

Paper Type: Original Article



## Does Pretreatment with a Serine Protease Inhibitor Enhance Walnut Kernel Tolerance to Aging Condition?

Seyedeh Fatemeh Fallah<sup>1</sup>, Farshid Ghaderi-Far<sup>2</sup>, Masoud Golalipour<sup>3</sup>, Hamid Reza Sadeghipour\*<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, Golestan University, Gorgan, Iran;\*(Associate Professor: Corresponding author: [h.r.sadeghipour@gmail.com](mailto:h.r.sadeghipour@gmail.com)).

<sup>2</sup>Department of Agronomy, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

<sup>3</sup>Department of Human Genetics, Gorgan University of Medical Sciences, Iran.

### Citation:

Fallah, S. F., Ghaderi-Far, F., Golalipour, M. & Sadeghipour, H. R. (2024). Does pretreatment with a serine protease inhibitor enhance walnut kernel tolerance to aging condition?. *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 37 (Issue No. 4), PP. 21-34

Received: 2023.12.12

Accepted: 2023.12.26

### Abstract

**Introduction:** Long-term storage of seeds under unfavorable conditions leads to their deterioration associated with decreased germination. Several studies have shown increased lipolysis in deteriorating seeds, but little is known about the role of protease activity during deterioration. In the present study, the effect of the controlled deterioration (CD) on the mobilization of storage proteins and the effects of pretreatment with protease inhibitor (PMSF) on the germination percentage of walnut kernels after CD were investigated.

**Methods:** Kernels were adjusted to 15 and 20 percent moisture content with water (control) or PMSF solution and then incubated for 3 and 6 days at 45°C for CD .

**Results:** CD increased soluble proteins, solubility of 19-24 kDa glutelins, increased activity of 80 kDa protease, accumulation of total amino acid, proline and protein carbonylation. Although aging-dependent decrease of germination was similar in both control and PMSF pretreatment, the aged kernels in PMSF pretreatment had lower proline, amino acid and carbonyl groups contents compared to the control. These results suggest that CD causes increased solubility of protein reserves, but the inhibition of serine protease(s), unlike lipase, has no effect on improving the adverse physiological effects of CD including germination loss, and only at the biochemical level, it partially improved kernel response to stress.

**Conclusion:** Identification of different metabolic pathways operating during CD of kernels can draw a picture of deterioration mechanism and also leads to introducing protocols for the quality and viability maintenance of kernels during storage.

**Keywords:** Carbonylation, Controlled deterioration, Germination, Protease, Storage proteins, Walnut





## آیا پیش‌تیمار دانه‌های گردو با بازدارنده سرین-پروتئازی سبب افزایش مقاومت آن در برابر زوال می‌شود؟

سیده فاطمه فلاح<sup>۱</sup>، فرشید قادری فر<sup>۲</sup>، مسعود گلعلی پور<sup>۳</sup>، حمیدرضا صادقی‌پور<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

(\*نویسنده مسئول: [h.r.sadeghipour@gmail.com](mailto:h.r.sadeghipour@gmail.com))

<sup>۲</sup>گروه زراعت، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

<sup>۳</sup>گروه ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی گرگان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۱

### چکیده

**مقدمه:** نگهداری طولانی بذر در شرایط نامناسب منجر به زوال و کاهش جوانه‌زنی می‌شود. زوال بذر همراه با افزایش فعالیت لیپازی است با این حال از نقش فعالیت‌های پروتئازی در طی زوال اطلاع اندکی وجود دارد. در مطالعه حاضر، تاثیر فرآیند زوال کنترل شده بر شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای و اثرات پیش‌تیمار با مهارکننده پروتئازی فنیل‌متیل سولفونیل‌فلوراید (PMSF) بر درصد جوانه‌زنی دانه‌های گردو پس از زوال بررسی شد.

**روش‌ها:** دانه‌های گردو که میزان رطوبت‌شان با آب (شاهد) یا محلول PMSF در سطح ۱۵ درصد و ۲۰ درصد تنظیم شده بود به مدت ۳ و ۶ روز در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به منظور زوال کنترل شده قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** زوال کنترل شده منجر به افزایش پروتئین‌های محلول، شکستن گلوپلین‌های ۲۴-۱۹ کیلودالتون، تشدید فعالیت پروتئاز ۸۰ کیلودالتونی، انباشت اسید آمینه کل، پرولین و کربنیل‌اسیون پروتئین شد. اگرچه درصد جوانه‌زنی به میزان مشابهی در دانه‌های شاهد و پیش‌تیمار PMSF کاهش یافت اما دانه‌های زوال یافته در پیش‌تیمار PMSF در مقایسه با شاهد دارای محتوای پرولین و اسید آمینه و گروه‌های کربنیل کمتری بودند. این نتایج حاکی از این است که زوال سبب تشدید شکستن ذخایر پروتئینی دانه‌های گردو می‌شود، اما مهار فرآیندهای پروتئازی بر خلاف لیپازی، تاثیری بر بهبود اثرات نامطلوب فیزیولوژیکی زوال از جمله افت جوانه‌زنی نداشته و فقط در سطح بیوشیمیایی تا حدی سبب بهبود پاسخ به تنش شده است.

**نتیجه‌گیری:** شناسایی هر چه بیشتر مسیرهای متابولیکی فعال شده در طی زوال دانه‌های گردو می‌تواند تصویری کلی از مکانیسم زوال دانه‌های گردو را فراهم کند و منجر به ارائه روش‌هایی جهت حفظ کیفیت و زنده‌مانی بیشتر دانه‌های گردو در طی ذخیره‌سازی در انبار شود.

**کلیدواژه‌ها:** پروتئین‌های ذخیره‌ای، پروتئاز، جوانه‌زنی، زوال کنترل شده، کربنیل‌اسیون، گردو

## مقدمه

زوال دانه به کاهش کیفیت، زنده‌مانی و قدرت دانه‌ها با گذشت زمان در طبیعت یا به هنگام نگهداری در انبار اشاره دارد [1]. زوال نه تنها از قدرت جوانه‌زنی دانه می‌کاهد بلکه سبب کاهش کیفیت ذخایر غذایی آن نیز می‌شود و بنابراین از دیدگاه کشاورزی و همچنین صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است. زوال دانه همراه با تجمع تدریجی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) منجر به کاهش یکپارچگی سیستم غشاء سلولی و تخریب DNA/RNA پروتئین و در مجموع کاهش قدرت دانه می‌شود [2]، [3]. تشدید تنفس در رطوبت بالاتر نیز یکی از منابع اصلی تولید ROS است [4]. در واقع، وقوع واکنش‌های اکسیداتیو تا حد زیادی وابسته به رطوبت دانه (MC) است. در محتوای بسیار کم رطوبتی، احتمال وقوع واکنش‌های اکسیداتیو غیرآنزیمی در فرآیند زوال زیاد است، اما با افزایش محتوای رطوبت دانه اکسیداسیون آنزیمی توسط لیپوکسیژناز تشدید شده و آسیب بیشتری به سلول وارد می‌گردد و در این حالت غلظت اکسیژن طبیعی یا کم بر سرعت زوال تأثیری ندارد [5]. زوال بذر با تغییرات متعدد متابولیکی و بیوشیمیایی از جمله پراکسیداسیون لیپید، تغییر در پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و قندها همراه است [6].

پروتئین‌ها نقش مهمی در متابولیسم طبیعی دانه و قدرت بذر دارند [7]. آنها بر اساس میزان حلالیت به ۴ گروه آلبومین‌ها، گلوبولین‌ها، پرولامین‌ها و گلوتلین‌ها طبقه‌بندی می‌شوند. افزایش پروتئین‌های محلول در دانه‌های کلم چینی [7] و یا کاهش پروتئین ذخیره‌ای دانه‌های گندم [8] طی زوال دلالت بر اهمیت متابولیسم ذخایر پروتئینی دارد. از طرف دیگر در طی زوال، در دانه‌های نیلوفر آبی (*Nelumbo nucifera*)، پردازش پروتئین‌ها و پروتئین‌های مرتبط با RNA به راحتی دچار کاستی شده، اما بسیاری از پروتئین‌های مرتبط با سیستم آنتی‌اکسیدان، فتوسنتز، شکستن نشاسته و ساکارز القاء می‌شوند [3]. ارتباط زوال با کاهش قدرت دانه در *Arabidopsis* [9] و نیلوفر آبی [3] و بسیاری از دانه‌های دیگر گزارش شده است. همچنین کیفیت و کمیت پروتئین‌ها نیز به طور مستقیم با طول عمر دانه ارتباط دارد [10]، [11]. کاهش مقدار پروتئین در دانه‌های زوال یافته تا حدی می‌تواند ناشی از کاهش سنتز یا افزایش دسترسی پروتئین‌ها به پروتئین‌ها یا فعالیت افزوده آن‌ها و تغییر در پلی‌پپتیدها باشد [10]. در این راستا تشدید فعالیت پروتئاز در طی زوال برخی بذرهایی که در محتوای رطوبت ۵ درصد تا ۱۵ درصد زنده می‌مانند (ارتدوکس) گزارش شده است [8]، [12]، [13]. در طی زوال فعالیت آنزیم پروتئاز واکوئلی افزایش یافته و در نتیجه این آنزیم کاندیدای خوبی به عنوان نشان‌گر کیفیت دانه است [13].

