

Getuienis dat termoinhibering en die opheffing daarvan deur suurstof plus kinetien by Great Lakes-slaaisaad verband hou met mitochondriale funksie

J.G.C. Small*

Fakulteit Natuurwetenskappe, Universiteit van die Oranje-Vrystaat,
Posbus 339, Bloemfontein, 9300

E. Cronje

Departement Plantkunde en Genetika, Universiteit van die Oranje-Vrystaat,
Posbus 339, Bloemfontein, 9300

Ontvang 29 September 1995; aanvaar 3 Januarie 1996

UITTREKSEL

Termoinhibering van Lactuca sativa L. cv. Great Lakes 659-saad het by 36 °C voorgekom. Termoinhibering is deur 'n kombinasie van 100% O₂ en kinetien (10 mg dm⁻³) opgehef. Chlooramfenikol het die voordelige invloed van O₂ plus kinetien opgehef.

Verskeie mitochondrionaktiwiteite (respirasie, koppeling, sekere matriksensiemaktiwiteite en inkorporering van [³⁵S]-metionien in mitochondrionproteïene) was by termogeïnhibeerde saad laer as by saad wat by 25 °C geïmbibeer is. Behandeling met suurstof plus kinetien het veroorsaak dat hierdie aktiwiteite by 36 °C geïmbibeerde saad tot dieselfde, of hoër vlakke plaasgevind het as by 25 °C-kontrolesaad.

Die profiel van [³⁵S]-metioniengemerke mitochondrionpolipeptiede van termogeïnhibeerde saad het kwalitatief verskil van die van saad wat by 25 °C geïmbibeer is en saad wat by 36 °C met O₂ plus kinetien behandel is. Sade uit laasgenoemde twee behandelings het 'n identiese profiel van [³⁵S]-metioniengemerke mitochondrionproteïene vertoon.

Die resultate van hierdie studie steun die hipotese dat die induksie en opheffing van termoinhibering by slaaisaad onderskeidelik verband hou met verlaging en met stimulering van mitochondrionaktiwiteit/ontwikkeling.

ABSTRACT

Evidence that thermoinhibition and the alleviation thereof by oxygen plus kinetin in Great Lakes lettuce seed is related to mitochondrial function

Thermoinhibition of Lactuca sativa L cv Great Lakes 659 seeds occurred at 36 °C. Thermoinhibition was alleviated by a combination of 100% O₂ and kinetin (10 mg dm⁻³). Chloramphenicol nullified the effect of O₂ plus kinetin.

A number of mitochondrial activities (respiration, coupling, certain matrix enzyme activities and incorporation of [³⁵S]-methionine in mitochondrial proteins) were lower in thermoinhibited than in seeds imbibed at 25 °C. Treating seeds with O₂ plus kinetin at 36 °C restored these mitochondrial activities to the same or in some cases, to higher levels than in 25 °C control seeds.

The profile of [³⁵S]-methionine labelled mitochondrial polypeptides from thermoinhibited seeds differed qualitatively from that of seeds imbibed at 25 °C and seeds treated with O₂ plus kinetin at 36 °C. The [³⁵S]-methionine labelled protein profiles of seeds from the latter two treatments were identical.

The results of this study support the hypothesis that induction of thermoinhibition is related to reduction in mitochondrial function and that stimulation of mitochondrial activity/development could be causative in the alleviation of thermoinhibition.

INLEIDING

Die optimum temperatuur vir die ontkieming van slaaisaad is ongeveer 20 °C maar verskille tussen kultivars kom voor.^{1,2} Ontkieming neem gewoonlik skerp af na die mate waarin die temperatuur bo die optimum verhoog word. In sommige kultivars soos Grand Rapids word ontkieming in die donker by laer temperature as in die lig gerem.³ By 'n sekere hoër temperatuur egter word sowel lig as donkerontkieming totaal gerem.³ Hierdie verskynsel heet termoinhibering.⁴

Die biochemiese meganisme van termoinhibering en die opheffing daarvan deur sekere behandelings is grootliks onbekend.⁵ Saini, et al.⁹ beweer dat etileensintese en -aksie benodig word vir die opheffing van termoinhibering. Small,

et al.,³ het die belangrikheid van etileen bevestig en aangetoon dat verhoogde ATP-vlakke moontlik verband hou met die opheffing van termoinhibering. Laasgenoemde studie³ wat met die donkersadige Grand Rapids-kultivar uitgevoer is, het aangetoon dat 'n kombinasie van 100% suurstof en kinetien 'n hoogs doeltreffende behandeling is om termoinhibering op te hef.

In die huidige studie word nagegaan of suurstof plus kinetien ook termoinhibering van die witsadige Great Lakes-kultivar kan ophef. Na aanleiding van die vorige bevinding³ dat 'n gebrek aan voldoende ATP-sintese moontlik met termoinhibering verband hou en aangesien ATP-sintese primêr 'n mitochondriale funksie is, word die hipotese getoets dat die induksie en opheffing van termoinhibering onder-

* Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word

skeidelik verband hou met verlaging en stimulering van mitochondrionaktiwiteit.

EKSPERIMENTELE PROSEDURE

Materiaal

Saad (strenggesproke dopvruggies) van *Lactuca sativa* L. cv Great Lakes 659 is vanaf die Sensako saadmaatskappy verkry en in lugdigte glasbottels in die donker by 2°C geberg.

Panacide (5,5'-2, 2'-dihidroksie difenielmetaan) is van BDH Chemicals, Poole, VK aangekoop. Chlooramfenikol, kinetien en gibberelliensuur (GA_3) is van Sigma Chemical Company, St. Louis, VSA verkry en vuurvliegglusiferien/lusiferase van Los Alamos, VSA. Proteïen molekule standarde, Amplify, Hyperfilm-MP en [^{35}S]-metionien is van Amersham International, VK verkry. Ander biochemikalieë is van Boehringer-Mannheim, Duitsland, verkry.

Medies suiwergraad gasse (O_2 , CO_2 , etileen) is deur Fedgas, Suid-Afrika verskaf.

