بسم الله الرحمن الرحيم

٩٩٢٧٨

۸۷/۱/۱۰۴۲۹۹
۸۷_۱۱_۱۲

دانشکده علوم

پایان نامه کارشناسی ارشد (M.Sc)

رشته زیست شناسی گیاهی (گرایش فیزیولوژی گیاهی)

عنوان :

متابولیسم آرژنین به هنگام استراتیفیکاسیون دانه های گردوی ایرانی

پژوهش و نگارش

منیره زارعی قادیکلایی

استاد راهنما

دکتر حمید رضا صادقی پور

استاد مشاور

دکتر علیرضا شاکری

۱۳۸۷ /۵/ ۲۸

بهار ۱۳۸۷

۹۹۶۷۵

به نام خدا

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

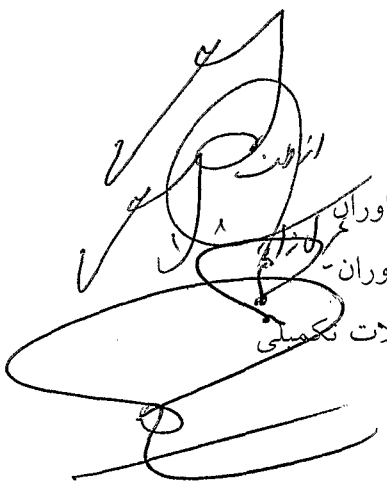
دانشکده علوم

صورتجلسه دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی

جلسه دفاع از پایان نامه خانم منیره زارعی قادیکلایی دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی با شماره دانشجویی ۸۴۱۱۰۱۳۵۰۱ تحت عنوان متابولیسم آرژنین به هنگام استراتیفیکاسیون دانه های گردوی ایرانی

در ساعت ۱۰ صبح روز یکشنبه مورخ ۱۳۸۷/۴/۲ در دانشکده علوم- سالن اجتماعات ۱ با حضور هیئت داوران به شرح زیر برگزار و پایان نامه با نمره ۱۹/۳ پذیرفته شد.

اعضاء هیئت داوران	سمت	امضاء
۱- دکتر حمید رضا صادقی پور	استاد راهنما	
۲- دکتر علیرضا شاکری	استاد مشاور	
۳- دکتر احمد عبدل زاده	عضو هیئت داوران	
۴- دکتر مهناز اقدسی	عضو هیئت داوران	
۵- دکتر محبوبه علیزاده	نماینده تحصیلات تکمیلی	



تقدیم به:

آنان که بر صفحه زندگیم هماره عشق باریدند

صاحبان برترین مقام پدر و مادر عزیزم

ارزشمندترین نعمت‌های پروردگار که با گرمی آفتاب وجودشان و با دریای زلال محبتشان موجب رشد و هدایت من شدند.

سپاسگزاری

سپاس بی منتها سزاوار توست که به مصلحت از نعمات به ما می‌بخشی و به حکمت از ما مـی‌سـتانی. خدایا! آنچه داشته‌ام تو داده‌ای و آنچه کرده‌ام تو میسر نموده‌ای. آنچه در این مجموعه گرد آمده اسـت حاصل نمی‌شد مگر به یاری عزیزانی که در مراحل مختلف این تحقیق مرا یاری رساندند که در اینجـا به رسم ادب لازم می‌دانم مراتب سپاس و قدردانی خویش را تقدیمشان نمایم:

بی شک اجرای موفقیت آمیز این تحقیق بدون راهنمایی استاد ارجمندم جناب آقـای دکتـر حمیدرضـا صادقی‌پور میسر نمی‌گردید، بدینوسیله از کمکهای ارزنده‌ی ایشان تشکر می‌نمایم.

از آقای دکتر علیرضا شاکری به جهت مشاوره و مساعدت بیدریغ شان.

از جناب آقای دکتر احمد عبدل زاده و سرکار خانم دکتر مهناز اقدسی برای تقبل زحمـت داوری ایـن پایان نامه.

از سرکار خانم دکتر علیزاده که به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی دانشگاه در جلـسه دفـاع از پایـان نامه حضور داشتند.

از جناب آقای دکتر عظیم محسنی به جهت مشاوره آماری.

از همه اساتید فرهیخته گروه زیست شناسی به ویژه آقای دکتر حدادچی، آقای دکتـر باقریـه و سـرکار خانم دکتر میان آبادی.

از مسئول محترم آزمایشگاه خانم مقدم و از دانشجویان کارشناسی ارشد خانم‌ها نظام‌دوست، تمسکنی، صفار، میری، شادلو، وحدت، شهمردادی و آقایان هاشمی و علی محمدی.

از برادر و خواهرانم، خانم پیرهادی و آقای اسفندیاری که با فداکاری‌ها و عطوفت بیکرانشان گذراندن دوران تحصیل را برای من آسان نمودند.