گردو (*Juglans regia* L.) یکی از گونه‌های درختی مهم و اقتصادی در مناطق معتدله جهان از جمله ایران است. مهمترین محصول این درخت دانه‌های آن است که مغز یا بافت خوراکی آن تا ۷۰ درصد لیپید را داراست [14]. اکثر مطالعات انجام شده چه در ایران و چه در سایر نقاط دنیا بر روی دانه‌های گردو به ارائه راهکارهای شکستن خواب دانه و تشدید جوانه‌زنی [15]، تفاوت ارقام و ژنوتیپ‌ها در این ویژگی [16] و همچنین، مکانیسم شکست خواب و جوانه‌زنی در شرایط نرمال و تنش‌زا متمرکز بوده است [17]، [18]. به رغم مطالعات چندی که زوال دانه‌های گردو را از دیدگاه علوم و صنایع غذایی بررسی کرده‌اند [19]، [20]، تاکنون تنها یک مطالعه به بررسی زوال دانه‌های گردو از دیدگاه فیزیولوژیکی و تأثیرات آن بر زنده‌مانی و جوانه‌زنی پرداخته است [21]. مطالعه اخیر نشان داد که مهار فعالیت‌های لیپازی دانه‌های گردو می‌تواند سبب افزایش مقاومت و حفظ قدرت جوانه‌زنی آن‌ها در مقابل زوال شود. افزون بر ذخایر لیپیدی، پروتئین‌های ذخیره‌ای ۱۷ درصد ذخایر غذایی دانه‌های گردو را تشکیل می‌دهند [14] اما از اهمیت شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای در فرآیند زوال این دانه اطلاعی در دست نیست. آبنوشی دانه‌های گردو منجر به اضمحلال پروتئین‌های ذخیره‌ای می‌شود [22]. اضمحلال پروتئین‌ها همراه با احیاء پیوندهای دی سولفیدی است که سبب افزایش حلالیت آن‌ها و متعاقب آن پروتئولیز می‌شود [23]. اگرچه مهار فعالیت‌های لیپازی دانه‌های گردو می‌تواند سبب افزایش مقاومت آن‌ها نسبت به زوال شود [21]، اما این سوال مطرح است که آیا همچون مهار فعالیت‌های لیپازی، مهار فعالیت‌های پروتئازی می‌تواند سبب افزایش مقاومت و حفظ قدرت جوانه‌زنی دانه‌ها در مقابل زوال شود؟ در کل از اهمیت فرآیندهای پروتئولیتیک و ارتباط آن با زوال و زنده‌مانی دانه‌های گردو اطلاعاتی موجود نیست. بنابراین، در مطالعه حاضر فرض شد که الف) زوال دانه گردو سبب تشدید شکستن ذخایر پروتئینی می‌شود و ب) مهار فعالیت‌های هیدرولازی درگیر در شکستن ذخایر پروتئینی می‌تواند قابلیت زنده‌مانی دانه را در طی فرآیند زوال بهبود بخشد. برای آزمون فرضیه‌های فوق، قابلیت جوانه‌زنی دانه و همچنین تغییرات گروهی از پارامترهای بیوشیمیایی مربوط به متابولیسم پروتئین در دانه‌های گردو با محتوای رطوبت ۱۵ درصد و ۲۰ درصد پیش تیمار شده با بازدارنده سرین پروتئازی فنیل متیل سولفونیل فلوراید PMSF طی زوال کنترل شده به مدت ۳ و ۶ روز بررسی و با نمونه‌های شاهد (آب) مقایسه شد.

## مواد و روش‌ها

## مواد گیاهی، اعمال تیمارهای زوال کنترل شده و آزمون جوانه‌زنی

در این مطالعه از دانه‌های گردو (*Juglans regia* L.) رقم ناشناخته برداشت شده در آبان ماه ۱۳۹۹ در همدان استفاده شد. میزان رطوبت اولیه دانه (MC) بر اساس وزن تر حدود ۶ درصد بود. میزان رطوبت اولیه پس از تعیین وزن خشک دانه‌هایی که به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد خشک شده بودند، تعیین شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل انجام شد. در آزمایش اول فاکتورها شامل سطح رطوبت (۲ سطح)، زمان زوال (۳ سطح) و پیش‌تیمار بازدارنده (۲ سطح) و در آزمایش دوم فاکتورها شامل سطح رطوبت (۳ سطح) و زمان زوال (۳ سطح) بود. هر تیمار آزمایش در مجموع شامل ۳۰ عدد دانه در سه تکرار ۱۰ عددی بود. میزان رطوبت دانه‌های خشک از طریق آبنوشی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با آب (شاهد) یا محلول ۱ میلی‌مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید PMSF بر روی ۲۰ درصد و ۱۵ درصد تنظیم شد. دانه‌های با محتوای رطوبت متفاوت (۶، ۱۵ و ۲۰ درصد MC) در فویل‌های آلومینیومی پیچیده شدند و در کیسه‌های نایلونی در بسته در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سپس کل مجموعه به مدت ۳ و ۶ روز در انکوباتور در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به منظور اعمال تیمار زوال کنترل شده قرار گرفتند. دانه‌های بدون زوال (بسته به نوع آزمایش ۱۵ و ۲۰ درصد یا ۶ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد) و دانه‌های زوال یافته برای مدت ۳ و ۶ روز متعاقباً برای مطالعات جوانه‌زنی و بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

در آزمایشات جوانه‌زنی، دانه‌های شاهد و زوال یافته در تیمارهای مختلف ابتدا با هیپوکلرید سدیم ۵ درصد ضدعفونی سطحی شدند (۱۵ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۵ درصد) و پس از شستشوی سطحی با آب مقطر (۳ مرتبه) به ظرفی از جنس پلی‌پروپیلن پر شده با شن انتقال یافتند و در اتاق کشت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به منظور رویش قرار گرفتند. به منظور حفظ رطوبت بستر شنی در طی آزمایش، هر هفته ۳ مرتبه سطح بستر با آب اسپری شد. دانه‌هایی دارای طول ریشه‌چه ۵ میلی‌متر به عنوان جوانه‌زده در نظر گرفته شد و میزان جوانه‌زنی در محیط کشت به مدت ۴۰ روز ثبت شد [21].

## شناسایی فعالیت پروتئازی به روش زیموگرافی

اساس شناسایی فعالیت پروتئازی بر روی ژل با استفاده از تکنیک زیموگرافی بود [24]. در این راستا، یک گرم بافت لپه با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج در هاون سرد خرد شد. ترکیب بافر استخراج شامل ۵۰ میلی‌مولار تریس در pH برابر با ۸/۵، ۰/۴ مولار ساکارز، ۱۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم، ۱ میلی‌مولار سولفات منیزیم، ۱ میلی‌مولار اتیلن دی آمید تترا استیک اسید (EDTA)، ۰/۶ درصد پلی وینیل پلی پیرولیدین (PVPP) و ۱۴ میلی‌مولار ۲-مرکاپتواتانول بود. هموژن حاصل پس از عبور از دو لایه پارچه لمل صاف شد و به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ میزان پروتئین روشنور (سوپرناتانت) با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) [25] اندازه‌گیری شد. عصاره پروتئینی روشنور سپس به نسبت حجمی ۱:۲ با بافر نمونه الکتروفورز مخلوط شد. ترکیب بافر نمونه شامل ۲/۴ میلی‌لیتر باز تریس ۰/۵ مولار با pH برابر با ۶/۸، ۴ میلی‌لیتر SDS ۱۰ درصد، ۲ میلی‌لیتر گلیسرول و یک میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ درصد بروموفنل بلو بود. در ابتدا به بافر نمونه ۵ میکرولیتر مرکاپتواتانول اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس میزان تقریبی ۵۰ میکروگرم پروتئین در هر چاهک الکتروفورز بارگیری شد. الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات تحت شرایط احیایی (همراه با مرکاپتواتانول) در یک سیستم ژل ناپیوسته با غلظت آکریل آمید ۱۵ درصد با استفاده از روش Gregerson and Fling (۱۹۸۶) [26] انجام شد.

