Dit is egter opmerklik dat die gesamentlike aktiwiteit vir elke behandeling laer is as die som van die afsonderlike PFK- en PFP-aktiwiteite. Hierdie verskynsel kan nie toegeskryf word aan 'n beperkende substraat-konsentrasie nie, want in die teenwoordigheid van fr26P₂ word veel hoër aktiwiteite verkry wat oor 'n paar minute reaksietyd 'n reglynige verloop het. Ander parameters soos bv. die feit dat die PFK-reaksiemengsel by pH 7,2 gebuffer is en vir die PFP-reaksiemengsel van 'n pH 7,8 buffer gebruik gemaak word, kan die rede vir die verskynsel wees. Hierdie aspek is nie verder ondersoek nie.

'n Gelyke vermenging van lug- en suurstofekstrakte van eksp. C (Tabel 3.1; laaste twee kolomme) het tot aktiwiteite gelei

wat min of meer in ooreenstemming was met die verwagte numeriese som van die afsonderlike aktiwiteite van lug- en suurstofsade se embryo's. Die eksperimentele waardes was nie konsekwent hoër of laer as die verwagte waardes nie en die afleiding word gemaak dat die verskil in aktiwiteite van suurstof- en lugsade se embryo's waarskynlik nie die gevolg van aktiveerders in die suurstofsade se ekstrakte, of remstowwe in die lugsade se ekstrakte is nie.

Laasgenoemde moontlikhede is veral van belang in 'n studie van PFK en PFP aangesien dit goed bekend is dat hierdie ensieme oor komplekse regulerende eienskappe beskik en dat verskeie metaboliëte 'n invloed op hulle aktiwiteit uitoefen (Turner & Turner 1980; Kombrinck *et al.* 1984). So byvoorbeeld veroorsaak 'n lae konsentrasie van 4 nmol.cm^{-3} PEP volledige inhibisie van PFK volgens Turner & Turner (1980) se literatuuroorsig, terwyl vars ertjiesade sowat 100 nmol.cm^{-3} PEP kan bevat. In hierdie studie is metaboliëte van die weefsel aansienlik verdun (ca 0,45 g weefsel met 40 cm^3 medium; dus minstens 90 keer verdunning van die weefselvloeistof) maar die moontlikheid is nog nie uitgesluit dat die waargenome ensiemaktiwiteite deur die metaboliëte in die ekstrakte beïnvloed kon word nie. Hierby moet egter vermeld word dat 'n goeie lineêre verband tussen ekstrak-"konsentrasie" en ensiemaktiwiteit verkry is.

Een van die metaboliëte wat in die PFK- en PFP-gekataliseerde reaksies en verwante reaksies 'n belangrike rol as deelnemende metaboliëte en/of as reguleerder speel, is fosfaat. Daarom is die bevinding dat by fosfaatbufferekstrakte van dag 3 en dag 4 sade geen verhoging in aktiwiteit deur die byvoeging van PP_i by PFK-reaksiemengsels gevind is nie, noemenswaardig (Tabel 3.1; eksp. B, soos reeds bespreek). Verder is dit opmerklik dat fosfaatbyvoeging (P_i) as kaliumfosfaatbuffer pH 7,4 (finale konsentrasie van $0,67 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ kaliumfosfaat) by PFK-reaksiemengsels eerder tot 'n verlaging as 'n verhoging in aktiwiteit van die trismediumekstrakte gelei het (Tabel 3.1; eksp. C; die laaste 3 rye data). Die verdere byvoeging van fr26P₂ het

tot 'n effense verhoging in aktiwiteit bo dié van die PFK-aktiwiteit (sonder byvoegings) gelei.

Fosfaat het 'n remmende invloed op die PFP-reaksie (dus van D-fruktose-1,6-bisfosfaatvorming) in die teenwoordigheid van fr26P₂ (Kombrinck *et al.* 1984), maar aan die ander kant het fosfaat 'n stimulerende uitwerking op PFK-aktiwiteit en dit werk die remming van PFK deur PEP teë (volgens oorsig deur Turner & Turner 1980). Op grond hiervan is dit verstaanbaar dat die byvoeging van PP_i en fr26P₂ nie 'n verhoging in aktiwiteit tydens die PFK-bepaling van die fosfaatekstrakte veroorsaak het nie. Die gebrek aan stimulering van aktiwiteit deur fosfaatbyvoeging tydens die PFK-bepaling van trismediumekstrakte kan moontlik impliseer dat daar geen PEP-remming van PFK voorgekom het nie en dat die teenwoordigheid van ander ione in die medium reeds voldoende was vir PFK-stimulering.

Die byvoeging van fr26P₂ by PFK- of PFP-reaksiemengsels sonder substraat (D-fruktose-6-fosfaat) het geen uitwerking gehad nie.

Oor die geheel gesien, blyk dit dus dat *S. juncea*-embrio's PFK- en PFP-aktiwiteit het en dat laasgenoemde se aktiwiteit die hoogste van die twee is. Oor die vier inkuberingsdae is daar wel 'n styging in die PFK- en PFP-aktiwiteit waargeneem. Sowel die PFK- as die PFP-aktiwiteit van die embrio's van suurstofsade is reeds op dag 1 hoër as dié van lugsade, alhoewel kieming van suurstofsade eers op dag 5 'n aanvang neem. PFP-aktiwiteit is nie op dae 3 en 4 van inkubering waarneembaar indien fosfaatbuffer as ekstraheringsmedium gebruik word nie.

3.4.1.2 Aldolase

Vir die aldolase-bepalings (Tabel 3.2) is van 'n relatief swak saadlot gebruik gemaak wat maksimaal 40% kieming na 14 dae van suurstofbehandeling bereik het. Daar kan dus nie veel daaruit afgelei word dat die aldolase-aktiwiteit van die embrio's van lug- en suurstofsade nie van mekaar verskil het nie. Oor die

Tabel 3.2 Die aldolase- en piruvaatkinase-aktiwiteit van die embrio's van lug- en suurstof-behandelde sade van *Strelitzia juncea*

Inkuberings-tyd (dae)	Aldolase-aktiwiteit; $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 50\text{ emb.}^{-1}$		Piruvaatkinase-aktiwiteit; $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 50\text{ emb.}^{-1}$	
	Lugsade	Suurstofsade	Lugsade	Suurstofsade
1	3,202±0,410 ^a	3,222±0,120	2,018±0,065	2,358±0,103
2	3,134±0,182	3,228±0,372	1,675±0,155	2,084±0,099
3	2,770±0,330	2,818±0,434	2,515±0,119	2,357±0,081
4	3,216±0,542	2,710±0,380	2,421±0,365	2,562±0,350

a : gemiddeld ± standaardafwyking: bepalinge op drie ekstrakte

vier inkuberingsdae het die aktiwiteit om $3 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 50 embrio's⁻¹ gewissel, wat tussen 10 en 20 keer hoër as die PFK-aktiwiteit van die lugsade is. Dit kan algemeen aanvaar word dat die aldolase-aktiwiteit van weefsel veel hoër as die PFK-aktiwiteit is (Turner & Turner 1980).

Alhoewel aldolase in veel hoër konsentrasie as PFK voorkom, speel dit 'n belangrike rol in die regulering van die glikolise-tempo. D-fruktose-1,6-bisfosfaat is 'n positiewe effektor vir PFK, maar hierdie verbinding dien ook as substraat vir aldolase. El-Badry *et al.* (1973) het volgens Davies (1984) dan ook 'n sterk verband tussen aldolase-konsentrasie en PFK-aktiwiteit gevind.

3.4.1.3 Piruvaatkinase (PK)

Soos reeds by die metode vir PK-bepalings gemeld (3.2.2.4), kon slegs baie lae aktiwiteit met die konvensionele bepalingstegniek (Aust *et al.* 1975) verkry word, alhoewel onlangse werk op plantweefsel met soortgelyke reaksiemengsels baie hoër aktiwiteit tot gevolg gehad het (Baysdorfer & Bassham 1984). Die gewysigde metode wat volgens Perl (1982c) toegepas en hier aangewend is, het egter goeie aktiwiteit gelewer. In laasgenoemde bepaling-metode word Co^{2+} -ione gebruik wat volgens Perl (1982c) die piruvaatkinase stimuleer. Volgens die standaardbronne oor PK (Bergmeyer *et al.* 1974) kan Co^{2+} as plaasvervanger vir Mg^{2+} dien.

Volgens gegewens wat met die Co^{2+} -bevattende reaksiemengsel ingewin is (Tabel 3.2), was die PK-aktiwiteit op dae 1 en 2 van saadinkubering hoër in die embrio's van suurstofsade as die van lugsade. Alhoewel die PK-aktiwiteit laer as dié van aldolase was, was dit nogtans veel hoër as die PFK-aktiwiteit. Geen duidelike toenemende tendense in PK-aktiwiteit kon met toenemende inkubering uit die beskikbare data afgelei word nie.

Piruvaatkinase word naas PFK as een van die regulerende ensieme van glikolise beskou vanweë die komplekse regulerende eienskappe waaroor dit beskik en omdat die reaksie onder fisiologiese

toestande grotendeels onomkeerbaar is (Turner & Turner 1980).

In die tydperk voor radikulaverskyning, was die PK-aktiwiteit in die embryo's van *Cicer arietinum*-sade hoër as die PFK- en aldolase-aktiwiteit (Burguillo & Nicolas 1974), maar geen duidelike patroon in ensiemaktiwiteit tydens hierdie periode is te sien nie.

3.4.1.4 Alkoholdehidrogenase (ADH)

Omdat *Strelitzia juncea* sade deur die toediening van suurstofgas tot kieming geïnduseer kan word, bestaan die moontlikheid dat aërobiese respirasie onder 'n normale lugregime beperkend is, en moet die bestaan van 'n aktiewe fermentasiesisteem as 'n sterk moontlikheid beskou word. Gevolglik is op die embryo-ADH-aktiwiteit van lug- en suurstofsade ingegaan om vas te stel of daar nie moontlik 'n groter mate van fermentasie by die embryo's van lugsade as dié van suurstofsade plaasvind nie.

Veral twee aspekte in verband met die ADH-aktiwiteit is ondersoek, naamlik die invloed van die samestelling van die ekstraksiemEDIUM en die moontlike teenwoordigheid van 'n ADH-remstof in die ekstrakte.

Verskeie mediums word volgens die literatuur vir die ekstrahering van ADH gebruik. In hierdie studie is die aanvanklike werk op *Strelitzia juncea* met 'n sukrose-bevattende $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ TRIS-HCl buffer uitgevoer, maar aangesien 'n latere literatuurstudie dit uitgewys het dat ADH deur Cl^- -ione gerem word (oorsig deur Leblová 1978a en 1979b), is ander ekstraksiemEDIUMS ook gebruik.

Uit die beskikbare gegewens wat ingewin is (Tabel 3.3), kan afgelei word dat die volgende drie ekstraksiemEDIUMS ewe doeltreffend vir die ekstrahering van ADH was:

$0,01 \text{ mol.dm}^{-3}$ TRIS-HCl pH 7,4 (soos Shimomura & Beevers 1983a);
 $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ kaliumfosfaatbuffer- $0,4 \text{ mol.dm}^{-3}$ sukrose pH 8,9
 (soos Leblová 1978b, behalwe dat haar medium nie sukrose bevat het nie); en

Tabel 3.3 Die invloed van die samestelling van die ekstraksiebuffer op die ADH-aktiwiteit van die embryo's van lug- en suurstofbehandelde sade van *Strelitzia juncea*

Inkuberingstyd (dae)	Saadbehandeling	ADH-aktiwiteit ($\mu\text{mol NADH gevorm.min.}^{-1} 50 \text{ emb.}^{-1}$) geëkstraheer met:		
		TRIS-SUK ^a	TRIS ^b	KPS ^c
0 ^d	-	7,97±0,17 ^e	7,95±0,17	6,87±0,49
2	lug	8,22±0,70	8,93±0,82	-
	suurstof	8,27±0,71	9,19±0,23	-
3	lug	8,56±0,76	8,26±0,63	-
	suurstof	8,18±0,72	-	-
4	lug	8,73±0,54	-	8,79±0,35
	suurstof	8,18±0,51	-	8,41±0,71

a 0,1 mol.dm⁻³ TRIS-HCl-0,4 mol.dm⁻³ sukrose; pH 7,4

b 0,01 mol.dm⁻³ TRIS-HCl; pH 7,5

c 0,1 mol.dm⁻³ Kaliumfosfaatbuffer-0,4 mol.dm⁻³ sukrose; pH 8,5

d embryo's van droë saad, onbehandel

e gemiddeld ± standaardafwyking vir bepaling op 3 ekstrakte

0,1 mol.dm⁻³ TRIS-HCl-0,4 mol.dm⁻³ sukrose; pH 7,5.
 Dit blyk dus dat die Cl⁻-ione wat in die TRIS-HCl ekstraksie-
 buffers voorgekom het, nie remmend opgetree het nie. Wat die
 ADH-aktiwiteit van die lugdroë saad se embrio's betref, was
 die aktiwiteit wat met die fosfaat-sukrose buffer verkry is,
 laer as wat met die TRIS-buffers verkry is. Hierdie aspek is
 nie verder ondersoek nie.

ADH-ekstrakte wat vir verskillende tye by 4°C gehou is, het 'n
 groot tydsafhanklike verlies aan ADH-aktiwiteit getoon, tensy
 daar DTT in die ekstraksiemedium teenwoordig was (Figuur 3.2).
 Soortgelyke resultate is ook vir inkuberingsdae 2, 3 en 4
 se ekstrakte verkry (resultate nie getoon nie). Die teenwoor-
 digheid van DTT het tot veel kleiner verliese in ADH-aktiwiteit
 met tyd gelei en dit geld vir sowel lug- as suurstofsade oor die
 vier inkuberingsdae. Bogenoemde waarnemings geld vir die terug-
 waartse ADH-reaksie (NADH-vorming), maar soortgelyke resultate
 is ook vir die voorwaartse ADH-reaksie (NADH-gebruik) gekry
 (resultate vir laasgenoemde nie getoon nie). In sommige gevalle
 is argongas deur 'n alikwot van die ekstrakt gestuur en daarna is
 dit onder argon geberg, maar dit het geen verskil aan die waar-
 genome ADH-aktiwiteit gemaak nie (resultate nie getoon nie).

Die voordelige uitwerking van DTT hou moontlik verband met die
 bevindings van Shimomura & Beevers (1983a) wat vervolgens toe-
 gelig sal word. Volgens genoemde outeurs is die ADH-aktiwiteit
 van *Oryza sativa*-saadekstrakte stabiel met tyd maar die ADH-
 aktiwiteit van ekstrakte van die saailingorgane toon 'n tydsaf-
 hanklike afname as gevolg van 'n remstof wat in die ekstrakte
 voorkom. Die inaktiverende uitwerking van die remstof kan voor-
 kom word deur gebruikmaking van DTT in die ekstraksiemediums of
 deur die plante onder anaërobiese toestande te kweek. Moontlik
 funksioneer die remstof *in vivo* as 'n reguleerder van ADH en
 volgens die outeurs kom die remstof waarskynlik apart van die
 ADH-ensiem gekompartementeerd voor. Die remstof kom hoofsaaklik
 gebonde aan endoplasmiese retikulum-membrane voor, terwyl ADH
 slegs in die sitosoliese fraksie aangetref word (Shimomura & ..

Beevers 1983b). Die algemene ADH-profiel vir inkuberende en kiemende sade (Leblová 1978a soos reeds onder 3.1 bespreek), word ook vir *Oryza sativa* gevind maar indien DTT-bevattende ekstraksiemediums gebruik word, word volgens Shimomura & Beevers (1983a) 'n heeltemal ander profiel verkry. Op hierdie stadium is die indruk dat die "algemeen aanvaarde" ADH-profiel 'n artifakt as gevolg van ekstraheringstegniek kan wees.

Uit bogenoemde bespreking kom dit na vore dat resultate wat met ru-ekstrakte ingewin word, met omsigtigheid geïnterpreteer moet word. Wat die resultate van Figuur 3.2 betref, moet in gedagte gehou word dat die ekstraksiemedium $0,4 \text{ mol.dm}^{-3}$ sukrose bevat het en dat alhoewel slegs beperkte vrystelling van 'n organel-gebonde remstof as gevolg daarvan kon plaasvind, dit nie noodwendig sou verhoed dat endoplasmiese retikulummembrane of geassosieerde verbindings daarvan ná afloop van die toegepaste sentrifugeringsprosedure in die bovloeistof van die ru-ekstrakte voorkom nie. Geen verskille in die ADH-aktiwiteit van eksosmotiese of endosmotiese ekstraksiemediums kon gevind word nie (Tabel 3.3).

Tersaaklik is ook dat die bovloeistof van *Strelitzia juncea* ru-ekstrakte oor reduserende "vermoëns" beskik sodanig dat dit die spontane reduksie van DCIP kan bewerkstellig (kyk 5.3.3.1(b), p 110). Shimomura & Beevers (1983b) het bevind dat dit juis die reduserende eienskappe van DTT is waardeur dit die inaktivering van die ADH-remstof voorkom. Dit is dus moontlik dat daar in die geval van *S. juncea* 'n ADH-remstof kan wees maar dat die uitwerking daarvan nie ten volle tydens normale essaiëringsprosedures gerealiseer word nie vanweë die samestelling van die bovloeistof.

Teen hierdie agtergrond gesien, kan die resultate van Figuur 3.2 met voorbehoud geïnterpreteer word as dat dit dui op die tydsafhanklike inaktivering van ADH in ekstrakte deur 'n remstof waarvan die remmende invloed deur DTT voorkom word. In die gevalle waar DTT nie in die mediums voorgekom het nie, het die ekstrakte van suurstofsade 'n ietwat hoër ADH-aktiwiteit gehad,

maar met die teenwoordigheid van DTT in die mediums het die ADH-aktiwiteite van lug- en suurstofsade goed ooreengestem en was dit eenders vir lug- en suurstofsade. In die geval van *Oryza sativum* daarenteen, was die saadekstrakte stabiel en het die saailingekstrakte slegs inaktiveerder bevat indien die saailinge onder aërobiese toestande gekweek is (Shimomura & Beevers 1983a). Genoemde outeurs het ook ander moontlike verklarings vir die verlies in ADH-aktiwiteit eksperimenteel ondersoek, maar dit is nie in hierdie studie gedoen nie.

In hulle ondersoek na die ADH-remstof, het Shimomura & Beevers (1983a) die betrokke ADH-ekstrak vermeng met 'n ADH-ekstrak wat uit droë *Oryza sativum* sade verkry is. Binne 40 minute het remstofbevattende ekstrakmengsels 'n laer ADH-aktiwiteit gehad as die verwagte numeriese som van die afsonderlike ADH-aktiwiteite van die ekstrakte. Wat die vermenging van *Strelitzia juncea* embryo-ekstrakte betref, toon Tabel 3.4 dat dit tot ADH-aktiwiteite gelei het wat nie konsekwent of noemenswaardig laer was as die verwagte numeriese som van die afsonderlike ADH-aktiwiteite nie. Hierdie afleiding geld vir sowel lug- as suurstofsade én vir gevalle waar ekstrakvermenging direk na bereiding of na verloop van 'n paar uur gedoen is. In teenstelling met die aangetoonde situasie by *Oryza sativum*, is die ADH-aktiwiteit van die droë embryo-ekstrakte onstabiel met tyd, en dit mag wees dat 'n ADH-remstof reeds in die droë embryo's voorkom (Tabel 3.4).

Opsommend vir die resultate van Figure 3.2, 3.3 en Tabel 3.4, kan gesê word dat die tydsafhanklike verlies in ADH-aktiwiteit van *Strelitzia juncea* embryo-ekstrakte grootliks deur DTT voorkom kan word, maar dat ekstrakvermenging nie dui op 'n beduidende verskil in ADH-remming van droë-, lug- of suurstofbehandelde sade se embryo's nie.

Anders as met sommige van die ander ensiemessaiërings (bv. dié van G6PDH en 6PGDH), is variërende resultate soms met die ADH-bepalings verkry. In 'n finale ADH-eksperiment is vyf ekstrakte van elke behandeling gemaak en uit hierdie resultate blyk dit

Tabel 3.4 Die invloed van die onderlinge vermenging van embryo-ekstrakte van *Strelitzia juncea* op die alkoholdehidrogenase-aktiwiteit (ADH)

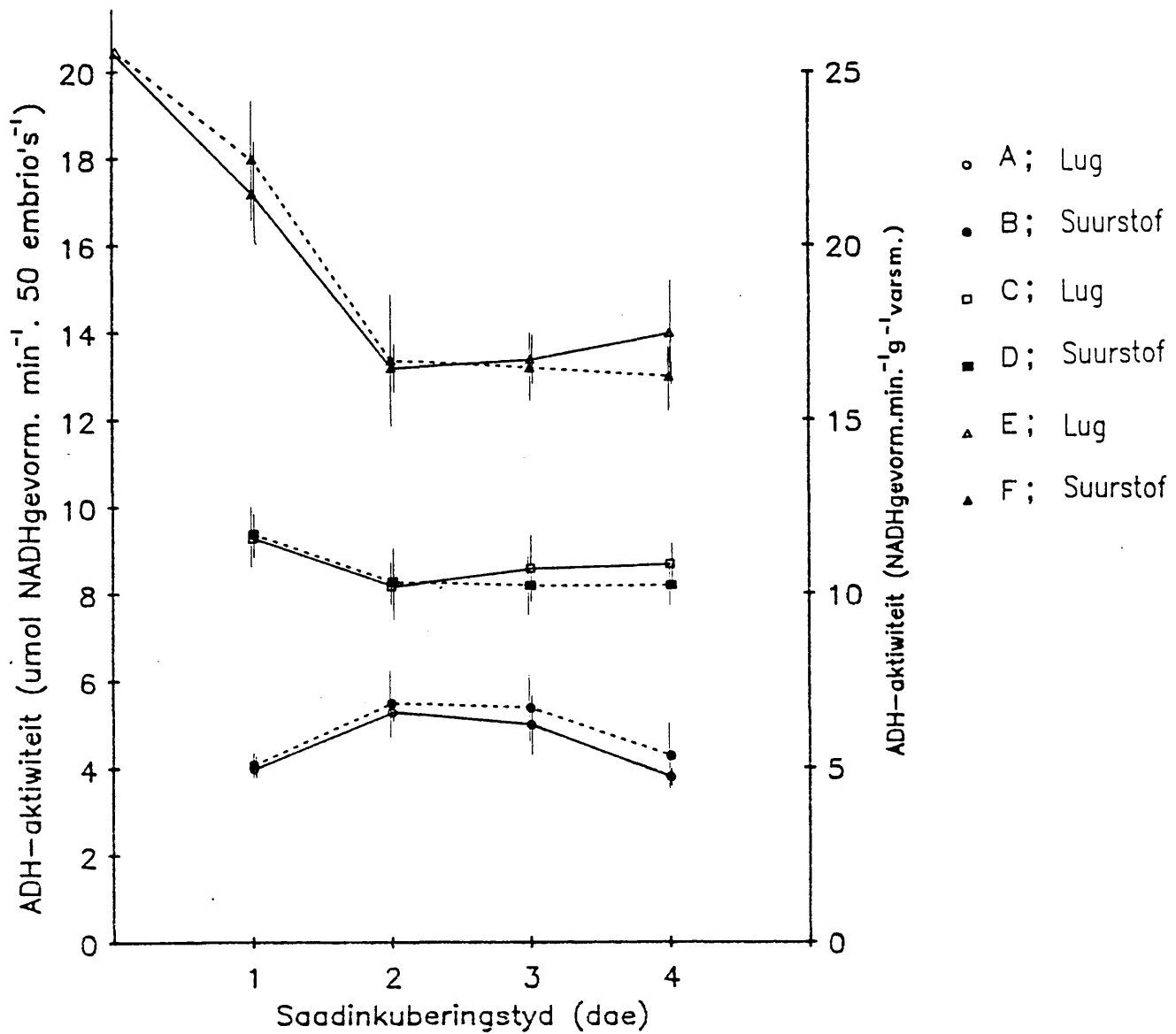
Bepaling	Saadinku- ^a beringstyd (dae)	Saadbe- hande- ling	Ekstraksie- buffer ^b	Ouderdom ^c van ek- strakte (uur)	Ekstrak- vermenging ^d	ADH-aktiwiteit $\mu\text{mol NADH gevorm. min.}^{-1} 50 \text{ emb.}^{-1}$	
						Eksperimen- teel	Verwagte numeriese som
a	0	-	KPS	1	a+KPS	6,232	-
b	1	Lug	"	"	b+KPS	8,079	-
c	1	Suurstof	"	"	c+KPS	8,161	-
d	-	-	-	-	a+b	14,824	14,311
e	-	-	-	-	a+c	15,478	14,393
f	-	-	-	-	b+c	17,294	16,240
g	0	-	KPS	9	g+KPS	5,195	-
h	1	Lug	"	"	h+KPS	8,072	-
i	1	Suurstof	"	"	i+KPS	8,383	-
j	-	-	-	-	g+h	13,101	13,267
k	-	-	-	-	g+i	14,824	13,578
l	-	-	-	-	h+i	15,140	16,455
m	0	-	KPS	2	m+KPS	6,985	-
n	0	-	"	"	n+KPS	7,408	-
o	4	Lug	"	"	o+KPS	8,682	-
p	4	Suurstof	"	"	p+KPS	7,822	-
q	-	-	-	-	m+o	15,036	15,667
r	-	-	-	-	n+p	15,994	15,230
s	0	-	TRIS	5	s+TRIS	5,003	-
t	0	-	"	9	t+TRIS	4,341	-
u	3	Lug	"	2	u+TRIS	8,722	-
v	"	Suurstof	"	"	v+TRIS	6,861	-
w	-	-	"	-	s+u	14,105	13,725
x	-	-	"	-	t+v	10,673	11,202

^a 0 dae: embryo's van lugdroë sade is gebruik

^b KPS : $0,1 \text{ mol. dm}^{-3}$ K-fosfaatbuffer pH 8,5 met $0,4 \text{ mol. dm}^{-3}$ sukrose. TRIS: $0,01 \text{ mol. dm}^{-3}$ TRIS-HCl pH 8,5

^c : Vir bepalings a tot l is ekstrakvermengings op tyd 0 uur gemaak. Vir alle ander bepalings is die ekstrakte na die aangeduide tydsverloop vermeng en direk daarna bepaal.

^d : 2 cm^3 van 'n ekstrak is met 2 cm^3 buffer of met 2 cm^3 van 'n ander ekstrak vermeng en op ys gehou. Van die mengsels is $0,1 \text{ cm}^3$ in 'n totale volume van $3,0 \text{ cm}^3$ reaksiemengsel gebruik.



Figuur 3.3. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die alkoholdehidrogenase-aktiwiteit van *Strelitzia* spp.-embrio's wat na verskillende tye van saadinkubering geëkstraheer is.

A, B, C, D: ADH-aktiwiteit per 50 embrio's (linkerkantste ordinaat).

E, F : ADH-aktiwiteit per g varsmassa (regterkantste ordinaat).

A, B : embrio's van *S. reginae*.

C, D, E, F: embrio's van *S. juncea*.

Tabel 3.5 Die invloed van suurstofinkubering en van saad-inkuberingstyd op die verhouding van die voorwaartse tot die terugwaartse reaksie soos gekataliseer deur alkoholdehidrogenase van ru-ekstrakte van die embryo's

Saad-inku-berings-tyd (dae)	Inku-berings-atmosfeer	Voorwaartse reaksie (NADH-vorming) by pH 6,9
		Terugwaartse reaksie (NADH-oksidering) by pH 8,9
1	lug	8,14 ^a ± 0,53
	suurstof	8,93 ± 0,72
2	lug	8,14 ± 0,78
	suurstof	8,25 ± 0,69
3	lug	7,86 ± 0,91
	suurstof	8,28 ± 0,47
4	lug	7,99 ± 1,29
	suurstof	8,78 ± 1,27

a: gemiddeld ± standaardafwyking (n = 3)

Ekstraksiemedium: 0,1 mol.dm⁻³ TRIS-HCl-0,4 mol.dm⁻³ sukrose

dat, op 'n embriobasis gesien, daar geen verskil in die ADH-aktiwiteit van lug- en suurstofsade is nie (Figuur 3.3). Hierdie afleiding geld vir sowel *Strelitzia juncea* as *S. reginae*. Op 'n varsmassabasis beskou, is daar 'n afname in ADH-aktiwiteit van dag 0 na dag 2 van inkubering, maar weer eens kon geen verskil tussen lug- en suurstofsade gevind word nie. Die feit dat, alhoewel die ADH-aktiwiteit van *S. reginae* laer as vir *S. juncea* was, maar dieselfde tendens verkry is, word as ondersteunende getuienis vir die afleidings beskou.

Verskillende ADH-isoënsieme word in plante aangetref, waarvan sommige se kinetiese eienskappe sodanig is dat hulle doeltreffender as die ander vir die omgekeerde ADH-reaksie nl. NADH-oksidering funksioneer (Davies 1980). Geen verskil in die verhouding van die terugwaartse tot die voorwaartse ADH-reaksie kon in hierdie studie vir die ru-ekstrakte van *Strelitzia juncea* embrio's gevind word nie, hetsy vir lug- of suurstofsade of vir verskillende inkuberingstye nie (Tabel 3.5). Probleme is ondervind om die aanvanklike voorwaartse ADH-reaksie (NADH-vorming) te monitor. Die aanvanklike reaksie was baie vinnig en hou moontlik verband daarmee dat TRIS 'n Schiffbasis met aldehyede (bv. asetaldheid) kan vorm (Blanchard 1984). Groter wisseling in waardes vir die voorwaartse reaksie as vir die terugwaartse reaksie is verkry. Dit is nie bekend in watter mate die optimum *in vitro* pH's die *in vivo* situasie kan weerspieël nie. Die moontlike implikasies wat die teenwoordigheid van verskillende isoënsieme mag inhou, sal later weer ter berde gebring word (3.4.2.1; p 61).

Volgens die oorsig van Davies (1980) lyk die hipotese van Crawford (1977) vir metaboliese aanpassing van sade teen versuiping (anaërobiese toestande) onwaarskynlik. Volgens die hipotese beskik sade wat teen anaërobiose bestand is, oor 'n lae tempo van anaërobiese metabolisme, 'n klein Pasteurverskynsel, en klein hoeveelhede etanol kom in hulle voor. Sade wat nie teen anaërobiose bestand is nie, bou hoë konsentrasies van die toksiese eindproduk van fermentasie nl. etanol op, en die testa verhoed die uitskeiding daarvan.

Ook Rumpho & Kennedy (1983) kom in hulle bespreking van onlangse navorsingsartikels tot die gevolgtrekking dat Crawford se hipotese nie steek hou nie. Rumpho & Kennedy (1983) het in hulle bestudering van *Echinochloa crus-galli*, wat onder anaërobiese toestande kan ontkiem en groei, tot die gevolgtrekking gekom dat hierdie gras metabolies sodanig onder anaërobiose funksioneer dat 'n aktiewe alkoholfermentasie met gepaardgaande hoë ADH-aktiwiteit gehandhaaf word, en dat daardeur NAD/NADH siklisering en ATP-produksie in die afwesigheid van suurstof moontlik gemaak word. Die anaërobiese omskakeling van etanol en koolhidrate na lipiede en ander intermediêre metaboliete word deur hierdie plant uitgevoer. Daarby het die organisme 'n hoë toleransie vir etanol. Die moontlikheid is nie uitgesluit dat soortgelyke metaboliese prosesse in 'n mate ook by ander soorte sade kan voorkom nie.

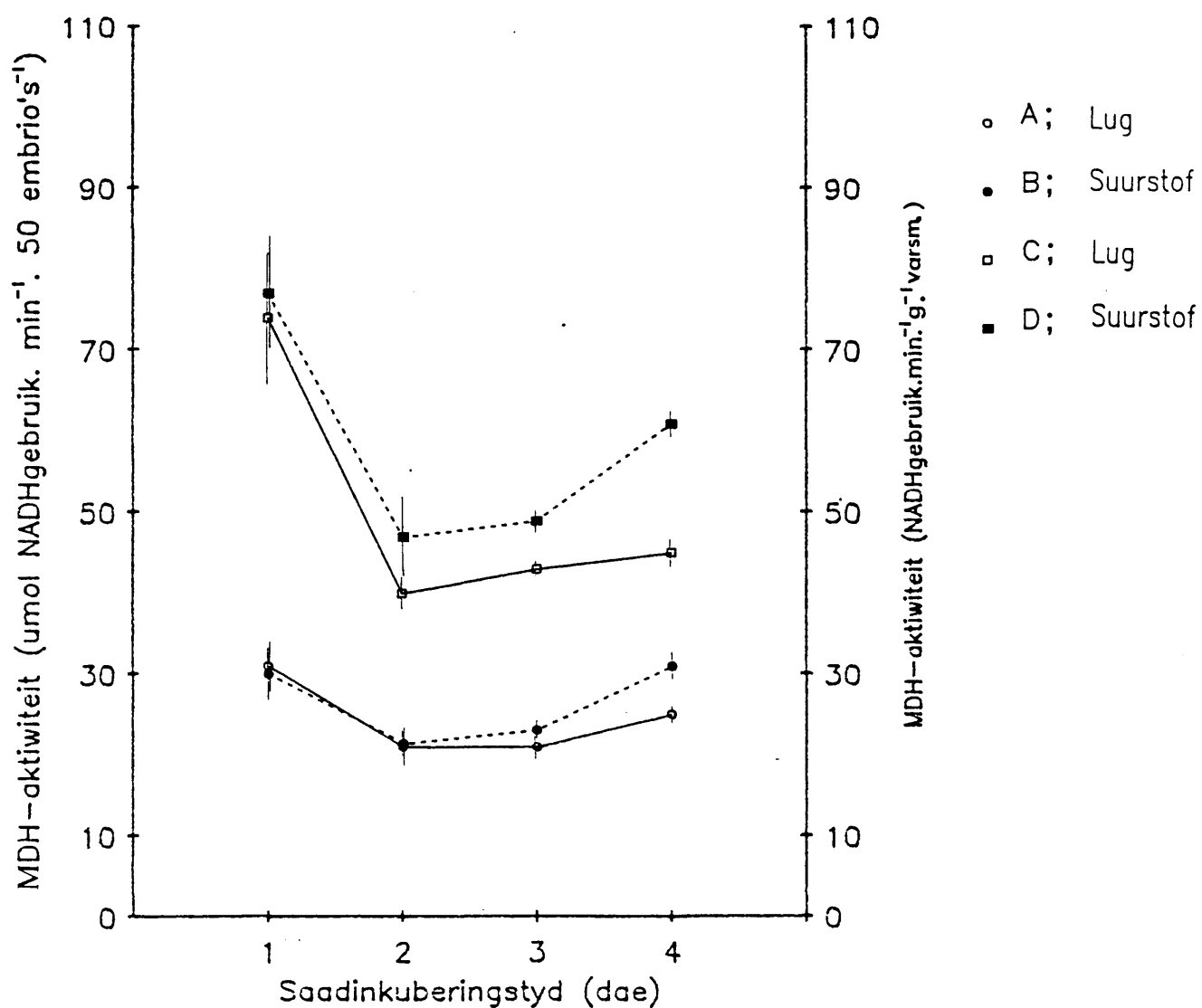
'n Bestudering van die beskikbare literatuur oor saadmetabolisme het geen inligting oor die ADH-aktiwiteit van dormante sade sonder en met 'n kiemingsinduserende behandeling opgelewer nie (Roberts 1969; 1973; Mayer 1973; Mayer & Shain 1974; Khan 1977b; Bewley & Black 1978, 1982; Mayer & Marbach 1981; Mayer & Poljakoff-Mayber 1982). Geen literatuurvergelyking is dus moontlik vir die situasie wat met *S. juncea* aangetref is nie, naamlik dat die embryo-ekstrakte verkry uit dormante en kiemingsgeïnduseerde sade geen verskil in ADH-aktiwiteit op 'n embriobasis oor die eerste vier inkuberingsdae gelewer het nie. Die ADH-aktiwiteit vir die voorwaartse reaksie (ca 65 $\mu\text{mol NADH gebruik. min.}^{-1}$ 50 embryo's $^{-1}$) was die hoogste van al die respiratoriese ensiemaktiwiteite wat vir *S. juncea* embryo's bepaal is, terwyl die ADH-aktiwiteit vir die terugwaartse reaksie (ca 8 $\mu\text{mole NADH gevorm. min.}^{-1}$ 50 embryo's $^{-1}$) die derde hoogste ensiemaktiwiteit was. Slegs MDH_{cyt} het 'n soortgelyke hoë aktiwiteit (ca 20 tot 30 $\mu\text{mol NADH gebruik. min.}^{-1}$ 50 emb. $^{-1}$) gehad. Daar is natuurlik geen noodwendige verband tussen hierdie waardes en reaksiekondisies met die *in vivo* situasie nie.

3.4.1.5 Sitosoliese malaatdehidrogenase (MDH_{cyt})

Die MDH_{cyt} -aktiwiteit uitgedruk as $\mu\text{mol NADH gebruik.min.}^{-1}$ 50 embryo's⁻¹ was na een dag van inkubering dieselfde vir embryo-ekstrakte van lug- en suurstofsade en as dié van lugdroë sade (Figuur 3.4). Eers op dag 4 was daar 'n duidelike toename in die MDH_{cyt} -aktiwiteit vir suurstofsade. 'n Ooreenstemmende tendens is waargeneem vir die bovloeistowwe van ru-ekstrakte wat met 'n ander sentrifugeringsprosedure verkry is (Figuur 5.12A; p 144). Indien die aktiwiteit op 'n varsmassabasis uitgedruk word, is die hoër MDH_{cyt} -aktiwiteite wat met die langer inkuberingstye vir suurstofsade waargeneem is, opmerkliker (Figuur 3.4).

Van al die ensieme wat in hierdie studie bepaal is, het MDH_{cyt} die tweede hoogste aktiwiteit getoon. Die MDH van die verskillende metaboliese kompartemente nl. MDH_{cyt} , MDH_{mit} en MDH_{gly} toon volgens Ting *et al.* (1975) nie groot verskille in hulle kinetiese eienskappe nie en MDH word nie as 'n allosteriese ensiem, wat onder komplekse regulering staan, beskou nie. Die relatiewe bydrae van die verskillende isoënsieme tot die metabolisme word eerder deur kompartementering bewerkstellig.

Malaatsintese in die sitosol kan plaasvind deurdat PEP deur PEP-karboksilase gekarboksileer word om OAA te vorm en deur MDH_{cyt} -katalise kan malaat uit OAA gevorm word (McMannon & Crawford 1971). Malaatsintese deur hierdie meganisme word egter deur Davies (1980) as onwaarskynlik beskou, omdat dit uit 'n energie-oogpunt geen voordeel vir die organisme inhou nie. Die vorming van OAA uit PEP deur PEP-karboksiekinase, is egter voordelig in hierdie opsig, want dit lei tot 'n karboksileringsreaksie waartydens ATP gesintetiseer word. Weer eens word MDH_{cyt} geïmpliseer vir die sintese van malaat uit OAA. Volgens Davies (1980) is die getuienis vir malaatophoping tydens anaërobiose maar skraal en hy beveel aan dat "protagonists of the metabolic theory of flooding should produce carbon balance sheets, paying particular attention to the leakage of metabolites and the need for CO_2 fixation in the production of malate."



Figuur 3.4. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die sitosoliese malaatdehidrogenase (MDH_{cyt})-aktiwiteit van *Strelitzia juncea*-embrio's wat na verskillende tye van saad-inkubering geëkstraheer is.

A, B: MDH_{cyt} -aktiwiteit per 50 embrio's (linkerkantste ordinaat).
 C, D: MDH_{cyt} -aktiwiteit per g varsmassa (regterkantste ordinaat).

Die vraag bly dus wat die moontlike rede vir die hoë MDH_{cyt} -aktiwiteit kan wees. In die metaboliese skema wat deur Davies (1980) voorgestel word vir die regulering van die pH van die sitosol, het MDH_{cyt} 'n integrale funksie. Ting *et al.* (1975) sien MDH_{cyt} se rol as om medewerkend met die sitosoliese karboksileringsensieme tot malaatsintese te lei; malaat kan volgens hulle betrokke wees in ioniese, osmotiese, of redoksregulering.

Op hierdie stadium kan uit die literatuur dus nie eksperimenteel-gegronde gevolgtrekkings gemaak word oor die hoofrol wat malaatdehidrogenase in die sitosol vervul nie. Perl (1978) het vir *Gossypium hirsutum* sade 'n daling in die totale MDH-aktiwiteit voor kieming beskryf en hy het die daling vertolk as sou MDH 'n spesifieke rol in die kiemingsproses hê. Ná die daling het die MDH-aktiwiteit van *G. hirsutum* sade met verdere inkubering konstant gebly, maar 'n styging in die totale MDH het met radikulaverskyning saamgeval. Moontlik kan die hoër toename in MDH_{cyt} by *Strelitzia juncea* suurstofbehandelde sade op dag 4 ook verband hou met radikulaverskyning wat by hierdie sade op inkuberingsdag 5 'n aanvang begin neem.

Die gebrek aan genoegsame inligting oor die rol van MDH in die kiemingsproses en die noodwendige spekulasie wat dit tot gevolg het, blyk uit die stelling "... our present results lead to the conclusion that the activity of MDH plays a role in affecting the oxidation-reduction balance of some materials in seed cells, which may critically control the early stage of seedling development." (Perl 1978). Geen duideliker toeligting oor die moontlike rol van MDH_{cyt} in dormansieverbreking of die ontkiemingsfisiologie kon in die reeds aangehaalde oorsigliteratuur (kyk 3.1, p 23), gevind word nie.

'n Goeie reglynige verband is vir die MDH_{cyt} - en ADH-aktiwiteite wat op dieselfde ekstrakte bepaal is, gevind (Figuur 3.5). Dit is duidelik dat 'n klein toename in die ADH-aktiwiteit 'n relatief groot toename in die MDH_{cyt} -aktiwiteit tot gevolg het. Die ...

moontlike implikasies hiervan is op hierdie stadium nie duidelik nie. 'n Hoë ADH-aktiwiteit kan verband hou met 'n hoë energie-behoefte (ATP) onder relatief anaërobiese toestande (Rumpfo & Kennedy 1983) maar geen direkte verband met MDH-aktiwiteit is duidelik nie. Moontlik word die verlaging van die pH van die sitosol vir optimum piruvaatdekarboksilase by *S. juncea* embrio's deur malaat bewerkstellig en nie deur laktaat nie (kyk bespreking onder 3.4.2.1, p 61).

Samevattend dus, MDH_{cyt} het 'n hoë aktiwiteit in die embrio's van droë en imbiberende *S. juncea* sade en eers op 'n relatief laat stadium van inkubering is 'n hoër aktiwiteit by die kiemings-geïnduseerde suurstofsade te bespeur. Die MDH_{cyt} -aktiwiteit het eers 'n dalende en later 'n stygende tendens soos wat inkubering verloop. Ander resultate wat vir die MDH van sitosoliese en mitochondriale kompartemente van *S. juncea*-embrio's verkry is, word onder 5.5.3 (p 143) bespreek.

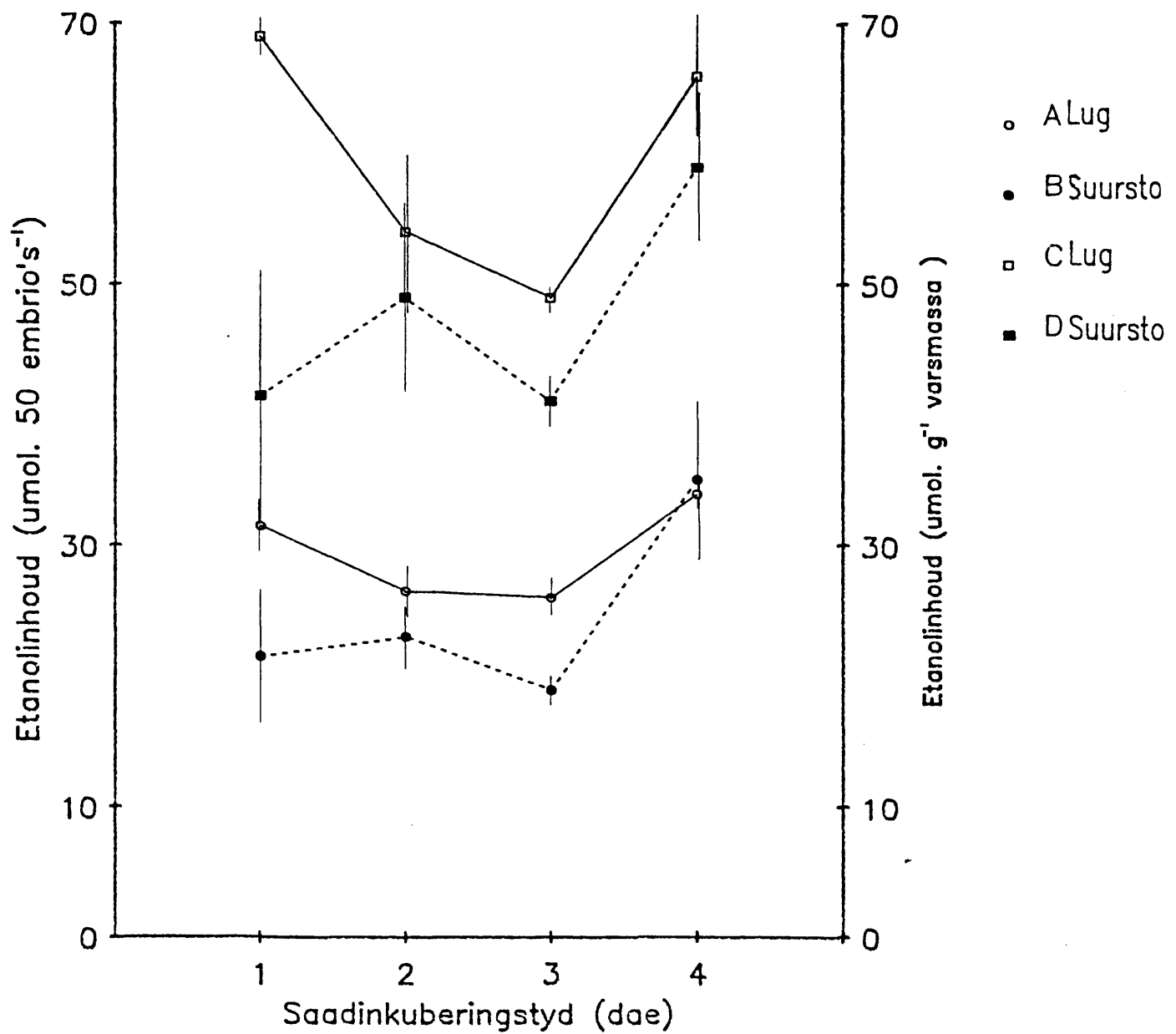
3.4.2 Metabolietinhoud

Die "respiratoriese" metaboliete waarvan die konsentrasies bepaal is, is nie van bepaalde metaboliese kompartemente afkomstig nie, maar as gevolg van die bepaalde ekstraksieprosedure verteenwoordig dit die volle komplement van die betrokke metaboliet in die embrio. Dit word egter aanvaar dat die betrokke metaboliete hoofsaaklik in die vakuool en/of sitosol voorkom en die resultate word dus in hierdie hoofstuk tesame met die sitosoliese ensieme bespreek.

Die adenilate is in afsonderlike eksperimente geëkstraheer en die betrokke resultate word in hoofstuk 6 bespreek.

3.4.2.1 Etanol

Na een dag van inkubering het die embrio's van die suurstofsade 'n laer etanolinhoud as dié van die lugsade gehad (Figuur 3.6). Die verkreeë $\mu\text{mol}\cdot 50 \text{ emb.}^{-1}$ -waardes gee 'n beter aanduiding van die omvang van die verskil (lugsade: 31,25; 36,65; 29,09.



Figuur 3.6. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die etanolinhoud van *Strelitzia juncea* -embrio's wat na verskillende tye van saadinkubering geëkstraheer is.

A, B: etanolinhoud per 50 embrio's (linkerkantste ordinaat).
 C, D: etanolinhoud per g varsmassa (regterkantste ordinaat).

Suurstofsade: 28,03; 19,79; 16,18). Op inkuberingsdag 3 het die embrio's van die suurstofsade ook 'n laer etanolinhoud as dié van die lugsade gehad, maar op dag 2 en dag 4 was daar geen betekenisvolle verskil te bespeur tussen die twee behandelings nie (Figuur 3.6).

Oor die geheel gesien, was daar eers 'n afname gevolg deur 'n toename in die etanolinhoud met toenemende inkubering vir die dormante sade. Dieselfde profiel word verkry indien die etanolinhoud op 'n varsmassabasis bereken word (Figuur 3.6).

Onder relatief anaërobiese toestande, ontstaan etanol in plantweefsel deur die prosesse van glikolise en fermentasie en ADH kataliseer die finale reaksiestap waartydens asetaldied na etanol toe gereduseer word (oorsig deur Cossins 1978 & Davies 1980). Die aanduidings is sterk dat die vorming van etanol in weefsel voorafgegaan word deur laktaatvorming; laasgenoemde lei tot 'n verlaging van die sitosol se pH sodanig dat die pH-regulerende sitosoliese buffersisteem nie daarvoor kompenseer nie. Vanweë die verlaagde pH van die sitosol word piruvaatdekarboksilase geaktiveer en etanolfermentasie word geïnisieer (Davies 1980).

Volgens die oorsig van Cossins (1978) wat vervolgens kortliks bespreek word, is daar verskeie moontlike eindbestemmings vir die opgehoopde etanol sodra aërobiese toestande weer vir saailinge aanbreek. 'n Grootskaalse uitskeiding van etanol na die omringende medium en atmosfeer is vir sommige soorte saailinge aangetoon en dit is verstaanbaar indien dit in ag geneem word dat etanol vlugtig is en dat (kyk Davies 1980) die molekule daarvan ongeïoniseerd is en dus maklik deur selle uitgeskei kan word. Die omsetting van etanol na die vlugtige verbinding asetoon is ook al aangetoon. Verskeie soorte saailinge is in staat om etanol te metaboliseer na 'n verskeidenheid organiese verbindings. In die saadlobbe van *Pisum sativum* is die etanol hoofsaaklik na organiese sure en glutamaat gemetaboliseer, terwyl in die geval van die vetryke *Ricinus communis*-endosperm die etanol

hoofsaaklik via die glioksalaatsiklus na suikers gemetaboliseer is (Cossins 1978). Daar was ook 'n mate van CO₂- en glutamaatvorming uit etanol in hierdie weefsel.

In alle gevalle was die eerste stap in die oksidering van etanol die omskakeling daarvan na asetaldheid deur bemiddeling van ADH (Cossins 1978). Verskillende ADH-isoënsieme met verskillende kinetiese eienskappe is uit plante geïsoleer en indien dit aanvaar word dat die K_M -waarde vir die substraat laag en vir die reaksieproduk hoër moet wees, is die "fisiologiese rigting" van die ADH-gekataliseerde reaksie etanolvorming uit asetaldheid (kyk Davies 1980 se bespreking van Cleland 1967 en Atkinson 1968). Die ADH-2S isoënsiem is katalities ondoeltreffender as die ADH-2F isoënsiem vir etanolvorming uit asetaldheid, maar volgens die inligting van Scandalios (1977) soos deur Davies (1980) aangegee, sal die ADH-2S isoënsiem ook ondoeltreffender as die ADH-2F isoënsiem wees vir katalisering van die omgekeerde reaksie. Uit die beskikbare gegewens blyk dit dat daar nie 'n ADH-isoënsiem in plantweefsel voorkom waarvan die fisiologiese funksie primêr die katalisering van etanol→asetaldheid omsettings is nie. Nogtans is sodanige omsettings deur die genoemde ADH-isoënsieme geredelik moontlik onder gunstige verhoudings van massawerking.

Massawerkingverhoudings ("mass action ratios") sal 'n funksie wees van al die komplekse metaboliese interaksies wat die konsentrasieverhoudings van etanol/asetaldheid en NAD/NADH sal bepaal. Alles in ag genome, is dit dus nie verbasend dat daar geen opmerklieke ooreenkoms in die profiel vir etanolinhoud (Figuur 3.6) en ADH-aktiwiteit (Figuur 3.3; p 53) van *Strelitzia juncea* embryo's is nie. Die moontlikheid van 'n ADH-remstof in die embryo-ekstrakte en die moontlike uitskeiding van etanol na die omringende medium is nog verdere kompliserende faktore.

Uit bostaande bespreking volg dit dan dat die teenwoordigheid van etanol in die embryo's van dormante *S. juncea* sade op dag 1 aan die aktiwiteit van ADH oor die eerste 24 uur van inkubering

toegeskryf moet word. Die laer etanolinhoud van die embryo's van suurstofsade kan aan een of meer van die volgende drie faktore toegeskryf word:

- 'n laer fermentasietempo;
- 'n groter metaboliese herbenutting van reeds gesintetiseerde etanol, of
- 'n groter uitskeiding van etanol na die omringende medium of atmosfeer.

Geen uitsluitel oor die gegewe opsies kan op grond van die beskikbare data gemaak word nie. Dieselfde moontlike opsies en slotsom geld ook vir die waargenome profiel vir etanolinhoud oor die vier inkuberingsdae.

Vir die bespreking hierbo oor die etanolinhoud van *S. juncea* embryo's is van inligting oor weefsel soos saailinge gebruik gemaak omdat min studies oor die etanolinhoud spesifiek op die voorkiemingsperiode van dormante sade toegespits is. Die onlangse werk oor die nie-dormante *Echinochloa crus-galli* sluit waarnemings oor die voor- en nakiemingstydperk in en dit dui daarop dat hierdie spesie wat onder anaërobiese toestande kan ontkiem en groei, 'n hoë toleransie vir etanol het, nie oor die Pasteurverskynsel beskik nie, etanol kan wegmetaboliseer, en etanol aan die omringende medium vrystel (Rumpho & Kennedy 1983; Kennedy *et al.* 1983). Die moontlikheid is glad nie uitgesluit dat van ons inheemse sade vanweë hulle struktuur normaalweg (gedeeltelike) anaërobiese toestande tydens vroeë inkubering sal ondervind, maar dat hulle soos *E. crus-galli* metabolies daarvoor aangepas kan wees. In hulle bespreking van die variasie in spesiese gevoeligheid vir etanol, wys ook Rumpho & Kennedy (1983) op die belangrike rol wat ADH in die verband kan speel: "In nature, particularly under low O₂ in plants, the widespread occurrence of ADH may be less important than the ability to synthesize or activate a specific isozyme during periods of stress as earlier studies (....) suggest."

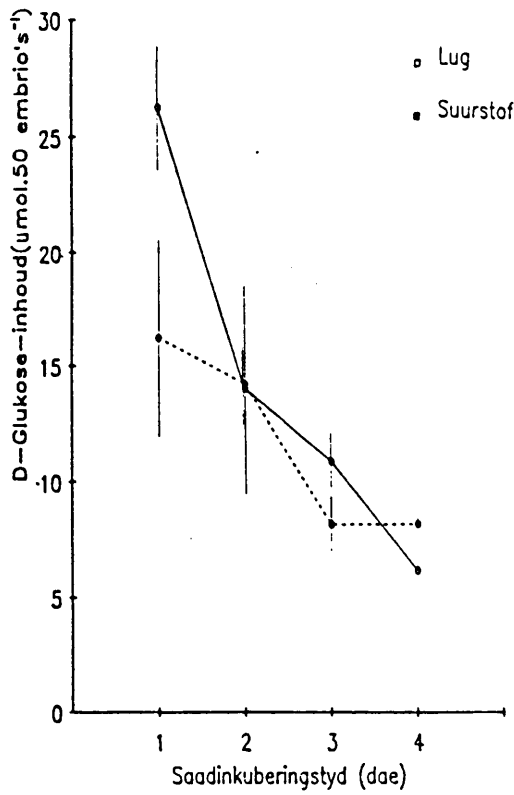
Die etanolinhoud van *S. juncea*-embrio's wissel rondom ca 55 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ varsmassa. Crawford (1977) gee die waardes vir verskeie sade aan en dit wissel tussen ca 10 en 100 $\mu\text{M.g}^{-1}$ droëmassa wat moeilik omrekenbare eenhede is.

3.4.2.2 D-glukose en D-fruktose

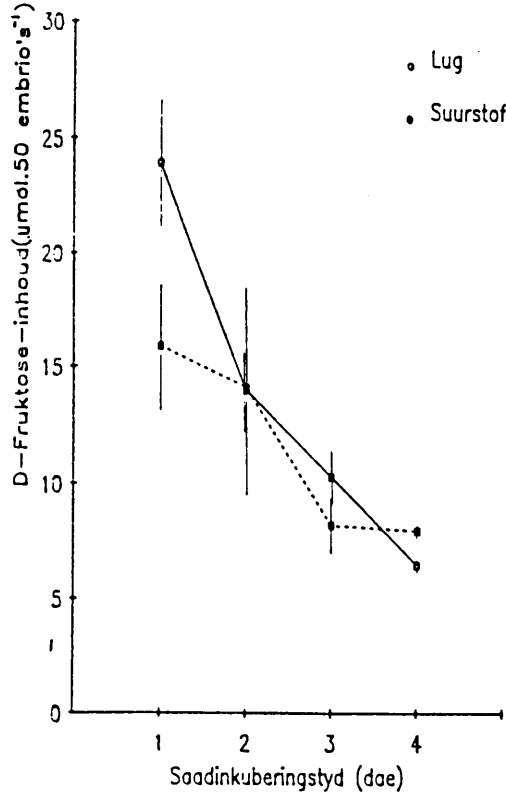
Glukose- en fruktose-bepalings is op dieselfde ekstrakte wat vir etanolbepalings gebruik is, uitgevoer. Die glukose-inhoud van *Strelitzia juncea* embrio's het grootliks oor die vier inkuberingsdae gedaal (Figuur 3.7 A). Dieselfde neiging is vir die embrio's van sowel lug- as suurstofsade waargeneem, maar die glukose-inhoud vir die embrio's van suurstofsade was na een dag van inkubering laer as wat dit vir die lugsade was. Die profiel vir die fruktose-inhoud (Figuur 3.7 B) stem opmerklik ooreen met dié vir die glukose-inhoud, soos ook blyk uit die goeie korrelasie wat tussen die glukose- en fruktose-inhoud verkry is (Figuur 3.7 C).