چکیده

متابولیسم آرژنین به هنگام استراتیفیکاسیون دانه های گردوی ایرانی

دانه‌های گردوی بالغ در وضعیت خواب بوده از اینرو برای رویش می‌بایستی پس از آبنوشی در شرایط سرما یعنی استراتیفیکاسیون قرار گیرند. تئوری بازدارندگی متابولیکی عدم رویش دانه‌های در حال خواب را ناشی از ناتوانی جنین درشکستن ذخایر غذایی می داند. علیرغم این امر شکستن پروتئین در دانه‌های گردو در هر دو شرایط سرد و گرم رخ می‌دهد. از اینرو می‌توان فرض کرد که متابولیسم اسیدهای آمینه تولیدی پس از پروتئولیز، تحت شرایط گرم مختل شده و باعث کاهش رویش دانه میگردد. از آنجائیکه آرژنین منبع مهمی از ازت و عمده‌ترین اسیدآمینه موجود در دانه‌های گردو می‌باشد، انتظار میرود متابولیسم آن بر وقایع مربوط به رویش در دو شرایط سرما و گرما موثر باشد. بنابراین مطالعه حاضر به بررسی مهمترین آنزیم کاتابولیسم کننده آرژنین یعنی آرژیناز در دو شرایط سرد و گرم در دانه‌های گردو پرداخته است. بعلاوه فعالیت دو آنزیم مهم دیگر درگیر در متابولیسم اسیدهای‌آمینه یعنی گلوتامین سنتتاز و گلوتامات دهیدروژناز نیز بررسی شده است. دانه‌های گردوی ایرانی (*Juglans regia*) پس از خیساندن، به مدت ۶۰ روز دردرجه حرارت ۵ °C قرار گرفتند. رویش دانه به میزان قابل ملاحظه‌ای در این تیمار افزایش یافت .دانه‌هایی که در شرایط گرم (۲۷ °C) قرار گرفته بودند درصد رویش کمی داشتند (۲۵٪) و عموما پس از بیست روز فاسد گردیدند. در حالیکه در دانه های تیمار استراتیفیکاسیون درصد جوانه زنی ۶۱٪ بود. فعالیت آرژیناز بیش از ۲۰۰ درصد در طی استراتیفیکاسیون در دانه‌ها افزایش یافته و از اواسط دوره سرما به بعد به بالاترین مقدار خود باقی می-رسد. در دانه‌هایی که تحت شرایط گرم قرار داشتند، بعد از یک افزایش اولیه، فعالیت آرژیناز سریعا کاهش یافت بطوریکه در شرایط گرم نسبت به سرد اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. اگرچه میزان فعالیت گلوتامین سنتتاز در دو شرایط گرم و سرد متفاوت نبود، اما میانگین فعالیت گلوتامات دهیدروژناز در دانه‌ها تحت شرایط گرم بگونه‌ای معنی-دار بیشتر از دانه‌هایی بود که در شرایط سرد قرار داشتند. کروماتوگرافی لایه نازک ترکیبات نیتروژنی دنسیله شده، بیشترین تجمع آمونیوم درون زاد را در دانه‌های تحت شرایط گرم نشان داد. بعلاوه در شرایط گرم کاهش میزان اسپرمین و انباشتگی بیشتر آگماتین مشاهده گردید. بنابراین می‌توان کاهش رویش دانه‌های گردو تحت شرایط گرم را ناشی از غیر فعال شدن سریع آرژیناز دانست که بنوبه خود منجر به اختلالاتی در متابولیسم اسیدهای آمینه می‌گردد. علاوه بر انباشتگی بیشتر اسیدهای آمینه آزاد و آمونیوم تغییر در محتوی پلی آمینها در شرایط گرم مبین این امر است. بعلاوه افزایش فعالیت گلوتامات دهیدروژناز در شرایط گرم اشاره به دی-آمیناسیون کاتابولیکی اسیدهای آمینه و تنفس آنها در این شرایط دارد. این وضعیت میتواند متابولیسم هدفمند اسیدهای‌آمینه برای فرآیند رویش (که به احتمال زیاد در شرایط سرما عمل می‌کند) را مختل سازد.

کلمات کلیدی:دانه‌های گردو،استراتیفیکاسیون،آرژیناز، گلوتامات دهیدروژناز ، گلوتامین سنتتاز، پلی آمین