## استخراج پروتئین‌های محلول، نشانه‌گذاری گروه‌های تیول آن‌ها با مونوبروموبیمان (mBB) و الکتروفورز SDS-PAGE

برای شناسایی وضعیت اکسید و احیاء گروه‌های تیول پروتئین‌ها نشانه‌گذاری گروه‌های تیول آزاد آن‌ها با مونوبروموبیمان (mBB) بر اساس روش Kobrehel و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد [27]. در این روش به ۱ گرم بافت لپه، ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر تریس ۰/۱ مولار با pH برابر با ۸، EDTA یک میلی‌مولار، PMSF یک میلی‌مولار و mBB دو میلی‌مولار) اضافه شد. محلول هموژن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. فاز شفاف میانی حاوی پروتئین محلول (سوپرناتانت) از زیر لایه روغنی برداشته شد و سپس به ۸۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی بدست آمده ۱۰ میکرولیتر SDS و ۱۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول ۰/۱ مولار

افزافه شد تا واکنش نشانه‌گذاری متوقف شود و mBBR اضافی نیز غیرفعال شود. در نهایت محلول حاصل با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمونه و ۱۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول برای انجام الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. همچنین بخش دیگری از سوپرناتانت نیز برای اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول با روش Bradford (۱۹۷۶) [25] مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز سدیم دودسیل سولفات تحت شرایط احیایی (همراه با مرکاپتواتانول) در یک سیستم ژل ناپیوسته با غلظت آکریل آمید ۱۵ درصد با استفاده از روش Gregerson و Fling (۱۹۸۶) [26] انجام شد. پس از الکتروفورز، فلورسانس ساطع شده از باندهای پروتئینی نشاندار شده با mBBR با استفاده از دستگاه High performance Ultraviolet Trans illuminator (UVP) عکس‌برداری شد.

### استخراج و اندازه‌گیری پروتئین کل دانه‌های گردو

استخراج پروتئین کل با استفاده از روش Stone و Gifford (۱۹۹۷) [28] همراه با تغییراتی انجام شد. در ابتدا بافت لپه (۰/۵ گرم) با ۲۵ میلی‌لیتر محلول هگزان: ایزوپروپانول (با نسبت حجم ۳ به ۲) چربی‌زدایی شد. سپس به ۲۰ میلی‌گرم از پودر چربی‌زدا شده از لپه، ۱ میلی‌لیتر بافر نمونه (تریس ۰/۰۶ مولار با pH برابر با ۶/۸، سدیم دودسیل فسفات ۲ درصد و گلیسرول ۱۰ درصد) اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک ساعت در بن ماری (درجه حرارت ۹۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند و هر ۱۰ دقیقه نمونه‌ها به شدت تکان داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. کل این فرآیند ۳ مرتبه انجام شد. اندازه‌گیری پروتئین کل به روش Markwell و همکاران (۱۹۸۱) [29] پس از خوانش جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر انجام شد.

### اندازه‌گیری پروتئین‌ها کربنیل‌دار شده

استخراج عصاره پروتئینی با استفاده از روش Sun و Leopold (۱۹۹۵) [30] همراه با تغییراتی انجام شد. به طور خلاصه، ابتدا ۱ گرم از بافت لپه در ۶ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار به همراه تریتون ۱۰۰ درصد در pH برابر با ۸/۵ هموزن شد. هموزن حاصل با سرعت ۱۲۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و میزان پروتئین در روشناور با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) [25] اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری گروه‌های کربنیل نیز به روش Xia و همکاران (۲۰۱۶) [31] همراه با تغییراتی انجام شد. بر اساس این روش ابتدا به دو لوله پلی پروپیلنی که هرکدام حاوی یک میلی‌گرم پروتئین بودند، میزان ۰/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدیک (HCl) ۲/۵ مولار (به عنوان شاهد) اضافه شد و به لوله دیگر ۰/۵ میلی‌لیتر ۴،۲ دی نیتروفنیل هیدرازین (DNPH) ۱۰ میلی‌مولار در اسید کلریدیک ۲/۵ مولار اضافه شد، سپس ورتکس شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوبه شدند. سپس به هریک از لوله‌ها ۲ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰ درصد افزوده شد و برای ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت تا پروتئین‌ها به طور کامل رسوب کنند. پس از سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ rpm فاز روشناور (سوپرناتانت) دور ریخته شد و رسوب حاصل با محلول اتانول-اتیل استات (۱:۱) ۳ مرتبه شستشو داده شد. رسوب نهایی پس از خشک شدن در معرض هوا در ۱/۲ میلی‌لیتر محلول گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار حاوی پتاسیم فسفات ۲۰ میلی‌مولار که pH آن با اسید کلریدیک غلیظ به ۲/۳ تنظیم شده بود، حل شد و به مدت یک ساعت در بن ماری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ ×g سانتریفیوژ شد تا مواد نامحلول رسوب کنند. پس از آن جذب نور روشناور نهایی در طول موج ۳۷۰ نانومتر خوانده شد و بر این اساس طبق فرمول زیر مقدار کربنیل‌اسیون پروتئین محاسبه شد:

$$\text{Carbonyl (nmol. mg}^{-1} \text{ protein)} = A_{370} \times 45.45 \text{ (nmol. mL}^{-1}) / \text{Protein concentration (mg. mL}^{-1})$$

### استخراج و اندازه‌گیری پرولین و اسید آمینه کل

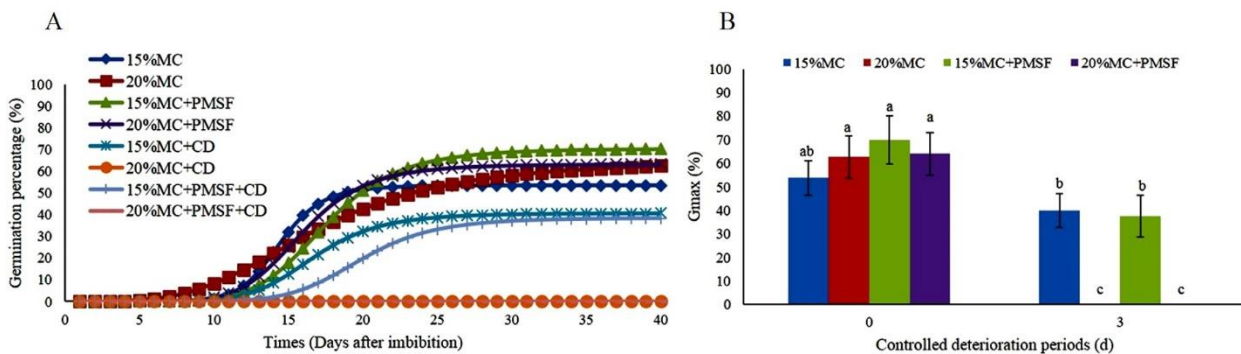
استخراج و اندازه‌گیری پرولین به روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) [32] و استخراج اسید آمینه به روش‌های روش Omokolo و همکاران (۱۹۹۴) [33] انجام شد. اندازه‌گیری اسید آمینه به صورت اسپکتروفتومتری بر اساس واکنش با ناین هیدرین با استفاده از روش Yemm و Cocking (۱۹۹۵) [34] انجام شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

درصد جوانه‌زنی تجمعی در مقابل زمان در هر تیمار با مدل چهار پارامتری هیل با نرم‌افزار SAS و با رویه proc-NLIN انجام شد و حداکثر درصد جوانه‌زنی، زمان تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی و زمان تا شروع جوانه‌زنی با کمک این مدل برای تیمارهای مختلف محاسبه شد [35]. همچنین مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت تمام آزمایشات بیوشیمیایی با سه تکرار بیولوژیکی انجام شد.