Kinetien is in 0,5 mol dm^{-3} HCL opgelos en daarna met NaOH geneutraliseer.⁵ Chlooramfenikol en GA_3 is eers in 'n klein volume etanol opgelos en na verdunning met gedistilleerde water is die etanol afgedamp tot 'n konsentrasie van minder as 1 mmol dm^{-3} . Hierdie konsentrasie etanol het nie ontkieming beïnvloed nie.

Ontkieming

Sade is vooraf vir 2 min. in 0,5% (m/v) waterige Panacide gesteriliseer en daarna met groot volumes steriele gedistilleerde water afgespoel. Vyf-en-twintig sade is op 'n enkel-laag-filtreerpapier wat met toetsoplossing (water; kinetien, 10 mg dm^{-3} ; chlooramfenikol, 10 mmol dm^{-3} ; of GA_3 , 100 mg dm^{-3}) benat is, in 55 mm deursnee plastiek Petri-bakkies geïnkubeer. Petri-bakkies met sade is in 2,2 dm^3 deursigtige plastiekbottels met gasdigte deksels geplaas. 'n Rubberseptum is in die deksel aangebring waardeur O_2 (100%), CO_2 (10% v/v) of etileen (100 mm 3 dm^{-3}) in die bottel ingelaat is. Vir die 100%- O_2 -behandeling is hierdie gas teen 600 cm^3 min.⁻¹ deur die bottel vir 30 min. geborrel waarna die bottel verseël is. Die resultate wat met hierdie behandeling verkry is, was dieselfde as waar 100% O_2 kontinu vir die duurte van die eksperiment deur die bottel geborrel is.

Sade is by $25 \pm 0,2^\circ C$ en $36 \pm 0,2^\circ C$ in witlig ("coolwhite" buislig, 16 mol $m^{-2}s^{-1}$) geïnkubeer en is as ontkiem beskou wanneer die radikula verskyn het.

Konsentrasies van toetsoplossings en gasse wat in eksperimente gebruik is, is in voorafeksperimente as optimaal bepaal.

Suurstofopname

Suurstofopname van sade is polarografies by 25°C met 'n Clark-elektrode (Yellow Springs Instrument Company, Yellow-Springs, Ohio) bepaal. Die reaksiekuvet het 3 cm^3 water en 25 ontkiemde of 50 onontkiemde sade bevat.

ATP

Die metodes vir prosessering van weefsel en bepaling van adeniennukleotiede deur middel van die lusiferien/lusiferase tegniek, is soos beskryf deur Raymond en Pradet.⁶

Ekstrahering en bepaling van etanol

Sade (100) is op filtreerpapier wat met toetsoplossing benat is, in 100 cm^3 Schott Duran glasreagensbottels geïnkubeer. Bottels is met behulp van rubberseptums verseël. 'n 100%- O_2 -atmosfeer is verkry deur bottels aan die begin van 'n eksperiment vir 30 min. (600 cm^3 min $^{-1}$) met O_2 te spoel.

Na 24 uur is etanol geëkstraheer en bepaal soos reeds beskryf.⁷

Isolering en suiwering van mitochondrions

Gewaste mitochondrions is uit heel sade berei soos beskryf deur Morohashi, et al.⁸ Gewaste mitochondrions is verder op 'n selfgenererende Percoll-gradient gesuiwer.⁹ Gesuiwerde mitochondrions was $93 \pm 3\%$ intak.

Suurstofopname van mitochondrions

Dit is polarografies met 'n Hansatech Clark-elektrode by 25°C bepaal. Die reaksiekuvet (1 cm^3) het 25 mmol dm^{-3} HEPES (N-(2-hidroksiëtiel) piperasien-N-2-etaansulfoonsuur) (pH 7,2), 5 mmol dm^{-3} K-Pi (kaliumfosfaatbuffer) (pH 7,2), 0,4 mmol dm^{-3} mannitol, 5 mmol dm^{-3} $MgCl_2$ en 0,1% (m/v) BSA (beeserumalbumien) bevat. Suksinaat (10 mmol dm^{-3} plus 0,6 mmol dm^{-3} ATP), NADH (nikotienamiedadenien dinukleotied gereduseerd 10 mmol dm^{-3}) en malaat (7 mmol dm^{-3} plus 0,3 mmol dm^{-3} ATP) is as respiratoriese substrate gebruik. ADP/O-verhoudings is bepaal na byvoeging van 24 nmol ADP.

Mitochondriale ensiemaktiwiteite

Gesuiwerde mitochondrions is vir aktiwiteitsbepalings van ensieme gebruik. Vir elke ensiem is reagens- en mitochondrionkonsentrasies in voorafeksperimente geoptimeer.

α -Ketoglutaarsuurdehidrogenase (α -KGDH)

Die aktiwiteit is by 340 nm bepaal deur die vorming van NADH.¹⁰ Die reaksie-medium van 1 cm^3 het bevat 20 mmol dm^{-3} HEPES (pH 7,0), 8 mmol dm^{-3} $MgCl_2$, 20 mmol dm^{-3} DTT (ditiotrietol), 2,8 mmol dm^{-3} NAD^+ , 4 mmol dm^{-3} antimisien A, 0,23 mmol dm^{-3} TPP (tiamienpirofosfaat), 2mmol dm^{-3} ADP, 10 mmol dm^{-3} K-Pi (pH7,0), 20 μ mol dm^{-3} CoA (koënsiem-A) en gesuiwerde mitochondrions. Die reaksie is met 9 mmol dm^{-3} α -ketogluraat begin.

Appelsuurensiem (ME)

Die NAD^+ -afhanklike ME-aktiwiteit van mitochondrions is bepaal deur die reduksie van NAD^+ by 340 nm in die volgende medium te meet: 80 mmol dm^{-3} K-Pi (pH6,8), 30 mmol dm^{-3} malaat, 0,5 mmol dm^{-3} NAD^+ en 1 mmol dm^{-3} $MnCl_2$. Die reaksie is geïnisieer deur byvoeging van $MnCl_2$, 'n obligate kofaktor vir ME-aktiwiteit,¹¹ en 0,4% (v/v) Triton X-100. Verder is 0,5 mmol dm^{-3} KCN en 1 mmol dm^{-3} SHAM (salisielhidroksaamsuur) bygevoeg om elektronvloei na O_2 te rem.