Die resultate kan s6 geïnterpreteer word dat daar 'n poel van oplosbare koolhidrate in die embrio's voorkom en dat suurstof-behandeling van die sade veroorsaak dat die poel na een dag van inkubering in 'n groter mate "getap" word deur 'n hoër glikolitiese aktiwiteit as wat die geval vir lugsade is. Oor die 4 inkuberingsdae gesien, kan die feitlik reglynige afname in die heksose-inhoud dui op 'n toenemende benutting van heksoses vir glikolise soos wat inkubering voortgaan. Die moontlikheid is nie uitgesluit dat die heksosepoel oor die inkuberingstyd deur hidrolise van oligosakkariede aangevul word maar dat dit verskuil word deur 'n hoë glikolisetempo van heksoses. Dit is moeilik om te verklaar waarom die glukose- en fruktose-inhoud van lug- en suurstofsade se embrio's slegs na een dag van inkubering verskil; moontlik is 'n addisionele vloed na een dag van inkubering voldoende om 'n gunstige "swaai" in die metabolisme te veroorsaak. Ten spyte van die feit dat daar skynbaar 'n hoër tempo van heksose-afbraak na een dag van inkubering is, is die etanolinhoud van die suurstofsade se embrio's laer as dié van

Figuur 3.7 A

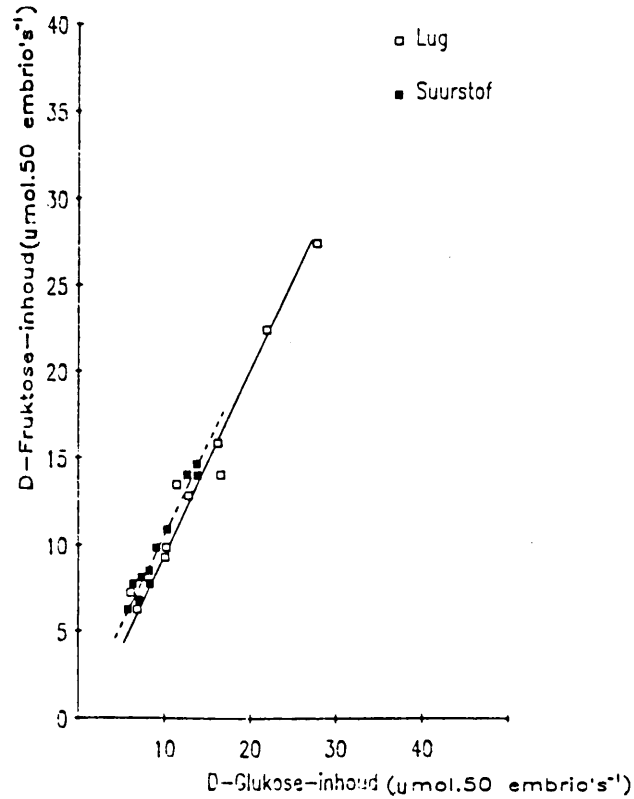


Figuur 3.7 B



67

Figuur 3.7 C



Figuur 3.7. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die D-glukose-inhoud en D-fruktose-inhoud van *Strelitzia juncea*-embrio's wat na verskillende tye van saadinkubering geëkstraheer is.

3.7 A. D-glukose-inhoud.

3.7 B. D-fruktose-inhoud.

3.7 C. Korrelasie tussen D-glukose- en D-fruktose-inhoud.

Vir lugsade: $Y = 0,949x + 0,434$; $r = 0,991^{**}$ ($n = 11$).

Vir suurstofsade: $Y = 0,913x + 0,881$; $r = 0,991^{**}$ ($n = 11$).

die lugsade. Na een dag van inkubering mag die verhouding van aërobiese tot anaërobiese respirasie vir die embryo's van suurstofsade baie groter as vir dié van lugsade wees.

Literatuur van die afgelope drie dekades dui daarop dat tydens die voorkiemingsperiode di- en oligosakkariede soos sukrose, raffinose en stagiöse as respirasiesubstrate vir ontluikende embryo's dien (oorsig deur Bewley & Black 1978). Eers ná die radikulaverskyning word die hoofreserwevoedingstowwe van die saadlobbe of endosperm gemobiliseer.

In plantweefsel kom verskeie oligosakkariede voor waarvan baie tot die "raffinose-familie" behoort; dit is oligosakkariede wat bestaan uit 'n sukrose-eenheid plus een-of-meer D-galaktose-eenhede. Al hierdie oligosakkariede sal met volledige hidrolise net soos sukrose ekwimolare hoeveelhede D-glukose en D-fruktose lewer, terwyl die hoeveelheid vrygestelde D-galaktose sal afhang van die betrokke oligosakkaried wat gehidroliseer word (Goodwin & Mercer 1983).

In inkuberende sade word glukose- en fruktose-poele dikwels aangetref, maar nie vrye galaktose nie, en volgens Bewley & Black (1978) is dit aanduidend van die vinnige benutting van galaktose, waarskynlik vir selwandsintese of die sintese van galaktolipiede.

Deurdat die metabolietekstrahering vir hierdie studie met 'n sterk suuroplossing uitgevoer is (3.2.3; p 33), sou dit noodwendig tot hidrolise van oligosakkariede lei. Dit is dus nie moontlik om af te lei in watter mate die verkreë glukose- of fruktose-inhoud (Figuur 3.7) vrye poele in die *S. juncea* embryo's verteenwoordig of die gevolg van oligosakkariedhidrolise tydens ekstrahering is nie. Daar kan egter afgelei word dat sukrose of 'n oligosakkaried behorende aan die raffinose-familie (soos raffinose of stagiöse) heelwaarskynlik die bron van die monoses voor of tydens ekstrahering was. Verder is dit duidelik dat die oligosakkaried/monose-poel beskikbaar vir respirasie sterk afgeneem het oor die vier inkuberingsdae.

Hierdie resultate van Figuur 3.7 is moeilik te vereenselwig met die resultate van Ybema *et al.* (1984). Hulle het 'n min of meer konstante vlak van reduserende verbindings met die 3,5-di-nitrosalisielsuurmetode vir die embryo's van dormante *S. juncea* sade oor die eerste vier saadinkuberingsdae gevind. In die lig van die α -amilase-aktiwiteit wat in die embryo's voorkom (Ybema *et al.* 1984), kan dit as waarskynlik beskou word dat 'n belangrike komponent van die reduserende verbindings maltose is. Die maltose kan vanaf die endosperm na die embryo's vervoer word; stysel kom nie in die embryo's self voor nie (Ybema *et al.* 1984). Maltose sal egter met suurhidrolise slegs D-glukose lewer en nie 'n ekwimolare hoeveelheid D-fruktose nie.

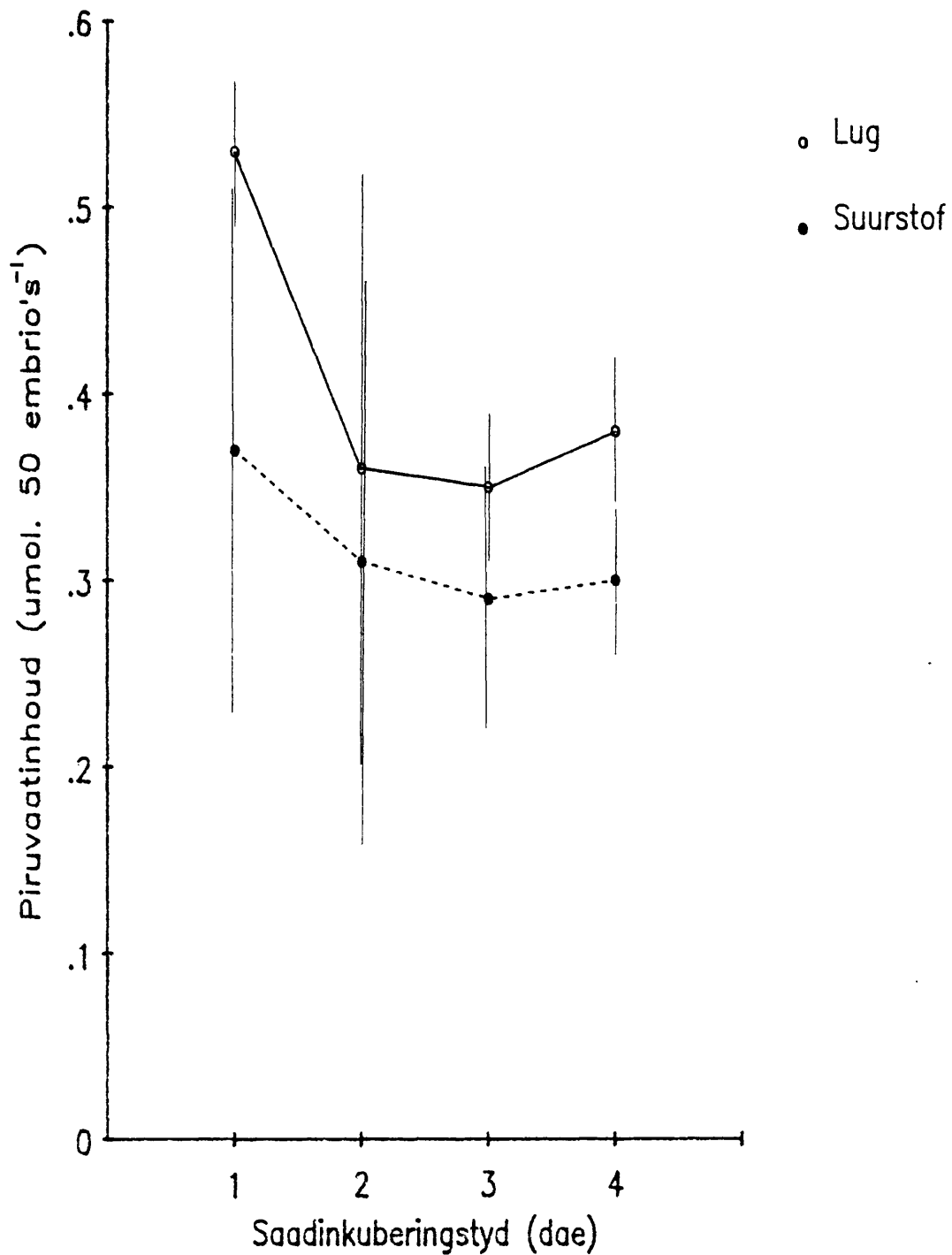
Meer inligting oor die spesifisiteit en betroubaarheid van die dinitrosalisielsuurtoets en die ensimatiese bepalingmetode is nodig asook verdere eksperimentele gegewens voordat die skynbare teenstrydigheid bygelê kan word. Die kompleksiteit van *S. juncea* embryo-ekstrakte blyk uit 5.3.3.1(b); p110 waar spontane reduktiewe aktiwiteit deur die ekstrakte waargeneem is; spontane reduksie van DCIP is deur die bovloeistof uitgevoer.

3.4.2.3 Piruvaat

'n Lae piruvaatinhoud is vir die embryo's van sowel lug- as suurstofsade waargeneem en oor die vier inkuberingsdae gesien, was daar geen opmerklike neiging soos vir glukose of fruktose waargeneem nie (Figuur 3.8). Aangesien die etanolinhoud nie met toenemende inkuberingstyd grootliks gestyg het nie alhoewel die glukose- en fruktose-inhoud afgeneem het, kan dit dui op 'n groter aërobiese respirasie of 'n groter kanalisering van heksoses na die PP-weg soos wat inkuberingstyd toeneem.

3.4.2.4 D-glukose-6-fosfaat en D-fruktose-6-fosfaat

Geen D-glukose-6-fosfaat of D-fruktose-6-fosfaat kon in die ekstrakte gevind word nie. Dit is waarskynlik nie die gevolg van die ekstraheringsprosedure nie, aangesien Ashihara & Matsumura (1977) 'n soortgelyke prosedure uitgevoer en wel dië



Figuur 3.8. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die piruvaatinhoud van *Strelitzia juncea* -embrio's wat na verskillende tye van saadinkubering geëkstraheer is.

genoemde heksosefosfate in *Phaseolus mungo* saailinge kon aantoon. Die afwesigheid van hierdie verbindings in die *Strelitzia juncea*-embrio-ekstrakte terwyl die ongefosforileerde ooreenkomstige monoses wel voorgekom het, dui moontlik op 'n vinnige metabolismering van die koolhidrate via glikolise en/of die PP-weg.

3.5 OPSOMMING

Die volgende sitosoliese ensiemaktiwiteite is in die embrio-ekstrakte van *Strelitzia juncea* gevind: PFK, PFP, aldolase, PK, ADH en MDH_{cyt}. Vir die "temporegulerende" PFK- en PFP-ensieme was die aktiwiteite die laagste van die genoemde ensieme, maar die PFP-aktiwiteit was hoër as dié van PFK. Sowel die PFP- as die PFK-aktiwiteit was hoër in die geval van suurstof- as in dié van lugsade. Oor die 4 inkuberingsdae gesien, was daar 'n stygende tendens in die aktiwiteit van hierdie twee ensieme.

Die aldolase- en PK-aktiwiteite was sowat 10 tot 20 keer hoër as dié van PFK en PFP; geen opmerklieke tendens kon in die ensieme se aktiwiteite oor inkuberingstyd of met suurstof-behandeling gevind word nie.

Hoë ADH-aktiwiteit is in die ekstrakte gevind en dit het geen verandering - op 'n embriobasis uitgedruk - met toenemende inkuberingstyd getoon nie. Dit blyk dat die ADH-aktiwiteit van ekstrakte onstabiel met tyd is, maar dat die teenwoordigheid van DTT die afname in aktiwiteit grootliks beperk, alhoewel ekstrakvermenging nie daarop dui dat 'n ADH-remstof teenwoordig is nie. Geen verskil in die ADH-aktiwiteit van lug- en suurstofsade se embrio's kon gevind word nie en so ook nie in die MDH_{cyt}-aktiwiteit nie. Laasgenoemde aktiwiteit was die hoogste van al die ensiemaktiwiteite en 'n goeie korrelasie is tussen die MDH- en die ADH-aktiwiteit van ekstrakte gevind.

--

Op inkuberingsdae 1 en 3 het embrio's van die suurstofsade 'n laer etanolinhoud as dié van die lugsade gehad; net soos in die geval van die ADH-aktiwiteit, was daar nie 'n duidelike tendens oor die 4 inkuberingsdae nie en selfs op dag 4 was die etanolinhoud vir die embrio's van die kiemingsgeïnduseerde suurstofsade nog hoog. Daarenteen het die glukose- en fruktose-inhoud van dag 1 na dag 4 feitlik reglynig afgeneem met toenemende inkubering. Behalwe vir dag 1 waar die glukose- en fruktose-inhoud van suurstofsade laer as dié van die lugsade was, was daar geen opmerklieke verskil tussen die lug- en suurstofbehandeling nie. Die piruvaat-inhoud was laag en het in profiel met dié vir die etanolinhoud ooreenkoms getoon.

HOOFSTUK 4

DIE INVLOED VAN DORMANSIEVERBREKING DEUR SUURSTOF OP DIE
PENTOSEFOSFAATMETABOLISME VAN STRELITZIA JUNCEA-SADE

4.1	INLEIDING	74
4.2	MATERIAAL EN METODEDES	75
4.2.1	Bereiding van 'n ru-ekstrak	75
4.2.2	Bepaling van ensiemaktiwiteite van G6PDH en 6PGDH in ru-ekstrakte	76
4.2.3	Bepaling van die C ₆ /C ₁ -verhouding	76
4.2.3.1	Diepskuurbehandeling van die sade	76
4.2.3.2	Toediening van radio-aktiewe metaboliete	76
4.3	BEREKENINGS	77
4.4	RESULTATE EN BESPREKING	79
4.4.1	Ensiemaktiwiteit van die ru-ekstrakte	79
4.4.2	C ₆ /C ₁ -verhoudings	84
4.5	ROBERTS SE HIPOTESE	87
4.6	OPSOMMING	89

4.1 INLEIDING

Die oksidatiewe pentosefosfaatweg staan sentraal in die veel besproke hipotese van Roberts (1969) wat handel oor die meganisme waardeur die dormansie van sade opgehef word. Daarom is 'n kort studie van die PP-weg van dormante en kiemingsgeïnduseerde *Strelitzia juncea* sade onderneem, en die resultate sal onder 4.5 aan die hand van die hipotese bespreek word.

Oor die algemeen wil dit voorkom asof daar oor die presiese funksie van die PP-weg in plante gespekuleer word. Dit word egter algemeen aanvaar dat die PP-weg primêr benodig word vir die sintese van NADPH wat as waterstofskenker vir die reduksiestappe van biosintetiese weë benodig word (Turner & Turner, 1980). Ander belangrike funksies is waarskynlik die voorsiening van pentosefosfaatverbindings, veral D-ribose-5-fosfaat vir nukleotied- en nukleïensuursintese; en D-eritrose-4-fosfaat wat as uitgangsverbinding in die sjikimiensuur biosintetiese weg benodig word. Die funksionering van laasgenoemde weg kan uiteindelik tot die sintese van aromatiese aminosure en lignien lei (Goodwin & Mercer 1983). Volgens Ashihara & Matsumura (1977) het die toediening van gemerkte glukonaat of ribose aan *Phaseolus mungo* saailinge tot die sintese van gemerkte RNA gelei.

'n Literatuuroorsig wat oor nie-dormante sade handel (Bewley & Black 1978), toon dat G6PDH- en 6PGDH-aktiwiteite tydens kieming toeneem en dat dit gepaard gaan met 'n afname in glikolitiese ensiemaktiwiteite. Sutcliffe & Sexton (1974) volgens Roberts & Smith (1977) het 'n verband tussen selverlenging in wortels en die aktiwiteit van die PP-weg gevind. In hulle kritiese literatuurbespreking kom Turner & Turner (1980) tot die gevolgtrekking dat die PP-weg in plante vir uiters 30% van die totale respirasie (as CO₂-vrystelling) verantwoordelik is en dat glikolise die hoofmetaboliese roete vir die oksidering van glukose-6-fosfaat is.

In hierdie studie is 'n maatstaf van die funksionering van die pentosefosfaatweg verkry deur die aktiwiteit van die eerste twee PP-weg ensieme, nl. G6PDH en 6PGDH, te bepaal. 'n Poging is ook aangewend om deur die toediening van radio-isotope vas te stel of dormansie-opheffing deur suurstof tot 'n verhoogde PP-weg metabolisme in *Strelitzia juncea* embryo's lei.

4.2 MATERIAAL EN METODEDES

4.2.1 Bereiding van 'n ru-ekstrak

'n Ru-ekstrak van die embryo's van *Strelitzia juncea* sade wat vir verskillende tye geïnkubeer is, is berei soos vir die bepaling van sitosoliese ensiemekstrakte beskryf is (3.2.1; p 26). Die ekstraksiemedium nl. 0,1 mol. dm³ TRIS-HCl pH 7,4 het sukrose (finale konsentrasie 0,4 mol. dm³) bevat maar nie DTT nie, vanweë die moontlike invloed wat dit op die G6PDH-aktiwiteit kon gehad het (Dennis & Miernyk 1982 se bespreking). Die bovloeistof is vir die bepaling van die aktiwiteite van G6PDH en 6PGDH gebruik.

Drie embryo-ekstrakte van lugsade asook drie ekstrakte van suurstofsade is berei vir elkeen van die saadinkuberingsdae 1, 2, 3 en 4. Die gemiddelde aktiwiteit en die standaardafwyking word in die grafieke aangetoon.

Sowat een jaar na verloop van die hierbogenoemde eksperiment is 'n opvolgekperiment uitgevoer. Ensiembepalings is vir een embryo-ekstrak van lugsade en een vir suurstofsade vir elkeen van die inkuberingsdae 1 en 4 uitgevoer, asook vir lugdroë sade. Op elkeen van die inkuberingsdae 1 en 4 van hierdie eksperiment, is die bovloeistof van die embryo-ekstrakte gebruik om die volgende mengsels te berei:

- (a) 5 cm³ bovloeistof (lugsade) + 5 cm³ ekstraksiemedium;
- (b) 5 cm³ bovloeistof (suurstofsade) + 5 cm³ ekstraksiemedium;
- (c) 5 cm³ bovloeistof (lugsade) + 5 cm³ bovloeistof (suurstofsade).

Die G6PDH- en 6PGDH-aktiwiteit van hierdie mengsels is op die volgende wyses bepaal.

4.2.2 Bepaling van ensiemaktiwiteite van G6PDH en 6PGDH in ru-ekstrakte

Vir die essaiëring van glukose-6-fosfaatdehidrogenase (G6PDH) en 6-fosfoglukonaatdehidrogenase (6PGDH) is vasgestel dat die volgende essaiëringmedium, gebaseer op dié van Gosling & Ross (1979), 'n reglynige verband tussen ekstrakvolume en aktiwiteit gegee het: $20 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ K-fosfaatbuffer pH 7,5; $5,0 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ Mg Cl₂; $1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ NADP en ekstrak.

Die reaksie vir G6PDH-bepaling is begin deur die byvoeging van Na₂-D-glukose-6-fosfaat (Boehringer) met 'n finale konsentrasie van $3,0 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$. Die totale reaksievolume was telkens $3,0 \text{ cm}^3$ in 'n kuvet met 1 cm deursnee. Die reaksieverloop is gevolg deur die absorpsieverandering by 340 nm met behulp van 'n Cary 219 spektrofotometer by 25°C te meet.

4.2.3 Bepaling van die C₆/C₁-verhouding

4.2.3.1 Diepskuurbehandeling van die sade

Omdat probleme voorsien is met die indringing van metaboliete in die sade tot by die embryo's, is die sade aan 'n diepskuurbehandeling onderwerp. *Strelitzia juncea* sade is net voor die ontsmettingsbehandeling (kyk 2.2, p 8) vir inkubering, met behulp van 'n Emery-skuurwiel parallel aan die lengte-as van die sade geskuur sodat die breë vlak aan die een kant van die saad se endosperm tot amper teen die embryo weggeskuur is.

Ná die diepskuurbehandeling is die sade ontsmet en met lug of suurstof geïnkubeer soos reeds beskryf (kyk 2.2). Slegs 2 flesse per behandeling is vir kiemingstudies gebruik en gemiddelde waardes bepaal.

4.2.3.2 Toediening van radio-aktiewe metaboliete

D-glukose-(1-¹⁴C) en D-glukose-(6-¹⁴C) is vanaf Amersham, Engeland verkry.

Diepgeskuurde sade is na 3 dae inkubering na 18 cm^3 Gilson respirometerflesse oorgedra (5 sade per fles). Ses van die

flesse het elk 'n 2,0 cm³ steriele oplossing van 16,8 nmol.cm⁻³ D-glukose (1- ¹⁴C gemerk) met spesifieke aktiwiteit van 2,2 GBq.mmol⁻¹ bevat. Ses ander flesse het elk 'n 2,0 cm³ steriele oplossing van 18,97 nmol.cm⁻³ D-glukose (6- ¹⁴C gemerk) met spesifieke aktiwiteit 1,95 GBq.mmol⁻¹ bevat. In elke flesput was 300 mm³ 8% KOH-oplossing. Die flessies is direk na byvoeging van die sade verseël en vir 1 uur by 25°C geskud teen 100 ossilasies per minuut.

Drie herhalings vir lugsade en drie herhalings vir suurstofsade is vir die 1- ¹⁴C-bepaling uitgevoer, en net so vir die 6- ¹⁴C-bepaling.

Na verloop van een uur inkubering in die gemerkte oplossings, is 200 mm³ KOH-oplossing uit elke flesput verwyder en vinnig met 4,0 cm³ Aquagel (Chemlab, Johannesburg) vermeng. Die aktiwiteit is met behulp van 'n Tricarb vloeistof-flikkerteller bepaal.

Geen noemenswaardige aktiwiteit bo dié van die agtergrond kon gevind word nie en dit kon volgens gebruikmaking van die interne standaard van die apparaat nie aan blussing toegeskryf word nie. Vanweë die nadelige invloed wat diepskuurbehandeling op die kieming van die sade gehad het, is geen verdere pogings om die C₆/C₁-verhouding te bepaal, uitgevoer nie.

Moontlik sou indringing van die gemerkte glukose met blootstellingstye van langer as 1 uur verkry kon word. 'n Ander benadering sou wees om die sade normaalweg te ontsmet en te inkubeer en dan net voor toediening aan 'n diepskuurbehandeling te onderwerp. Bogenoemde benaderings is nie in hierdie studie toegepas nie, maar behoort vir 'n opvolgstudie oorweeg te word.

4.3 BEREKENINGS

Na aanleiding van Gosling & Ross (1979) se kommentaar, is die G6PDH-aktiwiteit bereken deur die tempo van NADP-reduksie te halveer aangesien die 6PGDH-aktiwiteit in hierdie ekstrakte ook hoër as die G6PDH-aktiwiteit was.

Die volgende formules is gebruik:

vir G6PDH:

$$f(A^*EFGIJ) = \frac{(\tan A^*)^{-1} \times ExGxIx0,0096 \times 0,16077 \times 50}{2 \times F \times J} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} 50 \text{ emb}^{-1}$$

waar die simbole hulle gewone betekenis het (kyk 2.3).

Vir 6PGDH is die berekening soos hierbo uitgevoer, behalwe dat die deler slegs (F x J) was.

4.4 RESULTATE EN BESPREKING

4.4.1 Ensiemaktiwiteit van die ru-ekstrakte

Indien *in vitro* aktiwiteit van die ru-ekstrakte 'n maatstaf vir die *in vivo* situasie is, sou afgelei kon word dat die suurstof-behandeling waarskynlik 'n stimulering van die pentosefosfaatweg tot gevolg gehad het (Figuur 4.1). Die G6PDH-aktiwiteit van die embryo-ekstrakte van lugsade het so te sê oor die vier inkuberings-dae konstant gebly, terwyl dit by die suurstofsade effens hoër was en geleidelik oor die vier inkuberingsdae toegeneem het.

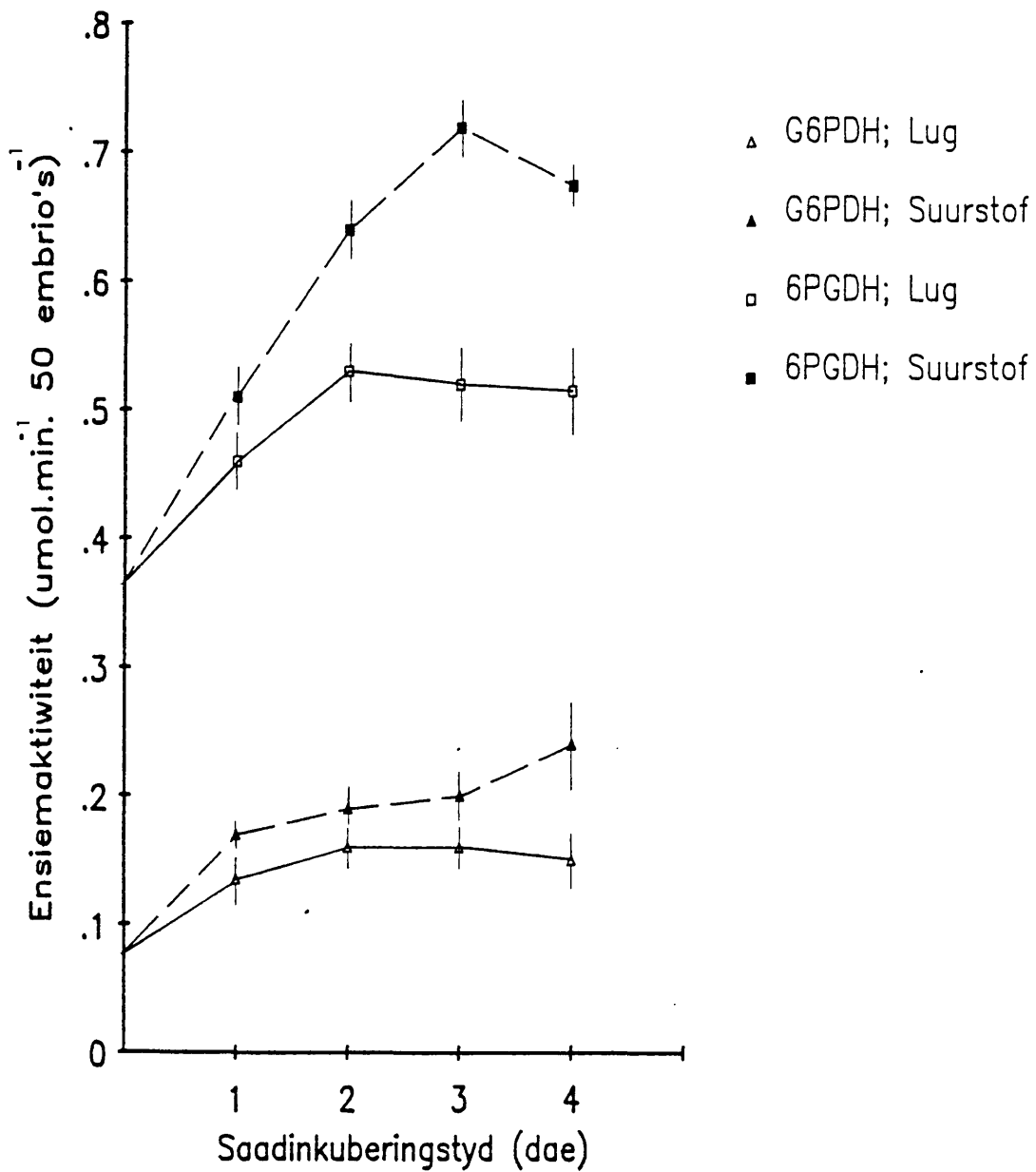
Die profiel hierbo toon sekere ooreenkomste met die resultate wat met *Corylus avellana* saadlobbe verkry is (Gosling & Ross, 1980). In hierdie saadlobbe het die G6PDH-aktiwiteit geleidelik oor maande van inkubering toegeneem by sowel dormante sade (20°C inkubering) as by sade onder kiemingsinduktiewe toestande (5°C inkubering). Na sowat 2 maande egter was die profiel soos vir *S. juncea* embryo's: die G6PDH-aktiwiteit van die sade onder induktiewe koue stratifisering het toegeneem terwyl die aktiwiteit by die dormante sade onder nie-induktiewe "warm" stratifisering konstant gebly het.

Hierteenoor het Adkins & Ross (1981) 'n toename in G6PDH-aktiwiteit na 2 maande inkubering by dormante *Avena fatua* sade (5°C inkubering) relatief tot kiemingsgeïnduseerde sade (25°C inkubering) gevind.

Die ander beskikbare literatuur wat betrekking het op dormansieverbreking en PP-weg ensiemaktiwiteit (Kovacs & Simpson 1976, Nicolas & Aldasoro 1979, Swamy *et al.* 1980) het onder kritiek van Adkins & Ross (1981) of Bewley & Black (1982) deurgeloop deurdat ensiembepalings òf na afloop van naryping òf op gekiemde sade uitgevoer is en dus eintlik nie op dormansie-studies van toepassing is nie. Die kritiek dat bepalinge op gekiemde sade uitgevoer is, geld nie vir hierdie werk met *Strelitzia juncea* nie, aangesien bepalinge op inkuberingsdae 1 tot 4 gedoen is terwyl radikulaverskyning eers op inkuberingsdag 5 'n aanvang begin neem. Dit mag egter wees dat die waargenome vroeë toename in G6PDH-aktiwiteit op dag 1 'n sekondêre verskynsel is wat die gevolg is van ander vroeëre prosesse wat deur suurstofinkubering geïnisieer is.

Die enigste toepaslike literatuur waarmee die *Strelitzia juncea* resultate vergelyk kan word, blyk dus dié van Adkins & Ross (1981) en Gosling & Ross (1980) te wees, soos reeds bespreek. Kommentaar op laasgenoemde outeurs se *Corylus avellana* werk, is dat die veranderings in G6PDH-aktiwiteit vir saadlobbe waargeneem is en dat dit moontlik nie relevant vir dormansieverbreking en respiratoriese metabolisme van die embrionale assie is nie (Bewley & Black 1982). By *Strelitzia juncea* vorm die embrionale assie en die saadlob een aaneenlopende struktuur (Van de Venter 1974 vir *Strelitzia reginae*) wat in geheel vir die ekstrahering van ensieme gebruik is. Dit kan dus nie afgelei word of die waargenome veranderings in ensiemaktiwiteit aan veranderings in die assie of saadlob of aan albei toegeskryf moet word nie.

Dit blyk dus dat die G6PDH-aktiwiteit by sowel *Corylus avellana* (Gosling & Ross 1980) as by *Avena fatua* sade (Adkins & Ross 1981) onder koue stratifisering gestyg het, alhoewel hierdie behandeling induktief vir eersgenoemde spesie is maar dormansie by die laasgenoemde spesie handhaaf. Die enigste toepaslike literatuur kan dus netsowel tot die gevolgtrekking lei dat 'n toename in G6PDH-aktiwiteit met lae-temperatuur-inkubering verband hou eerder as met dormansieverbreking.



Figuur 4.1. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die glukose-6-fosfaatdehidrogenase (G6PDH)- en 6-fosfoglu-konaatdehidrogenase (6PGDH)-aktiwiteit van *Strelitzia juncea*-embrio's wat na verskillende tye van saadinkubering geëkstra-heer is.

Wat die 6PGDH-aktiwiteit betref, was dit by die embryo-ekstrakte van lugsade min of meer konstant oor die vier inkuberingsdae behalwe vir 'n toename van dag 1 na dag 2 (Figuur 4.1). Soos in die geval van die G6PDH-aktiwiteit, was ook die 6PGDH-aktiwiteit vir die embryo-ekstrakte van suurstofsade deurgaans hoër en was daar 'n stygende tendens oor die 4 dae. Persentasiegewys egter, was die toename in 6PGDH-aktiwiteit van die embryo's as gevolg van dormansieverbreking deur suurstof feitlik dieselfde as die toename in die G6PDH-aktiwiteit.

Die toename in 6PGDH-aktiwiteit as gevolg van suurstofbehandeling stem ooreen met die situasie vir *Corylus avellana* saadlobbe (Gosling & Ross 1980) waar dormansieverbreking deur "koue" stratifisering tot 'n toename in 6PGDH-aktiwiteit gelei het. Vir *Avena fatua* embryo-ekstrakte kon geen duidelike toename in die 6PGDH-aktiwiteit as gevolg van dormansieverbrekende "warm" stratifisering oor die eerste 3 maande gevind word nie (Adkins & Ross 1981). Die outeurs het dit daaraan toegeskryf dat 6PGDH nie onder sterk kontrole is nie omdat dit nie die eerste temporegulerende ensiem van die oksidatiewe pentosefosfaat-metaboliese weg is nie. Die begrip van 'n "temporegulerende ensiem" geniet tans baie aandag en 'n sterk saak word daarvoor uitgemaak dat 'n metaboliese sisteem as geheel eerder as 'n enkele ensiem vir die reële vloed deur die metaboliese weg verantwoordelik is (Crabtree & Newsholme 1985, Masters 1985). In die geval van *Strelitzia juncea* sade het sowel die 6PGDH-aktiwiteit as die G6PDH-aktiwiteit gestyg vanweë suurstofbehandeling, alhoewel slegs laasgenoemde as "temporegulerend" vir die PP-weg beskou word.

Literatuur bestaan waarvolgens hoër G6PDH- as 6PGDH-aktiwiteit in weefsel verkry is (kyk Gosling & Ross 1979) maar in die embryo-ekstrakte van *Strelitzia juncea* was die 6PGDH/G6PDH-aktiwiteitsverhouding ≥ 3 . Geen noemenswaardige verskil in hierdie verhouding kon vir die embryo's van lug- en suurstofsade vir 'n bepaalde inkuberingstyd gevind word nie. Vir gedeeltelik gesuiwerde ekstrakte van *Corylus avellana* saadlobbe was die genoemde verhouding *ca* 4 (uit Gosling & Ross 1980 se data) terwyl dit

vir die gesuiwerde ensieme ca 12 was (Gosling & Ross 1979). Vir die gedeeltelik gesuiwerde ekstrakte van *Avena fatua* embryo's was die verhouding ca 2 (Adkins & Ross 1981) en vir die gesuiwerde ensieme was dit ca 5 (Adkins *et al.* 1980). Die 6PGDH/G6PDH-aktiwiteitsverhouding wat vir ongesuiwerde *Strelitzia juncea* embryo-ekstrakte verkry is, vergelyk dus goed met die aangehaalde waardes vir gedeeltelik gesuiwerde ekstrakte.

Gosling & Ross (1979) kon nie aflei of die hoër 6PGDH-aktiwiteit van die gesuiwerde ekstrakte aan 'n hoër konsentrasie 6PGDH as G6PDH toegeskryf moes word en of dit die gevolg van 'n doeltreffender katalitiese sentrum van 6PGDH kon wees nie. Die outeurs (Gosling & Ross 1979) waarsku egter dat "... conclusions based solely on C_6/C_1 decarboxylation ratios, or only on uncharacterized enzymes present in crude extracts, must be treated with reservation". Waar Ross en sy groep 'n NADP-reduksie onafhanklik van die substrate D-glukose-6-fosfaat of D-6-fosfoglukonaat gevind het, was daar geen sodanige agtergrondreduksie van NADP in enigeen van die *Strelitzia juncea* embryo-ekstrakte teenwoordig nie. Nogtans moet die klein maar reële toename in die G6PDH- en 6PGDH-aktiwiteite as gevolg van suurstofbehandeling van die *Strelitzia juncea* sade met voorbehoud as 'n toename in pentosefosfaat-oksidatiewe metabolisme geïnterpreteer word. Die aktiwiteitsverskille mag egter bloot as gevolg van ekstraksamestelling wees en nie die *in vivo* situasie verteenwoordig nie.

In die verband is die resultate wat in die laaste eksperiment oor die vermenging van ekstrakte verkry is (4.2.1, p 75), van belang (Tabel 4.1). Die aktiwiteite van G6PDH en 6PGDH vir suurstofsade was weer eens hoër as vir lugsade, alhoewel die verskille kleiner was vir hierdie saadlot en die vermenging van bovloei-stowwe het gelei tot aktiwiteitswaardes wat in ooreenstemming was met die verwagte numeriese som van die bovloei-stowwe se afsonderlike aktiwiteite. Voorlopig kan die afleiding gemaak word dat die hoër PP-ensiemaktiwiteite van die suurstofsade die gevolg van hoër ensiemkonsentrasie is.

Tabel 4.1 Die invloed van die vermenging van bovloei-stowwe van embrio-ekstrakte van lug- en suurstofbehandelde sade op die G6PDH- en 6PGDH-ensiemaktiwiteite

Bovloei-stofverduunning (1:1) of bovloei-stofvermenging (1:1) van embrio-ekstrakte:	Saadinkuberingstyd			
	Dag 1		Dag 4	
	Ensiemaktiwiteit as $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 50 embrio's ⁻¹ van:			
	G6PDH	6PGDH	G6PDH	6PGDH
Lug + medium	0,131 ± 0,004 ^a	0,472 ± 0,016	0,118 ± 0,005	0,413 ± 0,033
Suurstof + medium	0,141 ± 0,002	0,495 ± 0,013	0,184 ± 0,018	0,562 ± 0,003
Numeriese totaal	0,272 ± 0,004	0,967 ± 0,021	0,302 ± 0,019	0,975 ± 0,033
Lug + suurstof	0,265 ± 0,017	0,953 ± 0,048	0,304 ± 0,018	0,956 ± 0,039

a : gemiddeld van 3 bepalings ± standaardafwyking

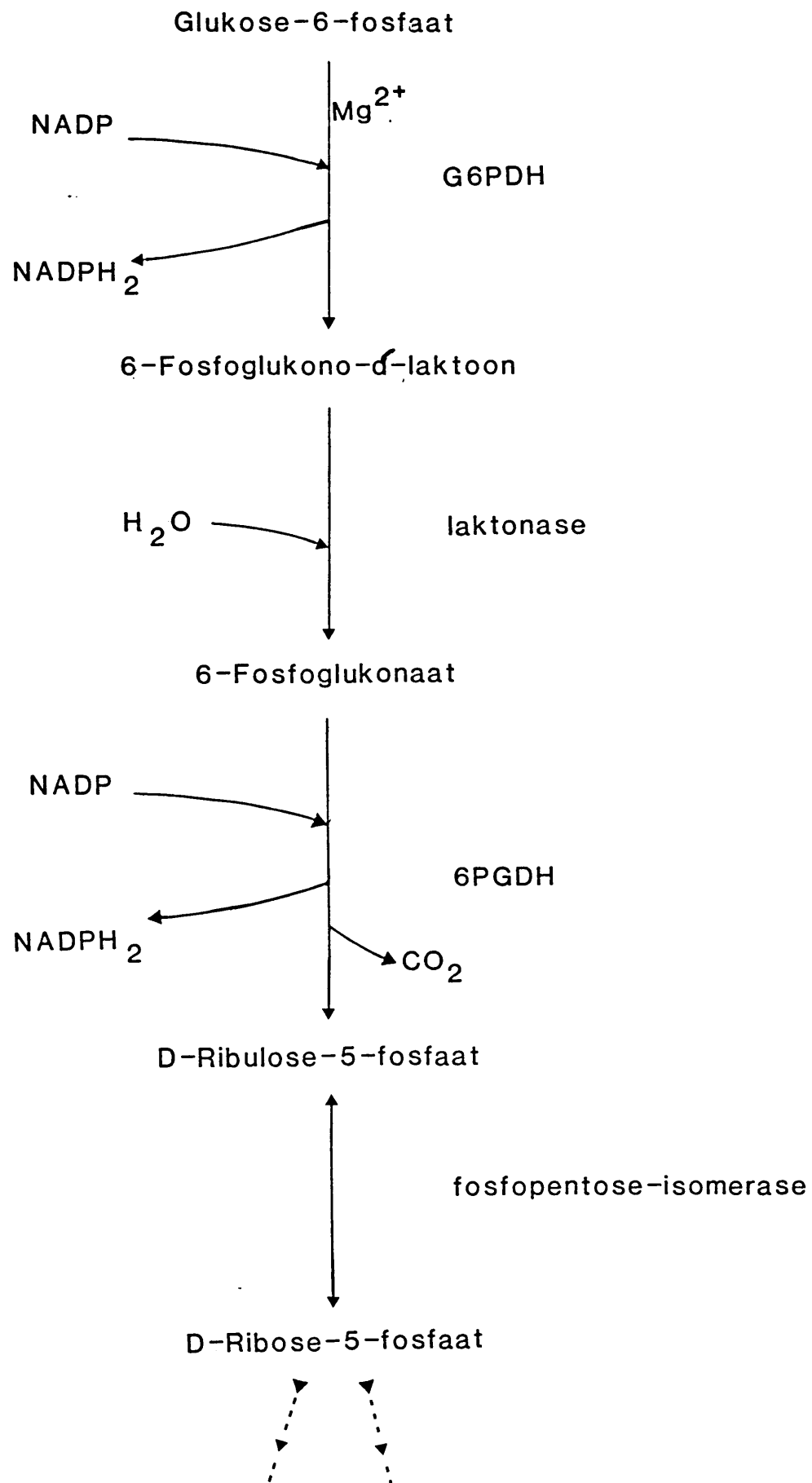
Geen G6PDH- of 6PGDH-aktiwiteit kon in die neerslag (23 000 g sentrifugering) waargeneem word nie; die optiese digtheid van die neerslagsuspensie het egter groot verdunnings daarvan genoodsaak waardeur die bepaling van lae ensiemaktiwiteite baie bemoeilik word. Dit is bekend dat 6PGDH in die organellêre fraksie van sade kan voorkom (Gosling & Ross 1980).

Onder die inleiding (4.1) is genoem dat een van die funksies van die PP-weg die sintese van ribose-5-fosfaat vir nukleotied-sintese (bv. ATP) is, soos wat dit in Figuur 4.2 toegelig word. Die klein toename in G6PDH-aktiwiteit op saadinkuberingsdag 1 (Figuur 4.2) se implikasie vir die toename in die adenilaatpoel van *Strelitzia juncea* embrio's word later bespreek (kyk 6.4.4; p 177).

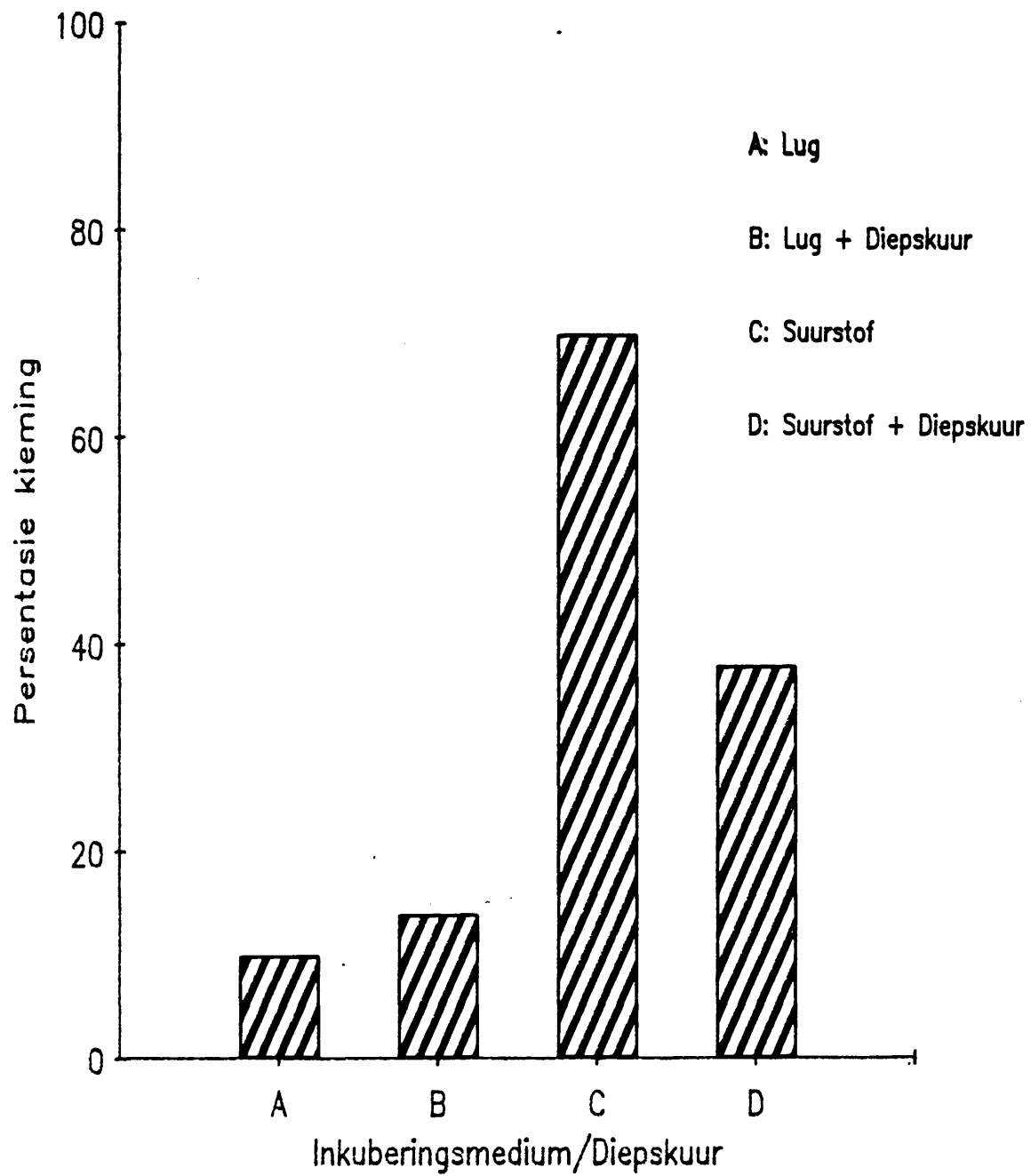
4.4.2 C₆/C₁-verhoudings

Soos reeds onder 4.2.2 gemeld, kon geen ¹⁴CO₂-vrystelling waargeneem word na 1 uur inkubering in ¹⁴C-gemerkte D-glukose-oplossings van *Strelitzia juncea* lug- of suurstofsade nie. Daar is reeds na ander moontlike benaderings verwys waarop die probleem oorkom kan word. Die diepskuurtegniek het 'n nadelige uitwerking op die kieming van die sade gehad (Figuur 4.3). Laasgenoemde resultaat is moeilik verklaarbaar; moontlik hou dit verband met die drastiese ontsmettingstegnieke wat op die geskuurde sade toegepas is.

'n Ander benadering sou kon wees om embrio's uit die sade te verwyder en dit aan gemerkte oplossings bloot te stel. Die nadeel hieraan verbonde is dat die embrio's aan 'n onnatuurlike suurstofregime blootgestel kan word en dat die pentosefosfaat-metabolisme daardeur beïnvloed kan word. Badenhorst (1982) het wel so 'n studie onderneem deur embrio's na drie dae saadinkubering uit die sade te verwyder en vir 1 uur aan gemerkte glukose-oplossings bloot te stel. Geen verskil in die C₆/C₁-verhouding van ca 0,5 is vir embrio's van lug- en suurstofsade gevind nie maar die embrio's van die suurstofsade het 'n groter ¹⁴CO₂-vrystellingstempo getoon met sowel D-glukose -(1-¹⁴C)- as D-glukose-(6-¹⁴C)-oplossings. Haar afleiding was dat sowel die PP-weg as die EMP-weg deur suurstofbehandeling gestimuleer is.



Figuur 4.2. 'n Voorstelling van 'n gedeelte van die pentosefosfaatweg.



Figuur 4.3. Die invloed van die inkubering van *Strelitzia juncea*-sade in 'n lug- of suurstofatmosfeer en van 'n diepskuurbehandeling op die persentasie kieming na 14 dae van inkubering.

Op die moontlike kritiek teen die tegniek, en afleidings oor die C_6/C_1 -verhouding (Bewley & Black 1982) sal nie ingegaan word nie aangesien geen suksesvolle indringing van die gemerkte verbindings in hierdie studie verkry is nie.

4.5 ROBERTS SE HIPOTESE

Die hipotese van Roberts (1969) het veral betrekking op hierdie studie omdat dit 'n verklaring bied vir die dormansieverbreking van sekere plantsoorte se saad deur suurstof. Volgens die hipotese speel die oksidatiewe pentosefosfaatmetabolisme 'n sleutelrol in die opheffing van dormansie en die resultate hierbo het dus betrekking.

Kortliks kom die hipotese daarop neer dat die PP-weg in dormante sade nie kan funksioneer nie omdat die benodigde koënsiem NADP in gereduseerde vorm teenwoordig is en dat oksidasie van hierdie NADPH deur suurstof bewerkstellig moet word. Verder word gepostuleer dat die oksidase hiervoor 'n laer affiniteit vir suurstof as sitochroomoksidase het. Onder toestande van suurstofspanning, soos wat waarskynlik in dormante sade aangetref word, sal al die beskikbare suurstof in die saad vir cyt ox-gekataliseerde NADH-oksidasie benut word. NADPH kan gevolglik nie geoksideer word nie, die PP-weg kan nie funksioneer nie en die saaddormansie word gehandhaaf.

Bogenoemde hipotese bied 'n goeie verklaring vir die verskynsel dat sowel suurstofbehandeling van sekere soorte "sade" (rys, hawer), as behandeling met remstowwe vir cyt ox (asied, sianied, ens.) tot opheffing van dormansie kan lei. Blokkering van cyt ox-bemiddelde oksidasie deur remstofoediening kan tot kanalisering van suurstof vir NADPH-oksidasie lei. Remstofoediening sal dus nie noodwendig tot 'n verhoogde suurstofopnametempo lei nie. Die verskynsel dat sekere N-bevattende verbindings soos nitrate, nitriete en metileenblou tot die opheffing van dormansie kan lei, is volgens die hipotese daaraan toe te skryf dat die verbindings as elektronontvangers in die oksidering van NADPH kan optree.

Toediening van die genoemde N-verbindings het nie dormansie-verbreking van *Strelitzia reginae* veroorsaak nie en ook nie die respiratoriese remstowwe CO₂, sianied- of asiedoplossings nie (Van de Venter 1974). Hieruit kan afgelei word dat Roberts se hipotese waarskynlik nie op die dormansie van *Strelitzia* spp. se sake betrekking het nie. Tog moet die onlangse literatuur in ag geneem word dat die toedieningstegniek wat in die verlede toegepas is, nie altyd kon kompenseer vir die swak indringingsvermoë, vlugtigheids-, stabiliteits- en pH-eienskappe van hierdie verbindings nie (Pradet 1982; Chin & Lee 1980).

Die hipotese dat dormansieverbreking tot verhoogde PP-weg-aktiwiteit moet lei, impliseer nie noodwendig dat die aktiwiteit van G6PDH of 6PGDH moet verhoog nie. Olosuyi (1973) volgens Roberts & Smith (1977) kon geen verskil in die genoemde ensiem-aktiwiteite vir diaspore van hawer vind nie; daaruit het die skrywers afgelei dat die ensieme nie beperkend is vir PP-weg aktiwiteit in hawerdiaspore nie. Benewens die reeds bespreekte werk van Gosling & Ross (1980), en die resultate wat hier vir *Strelitzia juncea* sake aangebied word, kon geen ander literatuur oor die toename in G6PDH- of 6PGDH-aktiwiteit in sake voor kieming as gevolg van dormansie-opheffing gevind word nie.

Vroeëre literatuur oor C₆/C₁-verhoudings met betrekking tot dormansieverbreking, het sterk op die betrokkenheid van die PP-weg gedui volgens die oorsig van Roberts & Smith (1977). Latere bevindings egter, is dat volgens C₆/C₁-bepalings daar geen verband tussen PP-weg aktiwiteit en dormansieverbreking by *Avena fatua* (Fuerst *et al.* 1983) bestaan nie en dat dormansieverbreking by hierdie spesies deur asied, nitraat en nitriet moontlik met sianiedongevoelige respirasie verband hou (Adkins *et al.* 1984). Vir *Spergula arvensis* sake het C₆/C₁-verhoudings eerder op 'n afname in PP-weg aktiwiteit as gevolg van dormansieverbreking deur etileen gedui (Jones & Hall 1981). Die huidige stand van sake met betrekking tot die hipotese word goed deur Bewley & Black (1982) weergegee: "Certainly, credit is due to Roberts for deriving a working model from the myriad of seemingly

unrelated observations. However, we feel that the evidence is not strong enough for the hypothesis to have been accepted to the extent that it has."

Opsommend dus, die waargenome toename in G6PDH- en 6PGDH-aktiwiteit op 'n vroeë stadium van inkubering met suurstof, sou kon inpas in die gestelde hipotese van Roberts, maar kan nie as 'n bevestiging daarvan gesien word nie.

4.6 OPSOMMING

Alhoewel die kieming van suurstofbehandelde *S. juncea* sade eers na 5 dae inkubering 'n aanvang begin neem, kon 'n toename in die G6PDH- en 6PGDH-aktiwiteite in die embryo-ekstrakte reeds op dag 1 waargeneem word. Die toename is waarskynlik die gevolg van 'n hoër ensiemkonsentrasie in die embryo's van die suurstofbehandelde sade. Die verhouding van 6PGDH- tot G6PDH-aktiwiteit was ongeveer 3/1. Suurstofbehandeling het gelei tot 'n geleidelike toename in die aktiwiteit van die ensieme oor die eerste vier inkuberingsdae terwyl dit vir die lugsade min of meer konstant was of afgeneem het. Ensiemaktiwiteit kon reeds in die droë sade aangetoon word. Die resultate sou kan inpas by Roberts se hipotese. Tegnieke aspekte bemoeilik die bepaling van die C_6/C_1 -verhouding by *S. juncea* sade.