## نتایج و بحث

الگوی زمانی تغییرات درصد جوانه‌زنی دانه‌های گردو زوال نیافته شاهد و پیش تیمار شده با PMSF و گردوهای زوال یافته به مدت ۳ روز در دو سطح رطوبتی ۱۵ درصد و ۲۰ درصد در شکل ۱ نشان داده شده است. در محتوای رطوبت ۱۵ درصد، میزان جوانه‌زنی دانه‌های شاهد در حدود ۵۳ درصد بود، در حالی که میزان جوانه‌زنی در پیش تیمار PMSF بیشتر و تا حدود ۷۰ درصد بود. در همین سطح رطوبت، میزان جوانه‌زنی دانه‌های شاهد و پیش تیمار PMSF پس از سه روز زوال کنترل شده کاهش یافت بطوری که به ترتیب در حدود ۴۰ درصد و ۳۷ درصد از بذرها جوانه زدند که اساساً تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در محتوای رطوبت ۲۰ درصد، زوال کنترل شده به مدت سه روز بطور کامل مانع از جوانه‌زنی دانه‌های شاهد و پیش تیمار PMSF شد (شکل ۱ A و B).

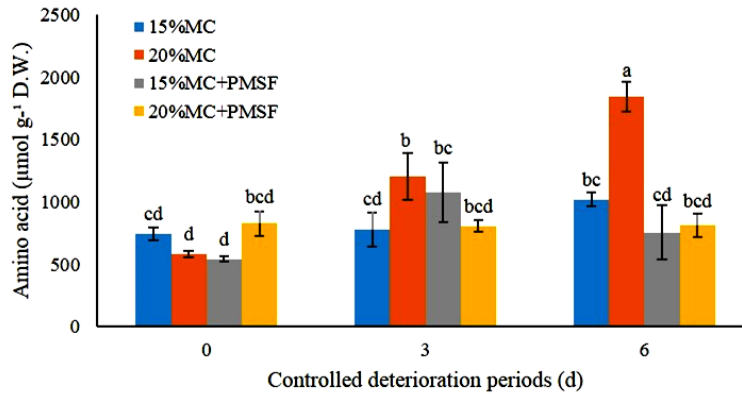


شکل ۱- تأثیر پیش تیمار دانه‌های گردو با PMSF بر الگوی زمانی رویش تجمعی (A) و درصد جوانه‌زنی نهایی (Gmax) (B) در دو محتوای رطوبت ۱۵ درصد و ۲۰ درصد قبل و بعد از ۳ روز زوال کنترل شده. تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) در میانگین‌ها پس از انجام آزمون LSD با حروف مختلف در بالای هر ستون نشان داده شده است

Figure 1- Effects of PMSF pretreatments of walnut kernels with 15 and 20 percent MC on changes in cumulative germination (A) and their maximum germination percentages (Gmax) (B) during three days of controlled deterioration (CD). Uncommon small letters on each bar represent significant differences ( $P < 0.05$ ) in final germination percentages according to LSD test

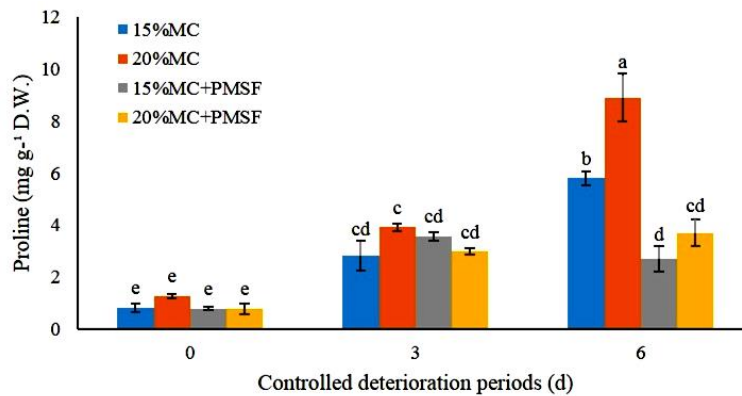
## تأثیر پیش تیمار PMSF بر محتوای اسید آمینه کل و پرولین دانه در طی زوال

پیش تیمار PMSF تأثیر معنی‌داری بر محتوای اسید آمینه کل دانه قبل از زوال نداشت (شکل ۲). زوال کنترل شده دانه در محتوای رطوبت ۲۰ درصد به مدت ۳ و ۶ روز سبب انباشتگی معنی‌دار اسید آمینه کل شد، اگرچه در رطوبت ۱۵ درصد تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. پیش تیمار PMSF دانه‌ها در کل بر محتوای اسید آمینه تأثیر معنی‌داری در طی زوال نداشت به استثنای دانه‌های با رطوبت ۲۰ درصد که بعد از ۶ روز زوال نسبت به دانه‌های شاهد زوال یافته کاهش شدید محتوای اسید آمینه کل را نشان دادند (شکل ۲). پیش تیمار PMSF همچنین تا روز سوم زوال تأثیری بر محتوای پرولین دانه در دو سطح رطوبتی ۱۵ درصد و ۲۰ درصد نداشت، اما بطور معنی‌داری سبب کاهش محتوای پرولین در روز ششم زوال در هر دو سطح رطوبتی شد (شکل ۳).



شکل ۲- تأثیر پیش تیمار دانه‌های گردو با PMSF بر محتوای اسید آمینه کل دانه‌های گردو در دو سطح رطوبتی ۱۵ درصد و ۲۰ درصد در طی ۳ و ۶ روز زوال کنترل شده (CD). حروف متفاوت در بالای هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بر اساس آزمون LSD است. نتایج میانگین حاصل از سه استخراج  $\pm$  SE است

Figure 2- Effects of PMSF pretreatment on total amino acid contents of walnut kernels with 15 and 20 percent MC during 3 and 6 days of controlled deterioration (CD) test. The uncommon small letter on each bar represents significant differences ( $P < 0.05$ ) based on the LSD test. The means are the results of extractions from three separate kernels  $\pm$  SE



شکل ۳- تأثیر پیش تیمار دانه‌های گردو با PMSF بر محتوای پرولین دانه‌های گردو در دو سطح رطوبتی ۱۵ درصد و ۲۰ درصد در طی ۳ و ۶ روز زوال کنترل شده (CD). حروف متفاوت در بالای هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بر اساس آزمون LSD است. نتایج میانگین حاصل از سه استخراج  $\pm$  SE است

Figure 3- Effects of PMSF pretreatment on proline contents of walnut kernels with 15 and 20 percent MC during 3 and 6 days of controlled deterioration (CD) test. The uncommon small letter on each bar represents significant differences ( $P < 0.05$ ) based on the LSD test. The means are the results of extractions from three separate kernels  $\pm$  SE

### تأثیر پیش تیمار PMSF بر کربنیلاسیون پروتئین دانه‌های گردو در طی زوال

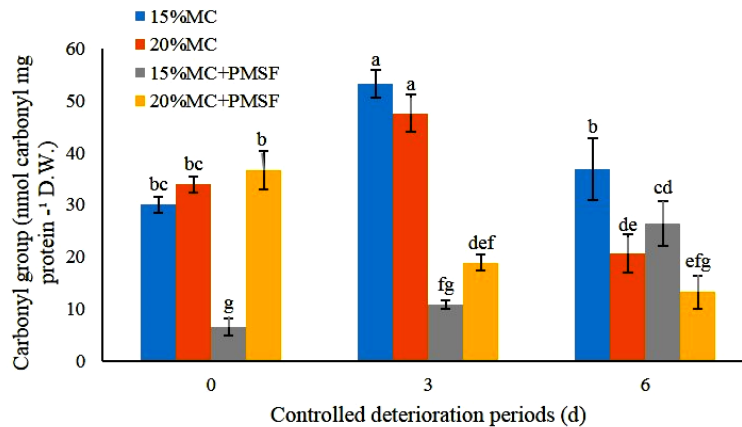
در غیاب پیش تیمار PMSF و در هر دو سطح رطوبت ۱۵ درصد و ۲۰ درصد، زوال کنترل شده به مدت ۳ و ۶ روز به ترتیب سبب افزایش و کاهش معنی‌دار کربنیلاسیون پروتئین شد (شکل ۴). اما پیش تیمار PMSF بطور مشخص سبب کاهش معنی‌دار کربنیلاسیون پروتئین پس از ۳ روز زوال در هر دو سطح رطوبتی دانه شد. در هر صورت پس از ۶ روز زوال تأثیر پیش تیمار PMSF بر کاهش کربنیلاسیون پروتئین صرفاً در سطح رطوبت ۲۰ درصد مشهود بود.