Malaatdehidrogenase (MDH)

Die aktiwiteit is bepaal deur die oksidasie van NADH by 340 nm te volg.¹² Die reaksie-medium het die volgende bevat: 80 mmol dm^{-3} K-Pi (pH 7,5), 3,75 mmol dm^{-3} $MgCl_2$, 23 mmol dm^{-3} oksaalasetaat en 0,25 mmol dm^{-3} NADH.

Suksinaatdehidrogenase (SDH)

Die aktiwiteit is bepaal deur die reduksie van DCPIP (dichlorofenolindofenol) by 600 nm¹³ in die volgende reaksie-medium te volg: 80 mmol dm^{-3} K-Pi (pH7,5), 0,8 mmol dm^{-3} PMS (fenasienmetosulfaat), 1 mmol dm^{-3} KCN, 96 μ mol dm^{-3} DCPIP en 5 μ mol dm^{-3} ATP. Die reaksie is begin deur byvoeging van 40 mmol dm^{-3} suksinaat.

'n Waarde van 16.1×10^3 dm^3 mol $^{-1}$ cm $^{-1}$ is vir die molare absorbeer vermoë van DCPIP geneem.¹³

Sitochroomoksidase (CO)

Sitochroomoksidase se aktiwiteit is bepaal deur die afname in absorpsie by 550 nm te volg tydens die oksidasie van gereduseerde sitochroom-C. Die reaksie-medium het 70 mmol dm^{-3} K-Pi (pH7,4) en 15 μ mol dm^{-3} gereduseerde sitochroom-C bevat.

Die gereduseerde sitochroom-C is soos volg berei: 0,1 mmol dm^{-3} sitochroom-C is in 20 mmol dm^{-3} K-Pi (pH 7,4) opgelos

en met $40 \text{ mm}^3 \cdot 1.2 \text{ mol dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ gereduseer. Hierna is lug deur die oplossing geborrel om oortollige $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ te oksideer. 'n Waarde van $21.1 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ is as die molare absorbeer vermoë van sitochroom-C geneem.¹⁴

Piruvaatdehidrogenasekompleks (PDH)

Die metode van Dry & Wiskich¹⁰ is gebruik. Die ensiemkompleks is geaktiveer deur die mitochondrionsuspensie vir 0,5 h by 4°C in die volgende medium te inkubeer: 100 mmol dm^{-3} Tris-HCL (Tris(hidroksiemetiel) aminometaan) (pH 7,5), 40 mmol dm^{-3} MgCl_2 en 0,2% (v/v) Triton X-100. Die mengsel is vir 20 min. by 27 000 x g gesentrifugeer en die supernatant is vir aktiwiteitsbepaling gebruik. Die reaksiemengsel het die volgende bevat: 25 mmol dm^{-3} TES (N-tris(hidroksiemetiel)metiel-2-aminoëtaan-sulfoonsuur (pH 7,3), $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ TPP, 1 mmol dm^{-3} MgCl_2 , 1 mmol dm^{-3} NAD^+ , $0,13 \text{ mmol dm}^{-3}$ CoA (koënsiem-A) en 1 mmol dm^{-3} L-sisteien en mitochondrionsuspensie. Hierdie medium is vir 1 min. by 25°C geïnkubeer waarna 1 mmol dm^{-3} Na-piruvaat bygevoeg is.

Proteïenbepaling

Proteïen is by 595 nm volgens die metode van Bradford¹⁵ bepaal. Bees-gammaglobulien is as verwysingstandaard gebruik.

In vivo radioaktiewe merking van mitochondriale proteïene

Die metode van Spencer, et al.,¹⁶ is gebruik.

In alle gevalle is merking van saad met [^{35}S]-metionien onder dieselfde toestande as met die ontkiemingsbehandelings uitgevoer. Merking het gedurende die eerste 10 uur van saadinkubering, dit wil sê voor ontkieming, plaasgevind. Tien sade is in 50 mm^3 -toetsoplossing bevattende $20 \mu\text{Ci}$ [^{35}S]-

metionien (37 TBq mmol^{-1}) geplaas en vir 5 sekondes geëvalueer.

Na inkubering van saad vir 10 uur is sade deeglik met gedistilleerde water gewas en drooggeklad. Mitochondrions is geïsoleer en gesuiwer soos hierbo beskryf is.

Gesuiwerde mitochondrions is in $12,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCL (pH 6,8), 10% (v/v) gliserol, 2 mmol dm^{-3} EDTA (etiëndiamientetra-asynsuur), 2 mmol dm^{-3} PMSF (fenielmetielsulfoniëfluoried), 14 mmol dm^{-3} β -merkaptotanol en 2,3% (m/v) SDS (natrium dodesielsulfaat) gesuspenseer en vir 5 min. by 95°C verhit.

Radioaktiwiteit van mitochondriale proteïen is deur middel van vloeistofsintellasetelling gemeet.¹⁷

Poliakrielamiedjelektroforese (PAGE) en fluorografie

SDS-PAGE is volgens die metode van Laemmli¹⁸ uitgevoer. Jelle is met Coomassie-blou gekleur volgens Fish en Jagendorf.¹⁹ Na ontkleuring is jelle met "Amplify" geïmpregneer, gedroog en aan X-straal film (Hyperfilm-MP) by -80°C blootgestel.

