دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد شانزدهم، شماره اول، ۱۳۸۸
www.gau.ac.ir/journals

مطالعه الکتروفورزی شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای و فعالیت پروتئازی در دانه‌های گردویی ایرانی پس از آبنوشی

منیره زارعی‌قادیکلایی[۱]، *حمیدرضا صادقی‌پور[۲]، علیرضا شاکری[۳] و احمد عبدل‌زاده[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان، [۲]استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان،
[۳]دانشیار گروه شیمی، دانشگاه گلستان، [۴]دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۲۰

چکیده

دانه‌های گردوی بالغ در وضعیت خواب هستند، از این‌رو برای رویش می‌بایستی پس از آبنوشی در شرایط سرد ۵ درجه سانتی‌گراد یعنی استراتیفیکاسیون قرار گیرند. اگرچه شکستن ذخایر غذایی در دانه‌های درختی آبنوشی شده تحت شرایط گرم انجام نمی‌شود، ولی در دانه‌های گردو گزارش شده است. اطلاعات چندانی در سطوح پروتئین و آنزیم در مورد فرآیندهای پروتئولیتیکی دانه‌های آبنوشی شده گردو وجود ندارد. دانه‌های گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) پس از آبنوشی، برای دوره‌های زمانی متفاوت حداکثر به‌مدت ٦٠ روز در درجه حرارت ۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. حداکثر درصد جوانه‌زنی در دانه‌های تیمار ۳۰ روز استراتیفیکاسیون ٦١ درصد رخ داد، در حالی‌که درصد جوانه‌زنی دانه‌های تحت شرایط گرما ۲۳ درصد بود. در تیمار گرما نسبت به سرما سرعت اضمحلال پروتئین کل بیشتر بوده، در حالی‌که میزان پروتئین محلول تحت هر دو شرایط گرم و سرد بدون تغییر باقی ماند. میزان گلوتلین‌ها با اجرام ملکولی ۲۳-۱۹ و ۳۵-۳۲ کیلو دالتون و ویسیلین‌ها با اجرام ملکولی ٤٩-٤٢ کیلودالتون در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های کل تحت دو تیمار سرما و گرما تغییر چندانی نداشت. الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول افزایش شدت باندهای پروتئینی ۵۸ و ٤٨-٤١ کیلودالتونی و کاهش شدت باند ۱۸ کیلودالتونی را نشان داد. افزایش شدت برخی از باندهای

* مسئول مکاتبه: hamidrezasadegh@yahoo.com

پلی‌پپتیدی در فاز محلول را می‌توان ناشی از افزایش انحلال پروتئین‌های ذخیره‌ای، پروتئولیز یا سنتز نو (*de novo synthesis*) آن‌ها دانست، در حالی‌که کاهش شدت باندهای پلی‌پپتیدی ناشی از فرآیند پروتئولیتیکی می‌باشد. زمانی‌که از آزوکازئین به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید، ماکزیمم فعالیت پروتئازی عصاره‌های دانه گردو در pH برابر ٦ مشاهده شد. عدم تفاوت معنی‌دار در فعالیت پروتئولیتیکی بین شرایط استراتیفیکاسیون و گرما حاکی از احتمال دخالت پروتئازهای دیگر در شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه‌های گردو است.

واژه‌های کلیدی: استراتیفیکاسیون، الکتروفورز، پروتئین ذخیره‌ای، پروتئاز، دانه گردو

مقدمه

در بسیاری از گیاهان، رویش دانه علی‌رغم شرایط مطلوب محیطی صورت نمی‌گیرد که به این وضعیت خواب دانه[1] گفته می‌شود. یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای از بین بردن خواب به‌ویژه در مورد گونه‌های درختی مناطق معتدله قرار دادن دانه در شرایط سرد و مرطوب (درجه حرارت ١ تا ٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١ الی ٦ ماه) می‌باشد که اصطلاحاً به آن استراتیفیکاسیون می‌گویند (چی‌ان و همکاران، ١٩٩٨؛ لین و همکاران، ١٩٩٤؛ لی و راس، ١٩٩٠). ناتوانی دانه‌های در حال خواب جهت رویش را ناشی از وجود موانع متابولیکی جهت شکستن ذخایر غذایی می‌دانند، به‌طوری‌که حذف این موانع توسط سرما رویش دانه را میسر می‌سازد (لیواک و همکاران، ٢٠٠٠؛ راس، ١٩٨٤). پروتئین‌های ذخیره‌ای که در دانه‌ها، سنتز و ذخیره می‌شوند به‌طور عمده شامل گلوبولین‌های کم‌محلول و گلوتلین‌های نامحلول می‌باشند (اوسبورن، ١٩٢٤). این پروتئین‌ها به‌عنوان منبع مهم نیتروژن و کربن در طی رویش و رشد گیاهچه مصرف می‌شوند. در شرایط مطلوب رویش دانه، انحلال این پروتئین‌ها افزایش یافته و به‌عنوان سوبستراهای مناسب پروتئازهای درون‌زاد جنین شکسته و مصرف می‌شوند (وونگ و همکاران، ٢٠٠١). شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای نشان‌دهنده برطرف شدن موانع متابولیکی فرآیندهای پروتئولیتیک می‌باشد. استراتیفیکاسیون در نوعی بازدانه به نام *Pseudotusga menziesii* باعث شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای می‌گردد (فوروارد و همکاران، ٢٠٠١؛ گرین و همکاران، ١٩٩١). افزایش فعالیت پروتئازها در طول دوره استراتیفیکاسیون در نتیجه سنتز پروتئازهای جدید و غیرفعال شدن ممانعت‌کننده‌های پروتئازی است که به‌طور طبیعی در بافت وجود دارند (سالیما و میکولا، ١٩٨٠). در