### تأثیر زوال کنترل شده بر میزان پروتئین‌های محلول و کل دانه

در این دسته از آزمایش‌ها، تأثیر زوال کنترل شده بر میزان پروتئین محلول و کل دانه در سه سطح رطوبتی ۶ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد بررسی شد (شکل ۵). زوال دانه همراه با افزایش میزان پروتئین محلول بعد از ۳ و ۶ روز در سه سطح رطوبتی ۶ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد بود بطوری که بالاترین میزان پروتئین محلول در روز ششم زوال و در محتوای رطوبت ۲۰ درصد مشاهده

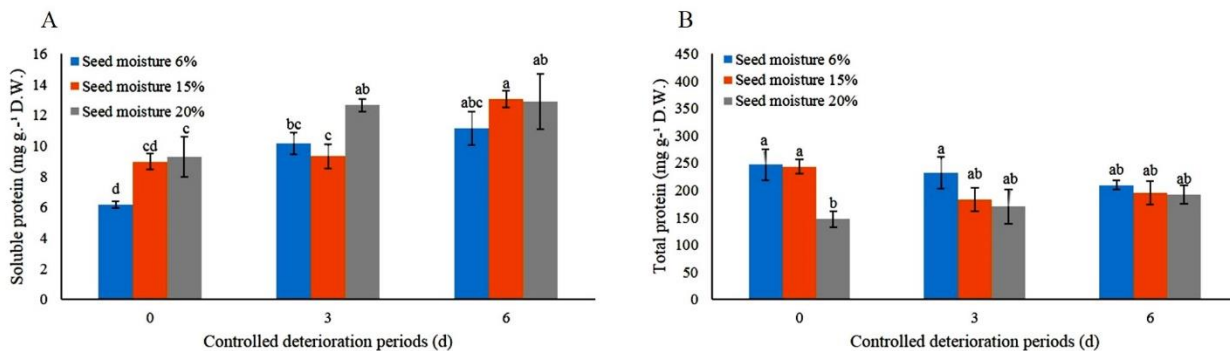


شد (شکل ۵ A). بر خلاف پروتئین محلول، میزان پروتئین کل در سه سطوح رطوبتی ۶ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد تحت تأثیر زوال تغییر معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۵ B).



شکل ۴- تأثیر پیش تیمار دانه‌های گردو با PMSF بر میزان کربنیل‌سیون پروتئین دانه‌های گردو در دو سطح رطوبتی ۱۵ درصد و ۲۰ درصد در طی ۳ و ۶ روز زوال کنترل شده (CD). حروف متفاوت در بالای هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بر اساس آزمون LSD است. نتایج میانگین حاصل از سه استخراج  $\pm$  SE است

Figure 4- Effects of PMSF pretreatment on protein carbonyl contents of walnut kernels with 15 and 20 percent MC during 3 and 6 days of controlled deterioration (CD) test. The uncommon small letter on each bar represents significant differences ( $P < 0.05$ ) based on the LSD test. The means are the results of extractions from three separate kernels  $\pm$  SE

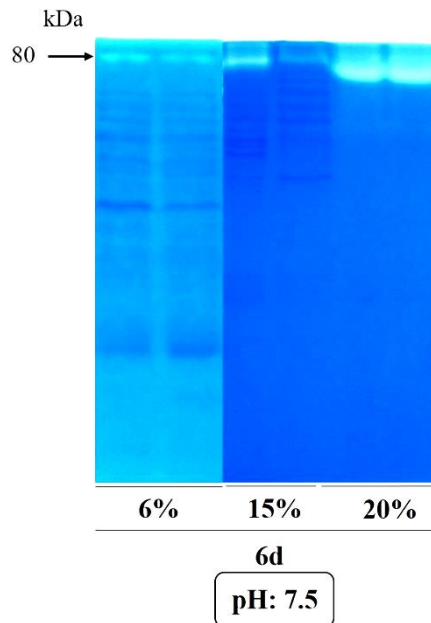


شکل ۵- تغییرات میزان پروتئین محلول (A) و پروتئین کل (B) دانه‌های گردو در سه سطح رطوبتی ۶ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد در طی زوال کنترل شده (CD) به مدت ۳ و ۶ روز. حروف متفاوت در بالای هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بر اساس آزمون LSD است. نتایج میانگین حاصل از سه استخراج  $\pm$  SE است

Figure 5- Changes in soluble protein (A) and total protein (B) contents of walnut kernels with moisture contents (MC) of 6, 15 and 20 percent MC during 3 and 6 days of controlled deterioration (CD). The uncommon small letter on each bar represents significant differences ( $P < 0.05$ ) based on the LSD test. The means are the results of extractions from three separate kernels  $\pm$  SE

### زیموگرافی فعالیت پروتئاز دانه‌های زوال یافته در سطوح رطوبتی مختلف با استفاده از SDS-PAGE

ردیابی فعالیت آنزیم پروتئاز دانه‌های گردو به روش زیموگرافی و با استفاده از تکنیک SDS-PAGE نشان داد که دانه‌های زوال یافته گردو به مدت ۶ روز در هر سه سطح رطوبتی ۶ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد دارای پروتئاز با وزن مولکولی ۸۰ کیلوالتون هستند که بیشترین فعالیت آن در دانه‌های با محتوای رطوبت ۲۰ درصد و در pH معادل ۷/۵ است (شکل ۶).



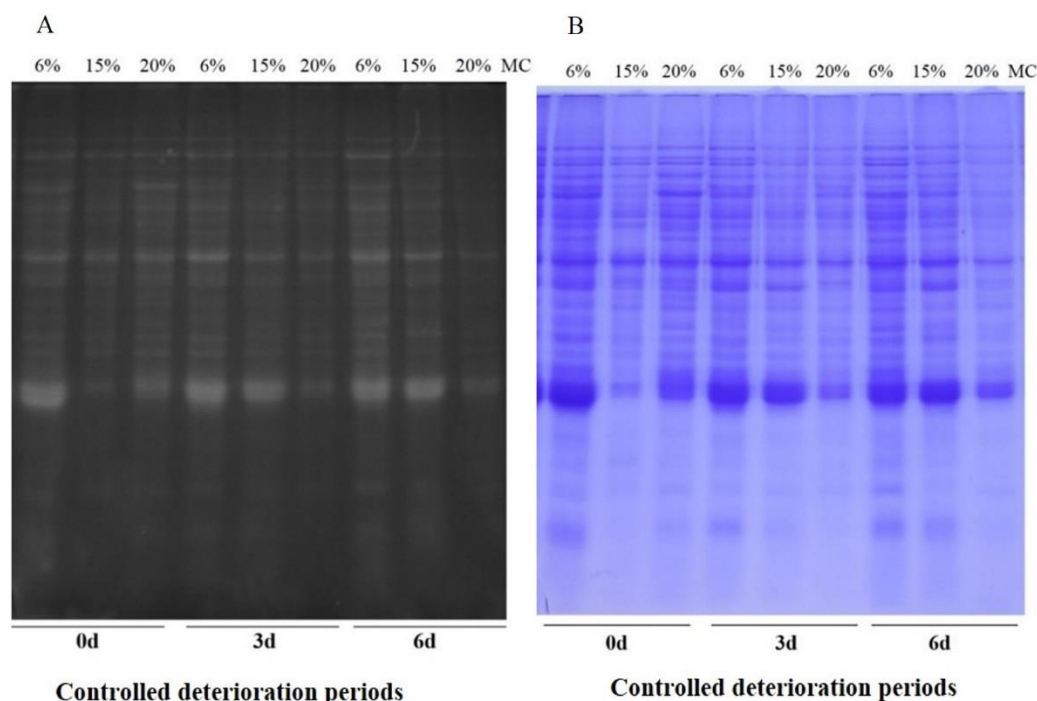
شکل ۶- شناسایی فعالیت پروتئاز دانه‌های گردو با سه سطح رطوبتی ۶ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد پس از زوال کنترل شده به مدت ۶ روز با روش زیموگرافی. پس از الکتروفورز پروتئین‌های دانه در ژل آکریل آمید حاوی ژلاتین با تکنیک SDS-PAGE، ژل حاوی باندهای پروتئینی ری‌ناتوره شد و نوار شفاف هضم شده ژلاتین نشان دهنده فعالیت پروتئاز است

**Figure 6-** Detection of protease activity after controlled deterioration of walnut kernels for 6 days at moisture contents (MC) of 6, 15, and 20 percent by zymography. After SDS-PAGE electrophoresis of kernel proteins on a gelatin embedded acrylamide gel, the separated protein bands were renatured and the transparent band of digested gelatin represents protease activity