HOOFSTUK 5DIE INVLOED VAN DORMANSIEVERBREKING DEUR SUURSTOF OP DIE AKTIWITEIT VAN BEPAALDE MITOCHONDRIALE ENSIEME VAN DIE EMBRIO'S VAN STRELITZIA JUNCEA-SADE

5.1	INLEIDING	93
5.2	ISOLERING VAN MITOCHONDRIONS	96
5.3	SUKSINAATDEHIDROGENASE-AKTIWITEIT (SDH)	99
5.3.1	Materiaal en metode	99
5.3.1.1	Literatuuroorsig oor die SDH-bepalingsmetode	100
5.3.1.2	Die finale prosedures vir die bepaling van die SDH-aktiwiteit	103
(a)	Samestelling van reaksiemengsel (volgens Singer 1974)	103
(b)	Samestelling van blankoreaksiemengsel	104
(c)	Gedeeltelike aktivering by 15°C (voorafinkubering by 15°C)	104
(d)	Aktivering by 30°C (voorafinkubering by 30°C) ...	104
(e)	Geen aktivering by 15°C	104
(f)	Bepaling van die reaksietempo	105
(g)	Invloed van die remstof oksalo-asetaat	105
(h)	Aantal herhalings gebruik	105
5.3.2	Berekening van SDH-aktiwiteit	106
5.3.3	Resultate en bespreking	107
5.3.3.1	Die agtergrondreaksietempo van DCIP	107
(a)	Die agtergrondreaksietempo van mitochondriale N ₃ -fraksies	108
(b)	Die agtergrondreaksietempo van bovloeistof-fraksies (S ₂)	110
5.3.3.2	Die invloed van ensiemaktivering by 15°C op die SDH-reaksietempo van die mitochondriale fraksies	114
5.3.3.3	Die invloed van PMS-konsentrasie- en aktivering by verskillende temperature op die SDH-aktiwiteit	119

5.3.4	Opsomming	129
5.4	SITOCROOMOKSIDASE-AKTIWITEIT (cyt ox)	129
5.4.1	Materiaal en metode	129
5.4.2	Berekening van cyt ox-aktiwiteit	131
5.4.3	Resultate en bespreking	134
5.4.3.1	Bovloeistof se cyt ox-aktiwiteit	136
5.4.3.2	Totale cyt ox-aktiwiteit	136
5.4.3.3	Totale mitochondriale cyt ox-aktiwiteit	139
5.4.3.4	Cyt ox-aktiwiteit van die mitochondriale fraksies afsonderlik	140
5.5	MALAATDEHIDROGENASE-AKTIWITEIT (MDH)	141
5.5.1	Materiaal en metode	141
5.5.2	Berekening van MDH-aktiwiteit	142
5.5.3	Resultate en bespreking	143
5.5.3.1	MDH van bovlloeistof	143
5.5.3.2	Totale MDH-aktiwiteit	145
5.5.3.3	MDH van totale mitochondriale fraksies	146
5.5.3.4	Mitochondriale fraksies afsonderlik	147
5.5.3.5	MDH/cyt ox-aktiwiteitsverhoudings	147
5.5.3.6	Oorsigtelike bespreking van cyt ox en MDH	150
5.6	ISOSITRAATDEHIDROGENASE-AKTIWITEIT (ICDH)	152
5.6.1	Materiaal en metodes	152
5.6.2	Resultate en bespreking	153
5.7	FUMARASE-AKTIWITEIT	153
5.7.1	Materiaal en metode	153
5.7.2	Resultate en bespreking	154

5.8	GLIOKSISOMALE ISOSITRAATLIASE-AKTIWITEIT (ICL) ..	154
5.8.1	Materiaal en metode	154
5.8.2	Resultate en bespreking	155
5.9	SAMEVATTENDE BESPREKING	155

5.1 INLEIDING

'n Geheelbeeld van die respiratoriese metabolisme van sade kan sekerlik nie verkry word sonder om ook 'n studie van mitochondriale funksionering te maak nie.

Behalwe vir een verwysing na ongepubliseerde resultate (Bewley & Black 1982), kon geen literatuur oor die mitochondrions met betrekking tot die dormansie van sade in onlangse literatuur-oorsigte gevind word nie. Gevolglik is van literatuur oor die mitochondrions van nie-dormante sade gebruik gemaak vir die interpretering van die verkreë resultate. Bogenoemde literatuur handel gewoonlik oor vinnig-kiemende sade, terwyl by die kiemingsgeïnduseerde *Strelitzia juncea* sade, kieming eers 'n aanvang op die vyfde inkuberingsdag neem. Dit bemoeilik die interpretering van die resultate, aangesien dit nie duidelik is watter inkuberings tyd van vinnig-kiemende sade (bv. *Phaseolus mungo* met bv. dag 2-geïnkubeerde *S. juncea*-sade in verband gebring moet word nie. Volgens Pradet (1982) moet voorkiemingsverskynsels relatief tot radikulaverskyning gesien word.

Daar is twee benaderings tot die bestudering van mitochondriale aktiwiteit. Ten eerste kan die mitochondrion as 'n funksionele eenheid bestudeer word deur middel van sekere parameters soos P/O-verhouding, suurstofopname as gevolg van substraatoksidering en respiratoriese kontrole-waardes. Die tweede benadering is in hierdie studie gevolg, nl. die bestudering van mitochondriale ensiemaktiwiteit.

Vir die eerste benadering is dit belangrik om hoë-kwaliteit mitochondrions te isoleer en in mitochondrion-isoleringsprosedures word van 'n groot hoeveelheid weefsel gebruik gemaak ten einde 'n klein persentasie hoë-kwaliteit mitochondrions te isoleer (Jackson & Moore 1979). Die meeste literatuur oor mitochondrion-isolering maak van sodanige metodes gebruik. In hierdie studie is gepoog om 'n kwantitatiewe bepaling van die mitochondriale ensiemaktiwiteite te maak en gevolglik is toegesien dat al die weefsel vir 'n ekstrak gehomogeniseer word.

Daardeur is die kans vir mitochondrionbeskadiging egter des te groter, sodat 'n relatief groot persentasie van die aktiwiteit in die bovloei-stof-fraksie kan voorkom.

Volgens 'n literatuuroorsig van Moróhashi (1978) oor die respiratoriese metabolisme van sade tydens hidrering, neem die mitochondriale ensiemaktiwiteite tydens imbibering toe, terwyl die glikolitiese ensiemaktiwiteite min verandering toon. Verder is die aktiwiteite van die mitochondriale ensieme baie laer as dié van die ondersoekte glikolitiese ensieme. Dit wil dus voorkom asof die mitochondriale aktiwiteit tempobepalend vir die katabolisme van glukose is. Aangesien die tempo van oksidering van malaat en suksinaat deur ongeskonde mitochondrions vinniger toeneem tydens imbibisie as wat die malaatdehidrogenase- en suksinaatdehidrogenase aktiwiteite toeneem, word afgelei dat die elektronoordragsisteam (EOS) die eintlike beperkende faktor vir die respirasie van imbiberende sade is.

Pradet (1982) stel in sy oorsig voor dat sekere gedeeltes van die EOS alreeds in droë sade voorkom, nl. NADH-ubikinoon-reduktase en suksinaat-ubikinoon-reduktase. Alhoewel die oksidering van NADH en suksinaat deur mitochondrions tydens imbibisie vinnig toeneem, word soms swak oksidering van NAD-gekoppelde substrate vir die matriksensieme gerapporteer.

'n Kontensieuse saak in verband met mitochondriale aktiwiteit van sade tydens vroeë inkubering, handel oor die mitochondriale ensiemaktiwiteit wat in die bovloei-stof na hoëspoedsentrifugering ("postmitochondrial fraction") van ekstrakte van imbiberende sade verkry word. Sodanige aktiwiteit kon tot dusver nog nie onomwonde as die gevolg van mitochondriale beskadiging uitgewys word nie, maar andersyds ook nie as voorafvervaardigde mitochondriale ensieme wat tydens imbibisie in mitochondriale membrane ingebou word nie (Pradet 1982).

Wat die moontlike invloed van suurstof op mitochondriale ensiemaktiwiteit tydens hidrering van sade betref, is min

bekend. Dit is vasgestel dat blootstelling van sade aan lug tydens imbibering tot verhoogde mitochondriale doeltreffendheid lei, maar nie wat betref mitochondriale ensiemaktiwiteit nie (Morohashi & Shimokoriyama 1977). Verder is dit ook gevind dat suksinaatdehidrogenase deur suurstof geïnaktiveer kan word tydens ekstrahering van die ensiem uit membrane (Burke *et al.* 1982). Geen inligting kon egter gevind word oor die moontlike *in vivo* interaksie tussen SDH en suurstof nie.

In hierdie studie oor die mitochondriale ensiemaktiwiteit van *Strelitzia juncea* embrio-ekstrakte, is van onsuiwer mitochondriale preparate gebruik gemaak aangesien suiwer preparate nie met die konvensionele sentrifugeringstegnieke verkry kon word nie. Die drie mitochondriale ensieme wat seker die meeste in die saad van ander spesies bestudeer is, nl. suksinaatdehidrogenase (SDH), malaatdehidrogenase (MDH) en sitochroomoksidase (cyt ox), is in hierdie studie ondersoek. Verder is ICDH-, fumarase en glioksisomale ICL-aktiwiteit ook nagegaan.

Aangesien loodsproewe geen of baie lae ensiemaktiwiteit getoon het, het dit 'n mate van verdieping in tegniek genoodsaak. Soos verder in hierdie hoofstuk sal blyk, was die teenwoordigheid van "skynreaksies" vir meeste van die aanvanklike probleme verantwoordelik.

Die karakterisering van die skynreaksies van SDH het soveel studie vereis dat hierdie hoofstuk se indeling, ter wille van die samehang, verskil van die ander hoofstukindelings; die tegnieke en resultate vir elke ensiem volg direk opmekaar. Ná die deurlees van hierdie hoofstuk sal die leser waarskynlik ook tot die gevolgtrekking kom dat meer sinvolle en bruikbare inligting verkry sou kon word deur eerder die aandag op cyt ox-as op SDH-aktiwiteit toe te spits. Een nadelige aspek van die werk is dat die inligting met betrekking tot cyt ox- en MDH-aktiwiteit vir dag 1 van suurstofinkubering ontbreek.

Ook om bepaalde praktiese redes is die P/O-verhouding en die respiratoriese kontrole-verhouding nie vir die mitochondriale

preparate bepaal nie en sodanige bepalings behoort sterk vir 'n opvolgstudie oorweeg te word. Normaalweg kan fumarase as 'n merkerensiem vir die teenwoordigheid en ongeskondenheid van mitochondrions gebruik word, maar in hierdie studie is tegniese probleme met die fumarasebepalings ondervind, soos later sal blyk (5.7). Hierdie aspek behoort in 'n opvolgstudie oor mitochondriale aktiwiteit eerste ondersoek te word.

5.2 ISOLERING VAN MITOCHONDRIONS

Twee flesse met 25 *S. juncea* sade in elk (kyk 2.2, p 8) is vir elke ekstraksie voorberei. Die 50 geweegde embryo's is in 'n yskoue vysel in 2 cm³ yskoue medium A (20 mmol.dm⁻³ TES-KOH, pH 7.1; 0,4 mol.dm⁻³ sukrose en 1 mmol.dm⁻³ EGTA) vir 30 s gemaal. Die ekstrak is kwantitatief met medium A deur 4 lae nylondoek (4 x 4 cm²; 225 µm porieë; Palmer 1967) gesyg. Die moes op die nylondoek is met behulp van 'n kwassie na die vysel oorgedra en vir 'n verdere 15 s in 1 cm³ medium A gemaal. Hierdie tweede ekstrak is ook kwantitatief deur die nylondoek gesyg en saam met die eerste ekstrak in 'n verkoelde 50 cm³ maatsilinder opgevang. Die totale volume is tot 40 cm³ met medium A opgemaak. Bogenoemde prosedure het 39-47 minute geduur.

Die verdere prosedure word in Figuur 5.1 uiteengesit en die volgende opmerkings is daarop van toepassing. Sentrifugering van 'n *S. juncea* embryo-ekstrak, lei kenmerkend tot 'n spierwit neerslag, 'n melkerige bovloei-stof, neergelegde lipiede bo-aan die kante van die buis en 'n drywende lipiedlaag (sowat 10 mm dik). Ten einde kontaminering van die waterige bovloei-stof of die neerslag met die drywende lipiede, of opwarreling van die neerslag te voorkom, is die volgende prosedure toegepas: die drywende lipiede is doeltreffend met 'n spuit met 'n dik naald (38 x 1,8 mm) en die waterige bovloei-stof met 'n spuit met 'n lang dun naald (90 x 0,8 mm) verwyder. Die neergelegde lipiede teen die wande van die buis is nā verwydering van die drywende lipiede en die waterige bovloei-stof met 'n papierdoekie uitgevee. Vir die was van 'n neerslag (Figuur 5.1; stappe g en k) is die neerslag met behulp van 'n kwassie in 'n paar druppels

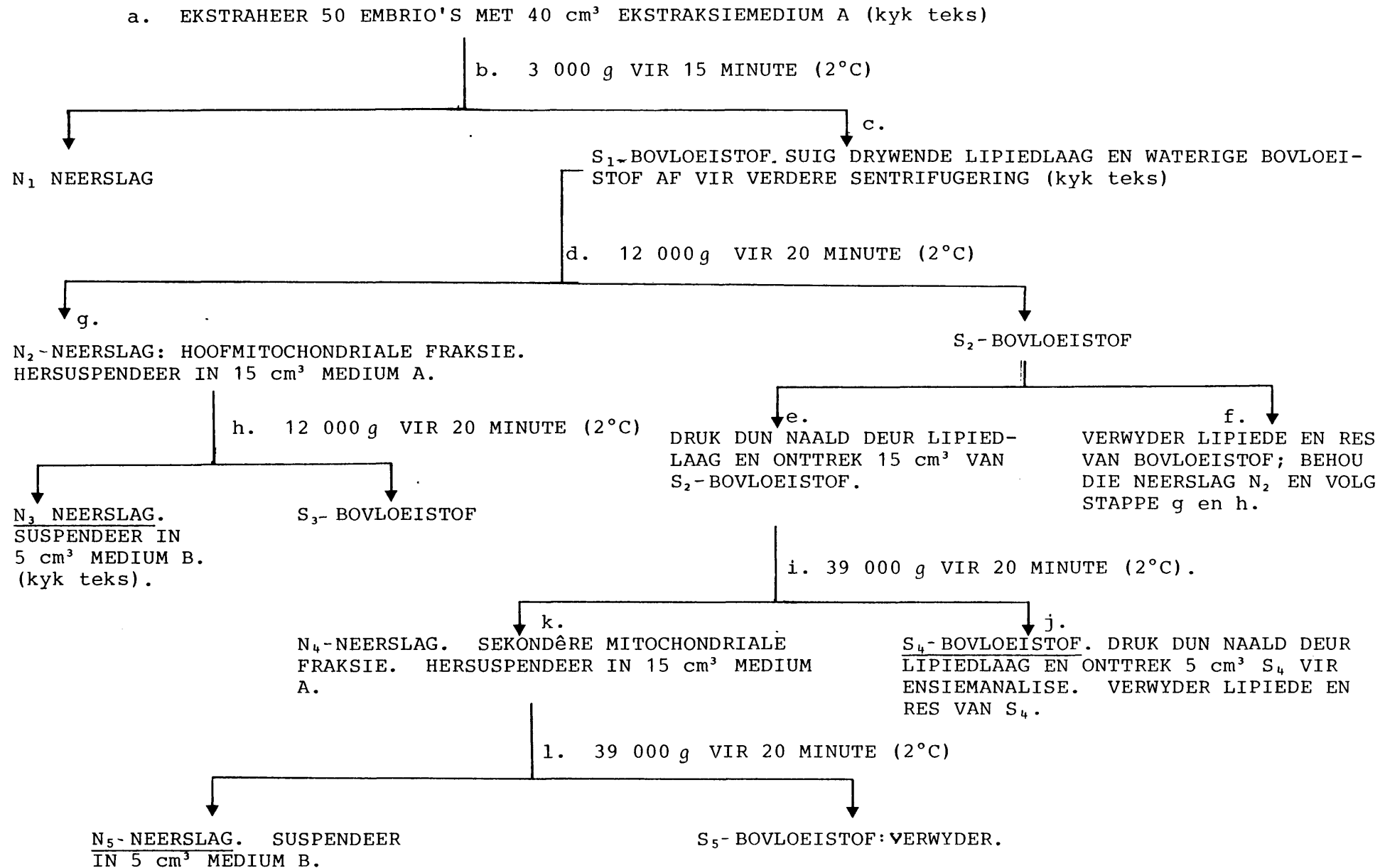
van medium A gehersuspendeer en dan tot 'n totale volume van 15 cm³ met medium A opgemaak waarna dit gesentrifugeer is.

Die finale neerslag (N₃ en N₅ in Figuur 5.1) is vir analise voorberei deur dit met behulp van 'n kwassie in 'n paar druppels medium B (samestelling soos medium A, maar sonder EGTA) te hersuspendeer en die suspensie kwantitatief na 'n Potter-S-buis (Braun) oor te dra. Die lospassende stang van die Potter-S-buis is stadig met die hand op en af beweeg (2 x), om 'n eweredige suspensie te verseker (Palmer 1967).

Die ekstraksiemedium A was op dié van Millhouse *et al.* (1983) gebaseer aangesien dit aan die gestelde vereistes van Laties (1974) vir mitochondrionisolering voldoen het. BSA is egter uit die medium weggelaat vanweë die hoë proteïenkonsentrasie van *S. juncea* ekstrakte.

Alhoewel die tydsverloop vanaf embrioverwydering tot die verkryging van die N₅-mitochondriale fraksie lank was (3,5 uur), is veel beter preparate verkry as met die algemene sentrifugeringsprosedure van Ikuma & Bonner (1967), Nawa & Asahi (1971) se prosedure vir saadweefsel, of Jackson & Moore (1979) se algemene prosedure vir geëtioteerde weefsel en vir blaarweefsel. Die gehalte van die preparate is aan die hand van visuele waarneming beoordeel; die mate waarin kontaminerende lae deeltjies van verskillende tekstuur en voorkoms in die neerslag voorgekom het, kon maklik makroskopies waargeneem word. Gradiëntsentrifugering is nie in hierdie studie toegepas nie.

Bogenoemde metodes se sentrifugeringsprosedures is onbevredigend gevind omdat die eerste lae-spoed swaai òf te kort òf te laag was om van die wit deeltjies, wat aan die *S. juncea* embriokestrakte hulle tipiese melkerige voorkoms gee, ontslae te raak. Selfs die lang prosedure van Figuur 5.1 het 'n mitochondriale neerslag (N₃) tot gevolg gehad wat uit 'n boonste digte wit neerslag en 'n onderste fyner neerslag bestaan het. 'n Geelgekleurde komponent kon ook onderskei word maar dit het ook in die N₁-fraksie voorgekom en was volgens voorlopige aanduidings nie mitochondriaal van aard nie. Volgens Palmer



Figuur 5.1 PROSEDURE VIR EKSTRAHERING VAN MITOCHONDRIONS VAN *STRELITZIA JUNCEA* SADE SE EMBRIO'S.

(1967) & Nobel (1967) skakel die gebruik van 'n nylondoek 'n eerste lae-spoed sentrifugeringstap uit, maar met die *S. juncea*-ekstrakte was sō 'n stap beslis nodig.

Die wit deeltjies was voorlopig vanweë hulle oplosbaarheid in sterk sure as proteïenreserweliggampies gekarakteriseer. In ander pogings om die wit deeltjies van die res van die neerslag met fyn tekstuur en "deursigtige" voorkoms te skei, is van filters gebruik gemaak. Redelike goeie retensie van die wit deeltjies is met bakteriese filters (1,2 μm porieë) verkry, maar die verlies in mitochondriale aktiwiteit na die filtreringsprosedure was onaanvaarbaar hoog. Elektronmikroskopiese studies van die neerslag sal aanbevelingswaardig vir 'n opvolgstudie wees.

Neerslag N_3 en bovloeistof S_2 (stap e) is vir SDH-bepalings gebruik en fraksies N_3 , N_5 en S_4 (Figuur 5.1) is vir cyt ox- en MDH-bepalings gebruik. Verdunnings van N_3 en N_5 suspensies is met medium B gemaak en verdunnings van bovloeistofwe met medium A.

Die metodes en resultate wat op die genoemde mitochondriale ensieme betrekking het, word nou bespreek.

5.3 SUKSINAATDEHIDROGENASE (SDH)-AKTIWITEIT

5.3.1 Materiaal en metode

Voordat die finale prosedures bespreek word, kan ter inleiding gemeld word dat die SDH-aktiwiteit aanvanklik bepaal is volgens die metode van Arrigoni & Singer (1962) waarvolgens die reduksie van 'n kunsmatige elektrondraer (DCIP) deur die substraat (suksinaat) spektrofotometries gevolg word. Wisselvallige resultate is aanvanklik verkry. Latere verworwe insig het laat blyk dat die wisselvalligheid toegeskryf kan word aan 'n kombinasie van faktore soos onsuier mitochondrionpreparate, DCIP-reduksie in die afwesigheid van suksinaat (agtergrondreaksie), remming van die agtergrondreaksie deur suksinaat en volgorde van reagensbyvoeging.

In ieder geval het die aanvanklike wisselvallige resultate 'n literatuurondersoek van die SDH-bepalingsmetode sterk genoodsaak en die finale metode wat in hierdie studie toegepas is, is die uitvloeisel daarvan. Hieronder volg 'n kort literatuurskets oor sommige aspekte van die SDH-bepalingsmetode en dit word gevolg deur 'n beskrywing van die prosedure wat uiteindelik op die embryo-ekstrakte van *Strelitzia juncea* toegepas is.

5.3.1.1 Literatuuroorsig oor die SDH-bepalingsmetode

In die bestudering van die SDH-bepalingsmetode, is swaar geleun op die oorsig van Singer (1974). Daarvolgens blyk dit dat suiwer membraanongebonde SDH nie DCIP-reduksie deur suksinaat kataliseer nie, tensy van PMS as 'n tussendraer van elektrone gebruik gemaak word. Inderwaarheid word suksinaat-PMS-oksidoreduktase dus as 'n maatstaf van SDH-aktiwiteit gebruik.

Die gemete reaksietempo is grootliks van die PMS-konsentrasie afhanklik. Waar die gewone prosedure met ensimatiese bepalingsten doel het om al die betrokke reagense in optimale konsentrasies te gebruik en sodoende die maksimum moontlike reaksietempo vir die ensiem te bepaal, kan die optimum PMS-konsentrasie volgens Singer *et al.* (1973) en Singer (1974) nie altyd in die reaksiemengsel gebruik word nie. As redes word aangevoer dat die optimum PMS-konsentrasie 'n funksie van die ekstraksieprosedure en ander behandelings kan wees en dat hoë PMS-konsentrasies remmend vir die SDH-reaksie kan wees. Gevolglik beveel die outeurs aan dat 'n reeks PMS-konsentrasies gebruik moet word. Deur berekeningsprosedure kan die V_{\max} (PMS) dan bepaal word.

Verskillende berekeningsmetodes bestaan om die V_{\max} -waardes te kan bereken (Segel 1976). Die algemeenste metode is om van 'n Lineweaver-Burk stip gebruik te maak, wat 'n lineêre transformasie van die algemene Michaelis-Menten vergelyking is en is deur Singer (1974) toegepas. Allerlei besware kan egter teen die Lineweaver-Burk transformasie ingebring word (Segel 1976) en in hierdie studie is aanvanklik van 'n Eadie-Scatchard transformasie gebruik gemaak. Hierdie transformasie kan ook

beperkings hê en uiteindelik is van 'n nie-lineêre passingsmetode (Sagnella 1985; Duggleby 1981) gebruik gemaak om die V_{\max} (PMS)-waardes te kan bereken. Aangesien die genoemde wiskundige tegnieke, net soos die Hill-analise waarna later verwys sal word, slegs as 'n middel tot 'n doel gebruik is, word dit nie nader toegelig nie.

Singer (1974) en Singer *et al.* (1973) beklemtoon dit sterk dat die SDH-ensiem van plantweefsel dikwels in 'n gedeaktiveerde toestand voorkom vanweë OAA wat aan die aktiewe sentrum gekoppel is en dat die ensiem eers geaktiveer moet word voordat die volle aktiwiteit daarvan bepaal kan word. Die aktiveringsproses behels die inkubering van die ensiem by relatief hoë temperature in die teenwoordigheid van suksinaat waardeur die OAA van die aktiewe sentrum verplaas word.

Volgens die outeurs word volle aktivering van SDH verkry deur die voorafinkubering van die mitochondrions met suksinaat vir 8 minute by 30°C; aktivering by 15°C is volgens hulle baie stadig en word as 'n verwysingsbehandeling gebruik om die mate van aktivering deur die 30°C voorafinkubering te kan bepaal. Sonder om die resultate vooruit te wil loop, kan hier net kortliks verduidelik word dat voorafinkubering van die *Strelitzia juncea* mitochondriale fraksies by 15°C alreeds 'n redelike mate van aktivering van SDH tot gevolg gehad het in vergelyking met preparate wat geen voorafinkubering gehad het nie. Gevolglik word in hierdie studie na die 15°C-voorafinkubering as "gedeeltelike aktivering" verwys.

Benewens die gebruik van verskillende PMS-konsentrasies en die aktivering van SDH, is 'n derde aspek wat deur Singer (1974) en Singer *et al.* (1973) benadruk word, die feit dat PMS moeilik die plantmitochondrions kan binnedring. Sonifisering van die mitochondriale suspensie word as die oplossing vir hierdie probleem aangegee. Aangesien Singer se ekstraksiebuffers nie osmotikum bevat het nie, word hier afgelei dat PMS-indringing ook beperkend in hipotoniese oplossings kan wees.

'n Laaste aspek van belang is dat die SDH-ensiem blykbaar tydens ekstrahering beskerm moet word teen inaktivering deur die byvoeging van swaelbevattende verbindings (sisteïen of DTT) en van suksinaat in die ekstraksiemediums (Singer *et al.* 1973, Nakayama en Asahi 1978). 'n Nadeel van die teenwoordigheid van sisteïen in die ekstraksiemedium is dat dit die spontane reduksie van DCIP in die reaksiemedium veroorsaak. Dit kan egter verhoed word deur die byvoeging van 'n byna ekwimolare hoeveelheid NEM by die reaksiemengsel net voor die aanvang van die SDH-reaksie waardeur die sisteïen spontaan geoksideer word (Singer 1974).

Al bogenoemde aanbevelings is in die bestudering van die SDH-reaksie in mitochondrionpreparate van *Strelitzia juncea* se embryo-ekstrakte toegepas, maar net sekere van die aanbevelings het ná eksperimentering as toepaslik vir die *S. juncea* ekstrakte geblyk. Die prosedures wat na aanleiding van die literatuurstudie ondersoek is maar wat nie in die finale metodes geïnkorporeer is nie, word nou kortliks bespreek. Die finale metodes wat wel gebruik is, se besonderhede word in die volgende afdeling (5.3.1.2) aangegee.

Geen probleme is met die NEM-prosedure as sodanig vir sisteïenoksidase in die reaksiemengsel ondervind nie, maar die teenwoordigheid van die "beskermers" sisteïen en suksinaat in die ekstraksiemedium het tot onstabiele ekstrakte gelei. 'n Gedurige koagulering van die wit deeltjies is in die ekstrakte waargeneem, selfs in die teenwoordigheid van slegs $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ suksinaat en $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ sisteïen (aanvanklik is $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ suksinaat en $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ sisteïen in ekstraksiemedium A gebruik na aanleiding van Burke *et al.* (1982) en Nakayama en Asahi (1978) se werk).

Sonifisering van mitochondriale suspensies (N_2) was ook ongewens aangesien dit ook tot koagulering en optiese verdigting van die ekstrakte gelei het en die spektrofotometriese werk bemoeilik het. Gevolglik is die sonifisering van mitochondrionsuspensies en die byvoeging van beskermers by die ekstraksiemedium twee van Singer (1974) se aanbevelings wat nie in die finale prosedure toegepas is nie. Die ander aanbevelings, nl. die aktivering

van die ensiem en die bepaling van V_{\max} (PMS) is as baie toepaslik in hierdie studie uitgewys en is gevolglik in die finale prosedure soos hieronder uiteengesit, geïnkorporeer.

Die moontlikheid het bestaan dat die SDH-ensiem van dormante *S. juncea* embryo's 'n ander mate van inaktivering as dié van nie-dormante sade kon hê. Gevolglik is aktiwiteitsbepalings op ongeaktiveerde, gedeeltelik geaktiveerde (15°C voorafinkubering) en ten volle geaktiveerde (30°C voorafinkubering) fraksies uitgevoer. Die finale metodes wat in hierdie studie vir die bepaling van SDH-aktiwiteit gevolg is, word nou uiteengesit en is op Singer (1974) gebaseer.

5.3.1.2 Die finale prosedures vir die bepaling van die SDH-aktiwiteit

SDH-aktiwiteit is as suksinaat:PMS-oksidoreduktase-aktiwiteit bepaal. Hieronder volg nou onder aparte hoofde 'n beskrywing van die verskillende tegnieke wat vir die bepaling van die SDH-aktiwiteit gebruik is.

(a) Samestelling van reaksiemengsel (volgens Singer 1974)

Met reaksiemengsel word bedoel 'n mengsel wat SDH-reaksiebuffer, suksinaat, KCN en ekstrak bevat. Nadat 'n reaksie geïnisieer is deur die byvoeging van DCIP en PMS by die reaksiemengsel, was die finale volume 3,0 cm³ en die finale konsentrasies van die verbindings was soos volg: 33 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ TES-KOH; 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ natriumsuksinaat; 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ KCN; 153 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ DCIP en PMS wat 0,180; 0,251; 0,359 of 1,077 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ was.

Die voorraadoplossing KCN is vooraf geneutraliseer deur die prosedure van Singer (1974) deur koue 30 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCN met 2,55 cm³ koue 1,0 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl te neutraliseer. Die voorraad KCN-oplossing is elke tweede dag vars opgemaak. Die voorraad-oplossings van suksinaat en DCIP is in SDH-reaksiebuffer (0,05 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ TES-KOH pH 7,5) opgemaak.

Die prosedure het van dié van Singer (1974) afgewyk deurdat TES-KOH in plaas van HEPES as reaksiebuffer gebruik is en deurdat die KCN-konsentrasie hoër was. Met die DCIP (Merck) wat vir hierdie werk gebruik is, het sonifisering van 0,007 g DCIP in 10 cm³ SDH-reaksiebuffer 'n DCIP-oplossing gegee wat na filtrering en 30 x verdunning 'n absorpsie van 1,00 tot 1,10 gegee het (vgl. Singer 1974).

(b) Samestelling van blankoreaksiemengsel

Die blankoreaksiemengsel was in samestelling en konsentrasie identies aan dié van die reaksiemengsel, behalwe dat dit geen suksinaat bevat het nie.

(c) Gedeeltelike aktivering by 15°C
(voorafinkubering by 15°C)

Aktivering is uitgevoer deur blanko- of reaksiekuvette met ooreenstemmende reaksiemengsels van propies te voorsien en vir 11 minute in 'n waterbad by 15°C te hou. Direk hierna is die DCIP en PMS bygevoeg om die reaksie te inisieer en die aktiwiteit is direk daarna spektrofotometries bepaal.

(d) Aktivering by 30°C (voorafinkubering by 30°C)

Aktivering is uitgevoer deur blanko- of reaksiekuvette met ooreenstemmende reaksiemengsels van propies te voorsien en vir 8 minute in 'n waterbad by 30°C te hou. Direk daarna is die kuvette in 'n waterbad by 10°C vir 3 minute gehou. Na verloop van die 11 minute inkubering was die temperatuur 15 tot 17°C. Die reaksie is direk daarna geïnisieer soos by 15°C aktivering beskryf.

Reaksiemengsels is nie gelyktydig nie, maar met bepaalde tydsintervalle, geaktiveer en die reaksietempo bepaal.

(e) Geen aktivering by 15°C

Direk nadat die ekstrak by 'n blanko- of 'n reaksiemengsel gevoeg is, is DCIP en PMS bygevoeg om die reaksie te inisieer. Daar

was dus geen voorafinkubering nie. "Geen-aktivering" studies is by slegs een PMS-konsentrasie uitgevoer, nl. $1,077 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$.

(f) Bepaling van die reaksietempo

Die blanko- en reaksiemengsels se DCIP-reduksietempo is afsonderlik van mekaar maar direk na mekaar bepaal deur die absorbansieverandering met tyd by 600 nm en 15°C te volg. Die spektrofotometriese bepaling is met 'n Cary 219 spektrofotometer uitgevoer en deur van 'n 1 cm deursnee kuvet gebruik te maak.

(g) Invloed van die remstof oksalo-asetaat (OAA)

Nadat die reaksietempo spektrofotometries vir ca 2-3 minute gevolg is, is OAA in die blanko- of reaksiemengsel ingeroer en die reaksietempo weer bepaal. Die finale OAA-konsentrasie in die kuvet was $2,4 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$. Die voorraadoplossing OAA is berei deur oksaalasynsuur (Boehringer) in 'n klein volume SDH-reaksiebuffer op te los, die pH na 7,5 in te stel met $2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH en na volume op te maak met SDH-reaksiebuffer.

'n Verdubbeling in die OAA-konsentrasie het geen groter remming veroorsaak as wat deur die $2,4 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ OAA gegee is nie en $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ OAA (finale konsentrasie) het soortgelyke remming gegee.

(h) Aantal herhalings gebruik

Agt behandelings is toegepas, nl. dae 1, 2, 3 en 4 van saadinkubering vir sowel lug- as suurstofsade. Slegs 1 ekstrak is van elke behandeling se sade gemaak. Vir elke ekstrak is die volgende data verkry vir sowel die mitochondriale N_2 -fraksie as die bovloeistoffraksie S_2 :- agtergrondreduksietempo (blanko); "geen aktivering"-tempo; invloed van PMS-konsentrasie en aktivering by 15°C en by 30°C op die DCIP-reduksietempo. Sowat 200 spektrofotometriese bepalinge is in totaal vir die 8 ekstrakte gemaak. Die metode was sodanig gestandaardiseer dat die tydsverloop vanaf ekstrakbereiding tot bepalinge vir die ekstrakte onderling vergelykbaar was. Variasie (van hoogste waarde tot laagste waarde) tussen die waardes wat eksperimenteel vir 'n

bepaalde reaksie se spektrofotometriese DCIP-reduksietempo verkry is, het hoogstens 3% beloop.

Alhoewel die resultate wat hier aangegee word, slegs op die 8 ekstrakte (1 ekstrak per behandeling) se data berus, het baie eksperimentering die finale prosedures voorafgegaan. Die tendense en verskynsels wat met die 8 ekstrakte verkry is, is ook met die voorafgaande eksperimentering (ca 30 ekstrakte) verkry. Die data kon egter nie hierby geïnkorporeer word nie vanweë verskillende ekstraherings-, sentrifugerings-, temperatuurekwilibrerings- en essaiëringsprosedures.

5.3.2 Berekening van SDH-aktiwiteit

Vir die berekening van SDH-aktiwiteit is E_{600}^{\sim} vir DCIP as $19,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ geneem (Singer *et al.* 1973), alhoewel Veeger *et al.* (1969) die waarde as $21 \times 10^3 \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ by 600 nm aangee.

Die DCIP-reduksietempo is bereken uit (kyk p 15):

$$H = \frac{(\tan A^*)^{-1} \times E_{600} \times I \times 0,5030}{F \times J} \text{ nmol DCIP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 50 \text{ embryo's}^{-1}$$

waar die simbole dieselfde betekenis as by 2.6 het. Vir die mitochondriale N_3 -fraksie was $G = 1$, $I = 5$. Vir die bovloei-stof-fraksie was $G = 1$ en $I = 40$.

Die berekening van die blanko DCIP-reduksietempo's (agtergrondreduksietempo), die totale DCIP-reduksietempo en die DCIP-reduksietempo ná remming van die reaksie deur OAA, is met behulp van bogenoemde formule gemaak. Die só verkreeë waardes is vir die opstel van Figure 5.2 tot 5.4 gebruik.

Netto DCIP-reduksietempo's (d.i. SDH-aktiwiteit) is in Figure 5.5 en verder gebruik en is verkry deur die tempo ná OAA byvoeging as agtergrond te beskou en van die totale reduksietempo's vir DCIP af te trek.

5.3.3 Resultate en bespreking

Resultate is oor die volgende aspekte van die SDH-reaksie van *Strelitzia juncea* embrio-ekstrakte ingewin: die agtergrond-reaksie, die SDH-aktiwiteit by verskillende PMS-konsentrasies om sodoende die maksimum tempo V_{\max} (PMS) deur berekening te kan vasstel en die invloed van aktivering deur temperatuur op die SDH-aktiwiteit. Al bogenoemde aspekte is vir die mitochondriale N_3 -fraksies bestudeer, maar vir die S_2 -bovloeistof-fraksie is geen aktiveringstudies uitgevoer nie en is slegs een PMS-konsentrasie gebruik.

Elkeen van die genoemde aspekte van die SDH-reaksie word nou onder afsonderlike hoofde bespreek.

5.3.3.1 Die agtergrondreaksietempo van DCIP

Soos reeds gestel, berus die SDH-bepaling daarop dat die reduksie van die kunsmatige elektrondraer DCIP deur suksinaat plaasvind. Die ideale situasie sou wees dat 'n ekstrak geen ander verbindings bevat waardeur die DCIP moontlik gereduseer kan word nie. Indien 'n ekstrak wel DCIP-reduksie in die afwesigheid van suksinaat sou uitvoer, moet dit as 'n agtergrondreaksie beskou word en van die totale DCIP-reduksietempo in die teenwoordigheid van suksinaat afgetrek word.

Die normale prosedure is om die reaksie spektrofotometries teenoor die blanko (agtergrondreaksie) te lees en sodoende vir die agtergrondreaksie te kompenseer. Dit is egter nie in hierdie studie gedoen nie omdat die agtergrondtempo in sommige gevalle nie konstant met tyd was nie en daar noodwendig 'n tydsverloop tussen DCIP/PMS-byvoeging by die twee kuvette was. In navolging van Singer (1974) is die blanko- en reaksiemengsels se DCIP-reduksietempo gevolglik apart bepaal.

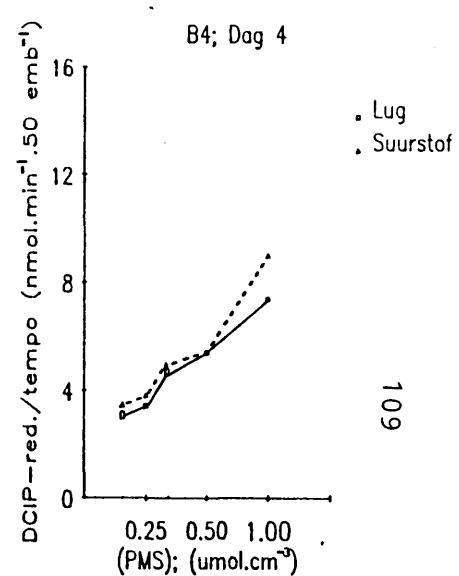
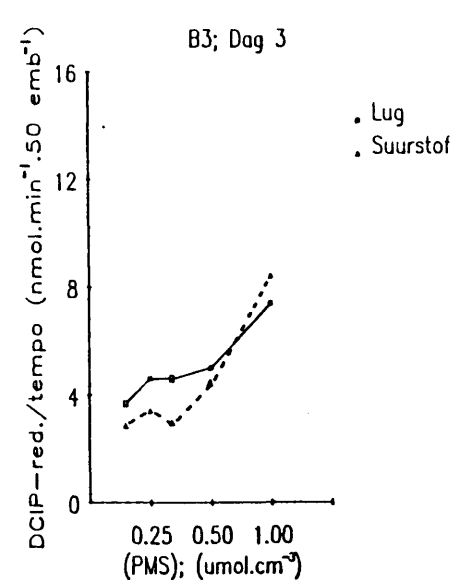
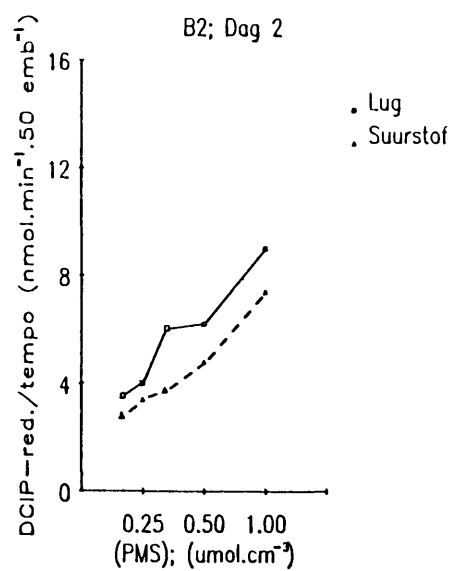
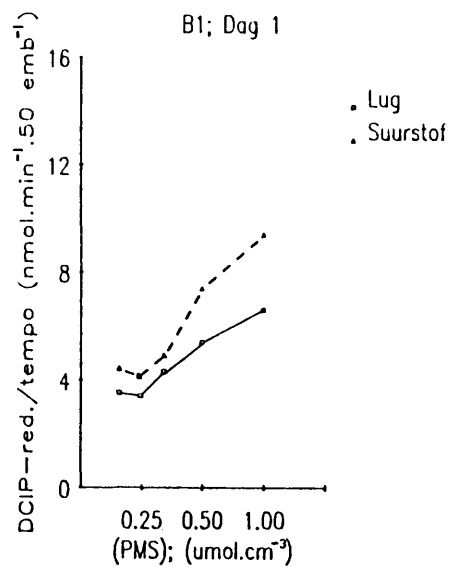
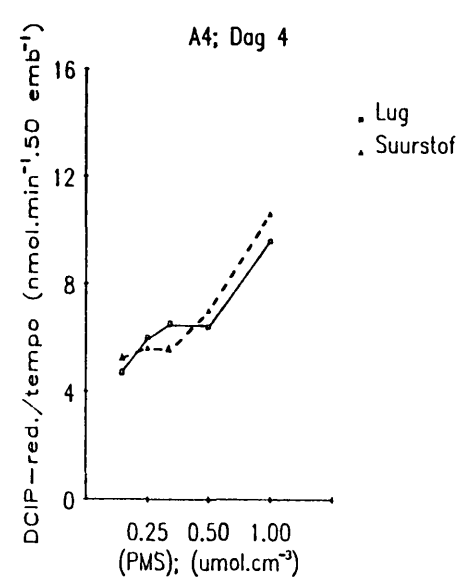
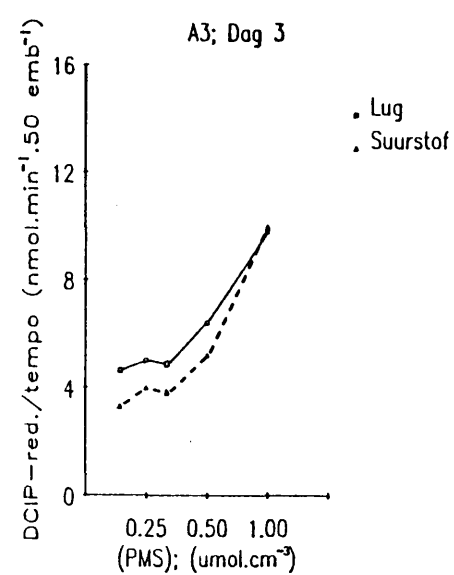
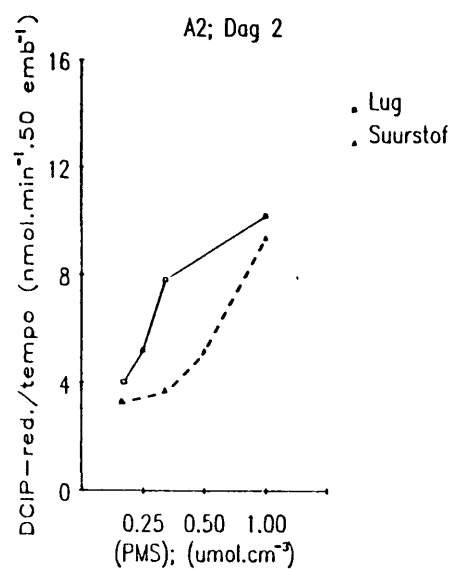
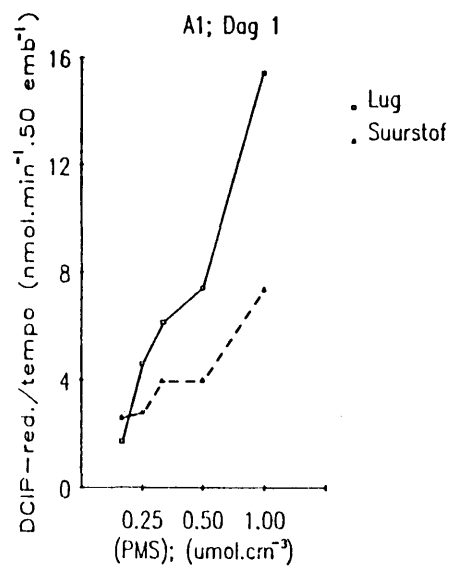
Aangesien die agtergrondreaksietempo relatief hoog was, is dit goed gekarakteriseer om daarvoor te kan kompenseer. Van belang is dat die mitochondriale fraksie en die bovloeistof-

fraksie verskil het wat betref die aard en die omvang van die agtergrondreaksie en gevolglik word die resultate wat met die twee fraksies se agtergrond verkry is, nou afsonderlik bespreek. Die agtergrondreduksietempo's is vir geaktiveerde fraksies in die geval van die mitochondrions bepaal, maar vir ongeaktiveerde fraksies in die geval van die bovloeistof. Verder is die agtergrondreduksietempo slegs vir die mitochondriale fraksies by 'n reeks PMS-konsentrasie bepaal.

(a) Die agtergrondreaksietempo van mitochondriale N_3 -fraksies

'n Agtergrondreaksietempo (blanko), dit wil sê DCIP-reduksie in die afwesigheid van suksinaat, is vir die N_3 -fraksies (Figuur 5.1, p 98) na 11 minute voorafinkubering van die blankoreaksiemengsels by 15°C waargeneem (Figuur 5.2, p 109). Hierdie agtergrondreaksietempo's was PMS-afhanklik en veral met die hoogste PMS-konsentrasie ($1,077 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$) is 'n relatief hoë tempo verkry. Oor die vier inkuberingsdae was daar nie 'n groot afname in die agtergrondtempo nie, maar die embryo-ekstrakte (N_3 -fraksies) van die suurstofsade het 'n ietwat laer agtergrondtempo as dié van die lugsade gegee.

Byvoeging van suksinaat tot so 'n blankoreaksiemengsel, (wat dus 'n reaksiemengsel gee volgens 5.3.1.2(a) en (b)), het deurgaans tot 'n verhoging in die reaksietempo gelei (kyk Figuur 5.4 a, b wat later bespreek sal word). Wanneer 'n SDH-remstof (soos OAA) by so 'n reaksiemengsel gevoeg is, het dit 'n onmiddellike verlaging in die reaksietempo tot 'n waarde nêr onder die agtergrondreaksietempo tot gevolg gehad. (Vergelyk Figuur 5.2 A en B). OAA-byvoeging by blankoreaksiemengsels (dus sonder suksinaat) het gewoonlik 'n geringe afname in die agtergrondtempo veroorsaak. Hieruit blyk dit dus dat die agtergrondreaksie nie deur OAA gerem word nie en dat die verhoogde DCIP-reduksietempo wat in die teenwoordigheid van suksinaat waargeneem is, OAA-gevoelig is en dus waarskynlik as gevolg van SDH-aktiwiteit was.



Voorafinkubering by 30°C het agtergrondtempo's baie soortgelyk aan voorafinkubering by 15°C gegee en die gemiddelde waardes vir die twee temperature is vir Figuur 5.2 gebruik. Sonder voorafinkubering is soortgelyke agtergrondtempo's as met voorafinkubering verkry.

Volgens Singer (1974) is agtergrondtempo's weglaatbaar klein by suiwer mitochondriale preparate. Die teenwoordigheid van 'n agtergrondreaksie kon in hierdie stadium nie vermy word nie en is goed gekarakteriseer om daarvoor te kan kompenseer. Moontlik hou die agtergrondreaksie verband met die teenwoordigheid van die reserweproteïenliggaampies wat saam met die mitochondrions in die N₂-fraksies voorgekom het. Aangesien agtergrondtempo's herhaalbaar was, kon die totale reaksietempo's daarvoor gekorrigeer word deur aftrekking van eersgenoemde waardes. Watter verbinding(s) vir die DCIP-reduksie verantwoordelik is in die afwesigheid van suksinaat, is onbekend.

(b) Die agtergrondreaksietempo's van bovloeistof-fraksies (S₂)

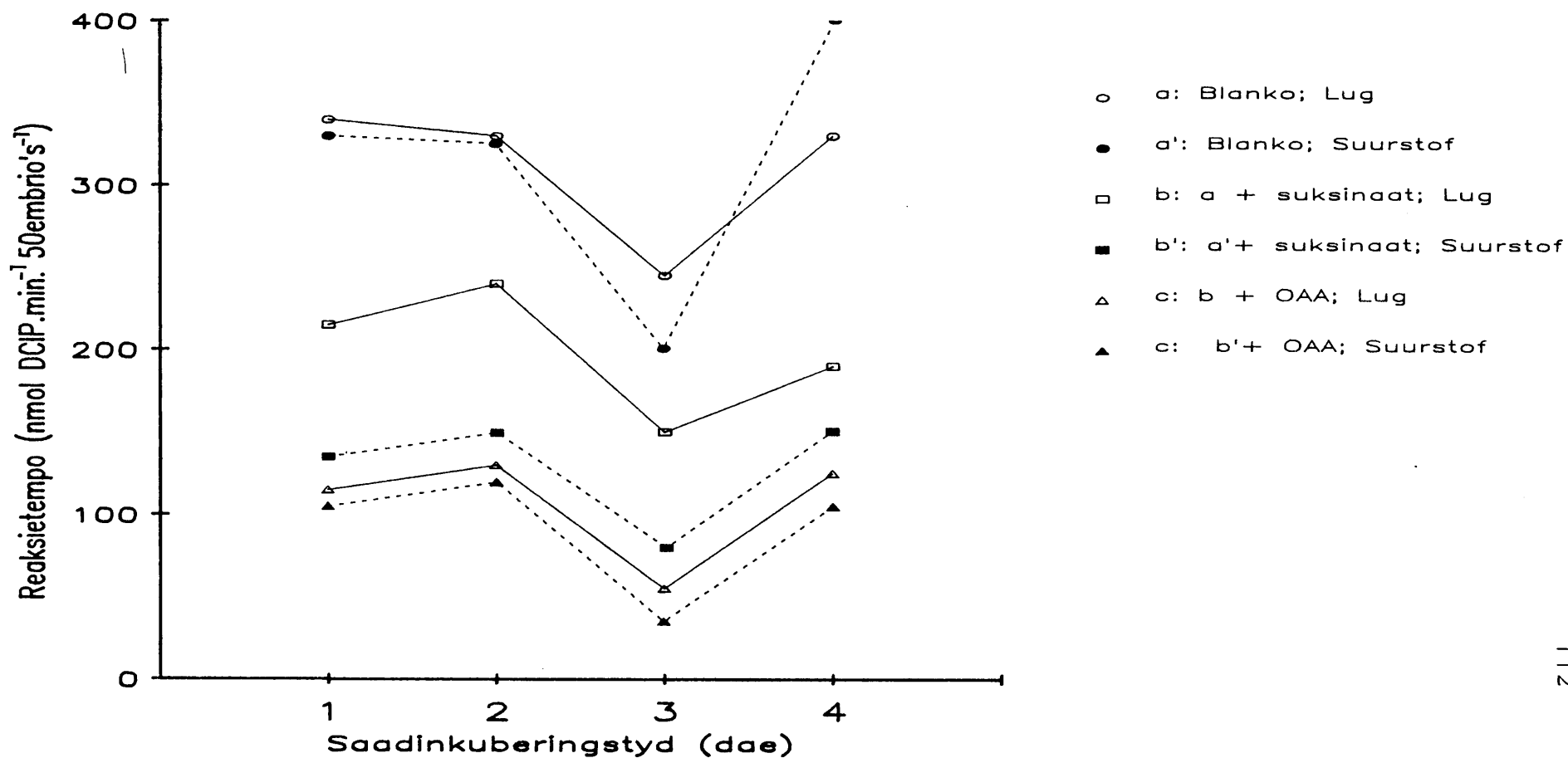
Die agtergrondtempo's wat met die bovloeistof-fraksie S₂ verkry is, is nie wesentlik deur voorafinkubering van die blankoreaksiemengsels beïnvloed nie. Die resultate wat vervolgens bespreek word, het betrekking op gevalle waar geen voorafinkubering toegepas is nie en waar slegs die hoogste PMS-konsentrasie van 1,077 μmol.cm⁻³ gebruik is. Die volgende bespreking is feitlik ewe goed vir al vier inkuberingsdae van toepassing en daar sal dus nie pertinent na die resultate van die verskillende inkuberingsdae verwys word nie.

Die bovloeistof-fraksie S₂ (Figuur 5.1, p 98) het 'n heelwat hoër agtergrondtempo (35 x hoër) as die mitochondriale fraksie getoon; selfs op 'n volume-ekstrak-in-die-kuvet basis was die agtergrondtempo met S₂-bevattende blankoreaksiemengsels hoër as wat met N₂-bevattende blankoreaksiemengsels verkry is (Figuur 5.3a, a'). DCIP-reduksie deur die S₂-fraksie kon ewe goed in die afwesigheid van PMS plaasvind, terwyl geen

DCIP-reduksie sonder PMS deur die N_3 -fraksie moontlik was nie (resultate nie getoon nie). Dit blyk dus dat die S_2 -bovloei-stowwe 'n groot DCIP-reduksietempo getoon het en dat dit waarskynlik nie 'n SDH-reaksie is nie aangesien dit in die afwesigheid van suksinaat plaasgevind het. Nakayama *et al.* (1980) het blykbaar 'n soortgelyke reduksie van DCIP deur sekere ekstrakte gevind, maar PMS was teenwoordig in die reaksiemengsels. Watter stowwe die reduksie veroorsaak, is nie bekend nie, maar in hierdie studie het embryo-ekstrakte van sowel lug- as suurstof soortgelyke reduksie getoon (vgl. Figuur 5.3a en a').

Byvoeging van suksinaat by die blankoreaksiemengsels wat S_2 -bovloei-stof bevat, het 'n groot verlaging in die DCIP-reduksietempo veroorsaak (Figuur 5.3b, b'). Dit is in teenstelling met wat verwag word vir 'n SDH-reaksie en vir wat met N_3 -bevattende blankoreaksiemengsels verkry is. Dit is opmerklik dat genoemde afname plaasgevind het alhoewel die S_2 -fraksie waarskynlik "ligte" mitochondrions bevat het (kyk sentrifugerings-prosedure; Figuur 5.1, p 98). Die afname in absorpsie by 600 nm as gevolg van suksinaatbyvoeging kon slegs in die teenwoordigheid van DCIP waargeneem word en kan dus nie toegeskryf word aan 'n ander algemene reaksie moniteerbaar by 600 nm nie; uit ander eksperimente is dit nl. bekend dat die byvoeging van 'n organiese suur by *Strelitzia juncea* ekstrakte tot 'n afname in absorpsie by sekere golflengtes kan lei. Oor die moontlike wyse waarop suksinaatbyvoeging die elektronvloei vanaf die onbekende verbinding(s) X na DCIP toe rem, kan hier geen uitspraak gelewer word voordat bykomende eksperimentering nie aangepak word nie.

Twee duidelike verskille tussen die DCIP-reduksietempo's van die S_2 -bovloei-stof-fraksies van lug- en suurstofsade is waargeneem. Ten eerste is die verlaging in die DCIP-reduksietempo wat deur suksinaatbyvoeging veroorsaak is, groter indien die S_2 -fraksies van suurstofsade in die blankoreaksiemengsels voorgekom het (Figuur 5.3; vgl. $\overline{b-a}$ met $\overline{b'-a'}$). 'n Verdere ver-



Figuur 5.3. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die DCIP-reduksietempo's (15°C) wat met die S₅-bovloeistof (12 000 g) van *Strelitzia juncea* embryo-ekstrakte verkry is na verskillende tye van saadinkubering. Hier verwys b (b') en c (c') na "bruto"-reduksietempo's wat verkry is na die byvoeging van suksinaat of OAA by a (a') of b (b') respektiewelik.

laging in die DCIP-reduksietempo kan bewerkstellig word deur OAA tot die reaksiemengsel te voeg en die tweede verskil tussen lug- en suurstofsade hang daarmee saam; OAA-byvoeging veroorsaak duidelik 'n groter verlaging in die DCIP-reduksietempo indien die S_2 -bovloeistof van lugsade afkomstig is (Figuur 5.3; vgl. $\overline{c-b}$ met $\overline{c'-b'}$). Nogtans was die finale DCIP-reduksietempo's na OAA-byvoeging vir die twee behandelings eenders.

Indien die bovloeistof enigsins SDH-aktiwiteit bevat het, kon dit nie waargeneem word nie weens die feit dat die byvoeging van suksinaat by bovloeistofbevattende reaksiemengsels tot 'n afname in die DCIP-reduksietempo gelei het. Geen eksperimentering is uitgevoer om te probeer vasstel of hierdie uitwerking van suksinaat met ensimatiese aktiwiteit verband gehou het of nie. Moontlik het die suksinaat die nie-spesifieke DCIP-reduksie gerem sodat die oorblywende DCIP-reduksietempo (Figuur 5.3; b en b') moontlik die membraanvrye (opgeloste) SDH-aktiwiteit verteenwoordig.

In hierdie verband is dit interessant dat Nakayama *et al.* (1980) na 18 h inkubering van *Pisum sativum* sade meer as 50% van die totale SDH-aktiwiteit in die opgeloste (membraanvrye) fraksie gevind het. Volgens Nakayama & Asahi (1981) verskil die eienskappe van opgeloste SDH van die membraangebode SDH; die opgeloste SDH word maklik deur suksinaat geïnaktiveer terwyl die membraangebode vorm deur suksinaat geaktiveer word.