فهرست مطالب	صفحه

فصل اول- مقدمه

خواب دانه ۱

نظریه بازدارندگی متابولیکی ۲

تغییرات بیوشیمیایی به هنگام استراتیفیکاسیون ۲

روغنهای ذخیره‌ای ۳

پروتئینهای ذخیره‌ای ۳

تغییر در فعالیت‌های آنزیمی غیرهیدرولیتیک ۵

آنزیم آرژیناز ٦

گلوتامین سنتتاز ۷

گلوتامات سنتاز ۸

گلوتامات دهیدروژناز ۸

تغییر در میزان پلی‌آمین‌ها ۹

معرفی گیاه ۱۲

پیشینه تحقیق ۱۳

اهداف پژوهش ۱٤

فصل دوم- مواد و روشها

۲-۱- مواد و روش های گیاهی ۱۵

۲-۲- آزمون جوانه‌زنی ۱۵

۲-۳- استخراج و اندازه‌گیری فعالیت پروتئاز ۱۶

۲-۴- استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آرژیناز ۱۸

۲-۵- استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز ۲۳

۲-۶- استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز ۲۸

۲-۷- اندازه‌گیری پروتئین محلول ۳۰

۲-۸- استخراج و کروماتوگرافی لایه نازک پلی‌آمین‌ها ۳۱

فهرست مطالب | صفحه

فصل سوم- نتایج

۳-۱- اثر استراتیفیکاسیون بر درصد جوانه‌زنی ۳۷
۳-۲- فعالیت پروتئاز در لپه و محور جنینی دانه‌های گردو ۳۸
۳-۳- فعالیت پروتئاز در لپه و محور جنینی طی استراتیفیکاسیون ۳۹
۳-٤- فعالیت پروتئاز در لپه و محور جنینی دانه‌های آبنوشی شده در شرایط گرم ٤۱
۳-۵- فعالیت آنزیم آرژیناز لپه و محور جنینی در طی استراتیفیکاسیون ٤۲
۳-٦- فعالیت آنزیم آرژیناز لپه و محور جنینی در دانه‌های آبنوشی شده در شرایط گرم ٤٤
۳-۷- فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز لپه و محور جنینی در طی استراتیفیکاسیون ٤۵
۳-۸ - فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز لپه و محور جنینی در دانه‌های آبنوشی شده در شرایط گرم ٤۷
۳-۹- فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز لپه و محور جنینی در طی استراتیفیکاسیون ٤۸
۳-۱۰- فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز لپه و محور جنینی در دانه‌های آبنوشی شده در شرایط گرم ۵۰
۳-۱۱- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در طی استراتیفیکاسیون سرد و گرم ۵۱
۳-۱۲- تغییرات پلی آمین‌ها در لپه و محور جنینی طی استراتیفیکاسیون ۵۲
۳-۱۳- تغییرات میزان پلی آمین‌ها در لپه و محور جنینی در شرایط گرم ۵۳

فصل چهارم- بحث

بحث ۵۵
جمع بندی نهائی و پیشنهادات ۶۲
منابع ۶۴

فهرست اشکال **صفحه**

فصل اول

شکل ۱-۱- مراحل سنتز اسپرمین و اسپرمیدین ۱۱

شکل ۱-۲- بیوسنتز پلی‌آمین‌ها در گیاهان ۱۱

فصل دوم

شکل ۲-۱- تغییرات جذب نور در طول موج ۴۳۰ نانومتر ناشی از شکستن آزوکازئین ۱۷

شکل ۲-۲- تغییرات میزان اورنیتین با گذشت زمان در مخلوط واکنش ناشی از افزودن عصاره آنزیمی استراتیفه شده لپه‌های ۲۰

شکل ۲-۳- تغییرات میزان اورنیتین با گذشت زمان در مخلوط واکنش ناشی از افزودن عصاره آنزیمی محورهای جنینی استراتیفه شده ۲۰

شکل ۲-۴- تغییرات میزان اورنیتین با گذشت زمان در مخلوط واکنش ناشی از افزودن عصاره آنزیمی لپه‌های شرایط گرم (۲۷ ̊C) ۲۰

شکل ۲-۵- تغییرات میزان اورنیتین با گذشت زمان در مخلوط واکنش ناشی از افزودن عصاره آنزیمی محورهای جنینی شرایط گرم (۲۷ ̊C) ۲۰

شکل ۲-۶- نمودار استاندارد اورنیتین به روش Roubelakis and Kliewer (1978) ۲۲

شکل ۲-۷- نمودار استاندارد فسفات به روش Gawronski and Benson (2004) ۲۶

شکل ۲-۸- تغییرات میزان فسفات با گذشت زمان در مخلوط واکنش ناشی از افزودن عصاره آنزیمی ۲۷

شکل ۲-۹- تغییرات جذب نور در طول موج ۳۴۰ نانومتر با زمان در مخلوط واکنش آنزیم گلوتامات دهیدروژناز ۲۹

شکل ۲-۱۰- نمودار استاندارد پروتئین به روش Bradford (1976) ۳۱

شکل ۲-۱۱- استاندارد پوترسین ۳۵

شکل ۲-۱۲- استاندارد پلی‌آمینها ۳۶

فصل سوم

شکل ۳-۱- تاثیر استراتیفیکاسیون سرد بر درصدجوانه‌زنی دانه‌های آبنوشی شده گردو ۳۷

شکل ۳-۲- فعالیت کازئینولیتیک عصاره‌های بدست آمده از لپه‌های گردو در استراتیفیکاسیون سرد در pHهای مختلف ۳۸

شکل۳-۳- فعالیت کازئینولیتیک عصاره‌های بدست آمده از لپه‌های گردو در استراتیفیکاسیون گرم (۲۷ ̊C) در pHهای مختلف ۳۹

شکل۳-۴- الگوی فعالیت پروتئازی لپه‌ها در طی دوره استراتیفیکاسیون سرد ۴۰

شکل ۳-۵- الگوی فعالیت پروتئازی محورهای جنینی در طی دوره استراتیفیکاسیون سرد ۴۰

شکل ۳-۶- الگوی فعالیت پروتئازی لپه‌ها در دانه‌های آبنوشی شده در شرایط گرم (۲۷ ̊C) ۴۱