RESULTATE

Saadontkieming

Ontkieming in lug met water as imbiberingsmedium is volledig by 36°C gerem (termoinhibering) (tabel 1). Termoinhibering in lug is in 'n groot mate deur 'n kombinasie van hormone en CO_2 opgehef. Asonderlik was nie een van die faktore in staat om termoinhibering op te hef nie (tabel 1). Termoinhibering is volledig deur 'n kombinasie van O_2 en kinetien en effens minder doeltreffend deur O_2 en etileen opgehef. 'n Kombinasie van O_2 en GA_3 het nie termoinhibe-

TABEL 1 Invloed van O_2 en CO_2 plus hormone en chlooramfenikol op ontkieming van Great Lakes 659-slaaisaad by 25°C en 36°C (gemiddeld \pm standaardfout, $n=3$). Die volgende konsentrasies is gebruik: kinetien (Kin) 10 mg dm^{-3} , Gibberelliensuur (GA_3) 100 mg dm^{-3} , etileen (E) $100 \text{ mm}^3 \text{ dm}^{-3}$, CO_2 , 10% (v/v); O_2 100% en chlooramfenikol (CA) 10 mmol dm^{-3}

Saadbehandeling	% Ontkieming by			
	25°C		36°C	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Lug + H_2O	$96 \pm 0,2$	98 ± 1	0	0
Lug + Kin	$95 \pm 0,3$	$97 \pm 0,4$	0	$1,33 \pm 3$
Lug + E	$94 \pm 0,2$	$98 \pm 0,3$	0	0
Lug + GA_3	93 ± 1	96 ± 2	0	0
Lug + CA	$75 \pm 1,2$	90 ± 1	0	0
Lug + Kin + GA_3 + E + CO_2	90 ± 2	$95 \pm 1,2$	$60 \pm 1,5$	$89 \pm 0,7$
Lug + Kin + GA_3 + E + CO_2 + CA	$93 \pm 0,4$	94 ± 1	0	0
O_2 + H_2O	$96 \pm 0,5$	$98 \pm 0,5$	0	0
O_2 + CA	$92 \pm 0,5$	93 ± 1	0	0
O_2 + Kin	$97 \pm 0,6$	$98 \pm 0,7$	$93 \pm 0,3$	$94 \pm 0,3$
O_2 + Kin + CA	90 ± 2	$91 \pm 0,3$	0	0
O_2 + E	$91 \pm 0,3$	$92 \pm 0,2$	43 ± 5	90 ± 1
O_2 + E + CA	$92 \pm 0,3$	$94 \pm 0,7$	0	0
O_2 + GA_3	$92 \pm 0,1$	$95 \pm 0,3$	0	3 ± 1
O_2 + GA_3 + CA	$90 \pm 0,2$	$93 \pm 0,1$	0	0
O_2 + Kin + E	91 ± 2	$96 \pm 0,1$	92 ± 1	$94 \pm 0,6$
O_2 + Kin + E + CA	$90 \pm 0,3$	93 ± 1	$1 \pm 0,3$	$3 \pm 0,5$

ring opgehef nie. Van die drie behandelings wat termoinhibering opgehef het, was 'n kombinasie van O₂ en kinetien die doeltreffendste aangesien 'n ontkiemingsyfer van meer as 93% reeds na 24 uur weens hierdie behandeling by 36°C verkry is.

Hierdie behandeling is dus in verdere studies gebruik.

Chlooramfenikol het die voordelige invloed van al drie die behandelings wat termoinhibering opgehef het, uitgewis. By 25 °C in lug het chlooramfenikol ontkieming vertraag (tabel 1), maar was toenemend remmend met toename in temperatuur (tabel 2).

Aangesien chlooramfenikol 'n remmer van 70 S-ribosoom proteïensintese is²⁰ en remming van ontkieming deur chlooramfenikol hoofsaaklik by hoë temperatuur tot uiting gekom het, word gepostuleer dat die ontwikkeling van 'n organel deur hoë temperatuur gestrem word. Verder word gepostuleer dat 'n behandeling wat termoinhibering ophef voordelig vir organelontwikkeling is. Daar word voorgestel dat die remmende invloed van chlooramfenikol by hoë temperatuur te wyte is aan belemmering van organelontwikkeling.

Aangesien hoë temperatuur en chlooramfenikol respirasie onderdruk het (kyk later), word voorgestel dat die organel ter sprake mitochondrions is.

Bogenoemde hipotese is in die volgende eksperimente getoets. Weens die hoë koste van gespesialiseerde chemikalieë en om die ekstraksie van mitochondrions binne werkbare limiete te hou, is slegs sekere kardinale behandelings geselekteer.

Voor-ontkiemingsrespirasiekapasiteit, ATP, totale adenilate en adenilaatenergielading (AEC)

Om 'n aanduiding van respiratoriese vermoë te kry, is respirasie van saad wat by 25 °C en 36 °C geïnkubeer is by dieselfde temperatuur, naamlik 25 °C gemeet. Die resultate in tabel 3 toon dat respirasiekapasiteit van saad wat by 36 °C in water geïnkubeer is, laer was as die van die kontrolesaad by 25 °C. Behandeling van saad met O₂ plus kinetien het 'n

respirasiekapasiteit amper gelyk aan die van 25 °C watergeïnkubeerde saad tot gevolg gehad. Chlooramfenikol het die respirasiekapasiteit verminder. Hierdie invloed van chlooramfenikol was groter by 36 °C as by 25 °C geïnkubeerde saad.

Hierdie remming deur chlooramfenikol was egter nie 'n direkte remming van respirasie nie aangesien byvoeging van chlooramfenikol tydens respirasie-meting van voorafwatergeïnkubeerde saad nie respirasie gerem het nie (resultate nie getoon).

Suurstof plus kinetien-behandeling van saad by 36 °C het 'n noemenswaardige toename in die ATP-vlak van saad na 10 h tot gevolg gehad, terwyl die vlakke in saad van al die ander behandelings soortgelyk was.

Die totale adenilaatvlak was ook hoër in saad wat met O₂ plus kinetien behandel is, terwyl die tweede hoogste vlak in die 25 °C-waterkontrolesaad voorgekom het.

Die energielading in saad uit al die behandelings, behalwe die hoë temperatuur chlooramfenikol behandeling, was hoog. By 36 °C het chlooramfenikol 'n merkbare verlaging in AEC tot gevolg gehad.

Etanolproduksie

Die totale etanolproduksie van sade oor 'n 24 h-periode word in tabel 4 getoon. Sade wat by 36 °C in water geïnkubeer is, het merkbaar gefermenteer, terwyl sade by dieselfde temperatuur wat met O₂ plus kinetien behandel is bykans geen fermentasie getoon het nie. By 25 °C is klein hoeveelhede etanol gevorm wat op geringe fermentasie dui.