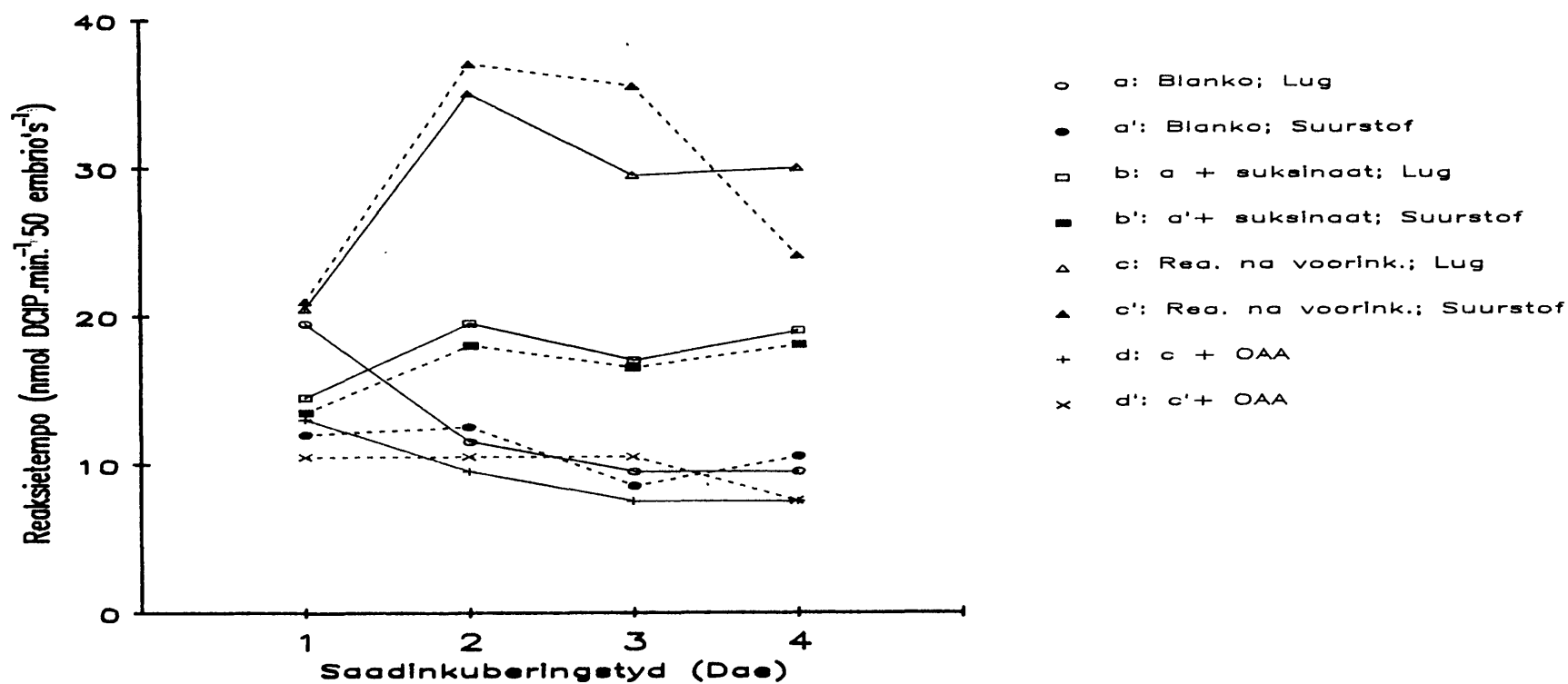
Die hoë agtergrondreduksietempo en die remming daarvan deur suksinaat was twee van die faktore wat die aanvanklike karakterisering van die SDH-reaksie bemoeilik het. Nakayama *et al.* (1980) het in die ekstrakte van *Pisum sativum* saadlobbe verbindings gehad wat die DCIP in die teenwoordigheid van PMS gereduseer het. Hierdie agtergrondreaksie het in die teenwoordigheid van PMS en DCIP binne 5 minute afgeloop, waarna die suksinaat bygevoeg is. Wat die *Strelitzia juncea* ekstrakte betref, het die agtergrondreaksie nie binne 5 minute afgeloop nie en die bogenoemde kompensasieprocedure van Nakayama *et al.* (1980) is nie toegepas nie omdat dit sou lei tot reaksiemengsels waarvan die DCIP- en PMS-konsentrasies onbekend was.

5.3.3.2 Die invloed van ensiemaktivering by 15°C op die SDH-reaksietempo van die mitochondriale fraksies

Om te kan vasstel wat die invloed van aktivering op die SDH-aktiwiteit is, is dit nodig om die SDH-aktiwiteit sonder aktivering ook te bepaal. Om die omvang van die werk te beperk, is die ongeaktiveerde agtergrondreaksie- en die ongeaktiveerde reaksietempo by slegs een temperatuur en een PMS-konsentrasie bepaal. Daarenteen is die aktiveringstudies by twee temperature en 'n reeks PMS-konsentrasies uitgevoer. 'n Vergelyking tussen ongeaktiveerde en geaktiveerde SDH-aktiwiteit kan dus slegs vir 15°C en 1,077 $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ PMS gemaak word. Die verwagting was om 'n gevolgtrekking te kon maak oor die mate van inaktivering van SDH by lug- en suurstofsade onder die genoemde voorwaardes. Hier kan net kortliks terugverwys word na 5.3.1.1 (p100) waar die situasie toegelig is dat die 15°C-voorafinkubering na aanleiding van Singer (1974) veronderstel was om 'n "geen aktivering"-behandeling te gewees het. In hierdie studie het dit skynbaar tot 'n gedeeltelike aktivering van die SDH-ensiem gelei aangesien dit tot 'n hoër aktiwiteit aanleiding gegee het as wanneer geen voorafinkubering by 15°C toegepas is nie (Figuur 5.4) soos aanstons bespreek sal word.

Die ongeaktiveerde agtergrondtempo van die hoofmitochondriale fraksie (N_3) by 15°C word in Figuur 5.4a, a' aangegee en die waardes is soortgelyk aan die reeds bespreekte agtergrondtempo's wat met voorafinkubering verkry is (vergelyk slegs met waardes vir die hoogste PMS-konsentrasie van Figuur 5.3, p 112). 'n Uitsondering was die N_3 -fraksie van embryo-ekstrakte van dag 1-geïnkubeerde lugsade wat ongeaktiveerd 'n hoë DCIP-reduksietempo gehad het.

In die teenwoordigheid van suksinaat was die DCIP-reduksietempo (ongeaktiveerde reaksiemengsel) hoër as die agtergrondreduksietempo (Figuur 5.4; vgl. b en b' met a en a') en die toename is aan SDH-aktiwiteit toegeskryf. Vir dag 1-geïnkubeerde sade was die SDH-aktiwiteit laag, maar vir dag 2-, 3- en 4-geïnkubeerde sade was dit feitlik tweemaal hoër as die agtergrondtempo en twee- tot driemaal hoër as op dag 1.



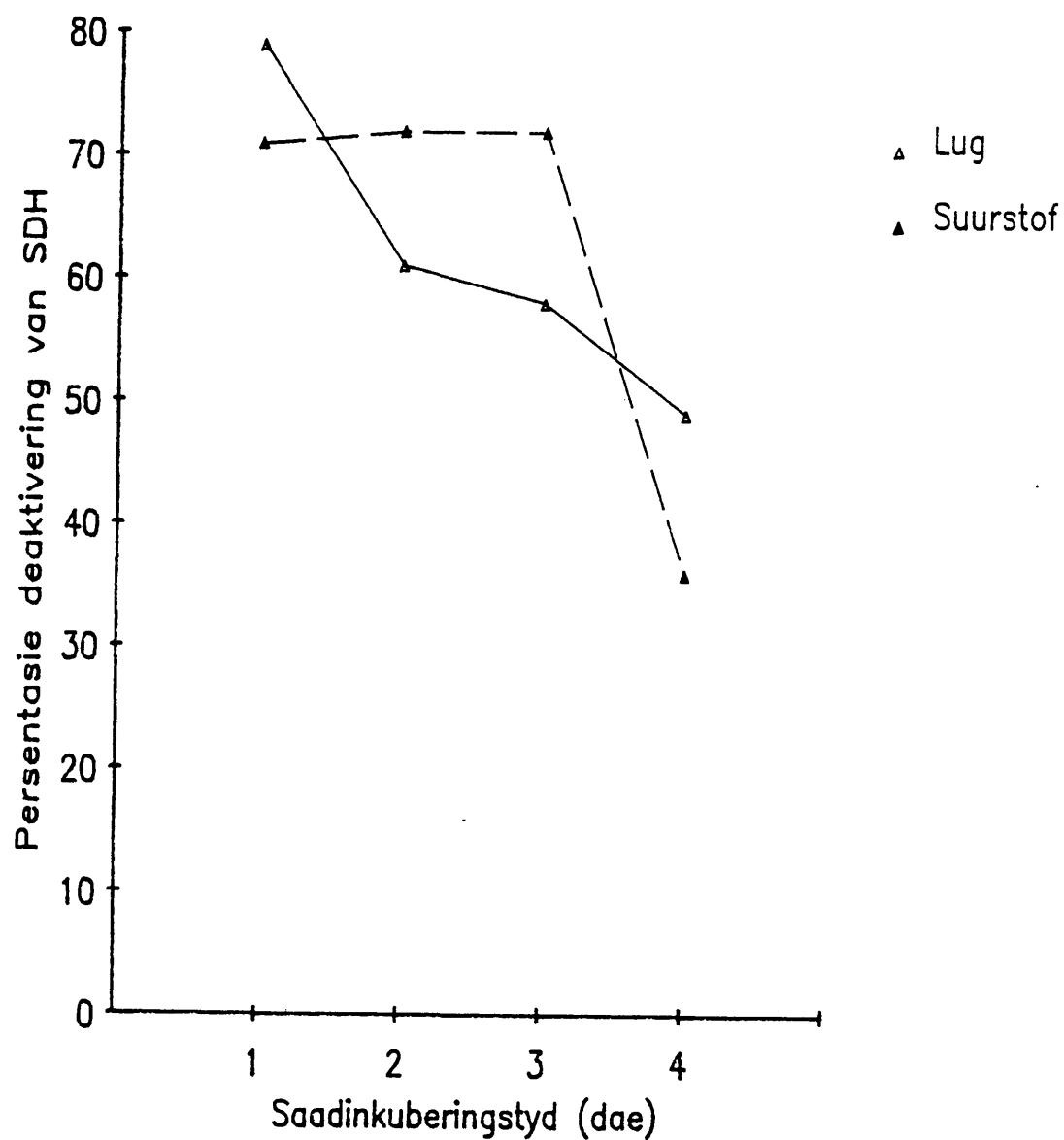
Figuur 5.4. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die DCIP-reduksietempo's (15°C) wat met die N₃-mitochondriale fraksie (12 000 g) van *Strelitzia juncea* embrio's verkry is na verskillende tye van saadinkubering. Hier verwys b (b') na "bruto"-reduksietempo's wat verkry is na byvoeging van suksinaat by blanko (a, a'). Na voorafinkubering van reaksiemengsels by 15°C (vir 11 minute is reaksies geïnisieer en bepaal (c, c'), waarna OAA bygevoeg is (d, d').

Aktivering van die SDH-ensiem (slegs aktivering by 15°C en by 'n PMS-konsentrasie van $1,077 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ is vergelykbaar met die "geen-aktivering" data en word in die Figuur aangegee), het feitlik deurgaans meer as 'n verdubbeling van aktiwiteit tot gevolg gehad (Figuur 5.4; vergelyk "netto" geaktiveerde SDH-reaksie $\overline{c-a}$ met netto ongeaktiveerde SDH-reaksie $\overline{b-a}$). Die byvoeging van OAA het tot 'n onmiddellike afname in tempo tot die vlak van die agtergrondtempo gelei (Figuur 5.4 d en d').

Net soos wat Singer *et al.* (1973) vir die mitochondrions van *Phaseolus aureus* saailinge en *Brassica oleracea* bloeiwyses gevind het, blyk dit dus dat *Strelitzia juncea* embryo's se SDH gedeeltelik gedeaktiveer was. Die persentasie deaktivering vir pas geïsoleerde *P. aureus* mitochondrions was 60 en vir *B. oleracea* 80%. Nakayama *et al.* (1980) het 'n deaktivering van 30 tot 80% van die gesolubiliseerde mitochondriale SDH gekry. Wat *S. juncea* betref, het lugbehandeling 'n amper gelykmatige afname van 79 tot 49% in deaktivering oor die vier inkuberingsdae tot gevolg gehad, terwyl by die suurstofsade 'n hoë vlak van deaktivering ($\geq 70\%$) oor die eerste 3 dae gevind is met 'n skielike daling na 36% deaktivering op dag 4 (Figuur 5.5; bereken uit Figuur 5.4 as $\frac{100 \overline{c-b}}{\overline{c-d}}$). Die tendens oor die eerste 3 inku-

beringsdae is dus skynbaar dat die suurstofsade 'n hoër mate van SDH-deaktivering vertoon.

Suksinaatdehidrogenase speel 'n sleutelrol in die voorgestelde skemas vir die benutting van lipiedreserwes deur β -oksidase in die glioksisome en glikoneogenese in vetryke sade. Dus was 'n aktiewe SDH eerder in die mitochondrions van die vetryke embryo's van die kiemingsgeïnduseerde suurstofsade as in dié van die dormante lugsade te wagte. Hierby moet egter in gedagte gehou word dat geen isositraatliase-aktiwiteit in die ekstrakte aangetref kon word nie; dit is dus heel moontlik dat daar geen glioksisomale aktiwiteit oor die eerste 3-4 dae van saadinkubering in die embryo's voorgekom het nie. Die RK-waardes wat Ybema (1983) vir *S. juncea* sade oor die eerste vier inkuberingsdae verkry het, dui ook nie op glikoneogenese-aktiwiteit nie.



Figuur 5.5. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die persentasie deaktivering van suksinaatdehidrogenase soos bepaal vir die N_2 -mitochondriale fraksie (12 000 g) van *Strelitzia juncea*-embrio-ekstrakte wat verkry is na verskillende tye van saadinkubering. SDH-bepalings is by 15°C uitgevoer.

Dit strook met die literatuur waarvolgens ICL-aktiwiteit eers merkbaar begin toeneem ná radikulaverskyning by nie-dormante sade (Becker *et al.* 1978).

Alle aanduidings is dat ook by plantmitochondrions SDH-deaktivering die gevolg is van OAA wat aan die ensiem gebind is (Singer *et al.* 1973). Dit is nie duidelik wat die rol van deaktivering *in vivo* kan wees nie aangesien die omslaggetal vir SDH hoër is as vir die Krebs siklus. Dit wil eerder voorkom asof die beperkende faktor in respirasie die beskikbaarheid van suksinaat sal wees; laasgenoemde se konsentrasie word normaalweg deur die aktiwiteit van suksiniel-ko. A sintetase en die voorafgaande ensieme van die Krebs siklus bepaal (Wiskich 1980).

Benewens hierdie beperkte interne mitochondriale bron van suksinaat, is daar ook 'n ander potensiële groot bron van suksinaat ekstern tot die mitochondrion wat tot hoë SDH-aktiwiteit kan lei en dus wel SDH-regulering mag noodsaak, nl. glioksisomale aktiwiteit tydens β -oksidase en glikoneogenese (Wiskich 1980). Of SDH wel tydens glikoneogenese of daarvóór deur OAA *in vivo* gereguleer word, val nog te besien; net so sal die hoë mate van deaktivering van SDH in die embrio's van suurstofsade en die moontlike verband wat dit met die afwesigheid van glioksisomale aktiwiteit het, aan verdere eksperimentering onderwerp moet word. Nie alle vetryke sade toon glioksisomale aktiwiteit nie (Mayer & Marbach 1981).

Die afleidings oor die mate van deaktivering van SDH (Figure 5.4 en 5.5) word met omsigtigheid voorgehou omdat die SDH-aktiwiteit slegs by een PMS-konsentrasie bepaal is. Singer (1974) het reeds gewaarsku dat "results based on a single dye concentration may yield misleading or even meaningless results." Daarby moet in gedagte gehou word dat aktivering by 'n temperatuur van 15°C nie noodwendig tot volle aktivering van SDH lei nie, soos uit die volgende bespreking sal blyk.

5.3.3.3 Die invloed van PMS-konsentrasie en aktivering by verskillende temperature op die SDH-aktiwiteit

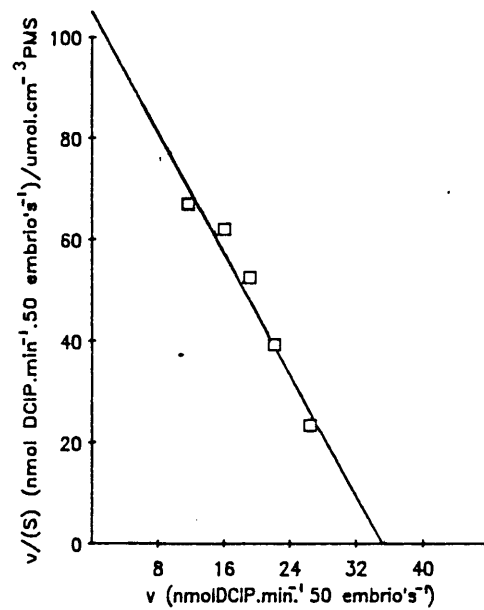
SDH-aktiwiteit in hierdie afdeling (5.3.3.3) verwys telkens na die "netto" SDH-aktiwiteit, dit wil sê ná korrigering vir die agtergrondreduksietempo van DCIP.

Soos hierbo gemeld, is dit aanbevelingswaardig om die SDH-aktiwiteit by 'n reeks PMS-konsentrasies te bepaal en die optimum aktiwiteit dan deur berekening vas te stel. Verder kan volle aktivering van die SDH-ensiem bewerkstellig word deur voorafinkubering by 30°C (Singer *et al.* 1973) en is dit ook in hierdie studie toegepas. Omdat hierdie studie primêr daarop gemik is om na moontlike verskille in die respiratoriese metabolisme tussen die embryo's van lug- en suurstofsade te soek, is dit goedgevind om ook die ongeaktiveerde SDH-aktiwiteit van die twee behandelings met mekaar te vergelyk. Uit die vorige afdeling (5.3.3.2) blyk dit dat voorafinkubering by 15°C egter reeds 'n mate van SDH-aktivering tot gevolg gehad het.

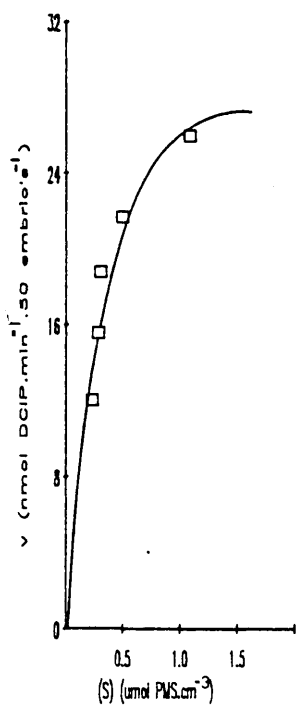
Soos in die vorige paragrafe aangevoer, is die SDH-aktiwiteit van die N₂-fraksies (Figuur 5.1, p 98) by verskillende PMS-konsentrasies bepaal en daaruit is die V_{max} (PMS)-waardes deur berekening verkry. Daarbenewens is SDH-aktivering van *S. juncea* uitgevoer deur reaksiemengsels vir 8 minute by 15 of 30°C te hou (kyk 5.3.1.2 c & d, p104) gevolg deur 'n 3 minute temperatuurekwilibrering waarna die DCIP-reduksietempo by 15°C bepaal is (Singer *et al.* 1973). Daarop is die reaksie gerem deur die byvoeging van OAA en die oorblywende DCIP-reduksietempo (Figuur 5.2 B; p109) is as agtergrond beskou om die "netto" SDH-aktiwiteit (= netto DCIP-reduksietempo = v te bepaal.

SDH se K_M- en V_{max}-waardes vir PMS is met behulp van onsuiwer mitochondriale fraksies verkry en die interpretering van sodanige waardes word met voorbehoud gedoen.

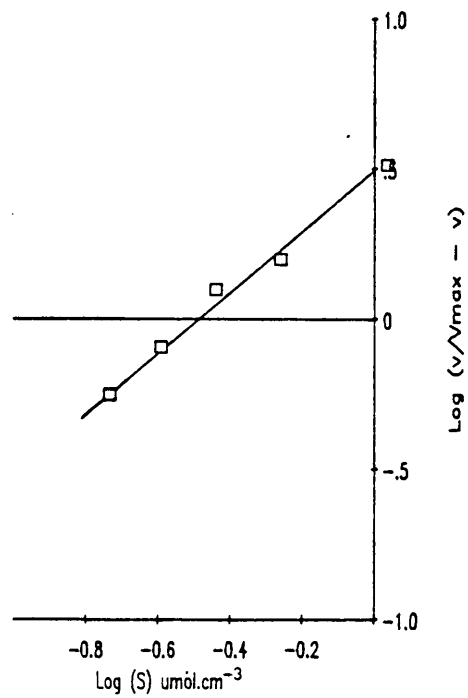
Figuur 5.6A



Figuur 5.6B



Figuur 5.6C



Figuur 5.6 A. Eadie-Scatchard stip van die reaksietempo's (v) vir die suksinaatdehidrogenase reaksie by 15°C met PMS as substraat en soos bepaal vir die N_3 -mitochondriale fraksie (12 000 g) van *Strelitzia juncea* embrio's van lugbehandelde sade na 2 dae van saadinkubering by 25°C .

5.6 B. Ensiemversadigingskromme wat verkry is deur nie-lineêre regressie van die v , (PMS) data van Figuur 5.6 A.

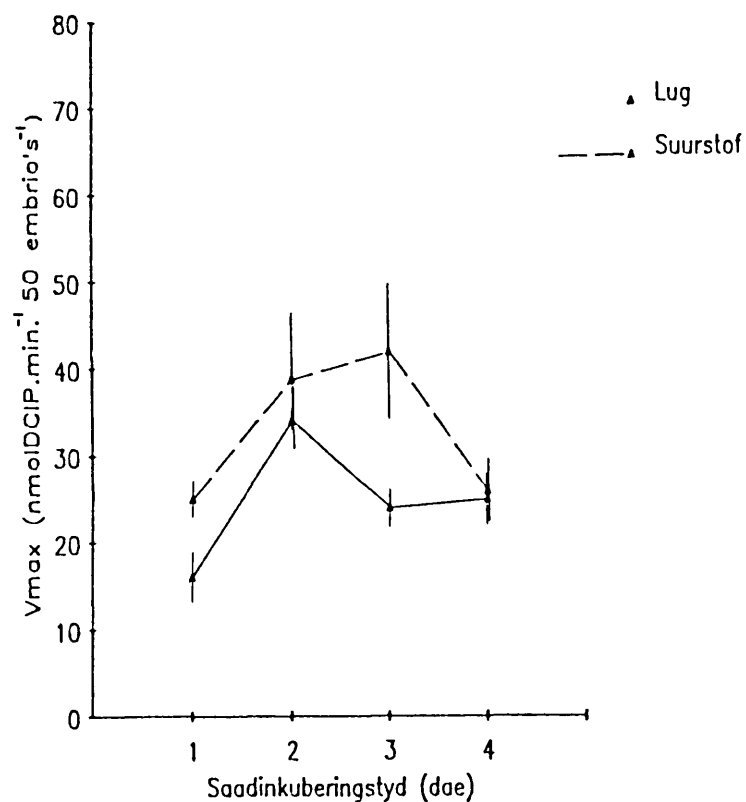
5.6 C. 'n Hill-stip vir die v , (PMS) data van Figuur 5.6 A.

Die SDH-aktiwiteit het grootliks van die PMS-konsentrasie afgehang en het 'n tipiese ensiemversadigingskromme gegee, soos blyk uit die Eadie-Scatchard analise (Segel 1976) wat 'n lineêre transformasie van die Michaelis-Menten vergelyking is (Figuur 5.6 A). In hierdie studie is by Segel (1976) se karakterisering van 'n v teenoor $v/(S)$ stip as 'n Eadie-Scatchard stip gehou. Meer algemeen is die benaming Eadie-Hofstee, wat in so 'n onlangse bron soos Fersht (1985) aan-gegee word, maar dan met $v/(S)$ op die X-as en v op die Y-as. Die datapunte vir die Eadie-Scatchard stip toon 'n effense "kromming" wat in 'n meerdere mate by die netto DCIP-reduksie-tempo's (SDH-aktiwiteit) as by die "bruto" DCIP-reduksietempo's merkbaar is. Die effense "kromming" van die datapunte was vir sommige ekstrakte baie opmerkliker as vir ander en kan eerstens die gevolg wees van sigmoïdale kinetiese eienskappe van die ensiem.

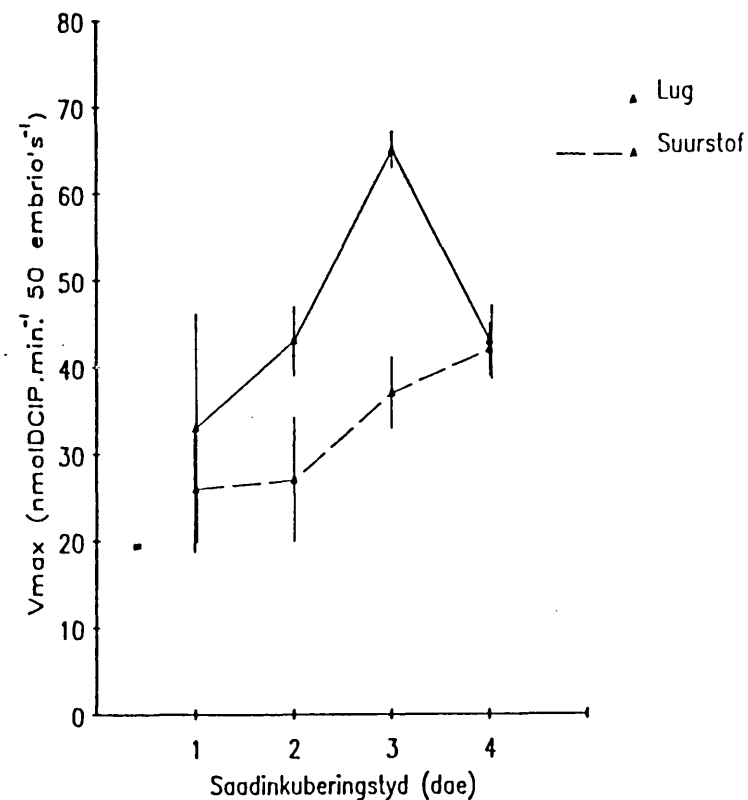
Gevolgtlik is die data aan 'n Hill-analise (Segel 1976) onderwerp (Figuur 5.6 C). Toegegee dat die datapunte min is vir 'n Hill-analise, maar met die data tot beskikking kon geen koöperatiewe verskynsels waargeneem word nie (Hill koëffisiënt $n \approx 1$ vir al die gevalle).

Tweedens kan die "kromming" in die datapunte die gevolg van die lineêre transformasie wees wat tot distorsie van data kan lei (Sagnella 1985). Om hierdie moontlikheid uit te skakel, is 'n nie-lineêre regressie op die oorspronklike datapunte ((PMS), v) uitgevoer volgens die rekenaarprogram van Duggleby (1981). Vir die uitvoer van die program is normale standaard-afwyking en bikwadratiese weging gebruik; vir beramers van die V_{\max} - en K_M -waardes is die waardes wat met die Eadie-Scatchard analises verkry is, gebruik. Goeie passing is meestal verkry (Figuur 5.6 B) en die program het die V_{\max} - en K_M -waardes van SDH vir PMS met teoreties berekende foutgrense gegee (Figure 5.7 en 5.8).

Figuur 5.7A



Figuur 5.7B



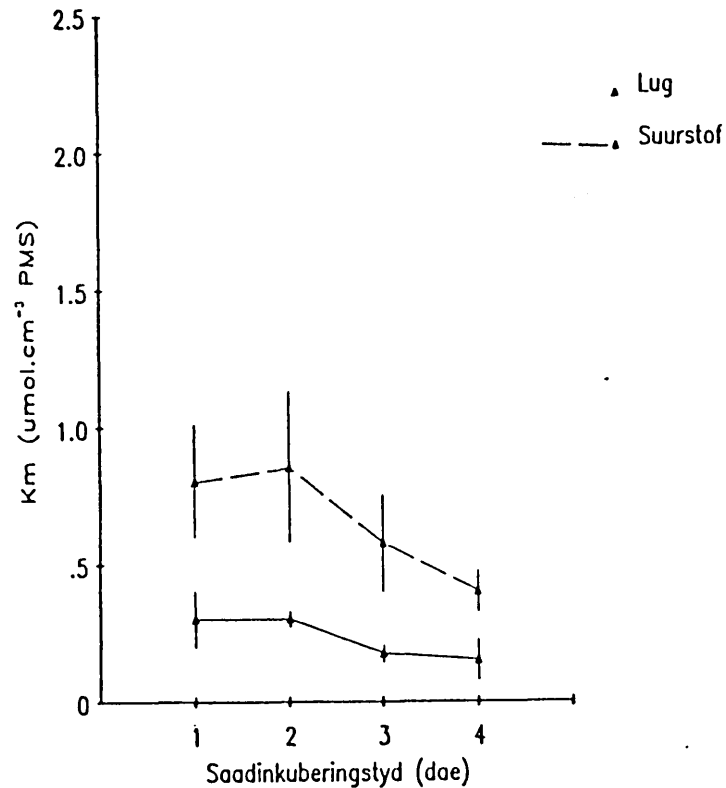
Figuur 5.7. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die V_{max} (PMS)-waardes vir die suksinaatdehidrogenase (SDH)-reaksie by 15°C soos bepaal vir die N_3 -mitochondriale fraksies (12 000 g neerslag) van ekstrakte van *Strelitzia juncea*-embrio's wat na verskillende tye van saadinkubering geëkstraheer is.

5.7 A. SDH is geaktiveer deur voorafinkubering van ekstrakte met suksinaat vir 11 minute by 15°C.

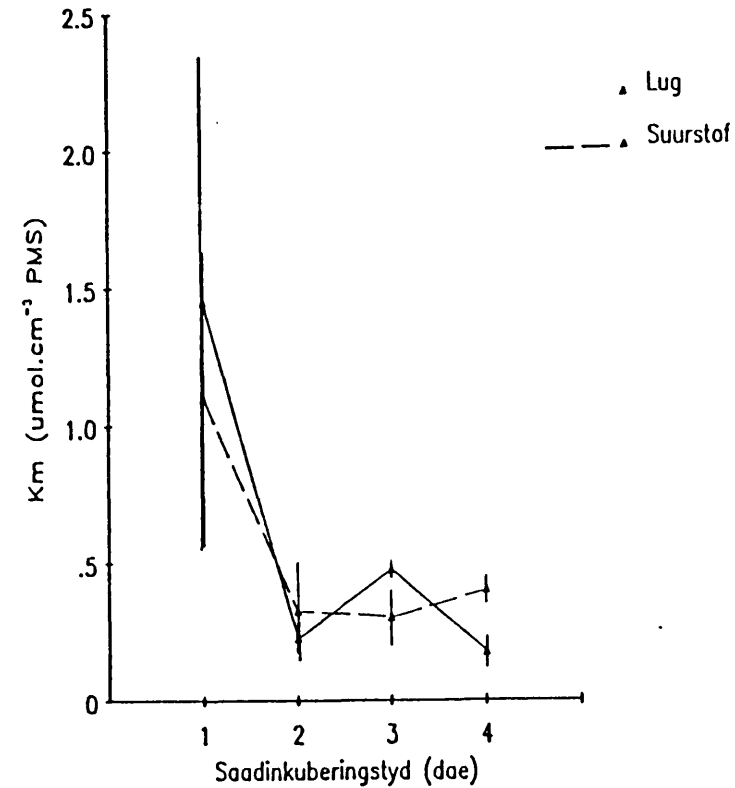
5.7 B. SDH is geaktiveer deur voorafinkubering van ekstrakte met suksinaat vir 8 minute by 30°C en 3 minute by 10°C.

Die aangeduide foutgrense is bereken deur passing met behulp van nie-lineêre regressie.

Figuur 5.8A



Figuur 5.8B



Figuur 5.8. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die K_M (PMS)-waardes vir die suksinaatdehidrogenase (SDH)-reaksie by 15°C soos bepaal vir die N_2 -mitochondriale fraksies (12 000 g neerslag) van ekstrakte van *Strelitzia juncea*-embrio's wat na verskillende tye van saadinkubering geëkstraheer is.

5.8 A. SDH is geaktiveer deur voorafinkubering van ekstrakte met suksinaat vir 11 minute by 10°C.

5.8 B. SDH is geaktiveer deur voorafinkubering van ekstrakte met suksinaat vir 8 minute by 30°C en 3 minute by 10°C.

Die aangeduide foutgrense is bereken deur passing met nie-lineêre regressie.

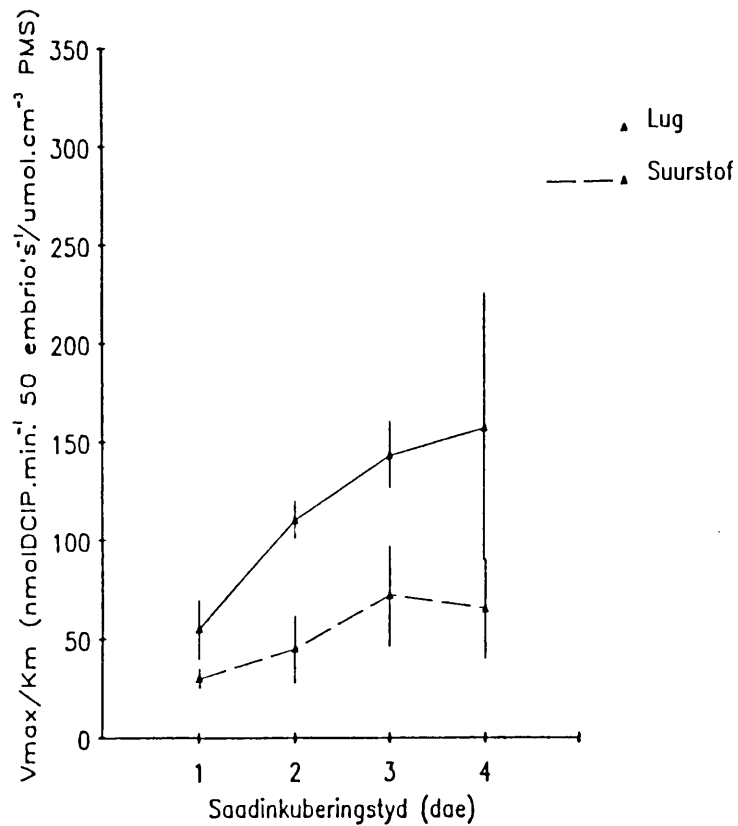
Die V_{\max} (PMS)-waardes vir netto SDH-aktivering by 15°C was volgens Figuur 5.7 A hoër as die waardes wat met die hoogste PMS-konsentrasie van $1,077 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ gevind is, en was oor die algemeen hoër vir die embryo's van suurstofsade. Hierdie V_{\max} -waardes het die vroeëre gevolgtrekking (kyk Figuur 5.5) dat suurstofbehandeling van die sade tot 'n groter inaktivering van die embryo's se SDH-aktiwiteit gelei het, nog sterker ondersteun. Op inkuberingsdag 4, een dag voordat kieming by suurstofsade 'n aanvang begin neem, was die SDH-aktiwiteit (15°C geaktiveer) dieselfde as by lugsade.

Bogenoemde resultate kan met aktivering by 30°C gekontrasteer word (Figuur 5.7 B). Behalwe vir dag 4, het 30°C voorafinkubering van die embryo's van suurstofsade nie 'n groot verhoging in SDH-aktiwiteit tot gevolg gehad nie en daar was 'n geleidelike stygende tendens in SDH-aktiwiteit van dag 1 na dag 4 van inkubering. Daarteenoor was die SDH-aktiwiteit van embryo's van lugsade hoër na 30°C as na 15°C aktivering, soseer dat na 30°C aktivering die lugsade se N_3 -embriofraksies 'n hoër SDH-aktiwiteit as dié van die suurstofsade gehad het.

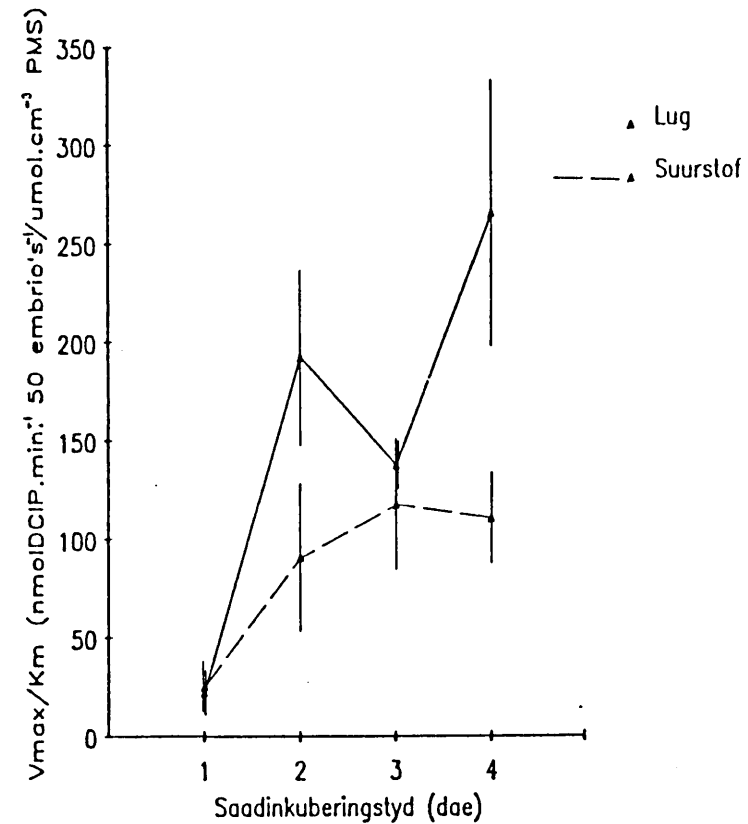
Die K_M (PMS)-waardes van SDH was na 30°C aktivering ongeveer dieselfde vir die embryo's van die twee behandelings (Figuur 5.8 B) maar die K_M (PMS)-waardes na 15°C aktivering was vir die suurstofsade se N_3 -embriofraksies deurgaans hoër (Figuur 5.8 A). Dit lyk na 'n teenstrydigheid dat die affiniteit vir die kunsmatige elektrondraer PMS vir die lugsade se N_3 -embriofraksies hoër was alhoewel die V_{\max} -waardes laer was as dié van die suurstofsade (15°C aktivering). Een moontlike verklaring hiervoor is dat die konsentrasie van die SDH-ensiem in die geval van die lugsade laer was, alhoewel die affiniteit vir PMS hoër was, moontlik weens 'n mindere mate van deaktivering.

Ten einde 'n ander basis van vergelyking te kan verkry, is die "doeltreffendheid" van SDH vir PMS-reduksie vir die twee behandelings verkry deur die V_{\max}/K_M -verhouding te bereken (Segel 1976). Daarvolgens was die N_3 -embrio-ekstrakte van die

Figuur 5.9A



Figuur 5.9B



Figuur 5.9. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die V_{\max}/K_M (PMS)-verhoudings vir die suksinaatdehidrogenase (SDH)-reaksie by 15°C soos bepaal vir die N₃-mitochondriale fraksies (12 000 g neerslag) van ekstrakte van *Strelitzia juncea*-embrio's wat na verskillende tye van saadinkubering geëkstraheer is.

5.9 A. SDH is geaktiveer deur voorafinkubering van ekstrakte met suksinaat vir 11 minute by 10°C.

5.9 B. SDH is geaktiveer deur voorafinkubering van ekstrakte met suksinaat vir 8 minute by 30°C en 3 minute by 10°C.

Die aangeduide foutgrense is bereken deur passing met nie-lineêre regressie.

lugsade "doeltreffender" na sowel 15 as 30°C aktivering (Figure 5.9 A en B) deurdat hulle geneig het om 'n hoër V_{\max}/K_M -verhouding te hê oor die vier inkuberingsdae.

Die resultate van Figure 5.7 tot 5.9 kan nie verklaar word sonder om sekere aannames te maak nie. Eerstens sal kortliks op van die aannames gewys word en daarna sal 'n kort interpretasie van die resultate gegee word, bloot om as 'n vertrekpunt te dien vir latere eksperimentele werk.

Die V_{\max} -waarde kan volgens eenvoudige ensiemkinetiese beskouings as $V_{\max} = k_p (E_T)$ gegee word, dit wil sê as 'n funksie van die tempokonstante (k_p) vir die dissosiasie van die ensiemsubstraatkompleks (ES), en van die totale ensiemkonsentrasie (E_T). Aangesien dieselfde ensiem SDH in dieselfde soort weefsel (*Strelitzia juncea* embrio-weefsel) hier ter sprake is, kan verwag word dat die V_{\max} -waardes vir PMS grotendeels 'n maatstaf van die totale SDH-konsentrasie sal wees. So 'n afleiding word egter gekompliseer deur die bevinding dat die mitochondriale SDH-ensiem in twee vorme kan voorkom (Hattori & Asahi 1982); of die twee isoensieme se kinetiese gedrag ten opsigte van PMS sal verskil, is nie bekend nie. Dit kan in elk geval nie sonder meer aanvaar word dat slegs die een SDH-isoënsiem by sowel die lug- as die suurstofsade sal voorkom nie. PMS het ook twee verskillende interaksies met die SDH-kompleks en die affiniteit van PMS vir die twee lokusse is verskillend (Singer 1974).

'n Verdere faktor wat in aanmerking geneem moet word voordat V_{\max} as 'n maatstaf van E_T beskou word, is nie net dat die V_{\max} -waarde deur die mate van inaktivering van die SDH-ensiem beïnvloed sal word nie, maar ook dat die mate van binding van SDH aan die mitochondriale binnemembraan deur die fisiologiese toestand van die weefsel bepaal kan word, soos wat Nakayama & Asahi (1981) vir die mitochondrions van *Pisum sativum* saadlobbe gevind het. Die SDH-ensiem se aktivering deur suksinaat is ook afhanklik van die ensiem se binding aan die membrane. Voorts kom daar 'n oplosbare SDH-ensiem in

saadlobbe voor wat tydens imbibering in die mitochondriale membrane ingebou word (Nakayama *et al.* 1980). Vanweë die agtergrondreduksietempo's wat met die bovloei-stowwe van *S. juncea* embryo-ekstrakte gevind is (soos reeds onder 5.3.3.1b, p110 bespreek) kon nie vasgestel word of die SDH-aktiwiteit van die N_3 -fraksies die totale SDH-aktiwiteit van die ekstrakte verteenwoordig en of daar moontlik ook 'n oplosbare sitosoliese SDH-komponent is wat by die lug- en suurstofsade van mekaar mag verskil nie.

By gebrek aan meer inligting sal voorlopig aanvaar word dat die SDH-ensiem van die embryo-ekstrakte se mitochondriale fraksies 'n hoër konsentrasie in die geval van suurstofsade het - soos wat vir die ander mitochondriale ensieme cyt ox en MDH gevind is volgens die bespreking onder 5.5.3.6 (p 150). Indien dit die geval is, kan die resultate van Figure 5.7 tot 5.9 so verklaar word:

Die rede vir die groter V_{max}/K_M -verhouding van die N_3 -embriofraksies van die lugsade is waarskynlik daarin geleë dat hulle SDH-ensiem beter deur 15°C inkubering geaktiveer word en veel beter op aktivering by 30°C reageer as wat die geval is met die suurstofsade. Dit is verder moontlik dat aktivering van SDH by 15°C die volle moontlike verlaging in die skynbare K_M -waarde van die lugsade se N_3 -embriofraksies veroorsaak, terwyl dit nie die geval is by suurstofsade nie. Laasgenoemde se skynbare K_M -waarde verlaag eers na 30°C aktivering, maar sonder om 'n noemenswaardige toename in die V_{max} -waarde te toon.

Bogenoemde interpretasie dat die SDH-ensiem in die geval van suurstofbehandeling van die sade in 'n groter mate geïnaktiveer is, rym nie met die verwagting van 'n aktiewer mitochondriale elektronoordragsistiem by die kiemingsgeïnduseerde suurstofsade nie. Tog is dit in hierdie verband interessant dat SDH nie net deur OAA geïnaktiveer kan word nie, maar ook deur suurstof. Tydens die ekstrahering van die oplosbare (membraan-ongebonde) SDH uit hipokotiele - juis die vorm waarin SDH

tydens vroeë inkubering in saadlobbe voorkom volgens Nakayama et al. (1980) - word van anaerobiese mediums gebruik gemaak (Burke et al. 1982). Hoe 'n suurstof- of OAA geïnaktiveerde SDH-ensiem met die opheffing van dormansie verband kan hou, is nie bekend nie. Volgens die resultate hier verkry, is 'n ondersoek na 'n interaksie tussen O_2 en SDH by *S. juncea* belangrik.

Inderwaarheid kon geen literatuur oor die verandering in die eienskappe van SDH tydens die opheffing van die dormante toestand van sade en die rol van SDH met dormansieverbreking gevind word nie. Wat nie-dormante sade betref, is dit bekend dat die intakte mitochondrions van *Arachis* embryo's oor die eerste 16 uur van inkubering 'n lae tempo van suksinaatoksidering handhaaf. Hierdie "jong" mitochondrions het ook 'n lae konsentrasie van sitochroom C - wat nodig is vir elektronoordrag vanaf suksinaat - bevat (Wilson & Bonner 1971). Vir *Pisum sativum* saadlobbe is 'n groot toename in SDH-aktiwiteit tydens imbibering gevind (Solomos et al. 1972).

Ten slotte moet weer daarop gewys word dat die resultate en afleidings oor SDH wat hier aangebied is, slegs voorlopig is; finale gevolgtrekkings is nie geregverdig voordat verdere eksperimentele gegewens nie ingewin word nie. Dit is wel so dat vir elke behandeling een en dieselfde ekstrak vir die bepaling van agtergrondtempo's, SDH-aktiwiteit by verskillende PMS-konsentrasies en aktivering by 15 en 30°C gebruik is, maar aan die ander kant is slegs een ekstrak vir elke behandeling gebruik. Verder is van onsuiver mitochondriale preparate gebruik gemaak. Oor die breë gesien, is dieselfde tendense wat op 'n bepaalde inkuberingsdag waargeneem is, ook in 'n meerdere of mindere mate by die ander inkuberingsdae waargeneem en dit dien deels as versterking van die resultate en interpretasies. Nogtans kan die afleidings slegs as 'n basis beskou word waarop verdere eksperimentele werk gebou kan word vir 'n bestudering van die SDH van *Strelitzia juncea* embryo's.

5.3.4 Opsomming

'n Gedeeltelik gesuiwerde mitochondriale fraksie is uit *Strelitzia juncea* embryo's verkry. Die mitochondriale fraksies het 'n OAA-ongevoelige PMS-afhanklike DCIP-reduksietempo as agtergrondreaksie gehad. In die teenwoordigheid van suksinaat egter, was daar 'n verhoogde OAA-gevoelige DCIP-reduksietempo wat aan die werking van SDH toegeskryf is.

Uit die gegewens is afgelei dat die SDH-ensiem gedeeltelik ge-deaktiveer was - ca 70% in die geval van suurstofsade - en dat laasgenoemde se deaktivering hoër was as vir die embryo's van lugsade. Oor die 4 inkuberingsdae was daar 'n afname in die deaktivering van die ensiem. Aktivering by 30°C was doeltreffender as aktivering by 15°C, veral vir die SDH van embryo's van lugsade.

Die V_{\max}/K_M -verhouding vir PMS was na sowel 15 as 30°C aktivering groter by die lugbehandeling en dit kan moontlik toegeskryf word aan groter deaktivering of 'n ander soort deaktivering van die suurstofsade.

In die bovloeistof was 'n verbinding(s) wat PMS-onafhanklike reduksie van DCIP veroorsaak het. Hierdie agtergrondreaksie se tempo is verlaag deur die byvoeging van suksinaat, maar die verlaging in tempo was meer by die lugekstrakte as die suurstofekstrakte. OAA het ook 'n afname in die agtergrond DCIP-reduksietempo veroorsaak.

5.4 SITOCHROOMOKSIDASE-AKTIWITEIT (cyt ox)

5.4.1 Materiaal en metode

Sitochroomoksidase-bepalings is op fraksies N₃, N₅ en S₅ uitgevoer (kyk Figuur 5.1, p 98).

Die essaiëringsmetode van Smith (1955) is toegepas maar met 'n sterker sitochroom-C-voorraadoplossing (Yonetani 1961). Die reaksiemengsel se totale volume was 3,0 cm³ en die finale

reagenskonsentrasies was $66,7 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ K-fosfaatbuffer pH 7,0 en $15 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-3}$ cyt C (gereduseer).

(a) Die reaksie is begin deur die byvoeging van die ekstrak. Die oksidering van cyt C tydens die aktiwiteitsbepaling is spektrofotometries gevolg deur die absorpsie by 550 nm op vasgestelde tye te bepaal deur gebruikmaking van 'n Cary 219 spektrofotometer by 25°C en 'n 1 cm-deursnee kuvet. Na verloop van ca 4 minute is $0,1 \text{ cm}^3$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -oplossing (versadig) bygeroer en die absorpsieverandering oor 3 minute gevolg.

(b) Die voorraad cyt C-oplossing is berei deur cyt C in cyt ox-reaksiebuffer ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ K-fosfaatbuffer pH 7,0) op te los en oor 5% Pd-asbestos soos volg te reduseer:

Pd-asbestos (2 g) is by 20 cm^3 $450 \text{ nmol}\cdot\text{cm}^{-3}$ cyt C (Boehringer) gevoeg, N_2 -gas is vinnig deurgeborrel vir 5 minute, gevolg deur H_2 -gas vir 1 uur en toe weer N_2 -gas vir 5 minute. Die oplossing is vinnig deur 'n klein Whatman nr 1 filtreerpapier gefiltreer en N_2 -gas is weer vir 1 minuut deurgeborrel. Die oplossing is onder N_2 geberg. Die reduksie is by 25°C uitgevoer en skuiming is voorkom deur silikonghries net bokant die oplossing aan die wande van die houër te smeer.

Reduksie van cyt C deur $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ is nie in hierdie studie toegepas nie omdat dit tot waterstofperoksiedvorming in die gereduseerde cyt C-oplossing kan lei. Indien die ekstrakte wat ondersoek word sitochroom-C-peroksidase sou bevat, sou dit tot foutiewe cyt ox-bepalings kon lei (Smith 1955). Aangesien Van de Venter (1974) hoë peroksidase-aktiwiteit in die bovloei-stoffraksies van *Strelitzia reginae* ekstrakte gevind het, is die Pd-asbestos reduksiemetode van cyt C toegepas om moontlike probleme by die bepaling van die cyt ox-aktiwiteit van die bovloei-stof-fraksie uit te skakel.

Die Pd-asbestos reduksiemetode het in loodsproewe goeie reduksie van cyt C tot gevolg gehad, maar nie toe die werklike eksperiment uitgevoer is nie. Terwyl goeie reduksie

’n A_{550}/A_{565} -verhouding van ≥ 6 behoort te lewer (Smith 1955), is die eksperimente met ’n cyt C-oplossing wat ’n verhouding van 5,9 gee, uitgevoer. Gevolglik was al die cyt C in die oplossing nie in die gereduseerde toestand nie. Verlies van vog as gevolg van gasdeurborreling het egter ’n mate van konsentrering van die cyt C-oplossing veroorsaak. Vanweë hierdie faktore was die presiese cyt C (gered.) konsentrasie in die kuvet onbekend.

Die fosfaatkonsentrasie in die kuvet is op grond van Khan *et al.* (1968) as $66,7 \text{ mmol.dm}^{-3}$ gekies. Verskillende pH-waardes is vir die uitvoer van die cyt ox-reaksie aangeteken: 7,4 (Cooperstein & Lazarov 1951); 7,0 (Smith 1955); 5,8 (Yonetani 1961 vir die gesuiwerde membraanongebonde ensiem); en 7,2 (Srivastava & Sarkissian 1971) vir die gesuiwerde membraanongebonde ensiem. Vir hierdie studie is slegs ’n pH van 7,0 gebruik.

Die uitwerking van sianied op die cyt ox aktiwiteit is nagegaan deur die byvoeging van ’n KCN-oplossing (kyk 5.3.1.2 a, p 103), vir bereiding) om ’n finale CN^- konsentrasie van $1 \text{ } \mu\text{mol.cm}^{-3}$ te gee.

Die proteïenkonsentrasie van die ekstrakte is volgens Bradford (1976) bepaal. As standaard vir die opstel van ’n ykkromme is BSA (beesserumalbumien) gebruik. Waardes vir proteïenkonsentrasie wat op hierdie wyse verkry is, is onderhewig aan die beperking dat die proteïene van hierdie embryo-ekstrakte nie noodwendig dieselfde tipe kleuring as die standaard (BSA) sal gee nie. So is byvoorbeeld gevind dat die bovloeistof-fraksies ’n helderder soort blou kleuring met die kleurreagens gee as wat met die mitochondriale fraksies verkry is.

5.4.2 Berekening van cyt ox-aktiwiteit

Die reaksie wat deur sitochroomoksidase gekataliseer word, is afhanklik van die konsentrasie van sitochroom C; suurstof; en

waterstofione. Normaalweg word 'n reaksiemengsel so saamgestel dat die uitgangstowwe teen optimale konsentrasies voorkom vir maksimale aktiwiteit en 'n zero-orde reaksie word verkry ten opsigte van die substrate. In sodanige gevalle is die waargenome reaksietempo 'n maatstaf van ensiemaktiwiteit.

In die geval van die sitochroomoksidase gekataliseerde reaksie, kan een van die genoemde uitgangstowwe, nl. sitochroom C, egter nie teen optimale konsentrasie gebruik word nie omdat die konsentrasie te hoog sal wees vir spektrofotometriese werk (Smith 1955). Deur eksperimentele werk is dit egter lank reeds bekend dat 'n eerste-orde reaksie met 'n konstante (maar nie-optimale) sitochroom C-konsentrasie verkry word. Die normale prosedure is dus om die eerste-orde konstante uit die eksperimentele data te bereken en dit dan te gebruik vir die berekening van die aanvanklike reaksietempo (v_0) by 'n gespesifiseerde sitochroom C-konsentrasie. Die aanvanklike reaksietempo dien dan as maatstaf van die ensiemaktiwiteit.

Dawes (1980) wys vir die algemene situasie daarop dat die eerste-orde konstante wat eksperimenteel vir 'n biochemiese reaksie van die eerste-orde verkry word, 'n skynbare eerste-orde konstante (k') is. Die aanvanklike reaksietempo (v_0) is skynbaar slegs van een substraat (sê A) afhanklik:

$$v_0 = k' (A)$$

Vir die ensiemgekataliseerde reaksie sal k' se waarde ook deur die ensiemkonsentrasie bepaal word en sal k' slegs 'n konstante waarde hê vir 'n bepaalde eksperiment waar die ensiemkonsentrasie konstant bly. Vir k' kan geskryf word:

$$k' = k (B)$$

waar k = tempokonstante vir die bepaalde reaksie
en (B) = ensiemkonsentrasie.

Die eerste-orde konstante (k) kan dus nie bepaal word nie want (B) is onbekend. Die aktiwiteitsbepaling vir die ensiem berus daarop dat k' eksperimenteel bepaal word en as 'n maatstaf van die ensiemaktiwiteit gebruik word.

In navolging van Smith (1955) is k' soos volg bereken:

$$k' = \frac{(\log \overline{W-Y} - \log \overline{X-Z}) \times 60 \times 2,303}{V} \quad \text{min}^{-1}$$

waar W = absorbansie op tyd t_0

X = absorbansie op tyd t_1

Y = absorbansie na byvoeging van ferrisianied; tyd t_3

Z = absorbansie na byvoeging van ferrisianied; tyd t_4

$V = t_1 - t_0$ in sekondes

Met *Strelitzia juncea* ekstrakte was die absorbansie na byvoeging van ferrisianied konstant sodat $Y = Z$ was.

Aangesien die aanvanklike reaksietempo (v_0) volgens Dawes (1980) soos volg bereken kan word:

$$v_0 = k' \times (A)$$

waar (A) = substraatkonsentrasie in kuvet

is v_0 bereken uit:

$$v_0 = \frac{k' \times G \times I \times (A) \times M \times 50}{E \times F \times J} \quad \text{nmol. cyt C. min.}^{-1} 50 \text{ embryo's}^{-1}$$

waar (A) = voorraadoplossing cyt C se konsentrasie (nmol.cm^{-3})

M = volume cyt C in kuvet gebruik (cm^3)

en die ander simbole se betekenis soos gewoonlik is (kyk 2.6, p 12 e.v.).

Teoreties behoort (A) 450 nmol.cm^{-3} te wees volgens die massa cyt C wat afgeweg is. Aangesien die reduksietegniek van gasborreling egter tot 'n verlies in die volume van die oplossing lei en die cyt C nie volledig gereduseer is nie, is die cyt C konsentrasie waarskynlik laer as 450 nmol.cm^{-3} . Vir die berekenings is laasgenoemde waarde egter gebruik.

Die waardes vir G en I vir die mitochondriale- en bovloei-stof-fraksies word onder MDH-berekenings gegee (5.5.2, p 142).

5.4.3 Resultate en bespreking

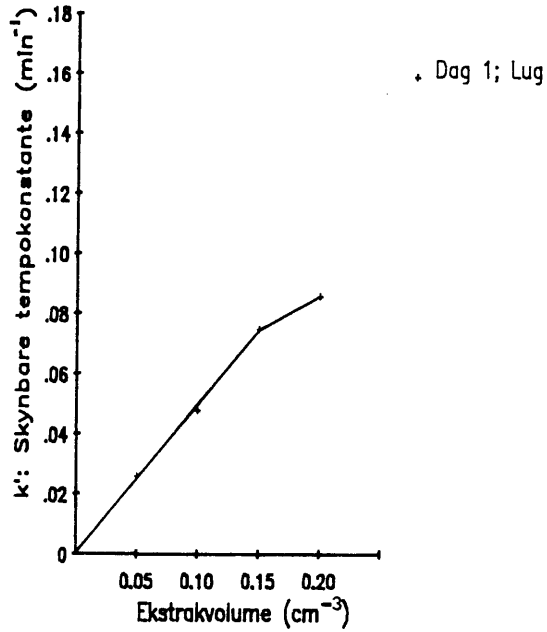
Voordat die resultate vir cyt ox-aktiwiteit bespreek word, kan hier daarop gewys word dat daar geen verskil in die proteïenkonsentrasie was van fraksies wat van lug- en suurstofsade afkomstig was nie. Geen addisionele of ander interpretasies kon gemaak word deur die aktiwiteit per mg proteïen uit te druk nie en daarom is die aktiwiteit soos in die vorige gevalle op 'n embryo-basis uitgedruk. Die resultate wat met die proteïenbepalings verkry is, word dus nie aangetoon of bespreek nie, behalwe om te sê dat die proteïenkonsentrasie van die bovloeistof bykans 100 keer hoër as dié van die mitochondriale fraksies was en dat die voorkoms van reserweproteïene enige interpretasies in verband met die proteïenkonsentrasies sou bemoeilik.