شکل ۳-۷- الگوی فعالیت پروتئازی محورهای جنینی دردانه‌های آبنوشی شده درشرایط گرم (۲۷ ℃) ۴۲
شکل ۳-۸- الگوی تغییر فعالیت آنزیم آرژیناز لپه‌ها در طی دوره استراتیفیکاسیون ۴۳
شکل ۳-۹- الگوی تغییر فعالیت آنزیم آرژیناز محورهای جنینی در طی دوره استراتیفیکاسیون ۴۳
شکل ۳-۱۰- الگوی تغییر فعالیت آنزیم آرژیناز لپه‌ها در دانه‌های آبنوشی شده در شرایط گرم (۲۷ ℃) ۴۴
شکل ۳-۱۱- الگوی تغییر فعالیت آنزیم آرژیناز محورهای جنینی در دانه‌های آبنوشی شده درشرایط گرم (۲۷ ℃) ۴۵
شکل ۳-۱۲- الگوی تغییر فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز لپه‌ها درطی دوره استراتیفیکاسیون ۴۶
شکل ۳-۱۳- الگوی تغییر فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز محورهای جنینی درطی دوره استراتیفیکاسیون ۴۶
شکل ۳-۱۴- الگوی تغییر فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز لپه‌ها در دانه‌های آبنوشی شده درشرایط گرم (۲۷ ℃) ۴۶
شکل ۳-۱۵- الگوی تغییر فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز محورهای جنینی در دانه‌های آبنوشی شده درشرایط گرم (۲۷ ℃) ۴۷
شکل ۳-۱۶- الگوی تغییر فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در لپه‌ها در طی دوره استراتیفیکاسیون ۴۹
شکل ۳-۱۷- الگوی تغییر فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز محورهای جنینی در طی دوره استراتیفیکاسیون ۴۹
شکل ۳-۱۸- الگوی تغییر فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز لپه‌ها در دانه‌های آبنوشی شده در شرایط گرم(۲۷ ℃) ۵۰
شکل ۳-۱۹- الگوی تغییر فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز محورهای جنینی در دانه‌های آبنوشی شده درشرایط گرم (۲۷ ℃) ۵۱
شکل ۳-۲۰- الگوی کروماتوگرافی لایه نازک پلی‌آمینهای استخراج شده از لپه (الف) و محور جنینی (ب) دانه‌های گردوی آبنوشی شده در شرایط استراتیفیکاسیون سرد ۵۳
شکل ۳-۲۱- الگوی کروماتوگرافی لایه نازک پلی‌آمینهای استخراج شده از لپه (الف) و محور جنینی (ب) دانه‌های آبنوشی شده درشرایط گرم (۲۷ ℃) ۵۴

فهرست جداول

صفحه

جدول ۲-۱- روش تهیه نمودار استاندارد اورنیتین به روش Roubelakis and Kliewer (1978) ۲۲

جدول ۲-۲- روش تهیه نمودار استاندارد فسفات به روش Gawronski and Benson (2004) ۲۶

جدول ۲-۳- طرز تهیه نمودار استاندارد پروتئین به روش Bradford, (1976) ۳۱

جدول ۳-۱- الگوی تغییر فعالیت آنزیم گلوتامات دهیدروژناز در لپه و محور جنینی در طی استراتیفیکاسیون سرد و گرم ۵۱

فهرست ضمائم

صفحه

ضمائم ۷۸

مقدمه

Introduction

۱-۱- خواب دانه:

یکی از مهمترین دوره‌های تکوینی در زندگی گیاهان تولید دانه است. در بسیاری از گونه‌های مناطق معتدله رویش دانه توسط مکانیسمی که اصطلاحاً خواب[1] نامیده می‌شود، ممانعت می‌گردد (Derkx, 2000). در بسیاری از گونه‌ها خواب دانه پدیده‌ای طبیعی است که شانس جوانه‌زنی دانه‌ها در زمان مناسب را افزایش می‌دهد (Leadem, 1997). در واقع خواب تضمین کننده رویش دانه در شرایط مساعد می‌باشد. به طور کلی ناتوانی جنین در غلبه بر محدودیت‌های اعمال شده بر آن را علت اصلی خواب می‌دانند. خواب دانه ناشی از دو عامل می‌باشد:

۱- خواب ناشی از پوششهای جنینی که به آن خواب برون زاد[2] و یا خواب اعمال شده از طرف پوشش جنین[3] گفته می‌شود (Xia and Kermode, 1999).