### تغییرات الگوی پروتئین محلول و پروتئین‌های دارای تیول آزاد دانه در طی زوال

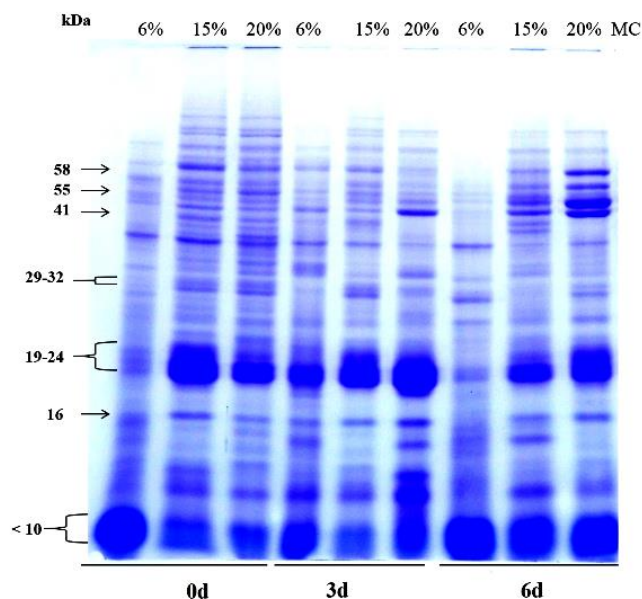
وضعیت اکسید-احیاء گروه‌های تیولی پروتئین‌های محلول دانه گردو به دنبال نشانه‌گذاری آن‌ها با مونوبروموبیمان (mBBr) و انجام SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۷). ترکیب mBBr به عنوان یک فلوروکروم اختصاصی تیول به گروه‌های تیول آزاد در پروتئین‌ها متصل می‌شود و منجر به فلورسانس آن‌ها در زیر نور UV می‌شود. بنابراین، سیگنال فلورسانس بیشتر نشان دهنده احیاء بیشتر پیوندهای دی سولفیدی یا وجود گروه‌های تیولی آزاد بیشتر در پروتئین‌هاست [23]. به موازات فرآیند زوال دانه‌های گردو، بررسی وضعیت اکسید و احیاء گروه‌های سولفیدریل (تیول) پروتئین‌ها با استفاده از مونوبروموبیمان (mBBr) نشان داد که بیشترین میزان فلورسانس در کلیه تیمارها مربوط به پروتئین‌های با وزن مولکولی ۱۹-۲۴ و به میزان کمتر ۲۹-۳۲ کیلوالتون است. مقایسه کیفی شدت فلورسانس هر باند پروتئینی با دانسیته همان باند پس از رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو نشان داد که تغییر شدت فلورسانس هر باند پروتئینی مربوط به تغییر میزان پروتئین آن باند است و بنابراین در طی زوال تغییر چشمگیری در وضعیت اکسید-احیاء گروه‌های تیول پروتئین‌ها اتفاق نمی‌افتد (شکل ۷). از آنجایی که در این آزمایش پروتئین بارگیری شده در هر چاهک از مقدار معین و ثابتی از بافت در کلیه تیمارها بدست آمده بود، این آزمایش نشان داد که با افزایش رطوبت در دانه‌های شاهد و زوال یافته، از میزان پروتئین‌های با وزن مولکولی ۱۹-۲۴ کیلوالتون کاسته می‌شود.

شکل ۸ تغییر در محتوای پروتئین‌های محلول دانه با استفاده از تکنیک SDS-PAGE را نشان می‌دهد. در این آزمایش میزان ثابتی از پروتئین محلول در هر یک از چاهک‌ها بارگیری شد. بطور مشخص افزایش رطوبت و دوره زوال سبب افزایش کیفی ضخامت باندهای پروتئینی با اوزان مولکولی ۴۱-۵۸، ۱۶ و تا حدی ۱۹-۲۴ کیلوالتون شد (شکل ۸).



شکل ۷- تغییرات وضعیت اکسید و احیاء گروه‌های سولفیدریل (تیول) پروتئین‌های محلول دانه گردو پس از نشانه‌گذاری با mBBR در سه سطح رطوبتی ۶ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد طی ۳ و ۶ روز زوال کنترل شده (CD) با استفاده از تکنیک SDS-PAEG (A). شکل (B) نشان دهنده همان پروتئین‌ها پس از رنگ آمیزی با کوماسی بریلیانت بلو است. حجم ثابتی از عصاره بدست آمده از دانه در هر یک از تیمارها به عنوان منبع پروتئین محلول در هر چاهک الکتروفورز بارگیری شد

**Figure 7-** SDS-PAGE pattern of of walnut kernels soluble proteins after labelling with thiol-specific fluorochrome mBBR showing free thiol groups in proteins. Constant volumes of soluble protein extracts from kernels of different moisture content (6, 15, and 20 percent MC) aged for 3 and 6 days were loaded in each electrophoretic well (A). Right panel shows the exposure of the SDS-PAGE resolved mBBR-labeled proteins to UV light and the left one represents the same gel after staining with Commassie Blue (B)



شکل ۸- الگوی الکتروفورز پروتئین‌های محلول دانه‌های گردو در سه سطح رطوبتی ۶ درصد، ۱۵ درصد و ۲۰ درصد در صد طی زوال کنترل شده به مدت ۳ و ۶ روز با استفاده از تکنیک SDS-PAGE. مقدار ثابت پروتئین محلول در هر چاهک بارگیری شده است

**Figure 8-** SDS-PAGE electrophoretic pattern of of soluble proteins from walnut kernels with different moisture contents (6, 15, and 20 percent MC) during 3 and 6 days of controlled deterioration. Equal amounts of soluble proteins from different samples were loaded in each lane

مطالعه حاضر نشان داد که زوال کنترل شده دانه‌های گردو به مدت ۳ روز سبب کاهش قدرت جوانه‌زنی آن‌ها می‌شود و پس از ۶ روز زوال دانه‌ها قدرت رویش خود را از دست می‌دهند. همچنین شدت تأثیر زوال بر جوانه‌زنی در محتوای رطوبت ۲۰ درصد دانه بسیار بیشتر از محتوای رطوبت ۱۵ درصد بود، زیرا که دانه‌های با رطوبت ۲۰ درصد پس از ۳ روز زوال کنترل شده جوانه‌زنی نداشتند. این نتایج در راستای مطالعه پیشین [21] است هرچند در آن مطالعه دانه‌های گردو با رطوبت ۱۵ درصد پس از ۶ روز زوال قدرت

جوانه‌زنی داشتند. با توجه به این که شکست خواب دانه‌های گردو تحت تأثیر ژنوتیپ است [16]، بنابراین شاید تأثیر زوال بر جوانه‌زنی دانه نیز به رقم و ژنوتیپ گیاه بستگی داشته باشد.

زوال و متعاقب آن کاهش جوانه‌زنی دانه‌های گردو سبب کاهش ذخایر لیپیدی همراه با انباشتگی اسیدهای چرب و تشدید فعالیت لیپاز است بطوری که پیش تیمار دانه با بازدارنده‌ی فعالیت لیپازی دی‌فنیل متیل فسفانات (DMP) سبب کندی و توقف زوال و بهبود جوانه‌زنی دانه‌ها پس از زوال می‌شود [21]. دانه‌های گردو دارای ۱۷ درصد-۲۰ درصد ذخایر پروتئینی هستند. از این رو در ابتدا احتمال شکستن ذخایر پروتئینی دانه تحت شرایط زوال بررسی شد. اگرچه میزان پروتئین کل دانه طی زوال تغییر چندانی نکرد، اما بر میزان پروتئین محلول دانه افزوده شد (شکل ۵). علاوه بر این زوال کنترل شده دانه بویژه در سطح رطوبت ۲۰ درصد همراه با انباشتگی اسیدهای آمینه بود (شکل ۲). بنابراین وقوع پروتئولیز محدود در دانه در طی زوال بسیار محتمل است. در پروتئولیز محدود پروتئین‌های دارای وزن مولکولی بیشتر و انحلال‌پذیری کمتر به پلی‌پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر و انحلال‌پذیری بیشتر تجزیه شده و بنابراین تغییر چندان محسوسی در میزان پروتئین کل مشاهده نمی‌شود [23]. افزایش نسبی پروتئین‌های با اوزان مولکولی ۲۴-۱۹ و ۵۸-۴۱ کیلودالتون در الگوی الکتروفورز عصاره پروتئین محلول دانه طی زوال (که مقدار ثابت و یکسان پروتئین محلول در هر چاهک بارگیری شده بود؛ شکل ۸ نیز نشان‌دهنده تشدید انحلال آنهاس، زیرا این دو به ترتیب نماینده گلوکلین‌ها و ویسیلین‌های نسبتاً نامحلول در فراکشن پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه گردو هستند [22]، [23]. افزایش انحلال‌پذیری پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه سبب افزایش قابلیت سوسترایی برای پروتئازها و در نتیجه هیدرولیز بعدی آن‌ها می‌شود [27]. بررسی الگوی الکتروفورز پروتئین محلول دانه‌های گردو پس از بارگیری حجم ثابت و یکسان از عصاره پروتئین محلول در هر چاهک، شکستن تدریجی گلوکلین ۲۴-۱۹ دالتونی را در طی زوال نشان داد (شکل ۷). علاوه بر این زیموگرافی عصاره پروتئین محلول دانه‌های گردو منجر به شناسایی پروتئاز با وزن مولکولی ۸۰ کیلودالتون شد که فعالیت بیشتری در دانه‌های زوال یافته در رطوبت بالاتر نشان داد (شکل ۶). کاهش جوانه‌زنی دانه گندم [8]، [36] و آر/بیدوپسیس [13] در طی زوال نیز همراه با افزایش فعالیت‌های پروتئازی است که می‌تواند در شکستن کلی پروتئین‌ها نقش داشته باشد و منجر به آزادسازی اسیدهای آمینه شود [37]. در مجموع بر اساس تمامی نتایج و شواهد بدست آمده، فرضیه اول این مطالعه مبنی بر تشدید شکستن ذخایر پروتئینی دانه‌های گردو در طی زوال تأیید می‌شود.