Mitochondrionaktiwiteit

Die resultate in tabel 5 toon dat hoëtemperatuur-inkubering van saad die respiratoriese kapasiteit van geïsoleerde mitochondrions merkbaar met al drie substrate verlaag het. Suurstof plus kinetien-behandeling van saad het hierdie invloed opgehef en tot gevolg gehad dat die respiratoriese kapasiteit van mitochondrions soortgelyk was aan die van saad wat by 25 °C (water) geïmbibeer is. Chlooramfenikol-

TABEL 2 Invloed van chlooramfenikol (10 mmol dm⁻³) op ontkieming van Great Lakes 659-slaaisaad by verskillende temperature in die lig

Saad-behandeling	Inkuberings-tyd	Temperatuur			
		25 °C	27 °C	30 °C	32 °C
Water	24 h	96 ± 4	90 ± 2	86 ± 10	80 ± 4
	48 h	96 ± 4	94 ± 2	90 ± 10	84 ± 4
Chlooramfenikol	24 h	75 ± 4	66 ± 2	16 ± 1	0
	48 h	92 ± 4	78 ± 2	40 ± 8	34 ± 2

TABEL 3 Voorontkiemings- respiratoriese kapasiteit, ATP, totale adenilaatinhoud en adenilaatenergielading (AEC) van Great Lakes 659-slaaisaad wat by 25 °C en 36 °C vir 10 h geïmbibeer is. (Konsentrasies soos in tabel 1)

Saad-behandeling vir 10 h	O ₂ -opname by 25 °C (nmol g ⁻¹ v.m. min ⁻¹)	ATP nmol saad ⁻¹	Totale adenilate (nmol saad ⁻¹)	AEC
25 °C-lug + H ₂ O	273 ± 15	0,284 ± 0,01	0,690 ± 0,03	0,80 ± 0,1
25 °C-lug + CA	189 ± 6	0,25 ± 0,04	0,354 ± 0,03	0,80 ± 0,1
36 °C-lug + H ₂ O	167 ± 15	0,28 ± 0,03	0,377 ± 0,04	0,82 ± 0,10
36 °C-O ₂ + Kin	256 ± 16	0,641 ± 0,16	0,968 ± 0,04	0,74 ± 0,11
36 °C-O ₂ + Kin + CA	111 ± 8	0,245 ± 0,01	0,520 ± 0,01	0,58 ± 0,04

behandeling van saad het die respiratoriese kapasiteit van mitochondrions verlaag.

Die ADP:O-verhoudings van mitochondrions toon dat hoëtemperatuur-inkubering van saad in water mitochondrions ontkoppel het (tabel 6). Suurstof plus kinetienbehandeling het koppeling herstel, maar chlooramfenikol het hierdie invloed opgehef. By 25 °C het chlooramfenikol slegs ont koppeling van malaatgedrewe elektronvloei teweeggebring, terwyl met NADH en suksinaat as substrate 'n

verlaging in ADP:O-verhoudings waargeneem is.

Wat mitochondriale ensieme betref (tabel 7), is die membraangebonde sitochroomoksidaseaktiwiteit nie deur hoë temperatuur of chlooramfenikol beïnvloed nie. Die matriksensieme α -KGDH, MDH, PDH en ME se aktiwiteite is deur hoë temperatuur verlaag en in die geval van MDH en ME is aktiwiteite deur suurstof plus kinetien by hoë temperatuur herstel tot lae temperatuurvlakke. Chlooramfenikol het verlaging in vlakke van SDH, α -KGDH (slegs by hoë temperatuur) en ME tot gevolg gehad.

TABEL 4 Invloed van O₂ plus kinetien en chlooramfenikol op totale etanolproduksie van Great Lakes 659-slaai-saad na 24 h inkubering by 25 °C en 36 °C

Saadbehandeling	Totale etanolproduksie ($\mu\text{g } 100^{-1}$ sade na 24 h)
25 °C-lug + H ₂ O	5,67 \pm 2
25 °C-lug + CA	5,74 \pm 1,3
36 °C-lug + H ₂ O	17,96 \pm 2,5
36 °C-O ₂ + Kin	1,66 \pm 0,2
36 °C-O ₂ + Kin + CA	1,10 \pm 0,2

Proteïensintese

Inkorporering van [³⁵S]-metionien in proteïene wat na 10 uur van saadinkubering in mitochondrions voorgekom het, is merkbaar deur hoë temperatuur verlaag (tabel 8). Suurstof plus kinetienbehandeling het proteïensintese by 36 °C volkome en tot selfs 'n hoër vlak as in die waterkontrolle by 25 °C laat herstel. Chlooramfenikol het inkorporering van [³⁵S]-metionien in mitochondriale proteïene betekenisvol gerem.

Hierdie kwantitatiewe asook kwalitatiewe verskille van mitochondrionproteïene is duidelik sigbaar in 'n fluorogram van geëkstraheerde proteïene (figuur 1). Die remmende invloed van chlooramfenikol op inkorporering van [³⁵S]-

TABEL 5 Staat 3 O₂-opnamekapasiteit van geïsoleerde gesuiwerde mitochondrions van Great Lakes 659-slaaisaad wat by 25 °C en 36 °C vir 10 h geïmbibeer is. Die volgende respiratoriese substrate is gebruik NADH (10 mmol dm⁻³), suksinaat (10 mmol dm⁻³ + 0,6 mmol dm⁻³ ATP) en malaat (7 mmol dm⁻³ + 0,3 mmol dm⁻³ ATP). Suurstofopname uitgedruk as nmol O₂ mg⁻¹ proteïen min⁻¹. Konsentrasies van Kin, O₂ en CA soos in tabel 1

Saadbehandeling	O ₂ -opname met substrate		
	NADH	Suksinaat	Malaat
25 °C-lug + H ₂ O	43,9 \pm 5	30,2 \pm 3	21,8 \pm 1,5
25 °C-lug + CA	29,9 \pm 0,2	21,8 \pm 1	14,4 \pm 4
% inhibering deur CA	31,9	27,8	33,9
36 °C-lug + H ₂ O	21,8 \pm 1	16,9 \pm 1,9	16,9 \pm 1
36 °C-O ₂ + Kin	43,2 \pm 2	27,5 \pm 0,2	19,3 \pm 0,9
36 °C-O ₂ + Kin + CA	20,3 \pm 5	16,9 \pm 1,4	14,3 \pm 2,4
% inhibering deur CA	52,8	38,4	26,0