۲- خواب ناشی از جنین نارس[4] که به آن خواب درون زاد[5] یا خواب فیزیولوژیکی گفته می‌شود. مثالی از این نوع خواب در گیاه یولاف[6] گزارش شده است (Bewely and Black, 1994). این نوع خواب با قرار دادن دانه‌ها در شرایط سرد و مرطوب که اصطلاحاً استراتیفیکاسیون[7] نامیده می‌شود برطرف می‌گردد (Leadem, 1997; Xia and Kermode, 1999). اطلاعات چندانی در خصوص چگونگی نقش سرما در تیمار استراتیفیکاسیون در برطرف کردن خواب دانه‌های گونه های درختی در دست نیست. عموما درجه حرارت پائین سبب کاهش سرعت واکنش‌های آنزیمی

---

1 -Dormancy

2 -Exogenous

3-coat-imposed

4-immature embryo

5- Endogenous

6 -*Avena fatua*

7- Stratification

می‌شود. بنابراین انتظار می‌رود که فرآیندهای متابولیکی دانه در اثر سرما به تاخیر بیافتند. علیرغم این امر اثرات مثبت تیمار سرما در تسریع جوانه‌زنی دانه مشاهده می‌شود. احتمال می‌رود که تیمار سرما در مهار برخی از عوامل ممانعت کننده جوانه‌زنی دانه نقش داشته باشد (Bewely and Black, 1994). به عبارتی تیمار سرما می‌تواند برخی فرآیندهای القاء کننده خواب را ممانعت کرده یا اثرات دیگری را موجب شود. به طور کلی می‌توان تغییراتی را که به هنگام استراتیفیکاسیون به وقوع می‌پیوندد شامل تغییر در تنظیم کننده‌های رشد یا تغییر در حساسیت جنین نسبت به تنظیم کننده‌های رشد و تغییر در فعالیت‌های آنزیمی مرتبط با شکستن مواد ذخیره‌ای دانه دانست.

در یک جمع‌بندی کلی نقش سرما در برطرف کردن خواب و تشدید فرآیند رویش دانه را به دو صورت عنوان کرده‌اند که عبارتند از: نظریه بازدارندگی متابولیکی (Ross, 1984 ; Lewak *et al.*, 2000) و فعال شدن مکانیسمهای ترمیم (Wang and Berjak, 2000).

۱-۲- نظریه بازدارندگی متابولیکی:

نظریه متابولیکی بیان می‌کند که دانه‌های در حال خواب در مسیر متابولیکی که منجر به شکستن ذخایر غذایی می‌گردد ناتوان هستند و این ناتوانی در طی سرما برطرف می‌شود (Ross,1984 ; Lewak *et al.*, 2000).

۱-۳- تغییرات بیوشیمیایی به هنگام استراتیفیکاسیون:

مواد ذخیره‌ای دانه به طور عمده شامل روغن‌های ذخیره‌ای، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها هستند. در طی استراتیفیکاسیون هر سه نوع ماده ذخیره‌ای دستخوش تغییرات شده بطوریکه روغن‌های ذخیره‌ای به اسیدهای چرب، پروتئین‌ها به اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک تبدیل شده و میزان کربوهیدراتهای نامحلول همچون نشاسته افزایش می‌یابد (Li and Ross, 1990 a,b; Zarska-Maciejewska, 1992).

۱-۳-۱- روغن‌های ذخیره‌ای:

روغن‌های ذخیره‌ای یکی از مواد اصلی دانه به شمار می‌روند و در اندامک‌هائی به نام اجسام روغنی[1] تجمع می‌یابند (Huang, 1996). تری آسیل گلیسرول مهمترین شکل روغن‌های ذخیره‌ای است. در طی استراتیفیکاسیون تجزیه روغن‌های ذخیره‌ای نقش مهمی را در بر طرف کردن خواب دانه ایفا می‌کند. به عنوان مثال در طی دوره استراتیفیکاسیون دانه‌های سیب کاهش جزیی در مقدار روغن‌های ذخیره‌ای روی می‌دهد (Zarska-Maciejewska and lewak, 1976). تبدیل متابولیتهای حاصل از تجزیه روغنهای ذخیره‌ای به قند که به شکل نشاسته ذخیره می‌شود در طی تیمار استراتیفیکاسیون دانه‌هایی همچون سیب و فندق گزارش شده است (Dawidowicz-Grzegorzewska, 1989; Li and Ross, 1990 a,b). فعال شدن برخی دیگر از آنزیم‌های درگیر در شکستن ذخایر غذایی یا متابولیسم بعدی محصولات حاصل از شکستن این ذخایر در طی دوره استراتیفیکاسیون گزارش شده است. افزایش هیدرولیز روغن‌های ذخیره‌ای در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم لیپاز به هنگام استراتیفیکاسیون دانه فندق همراه با برطرف شدن تدریجی خواب در این گیاه است (Li and Ross, 1990a). فعالیت آنزیم لیپاز در طی دوره استراتیفیکاسیون دانه در نوعی بازدانه به نام *Pseudotsuga menziesii* و سیب نیز گزارش شده است (Zarska-Maciejevska, 1992 ; Ching, 1968).