1- Seed Dormancy

طی استراتیفیکاسیون دانه‌های سیب، میزان فعالیت پروتئازها افزایش می‌یابد و این فعالیت منحصراً در محورهای جنینی مشاهده می‌شود (زارسکا- ماسیجیوسکا و لیواک، ۱۹۸۳). در نهاندانگان هیدرولیز اولیه پروتئین‌ها در محورهای جنینی صورت می‌گیرد. این در حالی است که هیدرولیز پروتئین‌های ذخیره‌ای لپه‌ها بعد از جوانه‌زنی انجام می‌شود (شلرت و همکاران، ۲۰۰۰). در طی استراتیفیکاسیون دانه‌های سیب و فندق نیز شکستن ذخایر پروتئینی از چنین الگویی تبعیت می‌کند، بدین‌معنی که شکستن این ذخایر ابتدا در محور جنینی انجام می‌شود (اندریوتیس و همکاران، ۲۰۰٤؛ لی و راس، ۱۹۹۰؛ داویدوویس- گرزگورزیوسکا، ۱۹۸۹). علاوه‌بر این مطالعات انجام شده برروی افرای قندی[1] افزایش ظرفیت سنتز پروتئین در جنین در طی استراتیفیکاسیون و تغییر در میزان پروتئین‌های اختصاصی را نشان می‌دهد که سبب برطرف کردن خواب دانه می‌شوند. پروتئین‌های ویژه‌ای در لپه‌ها سبب ابقای خواب در دانه‌های افرا می‌شوند و به‌نظر می‌رسد که تیمار استراتیفیکاسیون با کاهش این پروتئین‌ها سبب برطرف شدن خواب دانه می‌شود (هانس و بیوینگتون، ۱۹۹۲). گردو یکی از گونه‌های درختی مناطق معتدله ایران می‌باشد. گونه‌های مختلف گردو به ۱ الی ۳ ماه استراتیفیکاسیون نیاز دارند (کائور و همکاران، ۲۰۰٦). دانه گردو حاوی ۱٦/٦٦ درصد پروتئین شامل آلبومین، گلوبولین، پرولامین وگلوتلین می‌باشد که گلوتلین بیشترین مقدار یعنی حدود ۷۰ درصد پروتئین دانه را تشکیل می‌دهد (سز- تائو و سات، ۲۰۰۰؛ تیوبر و همکاران، ۱۹۹۹). شکستن ذخایر پروتئینی در طی استراتیفیکاسیون دانه‌های گردو گزارش شده است و نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که در دانه‌های گردو پروتئازی با جرم مولکولی زیاد و با pH بهینه اسیدی تا خنثی در دانه ذخیره شده است (عینعلی و صادقی‌پور، ۲۰۰۷). در هر صورت هیچ‌گونه اطلاعی از میزان و گستردگی فعالیت این پروتئازها و الگوی تغییر فعالیتشان در طی دوره خواب دانه‌های گردو در دست نمی‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی بیشتر فرآیند پروتئولیز در دانه‌های آبنوشی شده گردو تحت دو شرایط سرما و گرما است تا از این طریق بتوان به ماهیت پروتئازهای درگیر در این فرآیند به‌عنوان بخشی از عوامل کنترل‌کننده متابولیسم دانه‌های در حال خواب پی برد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: دانه‌های گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) به‌مدت ۲٤ ساعت در آب خیسانده و پس از سترون‌سازی سطحی توسط هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد و شستشوی مجدد با آب مقطر در

1- *Acer Saccharum* Marsh

دو لایه پارچه استریل و مرطوب قرار گرفتند. سپس این دانه‌ها برای تیمار استراتیفیکاسیون سرد برای فواصل ١٠ روزه (تا ٦٠ روز) در دمای ٥ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در تیمار استراتیفیکاسیون گرم دانه‌های مذکور با فواصل ٤ روزه (تا ٢٠ روز) در محیط کشت شنی و در درجه حرارت ٢٧ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس به دانه‌هایی که در دوره‌های متفاوتی تیمار سرما را دریافت کرده بودند (سه تکرار و هر تکرار شامل ٢٥ دانه) محیط کشت شنی در دمای ٢٧ درجه سانتی‌گراد انتقال یافته و میزان جوانه‌زنی آن‌ها در طی مدت چهل روز بررسی گردید. میزان رویش دانه‌هایی که از ابتدا در محیط کشت شنی در شرایط گرم ٢٧ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند نیز ثبت گردید و برای مقایسه اثر تیمار سرما در رویش دانه استفاده گردید. به‌علاوه از دانه‌های دو تیمار استراتیفیکاسیون سرد و گرم برای تجزیه و تحلیل‌های بیوشیمیایی استفاده گردید.

استخراج پروتئین کل با استفاده از روش استون و گیفورد (١٩٩٧) همراه با تغییراتی انجام شد. این تغییرات شامل حذف مرحله استخراج پروتئین با بافر فسفات (با pH معادل ٧/٥) و استفاده از بافرتریس ٠/٠٦ مولار با pH معادل ٨/٥ (به جای ٦/٨) حاوی سدیم دودسیل سولفات ٢ درصد و گلیسرول ١٠ درصد بود. اندازه‌گیری پروتئین کل به روش مارک‌ول و همکاران (١٩٨١) انجام گردید.

برای استخراج پروتئین محلول یک گرم بافت لپه یا محور جنینی، با ٦ میلی‌لیتر بافر استخراج خرد و هموژنیزه گردید. ترکیب بافر استخراج شامل تریس بازی ٠/١ مولار با اسیدیته ٧/٥، ساکارز ٠/٤ مولار، کلرید پتاسیم ١٠ میلی‌مولار، سولفات منیزیم یک میلی‌مولار، اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA) یک میلی‌مولار، فنیل‌متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) یک میلی‌مولار، پلی‌وینیل پلی‌پیرولیدون (PVPP) ٠/٦ درصد و ٢- مرکاپتواتانول ٥٠ میلی‌مولار بود. عمل استخراج در هاون سرد انجام شد و عصاره حاصل پس از صاف شدن توسط دو لایه پارچه ململ به‌مدت ١٥ دقیقه با شتاب g ×١٠٠٠٠ سانتریفیوژ شد. فاز بالایی به‌دست آمده پس از سانتریفیوژ برای اندازه‌گیری پروتئین محلول به روش برادفورد (١٩٧٦) به‌کار رفت.