TABEL 6 ADP/O-verhoudings van geïsoleerde gesuiwerde mitochondrions van saad wat by 25 °C en 36 °C vir 10 h geïmbibeer is. Konsentrasies van substrate, Kin, O₂ en CA soos in tabel 5

Saadbehandeling	NADH	Suksinaat	Malaat
25 °C-lug + H ₂ O	1,19 \pm 0,36	1,33 \pm 0,4	0,95 \pm 0,33
25 °C-lug + CA	0,99 \pm 0,21	1,17 \pm 0,33	Geen
36 °C-lug + H ₂ O	Geen	Geen	Geen
36 °C-O ₂ + Kin	0,82 \pm 0,3	0,9 \pm 0,1	0,99 \pm 0,09
36 °C-O ₂ + Kin + CA	Geen	Geen	Geen

TABEL 7 Mitochondriale ensiemaktiwiteite van saad wat by 25 °C en 36 °C vir 10 h geïmbibeer is. Konsentrasies van Kin, O₂ en CA soos in tabel 1. Eenhede vir SDH, α -KGDH, PDH, ME en CO: nmol mg⁻¹ proteïen min⁻¹, vir MDH $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteïen min⁻¹

Saadbehandeling	SDH	α -KGDH	MDH	PDH	ME	CO
25 °C-lug + H ₂ O	60,2 \pm 6	18,3 \pm 3	8,1 \pm 1,8	17,7 \pm 10	92,9 \pm 33	274 \pm 6
25 °C-lug + CA	37,0 \pm 5	29,9 \pm 7	6,1 \pm 0,1	16,7 \pm 2	53,9 \pm 2	261 \pm 23
36 °C-lug + H ₂ O	67,4 \pm 3	13,9 \pm 0,4	4,7 \pm 0,4	4,3 \pm 1,6	37,0 \pm 2	263 \pm 10
36 °C-O ₂ + Kin	60,1 \pm 5	14,2 \pm 0,9	11,1 \pm 0,9	4,0 \pm 0,5	92,3 \pm 5	273 \pm 5
36 °C-O ₂ + Kin + CA	40,6 \pm 0,4	3,1 \pm 0,02	7,7 \pm 0,9	4,2 \pm 3	65,6 \pm 11	269 \pm 4

TABEL 8 Invloed van O₂ plus kinetien en chlooramfenikol op die inkorporering van [³⁵S]-metionien in mitochondriale proteïene van Great Lakes 659-slaai-saad wat by 25 °C en 36 °C vir 10 h geïmbebeer is. Konsentrasies van kinetien (Kin), O₂ en chlooramfenikol (CA) soos in tabel 1

Saadbehandeling 10 h	Radioaktiwiteit Bq mg ⁻¹ proteïene
25 °C-lug + H ₂ O	141,68 ± 0,7
25 °C-lug + CA	35,09 ± 4
36 °C-lug + H ₂ O	83,39 ± 4
36 °C-O ₂ + Kin	161,17 ± 6
36 °C-O ₂ + Kin + CA	24,01 ± 2

metionien in mitochondriale proteïene is duidelik sigbaar. Dit is opvallend dat die profiel van radioaktiewe mitochondrionproteïene kwalitatief dieselfde was vir saad by 25 °C (water) en 36 °C (O₂ + kinetien). Die watergeïmbebeerde saad by 36 °C se radioaktiewe mitochondrionproteïeneprofiel was egter kwalitatief anders. Groot verskille tussen die profiel van laasgenoemde en die mitochondrions van die 36 °C O₂ + kinetienbehandeling word met pyltjies aangetoon.

BESPREKING

Tot redelik onlangs was die doeltreffendste behandeling om termoinhibering by slaaisaad teë te werk, 'n kombinasie van hormone en CO₂.^{5,21} Onlangs is aangetoon dat O₂ plus kinetien 'n nog doeltreffender behandeling is om termoinhibering by Grand Rapids-slaai ('n swartsadige kultivar) op te hef.³ In die huidige studie is hierdie bevinding ook vir die witsadige

Great Lakes-kultivar, bevestig.

In 'n vorige studie³ is aangetoon dat hoë temperatuur lae vlakke van ATP in saad tot gevolg het, en dat die opheffing van termoinhibering gepaardgaan met verhoogde ATP-vlakke.

Aangesien ATP-sintese by nie-groen weefsel primêr 'n funksie van mitochondrions is, is gepostuleer dat verlaagde mitochondrionaktiwiteit moontlik 'n rol by induksie van termoinhibering speel en verhoogde mitochondrionaktiwiteit gepaardgaan met opheffing van termoinhibering. Steun vir hierdie hipotese is met die huidige studie verkry.

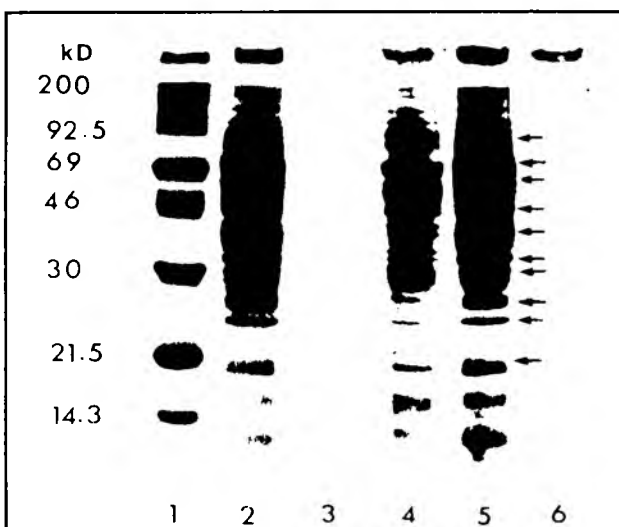
Wat induksie van termoinhibering betref, is aangetoon dat hoë temperatuur verskeie mitochondriongedrewe prosesse verlaag (heelsaadrespirasie, mitochondrionrespirasie, koppeling van mitochondrions, sekere matriksensiem-aktiwiteite en inkorporering van [³⁵S]-metionien in mitochondrionproteïene). Ten spyte van mitochondrion-ontkoppeling is ATP-vlakke egter nie verlaag nie. Heel waarskynlik kon verhoogde substraatvlakfosforilering hiervoor verantwoordelik wees, aangesien sade by 36 °C (water) 'n groot toename in etanolfermentasie getoon het.