۱-۳-۲- پروتئین‌های ذخیره‌ای:

پروتئینهای ذخیره‌ای بر اساس حلالیت به چهار گروه تقسیم می‌شوند (Osborn, 1924) که عبارتند از آلبومین‌ها یا پروتئین‌های ذخیره‌ای محلول در آب، گلوبولین‌ها یا پروتئین‌های ذخیره‌ای محلول در نمک، پرولامین‌ها یا پروتئین‌های ذخیره‌ای محلول در الکل و گلوتلین‌ها یا پروتئین‌های ذخیره‌ای محلول در اسید یا باز. در این میان، گلوبولین‌ها در دانه‌های دولپه‌ای‌ها به مقدار فراوان بوده و پرولامین‌ها مهمترین پروتئینهای ذخیره‌ای در اکثر غلات می‌باشند. پروتئینهای ذخیره‌ای که در دانه‌ها، سنتز و ذخیره می‌شوند بعنوان منبع نیتروژن و کربن در طی جوانه‌زنی و رشد گیاهچه مصرف می‌شوند. به هنگام شرایط مطلوب جوانه‌زنی این پروتئینها تحت فرآیندهای پروتئولیتیکی قرار گرفته و

1-Oil body

می‌شکنند. شکستن پروتئین‌های ذخیره‌ای نشان دهنده‌ی از بین رفتن مکانیسم بازدارنده در مقابل تجزیه می‌باشد. تحقیقات در این خصوص بطور عمده بر روی دانه‌های جوانه‌زده گیاهانی همانند بقولات، کلزا، آفتابگردان و غلات صورت گرفته است. در این بافت‌ها شکستن پروتئینهای ذخیره‌ای تنها بعد از خروج ریشه‌چه و اتمام دوران جوانه‌زنی قابل اندازه‌گیری می‌باشد (Muntz *et al.*, 2001). مطالعات فراساختاری نشان‌دهنده تجزیه تدریجی اجسام پروتئینی در بافتهای ذخیره‌ای دانه‌های صنوبر سیاه (Wang and Berjak, 2000)، سیب و فندق (Bouvier-Durand *et al.*, 1984; Dawidowicz-Grzegorzewska, 1989; Andriotis *et al.*, 2004) در طی استراتیفیکاسیون است. استراتیفیکاسیون در نوعی بازدانه به نام *Pseudotusga menziesii* باعث شکستن پروتئینهای ذخیره‌ای می‌گردد (Green *et al.*, 1991). در گیاه اخیر همزمان با شکستن پروتئینهای ذخیره‌ای، پروتئازی با وزن مولکولی بالا با pH بهینه قلیایی فعال می‌شود (Forward *et al.*, 2001). افزایش فعالیت پروتئازها در طول دوره استراتیفیکاسیون در نتیجه سنتز پروتئازهای جدید و غیر فعال شدن ممانعت کننده‌های پروتئازی که به طور طبیعی در بافت وجود دارند می‌باشد (Salmia and Micola,1980). بررسی‌های انجام شده بر روی نوعی کاج (*Pinus taeda* L.) نشان داده است که میزان پروتئینهای ذخیره‌ای دانه هم در جنین و هم در مگاگامتوفیت در طی استراتیفیکاسیون تغییر می‌یابد (Schneider and Gifford, 1994). در طی استراتیفیکاسیون دانه-های سیب میزان فعالیت پروتئازها افزایش می‌یابد و این فعالیت منحصرا در محورهای جنینی مشاهده می‌شود (Lewak *et al.*, 1975). در نهاندانگان محورهای جنینی در هیدرولیز پروتئینهای ذخیره‌ای به هنگام جوانه‌زنی نقش دارند و هیدرولیز اولیه پروتئینها در محورهای جنینی صورت می‌گیرد. این در حالی است که هیدرولیز پروتئینهای ذخیره‌ای لپه‌ها بعد از جوانه‌زنی انجام می‌شود (Schlereth *et al.*, 2000). در طی استراتیفیکاسیون دانه‌های سیب وفندق نیز شکستن ذخایر پروتئینی از چنین الگویی تبعیت کرده یعنی شکستن این ذخایر ابتدا در محور جنینی انجام می‌شود (Dawidowicz-Grezegorzewka, 1989; Andriotis *et al.*, 2004). شکستن ذخایر پروتئینی نیز در طی استراتیفیکاسیون دانه‌های گردو گزارش شده است (Einali and Sadeghipour, 2007). بعلاوه مطالعه اخیر نشان می‌دهد که در دانه‌های گردو پروتئازی با جرم مولکولی زیاد و با pH بهینه اسیدی تا خنثی در دانه ذخیره شده است و نیز دو پروتئاز با جرم مولکولی ۸۳ و ۸۹ کیلو دالتون در دانه‌های در حال جوانه‌زنی وجود داشته که ممکن است در شکستن پروتئینهای ذخیره‌ای درگیر باشند. بر