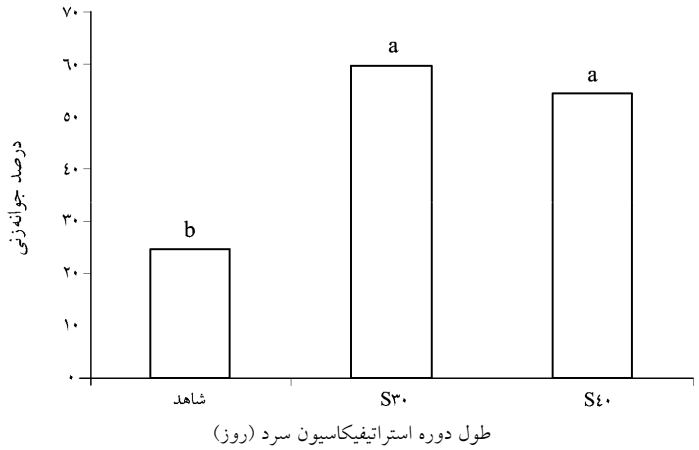
الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات- پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) پروتئین‌ها به روش فلینگ و گریگرسون (١٩٨٦) انجام شد.

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت پروتئاز به روش ویلسون و همکاران (١٩٨٨) همراه با تغییراتی انجام گردید.

همه اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام گردید و میزان معنی‌دار بودن داده‌ها با استفاده از آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن با نرم‌افزار SAS (٢٠٠١) ارزیابی شد.

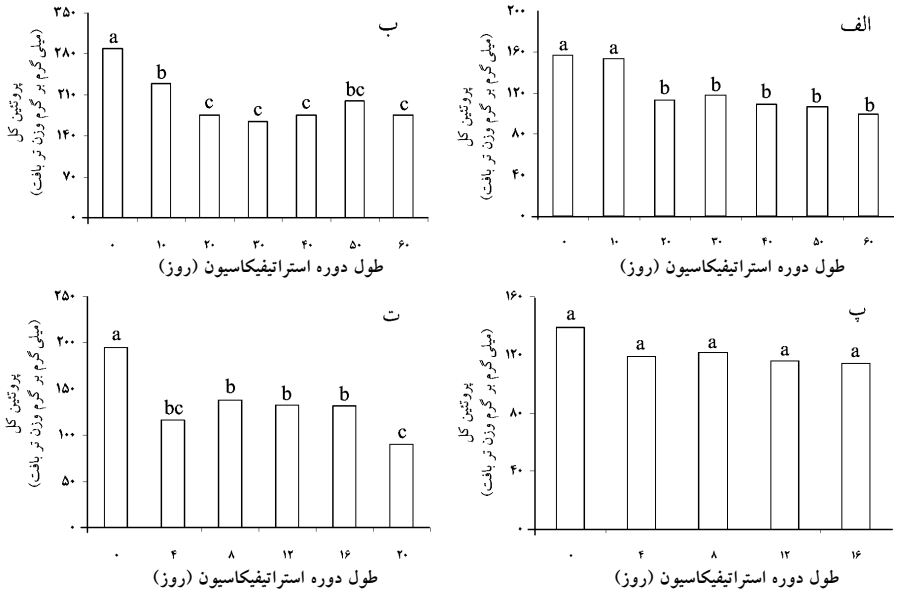
نتایج و بحث

نتایج حاصل از رویش جوانه‌زنی دانه‌های گردو نشان داد که دانه‌هایی که ۳۰ روز تیمار استراتیفیکاسیون را گذرانده بودند بالاترین درصد جوانه‌زنی یعنی ۶۱/۳۱ درصد را نشان دادند (شکل ۱). بنابراین به‌نظر می‌رسد که استراتیفیکاسیون دانه‌های گردوی ایرانی به‌مدت ۳۰ روز برای برطرف کردن خواب دانه‌ها کافی است. سایر پژوهشگران نیز نتایج مشابهی را در خصوص جوانه‌زنی دانه‌های گردو در دو شرایط گرما و استراتیفیکاسیون نشان داده‌اند (کائور و همکاران، ۲۰۰۶). در این حالت مشخص شده است که تیمار سرما و اسید جیبرلیک درصد رویش دانه را افزایش می‌دهند (کائور و همکاران، ۲۰۰۶). مطالعات در مورد اثر استراتیفیکاسیون بر درصد رویش بسیاری از دانه‌ها نشان‌دهنده یک رابطه مستقیم بین طول دوره استراتیفیکاسیون و افزایش درصد جوانه‌زنی است (چی‌ان و همکاران، ۱۹۹۸؛ لین و همکاران، ۱۹۹٤؛ لی و راس، ۱۹۹۰). به‌عنوان مثال در دانه‌های فندق ٤ الی ٦ هفته (لی و راس، ۱۹۹۰) و در گونه‌ای گلابی ۳ الی ٤ هفته (لین و همکاران، ۱۹۹٤) استراتیفیکاسیون برای برطرف شدن خواب لازم است. بسیاری از دانه‌های آبنوشی شده گردو تحت شرایط گرم اضمحلال یافته و رویش کمتری را نشان می‌دهند. در این حالت درصد رویش دانه در بهترین حالت در حدود ۲۳ درصد باقی می‌ماند (شکل ۱). به همین دلیل مسأله امکان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی از دانه‌های گردو در شرایط گرم پس از ۲۰ روز مقدور نبود.



شکل ۱- اثر طول دوره استراتیفیکاسیون سرد بر درصد جوانه‌زنی دانه‌های آبنوشی شده گردو. تیمارها عبارتند از شاهد: بدون تیمار سرما، S۳۰: استراتیفیکاسیون برای ۳۰ روز و S٤۰: استراتیفیکاسیون برای ٤۰ روز.