Wat opheffing van termoinhibering betref, het 'n suurstof-plus kinetienbehandeling bogenoemde mitochondrion-aktiwiteite tot die van 25 °C-kontrolevlakke herstel of selfs verhoog. Verder is die kwalitatiewe proteïeneprofiel van gesintetiseerde mitochondrionproteïene deur hierdie behandeling volkome tot dieselfde as by 25 °C-kontrolesade herstel.

Addisionele steun vir die rol van mitochondrions is uit die invloed van chlooramfenikol verkry. Chlooramfenikol is 'n remmer van 70S-ribosoomproteïensintese²¹ en kan dus verantwoordelik wees vir remming van proteïensintese by sowel mitochondrions as plastiede. Aangesien chlooramfenikol die stimulerende invloed van O₂ plus kinetien op ontkieming en mitochondrionaktiwiteite opgehef het, word aanvaar dat mitochondrionontwikkeling ter sprake is. Aspekte van die chlooramfenikolinvloed wat verdere bespreking regverdig, was die verskynsel dat hierdie remstof mitochondrionaktiwiteite en proteïensintese tot dieselfde mate by 25 °C en 36 °C gerem het, maar ontkieming is slegs by 36 °C gerem. Verder is sommige mitochondrionmatriksensiem-aktiwiteite ook gerem, terwyl hulle sintese deur die nukleus, en nie mitochondrion nie, gekodeer word. Aansluitend hierby was dit ook merkwaardig dat die voorkoms van [³⁵S]-metioniengemerkte polipeptiede in mitochondrions tot so 'n hoë mate deur chlooramfenikol gerem is.

Mitochondrion-DNA kodeer slegs vir 'n klein persentasie van mitochondrions se polipeptiede.²³ Die nukleus kodeer vir die oorgrote meerderheid van mitochondrionproteïene en die sintese daarvan word nie deur chlooramfenikol gerem nie. Die matriksensieme word onder andere hierby ingesluit. 'n Moontlike verklaring vir die groot remmende invloed van chlooramfenikol kan wees dat sekere membraangebode proteïene wat by die vervoer van ander proteïene oor die membraan betrokke is, moontlik deur mitochondrion-DNA gekodeer word en dat hulle sintese deur chlooramfenikol gerem is. Dit sou kon meebring dat [³⁵S]-metioniengemerkte proteïene wat in die sitosol vervaardig is, nie oor die mitochondrionmembraan vervoer kon word nie.

Die feit dat chlooramfenikol ontkieming slegs by 36 °C gerem het, maar proteïensintese en mitochondrionaktiwiteite in dieselfde mate by 25 °C en 36 °C gerem het, dui daarop dat laer drempelwaardes van noodsaaklike metaboliete/ensieme/proteïene by die optimum temperatuur as by 'n supra-optimale temperatuur benodig word. Indien hierdie afleiding



FIGUUR 1: Fluorogram om die inkorporeringspatroon van [³⁵S]-metionien van mitochondriale proteïene, geïsoleer uit saad wat by 25 °C en 36 °C geïnkubeer is, te toon. Gelyke hoeveelhede proteïene (25 g) is per put gelaai. Baan 1 toon molekulêre standaarde. Die ander bane verteenwoordig elk 'n saadbehandeling soos volg: 2, 25 °C-lug, water; 3, 25 °C-lug, CA; 4, 36 °C-lug, water; 5, 36 °C - O₂ + Kin; 6, 36 °C - O₂ + Kin + CA.

korrek is, beteken dit dat vir ontkieming om by 36 °C te kan plaasvind, daar addisionele vervaardiging van noodsaaklike selbestanddele moet plaasvind. Hierdie gedagte word gesteun deur die bevinding dat suurstof plus kinetien, wat termoinhibering opgehef het, inderdaad 'n toename in ATP-vlakke en omvang van proteïensintese hoër as wat by 25 °C geïnkubeerde sade voorgekom het, tot gevolg gehad het. Dit was ook duidelik dat proteïensintese by termogehibeerde sade kwalitatief anders was as by nie-geïnkubeerde saad.

Die resultate van hierdie studie ondersteun dus die hipotese wat aanvanklik gestel is. Daar word afgelei dat die afname van sekere mitochondrionaktiwiteite, moontlik weens remming van mitochondrionontwikkeling tydens imbibering, 'n veroorsakende faktor by die induksie van termoinhibering van slaaisaad is. Opheffing van termoinhibering blyk gekoppel te wees aan die herstel van hierdie aktiwiteite moontlik tot 'n hoër vlak as by 'n nie-remmende temperatuur.

Summary

In a previous study³ with Grand Rapids lettuce, a black seeded cultivar, a combination of 100% O₂ and kinetin (10 mg dm⁻³) was found to totally alleviate the induction of thermoinhibition at 38 °C. Furthermore this treatment greatly enhanced the ATP level in seeds indicating that enhanced mitochondrial activity could be causative in alleviating thermoinhibition. This hypothesis was tested in the present study in which a white seeded lettuce cultivar, Great Lakes 659 was used.

Seeds were imbibed at 25 °C and 36 °C in the light. The effect of a combination of hormones, CO₂ (10%) and O₂ (100%) on germination as well as the effect of chloramphenicol an inhibitor of 70S ribosome protein synthesis was tested. Whole seed respiration, ethanolic fermentation and ATP levels, mitochondrial respiration, ADP:O ratios, matrix enzyme activities and incorporation of [³⁵S]-methionine in mitochondrial polypeptides was determined in seeds from selected treatments.

In air, germination was inhibited at 36 °C (thermoinhibition). Thermoinhibition was relieved to some extent by a combination of hormones and CO₂ in air, neither factor alone being effective. The most efficient treatment to alleviate thermoinhibition was a combination of 100% O₂ and kinetin (10 mg dm⁻³), followed by a combination of O₂ and ethylene.