شکستن ذخایر لیپیدی در تشدید زوال دانه‌های گردو نقش مهمی دارد، زیرا پیش تیمار دانه‌های گردو با بازدارنده‌ی فعالیت لیپازی دی‌فنیل متیل فسفانات (DMP) سبب کندی و توقف زوال و بهبود جوانه‌زنی می‌شود [21]، اما از اهمیت شکستن ذخایر پروتئینی دانه در فرآیند زوال در کل اطلاعی در دست نیست. پیش از این شکستن تخصصی یک ویسیلین ۵۸ کیلو دالتونی به وسیله فعالیت یک سرین پروتئاز در دانه گردو گزارش شده است [23]. بنابراین، به منظور شناسایی اهمیت شکستن ذخایر پروتئینی در فرآیند زوال، تأثیر پیش تیمار دانه با مهارکننده پروتئازی فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) در دو سطح رطوبتی ۱۵ درصد و ۲۰ درصد بر جوانه‌زنی دانه، کربنیلاسیون پروتئین، اسید آمینه کل و پرولین بررسی شد. بر اساس نتایج آزمون جوانه‌زنی پس از ۳ روز زوال و در محتوای رطوبتی ۱۵ درصد، درصد جوانه‌زنی دانه‌های گردو پیش تیمار PMSF با دانه‌های شاهد تفاوتی نداشت (شکل ۱). در نتیجه پیش تیمار دانه با مهارکننده پروتئازی PMSF که مانع شکستن برخی از پروتئین‌های ذخیره‌ای (گلوبولین ۵۸ کیلودالتون) می‌شود [23] نتوانست از تشدید فرآیند زوال جلوگیری کند. عدم کارایی پیش تیمار دانه گردو با بازدارنده پروتئازی PMSF در قیاس با بازدارنده لیپازی DMP در کاهش پیامدهای زوال بر جوانه‌زنی می‌تواند به دلایل متعددی باشد. با استفاده از تکنیک طیف سنجی جرمی، پروتئازهای متعددی را در دانه‌های گردو گزارش کرده‌اند [38] که متفاوت از سرین-پروتئازها بوده و در نتیجه با PMSF مهار نمی‌شوند. از سوی دیگر، برخلاف ذخایر لیپیدی که حجم عمده ذخایر دانه گردو (تا حدود ۷۰ درصد وزن خشک) را شامل می‌شوند، ذخایر پروتئینی فقط ۱۷ تا ۲۰ درصد از ذخایر دانه بوده [14] و از این رو شاید مهار شکستن آن‌ها نتواند تأثیر چندانی بر بروز تنش اکسیداتیو (که خاستگاه احتمالی آن تنفس لیپیدها و اسیدهای چرب است) و در نتیجه زوال و کاهش جوانه‌زنی دانه داشته باشد. در دانه‌های گردو ممکن است پروتئازهای دیگری نیز فعال باشند که در شکست پروتئین‌های ذخیره‌ای طی جوانه‌زنی دانه گردو نقش داشته باشند که ممکن است نشان‌دهنده سطح وسیعی از پروتئازها طی زوال دانه گردو باشد. هر چند پیش تیمار PMSF دانه نتوانست سبب بهبود جوانه‌زنی دانه‌های گردو پس از زوال شود و عبارتی تأثیر فیزیولوژیکی محسوسی نشان نداد، اما در سطح بیوشیمیایی علائمی از بهبود شرایط تنش را به نمایش گذاشت که مهمترین آن کاهش میزان پرولین و کربنیلاسیون پروتئین بود

(اشکال ۳ و ۴). بدون این پیش‌تیمار، زوال سبب انباشتگی بیشتر پرولین و کربنیل‌اسیون پروتئین در دانه‌های گردو شد. تجمع پرولین در گیاهان پس از قرار گرفتن در معرض تنش‌های محیطی گزارش شده است [39]. انباشتگی پرولین در طی جوانه‌زنی دانه‌های گردو تحت شرایط تنش خشکی نیز گزارش شده است [17]. همچنین در شرایط تنش‌زا مثل زوال بذر مشتقات کربنیلی از جمله پروتئین‌های کربنیل‌دار تجمع می‌یابند [40]. بطور مثال افزایش سطح گروه‌های کربنیل در دانه‌های سیب که در معرض گرما قرار گرفته‌اند گزارش شده است [41]. در مجموع، داده‌های به‌دست‌آمده اگرچه نشان‌دهنده وقوع شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای در دانه‌های گردو در طی زوال است، اما از این فرضیه که شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای تشدیدکننده زوال دانه است و در نتیجه مهار آن می‌تواند سبب افزایش مقاومت در مقابل زوال شود حمایت نمی‌کند.

## نتیجه‌گیری

اکثر مطالعات انجام شده بر روی دانه‌های گردو تاکنون به مسئله زوال از دیدگاه علوم و صنایع غذایی پرداخته‌اند و از جنبه‌های فیزیولوژیکی زوال دانه‌های گردو غافل مانده‌اند. مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که به شناسایی نقش پروتئین‌های ذخیره‌ای در فرآیند زوال دانه‌های گردو پرداخته است. در این مطالعه، از داده‌های جوانه‌زنی و بیوشیمیایی برای درک اهمیت فرآیندهای پروتئولیتیک در فرآیند زوال دانه‌های گردو استفاده شد. نتایج نشان داد که از یک سو زوال سبب وقوع شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای در دانه‌های گردو شده و از طرف دیگر مهار شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای، بر خلاف لیپیدها بر سرعت زوال دانه‌های گردو تأثیر چندانی ندارد. در هر صورت این نکته را باید مد نظر داشت که در وهله اول سهم پروتئین‌ها از مواد ذخیره‌ای دانه گردو کمتر از ۲۰ درصد است و بعلاوه پروتئین‌های متنوع‌تری در شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه گردو دخالت دارند که فعالیت برخی از آن‌ها با ترکیب PMSF مهار نمی‌شود. از این رو شاید پیش‌تیمار دانه‌های گردو با طیف وسیع‌تری از بازدارنده‌های پروتئاز می‌تواند اثرات مثبت خود را بر افزایش مقاومت دانه نسبت به زوال نشان دهد. بی‌شک شناسایی هر چه بیشتر مسیرهای متابولیکی فعال شده در طی زوال دانه‌های گردو می‌تواند تصویری کلی از مکانیسم زوال دانه‌های گردو را فراهم کند و منجر به ارائه روش‌هایی جهت حفظ کیفیت و زنده‌مانی بیشتر دانه‌های گردو در طی ذخیره‌سازی در انبار شود.

## اعلام تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

## سپاسگزاری

این پژوهش توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) حمایت شده است (کد طرح ۹۸۰۲۴۸۸۰ به شماره ۱۹۸۸/ ص ۹۹/ مورخ ۲۸ آبان ۱۳۹۹).