پروتئین کل در لپه‌ها و محورهای جنینی دانه‌هایی که در شرایط استراتیفیکاسیون قرار گرفته بودند تا روز بیستم تیمار روند کاهشی داشت (شکل ٢- الف و ب). بیشترین کاهش پروتئین کل در لپه‌هایی که فقط برای ٤ روز در شرایط گرم قرار گرفته بودند مشاهده گردید و از روز چهارم تیمار گرما تا انتهای دوره، مقدار پروتئین کل هم‌چنان بدون تغییر باقی ماند (شکل ٢- ت). مقدار پروتئین کل در محورهای جنینی دانه‌های آبنوشی شده در شرایط گرم از لحاظ آماری تفاوت قابل ملاحظه‌ای را در طول زمان نشان نداد (شکل ٢- پ). بنابراین برخلاف سیب و فندق که شکستن ذخایر غذایی فقط در طی شرایط سرما (استراتیفیکاسیون) در دانه‌های آبنوشی شده انجام می‌شود (اندریوتیس و همکاران، ٢٠٠٤؛ داویدوویس- گرزگورزیوسکا، ١٩٨٩) در دانه‌های گردو در هر دو شرایط سرما و گرما شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای رخ می‌دهد. به‌علاوه بیشترین تغییرات ذخایر در هر دو شرایط سرما و گرما در لپه‌ها و نه در محور جنینی مشاهده می‌گردد.

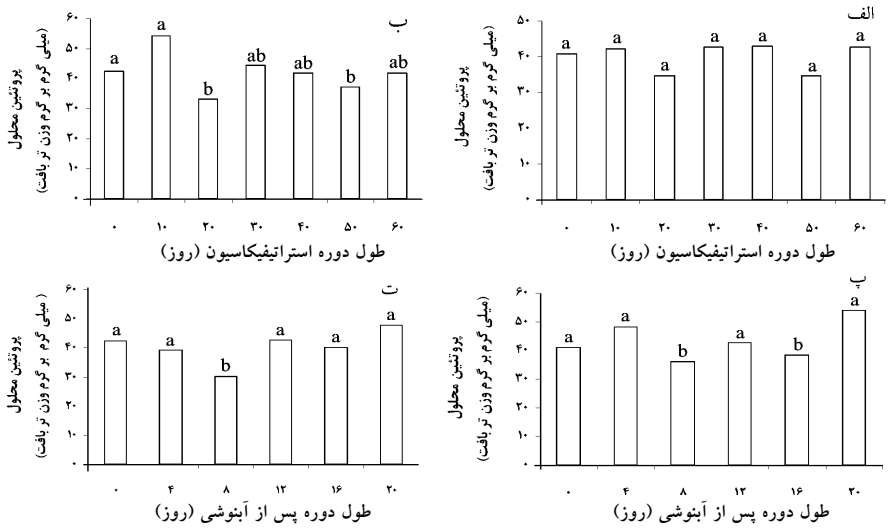


شکل ٢- الگوی تغییرات پروتئین کل دانه‌های گردو تحت تیمار استراتیفیکاسیون و شرایط گرم.

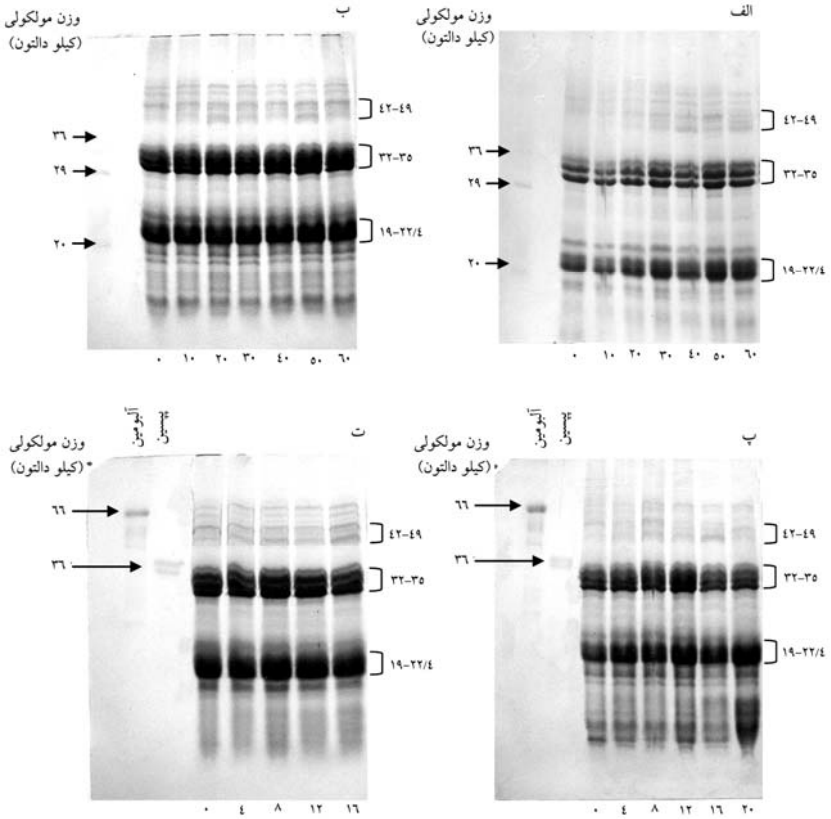
(الف) محور جنینی- استراتیفیکاسیون. (ب) لپه- استراتیفیکاسیون. (پ) محور جنینی- شرایط گرم و (ت) لپه- شرایط گرم. عدم نمایش داده‌های روز بیستم در شکل پ به‌دلیل از بین رفتن دانه‌های گردوی مربوط به این تیمار بود.