Chloramphenicol nullified the beneficial effect of all treatments which in its absence, relieved thermoinhibition. At 25 °C in air chloramphenicol retarded germination during the first 24 h but after 48 h did not severely inhibit germination. However, as the temperature was increased chloramphenicol increasingly inhibited germination.

Pregermination respiratory capacity of whole seeds and isolated mitochondria was reduced and mitochondria were uncoupled in thermoinhibited seeds. Both detrimental effects were alleviated by O₂ plus kinetin. This effect was reversed by chloramphenicol. Activities of α-ketoglutaric acid dehydrogenase, malate dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and malic enzyme were reduced in thermoinhibited seeds. Activities of these enzymes, with the exception of pyruvate dehydrogenase were restored by O₂ plus kinetin.

Incorporation of [³⁵S]-methionine in mitochondrial polypeptides was markedly reduced in thermoinhibited seeds. Oxygen plus kinetin treatment reversed this effect resulting in a higher level of protein synthesis than in 25 °C water

controls. The profile of [³⁵S]-methionine labelled mitochondrial polypeptides from thermoinhibited seeds differed qualitatively from that of seeds imbibed at 25 °C and seeds treated with O₂ plus kinetin at 36 °C. The [³⁵S]-methionine labelled protein profiles of seeds from the latter two treatments were identical.

The results of this study support the hypothesis that induction of thermoinhibition is related to reduction in mitochondrial function and that stimulation of mitochondrial activity/development could be causative in the alleviation of thermoinhibition.

DANKBETUIGING

Finansiële steun vir hierdie werk is vanaf die Universiteit van die Oranje-Vrystaat en die Stigting vir Navorsingsontwikkeling ontvang.

LITERATUURVERWYSINGS

- Kristie, D.N., Bassi, P.K. & Spencer, M.S. (1981). Factors affecting the induction of secondary dormancy in lettuce, *Plant Physiol.*, 67, 1224-1229.
- Thompson, D.A., Cox, S.A. & Sanderson, R.H. (1979). Characterization of germination response to temperature of lettuce (*Lactuca sativa* L.) achenes, *Annals of Botany*, 43, 319-334.
- Small, J.G.C., Schultz, C. & Cronje, E. (1993). Relief of thermoinhibition in Grand Rapids lettuce seeds by oxygen plus kinetin and their effects on respiration, content of ethanol and ATP and synthesis of ethylene, *Seed Sci. Res.*, 3, 129-135.
- Vidaver, W. & Hsiao, A.I. (1975). Secondary dormancy in light-sensitive lettuce seeds incubated anaerobically or at elevated temperature, *Can. J. Bot.*, 53, 2557-2560.
- Saini, H.S., Consolacion, E.D., Bassi, P.K. & Spencer, M.S. (1986). Requirement for ethylene synthesis and action during relief of thermoinhibition of lettuce seed germination by combinations of gibberellic acid, kinetin and carbon dioxide, *Plant Physiol.*, 81, 950-953.
- 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.
- Small, J.G.C., Potgieter, G.P. & Botha, F.C. (1989). Anoxic seed germination of *Erythrina caffra*: Ethanol fermentation and response to metabolic inhibitors, *J. Exp. Bot.*, 40, 375-381.
- Morohashi, Y., Seto, T. & Matsushima, H. (1991). Appearance of alternative respiration in cucumber cotyledon mitochondria after treatment with cycloheximide, *Physiol. Plant.*, 83, 640-646.
- Neuburger, M. (1985). Preparation of plant mitochondria, criteria for assessment of mitochondrial integrity and purity, survival *in vitro*. In *Encyclopedia of plant physiology*. Douce, R. & Day, D.A. eds. (Springer-Verlag, Berlin), pp. 7-24.
- Dry, I.B. & Wiskich, J.T. (1987). 2-Oxoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase activities in plant mitochondria: Interaction via a common coenzyme A pool, *Arch. Biochem. Biophys.*, 257, 92-99.
- 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.
- Cooper, T.G. (1977). *The tools of biochemistry* (Wiley, New York), pp. 351-352.
- Cook, N.D. & Cammack, R. (1985). Properties of a soluble rotenone insensitive NADH dehydrogenase released from *Arum maculatum* mitochondrial membranes by sonication, *Biochim. Biophys. Acta*, 827, 30-35.
- Van der Plas, L.H.W., Jobse, P.A. & Verleur, J.D. (1976). Cytochrome C dependent, antimycin-A resistant respiration in mitochondria from potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). Influence of wounding and storage time on outer membrane NADH-cytochrome-c-reductase, *Biochim. Biophys. Acta*, 430, 1-12.
- Bradford, M.M. (1977). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the princi-

- ple of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
16. Spencer, D., Higgins, T.J.V., Bullou, S.C. & Davey, R.A. (1980). Pulse-labeling studies on protein synthesis in developing pea seeds and evidence of a precursor form of legumin small subunit, *Plant. Physiol.*, 66, 510-515.
 17. Botha, F.C., & Small, J.G.C. (1985). Effect of water stress on the carbohydrate metabolism of *Citrullus lanatus* seeds during germination, *Plant Physiol.*, 77, 79-82.
 18. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
 19. Fish, I.E. & Jagendorf, A.T. (1982). High rates of protein synthesis by isolated chloroplasts, *Plant Physiol.*, 70, 1107-1114.
 20. Sotelo, J.N. & Ho, T-HD. (1987). Absence of heat shock protein synthesis in isolated mitochondria and plastids from maize, *J. Biol. Chem.*, 262, 12288-12292.
 21. Keys, R.D., Smith, O.E., Kumamoto, J. & Lyon, J.L. (1975). Effect of gibberellic acid, kinetin and ethylene plus carbon dioxide on the thermodormancy of lettuce seed (*Lactuca sativa* L. cv. Mesa 659), *Plant Physiol.*, 56, 826-829.
 22. Schuster, W. & Brennicke, A. (1994). The plant mitochondrial genome: Physical Structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45, 61-78.