خلاف گونه‌های دیگر، شکستن ذخایر پروتئینی دانه‌های گردو در طی تیمار سرما در لپه‌ها اتفاق افتاده و تغییر قابل ملاحظه‌ای در مقدار ذخایر پروتئین محور جنینی مشاهده نمی‌شود. تغییراتی نیز در طی استراتیفیکاسیون، در الگوی سنتز برخی پروتئین‌ها در نوعی کاج (*Pinus taeda* L.) روی می‌دهد بطوریکه هم در جنین و هم در مگاگامتوفیت سنتز پروتئین‌هایی با اوزان ملکولی کمتر از ۴۶ کیلو دالتون در طی استراتیفیکاسیون به شدت کاهش می‌یابد. علاوه بر این سنتز یک سری از پروتئین‌های با اوزان ملکولی ۱۶ الی ۷۸ کیلودالتون در طول این دوره افزایش می‌یابد (Schneider and Gifford, 1994). در این نوع کاج در طول تیمار سرما در اثر هیدرولیز جزئی پروتئین‌ها، میزان اسیدهای آمینه‌ای همچون آسپارتات، گلوتامات و آرژنین بطور نسبی افزایش می‌یابند (King and Gifford, 1997). مطالعات برروی افرای قندی[1] نشان دهنده افزایش ظرفیت سنتز پروتئین در جنین در طی استراتیفیکاسیون و تغییر در میزان پروتئین‌های اختصاصی است که سبب برطرف کردن خواب دانه می‌شوند. پروتئین‌های ویژه‌ای در لپه‌ها سبب ابقای خواب در دانه‌های افرا می‌شوند و بنظر می‌رسد که تیمار استراتیفیکاسیون با کاهش این پروتئین‌ها سبب برطرف شدن خواب دانه می‌شود (Hance and Bevington, 1992).

۱-۳-۳- تغییر در فعالیت‌های آنزیمی غیرهیدرولیتیک

افزایش فعالیت آنزیم ایزوسیترات لیاز در طی تیمار سرما در دانه‌های سیب (Bogatek *et al.*, 2002)، کاج قندی (Noland and Murphy, 1984) و فندق (Li and Ross, 1990a) نیز گزارش شده است. در دانه‌های فندق علاوه بر افزایش فعالیت آنزیم‌های گلی اکسیزومی مثل کاتالاز و ایزوسیترات لیاز (Li and Ross, 1990a)، آنزیم گلوکونئوژنزی فروکتوز ۱و۶ بیس فسفاتاز (Li and Ross, 1988) در طی تیمار سرما فعال شده که این تغییرات همگام با افزایش فعالیت لیپاز در طی دوره سرما نشان دهنده فعال شدن مسیر گلوکونئوژنز و تبدیل اسیدهای چرب حاصل از تجزیه روغن‌های ذخیره‌ای به قند است. در دانه‌های فندق در طی تیمار سرما افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز (Gosling and Ross, 1981) و کاتالاز (Li and Ross, 1990a) نیز گزارش شده است. به هر حال میزان فعالیت آنزیمهای اخیر (Gosling and Ross, 1981) در دانه‌هائی که تیمار گرما دریافت کرده بودند بسیار بالاتر بوده است که آنرا مرتبط با پیری تشدید شده دانه در این شرایط

1-*Acer saccharum* Marsh

می‌دانند. در دانه‌های آبنوشی شده گردو در طی استراتیفیکاسیون و تیمار گرما رونـد مـشابه تغییـرات فعالیت آنزیم کاتالاز همچنین بوقوع می‌پیونـدد (Einali and .Sadeghipour, 2007) در نـوعی کاج[1] در طی تیمار سرما میزان فعالیت آنزیم آرژیناز به طور جزئی افزایش پیدا می‌کند و عمده فعالیت این آنزیم در فرآیند رویش دانه پس از تیمار سرما مشاهده می‌شود (King and Gifford, 1997).

۱-۳-۴- آنزیم آرژیناز:

مطالعات بر روی ترکیب اسیدهای آمینه در دانه‌های گردو نشان داد کـه آرژنـین، گلوتامـات و آلانـین عمده اسیدهای آمینه آزاد بافت لپه را تشکیل می‌دهند در حالی که آلانین، اسید آمینه اصلی بافت جنین است (Mapelli *et al.*, 2001). در طول جوانه‌زنی دانه‌های گردو غلظت اسیدهای آمینه آرژنین و سیترولین در لپه‌ها و محورهای جنینی افزایش مـی‌یابـد (Mapelli *et al.*, 2001). از آنجـایی کـه پروتئینهای دانه گردو سرشار از آرژنین هستند، افزایش در آرژنین آزاد مـی‌توانـد بـه دلیـل هیـدرولیز پروتئین در طـول دوران جوانـه‌زنـی باشـد (Sze-Tao and Sathe, 2000). همچنـین سـیترولین می تواند در انتقال اسیدهای آمینه آزاد در طول دوران جوانه‌زنی دخالت داشـته باشـد (Mapelli *et al.*, 2001) در نوعی کاج (*Pinus taeda* L.) بعد از شکستن پروتئین‌هـای ذخیـره‌ای، بیـشترین اسید آمینه موجود آرژنین می‌باشد (Todd *et al.*, 2002) و بیش از ۴۶ درصد از نیتروژن کل ذخایر پروتئینی مگاگامتوفیت را تشکیل مـی‌دهـد (Todd and Gifford, 2002). آرژنـین ۶۵ درصـد از نیتروژن اسیدهای آمینه آزاد لپـه‌هـای نخـود را تـشکیل مـی‌دهـد (De Ruiter and Kolloffel, 1983). آرژیناز، آرژنین را به اوره و اورنتین تبدیل مـی‌کنـد (Alabadi *et al.*, 1996). اورنتـین پیش سازهای بیوسنتز پلی آمین‌هائی همچون پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین می‌باشد. اوره موجود در اثر واکنش اوره- آزی به آمونیوم و CO_2 تبدیل می‌شود. آمونیوم تولیدی جهت بیوسنتز اسیدهای آمینه توسط سیستم آنزیمی GS/GOGAT مورد استفاده قرار می‌گیرد. آرژنین تولیدی ناشـی از شکـستن پـروتئین‌هـا ذخیـره‌ای بـه میتوکنـدری انتقـال مـی‌یابـد (Polacco and Holland, 1993) و در میتوکنـدری توسـط آنـزیم آرژینـاز تجزیـه مـی‌شـود (Goldraij and Polacco, 2000). انـدازه هولوپروتئین آرژیناز ۱۴۰ کیلو دالتون گزارش شده است. جرم مولکولی آرژیناز در زنبق، نخود و سویا به ترتیب ۲۰۰، ۲۰۴ و ۲۲۰-۲۴۰ کیلودالتون گزارش شـده اسـت (Todd *et al.*,2001). کوفـاکتور