برخلاف پروتئین کل، میزان پروتئین‌های محلول در دانه‌های گردو چه در لپه‌ها و چه در محور جنینی در طی دوره استراتیفیکاسیون سرد یا شرایط گرما در حد نسبتاً ثابتی بدون تغییر باقی ماند (شکل۳- الف و ب). با توجه به این‌که قبل از اضمحلال و شکسته شدن پروتئین‌های ذخیره‌ای، میزان حلالیت آن‌ها افزایش می‌یابد (وونگ و همکاران، ۲۰۰٤؛ یانو و همکاران، ۲۰۰۱). سطوح نسبتاً بدون تغییر پروتئین‌های محلول دانه‌ها را می‌توان ناشی از توازن نسبی سرعت فرآیندهای انحلالی با فرآیندهای پروتئولیتیک دانست که از یک طرف سبب انتقال پروتئین‌های نامحلول به فاز محلول سلول شده و از طرف دیگر باعث شکسته شدن پروتئین‌های محلول می‌گردد.

الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های کل در لپه‌ها و در محورهای جنینی دانه‌هایی که در شرایط استراتیفیکاسیون یا گرما قرار داشتند (شکل ٤) تغییر مشخصی نشان نداد. این الگو به‌طور عمده شامل گلوتلین‌ها (سز- تائو و سات، ۲۰۰۰) با اجرام ملکولی ۲۳-۱۹ و ۳۵-۳۲ کیلو دالتون بود. به‌علاوه ویسیلین‌ها (تیوبر و همکاران، ۱۹۹۹) با اجرام مولکولی ٤۹-٤۲ کیلودالتون نیز جزء کوچک‌تری را شامل می‌شدند. این ثبات الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های کل حاکی از این است که قسمت اعظم پروتئین‌های ذخیره‌ای گردو به حالت نامحلول بوده و از این‌رو الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های کل به‌طور عمده توسط پلی‌پپتیدهای گلوتلین‌ها و ویسیلین‌ها که در محلول‌های رقیق آبی نامحلولند تعیین می‌گردد (اوسبورن، ۱۹۲٤).



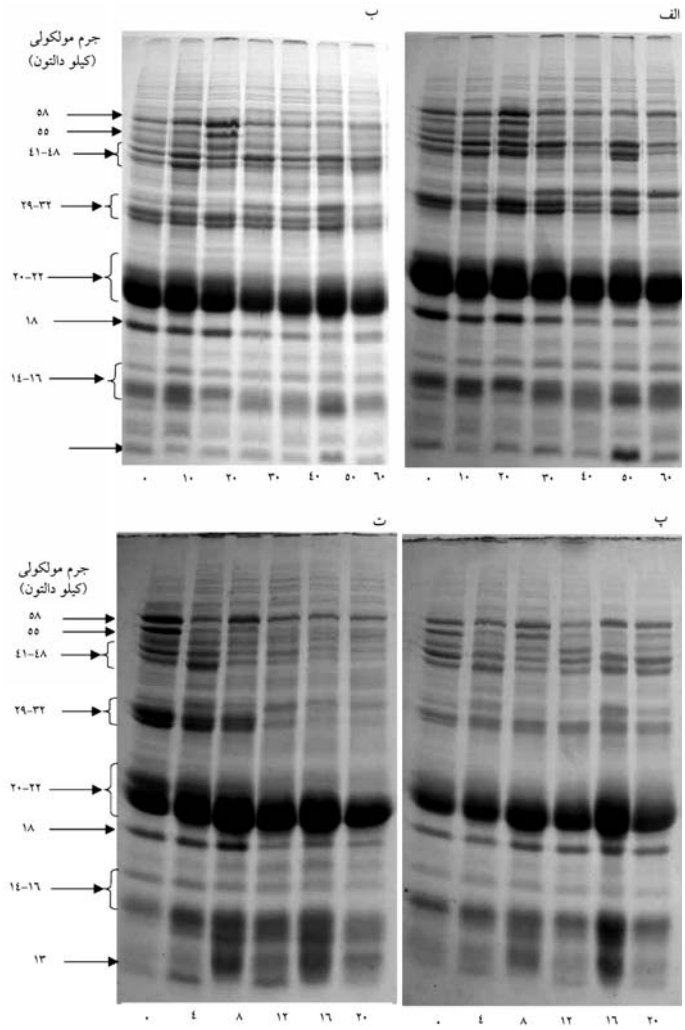
شکل ۳- الگوی تغییرات پروتئین محلول دانه‌های گردو تحت تیمار استراتیفیکاسیون و شرایط گرم. (الف) محور جنینی- استراتیفیکاسیون. (ب) لپه- استراتیفیکاسیون. (پ) محور جنینی- شرایط گرم و (ت) لپه- شرایط گرم.



شکل ٤- الگوی الکتروفورز پروتئین‌های کل دانه‌های گردو تحت تیمار استراتیفیکاسیون و شرایط گرم. (الف) لپه- استراتیفیکاسیون. (ب) محور جنینی- استراتیفیکاسیون. (پ) لپه- شرایط گرم و (ت) محور جنینی- شرایط گرم. پروتئین‌های آلبومین و پپسین به‌عنوان مارکر وزن مولکولی به‌کار رفته‌اند. عدم نمایش داده‌های روز بیستم در شکل ت به‌دلیل از بین رفتن دانه‌های گردوی مربوط به این تیمار بود.