Wat die resultate vir cyt ox-aktiwiteit betref, was die cyt C-konsentrasie in die kuvet laer as die verwagte waarde (soos onder 5.4.1 en 5.4.2 verduidelik), sodat die berekende v_0 -waardes waarskynlik laer as die absolute waardes sal wees. Relatief gesproke is die waardes egter met mekaar vergelykbaar. Verder word aanvaar dat die werklike tempokonstante (k) konstant bly met behandeling en dat die skynbare tempokonstante (k') as 'n maatstaf van ensiemkonsentrasie of -aktiwiteit beskou kan word.

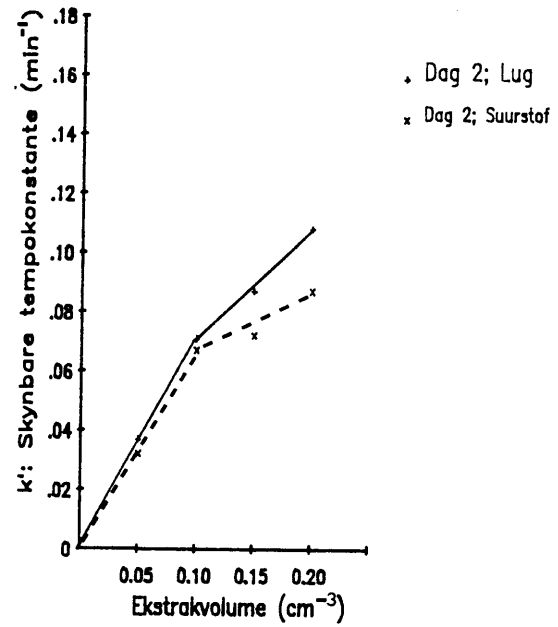
Die skynbare tempokonstantes (k') vir die N_3 -fraksies het slegs oor klein ekstrakvolumes 'n lineêre toename getoon (Figuur 5.10 A tot D). Die afwyking in reglynigheid by hoër ekstrakvolumes kan moontlik aan die relatief lae cyt C (gered.)-konsentrasie toegeskryf word. Slegs die k' -waardes vir $0,1 \text{ cm}^3$ ekstrakvolumes (lineêre gebied) is vir die berekening van die aanvanklike tempo's (v_0) vir cyt ox gebruik.

Vir al die fraksies het gegeld dat die byvoeging van KCN ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ finale konsentrasie) tot 'n onmiddellike en volkome remming van die reaksie gelei het. Geen verdere

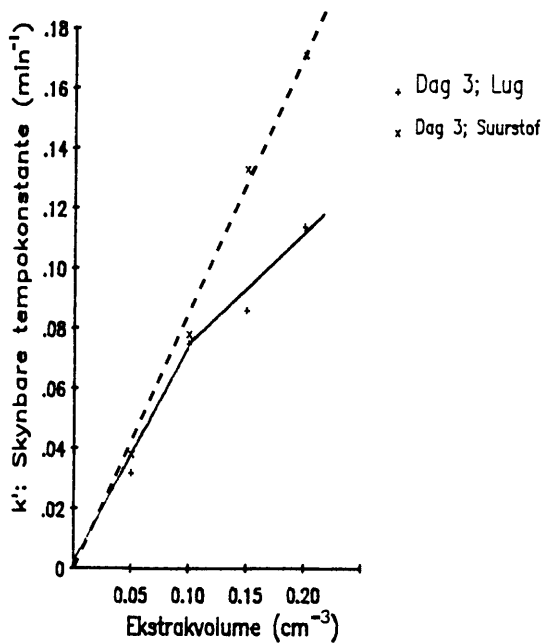
Figuur 5.10 A



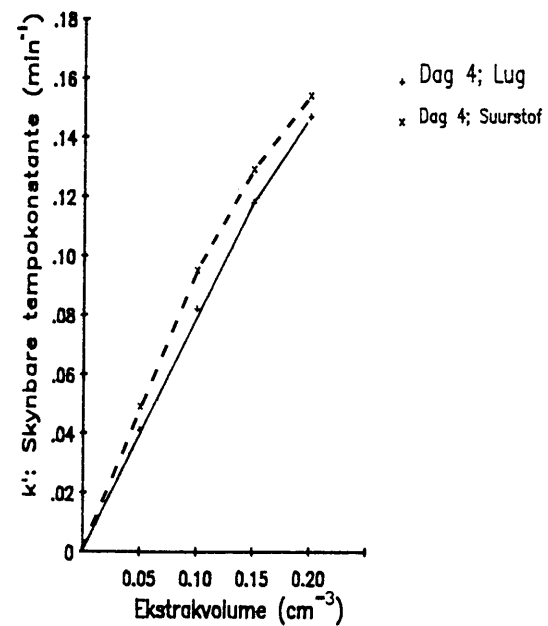
Figuur 5.10 B



Figuur 5.10 C



Figuur 5.10 D



Figuur 5.10. Die skynbare tempokonstante (k') vir die sityochroomoksidase reaksie soos beïnvloed deur die volume ekstrak in die kuwet. Ekstrak verwys na die N_3 -mitochondriale fraksie (12 000 g) van embryo-ekstrakte wat verkry is na verskillende behandelings en inkuberingsstye van *Strelitzia juncea* ekstrakte (Figure A tot D).

oksidasie of reduksie van cyt C ná KCN-byvoeging is waargeneem nie, sodat die moontlike steuring van ander cyt C-oksidasie of -reduktase reaksies nie hier ter sprake is nie (Smith 1955).

5.4.3.1 Bovloeistof se cyt ox-aktiwiteit

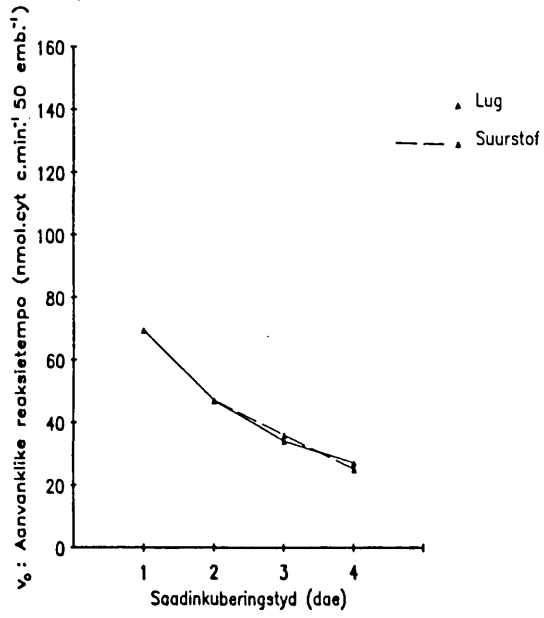
Uit Figuur 5.11 A blyk dit dat daar op dag 1 van saadinkubering 'n hoë cyt ox-aktiwiteit in die bovloeistof was maar dat oor die vier inkuberingsdae die v_0 vir cyt ox in die bovloeistof grootliks verlaag het (70 na 25 nmol. cyt C.min.⁻¹ 50 embrio's⁻¹). Hierdie afname in v_0 is by sowel die embrio's van lug- as suurstofsade gevind.

Een interpretasie van die resultate is dat die bovloeistof se v_0 vir cyt ox eintlik 'n weerspieëling is van die mate van mitochondriale breking; daarvolgens sou die mitochondrions aanvanklik baie labiel wees maar met toenemende inkuberingstyd is die mitochondrions stabiel en breking veel minder. 'n Tweede moontlike verklaring is dat die embrio's met die aanvang van inkubering alreeds 'n hoë konsentrasie cyt ox in die sitosol bevat en dat met toenemende saadinkubering die "sitosoliese" cyt ox in die mitochondrionmembrane ingebou word. Gelykluidende twee hipoteses word in 'n onlangse literatuuroorsig gegee (Pradet 1982). In dieselfde oorsig gee Pradet skynbaar voorkeur aan eersgenoemde verklaring: "It is likely that some enzymes are liberated from fragile membranes during the extraction of mitochondria. Further work has to be done in this field before the data can be interpreted." Die feit dat die bovloeistof se cyt ox-aktiwiteit vir lug- en suurstofbehandling eenders is, kan dus impliseer dat dieselfde mate van breking van mitochondrions by albei behandelings voorkom.

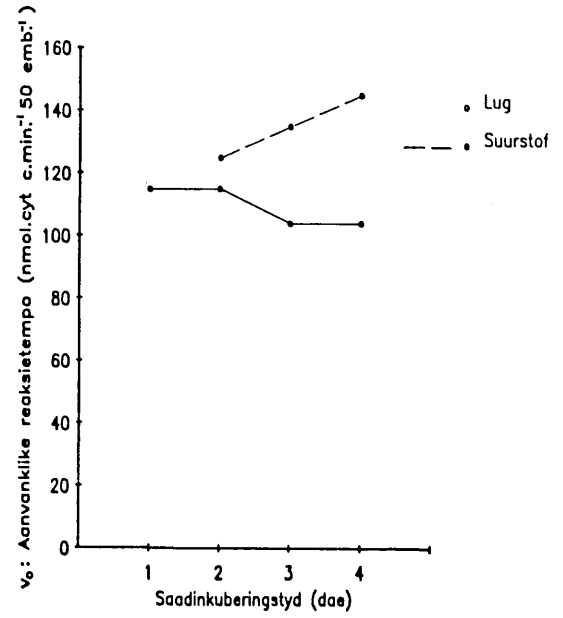
5.4.3.2 Totale cyt ox-aktiwiteit

Ten einde verdere lig op die saak te werp, is die totale cyt ox-aktiwiteit van die *Strelitzia juncea* embrio's (fraksies S_5 + N_3 + N_5) bereken en die bevinding is dat die totale cyt ox-aktiwiteit toegeneem het wat die suurstofsade betref, maar by die embrio's van die lugsade was daar eerder 'n dalende

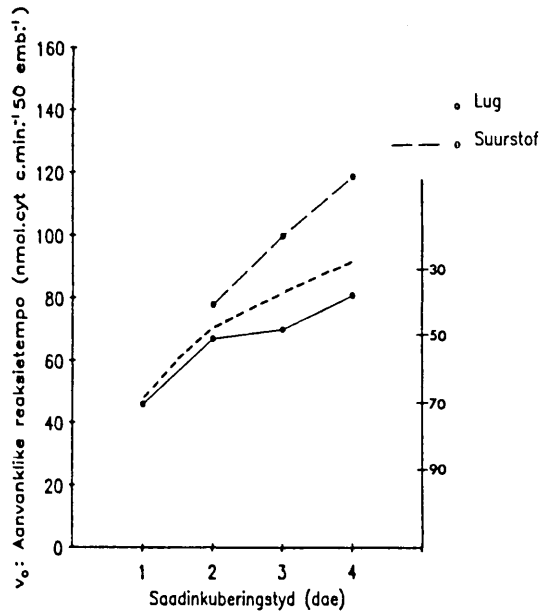
Figuur 5.11 A



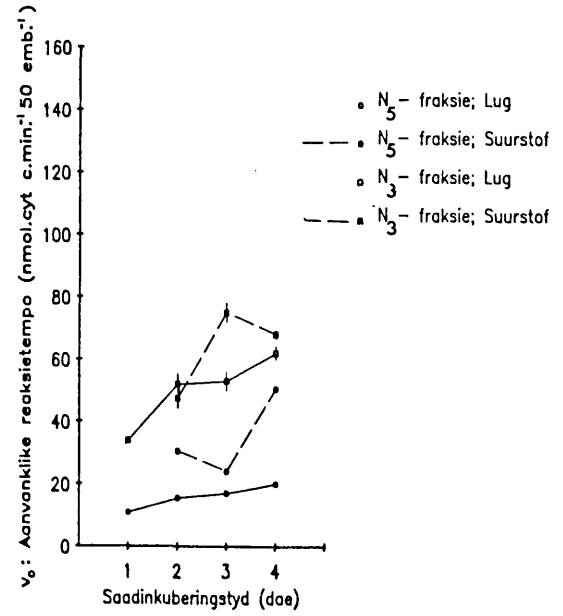
Figuur 5.11 B



Figuur 5.11 C



Figuur 5.11 D



neiging (Figuur 5.11 B). Die resultate kom ooreen met dit wat vir die mitochondriale fraksie van heelsaadekstrakte van *S. reginae* gevind is (Van de Venter 1974).

Daar bestaan twee moontlike verklarings vir die genoemde toename in totale cyt ox-aktiwiteit, naamlik aktivering van bestaande ensiem en *de novo* proteïenbiosintese. Mayer (1977) en Mayer & Marbach (1981) het op die kwessie van ensiemaktivering tydens saadinkubering ingegaan maar nie na cyt ox in die verband verwys nie. Nakayama *et al.* (1980) het ensiemaktivering egter bespreek as moontlike verklaring van die SDH-toename tydens aanvanklike imbibering van *Pisum sativum* saadlobbe en ook genoem dat die cyt ox-aktiwiteit dieselfde patroon as SDH gee. Vir laasgenoemde weefsel is aangetoon dat remstowwe van proteïenbiosintese nie die cyt ox- of SDH-aktiwiteit tydens aanvanklike inkubering nadelig beïnvloed nie en die moontlikheid van biosintese van cyt ox is dus uitgesluit (Nawa & Asahi 1973a).

Vir die saadlobbe van *Arachis hypogaea* is die situasie anders; die toename in cyt ox-aktiwiteit is ook waargeneem, maar is deur remstowwe van proteïenbiosintese voorkom (Morohashi *et al.* 1981). Aangesien remstowwe nie in hierdie studie van *Strelitzia juncea* gebruik is nie, kan uitsluiting oor die meganisme waarvolgens die totale cyt ox-aktiwiteit verhoog het, nie gegee word nie, behalwe om te sê dat albei moontlike situasies binne die Fabaceae voorgekom het en dat daar blykbaar nie een geldende situasie vir alle saadsoorte is nie.

'n Belangrike aspek wat in gedagte gehou moet word by die vergelyking van verskillende saadsoorte, is dat waarnemings relatief tot radikulaverskyning gemaak behoort te word (Pradet 1982). By *Pisum sativum* (radikulaverskyning na 24 uur inkubering) neem die totale cyt ox-aktiwiteit van ca 100 na ca 150 eenhede toe binne die eerste 0-6 uur inkubering (Nawa & Asahi 1971). Imbibisie van ertjiesaadlobbe vind binne 3 uur plaas (Morohashi & Bewley 1980b). 'n Soortgelyke toename (ca 110 tot ca 150 nmol. min.⁻¹ 50 embrio's⁻¹) is vir *Strelitzia*

juncea verkry maar oor 'n veel langer inkuberingsperiode (dag 1 na dag 4 suurstofbehandeling). Wateropname by *S. juncea* sade is vinnig oor die eerste 24 uur van inkubering en bereik 'n plato wat duur van dag 1 tot dag 4 (Ybema 1983). Radikulaverskyning begin eers op dag 5 by die suurstofsade en dit wil voorkom asof cyt ox-toename van 0-6 uur inkubering by *Pisum sativum* ekwivalent is aan 'n soortgelyke toename oor 4 inkuberingsdae by *Strelitzia juncea* sade waarvan die dormansie opgehef is.

By *Pisum sativum* saadlobbe is daar nie 'n verdere toename in cyt ox-aktiwiteit nie, waarskynlik omdat hierdie organe degenerereer (Nawa & Asahi 1971). In groeiende weefsel egter, behoort daar 'n toename in cyt ox-aktiwiteit te wees, soos inderdaad deur Van de Venter (1974) vir *Strelitzia reginae* tydens die kieming van die sade verkry is. Die tydperk van radikulaverskyning by *Arachis hypogaea* is nie gegee nie (Morohashi *et al.* 1981) sodat nie afgelei kan word of die onderdrukke cyt ox-aktiwiteit met groei geassosieer is en of dit moontlik tydens aanvanklike imbibering plaasvind nie.

Volgens Wikström *et al.* (1981) word sommige subeenhede van cyt ox in die sitosol en ander deur die mitochondriale proteïenbiosintetiese sisteem vervaardig. Nóg remmers van die sitosoliese proteïenbiosintetiese sisteem nóg remmers van die mitochondriale proteïenbiosintetiese sisteem het die cyt ox-aktiwiteit van *Pisum sativum* saadlobbe nadelig beïnvloed (Nawa & Asahi 1973a). Die cyt ox-aktiwiteit van *Phaseolus mungo* saadlobbe (radikulaverskyning na 6 uur inkubering) het vanaf begin inkubering toegeneem (Morohashi & Shimokoriyama 1975).

5.4.3.3 Totale mitochondriale cyt ox-aktiwiteit

Aangesien die bovloeiende se cyt ox-aktiwiteit met inkubering afgeneem het terwyl die totale cyt ox-aktiwiteit toegeneem het by die embryo's van die suurstofsade van *Strelitzia juncea*, spreek dit vanself dat die totale mitochondriale cyt ox-aktiwiteit (fraksies $N_3 + N_5$) moes toegeneem het. Alhoewel die toename by albei behandelings plaasgevind het, was dit opmerklik groter vir die embryo's van die suurstofsade.

Ten einde 'n maklike visuele vergelyking tussen die bovloeistof se afname en die totale mitochondriale fraksie se toename in cyt ox-aktiwiteit te kan tref, is albei fraksies se aktiwiteit op dieselfde figuur aangebring maar sodanig dat die bovloeistof se afname as 'n toename getoon word. Die bovloeistof se cyt ox-aktiwiteit (fyn stippel) moet dus van die omgekeerde skaal van die regterkantste ordinaat afgelees word (Figuur 5.11 C). Omdat die cyt ox-aktiwiteit vir die lug- en suurstofsade se bovloeistof-fraksie eenders is (Figuur 5.11 A), verteenwoordig die fyn stippel slegs die bovloeistof van die lugbehandeling se cyt ox-aktiwiteit.

Dit blyk dat vir alle inkuberingstye van die lugsade langer as dag 1, die toename in aktiwiteit van die totale mitochondriale fraksie dieselfde of minder is as die afname in die bovloeistof se cyt ox-aktiwiteit (Figuur 5.11 C). Vir suurstofsade egter, was die toename meer as wat deur die afname in die bovloeistof se cyt ox-aktiwiteit verklaar kan word. Dit blyk dus dat daar slegs by die suurstofsade 'n netto "sintese" van cyt ox is en dat dit in die mitochondriale fraksies teruggevind word.

5.4.3.4 Cyt ox-aktiwiteit van mitochondriale fraksies afsonderlik

'n Nadere beskouing van die cyt ox-aktiwiteit van die mitochondriale fraksies (Figuur 5.11 D) dui daarop dat vir die embryo's van die lugsade die cyt ox-aktiwiteit van die "swaar" fraksie (N_3 : 12 000 g) toegeneem het oor die 4 inkuberingsdae; dieselfde geld vir die "ligte" mitochondriale fraksie (N_5 : 39 000 g). Soortgelyke gevolgtrekkings as hierbo geld ook vir die embryo's van suurstofsade, maar dit is duidelik dat die ligte mitochondriale fraksie se cyt ox-aktiwiteit hoër as dié van die lugsade is. Dit wil dus voorkom asof die toename in die cyt ox-aktiwiteit na dormansie-opheffing deur suurstof veral vanweë 'n toename in die cyt ox-aktiwiteit van die ligte mitochondriale fraksie toegeskryf kan word.

'n Opsomming van die cyt ox-resultate word tesame met 'n opsomming van die MDH_{mit} resultate gegee (5.5.3.6).

5.5 MALAATDEHIDROGENASE-AKTIWITEIT (MDH)

5.5.1 Materiaal en metode

Vir die MDH-bepaling volgens Bergmeyer *et al.* (1974), het die blanko- en die reaksiemengsel 'n totale volume van $3,0 \text{ cm}^3$ gehad en die finale konsentrasies van die reagense was $78 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ K-fosfaatbuffer pH 7,5; $0,24 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ NADH. Die reaksie is begin deur die byvoeging van OAA by die reaksiemengsel ($0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ finale konsentrasie). Die OAA-voorraadoplossing is op 'n soortgelyke wyse as onder 5.3.1.2 opgemaak, behalwe dat MDH-reaksiebuffer ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ K-fosfaatbuffer pH 7,5) in plaas van SDH-reaksiebuffer gebruik is.

Die ekstrakte is onverdund of 10 maal verdun gebruik en die volume-byvoegings by die kuvet het van $0,050$ tot $0,200 \text{ cm}^3$ gewissel. Mitochondriale fraksies is met medium B en bo-vloeistof-fraksies met medium A verdun (kyk 5.2, p 96)

Aktiwiteit is teenoor die blanko gelees met 'n Cary 219 spektrofotometer by 25°C en 340 nm in 'n 1 cm deursnee kuvet. Geen blanko-reaksie is gevind nie behalwe by die N_1 -neerslag wat 'n baie heterogene en opties digte mengsel was. Aangesien die byvoeging van sekere organiese sure by *Strelitzia juncea* embryo-ekstrakte tot 'n verandering in absorpsie by sekere golflengtes lei, is as voorsorgmaatreeël ook vasgestel of absorpsieverandering in die afwesigheid van NADH verkry word. Geen sodanige verandering is by MDH-bepalings opgemerk nie.

Bogenoemde essaiëringsprosedure is volgens dié van Bergmeyer *et al.* (1974) vir diermitochondrions opgestel, maar dieselfde essaiëringsstelsel is deur Rustin *et al.* (1980) vir geïsoleerde plantmitochondrions gebruik. Sowel die twee mitochondriale fraksies N_3 en N_5 as die sitosoliese fraksie S_4 is met behulp van bogenoemde stelsel ondersoek. Alhoewel daar verskille in die kinetiese eienskappe van die sitosoliese, mitochondriale

en glicksisomale MDH's bestaan (Wieme 1974; Ting *et al.* 1975) is die verskille nie so groot dat dit die gebruik van verskillende essaiëeringsreaksiemengsels noodsaak nie. Volgens Ting *et al.* (1975) is remming van MDH deur hoë OAA-konsentrasies hoofsaaklik waarneembaar in ongesuiwerde ekstrakte. Remming deur OAA by pH 7,5 is eers 'n faktor by OAA-konsentrasies van $2 \mu\text{mol.cm}^{-3}$ (Zschoche & Ting 1973) vir gesuiwerde ekstrakte terwyl die essaiëeringsreaksiemengsels wat hier gebruik is, 'n OAA-konsentrasie van $0,5 \mu\text{mol.cm}^{-3}$ gehad het. In hierdie studie is uitstekende korrelasies tussen ekstrakvolume (40 x toename) en MDH_{cyt} - asook MDH_{mit} -aktiwiteit verkry en die moontlikheid van OAA-remming van MDH_{mit} en van MDH_{cyt} is nie ondersoek nie.

Volgens Bergmeyer & Bernt (1974) ontbind OAA-oplossings geleidelik en lei dit onder andere tot piruvaatvorming; gevolglik het hulle van 'n gekoppelde ensiemsisteem gebruik gemaak om moontlike verwarring tussen MDH- en LDH-aktiwiteite van ekstrakte te voorkom. In hierdie studie is die probleem omseil deur 'n OAA-oplossing vir hoogstens 4 dae te gebruik; na 4 dae kon geen verskil tussen die MDH-aktiwiteit gevind word deur vars en ou OAA-oplossings te gebruik nie.

5.5.2 Berekening van MDH-aktiwiteit

Die aktiwiteit is bereken uit H (p 15) en deur E^{\sim} vir NADH by 340 nm as $6,22 \times 10^3 \text{ mol.}^{-1} \text{ dm.}^3 \text{ cm}^{-1}$ te neem.

$$H = \frac{(\tan A^*)^{-1} \times E \times G \times I \times 0,07717 \mu\text{mol.min.}^{-1} \text{ 50 embryo's}^{-1}}{F \times J}$$

waar die simbole hulle gewone betekenis het (2.6, pp 13, 15).

Vir die mitochondriale fraksie N_3 (onv.) is $G = 1$; $I = 5$

Vir die mitochondriale fraksie N_5 (onv.) is $G = \frac{40}{15}$; $I = 5$

Vir bovloeistof-fraksie S_5 (onv.) is $G = 1$; $I = 40$

Vir die tienkeer verdunde ekstrakte is $G = 10$ vir N_3 en S_5

5.5.3 Resultate en bespreking

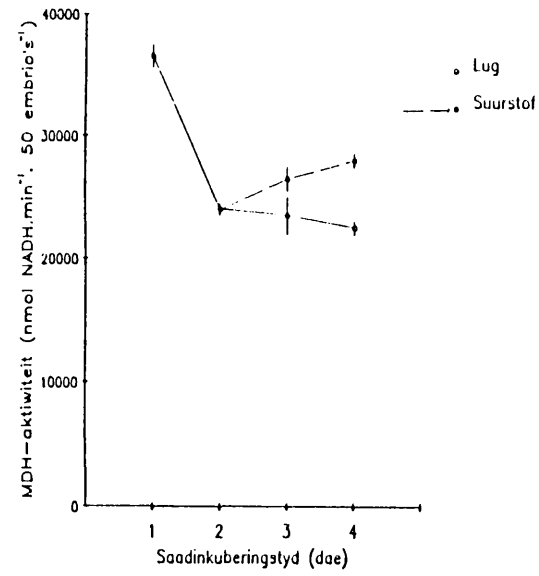
Die drie klasse isoënsieme van MDH (L-malaat: NAD-oksidoreduk-tase) kom in verskillende kompartemente in plantselle voor, nl. in die sitosol (MDH_{cyt}), die mitochondrions (MDH_{mit}) en die mikroliggaampies (Ting *et al.* 1975). Laasgenoemde kan in die peroksisome of die glioksisome (MDH_{gly}) voorkom. In *Zea mays* diaspore is drie isoënsieme in die endosperm en die embrio gevind, nl. twee mitochondriale en een sitosoliese MDH (Curry & Ting 1973). 'n MDH_{gly} is ook in die endosperm aangetref volgens Hayden & Cook (1972).

5.5.3.1 MDH van bovloei-stof

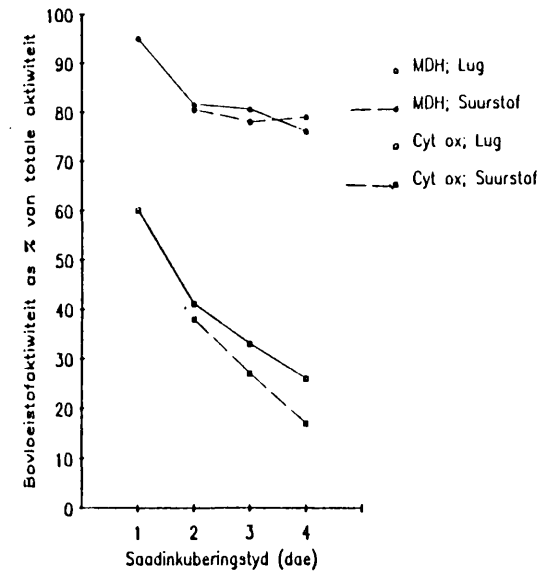
In hierdie studie is MDH-bepalings op dieselfde embrio-ekstrakte gedoen as waarop die reeds beskryfde cyt ox- en proteïenbepalings gedoen is. Die MDH-bepaling is direk na die cyt ox-bepaling vir 'n ekstrak uitgevoer. Dieselfde bovloei-stof (S_5 : 39 000 g) wat 'n afname van 33% in cyt ox-aktiwiteit van dag 1 na dag 2 van inkubering getoon het (kyk Figuur 5.11 A), het ook 'n 33% afname in MDH-aktiwiteit oor dieselfde tydperk getoon (Figuur 5.12 A).

Vir inkuberingstye langer as 2 dae, het die bovloei-stof se cyt ox-profiel en MDH-profiel egter van mekaar verskil: die MDH het in die geval van die lugsade konstant gebly of effens gestyg terwyl dit by die suurstofsade gestyg het. Dit stem ooreen met resultate van 'n veel vroeër eksperiment waar die MDH_{cyt} -aktiwiteit bepaal is vir 'n bovloei-stof-fraksie wat met 'n ander sentrifugeringsprosedure verkry is (Figuur 3.4, p 58). Die bovloei-stof van embrio-ekstrakte van droë sade het 'n relatief hoë MDH-aktiwiteit van $32 \mu\text{mol. NADH.min.}^{-1} 50 \text{ embrio's}^{-1}$ gehad wat nie oor die eerste inkuberingsdag afge-neem het nie. So 'n hoë aanvanklike MDH-aktiwiteit kan 'n belangrike funksie hê, soos later in verband met sitosoliese ATP-sintese bespreek sal word (6.4.6, p 183).

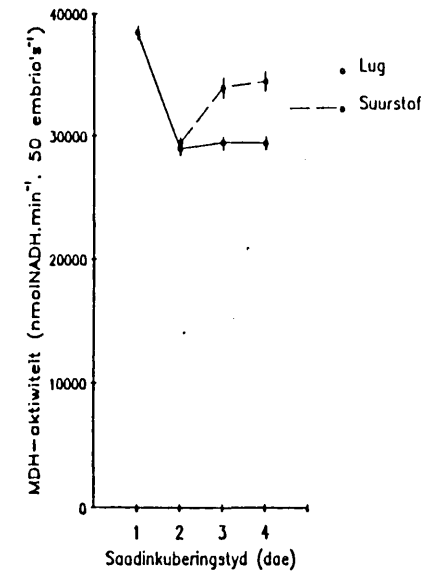
Figuur 5.12 A



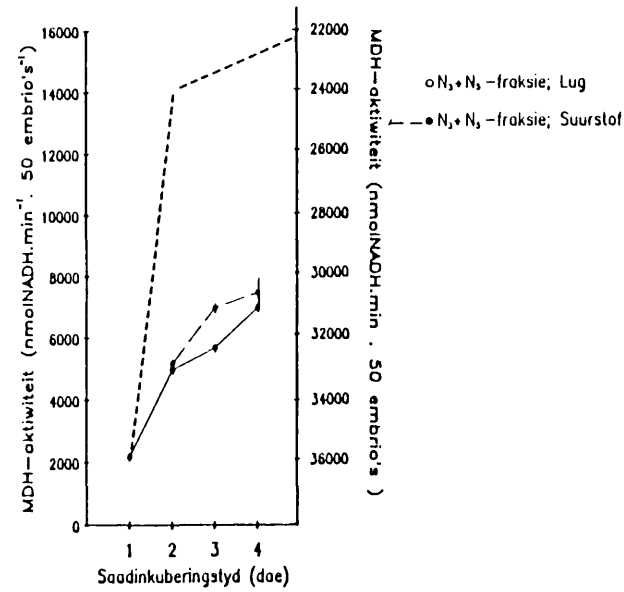
Figuur 5.12 B



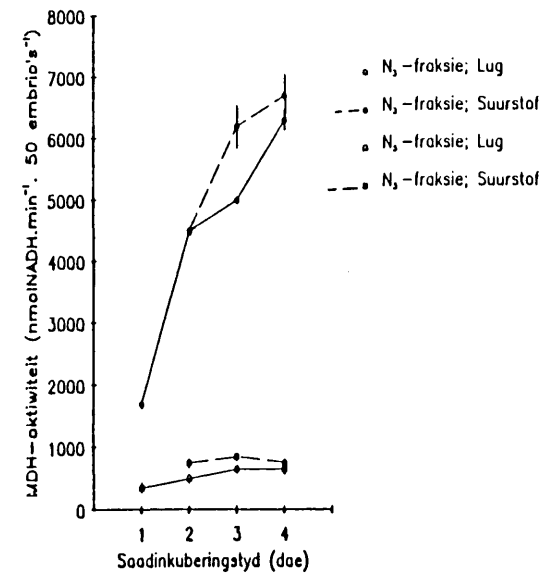
Figuur 5.12 C



Figuur 5.12 D



Figuur 5.12 E



Soos reeds onder 5.4.3 vir cyt ox bespreek is, kan die MDH-aktiwiteit van die bovloeistof bloot 'n weerspieëling wees van mitochondrion-beskadiging, of dit kan voorafvervaardigde MDH_{mit} verteenwoordig wat eers met verdere inkubering in die mitochondrions ingebou moet word. In die geval van MDH word die situasie nog verder gekompliseer deurdat die ensiem ook in ander kompartemente soos glioksisome en die sitosol kan voorkom. Dit is met die beskikbare inligting dus nie moontlik om presies te sê watter persentasie van die bovloeistof-MDH deur MDH_{cyt}-aktiwiteit verteenwoordig word nie. Tog is dit opmerklik dat die bovloeistof-aktiwiteit 'n baie groter persentasie van die totale aktiwiteit uitmaak in die geval van MDH as wat dit in die geval van cyt ox was (Figuur 5.12 B). Verder klop die MDH/cyt ox-verhouding van die totale mitochondriale fraksie goed met literatuurwaardes soos later bespreek sal word. Dit alles inaggenome word die gevolgtrekking gemaak dat minstens 50% van die bovloeistof se MDH-aktiwiteit waarskynlik aan MDH_{cyt} toegeskryf kan word.

Aangesien ongedialiseerde bovloeistof gebruik is, kan die 33% afname in MDH-aktiwiteit van dag 1 na dag 2 moontlik aan malaat- of OAA-konsentrasie van die bovloeistof toegeskryf word; ATP het ook 'n remmende uitwerking op MDH (Kuramitsu 1968) maar in 'n konsentrasiegebied van ca 1 mM wat veel hoër as die ATP-konsentrasie van die *Strelitzia juncea* embrioe-kstrakte is (hoofstuk 6). Die bovloeistof het egter oor 'n 40 keer verdunningsgebied steeds lineariteit ten opsigte van MDH-aktiwiteit getoon (resultate nie getoon nie) sodat die 33% afname in totale MDH waarskynlik aan 'n afname in die konsentrasie van die MDH-proteïen of aan sterk koppeling van 'n inaktiveerder aan die molekule toegeskryf moet word.

5.5.3.2 Totale MDH-aktiwiteit

In teenstelling met die resultate wat vir die totale cyt ox-aktiwiteit (Figuur 5.11 C) verkry is, het die totale MDH-aktiwiteit (fraksies S₅ + N₃ + N₅) 'n sterk daling van 25% van dag 1 na dag 2 van inkubering getoon (Figuur 5.12 C). Met

verdere inkubering egter, stem die profiel vir totale cyt ox- en totale MDH-aktiwiteit ooreen.

Die toename in die totale MDH-aktiwiteit tydens latere inkubering wat vir die embryo's van suurstofsade gevind is, is slegs gedeeltelik verantwoordbaar deur die toename in die bovloeistof se MDH. Weer eens kan die toename in die totale MDH òf aan ensiemaktivering òf aan *de novo* sintese toegeskryf word en is daar geen literatuur om sterk uitsluitel oor die twee moontlikhede te gee nie. Genoemde toename in totale MDH van dag 2 na dag 4 (suurstofbehandeling) is kleiner as die afname in MDH-aktiwiteit van dag 1 na dag 2.

Perl (1978) het vir *Gossypium hirsutum* sade (radikulaverskyning na 24 uur) gevind dat die totale MDH-aktiwiteit van die droë saad met groeikragtigheid gekorreleerd was. Oor die eerste 2 uur inkubering was daar 'n toename in MDH-aktiwiteit, maar van 2 na 5 uur inkubering was daar 'n sterk afname gevolg deur 'n konstante MDH-aktiwiteit tot op 24 uur. Eers met radikula-verskyning op 24 uur het die MDH-aktiwiteit weer gestyg. Perl het die daling in totale MDH-aktiwiteit vertolk as 'n aanduiding dat MDH 'n spesifieke rol in die kiemingsproses speel. Stoddart (1973) volgens Perl (1978) het vir garsembrio's 'n afname in MDH-aktiwiteit van 0 tot 3 uur inkubering gevind. Die waargenome daling in die totale MDH-aktiwiteit vir *Strelitzia juncea* embryo's tussen dag 1 en 2 van saadinkubering, stem dus ooreen met ander waarnemings behalwe dat dit op 'n ander tydskaal plaasvind.

5.5.3.3 MDH van totale mitochondriale fraksie

Steeds betreffende die afname in totale MDH van dag 1 na dag 2 van saadinkubering, is dit duidelik dat die afname die gevolg is van die afname in MDH-aktiwiteit van die bovloeistof. In die geval van cyt ox, is die "verlore" aktiwiteit teruggevind as 'n toename in die aktiwiteit van die totale mitochondriale fraksie (vergelyk bespreking van Figuur 5.11 C). Wat MDH-aktiwiteit betref, is die situasie egter anders. Alhoewel

daar 'n toename in die totale mitochondriale fraksies ($N_3 + N_5$) se MDH-aktiwiteit is (Figuur 5.12 D), is die toename veel kleiner as wat die afname in die bovloeistof se MDH-aktiwiteit is (vergelyk fyn stippel van Figuur 5.12 D wat soos vir Figuur 5.11 C die bovloeistof (lugbehandeling) se MDH-aktiwiteit gee volgens regterkantste ordinaat met omgekeerde skaal). In hierdie opsig verskil die resultate dus van dié van Nawa & Asahi (1971) vir vroeë inkubering van *Pisum sativum* want hulle het die bovloeistof ("postmitochondrial")-fraksie se afname van sowel cyt ox as MDH as 'n toename in die mitochondriale fraksies van die saadlobbe teruggevind. In laasgenoemde geval was die bovloeistof se MDH-aktiwiteit ook hoër as die mitochondriale fraksie se MDH-aktiwiteit, maar in hierdie studie het die bovloeistof se MDH 'n veel groter persentasie van die totale MDH-aktiwiteit uitgemaak, nl. 95-80% (Figuur 5.12 B).

Soos in die geval van cyt ox, is daar oor die vier inkuberingsdae van die sade steeds 'n toename in die MDH van die totale mitochondriale fraksie van die embryo's, maar anders as vir cyt ox is die aktiwiteit in die geval van die suurstofsade nie duidelik hoër as wat dit vir die lugsade is nie.

Die totale mitochondriale MDH-aktiwiteit van die embryo's van dormante *Strelitzia juncea* sade het oor die vier saadinkuberingsdae feitlik vervierdubbel vanaf die oorspronklike aktiwiteit van $440 \text{ nmol. NADH.min.}^{-1} \text{ } 10 \text{ embryo's}^{-1}$. Dit vergelyk goed met die $391 \text{ nmol.min.}^{-1} \text{ } 10 \text{ sade}^{-1}$ vir die totale mitochondriale aktiwiteit van die vinnig kiemende *Phaseolus mungo* sade na 20 minute inkubering (Morohashi & Shimokoriyama 1975b) wat van 20 tot 75 minute inkubering verdubbel het.

Die MDH-aktiwiteit van goeie preparate van mitochondrions is as $2\ 000 \text{ nmol.min.}^{-1} \text{ mg prot.}^{-1}$ aangegee deur Oliver & Walker (1984). Die *S. juncea* se totale mitochondriale aktiwiteit op dag 1 is $4\ 890 \text{ nmol.min.}^{-1} \text{ mg prot.}^{-1}$ en op dag 4 is dit $8\ 050 \text{ nmol.min.}^{-1} \text{ mg prot.}^{-1}$, en daarby moet in gedagte gehou word dat benewens mitochondriale proteïene daar waarskynlik ook reserweproteïene voorgekom het.

Weer eens blyk die belangrikheid van Pradet (1982) se stelling dat verskynsels met betrekking tot die tyd van radikulaver-skyning bekyk behoort te word.

5.5.3.4 Mitochondriale fraksies afsonderlik

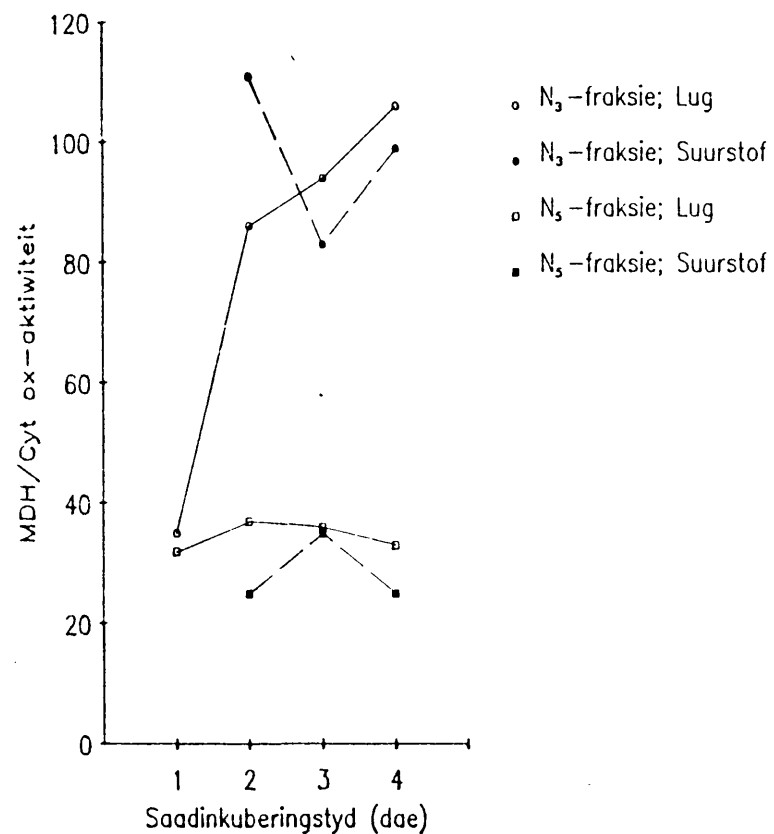
'n Vergelyking van die mitochondriale fraksies N_3 en N_5 onderling, laat blyk dat die N_3 -fraksie, soos vir cyt ox, heelwat hoër aktiwiteit as die N_5 -fraksie het (Figuur 5.12 E). Anders as vir cyt ox egter, het die N_5 -fraksie van die embryo-ekstrakte van die suurstofsade nie so 'n opmerklik hoër aktiwiteit as wat die geval vir die lugsade is nie.

5.5.3.5 MDH/cyt ox-aktiwiteitsverhoudings

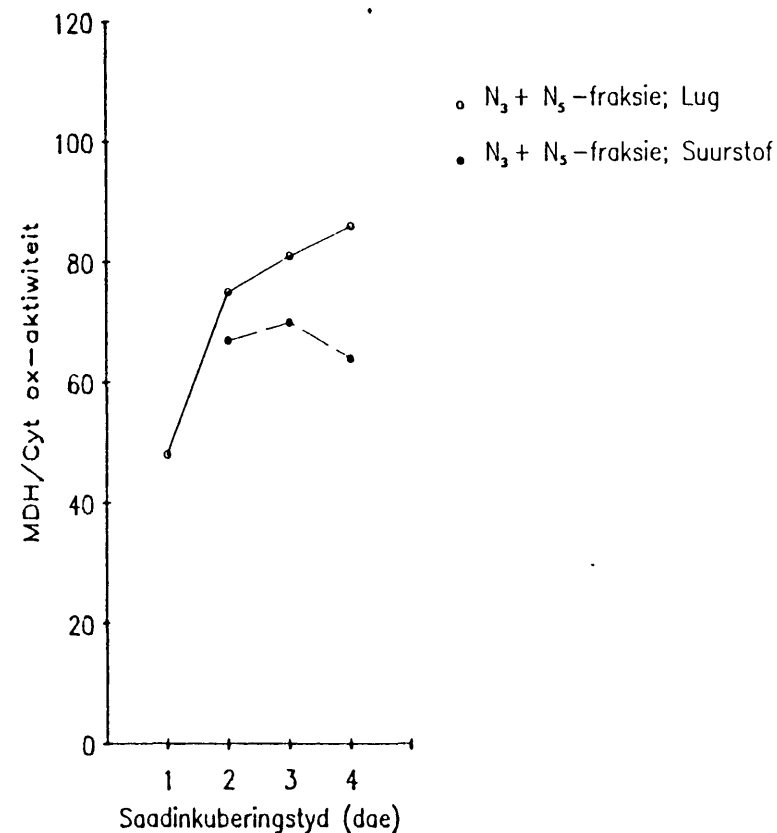
Op die oog af wil dit voorkom asof MDH/cyt ox-aktiwiteitsverhoudings as 'n goeie maatstaf van mitochondriale breking gebruik kan word. Tradisioneel word die MDH van die mitochondrion immers as 'n matriksensiem beskou (Goodwin & Mercer 1983), terwyl cyt ox in die mitochondriale binnemembraan ingebou is (Wikström *et al.* 1981). So byvoorbeeld het Nawa & Asahi (1973b) goed ontwikkelde mitochondrions van *Pisum sativum* saadlobbe osmoties gebreek met gevolglike verlies in MDH-maar nie cyt ox-aktiwiteit nie. Die beeld van MDH/cyt ox-verhoudings as 'n moontlike maatstaf van mitochondriale breking word egter vertroebel deur afleidings oor dieselfde saadweefsel dat daar 3 tipes mitochondrions in die droë sade voorkom wat wissel in hulle MDH- en cyt ox-aktiwiteit en dat die een tipe tot die ander oorgaan binne die eerste 6 uur van inkubering (Satoh & Asahi 1975). Alhoewel eenduidige afleidings oor MDH/cyt ox-verhoudings dus nie vir kort geïnkubeerde sade gemaak kan word nie, is die verhoudings in *Strelitzia juncea* sade nogtans bepaal om vas te stel in watter mate rusverbreking deur suurstof die verhouding beïnvloed.

Wat die lugsade betref, was die MDH/cyt ox-verhouding op dag 1 van saadinkubering eenders vir die swaar (N_3)- en die ligte (N_5)-mitochondriale fraksie van die embryo's maar het die verhouding by die N_3 -fraksie sterk toegeneem terwyl dit by die N_5 -fraksie

Figuur 5.13 A



Figuur 5.13 B



Figuur 5.13. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die malaatdehidrogenase/sitochroomoksidase-aktiwiteitsverhouding soos bepaal vir die mitochondriale fraksies van ekstrakte van *Strelitzia juncea*-embrio's wat na verskillende tye van saadinkubering geëkstraheer is.

5.13 A. MDH/cyt ox-verhouding vir N₃-fraksie (12 000 g neerslag) en N₅-fraksie (39 000 g neerslag).

5.13 B. MDH/cyt ox-verhouding vir die totale mitochondriale fraksie (N₃ + N₅).

nie veel verander het nie (Figuur 5.13 A). Die verhouding op dag 1 is 48, terwyl dit na 20 minute inkubering van *Phaseolus mungo* saadlobbe (Morohashi & Bewley 1980a) as 40 bereken kan word.

Uit die vorige paragraaf volg dat die N_5 -fraksie waarskynlik nie die gevolg van mitochondriale breking is nie. Die MDH/cyt ox-verhouding van die totale mitochondriale fraksie het toegeneem oor die 4 inkuberingsdae (Figuur 5.13 B). Afleidings oor die MDH/cyt ox-verhoudings by die suurstofsade word belemmer deurdat dag 3 se cyt ox (Figuur 5.11 D) vir die N_3 -fraksie waarskynlik te hoog en vir die N_5 -fraksie waarskynlik te laag is. Die totale mitochondriale fraksies (Figuur 5.13 B) bevestig egter dat die MDH/cyt ox-verhouding vir die suurstofsade neig om laer te wees as vir die lugsade. Dit word algemeen aanvaar dat met toenemende inkubering van metabolies ontwikkelende weefsel, die mitochondrions al hoe stabielier word en dat breking al hoe minder 'n faktor is. Die laer MDH/cyt ox-verhoudings by die suurstofsade moet dan eerder aan die vorming van cyt ox-bevattende membrane as aan breking toegeskryf word.

In hierdie bespreking is aanvaar dat MDH_{gly} nie teenwoordig is nie vanweë die gebrek aan isositraatliase-aktiwiteit. Verder is aangeneem dat die MDH van die mitochondriale fraksies uit die matriks vrygestel is. Meer onlangse literatuur (Day *et al.* 1983) het egter vorige literatuur bevestig dat daar selfs in gewaste mitochondrions 'n eksterne MDH voorkom; dit mag moontlik 'n MDH_{cyt} kontaminant wees (Rustin *et al.* 1980; 1985).

5.5.3.6 Oorsigtelike bespreking van cyt ox en MDH

Geen groot verskille in die totale MDH-aktiwiteit is vir embryo's van lug- en suurstofbehandelde sade gevind nie. Die huidige siening van MDH is dat die ensiem nie aan komplekse kinetiese regulering deur klein metaboliete onderwerp word nie, maar dat regulering deur OAA- en malaatkonsentrasies bewerkstellig word deur kompartementering van organelspesifieke isoënsieme wat

elk in 'n ander metaboliese roete optree (Ting *et al.* 1975). Die rol van MDH_{cyt} word gesien as malaatvorming vir ioniese-, osmotiese- en redoksregulering van die plantsel. Volgens Simon (1979) speel MDH 'n rol in die temperatuurakklimatisering van plante.

Rusverbreking deur suurstof het 'n duidelike toename in die totale mitochondriale cyt ox-aktiwiteit van die embryo's veroorsaak en dit alreeds 3 dae voordat kieming 'n aanvang begin neem het. Die toename is hoofsaaklik in die ligte mitochondriale fraksie verkry. Volgens Morohashi & Shimokoriyama (1977) het blootstelling van *Phaseolus mungo* sade aan lug tydens die inkuberingsproses tot 'n verhoging in mitochondriale doeltreffendheid maar nie in mitochondriale ensiemaktiwiteit nie gelei.

Indien gebeurtenisse by *Strelitzia juncea* relatief tot radikula-verskyning gesien word, stem die daling in MDH-aktiwiteit gevolg deur 'n konstante MDH-aktiwiteit tot en met radikula-verskyning ooreen met dit wat by ander sade aangetref is. Die toename in cyt ox-aktiwiteit van dag 1 tot dag 4 stem in omvang ooreen met die toename in cyt ox-aktiwiteit tussen 0 en 6 uur inkubering by *Pisum sativum* sade.

Toename in mitochondriale cyt ox-aktiwiteit kom met 'n ooreenstemmende afname in cyt ox-aktiwiteit van die bovloeistof ooreen by die lugsade, maar vir MDH is die afname in bovloeistof aktiwiteit veel kleiner as wat die geval by cyt ox is, maar die verlies in MDH-aktiwiteit van die bovloeistof is veel groter as die toename in die mitochondriale MDH.

Die konstante MDH/cyt ox-verhouding wat vir die ligte mitochondriale fraksie verkry is, dui daarop dat dit nie brokstukke is nie of andersins dat breking konstant was oor die vier inkuberingsdae. Suurstofbehandeling het 'n invloed gehad op die MDH/cyt ox-verhouding.

Soos reeds onder hoofstuk 4 bespreek, is verhoogde aktiwiteit van die PP-weg ensieme as gevolg van suurstofbehandeling waargeneem, maar dit blyk nou dat dit met 'n verhoogde cyt ox-aktiwiteit gepaard gaan. Soos reeds deur Van de Venter (1974) bespreek, pas die hoër cyt ox-aktiwiteit wat as gevolg van dormansieverbreking deur suurstof verkry is, nie in by Roberts (1969) se hipotese dat vir dormansie-opheffing die normale elektronvloei deur die EOS onderdruk moet word sodat NADPH-oksidering kan plaasvind vir die funksionering van die PP-weg nie.

5.6 ISOSITRAATDEHIDROGENASE-AKTIWITEIT (ICDH)

5.6.1 Materiaal en metode

Die aanvanklike bepalingmetode was op dié van Laties (1983) gebaseer. Die reaksiemengsel het bestaan uit $25 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ TES-KOH buffer pH 7,5; $5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ MgSO_4 en $3 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ KCN. Die NADH-konsentrasie is van 1 tot $3 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ gewissel. Die reaksie is met en sonder $0,4 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ sukrose in die reaksiemengsel uitgevoer.

Latere bepaling is op die werk van Duggleby & Dennis (1970a, b) gebaseer. Hierdie outeurs het die rol van sitraat as aktiveerder van ICDH ondersoek en dit blyk uit hulle werk dat 'n sitraat/isositraat verhouding van 36 goeie aktiwiteit lewer. Uit Duggleby & Dennis (1970b) volg dat hierdie verhouding verkry kan word deur 'n totale (sitraat + isositraat)-konsentrasie van $4,2 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ in die teenwoordigheid van $2 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ Mg^{2+} -ione te hê.

'n Blanko- en 'n reaksiemengsel is gevolglik so saamgestel dat in 'n finale volume van $3,0 \text{ cm}^3$ by elk die volgende reagenses voorgekom het: $25 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ TES-KOH pH 7,5; $4 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ trinatriumsitraat; $2 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ MgSO_4 ; $1 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ NAD en $1 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ KCN. Die reaksie is geïnisieer deur die byvoeging van trinatrium-DL-isositraat (finale konsentrasie $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$) by slegs die reaksiemengsel.

Sowel sitraat- as isositraat-voorraadoplossings is in ICDH-reaksiebuffer ($36 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ TES-KOH, pH 7,5) opgemaak. Die KCN-voorraadoplossing is berei soos onder 5.3.1.2a, p 103 beskryf. Die reaksie is spektrofotometries bepaal deur die absorbansieverandering by 340 nm by 25°C te volg en deur 'n 1 cm deursnee kuvet te gebruik.

5.6.2 Resultate en bespreking

Geen ICDH-aktiwiteit kon met enigeen van die twee genoemde essaiëringsprosedures in die mitochondriale fraksies gevind word nie. Die bovloeistof is nie vir ICDH-aktiwiteit ondersoek nie.

Geen literatuur oor die aanwesigheid al dan nie van ICDH tydens die vroeë imbiberingsfase van sade kon gevind word nie. In die onlangse oorsigartikel van Pradet (1982) word dit gemeld dat sommige van die NAD-gekoppelde substraat-oksiderings van mitochondrions se aktiwiteit gedurende imbibisie as laag aangemeld is en dat die saak verder ondersoek behoort te word. In hierdie studie is goeie MDH-aktiwiteit gevind, sodat volgens die huidige beeld van die funksionering van die elektronoordragsstelsel, die probleem nie by die oksidering van NADH behoort te lê nie.

5.7 FUMARASE-AKTIWITEIT

5.7.1 Materiaal en metode

Fumarase is volgens die metode van Hampp (1980) bepaal. In 'n totale volume van $3,0 \text{ cm}^3$ het sowel die blanko- as die reaksiemengsel $43,3 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ TRICINE-KOH pH 8,4 bevat. Die reaksie is begin deur die byvoeging van natrium-L-malaat (finale konsentrasie van $10,0 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$) by die reaksiemengsel.

Die voorraadoplossing van Na₁-L-malaat is berei deur dit in 'n minimum volume water op te los, die pH na 8,4 in te stel met $2,0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KOH en tot volume op te maak met water.

Die absorbansieverandering by 240 nm is teenoor die blanko gelees in 'n Cary 219 spektrofotometer by 25°C en in 'n 1 cm deursnee kuvet.

5.7.2 Resultate en bespreking

Fumarase word as 'n goeie merker-ensiem vir mitochondrions beskou (Jackson & Moore 1979). Die reaksie word gemonitor deur die toename in absorbansie by 240 nm te gebruik as 'n maatstaf van die teenwoordigheid van die dubbelbinding van die fumaraatmolekuul. Geen aktiwiteit kon in enigen van die mitochondriale fraksies aangetoon word nie omdat die byvoeging van malaat waardeur die reaksie geïnisiëer is tot 'n afname eerder as 'n toename in die absorbansie by 240 nm gelei het. Dit hou moontlik verband met die troebelheid van die reaksiemengsel as gevolg van die melkerige bovloeistof- en neerslag-suspensies.

5.8 GLIOKSISOMALE ISOSITRAATLIASE-AKTIWITEIT (ICL)

5.8.1 Materiaal en metode

Die blanko- en reaksiemengsel se totale volume was 3,0 cm³ en elk het die volgende reagentie in finale konsentrasies gehad: 115 μmol.cm⁻³ K-fosfaatbuffer pH 6,85; 1,5 μmol.cm⁻³ MgCl₂; 0,6 μmol.cm⁻³ L-sisteïen; 1,0 μmol.cm⁻³ fenielhidrasien (gebaseer op Dixon & Kornberg 1959). Die reaksie is begin deur trinatriumsitraat (finale konsentrasie 1,0 μmol.cm⁻³) by die reaksiemengsel te voeg. Sowel die blanko- as die reaksiemengsel het die N₂-neerslag (Figuur 5.1, p 98) as suspensie bevat. Ander sentrifugeringsfraksies is nie uitgetoets nie. Voor sentrifugering van die ru-ekstrak, is 4 cm³ van 'n 5% Triton-X100 (v/v) oplossing daarby ingeroer en vir 15 minute laat staan (McGregor 1969).

Die vorming van glioksalaatfenielhidrasoon word bepaal deur die absorbansieverandering van die reaksiemengsel teenoor die blanko by 324 nm in 'n Cary 219 spektrofotometer by 25°C in 'n 1 cm deursnee kuvet te volg.

5.8.2 Resultate en bespreking

Geen aktiwiteit kon in die N₂-neerslag van embryo-ekstrakte aangetoon word nie. Ekstrakte van koringsade het wel ICL-aktiwiteit met hierdie essaiëringstegniek getoon (resultate word nie aangedui nie) sodat daar 'n redelike mate van sekerheid is dat die neerslag nie ICL-aktiwiteit gehad het nie.

5.9 SAMEVATTENDE BESPREKING

Die mitochondriale fraksie wat uit *Strelitzia juncea* verkry is, is slegs 'n gedeeltelik gesuiwerde fraksie en die resultate moet gevolglik met omsigtigheid geïnterpreteer word.