1-*Pinus taeda* L.

آنزیم آرژیناز یون منگنز می‌باشد (Todd and Gifford, 2002). فعالیت آنزیم آرژیناز تحت تاثیر pH تغییر می‌یابد. pH بهینه آنزیم آرژیناز در لپه‌های Vigna catjang و لپه‌های نخود بـه ترتیـب ۱۰ و ۹/۱ گـزارش شـده اسـت (De Ruiter and Kolloffel, 1983; Dabir *et al.*, 2005). P II پروتیئن کلروپلاستی می‌باشد و توسط ژنهای هسته کد می‌شـود و در بیوسـنتز آرژنـین دخالـت دارد. فقدان پروتیئن P II، باعث تجمع آرژنین می‌شود (Ferrario-Mery *et al.*, 2006). در طی تیمار سرما در دانه نوعی کاج (*Pinus taeda* L.) میزان فعالیت آنزیم آرژیناز به طور جزئی افزایش پیدا می‌کند و عمده فعالیت این آنزیم در فرایند رویش دانـه پـس از تیمـار سـرما مـشاهده مـی‌شـود (King and Gifford, 1997).

۱-۳-۵- گلوتامین سنتتاز:

گلوتامین سنتتاز (GS) آنزیم کلیدی در متابولیـسم نیتـروژن گیاهـان مـی‌باشـد (Canovas *et al.*, 2007). گلوتامین سنتتاز تبدیل نیتروژن غیر آلی (آمونیوم) به شکل آلـی (گلوتـامین) را کاتـالیز مـی-کند (Oliveira *et al.*, 2002). GS پروتئین اکتامریـک بـا وزن مولکـولی ۴۰۰- ۳۵۰ کیلودالتـون مـی‌باشـد (Fuentes *et al.*, 2001). GS1 شـکل سـیتوزولی آنـزیم گلوتـامین سـنتتاز و مـسئول اسیمیلاسیون آمونیوم جذب شده از خاک و گردش آمونیوم آزاد شده در فرآیندهای متابولیکی به غیـر از تنفس نوری می‌باشد. GS2 شکل کلروپلاستی آنـزیم گلوتـامین سـنتتاز بـوده و در اسیمیلاسـیون آمونیوم تولید شده ناشی از احیاء نیترات و تنفس نوری دخیـل مـی‌باشـد (Ortega *et al.*, 2001). GS1 توسط ژن‌های چند گانـه و GS2 توسـط ژن منفـرد هـسته کـد مـی‌شـوند (Oliveira and Coruzzi, 1999). اهمیت فیزیولوژی GS اسیمیلاسیون نیتروژن برای کاتابولیسم پروتئین و استفاده از گلوتامین به عنوان سوبسترای نیتروژنی یا به عنوان محصول انتقالی نیتروژن می‌باشـد (Teixeira *et al.*, 2005). افزایش سنتز گلوتامین یکی از مهمترین وقایع متابولیکی در طول مـدت جوانـه‌زنـی است و در واقع بیوسنتز اسیدهای آمینه بعنوان یک مخـزن متـابولیکی فعـال جهـت مـصرف آمونیـوم تولیدی ناشی از فعالیت متوالی آرژیناز و اوره- آز عمل می‌کند که این امر بـه نوبـه خـود زمینـه‌سـاز بیوسنتز سایر اسیدهای آمینه می‌باشد. فعالیت گلوتامین سنتتاز کلروپلاستی در طی مدت تاریکی، پیری و اسـترس‌هـای محیطـی کـاهش و در حـالی کـه گلوتـامین سـنتتاز سیتوپلاسـمی افـزایش مـی‌یابـد (Loulakakis *et al.*,1994; Kichey *et al.*, 2005; Pageau *et al.* 2006). گلوتـامین