برخلاف الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های کل، الکتروفورز پروتئین‌های محلول دانه‌های آبنوشی شده گردو در هر دو شرایط استراتیفیکاسیون و گرما تغییراتی نشان داد (شکل ٥). به‌عنوان مثال شدت برخی از باندهای پروتئینی مثل ٥٨ یا ٤٨-٤١ کیلودالتونی در طی اوایل دوره استراتیفیکاسیون افزایش یافت، در حالی‌که پروتئین ١٨ کیلو دالتونی روند کاهشی نشان داد. عدم ثبات ترکیب پلی‌پپتیدهای سازنده پروتئین‌های محلول تأییدی بر این ادعا است که مقدار پروتئین‌ها در فاز محلول سلول توسط فرآیندهای انحلالی، سنتزی و پروتئولیتیکی تنظیم می‌گردد. افزایش شدت باندهای پلی‌پپتیدی در این

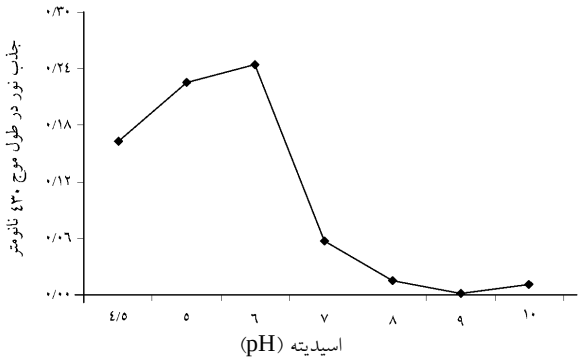
حالت را می‌توان ناشی از افزایش انحلال آن‌ها در اثر پروتئولیز یا فرآیندهای دیگر و ورودشان از فاز نامحلول به محلول یا ناشی از سنتز نو[1] آن‌ها دانست. از طرفی کاهش شدت برخی از باندهای پلی‌پپتیدی را می‌توان ناشی از پروتئولیز و شکسته شدن آنها در نظر گرفت.



شکل ۵- الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول دانه‌های گردو تحت تیمار استراتیفیکاسیون و شرایط گرم. (الف) لپه- استراتیفیکاسیون. (ب) محور جنینی- استراتیفیکاسیون. (پ) لپه- شرایط گرم و (ت) محور جنینی- شرایط گرم.

1- *De Novo Synthesis*

مطالعه تغییر ذخایر غذایی دانه‌های گردو نشان داد که سرعت شکستن ذخایر پروتئینی در نمونه‌هایی که تیمار سرما دریافت نکرده‌اند بیشتر است. این امر نشان‌دهنده فعالیت پروتئولیتیک بیشتر در دانه‌های تیمار گرما نسبت به دانه‌های استراتیفه شده باشد. زیموگرافی عصاره‌های حاصل از دانه‌های گردو به‌منظور شناسایی پروتئازهای مسئول شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای در طول استراتیفیکاسیون نشان‌دهنده پروتئازهای با جرم مولکولی بسیار زیاد بود که بیشتر در pH خنثی فعال بودند و حتی فعالیت آن‌ها در دانه‌های در حال جوانه‌زنی نیز قابل تشخیص بود، گرچه در دانه‌های جوانه‌زده، پروتئازهایی با وزن مولکولی کمتر نیز مشاهده گردید (عینعلی و صادقی‌پور، ٢٠٠٧). در روش زیموگرافی عصاره پروتئازی دی- ناتوره[1] شده ابتدا در ژل آکریل آمید حاوی ژلاتین جدا شده و مجدداً ری- ناتوره[2] می‌شود. در اثر هضم ژلاتین توسط پروتئاز فعالیت پروتئازی را می‌توان در ژل ردیابی کرد. در هر صورت به‌دلیل احتمال ری- ناتوره نشدن تمام پروتئازها در این روش، اطلاعی از میزان و نحوه فعالیت‌های پروتئولیتیکی در دانه‌های گردو در دست نمی‌باشد. با توجه به اهمیت شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای در رویش دانه و با توجه به سرعت متفاوت اضمحلال آن‌ها در دو شرایط گرم و سرد، فعالیت پروتئاز (یا پروتئازهای) درگیر در شکستن این ذخایر در طی شرایط گرم و سرد بررسی گردید. به‌منظور شناسایی پروتئازها توانایی عصاره‌های به‌دست آمده از دانه‌های گردو در هیدرولیز سوبسترای سنتزی آزوکازئین در دامنه pH های مختلف بررسی گردید. نتایج نشان داد که بیشترین فعالیت کازئینولیتیک (پروتئازی) در pH برابر با ٦ می‌باشد (شکل ٦). فعالیت پروتئازی در دامنه pHهای اسیدی کمتر از ٦ قابل ملاحظه بود، ولی در pH بیشتر از ٦ افت شدید فعالیت به‌خصوص در دامنه pHهای خنثی تا قلیایی مشاهده گردید.



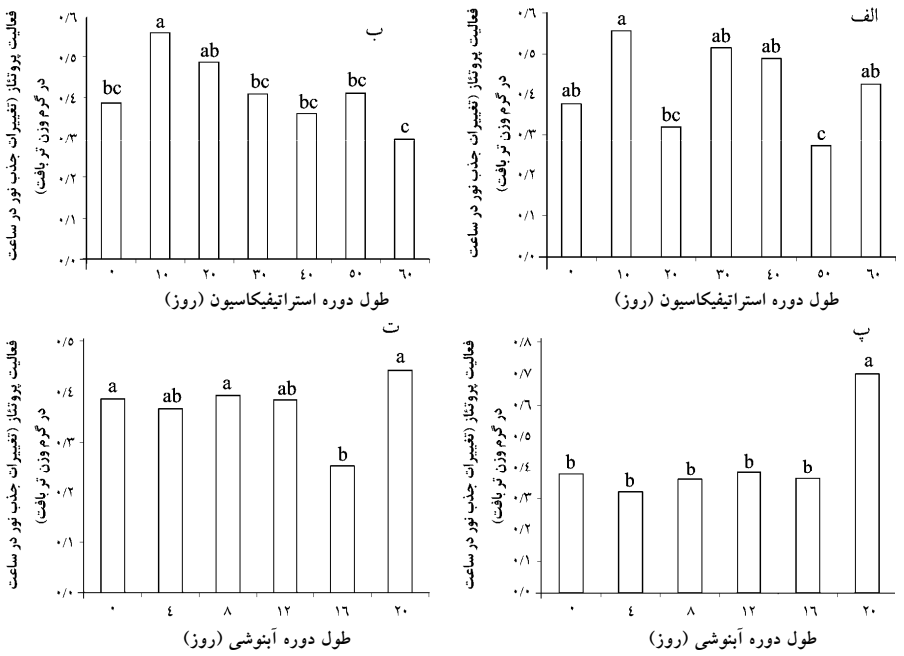
شکل ٦- فعالیت پروتئازی (کازئینولیتیک) عصاره‌های به‌دست آمده از دانه‌های گردو در pHهای مختلف.