Die duidelikste invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die mitochondriale ensiemaktiwiteit was as 'n toename in die cyt ox-aktiwiteit te bespeur. Selfs die totale cyt ox-aktiwiteit van al die gesamentlike fraksies van die embryo-ekstrakte het 'n toename getoon. Hierdie aspek is 'n belangrike waarneming; uitsluitel behoort in opvolgstudies verkry te word of suurstof 'n aktiverende invloed op die cyt ox-ensiem het en of daar 'n *de novo* sintese van cyt ox is wat deur die teenwoordigheid van suurstof geïnisieer word.

Die mitochondriale MDH-aktiwiteit het ook grootliks toegeneem oor die 4 inkuberingsdae as gevolg van suurstofbehandeling. Suurstofbehandeling het ook veroorsaak dat die totale MDH-aktiwiteit (alle fraksies gesamentlik) toegeneem het.

Resultate met cyt ox en MDH verkry, bevestig die huidige aanvaarde siening dat mitochondriale eerder as sitosoliese ensiem-aktiwiteite tydens kieming beperkend is.

Vir die ligte mitochondriale fraksie het die MDH_{mit}/cyt ox-verhouding relatief konstant gebly met toenemende inkubering van die sade en daaruit word afgelei dat die ligte fraksie nie

die gevolg van breking is nie. Suurstofbehandeling het tot gevolg gehad dat die MDH_{mit}/cyt ox-verhouding laer was as vir die embryo's van lugsade.

Wat die resultate vir SDH betref, is die situasie kompleks vanweë skynreaksies wat voorgekom het. Omdat gekontamineerde fraksies gebruik is, word met voorbehoud afgelei dat suurstofbehandeling tot 'n groter inaktivering van SDH gelei het. Dit kan 'n belangrike waarneming wees, veral omdat dit bekend is dat SDH *in vitro* deur suurstof geïnaktiveer kan word.

Die gebrek aan ICDH- en fumarase-aktiwiteit kan eweneens belangrik wees en kan dui op 'n gebrek aan funksionering van die Krebs-siklus. Dit sou impliseer dat die verhoogde cyt ox-aktiwiteit daaraan toegeskryf moet word dat daar as gevolg van suurstofbehandeling 'n ander invoerpunt van elektrone na die EOS-sisteem geaktiveer word en dat die konvensionele Krebs-siklus *per se* nie daarby betrokke is nie. Die stelling van Mayer (1973) moet egter in gedagte gehou word dat "Negative results are rarely final proof of the absence of a postulated pathway."

HOOFSTUK 6

DIE INVLOED VAN SUURSTOF OP DIE ADENILAAT-METABOLISME VAN
STRELITZIA JUNCEA - SADE

6.1	INLEIDING	159
6.2	MATERIAAL EN METODEDES	161
6.2.1	Adenilaatekstrahering	161
6.2.1.1	Literatuuroorsig	161
6.2.1.2	Adenilaatekstrahering van <i>Strelitzia juncea</i> sade	162
6.2.1.3	Adenilaatekstrahering van <i>Strelitzia juncea</i> embryo's	164
6.2.2	Bepaling van die ATP-konsentrasie van die ekstrakte met behulp van bioluminessensie	164
6.2.3	Bepaling van die ADP- en die AMP-konsentrasie van <i>Strelitzia juncea</i> embryo-ekstrakte	166
6.2.4	Bepaling van 'n sitosoliese ATP-sintesesistiem	168
6.2.4.1	Bereiding van ensiemekstrakte	168
6.2.4.2	Reaksiemengsel vir die ondersoek van ATP-sintese	168
6.2.4.3	Bepaling van ATP-konsentrasie van reaksiemengsels	169
6.3	BEREKENINGS	170
6.3.1	Die ATP-konsentrasie van heelsade en embryo's	170
6.3.2	Die berekening van AMP- en ADP-konsentrasies	171
6.3.3	Berekening van die ATP-sintese tempo van sitosoliese ekstrakte	172
6.4	RESULTATE EN BESPREKING	173
6.4.1	ATP-inhoud van heelsade	173
6.4.2	ATP-inhoud van embryo's	173
6.4.3	ADP- en AMP-inhoud van embryo's	175
6.4.4	Totale adenilaatpoel	177

6.4.5	Energielading	179
6.4.6	Sitosoliese ATP-sintese-sisteem	183
6.5	OPSOMMING	188

6.1 INLEIDING

Dit word algemeen aanvaar dat die eintlike *raison d'être* vir die katabolisme van respirasiesubstrate die produksie van ATP is. In hierdie studie van die respirasie van *Strelitzia juncea* sade is die adenilate AMP, ADP en ATP gevolglik geëkstraheer en die konsentrasie daarvan bepaal. Sodoende kon die invloed van dormansie-opheffing deur suurstof op die sade se adenilaat-metabolisme nagegaan word. 'n Kort oorsig oor die adenilaat-metabolisme van sade word vervolgens as agtergrond aangebied.

In nie-dormante sade is daar reeds met aanvanklike inkubering (0-6 h) 'n groot toename in die ATP-inhoud (Pradet 1982). Omdat in vroeëre werk funksionele mitochondrions nog nie in droë of baie kort geïmbibeerde sade aangedui kon word nie, is aanvaar dat oksidatiewe fosforilering nie kan plaasvind nie en dat die aanvanklike ATP-sintese deur ander meganismes plaasvind soos onder andere deur Mayer (1977) gepostuleer. Perl (1980) het ook 'n hipotese geformuleer waarvolgens ATP deur 'n sitosoliese sisteem uit NADH vervaardig word, en aangetoon dat dit met dormansieverbreking deur etileen verband kan hou.

Die elegante werk van Hourmant & Pradet (1981) het egter duidelik aangetoon dat die aanvanklike ATP-sintese in kort-geïmbibeerde slaaisade suurstofafhanklik is en dat dit waarskynlik via die konvensionele elektronoordragsisteem plaasgevind het. Meer onlangse studies het dan ook aangetoon dat oksidatiewe fosforilering deur mitochondrions binne 'n paar minute na imbibering plaasvind, soos deur Pradet (1982) in 'n onlangse oorsigartikel saamgevat is.

Adenilaatenergielading (AEC) is 'n begrip wat deur Atkinson in 1968 geformuleer is en wat 'n maatstaf is van die fraksie van die totale adenilaatpoel wat "hoë-energie fosfaatbindings" bevat. Hy het gepostuleer dat die handhawing van 'n bepaalde AEC-waarde deur selle 'n wyse is waarop die metabolisme van die sel gereuleer word en die hipotese is volledig deur Preiss & Kosuge (1976) uiteengesit. Verskeie argumente vir en teen die begrip is al geopper en die vernaamste argumente daarteen is puntsgewys deur Pradet & Raymond (1984) aangeteken. Die huidige stand van sake

betreffende die AEC-hipotese word goed soos volg opgesom:
 "The importance of AdN in metabolic regulation is presently a matter of debate. It is extremely difficult to determine if the stabilization of AdN ratio's and consequently of AEC are the cause or the consequence of regulation" (Pradet & Raymond, 1983). Gevolglik is die bepaling van hierdie en ander metaboliese parameters tans van groot belang vir 'n begrip van energiemetabolisme.

Vir nie-dormante sade is vasgestel dat die AEC vanaf 'n baie lae waarde in droë sade tot 'n hoë waarde ($>0,8$) styg binne ca 30 minute imbibering. Daarna bly dit konstant tydens fase II van die suurstofopnametempo (Pradet 1982). Ná 'n vinnige styging in die totale adenilaatpoel tydens fase I, bly dit konstant tot en met die aanvang van fase III. Bogenoemde opsomming van Pradet is maar op enkele literatuurverslae gebaseer (slaai-, koring-, sojaboonsade) en uitsonderings op die reël bestaan (Pradet 1982).

Literatuur oor die adenilaatmetabolisme van dormante sade is min. Die beskikbare inligting handel oor die invloed van stratifisering en ander temperatuurbehandelings op dié adenilaatmetabolisme en kan sō saamgevat word dat hoë AEC-waardes ook in dormante sade onder nie-induktiewe toestande vir kieming bereik word maar dat dit op sigself onvoldoende is om tot dormansieverbreking te lei (Mayer & Marbach 1981).

Hierop volg 'n beskrywing van die ekstrahering en bepaling van ATP, ADP en AMP. Uit die verkreë resultate is die totale adenilaatpoel en die AEC-waarde bereken en 'n vergelyking tussen die genoemde groothede is getref vir die embryo's van lug- en suurstofsade van *Strelitzia juncea* na verskillende tye van saadinkubering.

6.2 MATERIAAL EN METODES

6.2.1 Adenilaatekstrahering

6.2.1.1 Literatuuroorsig

Die keuse van 'n metode vir die ekstrahering van adenilate uit plantmateriaal moet met die grootste omsigtigheid gedoen word vanweë die hoë omslagtempo vir ATP en die byna oombliklike invloed wat 'n verandering in omgewingstoestande soos gassamestelling op die ATP-inhoud van weefsel kan uitoefen (Raymond & Pradet 1980, Pradet & Raymond 1983).

Drie benaderings is oorweeg, nl. die gebruik van kokende ekstraheermiddels, die PCA-metode en die TCA-metode en hulle word vervolgens kortliks bespreek.

Die gebruik van kokende ekstraheermiddels is 'n vinnige en gerieflike metode (Grobbelaar 1980), werk uitstekend vir enkelselsuspensies (Holm-Hansen & Karl 1978) en is deur Guinn & Eidenbock (1972) vir gebruik met fenolryke plantmateriaal aanbeveel. Nogtans is die metode nie vir saad-ekstrahering oorweeg nie vanweë die vertraagde inaktivering van fosfatases (Bieleski 1964) wat daarmee verkry word en die gevolglike foutiewe adenilaatverhoudings wat dit tot gevolg kan hê (Bonzon *et al.* 1981), waarskynlik vanweë die ongunstige termiese gradiënte van vloeistof-vastestof mengsels van veelsellige weefsel (Holm-Hansen & Karl 1978).

Die PCA-metode word veral deur Perl (1980, 1980/81 a en b, 1981 a en b, 1982 a, b, c) op die gebied van saadadenilaatmetablisme aangewend, maar die metode is al gekritiseer vir die kopresipitering van ATP wat tydens die neutralisering van PCA met KOH kan plaasvind (Wiener *et al.* 1974) en die moontlike reaktivering van sekere tersaaklike ensieme tydens die neutraliseringsproses (Ikuma & Tetley 1976). Bowendien is Holm-Hansen & Booth (1966) se bevinding dat selfs geneutraliseerde PCA-ekstrakte inhiberend vir die lusiferasereaksie tydens die

bioluminessensie bepaling van ATP kan wees, in loodsstudies bevestig. Gevolglik is daar van die PCA-metode afgesien.

In feitlik al die vergelykende metode-studies, is die TCA-metode as die betroubaarste aangedui (Lundin & Thore 1975, Larsson & Olsson 1979, Saglio & Daniels 1979) en dit is ook die verkose standaardmetode van Pradet en sy medewerkers wat belangrike bydraes op die gebied van saadadenilaatmetabolisme gelewer het (Raymond & Pradet 1980). Alhoewel die TCA-metode as die omslagtigste en tydrowendste van die verskillende metodes uitgewys word, is dit ook in hierdie studie as die betroubaarste metode bevind. Gevolglik is die TCA-metode deurgaans in hierdie studie toegepas vir adenilaatekstrahering, maar met dié belangrike voorbehoud dat die ekstraksiemedium benewens TCA ook EDTA bevat het (Lundin & Thore 1975, Myhrman *et al.* 1978) en dat die ekstrahering by lae temperature uitgevoer is (Bieleski 1964).

Die adenilaatekstrahering van *Strelitzia juncea* sade en embryo's volgens die TCA-metode word vervolgens volledig bespreek.

6.2.1.2 Adenilaatekstrahering van *Strelitzia juncea* sade

'n Fles met 25 *S. juncea* sade, ontsmet en geïnkubeer soos onder 2.2 en 2.3 (p. 8) beskryf, is na die laboratorium gebring en die sade is vinnig na 'n siffie oorgebring en liggies gedroog.

Binne 8 s nadat 'n fles oopgemaak is, is die sade vanuit die siffie na diëtieleter (-100°C minimum) oorgebring en vir 5 min. by hierdie temperatuur gehou. Hierna is die sade na 150 cm^3 TCA-EDTA medium ($1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ TCA, $1\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ EDTA) in 'n 250 cm^3 Virtisfles oorgebring. Direk hierna is die sade vir 2 min. lank fyngeslaan deur van 'n Virtis "macro Turboshear" lemstelsel gebruik te maak. Aangesien die Virtisfles van 'n mantel waardeur metanol (-10°C) gesirkuleer het, voorsien was, is die ekstrakte se temperatuur onder -5°C gehandhaaf tydens die ekstraksieprosedure. Mikroskopiese ondersoek het aangetoon dat bykans alle selle in die proses vernietig is.

Die homogenaat is kwantitatief na sentrifugeerbuis oorgebring en ná 'n afswaai by 23 000 g vir 10 min. by 2°C is die bovloeistof herwin en die neerslag met 45 cm³ TCA-EDTA gewas en weer aan dieselfde sentrifugering onderwerp. Die bovloeistowwe is saamgevoeg en die helder oplossing se volume is na 250 cm³ met TCA-EDTA opgemaak.

Van bogenoemde oplossing is 'n 10 cm³ alikwot onttrek en die TCA is daaruit verwyder deur 3 keer met 30 cm³ volumes yskoue diëtieleter in skeitregters te ekstraheer. Die oortollige eter is verwyder deur druklug met behulp van 'n pasteurpipet deur die oplossing te borrel. Vervolgens is 5,0 cm³ van die oplossing verwyder, die pH daarna na 7,0 met 0,2 mol.dm⁻³ KOH ingestel en is dit kwantitatief na 'n 10 cm³ volumetriese fles oorgebring en tot volume opgemaak met 2TRIS-H₂SO₄-EDTA (40 mmol.dm⁻³ TRIS-H₂SO₄ wat 2 mmol.dm⁻³ EDTA bevat; pH 7,75). Ná goeie vermenging is die 10 cm³ finale oplossing oor 5 plastiek-polytopbuis verdeel, met vloeistikstof gevries, in die vrieskas (-15°C) gebêre en binne 2 maande geanaliseer.

In die aanvanklike ekstraheeringsprosedure is daar ná die eterafblaasprosedure 'n pH-instelling na 6,8 gemaak en die totale volume van die oplossing bepaal waarna dit direk gevries is. Hierdie oplossings het egter 'n blussing vertoon met die bioluminessensie metode, wat moontlik aan onvolledige TCA-verwydering toegeskryf kan word, òf aan die feit dat die ioonsamestelling van die ekstrakte van dié van die ATP-standaarde verskil het. Laasgenoemde moontlikheid is bevestig deur bogenoemde metode te volg waartydens die finale oplossing met 2 TRIS-H₂SO₄-EDTA opgemaak is. Sodoende is die 2 TRIS-H₂SO₄-EDTA ongeveer tweemaal deur die pH-gekorregerde monsteroplossing verdun sodat die finale monsteroplossing se TRIS-H₂SO₄-EDTA-samestelling naastenby soos dié van die ATP-standaarde was. Hierdie monsters het inderdaad min blussing getoon.

6.2.1.3 Adenilaatekstrahering van *Strelitzia juncea* embryo's

Die metode verskil in sommige opsigte van die metode hierbo (6.2.1.2) wat vir saadekstrahering ontwikkel is.

Direk nadat die sade na 'n siffie oorgebring is, is hulle op 'n papierhanddoek oopgesprei. Die sade is vinnig oopgesny, die embryo's vinnig verwyder en regstreeks in vloeistikstof gevoeg. Sodoende is embryo-vir-embryo direk nadat dit blootgestel is, in die vloeistikstof gevoeg. Dit het sowat 10 tot 13 minute geneem om die embryo's van 25 sade van 'n fles so te verwyder. Alhoewel die laaste saad dus sowat 10 tot 13 minute aan die laboratoriumatmosfeer blootgestel is, is elke embryo self vir sowat 3 sekondes aan die atmosfeer blootgestel voordat dit gevries is.

Nadat die vloeistikstof afgekook het, is die embryo's vinnig geweeg en direk daarna in 'n vysel (-10°C) met TCA-EDTA (-10°C) binne 2 minute fyngemaal. Die ekstrak is tot 30 cm^3 met TCA-EDTA opgemaak voor sentrifugering (kyk 6.2.1.2). Die neerslag is met 7 cm^3 TCA-EDTA gewas en die gekombineerde bovloeistof se volume tot 50 cm^3 met TCA-EDTA opgemaak. Die oorblywende gedeelte van die prosedure was soos onder 6.2.1.2 beskryf.

'n Fles met 25 sade het een herhaling uitgemaak. Vir elke behandeling (lug of suurstof) is 3 herhalings vir elke inkuberings-tyd uitgevoer. Die hele eksperiment is 3 x oor tyd vir heelsade en 2 x oor tyd vir embryo-ekstrahering herhaal. Die herhaalbaarheid van die tegniek is goed en die verskille tussen lug- en suurstofsade is konsekwent verkry. Voorts is $1\ 000\text{ cm}^3$ 10^9 fg.cm^{-3} ATP-standaard in die Virtisfles by die heelsade gevoeg net vóór homogenisering, die hele prosedure is voltooi en die persentasie herwinning is bepaal.

5.2.2 Bepaling van die ATP-konsentrasie van die ekstrakte met behulp van bioluminessensie

Voorafgeweegde ATP ($10\ \mu\text{g Na}_2\text{.ATP.3H}_2\text{O MM 605}$; Lumac) is in $10,0\text{ cm}^3$ steriele TRIS- H_2SO_4 -EDTA medium (20 mmol.dm^{-3} TRIS- H_2SO_4

wat $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ EDTA bevat; pH 7,75) opgelos om 'n $10^9 \text{ fg} \cdot \text{cm}^{-3}$ standaardoplossing te verkry. Die oplossing is in plastiek-polytopbuise verdeel, met vloeistikstof gevries, in 'n vrieskas (-15°C) gehou en binne 2 maande gebruik.

Op die dag van ATP-analises, is 'n $10^9 \text{ fg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ATP-standaard onttrek, heeltemal ontvries en 'n reeks standarde wat van 8×10^8 , 6×10^8 tot 2×10^6 , $10^6 \text{ fg} \cdot \text{cm}^{-3}$ strek, is met behulp van yskoue steriele TRIS- H_2SO_4 -EDTA daaruit berei. Die standarde en ontvriesde monsters is op ys gehou. Geen afname in die ATP-konsentrasie van monsters of standarde is oor 'n 12-uur periode ondervind deur van hierdie prosedure gebruik te maak nie.

Vir 'n bioluminensensie-bepaling, is 50 mm^3 TRIS- H_2SO_4 -EDTA en 50 mm^3 monster of ATP-standaard in 'n kuvet vermeng en nadat die kuvet volgens voorskrifte in 'n Picolite bioluminensensie-apparaat (Packard) geplaas is, is 50 mm^3 lusiferien-lusiferase mengsel ("Lumit-PM" oplossing; Lumac) bygespuit. Die "Lumit-PM"-oplossing is 12 ure voor gebruik gerekonstitueer deur die byvoeging van 5 cm^3 "Lumit"-buffer.

Vir die registrering van ligflitse, is die apparaat soos volg gekalibreer:

Tyd vanaf inspuit van "Lumit-PM" totdat apparaat tellings begin registreer (sloertyd): 10 s.

Tyd waaroor tellings geregistreer word: 30 s.

Agtergrondtelling afgetrek: die tellings wat deur 100 mm^3 TRIS- H_2SO_4 -EDTA buffer gegee is na byspuit van 50 mm^3 "Lumit-PM" is as agtergrond afgetrek.

Temperatuur: $23,0^\circ\text{C}$.

'n Bioluminensensiebepaling is gewoonlik driekeer op dieselfde monster of standaard uitgevoer en die gemiddelde telling is vir berekenings gebruik. Die standaardafwyking was gewoonlik tussen 1 en 3% van die gemiddelde en by hoë uitsondering tot 7% van die gemiddeld.

Blussing is bepaal deur 50 mm³ interne standaard in die kuvet in die plek van die 50 mm³ TRIS-H₂SO₄-EDTA te voeg. Die interne standaard is sō gekies dat die konsentrasie daarvan tweekeer dié van die monster se skynbare konsentrasie was. Om te verseker dat die totale ATP-konsentrasie onder die halfversadigingspunt van lusiferase is (Strehler 1968), is van monsterverdunning gebruik gemaak.

6.2.3 Bepaling van die ADP- en AMP-konsentrasie van *Strelitzia juncea* embryo-ekstrakte

Die AMP en ADP van die ekstrakte is deur middel van die algemeen aanvaarde ensimatiëse tegnieke na ATP omgeskakel en die toename in ATP-konsentrasie is met behulp van die bioluminenssensie-tegniek bepaal (Holm-Hansen & Karl 1978).

Die volgende reagense is net voor die uitvoering van die reaksies opgemaak en op ys gehou:

Reagens A (vir ATP bepaling)

2,000 cm³ KP-buffer (225 mmol.dm⁻³ steriele kaliumfosfaatbuffer,
pH 7,40 by 25°C)
2,000 cm³ MgCl₂ (45 mmol.dm⁻³ magnesiumchloried)
2,000 cm³ steriele water
6,000 cm³ totaal

Reagens B (vir ADP bepaling)

2,000 cm³ KP-buffer (soos vir A)
2,000 cm³ MgCl₂ (soos vir A)
0,240 cm³ PK (piruvaatkinase; Boehringer 128155; 10 mg cm⁻³
(NH₄)₂SO₄ suspensie; 200 U.mg⁻¹)
0,160 cm³ PEP (18,75 mmol.dm⁻³ fosfoenolpirodruiwesuur;
Boehringer 108278)
1,600 cm³ steriele water
6,000 cm³ totaal

Reagens C (vir AMP bepaling)

1,500 cm ³	KP-buffer (soos vir A)
1,500 cm ³	MgCl ₂ (soos vir A)
0,180 cm ³	PK (soos vir B)
1,125 cm ³	AK (adenilaatkinase; Boehringer 127272; 2 mg cm ⁻³ (NH ₄) ₂ SO ₄ suspensie; 360U.mg ⁻¹)
0,120 cm ³	PEP (soos vir B)
0,075 cm ³	steriele water
<u>4,500 cm³</u>	<u>totaal</u>

Waar Holm-Hansen & Karl (1978) van 'n vierde reagens gebruik maak het om vas te stel of die totale ATP-konsentrasie nie remmend vir adenilaatkinase is nie, is in hierdie studie eerder van monsterverdunning gebruik gemaak.

Adenilaatomsettings is uitgevoer deur telkens 200 mm³ van 'n ekstrak in elk van buise A, B en C (13 x 75 mm "Vac-U-Test sterile red stopper blood collection tubes"; Radem Laboratory Equipment) te voeg en albasters vir proppe te gebruik. Agt monsters, elk met 'n A, B en C buis, kan gerieflik met 1 minuut intervalle hanteer word. By elk van die 3 buise van 'n monster is op tyd 0 min. 50 mm³ van 'n ooreenstemmend gemerkte reagens gevoeg en die reaksiebuis is in 'n waterbad by 30°C vir 30 minute gehou waarna dit vir 2,5 minute in 'n 93°C waterbad verhit is. Die buise is tot kamertemperatuur afgekoel waarna 'n biolumines-sensiebepaling daarop uitgevoer is.

Vir laasgenoemde bepaling is prosedure 6.2.2 na aanleiding van Holm-Hansen & Karl (1978) se kommentaar sō aangepas dat 'n sloertyd van 0 s en 'n telperiode van 10 s gebruik is. Verder is 'n registreerder aan die bioluminessensie-apparaat gekoppel om die reaksiekinetika grafies te volg, maar geen abnormaliteite soos beskryf in Thore (1980) kon in die ligflitsproduksie van reaksiemengsels A, B of C van monsters of standaard gevind word nie. Uit die grafieke was dit ook duidelik dat die byspuit van lusiferase oombliklike vermenging tot gevolg gehad het (Seitz & Neary 1976).

Vir die korrekte bioluminessensie bepaling van 'n monster of standaard, is dit belangrik dat die ooreenstemmende blanko se agtergrond afgetrek word, afhangende daarvan of 'n A-, B- of C-reaksiemengsel se bioluminessensie bepaal word. 'n Blanko is opgemaak uit 200 mm³ TRIS-H₂SO₄-EDTA en 50 mm³ reagens A, B of C.

Om die doeltreffendheid van die adenilaatomsettings te kan bepaal, is standaardmengsels opgemaak en op soortgelyke wyse as die monsters geprosesseer. Standaardoplossings (10⁹ fg.cm⁻³) ADP en AMP wat uit voorafgeweegde "Lumac"-standaarde berei en gevries is (kyk 6.2.2, p 164), is vir die doel gebruik.

6.2.4 Bepaling van 'n sitosoliese ATP-sintese sisteem

In 'n reeks artikels het Perl (1980, 1980/81 a en b, 1981 a en b, 1982 a, b, c) aangetoon dat ekstrakte van imbiberende sade tot ATP-sintese in staat is en het hy 'n hipotetiese reaksieskema opgestel waarvolgens ATP-sintese met behulp van sitosoliese ensieme moontlik is. Die moontlike bestaan van so 'n sitosoliese ATP-sintese is vir *Strelitzia juncea* sade ondersoek. Geen deeglike en indringende tegniekstudies is hieroor aangepak nie en die prosedures word kortliks hieronder aangegee.

6.2.4.1 Bereiding van ensiemekstrakte

Saadinkubering en ekstrakbereiding van embryo's is soos vir die ekstrahering van sitosoliese ensieme uitgevoer (3.2.1, p 26), behalwe dat 25 mmol.dm⁻³ K-fosfaatbuffer pH 6,4 as ekstraksie-medium gebruik is (Perl 1980). Die 18 000 g bovloeistof (na sentrifugering van ru-ekstrak vir 10 min.) is vir die bepaling van sitosoliese ATP-sintese gebruik. Bogenoemde prosedure het van dié van Perl (1980) afgewyk deurdat verpoeierde saadweefsel nie gebruik is nie.

6.2.4.2 Reaksiemengsel vir die ondersoek van ATP-sintese

Die aanvanklike reaksiemengsel is volgens Perl (1980, 1981b) saamgestel maar swak korrelasie tussen ATP-sintese en ekstrak-

volume is verkry. Deur eksperimentering is vasgestel dat die volgende reaksiemengsel 'n lineêre toename in ATP-sintese met ekstrakvolume gee.

Die finale konsentrasies in die reaksiemengsels was $22 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ K-fosfaatbuffer pH 6,4; $10 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ $(\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N})_3$ -fosfoënopiruvaat; $2 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ NADH; $1 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ MnSO_4 ; $1 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ MgCl_2 ; $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ CoSO_4 en ekstrak om 'n totaal van $3,0 \text{ cm}^3$ reaksievolume te gee.

In literatuur wat eers na hierdie studie beskikbaar was (Perl 1982c) en wat oor ATP-sintese van dormante sade handel, blyk dit dat Perl reaksiemengsels gebruik het wat heelwat verskil van dié wat hy vroeër gepubliseer het.

6.2.4.3 Bepaling van ATP-konsentrasie van reaksiemengsels

Nadat 'n reaksie geïnisieer is deur die byvoeging van ekstrak, is monsters op vasgestelde tye van die reaksiemengsel onttrek vir die bepaling van die ATP-konsentrasie daarvan. Perl (1980) het die PCA-ekstraksiemetode op die monsters toegepas maar in hierdie studie is swak resultate daarmee verkry. Gevolglik is die omslagtiger TCA-metode aanvanklik toegepas wat kortliks daarop neerkom dat TCA-EDTA by 'n $1,0 \text{ cm}^3$ monster gevoeg is gevolg deur sentrifugering, eterekstrahering en pH-instelling soos reeds beskryf (kyk 6.2.1).

Later het geblyk dat soortgelyke resultate op 'n veel vinniger en geriefliker wyse soos volg verkry kon word. Op vasgestelde tye is 'n 50 mm^3 monster uit die reaksiemengsel onttrek, vinnig met 50 mm^3 TRIS-EDTA buffer in 'n Picolite telkuvet vermeng en die aantal ligflitse bepaal deur die byspuit van 50 mm^3 lusiferase soos reeds beskryf (6.2.2 maar met 'n sloerfase van 0 s en 'n telperiode van 10 s).

Geen aanduiding dat interaksies tussen moontlike kontaminerende komponente van die lusiferase-preparaat of die lusiferase self en die monster 'n invloed op die ligflitstellings gehad het, kon

gevind word nie. Nogtans moet gemeld word dat 'n vergelyking tussen hierdie kort metode en die omslagtiger TCA-metode vir slegs 'n paar reaksiemengsels uitgevoer is.

6.3 BEREKENINGS

6.3.1 Die ATP-konsentrasie van heelsade en embryo's

'n Reglynige regressie ($Y = Bx + A'$) is gemaak vir $Y = \log(\text{tellings})$ teenoor $x = \log(\text{standaard ATP-konsentrasie; fg.cm}^{-3})$. Die ATP-konsentrasie van 'n oplossing is bereken deur sy gemiddelde telling in die regressievergelyking te vervang:

$$f(\overline{ABW}) = \text{antilog} \left(\frac{\log W - A'}{B} \right) \dots\dots\dots (1)$$

$$= C \text{ (konsentrasie van oplossing; fg.cm}^{-3} \text{)}$$

waar A' = afsnit van regressievergelyking

B = helling van regressievergelyking

W = gemiddelde telling met oplossing verkry

Die adenilaatkonsentrasie van die heelsade of die embryo's is so bereken:

$$f(\text{CDGIJNP}) = \frac{C \times D \times G \times P \times I \times 50}{(N-C) \times 605 \times 10^6 \times J} \quad \begin{array}{l} \text{nmol.50 sade}^{-1} \\ \text{(of nmol.50 emb.)}^{-1} \end{array} \dots\dots\dots (2)$$

waar C = konsentrasie van oplossing soos uit (1) bereken;

D = ATP-konsentrasie van die interne standaard wat by blussing gebruik is soos uit (1);

N = ATP-konsentrasie van (oplossing + interne standaard) soos by blussing bepaal en volgens (1) bereken;

J = getal sade of embryo's geëkstraheer (of saadmassa);

G = verdunningsfaktor vir verdunning uitgevoer ná pH instelling;

P = verdunningsfaktor vir verdunning uitgevoer om oplossing sodanig te verdun ($< 10^9 \text{ fg.cm}^{-3}$) dat die konsentrasie laer as die halfversadigingspunt vir lusiferase is. Embryo-oplossings moes tipies 50 x verdun word ($P = 50$) terwyl verdunning van heelsaadoplossings onnodig was ($P = 1$);

I = totale volume waarna oplossing opgemaak is net ná sentrifugering.

Die ATP-inhoud van 3 herhalings (d.i. 3 inkuberingsflesse, elk met 25 sade), bereken volgens (2), se gemiddeld en standaard-afwyking) word in die figure voorgestel.

Die blussingsfaktor is bereken deur:

$$f(\text{CDN}) = \frac{D}{(N-C)} \dots\dots\dots (3)$$

Deur nmol.50 sade ⁻¹-waardes met 8,2 te deel, kan die waardes vir nmol. (g gem.droëm.saad) ⁻¹ naastenby verkry word en deur nmol.50 emb ⁻¹-waardes met 0,4 te deel, kan die waardes vir nmol. (g gemiddelde varsmassa van die embrio's) ⁻¹ naastenby verkry word.

6.3.2 Die berekening van AMP en ADP konsentrasies

Drie verskillende regressievergelykings (A, B en C) is onderskeidelik uit die data vir die A-, B- en C-buise van die ATP-standaarde opgestel. Die ATP-konsentrasie van 'n monster of standaardmengsel se reaksiemengsel is uit (1) bereken deur die toepaslike regressievergelyking (A, B of C) te gebruik. Vervolgens is die monsters se ATP-inhoud volgens (2) as nmol. 50 emb ⁻¹ bereken en die ADP- en AMP-inhoud van die embrio's is deur die volgende bewerkings verkry:

$$\text{ADP-inhoud (nmol.50 emb}^{-1}\text{)} = \text{ATP-inhoud volgens die B-reaksiesmengsel (nmol.50 emb}^{-1}\text{)} - \text{ATP-inhoud volgens die A-reaksiesmengsel (nmol.50 emb}^{-1}\text{)}.$$

Verder:

$$\text{AMP-inhoud (nmol.50 emb}^{-1}\text{)} = \text{ATP-inhoud volgens die C-reaksiesmengsel (nmol.50 emb}^{-1}\text{)} - \text{ATP-inhoud volgens B-reaksiesmengsel (nmol.50 emb}^{-1}\text{)}$$

Om die teoretiese adenilaatomsettings van die standaardmengsels te bereken, is die ADP-konsentrasie (fg.cm^{-3}) van 'n mengsel met 'n faktor 1,1878 en die AMP-konsentrasie (fg.cm^{-3}) met 'n faktor 1,4617 vermenigvuldig. Sommering van $(\text{ATP}) + 1,1878 \times (\text{ADP}) + 1,4617 \times (\text{AMP})$ gee die totale verwagte (ATP) in fg.cm^{-3} aan.

Aangesien die molmassa en verklaarde soutsamestelling op die etikette van die ADP- en AMP-"Lumac"-standaarde nie ooreengestem het nie, is op bogenoemde faktoromskakelings besluit ná oorlegpleging met die "Lumac"-firma. Die ADP-omsetting wissel van 91 tot 96% van die teoreties verwagte waardes en die AMP-omsetting van 74 tot 79% van die teoretiese waardes.

Die energieladingwaarde (EC) en die ewewigskonstante (K) vir die adenilaatkinase gekataliseerde reaksie is só bereken (Atkinson 1968, Bomsel & Pradet 1968):

$$EC = \frac{(\text{ATP}) + \frac{1}{2} (\text{ADP})}{(\text{ATP}) + (\text{ADP}) + (\text{AMP})} \dots\dots\dots (4)$$

$$K = \frac{(\text{ATP}) \times (\text{AMP})}{(\text{ADP})^2} \dots\dots\dots (5)$$

Die mate van variasie om die berekende groothede EC en K is volgens Aikens *et al.* (1978) bereken.

6.3.3 Berekening van die ATP-sintese tempo van sitosoliese ekstrakte

Die ligflitstellings (t_0) wat op tyd 0 (direk na byvoeging van die ekstrak tot die reaksiemengsel) verkry is, is as agtergrond van die latere tellings (t) afgetrek. Die verkreë waardes ($t-t_0$) is as maatstaf van ATP-sintese gebruik en is nie soos vir die ander eksperimente van 'n ykkromme afgelees nie.

6.4 RESULTATE EN BESPREKING

6.4.1 ATP-inhoud van heelsade

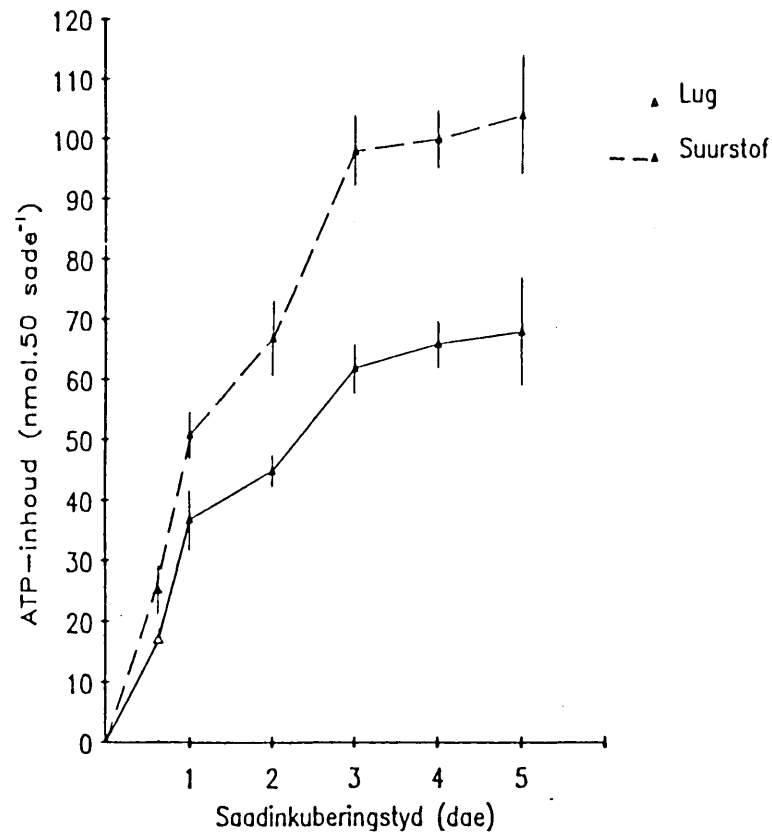
Saad se ATP-inhoud neem vinnig vanaf 'n lae waarde in droë saad ($0,24 \text{ nmol} \cdot 50 \text{ sade}^{-1}$) toe oor die eerste twee dae van saad-inkubering en plat dan geleidelik af tot op dag 5 van inkubering (Figuur 6.1 A). Die suurstofsade se ATP-inhoud neig reeds om na 15 uur inkubering hoër te wees en plat op 'n hoër waarde as by die lugsade af. Die waardes val binne die grense wat vorige waarnemers met verskillende soorte sade gekry het (Ching 1973). Uit die verloop van die kromme wil dit voorkom asof homeostase binne vyf inkuberingsdae bereik is en dat daar nie 'n algehele onderdrukking van ATP-sintese by die lugsade is nie. Inderwaarheid stem die verloop van ATP-toename van die dormante sade oor die vyf inkuberingsdae in profiel en waardes goed ooreen met dié van nie-dormante normaal-kiemende sade binne 0-6 h van imbibering (Lunn & Madsen 1981).

In die vorige hoofstuk oor mitochondriale ensieme is reeds die afleiding gemaak dat verskynsels wat by normaalkiemende sade binne 'n paar uur van inkubering afspeel, by *Strelitzia juncea* sade oor 4 inkuberingsdae plaasvind. Die afleiding geld skynbaar ook vir ATP-konsentrasie. Volgens die literatuuroorsig van Pradet (1982) is daar 'n vinnige toename in die ATP-konsentrasie van sade met 'n kort fase 1 van suurstofopname. *Strelitzia reginae* en *S. juncea* vertoon egter nie die kenmerkende fases 1 en 2 in suurstofopnametempo nie, soos blyk uit die data van Van de Venter (1974) en Ybema (1983). Laasgenoemde het egter nie 0 -opname voor dag 1 van inkubering bepaal nie. Nogtans is 'n groot toename in die ATP-inhoud van die sade vanaf die aanvang van inkubering verkry. Die waargenome profiel vir ATP-toename stem ook nie ooreen met die profiel vir waterimbibisie van *S. juncea* nie (Ybema, 1983).

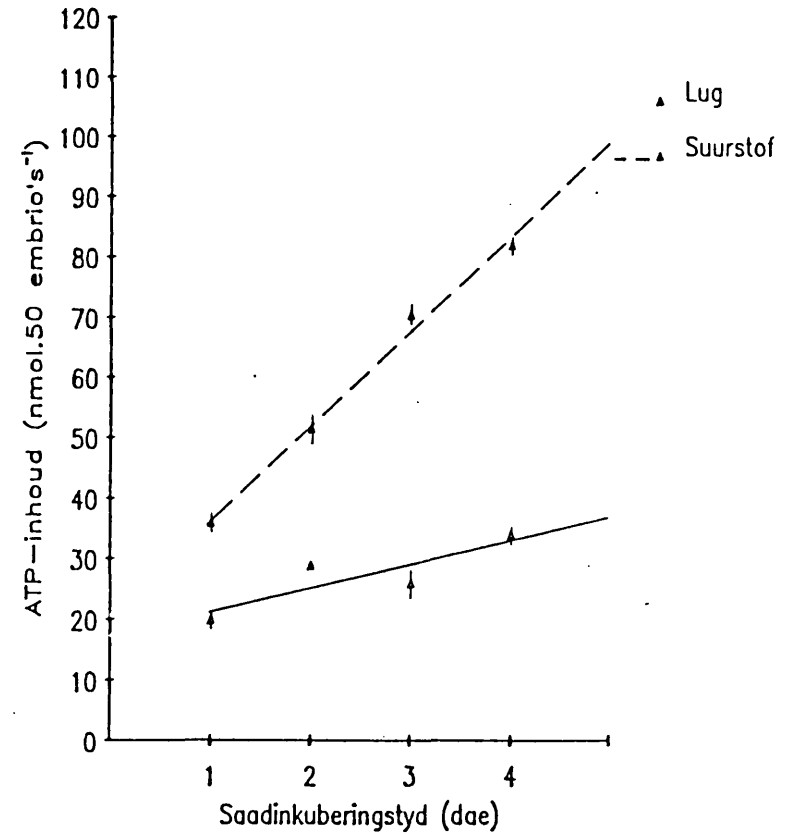
6.4.2 ATP-inhoud van embrio's

Die ATP-inhoud van die embrio's van suurstofsade van *Strelitzia juncea* (Figuur 6.1 B), is hoër as dié van die lugsade en in albei gevalle is daar 'n reglynige toename in ATP-inhoud met toenemende inku-

Figuur 6.1 A



Figuur 6.1 B



Figuur 6.1. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die ATP-inhoud van *Strelitzia juncea*-sade of embrio's na verskillende tye van inkubering van die sade in lug- of suurstofatmosfeer.

6.1 A. ATP-inhoud van die heelsade.

6.1 B. ATP-inhoud van die embrio's.

bering. Die heelsade (Figuur 6.1 A) se ATP-inhoud vertoon ook in 'n mate reglynig as dae 0 en 5 se waardes buite rekening gelaat word.

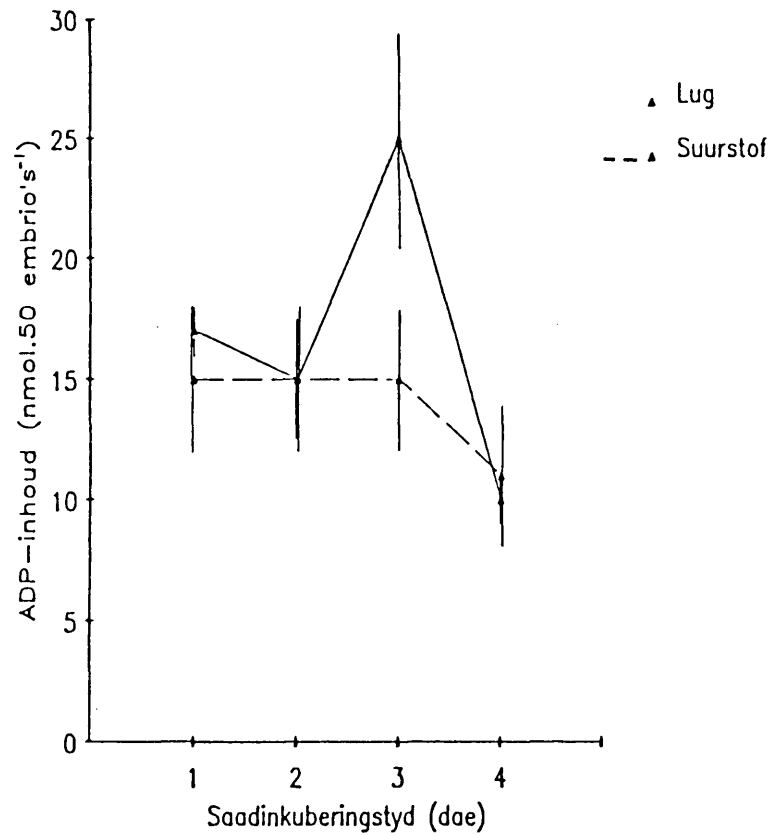
Aangesien die ATP-inhoud op 'n saadbasis (Figuur 6.1 A) hoër as op 'n embriobasis (Figuur 6.1 B) is, kan aangeneem word dat die endosperm- of aleuronweefsel ook moontlik ATP bevat het, maar dan hoogstens eenderde van die embryo se ATP-inhoud. Die hoë omslaggetal vir ATP in metaboliese aktiewe weefsel egter in ag genome (Pradet & Raymond 1983), kan die laer ATP-inhoud van die embryo's ook die gevolg wees van die relatief lang prosedure vir embrioverwydering (6.2.1.3; p 164).

6.4.3 ADP- en AMP-inhoud van die embryo's

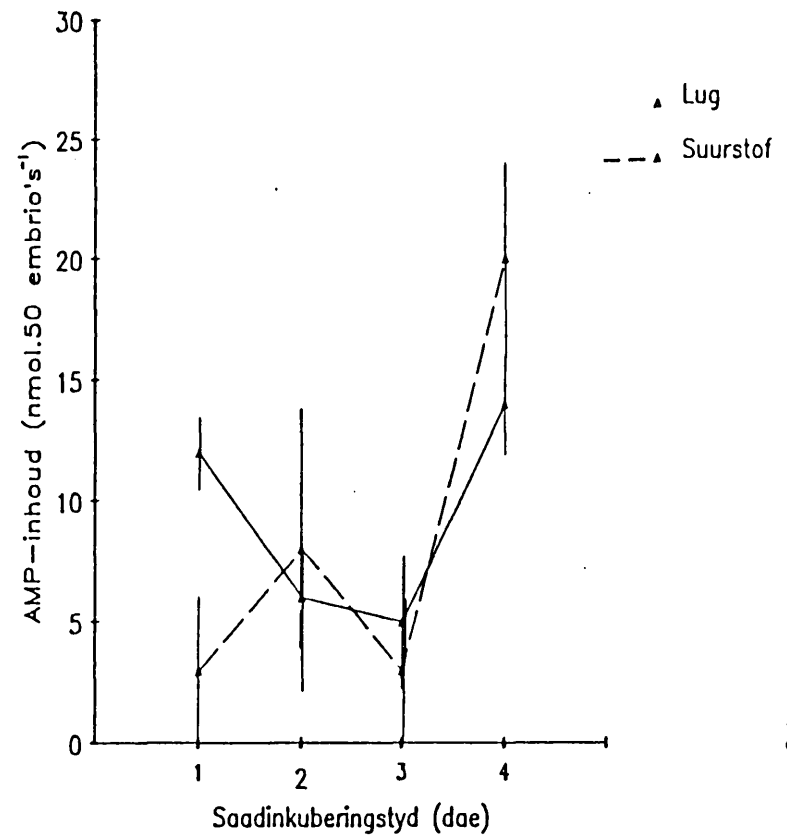
Die ADP-inhoud van die embryo's (Figuur 6.2 A) het min of meer konstant op 15 nmol. 50 embryo's⁻¹ van dag 1 tot 4 van inkuberingsgebly en behalwe vir inkuberingsdag 3, was daar feitlik geen verskil in die ADP-inhoud van embryo's afkomstig van dormante- en nie-dormante sade nie. So 'n konstante ADP-vlak is ook vir *Pisum sativum* sade tydens 0-16 h imbibisie (Brown 1965), *Pinus ponderosa* embryo's tydens stratifisering en voor kieming (Ching & Ching 1972) en vir geïsoleerde *Triticum aestivum* embryo's tussen 0 en 16 h imbibering (Obendorf & Marcus 1974) gevind.

Van die drie nukleotiede, was die AMP-inhoud die laagste (ca 5 nmol. 50 embryo's⁻¹ op inkuberingsdae 2 en 3) maar op dag 4 was die ADP- en AMP-inhoud van die embryo's eenders (Figuur 6.2 B). Geen verskil tussen die embryo's van lug- en suurstofsade kon gevind word nie, behalwe op die eerste inkuberingsdag waar 'n hoër AMP-inhoud by die lugbehandelde saad gevind is. Hierdie verskil in AMP-inhoud op inkuberingsdag 1 is van belang aangesien ATP-toename tydens imbibering met 'n ooreenstemmende AMP-afname gekorreleer is (Obendorf & Marcus 1974 vir geïsoleerde *Pisum sativum* embryo's; Brown 1965 vir *Pisum sativum* sade). Uit die oorsig van Pradet (1982) volg ook

Figuur 6.2 A



Figuur 6.2 B



Figuur 6.2. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die ADP- en AMP-inhoud van *Strelitzia juncea*-embrio's wat na bepaalde saadinkuberingstye geanaliseer is.

6.2 A. ADP-inhoud.

6.2 B. AMP-inhoud.

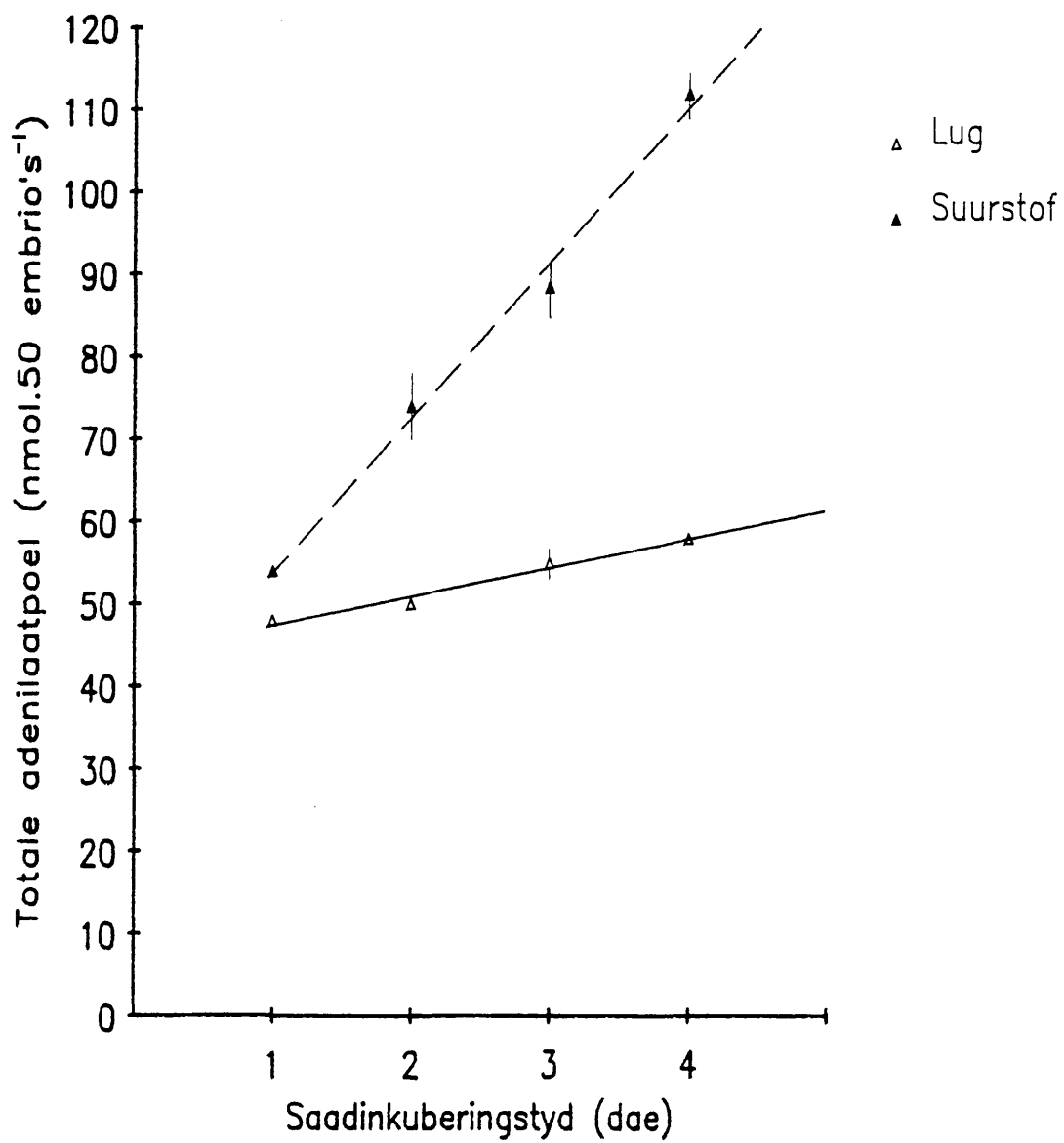
dat vir sade met 'n kort fase 1 van suurstofopname, daar 'n hoë ATP-sintese tempo is en dat die sintese uit AMP en ADP geskied.

6.4.4 Totale adenilaatpoel

Reeds op dag 1 van inkubering was die totale adenilaatpoel van die embryo's van suurstofsade groter as dié van die lugsade en daarna het dit reglynig met verdere inkubering toegeneem sodat die totale poel op dag 4 ca tweekeer groter as op dag 1 was. Ook by die embryo's van die lugsade was daar 'n reglynige toename in poelgrootte met inkubering maar die poel was slegs 1,21 keer groter. (Figuur 6.3). Dit is duidelik uit Figure 6.1 B en 6.2 dat die toename in die adenilaatpoel van die embryo's van suurstofsade aan die bydrae van ATP tot die poel toegeskryf moet word.

Uit al die voorafgaande blyk dit dat die toename in ATP op dag 1 ($16 \text{ nmol. } 50 \text{ embryo's}^{-1}$) as gevolg van suurstofbehandeling, slegs gedeeltelik deur die sintese van ATP uit AMP ($8,5 \text{ nmol. } 50 \text{ embryo's}^{-1}$ laer as vir lugbehandeling) verklaar kan word. Dit stem ooreen met die algemene situasie (Pradet 1982) waar die adenilaatpoel deur adenilaatsintese reeds 'n paar minute ná die aanvang van ATP-sintese in imbiberende sade toeneem. Volgens laasgenoemde outeur styg die poel van 100 tot 500 nmol. g^{-1} saad binne 4 uur by sommige saadsoorte. Die poelgrootte van *Strelitzia juncea* embryo's op dag 0 is nie bepaal nie sodat 'n vergelyking nie getref kan word nie.

Min inligting oor die wyse waarop die adenilaatpoel deur adenilaatsintese vergroot word, kon in onlangse literatuur gevind word. Kombrinck & Beevers (1983) het die vervoer van nukleosiede vanaf endosperm na saadlobbe vir *Ricinus communis* waargeneem, maar hulle studies was tot gekiemde sade beperk. Brown (1965) het nie 'n toename in adenilaatpoel vir *Pisum sativum* sade waargeneem nie maar gevind dat die gehele nukleosied-plus nukleotiedpoel (adenilate en ander) konstant gebly het oor die 0-16 h periode.



Figuur 6.3. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die totale adenilaatpoel van *Strelitzia juncea* -embrio's wat na bepaalde saadinkuberingstye geanaliseer is.

Soos reeds bespreek (4.4.1, p 79), is 'n klein toename in die aktiwiteit van die PP-weg ensiem G6PDH as gevolg van suurstof-behandeling vir die embryo's van *Strelitzia juncea* waargeneem. Sou die klein verskil ($0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 50 embryo's⁻¹) ook *in vivo* van toepassing wees, kan dit teoreties 'n D-ribose-5-fosfaat sintese van $43\ 200 \text{ nmol}\cdot 50 \text{ embryo's}^{-1}$ oor 24 uur moontlik maak wat veel meer is as die *ca* $8 \text{ nmol}\cdot 50 \text{ embryo's}^{-1}$ waarmee die totale adenilaatpoel vergroot het. So 'n afleiding is natuurlik hoogs spekulatief, soos blyk uit die polemieë oor die belangrikheid van 'n enkele "regulerende" ensiem versus die funksionering van 'n hele sisteem vir metaboliese regulering (Crabtree & Newsholme 1985; Masters 1985). Nogtans is dit teoreties moontlik dat ten minste die glikosiedgedeelte van adenilate deur *S. juncea* embryo's oor die eerste 24 uur van saadinkubering gesintetiseer kan word.

'n Ander moontlike verklaring vir ATP-sintese, is uit NADH volgens die hipotese van Perl (1982c) wat later bespreek sal word (6.4.6, p 183).

6.4.5 Energielading

Die adenilaat-energielading (AEC) van suurstofsade se embryo's het tussen $0,775 \pm 0,019$ minimum (dag 4) en $0,885 \pm 0,031$ maksimum (dag 3) gewissel (Figuur 6.4) en is in ooreenstemming met waardes wat vir metabolies aktiewe plantweefsel verkry word (oorsig deur Pradet 1982). Dit is opmerklik dat so 'n hoë AEC-waarde reeds op dag 1 van saadinkubering vir die embryo's van suurstofsade bereik word terwyl vir die lugbe-handeling die opmerklike lae waarde van $0,585 \pm 0,010$ verkry is. Behalwe vir die AEC-waarde van $0,732 \pm 0,019$ op inkuberingsdag 2 vir laasgenoemde behandeling, is dit oor die vier inkuberingsdae gesien laer as 0,7 en dus as dié van die embryo's van die suurstofsade.