## منابع

- [1] Malik, C. P. (2013). Seed deterioration: a review. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 2 (3), 374-385.
- [2] Xiang, F., Liu, W. C., Liu, X., Song, Y., Zhang, Y., Zhu, X., Wang, P., Guo, S. & Song, C-P. (2023). Direct balancing of lipid mobilization and reactive oxygen species production by the epoxidation of fatty acid catalyzed by a cytochrome P450 protein during seed germination. *New Phytologist*, 237 (6), 2104-2117.
- [3] He, D., Cai, M., Liu, M., & Yang, P. (2023). TMT-based quantitative proteomic and physiological analyses on lotus plumule of artificially aged seed in long-living sacred lotus *Nelumbo nucifera*. *Journal of Proteomics*, 270, 104736.
- [4] Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. & Nonogaki, H. (2013). Longevity, storage, and deterioration. In *Seeds* (pp. 341-376). Springer, New York, NY.
- [5] Gerna, D., Ballesteros, D., Arc, E., Stöggl, W., Seal, C.E., Marami-Zonouz, N., Na, C.S., Kranner, I. & Roach, T. (2022). Does oxygen affect ageing mechanisms of *Pinus densiflora* seeds? A matter of cytoplasmic physical state. *Journal of Experimental Botany*, 73 (8), 2631-2649.
- [6] Kibinza, S., Bazin, J., Bailly, C., Farrant, J. M., Corbineau, F. & El-Maarouf-Bouteau, H. (2011). Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant science*, 181 (3), 309-315.

- [7] Jiang, F. L., Bo, L. P., Xu, J. J. & Wu, Z. (2018). Changes in respiration and structure of non-heading Chinese cabbage seeds during gradual artificial aging. *Scientia Horticulturae*, 238, 14-22.
- [8] Galleschi, L., Capocchi, A., Ghiringhelli, S., Saviozzi, F., Calucci, L., Pinzino, C. & Zandomenighi, M. (2002). Antioxidants, free radicals, storage proteins, and proteolytic activities in wheat (*Triticum durum*) seeds during accelerated aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (19), 5450-5457.
- [9] Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S. P., Belghazi, M., Job, C. & Job, D. (2008). Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology*, 148 (1), 620-641.
- [10] Parkhey, S., Naithani, S. C. & Keshavkant, S. (2014). Protein metabolism during natural ageing in desiccating recalcitrant seeds of *Shorea robusta*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36 (7), 1649-1659.
- [11] Nguyen, T. P., Cueff, G., Hegedus, D. D., Rajjou, L. & Bentsink, L. (2015). A role for seed storage proteins in *Arabidopsis* seed longevity. *Journal of Experimental Botany*, 66 (20), 6399-6413.
- [12] Dell'Aquila, A. (1994). Wheat seed ageing and embryo protein degradation. *Seed Science Research*, 4 (3), 293-298.
- [13] Viñegra de la Torre, N., Kaschani, F., Kaiser, M., van der Hoorn, R. A., Soppe, W. J. & Mias Villamil, J. C. (2019). Dynamic hydrolase labelling as a marker for seed quality in *Arabidopsis* seeds. *Biochemical Journal*, 476 (5), 843-857.
- [14] Sze-Tao, K. W. C. & Sathe, S. K. (2000). Walnuts (*Juglans regia* L.): proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein in vitro digestibility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (9), 1393-1401.
- [15] Raoufi, A., Vahdati, K., Karimi, S. & Roozban, M. R. (2020). Optimizing seed germination and growth of seedlings in persian walnut. *Journal of Nuts*, 11 (3), 185-193.
- [16] Vahdati, K., Aslamarz, A. A., Rahemi, M., Hassani, D. & Leslie, C. (2012). Mechanism of seed dormancy and its relationship to bud dormancy in persian walnut. *Environmental and experimental botany*, 75, 74-82.
- [17] Lotfi, N., Soleimani, A., Vahdati, K. & Çakmakçı, R. (2019). Comprehensive biochemical insights into the seed germination of walnut under drought stress. *Scientia Horticulturae*, 250, 329-343.
- [18] Vahdati, K., Lotfi, N., Kholdebarin, B., Hassani, D., Amiri, R., Mozaffari, M. R. & Leslie, C. (2009). Screening for drought-tolerant genotypes of persian walnuts (*Juglans regia* L.) during seed germination. *HortScience*, 44 (7):, 1815-1819.
- [19] Ortiz, C.M., Vicente, A.R., Fields, R.P., Grilo, F., Labavitch, J.M., Donis-Gonzalez, I. & Crisosto, C.H. (2019) Walnut (*Juglans regia* L.) postharvest deterioration as affected by pellicle integrity, cultivar and oxygen concentration. *Postharvest Biology and Technology*, 156, 110948.
- [20] Ziaolhagh, S., Fatemian, H. & Goodarzi, F. (2020). The effect of thermal pretreatment and packaging conditions on the shelf-life of walnut kernels. *Journal of Nuts*, 11 (2), 159-168.
- [21] Pournik, S., Abbasi-Rostami, M., Sadeghipour, H. R. & Ghaderi-Far, F. (2019). True lipases beside phospholipases contribute to walnut kernel viability loss during controlled deterioration and natural aging. *Environmental and Experimental Botany*, 164, 71-83.
- [22] Einali, A. R. & Sadeghipour, H. R. (2007). Alleviation of dormancy in walnut kernels by moist chilling is independent from storage protein mobilization. *Tree physiology*, 27(4), 519-525.
- [23] Shahmoradi, Z., Tamaskani, F., Sadeghipour, H. R. & Abdolzadeh, A. (2013). Redox changes accompanying storage protein mobilization in moist chilled and warm incubated walnut kernels prior to germination. *Journal of plant physiology*, 170 (1), 6-17.
- [24] Heussen, C. & Dowdle, E. B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical biochemistry*, 102 (1), 196-202.
- [25] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- [26] Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Analytical biochemistry*, 155 (1), 83-88.
- [27] Kobrehel, K., Wong, J. H., Balogh, A., Kiss, F., Yee, B. C. & Buchanan, B. B. (1992). Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiology*, 99 (3):, 919-924.
- [28] Stone, S. L. & 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. *International Journal of Plant Sciences*, 158 (6), 727-737.
- [29] Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Tolbert, N. E. & Bieber, L. L. (1981). [16] Protein determination in membrane and lipoprotein samples: Manual and automated procedures. *In Methods in enzymology*, 72, 296-303.
- [30] Sun, W. Q. & Leopold, A. C. (1995). The Maillard reaction and oxidative stress during aging of soybean seeds. *Physiologia Plantarum*, 94 (1), 94-104.
- [31] Xia, Q., El-Maarouf-Bouteau, H., Bailly, C. & Meimoun, P. (2016). Determination of protein carbonylation and proteasome activity in seeds. *Methods in Molecular Biology*, 1450, 205-12.
- [32] Bates, L.S., Waldren, R.P. & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39, 205-207.
- [33] Omokolo, N. D., Nankeu, D. J., Niemenak, N. & Djocgoue, P. F. (2002). Analysis of amino acids and carbohydrates in the cortex of nine clones of *Theobroma cacao* L. in relation to their susceptibility to *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. *Crop Protection*, 21 (5), 395-402.
- [34] Yemm, E. W., Cocking, E. C. & Ricketts, R. E. (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 80 (948), 209-214.

- [35] El-Kassaby, Y. A., Moss, I., Kolotelo, D. & Stoehr, M. (2008). Seed germination: mathematical representation and parameters extraction. *Forest Science*, 54 (2), 220-227.
- [36] Calucci, L., Capocchi, A., Galleschi, L., Ghiringhelli, S., Pinzino, C., Saviozzi, F. & Zandomeneghi, M. (2004). Antioxidants, free radicals, storage proteins, puroindolines, and proteolytic activities in bread wheat (*Triticum aestivum*) seeds during accelerated aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (13), 4274-4281.
- [37] Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I. & del Río, L. A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40 (6-8), 521-530.
- [38] Chen, C., Wang, R., Dong, S., Wang, J., Ren, C. X., Chen, C. P., et al. (2022). Integrated proteome and lipidome analysis of naturally aged safflower seeds varying in vitality. *Plant Biol.* 24 (2), 266-277.
- [39] Zhang, L. & Becker, D. F. (2015). Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Frontiers in Plant Science*, 6, 552.
- [40] Ciacka, K., Tymiński, M., Gniazdowska, A. & Krasuska, U. (2020). Carbonylation of proteins—an element of plant ageing. *Planta*, 252 (1), 1-13.
- [41] Dębska, K., Krasuska, U., Budnicka, K., Bogatek, R. & Gniazdowska, A. (2013). Dormancy removal of apple seeds by cold stratification is associated with fluctuation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO production and protein carbonylation level. *Journal of plant physiology*, 170 (5), 480-488.