1- De-Naturation
2- Re-Naturation

با توجه به این نتایج می‌توان گفت که یک پروتئاز اسیدی احتمالاً در شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه گردو در طی دوره استراتیفیکاسیون دخالت دارد. پروتئازهایی با جرم مولکولی بسیار زیاد که در pH خنثی فعال هستند، هم‌چنین در دانه‌های نوعی بازدانه (*Pseudotusga menziesii*) در طی تیمار استراتیفیکاسیون گزارش شده‌اند (فوروارد و همکاران، ۲۰۰۱). به‌علاوه در همین گیاه استراتیفیکاسیون باعث شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای می‌گردد (گرین و همکاران، ۱۹۹۱). در طول استراتیفیکاسیون دانه‌های سیب نیز میزان فعالیت پروتئازها افزایش پیدا می‌کند و این فعالیت منحصراً در محورهای جنینی مشاهده می‌شود (زارسکا- ماسیجیوسکا و لیواک، ۱۹۸۳). افزایش فعالیت پروتئازها در طول دوره استراتیفیکاسیون در نتیجه سنتز پروتئازهای جدید و غیرفعال شدن ممانعت‌کننده‌های پروتئازی که به‌طور طبیعی در بافت وجود دارند، می‌باشد (سالیما و میکولا، ۱۹۸۰). حداکثر فعالیت پروتئازی در لپه دانه‌های استراتیفه شده در شرایط سرما در روز دهم مشاهده گردید و سپس روندی کاهشی تا انتهای دوره تیمار مشاهده گردید، اما فعالیت پروتئاز در محور جنینی دانه‌های استراتیفه شده روند مشخصی نشان نداد (شکل ۷- الف و ب). در دانه‌های آبنوشی شده در شرایط گرم نیز فعالیت پروتئاز اسیدی روند مشخصی نداشت و تغییر نکرد و فقط در انتهای دوره یعنی در دانه‌های ۲۰ روزه آن هم در محور جنینی افزایش معنی‌دار قابل ملاحظه‌ای نشان داد (شکل۷- پ و ت).

علی‌رغم این‌که سرعت شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای و هم‌چنین مطالعه حاضر در دانه گردو در شرایط گرما بیشتر از سرما است (عینعلی و صادقی‌پور، ۲۰۰۷)، اما مقایسه فعالیت پروتئاز در دو شرایط گرم و سرد نشان داد که فعالیت پروتئاز در شرایط استراتیفیکاسیون نسبت به شرایط گرم تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد. به‌علاوه الگوی تغییر فعالیت کازئینولیتیک با الگوی شکسته شدن پروتئین‌های کل نیز تطابق ندارد. این امر نشان می‌دهد که فعالیت پروتئاز اسیدی شناسایی شده در دانه‌های گردو که با استفاده از سوبسترای سنتزی آزوکازئین اندازه‌گیری شده است، تنها پروتئاز دخیل در شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای در این حالت نبوده و احتمالاً پروتئازهای دیگری نیز در این امر دخالت دارند که هنوز شناسایی نشده‌اند. از این‌رو استفاده از سایر سوبستراهای سنتزی از قبیل Bz-Asn-*p*-nitroanilide یا Bz-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilide و یا با استفاده از سوبسترای طبیعی از قبیل گلوبولین‌های درون‌زاد[1] دانه گردو شاید بتوان آن‌ها را شناسایی کرد.

1- Endogenous



شکل ۷- الگوی فعالیت پروتئاز دانه‌های گردو تحت تیمار استراتیفیکاسیون و شرایط گرم. (الف) محور جنینی- استراتیفیکاسیون. (ب) لپه- استراتیفیکاسیون. (پ) محور جنینی- شرایط گرم و (ت) لپه- شرایط گرم.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر مجید عظیم محسنی از گروه آمار دانشکده علوم دانشگاه گلستان برای مشاوره آماری این مطالعه قدردانی می‌گردد.

منابع

1.Andriotis, V.M.E., Smith, B., and Ross, J.D. 2004. Phytic acid mobilization is an early response to chilling of the embryonic axes from dormant oil seed of hazel (*Corylus avellana* L.). J. Exp. Bot. 56: 537-545.

2.Braford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein ulilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

3.Chien, C.T., Ku-Huang, L.L., and Lin, T.P. 1998. Changes in ultrastructure and abscisic acid level response to applied gibberllins in *Taxus mairei* seeds treated with warm and cold stratification. Ann. Bot. 81: 41-47.