Die AEC-begrip is slegs geldig indien die adenilaatpoel deur die adenilaatkinase (AK) ensiem geëkwilibreer word (Bomsel &

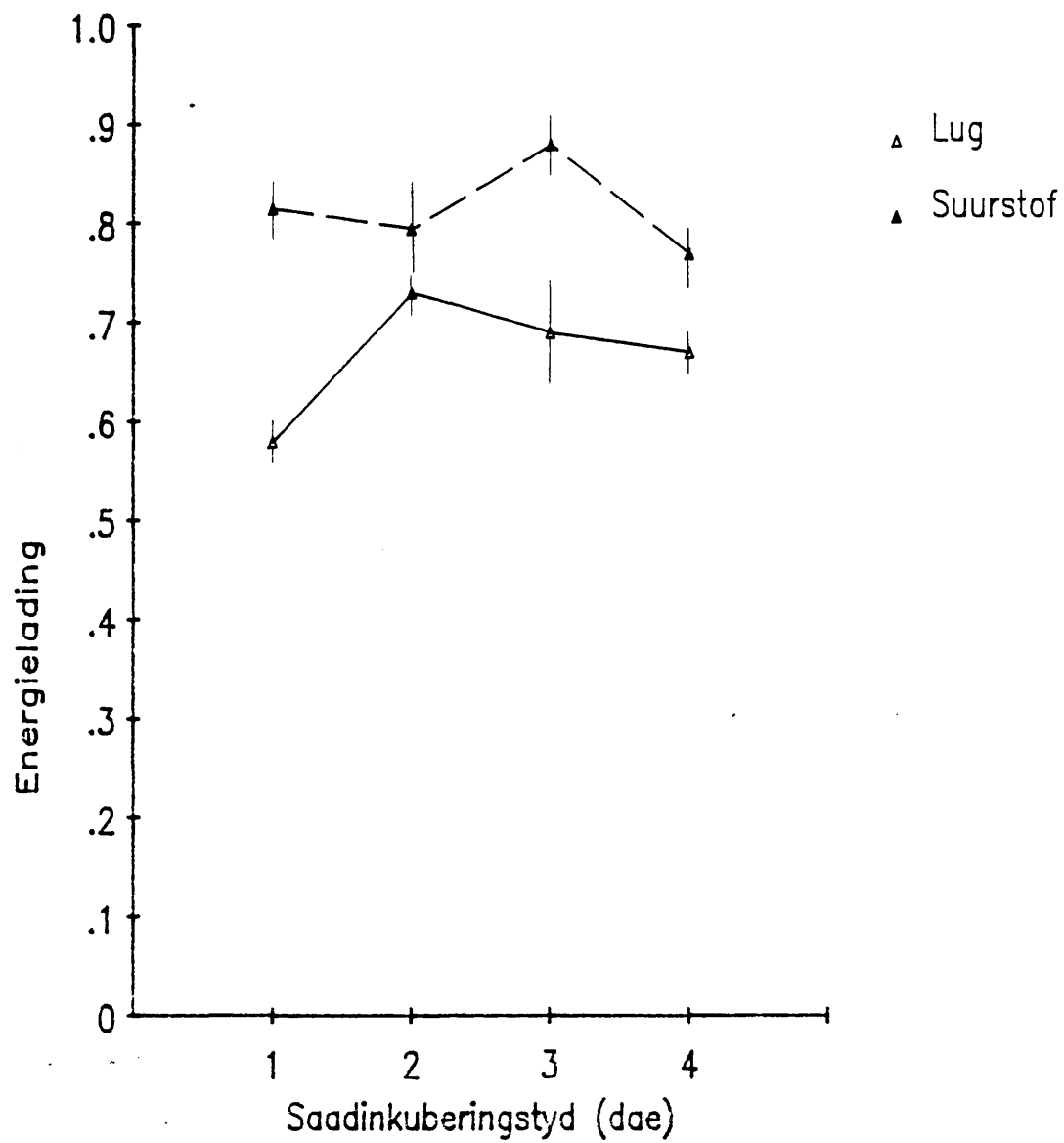
Pradet 1968; Raymond & Pradet 1980). Om dit vas te stel, is die K_{eq} -waardes vir die AK bereken (Tabel 6.1). Die hoë foutgrense is die gevolg van die berekeningsprosedure, maar die afleiding kan tog gemaak word dat AK wel die poel geëkwilibreer het, behalwe vir dag 4. Normaal aanvaarde K-waardes wissel tussen 0,4 en 1,4 *in vitro*, afhangende van die Mg^{2+} -konsentrasie (Raymond & Pradet 1980). Die hoë K-waardes soos vir dag 4 waargeneem, kan moontlik aan die teenwoordigheid van verskillende adenilaatpoele toegeskryf word.

Tabel 6.1 Berekenende K-waardes vir die adenilaatkinase gekataliseerde reaksie vir embryo's van *Strelitzia juncea* sade wat in lug- of suurstof geïnkubeer is

Saadinkubering (dae)	K-waardes	
	Lug-behandeling	Suurstof-behandeling
1	0,852±0,121	0,544±0,606
2	0,710±0,289	1,754±1,274
3	0,195±0,218	0,786±1,021
4	5,230±1,700	14,350±8,225

Uit die oorsig van Pradet & Raymond (1984) blyk dit dat situasies waar (i) die metaboliese benutting (U) van ATP of (ii) die metaboliese regenerering (R) tesame met die metaboliese benutting (U) van ATP benadeel word, min uitwerking op die AEC-waarde het. Situasies daarenteen waar slegs die R-weg benadeel word, het 'n verlaging in die AEC-waarde tot gevolg. Op grond van hierdie hipotese, kan enkele spekulasies oor die relatief lae AEC-waarde van die embryo's van lugsade gewaag word.

Die lae AEC-waarde op inkuberingdag 1 vir die lugbehandeling, dui daarop dat slegs die R-weg beperkend is. Aangesien die



Figuur 6.4. Die invloed van dormansieverbreking deur suurstof op die adenilaatenergieelading (AEC)-waardes van *Strelitzia juncea*-embrio's wat na bepaalde saadinkuberingstye geanaliseer is. ATP-sintese is waargeneem as 'n toename in netto tellings soos deur bioluminessensie bepaal.

glukose-, fruktose- en piruvaatinhoud van die lugsade se embryo's hoër as dié van die suurstofsade was, (3.4.2.2, p 66), was die beskikbaarheid van substrate vir respirasie waarskynlik nie beperkend nie. Ybema (1983) kon geen verskille in die konsentrasie reduserende verbindings van die twee behandelings se embryo's oor die eerste 4 inkuberingsdae vind nie. 'n Beperking van die R-weg lê dus waarskynlik by die benutting van die respirasiesubstrate vir ATP-sintese, soos bv. swak gekoppelde mitochondrions.

Die suurstofopnametempo van die suurstofsade is nie veel hoër as by die lugsade nie ($\text{ca } 4 \text{ mm}^3 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ volgens die gegewens van Ybema 1983). Daaruit kan bereken word dat 'n addisionele ATP-sintese van $\text{ca } 70 \text{ mg}$ oor 24 uur moontlik is indien die addisionele suurstof opgeneem vir die volledige oksidasie van 'n heksose gebruik sou word. Die suurstofopnametempo van suurstofsade kan teoreties 'n verhouding van 0,39 gee vir die (totale hoeveelheid ATP sintetiseerbaar (g))/(massa embryo's (g)) terwyl dieselfde verhouding vir lugsade 0,23 is (berekeningsprosedure en aannames word onder 7.2.3, p 191 aangegee). Dit vergelyk swak met 'n waarde van 5 vir dieselfde verhouding wat vir aktief groeiende wortelpunte verkry is (Pradet & Raymond 1983). Aan die ander kant moet onthou word dat 'n relatief groot gedeelte van die embryo's se massa uit reserwevoedingstowwe bestaan en dat daar waarskynlik nie 'n hoë mitotiese aktiwiteit voor kieming plaasvind nie. Substraatvlakfosforilering kan 'n belangrike rol speel en die hoë mate van fermentasie wat by suurstofsade moontlik is (kyk 3.4.1.4, p46) kan hiermee verband hou. Alhoewel die effens hoër suurstofopnametempo oor die eerste vier inkuberingsdae meer as voldoende is om die hoër ATP-inhoud van die suurstofsade te verklaar, is dit dus onvoldoende om die hoë omslaggetal wat vir weefsel soos wortelgroeipunte verkry is, moontlik te maak.

Hoë AEC-waardes kan wel deur fermentasie bewerkstellig word indien voldoende substraat beskikbaar is (Pradet & Raymond 1984). Die vloed deur die glikolitiese sisteem kan egter nie vir lug- en suurstofsade uit die beskikbare data bereken word nie. Volgens Mayer & Marbach (1981) se oorsig is substraatvlakfosforilering onvoldoende om die hoë ATP-sintese tempo tydens aanvanklike imbibering te verklaar.

Geen inligting oor die opheffing van dormansie deur suurstof en hoe dit moontlik die AEC-waardes beïnvloed, kon gevind word nie. Wat dormansieverbreking deur temperatuurbehandelings betref, het Esashi *et al.* (1983) tot die gevolgtrekking gekom dat die meganisme waardeur bepaalde temperatuurbehandelings die sekondêre dormansie van *Xanthium pennsylvanicum* sade opgehef het, 'n toename in die ATP-inhoud en die adenilaatpoel van die embrionale assie veroorsaak het, maar nie van die AEC-waarde nie. Dit stem nie ooreen met ander literatuur oor dormansieverbreking deur stratifisering waar sowel die ATP-inhoud as die AEC-waardes styg nie, soos bespreek deur Esashi *et al.* (1983). Genoemde outeurs het die onvermoë van dormante *X. pennsylvanicum* sade tot kieming toegeskryf aan 'n lae ATP-sintese tempo sowel as 'n onvermoë vir die vorming van AMP. Volgens hulle bevindings is AMP-sintese aan sianiedongevoelige respirasie gekoppel en veroorsaak sekere temperatuurbehandelings wat dormansie verbreek, dat die kapasiteit vir die sianiedongevoelige weg toeneem.

Benewens ATP-sintese deur die konvensionele glikolitiese en fermentatiewe prosesse, is ook ander hipoteses vir sitosoliese ATP-sintese geformuleer.

6.4.6 Sitosoliese ATP-sintese sisteem

ATP-sintese in imbiberende nie-dormante sade is aan 'n suurstofafhanklike proses gekoppel en dit is waarskynlik die sitochroombevattende elektronoordragsisteem (Pradet 1982). Alhoewel daar literatuur oor die glikolitiese sintese van ATP in imbiberende sade bestaan, is volgens die genoemde outeur, die kwantitatiewe belangrikheid van die twee prosesse nog nie ondersoek nie. In hierdie studie is gepoog om vas te stel of die sitosoliese ATP-sintese sisteem (Perl 1980) in *Strelitzia juncea* sade aangedui kon word.

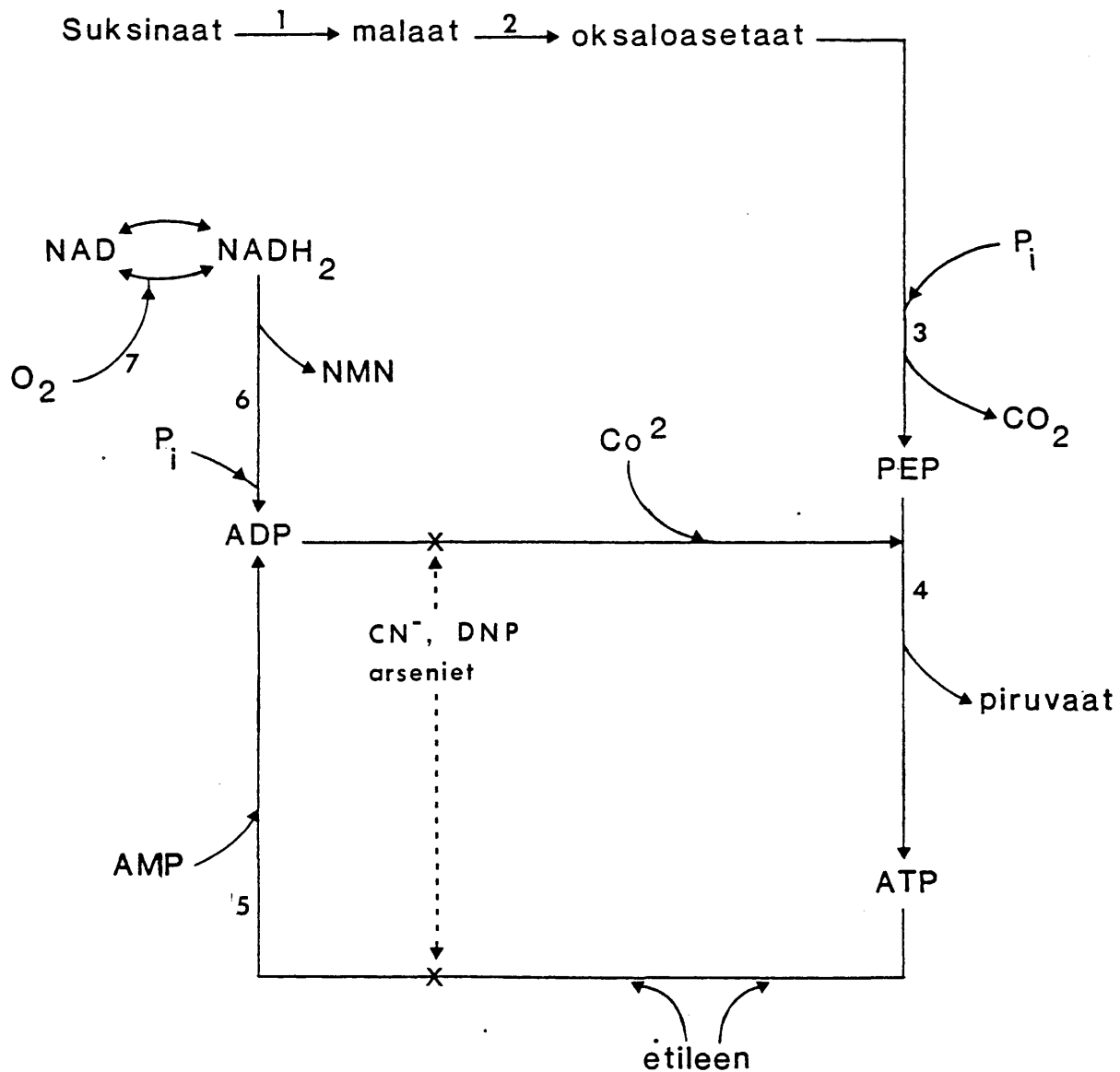
Op grond van sy eksperimentele werk, het Perl (1980) 'n hipotetiese ATP-sintese skema opgestel waarvolgens ATP-toename

in imbiberende sade deur sitosoliese ensieme bewerkstellig word. Die hipotese is later uitgebrei (Perl 1982c) op grond van werk wat met dormante *Arachis hypogaea* sade gedoen is en waarvolgens etileen die ATP-sinteseproses kan beïnvloed (kyk Figuur 6.5 wat uit Perl (1982c) oorgeneem is).

'n Kardinale aspek van die hipotese is die teenwoordigheid van 'n NADH-pirofosforilase-ensiem (Perl 1981b) waardeur die sintese van ATP uit NADH moontlik gemaak word. Twee van die sitosoliese ensieme wat in die hipotese figureer, nl. PK en MDH_{cyt} se teenwoordigheid is reeds vir *Strelitzia juncea* embryo-ekstrakte aangetoon (hfst. 3 en 5). Resultate wat met die toets-sisteem onder 6.2.4 beskryf is, word vervolgens bespreek.

Soos reeds gemeld (6.2.4), is 'n lineêre verband tussen ekstrak-volume en ATP-sintese verkry (Figuur 6.6 A). 'n Lae tempo van ATP-sintese is in reaksiemengsels sonder CoSO₄ of MnSO₄ waargeneem; dit het gegeld vir dag 1 geïnkubeerde lugsade (Figuur 6.6 B) en ook vir dag 3 geïnkubeerde lugsade. Dit ondersteun die gevolgtrekking: "Thus, Co⁺ seems to be an essential ion for ATP synthesis in seeds at their early stage of germination" (Perl 1982C). Kobaltione (Co²⁺) is volgens die outeur noodsaaklik vir PK-aktiwiteit en daarby onderdruk dit die AK-aktiwiteit.

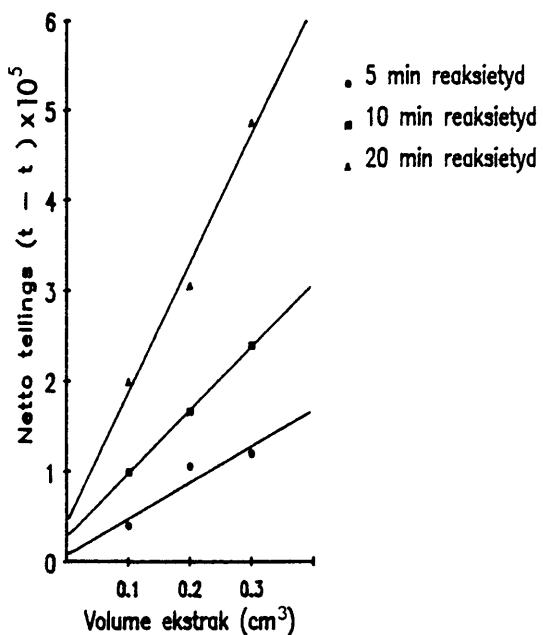
Indien NADH-pirofosforilase vir die aanvanklike ATP-sintese verantwoordelik is, behoort die ATP-sintese tempo deur NADH-konsentrasie beïnvloed te word. Die NADH-konsentrasie het wel 'n invloed op die ATP-sintese tempo gehad (Figuur 6.6 C) maar ATP-sintese is ook sonder NADH-byvoeging verkry. Dit kan verklaar word deur die teenwoordigheid van endogene NADH in die ekstrak; die waargenome staking van ATP-sintese na 10 minute reaksietyd in die afwesigheid van bygevoegde NADH sal dan aan die opgebruik van die endogene NADH toegeskryf kan word. ATP-sintese sonder bygevoegde NADH is nie net vir dag 1 geïnkubeerde embryo-ekstrakte (Figuur 6.6 C) gevind nie, maar



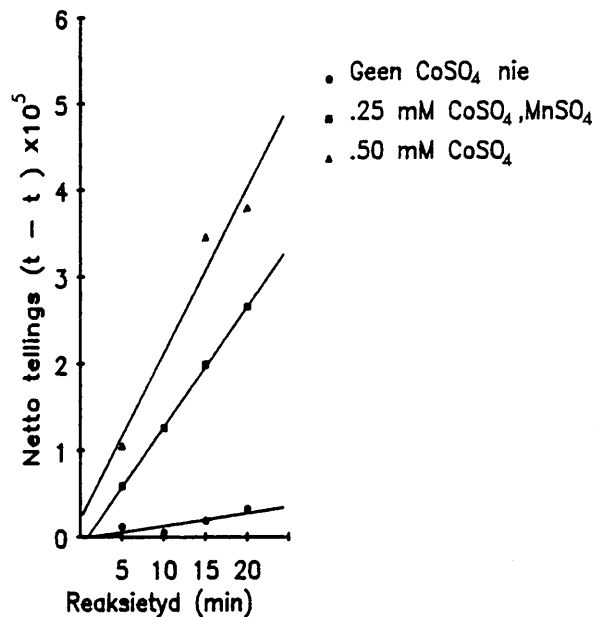
Figuur 6.5. Hipotetiese skema vir die sintese van ATP tydens vroeë inkubering van sade. Uit Perl (1982c, p 468) oorgeneem.

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1 : suksinaatdehidrogenase | 5 : adenilaatkinase |
| 2 : malaatdehidrogenase | 6 : NADH ₂ -pirofosforilase |
| 3 : PEP karboksiefosfotransferase | 7 : NADH ₂ -oksigenase |
| 4 : Piruvaatkinase | |

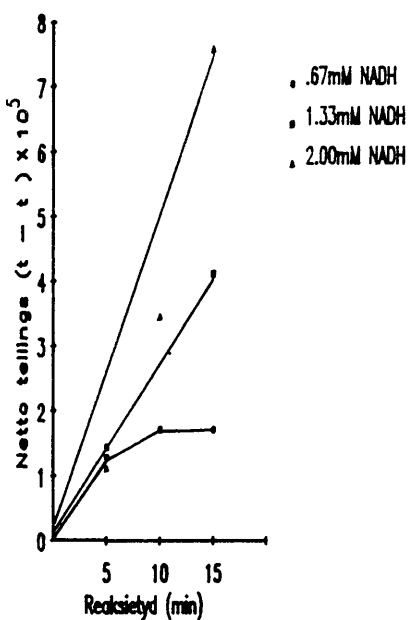
Figuur 6.6 A



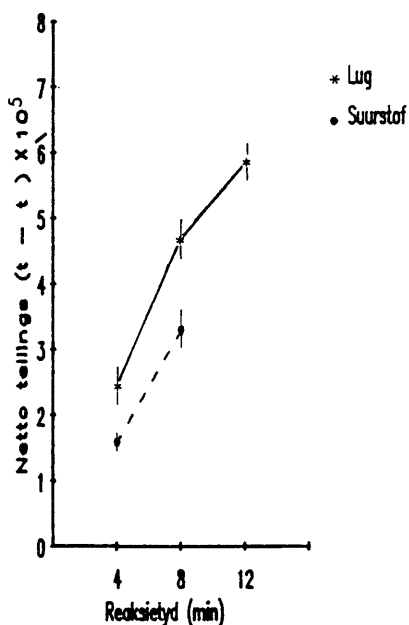
Figuur 6.6 B



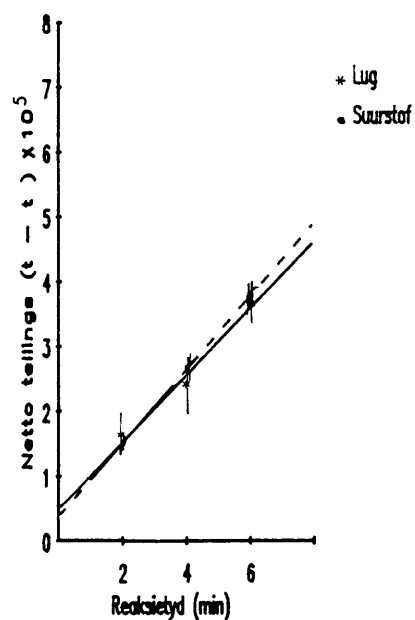
Figuur 6.6 C



Figuur 6.6 D



Figuur 6.6 E



ook vir dag 3 geïnkubeerde embrio-ekstrakte (resultate nie getoon nie).

Na 2 en 3 dae inkubering (Figuur 6.6 D, E) was daar nie veel verskil in die ATP-sintese tempo as gevolg van lug- en suurstof-inkubering van sade nie; op dag 2 was die sintese tempo vir lugbehandeling groter. Die rede dat aktiewe ATP-sintese nie by die suurstofsade gevind is nie, kan aan 'n paar oorsake toegeskryf word; moontlik word ATP nie in die embrio's van suurstofsade via die voorgestelde skema gesintetiseer nie; die hipotetiese skema funksioneer moontlik goed voor inkuberingsdag 2 by die suurstofsade; die reaksiemengsel wat hier gebruik is, is moontlik nie optimaal vir 'n bepaalde sleutelensiem of -sisteem in die suurstofekstrakte nie.

Op hierdie stadium is dit onduidelik of die hoër ATP-sintetiese vermoë van nie-dormante *Arachis hypogaea* sade aan een bepaalde faktor in die hipotetiese skema toegeskryf kan word of nie. Verder is dit nog nie vasgestel of die voorgestelde onderlinge interaksie tussen die ensieme (Perl 1982 c) *in vivo* kan optree en of die waargenome ATP-sintese net die gevolg van toevallige ensiemvermenging vanweë weefselhomogenisering is nie.

Een duidelike verskil wat wel met die toetsstelsel tussen lug- en suurstofsade se embrio-ekstrakte uitgewys kan word, is dat die aanvanklike ligflitstellings (t_0) altyd hoër in die geval van die suurstofsade was (resultate nie getoon nie). Dit dien as bevestiging daarvan dat die embrio's van suurstofsade 'n hoër ATP-inhoud het.

By die evaluering van die resultate oor die ondersoek na 'n sitosoliese ATP-sintese-sisteem, moet die voorlopige aard van die werk in gedagte gehou word. Die volgende stelling bly van krag: "Establishment of the possible relation between dormancy breakage and the ATP synthesis system in seeds, described here as a universal phenomenon, necessitates further investigations in additional crops and on purified enzymes" (Perl 1982 c).

6.5 OPSOMMING

Die ATP-inhoud van heelsade was hoër as dié van die embrio's van *Strelitzia juncea* sade. Suurstofbehandeling van die sade het tot 'n reglynige toename in die ATP-inhoud van die embrio's oor die eerste vier inkuberingsdae gelei. Die lugsade se embrio's het ook so 'n reglynige toename in die ATP-inhoud getoon, maar dit was van veel kleiner omvang as in die geval van die suurstofsade.

Die ADP-inhoud was min of meer konstant oor die vier inkuberingsdae vir albei behandelings en heelwat laer as die ATP-inhoud. Die AMP-inhoud was laer as die ADP-inhoud en het op dag 1 'n laer waarde by die embrio's van die suurstofsade gehad. Origens was daar geen verskil in die AMP-inhoud van die embrio's van lug- en suurstofsade met saadinkuberingstyd nie.

Die reglynige toename in die adenilaatpoel met tyd kan grootliks aan die toename in die ATP-inhoud toegeskryf word. Die poel is op dag 4 ten minste tweemaal groter vir die embrio's van die suurstofsade as vir dié van die lugsade.

Oor die vier inkuberingsdae was die AEC-waardes vir die embrio's van suurstofsade $\geq 0,8$ terwyl dit vir die lugsade se embrio's feitlik deurgaans $\leq 0,7$ was. Dit wil voorkom asof die poel vir die eerste drie dae waarskynlik deur AK geëkwilibreer is.

Die sintese van ATP deur 'n sitosoliese sisteem soos deur Perl (1982c) gepostuleer, kon wel aangetoon word, maar geen verskil in die ATP-sintese tempo tussen die embrio-ekstrakte van lug- en suurstofsade kon gevind word nie.

HOOFSTUK 7OORSIGTELIKE BESPREKING VAN DIE RESPIRATORIESE METABOLISMEVAN STRELITZIA JUNCEA - SADE

7.1	INLEIDING	190
7.2	BEREKENINGS	190
7.2.1	Suurstofopname van <i>Strelitzia juncea</i> - sade	190
7.2.2	Maksimum teoretiese hoeveelheid heksoses oksideerbaar	191
7.2.3	Maksimum teoretiese hoeveelheid ATP wat uit die volledige oksidasie van heksoses gevorm kan word ...	191
7.2.4	Berekening van eksperimenteel-bepaalde afname in heksose-inhoud	191
7.2.5	Hoeveelheid suurstofopname wat teoreties vir <i>in vitro</i> aktiwiteit van sitochroomoksidase benodig word	192
7.3	VERNAAMSTE BEVINDINGS VIR DORMANTE SADE	192
7.4	VERNAAMSTE BEVINDINGS VIR DORMANSIEVERBREKING DEUR SUURSTOF	194
7.5	ENKELE INTERPRETASIES OOR DIE RESPIRATORIESE METABOLISME EN DORMANSIEVERBREKING DEUR SUURSTOF VAN STRELITZIA JUNCEA - SADE	196
7.6	GEVOLGTREKKING	204
7.7	VOORSTELLE VIR OPVOLGSTUDIES	205

7.1 INLEIDING

In hierdie slothoofstuk word gepoog om eers 'n oorsigtelike bespreking van die vernaamste resultate van hierdie studie te gee en om die bevindings dan met mekaar in verband te probeer bring. Dit is uiteraard 'n moeilike taak omdat slegs enkele aspekte uit die wye studiegebied van respiratoriese metabolisme uitgevoer is en die literatuur daarvoor diepgaande en omvattend is.

Vir die interpretering van die verloop van respiratoriese metabolisme, is 'n kennis van die suurstofopname van die sade noodsaaklik. Hiervoor is die data van Ybema (1983) gebruik. Op grond van hierdie data, is verskeie aannames en berekenings gemaak om enigszins 'n vrugbare bespreking oor die invloed van suurstof op die respiratoriese metabolisme van *Strelitzia juncea* sade te kan maak.

Die gegewe aannames en berekenings word vervolgens gegee (7.2) en dit word gevolg deur 'n oorsigtelike bespreking van die vernaamste bevindings vir dormante (7.3) en nie-dormante sade (7.4). Daarna word gepoog om die bevindings na aanleiding van onlangse literatuur met mekaar in verband te bring (7.5) en na 'n gevolgtrekking (7.6), word ten slotte 'n paar voorstelle gemaak oor aspekte wat nadere ondersoek regverdig.

7.2 BEREKENINGS

7.2.1 Suurstofopname van *Strelitzia juncea* sade

Uit Figuur 7 van Ybema (1983) is die volgende data verkry. Gemiddelde suurstofopnametempo vir dae 1 tot 4 is respektiewelik:

- vir lugsade: 6,0; 6,5; 7,0 en 6,5 $\text{mm}^3\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ droëmassa;
- vir suurstofsade: 10,0; 9,0; 8,5 en 8,5 $\text{mm}^3\text{h}^{-1}\text{g}^{-1}$ droëmassa.

Aannames:

Massa van 50 lugdroë sade: gemiddeld 4,5 g.

Varsmassa van 50 embryo's: gemiddeld 0,45 g.

Waargenome tempo op dag d geld ook vir die voorafgaande 24 uur periode.

Op grond van bogenoemde geld dat

$$q = \frac{\text{O}_2\text{-opnametempo vir dag d} \times 24 \times 4,5}{22,414}$$

waar q die totale hoeveelheid suurstof opgeneem as $\mu\text{mol} \cdot 50 \text{ sade}^{-1}$ vir die voorafgaande 24 uur periode gee.

7.2.2 Maksimum teoretiese hoeveelheid heksoses oksideerbaar

Vir die volledige oksidering van 1 μmol heksose, word 6 μmol suurstof benodig. Dus, maksimum hoeveelheid heksoses wat volledig deur suurstof oor 'n 24 uur periode geoksideer kan word: $q/6 \mu\text{mol} \cdot 50 \text{ embryo's}^{-1}$.

7.2.3 Maksimum teoretiese hoeveelheid ATP wat uit die volledige oksidasie van heksoses gevorm kan word

Die volledige oksidasie van 1 μmol heksose kan teoreties tot die sintese van 36 μmol ATP in plantselle aanleiding gee (Goodwin & Mercer 1983). Die maksimum hoeveelheid ATP wat oor 24 uur as gevolg van die opgeneemde suurstof uit heksoses gevorm kan word:

$$\begin{aligned} & \frac{36q}{6} \mu\text{mol ATP} \cdot 50 \text{ embryo's}^{-1} \\ & = \frac{6q \times 605}{10^6} \text{ g ATP} \cdot 50 \text{ embryo's}^{-1} \end{aligned}$$

maar varsmassa van 50 embryo's is 0,45 g, dus:

$$1 \text{ g embryo's kan } \frac{6q \times 605}{0,45 \times 10^6} \text{ g ATP oor 'n 24 uur periode sinteti-}$$

seer as gevolg van die opname van q μmol suurstof oor dieselfde tydperk.

7.2.4 Berekening van eksperimenteel-bepaalde afname in heksose-inhoud

Die D-glukose- en D-fruktose-inhoud van lugdroë embryo's is nie eksperimenteel bepaal nie, maar 'n geskatte waarde is soos volg deur berekening verkry.

Volgens Figuur 3.7 A is daar feitlik 'n reglynige afname in die glukose-inhoud van die embryo's oor die eerste vier inkuberingsdae. Volgens die lineêre regressievergelyking:

$$y = -5,610x + 27,750 \quad (n = 4; \quad r = -0,965)$$

waar x = inkuberingsdag en y = glukose-inhoud,

kan afgelei word dat die glukose-inhoud op dag 0 as $27,75 \mu\text{mol} \cdot 50 \text{emb.}^{-1}$ aanvaar kan word. Die verlies aan totale heksoses (glukose + fruktose) is bereken as $2 \times (27,75 - 16) \mu\text{mol} \cdot 50 \text{emb.}^{-1}$ oor die eerste 24 uur van inkubering.

7.2.5 Hoeveelheid suurstofopname wat teoreties vir *in vitro*-aktiwiteit van sitochroomoksidase benodig word

Veronderstel dat die cyt ox-aktiwiteit $s \text{ nmol} \cdot \text{min.}^{-1} \cdot 50 \text{emb.}^{-1}$ is. Dan sal oor 'n uur-periode

$$\frac{60 \text{ s}}{1000} \mu\text{mol cyt C} \cdot 50 \text{emb.}^{-1} \text{ geoksideer kan word.}$$

Dit sal tot 'n suurstofopname van $\frac{60 \text{ s}}{4000} \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$ lei, aangesien

2 cyt C-molekule deur 1 atoom suurstof geoksideer word. Die suurstofopnametempo wat dus met 'n bepaalde *in vitro* cyt ox-aktiwiteit verband hou, is dus

$$\begin{aligned} & \frac{60 \text{ s} \times 22,414}{4000} \text{ mm}^3 \text{O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot 50 \text{emb.}^{-1} \\ = & \frac{60 \text{ s} \times 22,414}{4000 \times 4,5} \text{ mm}^3 \text{O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ saad} \end{aligned}$$

Vir die data uit Figuur 5.11 B (p) kom dit vir inkuberingsdae 1 tot 4 op die volgende tempo's neer:

- lugsade: 8,6; 8,6; 7,8 en 7,8;
- suurstofsade: -; 9,3; 10,1 en $10,8 \text{ mm}^3 \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

7.3 VERNAAMSTE BEVINDINGS VIR DORMANTE SADE

Die beeld wat uit al die voorafgaande werk oor *Strelitzia juncea* sade kom, is dié van 'n dormante saad wat na alle waarskynlikheid die bekende glikolitiese en mitochondriale prosesse van "konvensionele" respirasie uitvoer. In die dormante sade neem die

ekwimolare hoeveelhede glukose en fruktose amper reglynig af met toenemende inkubering, waarskynlik weens toenemende benutting van 'n di-, tri- of tetrasakkaried vir respiratoriese prosesse. Hierdie groot afname in die oplosbare koolhidrate van die embryo's word nie as etanol of piruvaat teruggevind nie. Uit berekening van die beskikbare O₂-opname data (Ybema 1983) van sade, blyk dit dat die sade oor die vier inkuberingsdae gesamentlik rofweg 125 μmol suurstof. 50 emb.⁻¹ opgeneem het (Tabel 7.1), en dat dit voldoende is om slegs sowat die helfte van die waargenome afname in heksose-inhoud van die dormante sade se embryo's te verklaar.

Al die glikolitiese ensieme waarvoor bepaling uitgevoer is, was teenwoordig (PFK, PFP, PK, aldolase) en so ook die PP-weg ensieme (G6PDH, 6PGDH), en gesien die hoë ADH-aktiwiteit en etanolinhoud was die fermentatiewe aktiwiteit hoog. Moontlik is 50% van die heksosepoel aërobies en die ander 50% fermentatief gerespireer.

Soos vir ander saadsoorte tydens vroeë inkubering gevind is (oorsig deur Morohashi 1978), is daar weinig verandering in die glikolitiese ensiemaktiwiteit met tyd en is die mitochondriale aktiwiteit veel laer as die glikolitiese. Volgens Morohashi (1978) lei dit tot 'n oorvoorsiening van piruvaat sodat hierdie fase van 'n wanbalans tussen die glikolitiese en mitochondriale aktiwiteit gekenmerk word deur 'n hoë etanolfermentasie. Dit word gou opgevolg met 'n aërobiese fase waar tydens gisting afneem met toenemende inkubering. Die dormante sade van *Strelitzia juncea* verskil in die opsig want die ADH-aktiwiteit en etanolinhoud neem nie veel af oor die 4 inkuberingsdae nie. Van die mitochondriale fraksies het MDH_{mit} 'n toename met tyd getoon, maar vir SDH en cyt ox was daar nie 'n noemenswaardige toename nie. Die totale aktiwiteit van hierdie ensieme (bovloeistof + neerslag) het konstant gebly of afgeneem. Dit blyk dat die mitochondriale aktiwiteit van die dormante sade nie reageer soos verwag vir nie-dormante sade nie.

Ook wat die adenilaatmetabolisme betref, verskil die dormante embryo's van *S. juncea* sade met dít wat vir ander sade gevind is. Normaalweg is daar 'n groot toename in die adenilaatpoel en die ATP-inhoud, maar vir die dormante *S. juncea* sade was daar slegs 'n klein toename in hierdie parameters. Ook die AEC-waardes was relatief laag (0,59 minimum tot 0,73 maksimum) en strook nie met waardes van $\geq 0,8$ wat vir aktief-metaboliserende weefsel verwag word nie.

7.4 VERNAAMSTE BEVINDINGS VIR DORMANSIEVERBREKING DEUR SUURSTOF

Alhoewel die suurstofopnametempo van suurstofsade van *Strelitzia* spp. volgens die data van Van de Venter (1974) en Ybema (1983) uiters ca $4 \text{ mm}^3 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ hoër as dié van lugsade is, is die algemene respiratoriese aktiwiteit van die *S. juncea* sade waarvan die dormansie deur suurstof opgehef is, oor die algemeen hoër as dié van die dormante sade.

In die embryo's van nie-dormante sade kom ook 'n ekwimolare hoeveelheid glukose en fruktose voor wat met toenemende inkubering dieselfde profiel as vir dormante sade lewer. Die hoeveelheid heksoses wat oor die eerste 24 uur "verdwyn" het, is meer as wat deur die totale hoeveelheid suurstof opgeneem oor dieselfde periode verklaar kan word (Tabel 7.1). Oor die vier dae gesien, is daar dieselfde verlies in heksoses as by die embryo's van dormante sade, maar 'n groter persentasie daarvan is aan volledige oksidering deur suurstof toe te skryf. Die verlies in heksoses oor die eerste 24 uur is egter so groot dat slegs 34% daarvan deur suurstof geoksideer kon word. Indien die aanname geldig is dat die afname in heksoses as gevolg van respiratoriese aktiwiteit is, moes 'n hoë mate van fermentasie ook in die embryo's van nie-dormante sade plaasgevind het. Alhoewel die etanol- en piruvaatinhoud geneig het om effens laer te wees as by die embryo's van dormante sade, was die ADH-aktiwiteit hoog.

Wat die glikolitiese aktiwiteit betref, is slegs die PFK- en PFP-ensiemaktiwiteite effens hoër as vir die embryo's van dormante sade, maar daar is ook geen opvallende stygende tendens

Tabel 7.1 Suurstofopname van *Strelitzia juncea* sade en implikasies wat dit teoreties vir oksidering van heksoses en vir ATP-sintese in die embryo's inhou^a

Suurstofopname van sade, teoreties berekende parameters daaruit en eksperimenteel bepaalde heksose-inhoud van embryo's							
Saad-behan- deling	Eerste 24 uur van saadinkubering				Totaal vir eerste 4 dae van saadinkubering		
	Suurstof- opname	Maksimum hek- soses vol- ledig oksi- deerbaar	Heksoses eks- perimenteel geoksideer	Maksimum ATP produ- seerbaar per massa embryo's	Suurstof- opname	Maksimum heksoses volledig oksi- deerbaar	Heksoses eksperi- menteel geoksi- deer
	($\mu\text{mol}.50\text{sade}^{-1}$)	($\mu\text{mol}.50\text{emb}^{-1}$)	($\mu\text{mol}.50\text{emb}^{-1}$)		($\mu\text{mol}.50\text{sade}^{-1}$)	($\mu\text{mol}.50\text{emb}^{-1}$)	($\mu\text{mol}.50\text{emb}^{-1}$)
Lug	28,9	4,8	7,5	0,23	125,3	20,9	42,5
Suurstof	48,2	8,0	23,5	0,39	173,5	28,9	39,5

a : Berekeningsprosedures en aannames is onder 7.2 uiteengesit

met toenemende inkubering nie. Die PP-weg ensieme G6PDH en 6PGDH toon 'n profiel wat verskil van dié vir die embrio's van dormante sade; die aktiwiteite is hoër en styg met toenemende inkubering, alhoewel die verhouding tussen die twee ensiemaktiwiteite ook by die nie-dormante sade 3 is. Interessant is dat die MDH_{cyt} -aktiwiteit wat alreeds so hoog in die embrio's van dormante sade is, tydens dormansie-opheffing nóg hoër is.

'n Belangrike waarneming is dat die totale cyt ox-aktiwiteit (alle fraksies saam) 'n goeie reglynige toename met toenemende inkubering toon en in teenstelling met die ander mitochondriale ensieme SDH en MDH, duidelik van die situasie vir embrio's van dormante sade verskil.

Die adenilaatmetabolisme van embrio's van die nie-dormante sade verskil grootliks van dié van dormante sade, en relatief gesproke is dit by verre die grootste verskil wat as gevolg van dormansieverbreking deur suurstof waargeneem kon word. Die ATP-inhoud en adenilaatpoel het reglynig toegeneem en meer as verdubbel, terwyl die AEC-waarde tussen 0,78 en 0,89 gewissel het.

Op grond van die waarnemings wat oor die respiratoriese metabolisme van *S. juncea* sade gemaak is, kan gepostuleer word dat die dormansieverbrekende proses(se) alreeds binne 24 uur van suurstof-inkubering voorkom. Reeds na een dag van inkubering is die volgende as gevolg van suurstofinkubering waargeneem: 'n hoër ATP-inhoud en adenilaatpoel; 'n laer etanol-, glukose- en fruktose-inhoud; 'n hoër G6PDH-, 6PGDH-, PFK- en PFP-aktiwiteit. 'n Ander moontlikheid is natuurlik dat die vroeë verandering lei tot die oploop na 'n bepaalde situasie wat dan tot dormansieverbreking lei.

7.5 ENKELE INTERPRETASIES OOR DIE RESPIRATORIESE METABOLISME EN DORMANSIEVERBREKING DEUR STRELITZIA JUNCEA SADE

Die toename in sekere ensiemaktiwiteite as gevolg van dormansieverbreking deur suurstof, kan eerstens aan 'n verhoging in die

ensiemkonsentrasie toegeskryf word; die problematiek en aannames waarop so 'n afleiding gebaseer is, is reeds onder 2.6, p 18 bespreek. So 'n toename sou die translasie van reeds bestaande mRNA kon behels. Die toename in α -amilase-aktiwiteit soos deur Ybema *et al.* (1984) gevind, sou ook deur 'n toename in ensiemkonsentrasie verklaar kon word, maar die daaropvolgende afname in aktiwiteit met die terugplaas van die sade vanaf suurstof- na lugatmosfeer, laat die vermoede ontstaan dat die α -amilase-aktiwiteit moontlik deur reguleerdermolekule beheer word en dat laasgenoemde weer deur suurstof beïnvloed word. Volgens 'n onlangse oorsig (Turner & Turner 1980) blyk dit egter dat α -amilase nie 'n allosteriese ensiem is nie. In hierdie studie was daar in die paar ondersoekte gevalle nie sterk aanduidings van aktiveerders of remstowwe wat vir die verskille in aktiwiteit verantwoordelik kan wees nie.

'n Tweede moontlike verklaring vir die hoër ensiemaktiwiteit is dié van ensiemaktivering. Volgens Mayer (1977): "Activation of enzymes is that process which leads to the appearance of enzyme activity in the absence of protein synthesis, water uptake being a necessary but insufficient requirement for the process." Die opvallende toename in bv. die totale cyt ox-aktiwiteit as gevolg van suurstofinkubering kan dus verklaar word as die aktivering van reeds bestaande cyt ox in die embrionelle.

Wat sou die onderliggende implikasie daarvan wees dat veral die twee PP-weg ensieme en die cyt ox-aktiwiteit toeneem tydens dormansieverbreking; dat die ATP-inhoud en adenilaatpoel grootliks styg en dat 'n hoër ADH-aktiwiteit gehandhaaf word? In die hieropvolgende bespreking word gepoog om bogenoemde waarnemings in verband met mekaar te bring.

Die opvallende toename in die cyt ox-aktiwiteit as gevolg van suurstofinkubering het bepaald die implikasie dat daar 'n verhoogde suurstofopnametempo en gepaardgaande ATP-sintese in die kiemingsgeïnduseerde embryo's moet wees. Deur berekenings kan

aangetoon word dat die *in vitro* waargenome toename in cyt ox-aktiwiteit (Figuur 5.11 B, p 137), tot 'n suurstofopnametempo sal aanleiding gee wat, onder normale gebruikstoestande vir sade, bo die sensitiwiteitsvlak ($ca\ 0,220\ \mu\text{mol.O}_2\cdot\text{h}^{-1}$) van die Gilson-respirometer lê (kyk 7.2.5, p 192 vir berekenings). Daar is natuurlik geen noodwendige verband tussen *in vitro* en *in vivo* aktiwiteit nie (Butterworth 1983), maar op grond van die voorafgaande *in vitro* waardes vir cyt ox-aktiwiteit, is dit nie verbasend dat Van de Venter (1974) & Ybema (1983) nie opvallende verskille in suurstofopnametempo tussen lug- en suurstofgeïnkubeerde sade kon vind nie.

Wat die verband tussen suurstofopnametempo en ATP-sintese betref, is deur berekenings aangetoon (Tabel 7.1, p 195) dat met glukose as substraat die suurstofopnametempo oor die eerste dag van inkubering hoogstens 'n waarde van 0,4 vir die verhouding: (totale massa ATP teoreties gesintetiseer oor 24 uur)/(massa embryo's) kan gee wat kleiner ($5/0,4 = 12,5$) is as vir metaboliese aktiewe weefsel soos wortelgroeipunte. Dit is 'n heel aanvaarbare bevinding as in ag geneem word dat 'n groot gedeelte van die embriomassa waarskynlik deur reserwestowwe in beslag geneem word en dat wortelgroeipunte hoë mitotiese aktiwiteit het wat na alle waarskynlikheid nie by embryo's tydens vroeë inkubering van sade voorkom nie. Die relatief lae suurstofopnametempo van die suurstofgeïnkubeerde sade kan dus voldoende wees om 'n redelik-aanvaarbare omslaggetal vir ATP in die embryo's te gee, en die waargenome toename in cyt ox-aktiwiteit kan groot belang hierby hê.

Nogtans is die moontlikheid sterk dat daar ATP-sintese buite-om die suurstofgekoppelde volledige oksidasie van glukose via glikolise, die Krebs-siklus en elektronoordragstelsel plaasvind; die moontlikheid dat al die opgeneemde suurstof slegs vir oksidatiewe fosforilering in die embryo's gebruik word en dat 'n P/O-verhouding van 3 tydens vroeë inkubering geld, is skraal.

Die ander moontlike bron van ATP-sintese is dan via glikolise en etanolfermentasie en die hoë ADH-aktiwiteit en etanolinhoud van

die *S. juncea* embrio's hou moontlik hiermee verband. Hoë AEC-waardes kan wel met hoë fermentatiewe aktiwiteit gepaard gaan (Pradet & Raymond 1984). Die waargenome afname in heksose-inhoud oor die eerste 24 uur wat nie aan oksidering deur suurstof toegeskryf kan word nie, is $23,5 - 8,0 = 15,5 \mu\text{mol} \cdot 50 \text{ emb.}^{-1}$ (Tabel 7.1) wat slegs $31 \mu\text{mol ATP} \cdot 50 \text{ emb.}^{-1}$ kan lewer via glikolise en fermentasie. Dit is natuurlik moontlik dat die werklike verlies aan heksoses veel groter is as wat bereken is. Nog 'n moontlikheid is dat die suurstof vir die oksidasie van asetiel-koënsiem A van lipiedafbraak gebruik is en dat al die beskikbare heksoses gefermenteer is. Uit die gegewens wat vir *S. juncea* ingewin is, is dit dus nie moontlik om af te lei wat die kwantitatiewe bydrae van etanolfermentasie tot die ATP-produksie is nie, en die stelling van Raymond & Pradet (kyk motto vir hoofstuk 7) is ook op hierdie studie van toepassing.

Die fermentering van glukose na etanol lei nie net tot ATP produksie nie, maar dit word algemeen aanvaar (Goodwin & Mercer 1983) dat fermentasie die voordeel het dat dit onder hipoksiese toestande die terugoksidering van NADH na NAD moontlik maak waardeur 'n hoë glikolisetempo gehandhaaf kan word. Dit is ook as die rede vir die hoë etanolfermentasie van *Echinochloa crus-galli* onder anaërobiese aangewys (Rumpho & Kennedy 1983).

Hoë ADH-aktiwiteit kan ook die oksidering van etanol impliseer en dit kan 'n verklaring bied vir die laer etanolinhoud van die nie-dormante sade. Etanoloksidering geskied altyd deur bemiddeling van ADH en met die vorming van asetaldehid; laasgenoemde word dan deur asetaldehiddehidrogenase na asetaat geoksideer en die asetaat word vir die sintese van verskeie organiese sure gebruik (Cossins 1978). In die geval van *Pisum sativum* sade is die etanol na organiese sure soos sitraat, isositraat en malaat gemetaboliseer, maar in vetryke weefsel soos *Ricinus communis* endosperm is dit eers hoë konsentrasies malaat wat ontstaan het voordat suikers daaruit gevorm is (Cossins 1978). Vir *Echinochloa crus-galli* het Rumpho & Kennedy (1983) gevind dat die asetaat wat uit etanol ontstaan onder anaërobiese toestande na lipiede toe

gemetaboliseer word en dat karboksilering deur CO_2 ook by etanol-metabolisme betrokke is.

Dit blyk uit bogenoemde dat daar 'n sterk verband tussen etanol-oksidering en die organiese-suur metabolisme is. Moontlik bied dit 'n verklaring vir die goeie reglynige verband tussen die ADH- en MDH_{cyt} -aktiwiteite wat vir *Strelitzia juncea* embrio's gevind is (Figuur 3.5, p 60). Die laer CO_2 -vrystelling wat Ybema (1983) vir die dormansieverbreekte sade gevind het, mag moontlik eerder met 'n hoër karboksileringsaktiwiteit as met 'n laer fermentasie-tempo verband hou. Hierby moet egter in gedagte gehou word dat die reglynige verband tussen ADH- en MDH_{cyt} -aktiwiteit vir die embrio's van sowel dormante as nie-dormante sade geld.

McMannon & Crawford (1971) het 'n reaksieskema vir die gelyktydige ophoping van malaat en etanol onder anoksiese toestande voorgestel waardeur 'n hoër MDH_{cyt} - en ADH-aktiwiteit te wagte kan wees, maar Davies (1980) het die funksionering van so 'n reaksieskema as onwaarskynlik beskou omdat dit nie tot 'n netto ATP-sintese kan lei nie.

Een gevolg van die oksidering van etanol na asetaat is dat dit tot die vorming van NADH sal aanleiding gee sodat laasgenoemde weer geoksideer sal moet word. Onder anaërobiese toestande mag dit 'n probleem skep vir die handhawing van die korrekte redoks-balans van NADH/NAD.

Die vraag ontstaan of die hoër ADH-aktiwiteite van *S. juncea* embrio's gesien moet word as 'n aanduiding van 'n hoër glikolise-aktiwiteit met gepaardgaande etanolvorming waardeur NADH weer geoksideer word, en of die hoër ADH-aktiwiteit verband hou met etanoloksidering. Dat ADH-isoënsieme met verskillende kinetiese eienskappe wel in plante voorkom, is reeds bespreek (3.2.2.5, p 31), maar sover bekend is ADH nie in organelle gekompartementaliseer nie. Moontlik hou die voorkoms van 'n ADH-remstof gekoppel aan die endoplasmiese retikulum (Shimomura & Beevers 1983b) verband met die regulering van ADH vir etanolsintese of etanoloksidering.

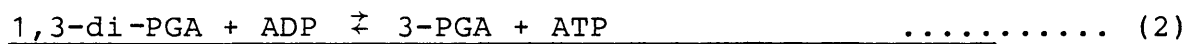
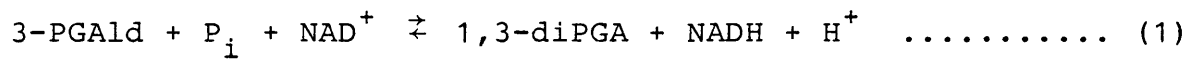
Shimomura & Beevers (1983a) het juis gevind dat die remstof onder aërobiese toestande sy uitwerking toon. Geen verskil in die ADH-aktiwiteit of die inwerking van 'n ADH-remstof kon tussen die lug- en suurstofbehandelde *S. juncea* sade se embryo-ekstrakte gevind word nie. Die probleem is dat die embryo's tydens verwydering aan lugatmosfeer blootgestel word wat moontlik 'n invloed op die ADH-remstof kon gehad het. Geen gevolgtrekking oor die rol van ADH of 'n ADH-remstof in die vorming of oksidering van etanol in suurstofbehandelde *S. juncea* sade kan uit hierdie studie met ru-ekstrakte gemaak word nie.

'n Bespreking van die vernaamste aspekte soos by die aanvang van hierdie bespreking onder 7.3 uiteengesit, is gegee. Die toename in die G6PDH- en 6PGDH-aktiwiteite moet nog onder bespreking kom.

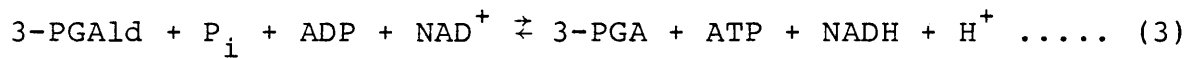
Onder 4.5 (p 87) is reeds daarop gewys dat die toename in G6PDH- en 6PGDH-aktiwiteite sou kon inpas by Roberts se hipotese maar nie as 'n bevestiging daarvan gesien kan word nie. Die moontlike rol van die PP-weg in die sintese van D-ribose-5-fosfaat vir adenilaatsintese is reeds toegelig (6.4.4, p177). Nog 'n belangrike funksie is die redoksreaksies waarby NADP betrokke is.

Tans geldende sienings is dat die reaksiesisteme in die sel nie ver weg van ewewig funksioneer nie: "... one must assume that these enzymes generate glycolytic and gluconeogenic fluxes from perturbations which probably represent less than 10% deviations from equilibrium" (Achs *et al.* 1971 volgens Anderson 1974). Benewens die feit dat reaksies by naby-ewewig toestande funksioneer, is twee ander belangrike aspekte van sellulêre metabolisme van belang, nl. die handhawing van homeostase en gevolglik van die verhoudings van $(\text{NAD})/(\text{NADH})$; $(\text{NADP})/(\text{NADPH})$; $(\text{ATP})/(\text{ADP}) \cdot (\text{P}_i)$ en pH (Davies 1984). Hierdie verhoudings word gehandhaaf deurdat die betrokke metaboliete deur middel van reaksies met ander intermediêre metaboliete aan mekaar gekoppel is. So byvoorbeeld is die $(\text{NAD})/(\text{NADH})$ -verhouding en die adenilaatverhouding gesamentlik afhanklik van die aktiwiteit van gliseraldehyd-3-fosfaat-dehidrogenase en 3-fosfogliseraatkinase (Davies 1984).

Waar hierdie outeur 'n verband gelê het tussen (piruvaat), (laktaaat), (NADH)/(NAD) en adenilaatverhoudings, kan op grond van sy redenasie soortgelyke verbande afgelei word waarin etanol in plaas van laktaat konfigureer:



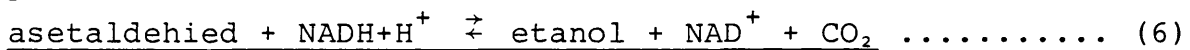
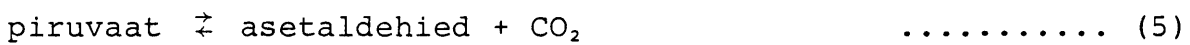
Somreaksie:



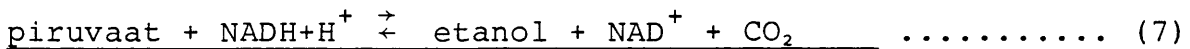
Die ewewigskonstante (K_{eq}^{\sim}) by 'n bepaalde pH is vir (3):

$$K_{eq}^{\sim} = \frac{(3\text{-PGA})(\text{ATP})(\text{NADH})}{(3\text{-PGald})(P_i)(\text{ADP})(\text{NAD}^+)} \dots\dots\dots (4)$$

Verder:



Somreaksie:



Die ewewigskonstante ($K_{eq}^{\sim\sim}$) by 'n bepaalde pH is vir (7):

$$K_{eq}^{\sim\sim} = \frac{(\text{etanol})(\text{NAD}^+)(\text{CO}_2)}{(\text{piruvaat})(\text{NADH})} \dots\dots\dots (8)$$

Uit (4) volg dat:

$$K_{eq}^{\sim} \times \frac{(3\text{-PGald})}{(3\text{-PGA})} = \frac{(\text{NADH})}{(\text{NAD}^+)} \times \frac{(\text{ATP})}{(\text{ADP})(P_i)} \dots\dots\dots (9)$$

en uit (8) en (9) volg dat:

$$K_{eq}^{\sim} \cdot K_{eq}^{\sim\sim} \times \frac{(3\text{-PGald})}{(3\text{-PGA})} = \frac{(\text{etanol})(\text{CO}_2)}{(\text{piruvaat})} \times \frac{(\text{ATP})}{(\text{ADP})(P_i)} \dots\dots\dots (10)$$

Dit volg (kyk (9) en (10), dat die adenilaatverhoudings en die (NADH)/(NAD)-redokssisteem aan mekaar en verskeie metaboliese konsentrasies gekoppel is. Volgens Anderson (1974) en soos deur Davies (1984) toegelig, kan 'n klein persentasieverandering in die konsentrasie van 'n metaboliet soos ATP met 'n klein poel, 'n klein persentasieverandering (maar 'n groot verandering in konsentrasie) van 'n gekoppelde metaboliet met 'n groot metaboliese poel veroorsaak. Die omgekeerde sal ook waar wees.

Uitdrukking (10) bevat verskeie parameters wat in hierdie studie bepaal is, soos die konsentrasies van piruvaat, etanol, ATP en ADP. Ander inligting om sinvolle afleidings te kan maak, ontbreek egter; die adenilaat- en NAD-redoksverhoudings hou waarskynlik ook met heelwat ander metabolietverhoudings verband. Die kompleksiteit van die situasie blyk uit die wiskundige modelle wat deur Heinrich & Rapoport (1974a, b) en Rapoport (1974) beskryf is.