4.Dawidowicz-Grzegorzewska, A. 1989. Degeradation of protein and lipid bodies during dormancy removal in apple seeds. J. Plant Physiol. 135: 43-51.
5.Einali, A.R., and Sadeghipour, H.R. 2007. The alleviation of dormancy in walnut kernels by moist chilling is independent from storage protein mobilization. Tree Physiol. 27: 519-525.
6.Fling, S.P., and Gregerson, D.S. 1986. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris buffer system without urea. Anal. Biochem. 155: 83-88.
7.Forward, B., Tranbarger, S., and Misra, S. 2001. Characterization of proteinase activity in stratified Douglas-fir seeds. Tree Physiol. 21: 625-629.
8.Green, M.G., McLeod, J.K., and Misra, S. 1991. Characterization of Douglas-fir protein body composition by SDS-PAGE and electron microscopy. Plant Physiol. Biochem. 29: 49-56.
9.Hance, B.A., and Bevington, J.M. 1992. Changes in protein synthesis during stratification and dormancy release in embryos of sugar maple (*Acer saccharum*). Physiologia Plantarum, 86: 365-371.
10.Kaur, R., Sharma, N., Kumar, K., Sharma, D.R., and Sharma, S.D. 2006. In vitro germination of Walnut (*Juglans regia* L.) embryos. Sci. Hort. 109: 385-388.
11.Lewak, S., Bogatek, R., and Zarska-Maciejewska, B. 2000. Sugar metabolism in apple embryos. Pp: 47-55, In: Dormancy in plants. (Eds.) Viemont, J.D., and Crabbe, J. CAB International.
12.Li, L., and Ross, J.D. 1990. Lipid mobilization during dormancy breakage in oilseed of *Corylus avellana*. Ann. Bot. 66: 501-505.
13.Lin, C.H., Lee, L.Y., and Tseng, M.J. 1994. The effect of stratification and thdiazuron treatment on germination and protein synthesis of *Pyrus serotina* Rehd cv. Niauli. Ann. Bot. 73: 515-523.
14.Markwell, M.A.K., Hass, S.M., Tolbert, N.E., and Bieber, L.L. 1981. Protein determination in membrane and lipoprotein sample: manual and automated procedure. Methods Enzymol. 72: 296-303.
15.Osborn, T.B. 1924. The vegetable protein. Longmans, Green, London.
16.Ross, J.D. 1984. Metabolic aspects of dormancy. Pp: 45-75, *In* Seed Physiology. Vol. 2. Germination and reserve mobilization. (EDs.) Murray, D.R. Academic press, New york.
17.Salmia, M.A., and Mikola, J.J. 1980. Inhibitions of the endogenous proteinasees in the seeds of Scots pine, *Pinus sylvestris*. Physiologia Plantarum, 48: 126-130.
18.Schlereth, A., Becker, C., Horstmann, C., Tiedemann, J., and Muntz, K. 2000. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). J. Exp. Bot. 51: 1423-1433.

19.Stone, S.L., and Gifford, D.J. 1997. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth: I storage protein reserves. Int. J. Plant Sci. 158: 727-737.
20.Sze-Tao, K.W.C., and Sathe, S.K. 2000. Walnuts (*Juglans regia* L.): Proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein *in vitro* digestibility. J. Sci. Food Agric. 80: 1393-1401.
21.Teuber, S.S., Jarvis, K.C., Dandekar, A.M., Peterson, W.R., and Ansari, A.A. 1999. Identification and cloning of a complementary DNA encoding a vicilin-like proprotein, Jug r2, from English walnut kernel (*Juglans regia* L.*)*, a major food allergen. J. Allergy Clinical Immunol. 104: 1311-1320.
22.Wilson, K.A., Papastoitsis, G., Hartl, P., and Tan-Wilson, A.L. 1988. Survey of the proteolytic activites degrading the kunitz trypsin inhibitor and glycinin in germinating soybeans (*Glycine max*). Plant Physiol. 88: 355-360.
23.Wong, J.H., Cai, N., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Hurkman, W.J., and Yano, H., Wong, J.H., Cho, M.J., and Buchanan, B.B. 2001. Redox changes accompanying the degradation of seed storage proteins in germination rice. Plant Cell Physiol. 42: 879-883.
24.Zarska-Maciejewska, B., and Lewak, S. 1983. The role of proteolytic enzymes in the release from dormancy of apple seeds. Z.Pflanzenphysiol, 110: 409-417.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 16(1), 2009
www.gau.ac.ir/journals

Electrophoretic study of storage protein mobilization and proteolytic activities in imbibed walnut kernels

M. Zarei Ghadikolaee[1], *H.R. Sadeghipour[2], A.R. Shakery[3] and A. Abdolzadeh[4]

[1]M.Sc. student, Dept. of Biology, Golstan University, [2]Assistant Prof., Dept. of Biology, Golstan University, [3]Associate Prof., Dept. of Chemistry, Golstan University, [4]Associate Prof., Dept. of Biology, Golstan University

Abstract

Walnut kernels are dormant at maturity and therefore in order to germinate require moist-chilling or stratification, i.e. incubating imbibed seeds at cold (5ºC) for a certain period. It is assumed that reserve mobilization can not proceed in imbibed dormant seeds incubated at warm condition. In contrast to other dormant tree seeds, imbibing dormant walnut kernels showed storage protein mobilization irrespective of the temperature of incubation. However, there is no information on the nature of proteolytic processes at the protein and enzyme levels in imbibed walnut kernels. Persian walnut (*Juglans regia* L.) kernels were stratified at 5ºC for increasing periods up to 60 days. Thirty days stratified kernels displayed maximum germination percentage of 61% whereas only 23% of warm-incubated kernels germinated. Mobilization of total storage protein in kernels was faster under warm conditions when compared to stratification. Levels of soluble proteins remained unchanged following imbibition in both stratified and warm-incubated kernels. SDS-PAGE patterns of total proteins did not show any changes in walnut 19-23 and 32-35 kDa glutenins and 42-49 kDa vicilins under both temperature regimes. This technique however, revealed alterations in the polypeptide patterns of soluble protein fraction notably increased band intensity of 41-48 and 58 kDa in parallel with reduced band intensity of 18 kDa polypeptides. The increased levels of some polypeptides in the soluble fraction might have been resulted from the increased solubility of insoluble storage proteins, proteolysis or *de novo* protein synthesis, while reduced band intensity is likely to represent proteolytic processes. Using azocasein as a substrate to detect protease (s) involved in storage protein mobilization, a protease most active at pH 6.0 was found in extracts from walnut kernels. Since no significant differences were observed in measured protease activity between stratified and warm-incubated kernels, other proteases are supposed to be involved in the mobilization of walnut kernel storage proteins.

Keywords: Stratification, Electrophoresis, Storage protein, Protease, Walnut kernels

---

* Corresponding Author; Email: hamidrezasadegh@yahoo.com