In die inleiding tot hierdie studie (kyk 1.1, p 3) is daarop gewys dat sade van *Erythrina caffra* 'n vyfvoudige verhoging in suurstofopnametempo getoon het na die opheffing van hardskaligheid. *Strelitzia juncea* sade handhaaf 'n lae suurstofopnametempo; inkubering in suurstof lei tot amper 'n verdubbeling in die gemiddelde opnametempo; daar is egter redelike variasie om die gemiddeldes en dieselfde profiel van 'n feitlik konstante suurstofopnametempo oor die eerste vier inkuberingsdae word vir sowel dormante as suurstofbehandelde sade verkry. Suurstofbehandeling lei allermens tot 'n opvallende verandering in die profiel vir suurstofopnametempo. Nogtans kan die verhoogde suurstofopnametempo voldoende wees om die verhouding tussen sekere metabolietkonsentrasies sodanig te verander dat 'n gunstige verhouding van (NADH)/(NAD), (NADPH)/(NADP) en adenilaatverhoudings verkry word waardeur 'n gewenste homeostase vir die kiemingsproses bereik kan word. Op hierdie stadium is dit nie moontlik om te voorspel hoedanig die verhoging in suurstofopnametempo of wat die gewenste konsentrasieverhoudings vir kieming moet wees nie.

In hierdie studie is gevind dat die adenilaatverhoudings (as AEC uitgedruk) reeds op dag 1 van inkubering "gunstig" was, met ander woorde wat vir metaboliese aktiewe weefsel verkry word. Suurstofopname en fermentasie by dormante sade was nie voldoende om hierdie gunstige verhouding te kry nie. Davies (1984) wys daarop dat daar geen rede is waarom slegs AEC-waardes soveel aftrek in die literatuur kry nie; die verskillende kardinale "klein-poel" metaboliete is immers aan mekaar "gekoppel" soos reeds bespreek en die (NADH)/(NAD)- of (NADPH)/(NADP)-verhoudings is eweneens belangrik.

Die slotsom waartoe daar in hierdie studie geraak word, is dat die verhoging in suurstofopnametempo voldoende was om 'n algemene verhoging in die respiratoriese metabolisme van die suurstof-behandelde *S. juncea* sade moontlik te maak en dat dit tot gunstige verhoudings van die adenilate en sekere koënsieme soos NADH en NADPH gelei het. Waarskynlik het die suurstof opgetree as eindontvanger van elektrone tydens oksidatiewe fosforilering en hou dit verband met die verhoogde cyt ox-aktiwiteit van die embryo's.

Die ander moontlike invloed wat suurstof op dormansie-opheffing kan hê (kyk 1.1, p 4) naamlik die oksidering van 'n remstof, is nie in hierdie studie ondersoek nie. 'n Waterige ekstrak van die endosperm en testa het geen invloed op die aktiwiteit van ADH, G6PDH, 6PGDH of PFK gehad nie.

7.6 GEVOLGTREKKING

Dormansieverbreking van *Strelitzia juncea* sade deur suurstof-behandeling lei tot 'n verhoging in die respiratoriese aktiwiteit van die embryo's. Vir sommige ensiemaktiwiteite is daar geen of weinig verhoging in aktiwiteit met toenemende inkuberingstyd as gevolg van suurstofbehandling bv. ADH, aldolase, PK, MDH_{cyt}, PFK en PFP. Ander ensieme soos sitochroomoksidase, G6PDH en 6PGDH toon egter 'n duidelike toename in aktiwiteit. 'n Hoër adenilaatverhouding (AEC-waarde) word as gevolg hiervan verkry

en die metabolisme van die embryo's is gevolglik gunstig vir kieming. Die dormante sade is waarskynlik nie in staat om soortgelyke gunstige adenilaatverhoudings deur middel van fermentasie en die beperkte suurstofopname te verkry nie.

7.7 VOORSTELLE VIR OPVOLGSTUDIES

'n Belangrike aspek wat ondersoek behoort te word, is of die addisionele suurstofopname van die sade as gevolg van suurstof-inkubering, wel vir oksidatiewe fosforilering bestem is of nie. Die antwoord hierop sal uitsluitel kan gee oor die volgende aspekte:

Oksidering van 'n remstof;
bron van ATP;
rol van verhoogde cyt ox-aktiwiteit.

Die gevraagde inligting sal hopelik deur die toediening van metaboliese remstowwe en die bestudering van intakte mitochondrions verkry kan word.

'n Studie behoort ook onderneem te word oor metodes om die behoorlike indringing van toegediende stowwe in die saad te verseker.

Die toepaslikheid van die gebruik van (ATP)/(ADP)-verhoudings as 'n maatstaf van die kritiese suurstofdruk vir respirasie (Saglio *et al.* 1983, Saglio *et al.* 1984), behoort vir *S. juncea* sade ondersoek te word. Heelwat meer bruikbare inligting oor die metabolisme van dormante sade voor en na dormansieverbreking sal verkry kan word deur die konsentrasievlakke van sleutelmetaboliete te bepaal.

Strelitzia juncea sade het bepaalde voordele vir die bestudering van dormansie. Die embryo's is relatief groot en maklik om te hanteer. Die dormansieverbreking het 'n duidelike uitwerking op saadmetabolisme voor radikulaverskyning en laasgenoemde proses

neem eers na 5 dae van inkubering 'n aanvang. Prosesse wat by die veelbestudeerde saad van *Pisum sativum*, *Phaseolus mungo* en andere binne 24 uur afspeel, strek in die geval van *Strelitzia spp.* se sade blykbaar oor 'n paar dae.

Volgens die insig wat met hierdie studie verwerf is, wil dit op hierdie stadium blyk dat volstaan kan word met Nikolaeva (1969) se gevolgtrekking dat "The available data indicate that dormant seeds do not possess a qualitatively peculiar type of respiration."

HOOFSUK 8OPSOMMING/SUMMARY, DANKBETUIGINGS, CURRICULUM VITAE EN
LITERATUURLYS

8.1 (a)	OPSOMMING	208
8.1 (b)	SUMMARY	211
8.2	DANKBETUIGINGS	214
8.3	CURRICULUM VITAE	216
8.4	LITERATUURLYS	218

8.1 OPSOMMING/SUMMARY(a) OPSOMMING

Invloed van rusverbreking deur suurstof op sekere aspekte van die respiratoriese metabolisme van saad van *Strelitzia juncea*.

Leier: Prof. H.A. van de Venter
 Medeleier: Prof. J.G.C. Small
 Departement: Plantkunde
 Graad: M.Sc. (Plantfisiologie)
 Aanvangsdatum: April 1983

Inkubering van *Strelitzia juncea* sade in 'n 100% suurstofatmosfeer by 25°C, hef die saaddormansie op en kieming begin op die 5de inkuberingsdag 'n aanvang neem. Embrio's is op bepaalde inkuberingstye uit die sade verwyder vir die bereiding van ru-ekstrakte waarvan sekere respiratoriese ensiemaktiwiteite en metabolietkonsentrasies bepaal is. Sodoende is 'n vergelyking tussen die respiratoriese aktiwiteit van suurstofbehandelde sade en lugbehandelde sade (sade in lugatmosfeer by 25°C) getref. Dit blyk dat reeds oor inkuberingsdae 1 tot 4 die suurstofbehandelde sade 'n hoër respiratoriese aktiwiteit het, soos uit die volgende bespreking sal blyk.

Wat die glikolitiese ensiemaktiwiteite betref, is die aktiwiteit van fosfofruktokinase (PFK) en anorganiese pirofosfaat:D-fruktose-6-fosfaat:1-fosfotransferase (PFK) effens hoër as gevolg van die suurstofbehandeling. Aldolase- en piruvaatkinase-aktiwiteit kom in die embrio's voor, maar is nie hoër in die embrio's van suurstofbehandelde sade nie. Alkoholdehidrogenase (ADH)- en sitosoliese malaatdehidrogenase (MDH_{cyt})-aktiwiteit is vir sowel die lug- as suurstofbehandeling dieselfde. Die D-glukose-, D-fruktose-, etanol- en piruvaatinhoud van die embrio's neig om effens laer te wees as gevolg van suurstofbehandeling van die sade. Op die eerste dag van saadinkubering is die glukose-, fruktose- en etanolinhoud

duidelik laer vanweë die suurstofbehandeling. Die glukose- en fruktose-inhoud is feitlik dieselfde vir beide behandelings. Die gevolgtrekking word uit die beskikbare data gemaak dat suurstofbehandeling waarskynlik nie 'n groot toename in glikolitiese aktiwiteit van die embryo's veroorsaak nie en dat fermentatiewe aktiwiteit feitlik dieselfde vir die twee handelings is.

'n Duidelike verhoging in die aktiwiteit van die twee pentose-fosfaatwegensieme D-glukose-6-fosfaatdehidrogenase (G6PDH) en 6-fosfoglukonaatdehidrogenase (6PGDH) is oor inkuberingsdae 1 tot 4 vir die embryo's van suurstofbehandelde sade te bespeur. Die verhoging in aktiwiteit is egter sodanig dat die verhouding van 6PGDH/G6PDH steeds *ca* 3 is. Hierdie resultate sou kon inpas by Roberts se hipotese vir die meganisme van dormansieverbreking van sade.

Mitochondriale fraksies besit suksinaatdehidrogenase (SDH)-, malaatdehidrogenase (MDH_{mit})- en sitochroomoksidase (cyt ox)-aktiwiteit. Die cyt ox-aktiwiteit is in die geval van suurstofbehandeling duidelik hoër as dié van die lugbehandeling en toon 'n reglynige toename met inkuberingstyd. Die nie-mitochondriale fraksies besit ook cyt ox-aktiwiteit wat aan die teenwoordigheid van buitemitochondriale cyt ox-aktiwiteit *in vivo* of aan mitochondriale breking toegeskryf kan word. Die totale cyt ox-aktiwiteit styg met toenemende inkuberingstyd wat die embryo's van suurstofbehandelde sade betref, maar nie in die geval van lugbehandelde sade nie. In sowel die mitochondriale as die nie-mitochondriale fraksies kom 'n skynbare SDH-reaksie voor wat die bepaling van die werklike SDH-aktiwiteit bemoeilik. Die SDH-ensiem van embryo's van die suurstofbehandelde sade is in 'n groter mate gedeaktiveer as in die geval van lugbehandelde sade. Aktivering word bewerkstellig deur "hoë"-temperatuur inkubering van die ekstrakte in die teenwoordigheid van suksinaat.

Die opvallendste gevolg van suurstofinkubering van die sade, is dat die adenosientrifosfaat (ATP)-inhoud en die totale adenilaatpoel van die embryo's reglynig toeneem om na vier dae inkubering tweemaal hoër as dié van die lugbehandelde sade te wees. Die adenilaatenergielading (AEC) is as gevolg van die suurstofbehandeling hoog ($\geq 0,8$) terwyl dit vir die lugbehandeling laag ($\leq 0,7$) is. Veral na 1 dag van inkubering is die AEC-waarde vir die lugbehandeling opvallend laag.

In 'n samevattende bespreking word gespekuleer dat die suurstof-behandeling 'n effens groter vloed deur die bestaande respiratoriese weë veroorsaak wat tot 'n toename in die fisiologies belangrike verhoudings (NADH)/(NAD) en (ATP)/ADP (P) lei en dat kieming daardeur geïnduseer kan word.

8.1(b) SUMMARY

The effect of dormancy release by oxygen treatment on certain aspects of the respiratory metabolism of *Strelitzia juncea* seeds.

Supervisor: Prof H.A. van de Venter
Co-supervisor: Prof J.G.C. Small
Department: Botany
Degree: M.Sc. (Plant Physiology)
Commencement: April 1983

Strelitzia juncea seeds are released from dormancy by incubation of the seeds in 100% oxygen at 25°C; germination commences on the fifth day of incubation. After incubation of the seeds for various periods, embryos were removed from the seeds and used for the preparation of crude extracts for the determination of the activity of specific respiratory enzymes and metabolite concentrations. Results were compared with similar determinations made on extracts of the embryos of seeds which were air-incubated at 25°C. Comparisons led to the conclusion that embryos of the oxygen treated seeds have a higher respiratory activity than those of air-treated seeds.

The glycolytic enzymes phosphofructokinase (PFK) and inorganic pyrophosphate:D-fructose-6-phosphate:1-phosphotransferase (PFP), exhibited only slightly higher activity in response to oxygen treatment of the seeds. Although aldolase and pyruvate kinase (PK) activity could be demonstrated, the activity was not influenced by oxygen treatment. A similar conclusion was drawn as regards the activity of alcohol dehydrogenase (ADH) and cytosolic malate dehydrogenase (MDH_{cyt}). The D-glucose, D-fructose, ethanol and pyruvate content of embryos of oxygen treated seeds was slightly lower than that of air-treated seeds. On the first day of incubation however, there was a definite decline in the content of glucose, fructose and ethanol as a result of oxygen incubation. Within each treatment, the glucose and fructose contents were remarkably similar. The

conclusion drawn from the above observations is that glycolytic activity of the embryos was only slightly enhanced following oxygen incubation of the seeds. Fermentative activity appears to be similar for the two incubation treatments.

The activity of the two pentose phosphate pathway enzymes D-glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PDH) and 6-phosphogluconate-dehydrogenase (6PGDH) extracted from embryos, showed a definite increase in activity over the first four days of seed incubation in oxygen. The ratio of 6PGDH/G6PDH was *ca* 3 for both treatments. The results are in accordance with the hypothesis for the mechanism of dormancy release put forward by Roberts.

Succinate dehydrogenase (SDH), malate dehydrogenase (MDH_{mit}) and cytochrome oxidase (cyt ox) activity were found in the mitochondrial fraction. Oxygen treatment of the seeds led to a significant increase in cyt ox activity of the embryos, and the increase was linear with respect to incubation time. Cyt ox activity was associated with the non-mitochondrial fraction as well, which can be ascribed to the occurrence of *in vivo* extramitochondrial activity in imbibing seeds, or to mitochondrial breakage during extraction. The total cyt ox activity increased with incubation time, but only in the case of oxygen treated seeds. Both the mitochondrial and non-mitochondrial fractions contained a pseudo-SDH reaction which complicated the determination of true SDH-activity. The SDH-enzyme of embryos from oxygen treated seeds was deactivated to a larger extent than that of air-treated seeds. Activation may be accomplished by "high" temperature incubation of the extracts in the presence of succinate.

The linear increase in the adenosine triphosphate (ATP) content and the total adenylate pool of the embryos with incubation time, led to a twofold increase in the value of these parameters, and is the most prominent consequence of oxygen incubation of the seeds. Oxygen incubation led to AEC values $\geq 0,8$, while AEC values for air treated seeds were $\leq 0,7$.

In conclusion, it is speculated that oxygen treatment causes a slightly higher flux through the existing respiratory pathways which leads to an increase in the physiological important parameters $(ATP)/(ADP)(P)$ and $(NADH)/(NAD)$, and initiates the germination process.

8.2 DANKBETUIGINGS

Verskeie persone en instansies het 'n aandeel aan die suksesvolle voltooiing van hierdie studie gehad en hulle bydrae word dankbaar erken. Benewens die ondersteuning van my familie en vriendekring, verdien veral die volgende persone spesiale vermelding:

Sonder befondsing en die beskikbaarstelling van apparaat deur die Margaretha Mes Instituut vir Saadnavorsing (Direkteur: Professor P.J. Robbertse, U.P.), sou hierdie studie nie moontlik gewees het nie.

Dit was 'n voorreg om onder leiding van die twee persone wat baanbrekerswerk op *Strelitzia spp.* gedoen het, te studeer. My mentor, professor J.G.C. Small, het my op die regte tydstip uit die akademiese vaarwater gehelp deur my 'n goeie projek aan te bied en my in die toepassing van ensimatiese bepalingstegnieke bekwame leiding te gee. Na sy vertrek, het professor H.A. van de Venter ingewillig om as leier op te tree en ek het baie gebaat by sy praktiese benadering en goeie oordeelsvermoë.

Professor P.J. Zietsman (Dekaan: Fakulteit Natuurwetenskappe), se vriendelike betrokkenheid en aanmoediging word dankbaar erken.

My kollegas in die departement Plantkunde het uiteraard 'n belangrike aandeel in die sukses van die studie. Die departementshoof, professor N. Grobbelaar, se inskerping tot 'n kritiese benadering in die wetenskap vind ook neerslag in hierdie studie. Sy aandeel is ook te bemerk in die goeie organisasie en infrastruktuur van die departement waarsonder so 'n studie moeilik uitvoerbaar sou wees. Mev. Orma Badenhorst het uitstekende tegniese hulp verleen. Dr. L.A. Coetzer het vrywilliglik sekere van my pligte oorgeneem waardeur heelwat navorsingstyd tot my beskikking gekom het. Ek het waardering vir sy onbaatsugtige vriendskap.

Professor J. Coetsee (Elektronmikroskopie-eenheid, U.P.), word in die besonder bedank vir die beskikbaarstelling van 'n rekenaar en gekoppelde grafiekstipper en dat hy my towys gemaak het in die gebruik daarvan.

Aan professor L. Visser en sy personeel (departement Biochemie), is dank verskuldig vir die gebruik van apparaat en vir vrugbare gesprekke.

Die personeel van die Nasionale Vakterminologiese diens was met die gebruik van die korrekte vakterme behulpsaam.

Mev. L. Meyer en mej. K. Schoeman was behulpsaam met die proefleeswerk en die bydrae van Philip Schoeman en sy gesin word dankbaar erken.

Ek het die voorreg gehad om die hulp van 'n baie bekwame tikster in die persoon van mev. L. Schoeman vir die tik van hierdie verhandeling te hê.

My moeder, Margrieta de Meillon, se opofferings oor die jare heen vir my akademiese loopbaan word dankbaar in herinnering geroep. Haar finansiële bydrae tot die totstandbrenging van hierdie manuskrip word dankbaar erken.

Tydens die verloop van die studie is ek goed deur my gesin ondersteun. Veral my vrou Rita, word bedank, nie net vir haar hulp met die voorbereiding van hierdie manuskrip nie, maar veral vir haar geduld en begripvolle bystand. Ek dra hierdie verhandeling aan haar op.

8.3 CURRICULUM VITAE

Stephanus de Meillon is op 28 Maart 1945 te Brakpan, Transvaal, gebore waar hy ook sy primêre opleiding by Brakpan-Oos Laerskool ondergaan het. In 1962 matrikuleer hy met eersteklas aan die Hoër Seunskool Stoffberg. Hy behaal die B.Sc-graad in 1965 aan die P.U. vir C.H.O. met Plantkunde en Chemie as hoofvakke. Aan die einde van 1966 skryf hy die B.Sc.Hons. (Plantbiochemie) by dieselfde universiteit af waarna hy in diens van die Departement van Landbou-tegniese Dienste tree en navorsing op *Striga asiatica* doen.

Vanaf 1968 tot 1972 was hy by die Navorsingsinstituut vir Tabak te Kroondal werksaam as 'n Vakkundige Beampte waar hy studies op die versuiping van tabak onderneem het. Vanaf 1972 tot 1974 was hy in diens van Inligting- en Navorsingsdienste (IND) van die WNNR waar hy literatuurondersoeke vir die Nasionale Instituut vir Waternavorsing (NIWN) onderneem het en ook verantwoordelik was vir die indeksering vir en uitgee van die maandblad "Current Literature on Water" (CLOW). Aan die einde van 1973 het hy die Hoër Diploma in Biblioteekkunde (HDB) deur deeltydse studie aan UNISA verwerf. Hy beskik ook oor 'n diploma in gaschromatografie van die Instituut vir Chromatografie (U.P.).

Gedurende 1974 is hy as lektor in die destydse Departement van Plantfisiologie en -biochemie, wat later by die Plantkunde-departement geïnkorporeer is, aangestel en is tans nog as dosent in die departement werksaam. Mnr. De Meillon is lid van die Suid-Afrikaanse Genootskap van Plantkundiges (SAGP), waarvan hy by verskeie geleenthede as ondervoorsitter, sekretaris en komiteelid van die plaaslike Noord-Transvaaltak gedien het. Hy is ook assessorlid van die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns, lid van die "International Weed Science Society" (IWSS) en is by die Suid-Afrikaanse Raad vir Natuurwetenskaplikes (SARN) as natuurwetenskaplike geregistreer. Hy het verskeie referate voor vakkundige verenigings gelewer en het enkele artikels/verslae geskryf.

Wat buitevakkundige bedrywighede betref, was hy oor die jare aktief by verskeie kerklike bedrywighede betrokke, beoefen hy bergklim, skaak en muurbal as stokperdjies of sosiale ontspanning en was hy vir 1969 die ope skaakkampioen van Rustenburg. Hy is in 1974 met Magrieta Gertruida van der Merwe getroud en hulle het drie kinders: Mariette (10), Stéfan (7) en Jaco (5).

8.4 LITERATUURLYS

- ACHS, M.J., ANDERSON, J.H. & GARFINKEL, D. 1971. *Comput. biomed. Res.* 4:65.
- ADKINS, S.W., GOSLING, P.G. & ROSS, J.D. 1980. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase of wild oat seeds. *Phytochemistry* 19: 2523-2525.
- ADKINS, S.W. & ROSS, J.D. 1981. Studies in wild oat seed dormancy 2. Activities of pentose phosphate pathway dehydrogenases. *Plant Physiol.* 68: 15-17.
- ADKINS, S.W., SIMPSON, G.M. & NAYLOR, J.M. 1984. The physiological basis of seed dormancy in *Avena fatua* 4. Alternative respiration and nitrogenous compounds. *Physiol. Plant.* 60: 234-238.
- AIKENS, D.A., BAILEY, R.A., MOORE, J.A., TOMKINS, R.P.T. & GIACHINO, G.G. 1978. Integrated experimental chemistry. Principles and techniques, Vol. 1, Allyn & Bacon, Boston.
- ANDERSON, J.H. (jnr.). 1974. Control of enzymatic velocity under near-equilibrium conditions. *J. theor. Biol.* 47: 153-161.
- ANDERSON, R.L. & SABULARSE, D.C. 1982. Inorganic pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate:1-phosphotransferase from mung bean. *Methods enzymol* 90: 91-97.
- ap REES, T. 1980. Assessment of the contributions of metabolic pathways to plant respiration. In: *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*, ed. Stumpf, P.K. & Conn, E.E. Vol. 2, Hfst. 1, Academic Press, New York.
- ARRIGONI, O. & SINGER, T.P. 1962. Limitations of the phenazine methosulphate assay for succinic and related dehydrogenases. *Nature (London)* 193: 1256-1258.
- ASHIHARA, H. & MATSUMURA, H. 1977. Changes in the activity and the function of the pentose phosphate pathway during germination of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. *Int. J. Biochem.* 8: 461-471.

- ATKINSON, D. 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7: 4030-4034.
- AUST, A., YUN, S-L. & SUELTER, C.H. 1975. Pyruvate kinase from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Methods enzymol* XLIIC: 176-182.
- BADENHORST, A.D. 1982. Invloed van rusverbreking deur suurstof op die dehidrogenase ensiemaktiwiteite van die pentosefosfaatweg. Honneurstaak, Dept. Plantkunde, Univ. van Pretoria.
- BAYSDORFER, C. & BASSHAM, J.A. 1984. Spinach pyruvate kinase isoforms. Partial purification and regulatory properties. *Plant Physiol.* 74: 374-379.
- BECKER, W.M., LEAVER, C.J., WERR, ELIZABETH M. & RIEZMAN, H. 1978. Regulation of glyoxysomal enzymes during germination of cucumber 1. Developmental changes in cotyledonary protein, RNA, and enzyme activities during germination. *Plant Physiol.* 62: 542-549.
- BERGMEYER, H.U. 1974a. Determination of enzyme activities. In: *Methods of enzymatic analysis*, red. Bergmeyer, H.U., 2de uitgawe, Vol. 1, Verlag Chemie, Weinheim.
- BERGMEYER, H.U. 1974b. *Methods of biochemical analysis*, 2de uitgawe, Vol. 1, Verlag Chemie, Weinheim.
- BERGMEYER, H.U. & BERNT, E. 1974. Malate dehydrogenase. U.V.-assay. In: *Methods of enzymatic analysis*, red. Bergmeyer, H.U., 2de uitgawe, Vol. 2, Verlag Chemie, Weinheim.
- BERGMEYER, H.U., GAWEHN, K. & GRASSL, MARIANNE. 1974. Enzymes as biochemical reagents. In: *Methods of enzymatic analysis*, red. Bergmeyer, H.U., 2de uitgawe, Vol. 1, Verlag Chemie, Weinheim.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1978. *Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Development, germination, and growth*, Vol. 1, Springer-Verlag, Berlin.

- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1982. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Viability, dormancy, and environmental control, Vol. 2, Springer-Verlag, Berlin.
- BIELESKI, R.L. 1964. The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Anal. Biochem.* 9: 431-442.
- BLANCHARD, J.S. 1984. Buffers for enzymes. *Methods enzymol.* 104: 404-414.
- BOMSEL, J.L. & PRADET, A. 1968. Study of adenosine 5'-mono-, di- and triphosphates in plant tissues IV. Regulation of the level of nucleotides, *in vivo* by adenylate kinase: theoretical and experimental study. *Biochim. Biophys. Acta* 162: 230-242.
- BONZON, M., HUG, M., WAGNER, E. & GREPPIN, H. 1981. Adenine nucleotides and energy charge evolution during the induction of flowering in spinach leaves. *Planta* 152: 189-194.
- BOSCA, L. & CORREDOR, C. 1984. Is phosphofructokinase the rate-limiting step of glycolysis? *Trends Biochem. Sci.* 9: 372-373.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BROWN, E.G. 1965. Changes in the free nucleotide and nucleoside pattern of pea seeds in relation to germination. *Biochem. J.* 95: 509-514.
- BROWN, N.A.C. & VAN STADEN, J. 1973. The effect of stratification on the endogenous cytokinin levels of seed of *Protea compacta* and *Leucadendron daphnoides*. *Plant Physiol.* 28: 388-392.
- BURGUILLO, P.F. & NICOLÁS, G. 1974. Respiratory activity during germination of seeds of *Cicer arietinum* L.I. Glycolysis and fermentation. *Plant Sci Lett* 3: 143-148.

- BURKE, J.J., SIEDOW, J.N. & MORELAND, D.E. 1982. Succinate dehydrogenase. A partial purification from mung bean hypocotyls and soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 70: 1577-1581.
- BUTTERWORTH, P.J. 1983. Different kinds of enzyme determination. In: *Methods of enzymatic analysis*, red. Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. & Grassl, M., 3de uitgawe, Vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim.
- CHIN, C.K. & LEE, M. 1980. Effect of pH on the activity of some respiratory inhibitors. *Plant Physiol.* 66: 1058-1060.
- CHING, T.M. 1973. Adenosine triphosphate content and seed vigor. *Plant Physiol.* 51: 400-402.
- CHING, T.M. & CHING, K.K. 1972. Content of adenosine phosphates and adenylate energy charge in germinating Ponderosa pine seeds. *Plant Physiol.* 50: 536-540.
- CLELAND, W.W. 1967. Enzyme kinetics. *Ann. Rev. Biochem.* 36: 77-112.
- COLLIS-GEORGE, N. & MELVILLE, M.D. 1974. Models of oxygen diffusion in respiring seed. *J. Exp. Bot.* 25: 1053-1069.
- CÔME, D. & TISSAOUI, T. 1973. Interrelated effects of imbibition, temperature and oxygen on seed germination. In: *Seed ecology*, red. Heydecker, W., Hfst. 9, Butterworths, London.
- CONN, E.E. & STUMPF, P.K. 1976. *Outlines of biochemistry*, 4de uitgawe, John Wiley & Sons, New York.
- COOPERSTEIN, S.J. & LAZAROV, A. 1951. A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 189: 665-670.
- COSSINS, E.A. 1978. Ethanol metabolism in plants. In: *Plant life in anaerobic environments*, red. Hook, D.D. & Crawford, R.M.M., Hfst. 7, Ann Arbor Science Publishers, Michigan.

- CRABTREE, B. & NEWSHOLME, E.A. 1985. Modelling and quantifying metabolic control systems. *Trends Biochem. Sci.* 10: 188.
- CRAWFORD, R.M.M. 1977. Tolerance of anoxia and ethanol metabolism in germinating seeds. *New Phytol.* 79: 511-517.
- CSEKE, C., BALOGH, A., WONG, J.H., BUCHANAN, B.B., STITT, M., HERZOG, B. & HELDT, H.W. 1984. Fructose 2,6-bisphosphate: a regulator of carbon processing in leaves. *Trends Biochem. Sci.* 9: 533-535.
- CURRY, R.A. & TING, I.P. 1973. Purification and crystallization of three isoenzymes of malate dehydrogenase from *Zea mays* seed. *Arch. Biochem. Biophys.* 158: 213-224.
- CZOK, R. & LAMPRECHT, W. 1974. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: *Methods of enzymatic analysis*, red. Bergmeyer, H.U., 2de uitgawe, Vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim.
- DAVIES, D.D. 1980. Anaerobic metabolism and the production of organic acids. In: *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*, red. Stumpf, P.K. & Conn, E.E. Vol. 2, Hfst. 14, Academic Press, New York.
- DAVIES, D.D. 1984. The co-ordination and integration of metabolic pathways. In: *The physiology and biochemistry of plant respiration*, red. Palmer, J.M., Hfst. 13, Cambridge University Press, Cambridge.
- DAWES, E.A. 1980. *Quantitative problems in biochemistry*, 6de uitgawe, Longman, London.
- DAY, D.A., NEUBURGER, M., DOUCE, R. & WISKICH, J.T. 1983. Exogenous NAD⁺ effects on plant mitochondria. A reinvestigation of the transhydrogenase hypothesis. *Plant Physiol.* 73: 1024-1027.
- DENNIS, D.T. & MIERNYK, J.A. 1982. Compartmentation of nonphotosynthetic carbohydrate metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 27-50.

- DIXON, G.H. & KORNBERG, H.L. 1959. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem. J. Proc.* 72: 3.
- DIXON, M. & WEBB, E.C. 1964. *Enzymes*, 2de uitgawe, Longmans, London.
- DOIREAU, P. 1969. *C.R. Herbd. Seanc. Acad. Sci.* 268: 933.
- DUGGLEBY, R.G. 1981. A non-linear regression program for small computers. *Anal. Biochem.* 110: 9-18.
- DUGGLEBY, R.G. & DENNIS, D.T. 1970a. Nicotinamide adenine dinucleotide - specific isocitrate dehydrogenase from a higher plant. The requirement for free and metal-complexed isocitrate. *J. Biol. Chem.* 245: 3745-3750.
- DUGGLEBY, R.G. & DENNIS, D.T. 1970b. Regulation of the nicotinamide adenine dinucleotide - specific isocitrate dehydrogenase from a higher plant. The effect of reduced nicotinamide adenine dinucleotide and mixtures of citrate and isocitrate. *J. Biol. Chem.* 245: 3751-3754.
- EDWARDS, MIRIAM M. 1968. Dormancy in seeds of charlock 2. The influence of the seed coat. *J. Exp. Bot.* 19: 583-600.
- EDWARDS, MIRIAM M. 1969. Dormancy in seeds of charlock 4. Interrelationships of growth, oxygen supply and concentration of inhibitor. *J. Exp. Bot.* 20: 876-894.
- EL-BADRY, A.M., OTANI, A. & MANSOUR, T.E. 1973. Studies on heart phosphofructokinase. Role of fructose-1,6-diphosphate in enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 248: 557-563.
- ESASHI, Y. KOTAKI, K. & OHHARA, Y. 1976. Induction of cocklebur seed germination by anaerobiosis: a question about the "inhibitor hypothesis" of seed dormancy. *Planta (Berl.)* 129: 109-112.

- ESASHI, Y., NAGAYAMA, T., SATOH, M. & SAIJOH, K. 1983.
A bimodal germination response to temperature in cocklebur seeds 2. ATP and adenylate pool. *Plant, Cell Environ.* 6: 55-63.
- FEIGL, F. 1946. Qualitative analysis by spot tests. Inorganic and organic applications. Vertaling deur Oesper, R.E., 3de uitgawe, Elsevier, New York.
- FELL, D.A. 1984. Phosphofructokinase and glycolytic flux. *Trends Biochem. Sci.* 9: 515-516.
- FUERST, E.P., UPADHYAYA, M.K., SIMPSON, G.M., NAYLOR, J.M. & ADKINS, S.W. 1983. A study of the relationship between seed dormancy and pentose phosphate pathway activity in *Avena fatua*. *Can J. Bot.* 61: 667-670.
- GIVAN, C.V. 1972. Control of glycolysis by orthophosphate and adenosine triphosphate in soluble extracts of germinating pea seeds. *Planta* 108: 29-38.
- GOODWIN, T.W. & MERCER, E.I. 1983. Introduction to plant biochemistry, 2de uitgawe, Pergamon Press, Oxford.
- GOSLING, P.G. & ROSS, J.D. 1979. Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase from hazel cotyledons. *Phytochemistry* 18: 1441-1445.
- GOSLING, P.G. & ROSS, J.D. 1980. Pentose phosphate metabolism during dormancy breakage in *Corylus avellana* L. *Planta* 148: 362-366.
- GROBBELAAR, J.U. 1980. Adenosine triphosphate (ATP). Publikasie van Instituut vir Omgewingswetenskappe, Univ. van die Oranje-Vrystaat.
- GRONDAL, E.J.M., BETZ, A. & KREUZBERG, K. 1983. Partial purification and properties of alcohol dehydrogenase from the unicellular green alga *Chlamydomonas moewusii*. *Phytochemistry* 22: 1695-1699.
- GUINN, G. & EIDENBOCK, MARIE P. 1972. Extraction, purification, and estimation of ATP from leaves, floral buds, and immature fruits of cotton. *Anal. Biochem.* 50: 89-97.

- HAMPP, R. 1980. Rapid separation of the plastid, mitochondrial, and cytoplasmic fractions from intact leaf protoplasts of *Avena*. Determination of *in vivo* ATP pool sizes during greening. *Planta* 150: 291-298.
- HARPER, J.L. 1977. Population biology of plants. London, Academic Press.
- HATTORI, T. & ASAHI, T. 1982. The presence of two forms of succinate dehydrogenase in sweet potato mitochondria. *Plant Cell Physiol.* 23: 515-523.
- HAYDEN, D.B. & COOK, F.S. 1972. Malate dehydrogenase in maize endosperm: the intracellular location and characterization of the two major particulate forms. *Can. J. Biochem.* 50: 663-671.
- HEINRICH, R. & RAPOPORT, T.A. 1974a. A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* 42: 89-95.
- HEINRICH, R. & RAPOPORT, T.A. 1974b. A linear steady-state treatment of enzymatic chains. Critique of the cross-over theorem and a general procedure to identify interaction sites with an effector. *Eur. J. Biochem.* 42: 97-105.
- HOFMANN, E. & KOPPERSCHLÄGER, G. 1982. Phosphofructokinase from yeast. *Methods enzymol* 90: 49-60.
- HOLM-HANSEN O. & BOOTH, C.R. 1966. The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnological Oceanography* 2: 510-519.
- HOLM-HANSEN, O. & KARL, D.M. 1978. Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and environmental samples. *Methods enzymol* LVII: 73-85.
- HORECKER, B.L. 1975. Fructose bisphosphate aldolase from spinach. *Methods enzymol* XLIIC: 234-239.
- HOURMANT, A. & PRADET, A. 1981. Oxidative phosphorylation in germinating lettuce seeds (*Lactuca sativa*) during the first hours of imbibition. *Plant Physiol.* 68: 631-635.
- IKUMA, H. & BONNER, W.D. Jr. 1967. Properties of higher plant mitochondria I. Isolation and some characteristics of tightly-coupled mitochondria from dark-grown mung bean hypocotyls. *Plant Physiol.* 42: 67-75.

- IKUMA, H. & TETLEY, R.M. 1976. Possible interference by an acid-stable enzyme during the extraction of nucleoside di- and triphosphates from higher plant tissues. *Plant Physiol.* 58: 320-323.
- JACKSON, C. & MOORE, A.L. 1979. Isolation of intact higher-plant mitochondria. In: *Plant organelles*, red. Reid, E., Ellis-Horwood, New York.
- JANN, REBECCA C. & AMEN, R.D. 1977. What is germination? In: *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*, red. Khan, A.A., Hfst. 2, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- JONES, J.F. & HALL, M.A. 1981. The effect of ethylene on quantitative and qualitative aspects of respiration during the breaking of dormancy of *Spergula arvensis* L. seeds. *Ann. Bot.* 48: 291-300.
- KACSER, H. & BURNS, J.A. 1973. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27: 69-104.
- KATOH, H. & ESASHI, Y. 1975. Dormancy and impotency of cocklebur seeds 2. Phase sequence in germination process. *Plant Cell Physiol.* 16: 697-706.
- KENNEDY, R.A., RUMPHO, MARY E. & VAN DER ZEE, DELMA 1983. Germination of *Echinochloa crus-galli* (Barnyard Grass) seeds under anaerobic conditions. Respiration and response to metabolic inhibitors. *Plant Physiol.* 72: 787-794.
- KHAN, A.A. 1977a. Seed dormancy: changing concepts and theories. In: *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*, red. Khan, A.A. Hfst. 3, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- KHAN, A.A. 1977b. *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- KOLLÖFFEL, C. 1968. Activity of alcohol dehydrogenase in the cotyledons of peas germinated under different environmental conditions. *Acta Bot. Neerl.* 17: 70-77.

- KOMBRINCK, E. & BEEVERS, H. 1983. Transport of purine and pyrimidine bases and nucleosides from endosperm to cotyledons in germinating castor bean seedlings. *Plant Physiol.* 73: 370-376.
- KOMBRINCK, E., KRUGER, N.J. & BEEVERS, H. 1984. Kinetic properties of pyruvate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 74: 395-401.
- KOVACS, M.I.P. & SIMPSON, G.M. 1976. Dormancy and enzyme levels in seeds of wild oats. *Phytochemistry* 15: 455-458.
- KRUGER, N.J. & DENNIS, D.T. 1985. Reassessment of an apparent hyperactive form of phosphofructokinase from plants. *Plant Physiol.* 78: 645-648.
- KRUGER, N.J., KOMBRINCK, E. & BEEVERS, H. 1983. Pyruvate: fructose-6-phosphate phosphotransferase in germinating castor bean seedlings. *FEBS Lett.* 153: 409-412.
- KURAMITSU, H.K. 1968. Adenine nucleotide inhibition of pea malate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 383-384.
- LANG, G. & MICHAL, G. 1974. D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate. In: *Methods of enzymatic analysis*, red. Bergmeyer, H.U., 2de uitgawe, Vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim.
- LARSSON, C.-M. & OLSSON, T. 1979. Firefly assay of adenine nucleotides from algae: comparison of extraction methods. *Plant Cell Physiol.* 20: 145-155.
- LATIES, G.G. 1974. Isolation of mitochondria from plant material. *Methods Enzymol* 31A: 589-600.
- LATIES, G.G. 1983. Membrane-associated NAD-dependent isocitrate dehydrogenase in potato mitochondria. *Plant Physiol.* 72: 953-958.
- LEBLOVÁ, SYLVA, 1978a. Pyruvate conversions in higher plants during natural anaerobiosis. In: *Plant life in anaerobic environments*, red. Hook, D.D. & Crawford, R.M.M., Hfst. 6, Ann Arbor Science Publishers, Michigan.

- LEBLOVÁ, SYLVA. 1978b. Isolation and identification of alcohol dehydrogenases (ADH) from germinating seeds. In: Plant life in anaerobic environments, red. Hook, D.D. & Crawford, R.M.M., Hfst. 14, Ann Arbor Science Publishers, Michigan.
- LOWRY, O.H. & PASSONNEAU, JANET V. 1972. A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press, New York.
- LUNDIN, A. & THORE, A. 1975. Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay. *Appl. Microbiol.* 30: 713-721.
- LUNN, G. & MADSEN, E. 1981. ATP-levels of germinating seeds in relation to vigor. *Physiol. Plant* 53: 164-169.
- MASTERS, C. 1985. Phosphofructokinase, compartmentation and the regulation of glycolysis. *Trends Biochem. Sci.* 10: 189.
- MAYER, A.M. 1973. The control of the initial stages of germination: some biochemical investigations. *Seed Sci. Technol.* 1: 51-72.
- MAYER, A.M. 1977. Metabolic control of germination. In: The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination, red. Khan, A.A., Hfst. 17, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- MAYER, A.M. & MARBACH, IRITH. 1981. Biochemistry of the transition from resting to germinating state in seeds. *Prog. in Phytochem.* 7: 95-136.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1982. The germination of seeds, 3de uitgawe, Pergamon Press, Oxford.
- MAYER, A.M. & SHAIN, Y. 1974. Control of seed germination. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25: 167-193.
- MCGREGOR, D.I. 1969. A developmental study of enzymes in the cotyledons of watermelon seedlings upon germination and exposure to light. Ph.D. proefskrif. Universiteit van Purdue.
- MCMANNON, M. & CRAWFORD, R.M.M. 1971. A metabolic theory of flooding tolerance: the significance of enzyme distribution and behaviour. *New Phytol.* 70: 299-306.

- MILLHOUSE, JENNY, WISKICH, J.T. & BEEVERS, H. 1983. Metabolite oxidation and transport in mitochondria of endosperm from germinating castor bean. *Aust. J. Plant Physiol.* 10: 167-177.
- MOROHASHI, Y. 1978. Development of respiratory metabolism in seeds during hydration. In: *Dry biological systems*, red. Crowe, J.H. & Clegg, J.S., Academic Press, New York.
- MOROHASHI, Y. & BEWLEY, J.D. 1980a. Development of mitochondrial activities in pea cotyledons during and following germination of the axis. *Plant Physiol.* 66: 70-73.
- MOROHASHI, Y. & BEWLEY, J.D. 1980b. Development of mitochondrial activities in pea cotyledons. Influence of dessication during and following germination of the axis. *Plant Physiol.* 66: 637-640.
- MOROHASHI, Y., BEWLEY, J.D. & YEUNG, E.C. 1981. Biogenesis of mitochondria in imbibed peanut cotyledons: influence of the axis. *J. Exp. Bot.* 32: 605-613.
- MOROHASHI, Y. & SHIMOKORIYAMA, M. 1975a. Further studies on glucose catabolism in the early phases of germination of *Phaseolus mungo* seeds. *J. Exp. Bot.* 26: 927-931.
- MOROHASHI, Y. & SHIMOKORIYAMA, M. 1975b. Development of mitochondrial activities in the early phase of germination of *Phaseolus mungo* seeds. *J. Exp. Bot.* 26: 932-938.
- MOROHASHI, Y. & SHIMOKORIYAMA, M. 1977. Water content and mitochondrial activities in the imbibitional phase of germination of *Phaseolus mungo* seeds. *Z. Pflanzenphysiol.* 82: 173-178.
- MYHRMAN, A., LUNDIN, A. & THORE, A. 1978. The analytical application of ATP monitoring using firefly bioluminescence. Wallac LKB pamphlet, application note 314; 6p.
- NAKAYAMA, N. & ASAHI, T. 1978. Change in the interaction of succinate dehydrogenase with the inner membrane of cotyledon mitochondria during germination of pea seeds. In: *Plant mitochondria*, red. Ducet, G. & Lance, C., Elsevier, Amsterdam.

- NAKAYAMA, N. & ASAHI, T. 1981. Changes in properties of succinate dehydrogenase during senescence of pea cotyledons. *Plant Cell Physiol.* 22: 79-89.
- NAKAYAMA, N., SUGIMOTO, I. & ASAHI, T. 1980. Presence in dry pea cotyledons of soluble succinate dehydrogenase that is assembled into the mitochondrial inner membrane during seed imbibition. *Plant Physiol.* 65: 229-233.
- NAWA, Y. & ASAHI, T. 1971. Rapid development of mitochondria in pea cotyledons during the early stage of germination. *Plant Physiol.* 48: 671-674.
- NAWA, Y. & ASAHI, T. 1973a. Biochemical studies on development of mitochondria in pea cotyledons during the early stage of germination. Effects of antibiotics on the development. *Plant Physiol.* 51: 833-838.
- NAWA, Y. & ASAHI, T. 1973b. Relationship between the water content of pea cotyledons and mitochondrial development during the early stage of germination. *Plant Cell Physiol.* 14: 607-610.
- NICOLÁS, G. & ALDASORO, J.J. 1979. Activity of the pentose phosphate pathway and changes in nicotinamide nucleotide content during germination of seeds of *Cicer arietinum* L. *J. Exp. Bot.* 30: 1163-1170.
- NIKOLAEVA, M.G. 1969. Gas exchange of dormant seeds in relation to temperature. In: *Physiology of deep dormancy in seeds*, ed. Nikolaeva, M.G., Hfst. 6, National Science Foundation, Washington, D.C.
- NOBEL, P.S. 1967. A rapid technique for isolating chloroplasts with high rates of endogenous photophosphorylation. *Plant Physiol.* 42: 1389-1394.
- OBENDORF, R.L. & MARCUS, A. 1974. Rapid increase in adenosine-5'-triphosphate during early wheat embryo germination. *Plant Physiol.* 53: 779-781.
- OLIVER, D.J. & WALKER, G.H. 1984. Characterization of the transport of oxaloacetate by pea leaf mitochondria. *Plant Physiol.* 76: 409-413.
- OLOSUYI, S.A. 1973. Ph.D.thesis, Univ. van Reading.

- PALMER, J.M. 1967. Rapid isolation of active mitochondria from plant tissue. *Nature* (London) 216: 1208.
- PERL, M. 1978. A possible role of malate dehydrogenase activity in seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum*). *Isr. J. Bot.* 27: 54-61.
- PERL, M. 1980. An ATP-synthesizing system in seeds. *Planta* 149: 1-6.
- PERL, M. 1980/81a. Enzyme activities involved in ATP synthesis in seeds. *Isr. J. Bot.* 29: 307-311.
- PERL, M. 1980/81b. AMP and phosphoenolpyruvate-dependent ATP synthesis in lettuce seeds. *Isr. J. Bot.* 29: 312-317.
- PERL, M. 1981a. Kinetin effect on ATP synthesis and on adenylate kinase activity in pea seeds. *Phytochemistry* 20: 2085-2088.
- PERL, M. 1981b. Reduced nicotinamide-adenine-dinucleotide-pyrophosphorylase: a novel enzyme in seeds. *Phytochemistry* 20: 1791-1793.
- PERL, M. 1982a. ATP accumulation in peanut seeds during seed-ripening and during the dormancy-breaking process. *J. Exp. Bot.* 33: 449-455.
- PERL, M. 1982b. The effect of ethylene and temperature on ATP accumulation from various substrates in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *J. Exp. Bot.* 33: 456-462.
- PERL, M. 1982c. ATP synthesis in cell-free extracts of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *J. Exp. Bot.* 33: 463-470.
- PORTER, N.G. & WAREING, P.F. 1974. The role of the oxygen permeability of the seed coat in the dormancy of seed of *Xanthium pennsylvanicum* Wallr. *J. Exp. Bot.* 25: 583-594.
- PRADET, A. 1982. Oxidative phosphorylation in seeds during the initial phases of germination. In: The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination, red. Khan, A.A., 2de uitgawe, Hfst. 14, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

- PRADET, A. & RAYMOND, P. 1983. Adenine nucleotide ratios and adenylate energy charge in energy metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34: 199-224.
- PRADET, A. & RAYMOND, P. 1984. Adenylate energy charge, an indicator of energy metabolism. In: *The physiology and biochemistry of plant respiration*, red. Palmer, J.M., Hfst. 16, Cambridge University Press, Cambridge.
- PREISS, J. & KOSUGE, T. 1976. Regulation of enzyme activity in metabolic pathways. In: *Plant Biochemistry*, red. Bonner, J. & Varner, J.E., 3de uitgawe, Hfst. 10, Academic Press, New York.
- RACKER, E. 1984. The rate-limiting step in glycolysis. *Trends Biochem. Sci.* 9: 516.
- RAPOPORT, T.A., HEINRICH, R., JACOBASCH, GISELA & RAPOPORT, S. 1974. A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erithrocytes. *Eur. J. Biochem.* 42: 107-120.
- RAYMOND, P. & PRADET, A. 1980. Stabilization of adenine nucleotide ratios at various values by an oxygen limitation of respiration in germinating lettuce (*Lactuca sativa*) seeds. *Biochem. J.* 190: 39-44.
- REBEILLE, F., BLIGNY, R. & DOUCE, R. 1984. Is the cytosolic P_i concentration a limiting factor for plant cell respiration? *Plant Physiol.* 74: 355-359.
- ROBERTS, E.H. 1969. Seed dormancy and oxidation processes. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 23: 161-192.
- ROBERTS, E.H. 1973. Oxidative processes and the control of seed germination. In: *Seed ecology*, red. Heydecker, W., Butterworth, London.
- ROBERTS, E.H. & SMITH, R.D. 1977. Dormancy and the pentose phosphate pathway. In: *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*, red. Khan, A.A., Hfst. 18, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

- RUMPHO, MARY E. & KENNEDY, R.A. 1983. Anaerobiosis in *Echinochloa crus-galli* (Barnyard grass) seedlings. Intermediary metabolism and ethanol tolerance. *Plant Physiol.* 72: 44-49.
- RUSTIN, P., MOREAU, F. & LANCE, C. 1980. Malate oxidation in plant mitochondria via malic enzyme and the cyanide-insensitive electron transport pathway. *Plant Physiol.* 66: 457-462.
- RUSTIN, P., RÖTIG, AGNÈS & ALIN, MARIE-FRANÇOISE, 1985. Continuous measurement of oxaloacetate in purified mitochondria from the leaves of *Kalanchoë blossfeldiana*. *Physiol. Plant.* 63: 201-207.
- SAGLIO, P.H.M. & DANIELS, M.J. 1979. ATP and energy charge as criteria of growth and metabolic activity of Mollicutes: application to *Spiroplasma citri*. *J. Gen. Microbiol.* 110: 13-20.
- SAGLIO, P.H., RANCILLAC, M., BRUZAN, F. & PRADET, A. 1984. Critical oxygen pressure for growth and respiration of excised and intact roots. *Plant Physiol.* 76: 151-154.
- SAGLIO, P.H., RAYMOND, P. & PRADET, A. 1983. Oxygen transport and root respiration of maize seedlings. A quantitative approach using the correlation between ATP/ADP and the respiration rate controlled by oxygen tension. *Plant Physiol.* 72: 1035-1039.
- SAGNELLA, G.A. 1985. Model fitting, parameter estimation, linear and non-linear regression. *Trends Biochem. Sci.* 10: 100-103.
- SATOH, S. & ASAHI, T. 1975. Biochemical properties of mitochondrial membrane from dry pea seeds and changes in the properties during imbibition. *Plant Physiol.* 56: 816-820.
- SCANDALIOS, J.G. 1977. *Phytochem. Soc. Symp.* 14: 129-153.
- SEGEL, I.H. 1976. *Biochemical calculations. How to solve mathematical problems in general biochemistry*, 2de uitgawe, John Wiley & Sons, New York.

- SEITZ, W.R. & NEARY, M.P. 1976. Recent advances in bioluminescence and chemiluminescence assay. *Methods of Biochemical Analysis*, ed. Glick, D., Vol. 23 : 161-189, Interscience, New York.
- SHIMOMURA, S. & BEEVERS, H. 1983a. Alcohol dehydrogenase and an inactivator from rice seedlings. *Plant Physiol.* 71: 736-741.
- SHIMOMURA, S. & BEEVERS, H. 1983b. Alcohol dehydrogenase inactivator from rice seedlings. Properties and intracellular location. *Plant Physiol.* 71: 742-746.
- SIMON, J.P. 1979. Adaptation and acclimation of higher plants at the enzyme level: temperature-dependent substrate binding ability of NAD-malate dehydrogenase in four populations of *Lathyrus japonicus* Willd. (Leguminosae). *Plant Sci. Lett.* 14: 113-120.
- SINGER, T.P. 1974. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and α -glycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem. Anal.* 22: 123-175.
- SINGER, T.P., OESTREICHER, G. & HOGUE, PATRICIA. 1973. Regulation of succinate dehydrogenase in higher plants 1. Some general characteristics of the membrane-bound enzyme. *Plant Physiol.* 52: 616-621.
- SMALL, J.G.C., MCNAUGHTON, JUDITH E. & GREEFF, J.H. 1977. Physiological studies on the germination of *Erythrina caffra* Thunb. seeds. *Jl. S. Afr. Bot.* 43: 213-222.
- SMITH, LUCILE. 1955. Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase. *Methods Biochem. Anal.* 2: 427-434.
- SOLOMOS, T., MALHOTRA, S.S., PRASAD, S., MALHOTRA, S.K. & SPENCER, MARY. 1972. Biochemical and structural changes in mitochondria and other cellular components of pea cotyledons during germination. *Can. J. Biochem.* 50: 725-737.
- SRIVASTAVA, H.K. & SARKISSIAN, I.V. 1971. Purification of cytochrome oxidase from mitochondria of higher plants. *Phytochemistry* 10: 977-980.
- STELLWAGEN, E. & WILGUS, H. 1975. Phosphofructokinase of yeast. *Methods enzymol.* XLIIC: 78-85.

- STODDART, J.L. 1973. Patterns of protein synthesis during seed germination. Welsh Plant Breeding Stn. (Aberyswyth) Rep., pp 76-78.
- STOREY, B.T. 1980. Electron transport and energy coupling in plant mitochondria. In: The biochemistry of plants. A comprehensive treatise, red. Stumpf, P.K. & Conn, E.E., Vol. 2, Hfst. 4, Academic Press, New York.
- STREHLER, B.L. 1968. Bioluminescence assay: principles and practice. *Methods Biochem. Anal.* 16: 99-179.
- SUTCLIFFE, J.F. & SEXTON, R. 1974. In: Structure and function of primary root tissues, red. Kolk, J., Veda, Bratislava.
- SWAMY, P.M., UMAPATHI, P. & NARASIMHA REDDY, S.B. 1980. Involvement of PP pathway enzymes in the dormancy of Peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *Z. Pflanzenphysiol.* 97: 373-376.
- THORE, A. 1980. Bioluminescence assay: extraction of ATP from biological specimens. Wallac LKB pamflet; 6p.
- TING, I.P., FÜHR, I., CURRY, R. & ZSCHOCH, W.C. 1975. Malate dehydrogenase isozymes in plants: preparation, properties, and biological significance. In: Isozymes II. Physiological function, red. Markert, C.L., Academic Press, New York.
- TURNER, J.F. & TURNER, DONELLA H. 1980. The regulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. In: The biochemistry of plants. A comprehensive treatise, red. Stumpf, P.K. & Conn, E.E., Vol. 2, Hfst. 7, Academic Press, New York.
- VAN DE VENTER, H.A. 1974. Distribution, leaf morphology, embryology and germination of the acaulescent species of *Strelitzia* ait. Ph.D. proefskrif, Univ. van Port Elizabeth.
- VAN DE VENTER, H.A. 1978. Effect of various treatments on germination of dormant seeds of *Strelitzia reginae* ait. *Jl. S. Afr. Bot.* 44: 103-110.
- VAN DE VENTER, H.A. & SMALL, J.G.C. 1974. Dormancy in seeds of *Strelitzia* ait. *S. Afr. J. Sci.* 70: 216-217.

- VAN DE VENTER, H.A. & SMALL, J.G.C. 1975. Evidence for the presence of a germination inhibitor in seeds of *Strelitzia* ait. *Jl. S. Afr. Bot.* 41: 211-223.
- VAN DE VENTER, H.A. , SMALL, J.G.C. & ROBBERTSE, P.J. 1975. Notes on the distribution and comparative leaf morphology of the acaulescent spp. of *Strelitzia* ait. *Jl. S. Afr. Bot.* 41: 1-16.
- VEEGER, C., DERVARTANIAN, D.V. & ZEYLEMAKER, W.P. 1969. Succinate dehydrogenase. *Methods Enzymol.* XIII: 81-90.
- WIEME, R.J. 1974. Assay after electrophoretic separation. In: *Methods of enzymatic analysis*, red. Bergmeyer, H.U., 2de uitgawe, Vol. 2, Verlag Chemie, Weinheim.
- WIENER, S., WIENER, R., URIVETZKY, M. & MEILMAN, E. 1974. Coprecipitation of ATP with potassium perchlorate: the effect on the firefly enzyme assay of ATP in tissue and blood. *Anal. Biochem.* 59: 489-500.
- WIKSTRÖM, M., KRAB, K. & SARASTE, M. 1981. Cytochrome oxidase. A synthesis. Academic Press, New York.
- WILSON, S.B. & BONNER, W.D. Jr., 1971. Studies of electron transport in dry and imbibed peanut embryos. *Plant Physiol.* 48: 340-344.
- WISKICH, T. 1980. Control of the Krebs cycle. In: *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*, red. Stumpf, P.K. & Conn, E.E., Vol. 2, Hfst. 6, Academic Press, New York.
- WU, M-X., SMYTH, D.A. & BLACK, C.C. Jr. 1983. Fructose-2,6-bisphosphate and the regulation of pyruvate-dependent phosphofructokinase activity in germinating pea seeds. *Plant Physiol.* 73: 188-191.
- YBEMA, S.G. 1983. Invloed van suurstof op rusverbreking, respirasie en aspekte van styselafbraak in *Strelitzia juncea*-saad. M.Sc. tesis, Univ. van Pretoria.

- YBEMA, S.G., SMALL, J.G.C., ROBBERTSE, P.J. & GROBBELAAR, N.
1984. Oxygen and gibberellic acid effects on germination,
amylase activity and reducing substance levels of *Strelitzia*
juncea seeds. *Seed Sci. Technol.* 12: 597-612.
- YONETANI, T. 1961. Studies on cytochrome oxidase III.
Improved preparation and some properties. *J. Biol. Chem.*
236: 1680-1688.
- ZSCHOCHÉ, W.C. & TING, I.P. 1973. Malate dehydrogenases of
Pisum sativum. Tissue distribution and properties of the
particulate forms. *Plant Physiol.* 51: 1076-1081.
