

## تأثیر پیش تیمار ملاتونین بر برخی فاکتورهای فیزیولوژی در ریزجلبک کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*) تحت تنش پرتوهای یونیزان

پیمان آقائی<sup>۱</sup>، سیدعلی حسینی نفرشی<sup>۲\*</sup>، احمد رضمانی مقدم<sup>۳</sup> و محمدامین طغیانی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی: ۳۶۹۷-۱۹۳۹۵، تهران، ایران.

<sup>۲</sup>گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، اصفهان، ایران.

<sup>۳</sup>گروه فیزیک هسته‌ای، دانشکده فیزیک، دانشگاه کاشان، کاشان، اصفهان، ایران.

\*اصفهان، کاشان، دانشگاه کاشان، دانشکده شیمی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، کدپستی: ۸۷۳۱۷-۵۳۱۵۳

پست الکترونیکی: sahosseini@kashanu.ac.ir

### چکیده

ملاتونین (N-استیل-۵-متوکسی تریپتامین) دارای نقش مهم و اساسی در بسیاری از فرآیندهای نموی و پاسخ به تنش‌ها، در گیاهان و جلبک‌ها است. در این تحقیق سعی شده تا نقش میانجی‌گری ملاتونین روی میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و پاسخ سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی به تنش گاما در سه غلظت شاهد، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار در ریزجلبک کلرلا ولگاریس مورد بررسی قرار بگیرد. نتایج نشان داد که جلبک‌هایی که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین پیش تیمار شده بودند، دارای رنگیزه‌های فتوسنتزی بیشتر و غشاء پایدارتری در شرایط تنش گاما بودند. بر اساس نتایج این تحقیق، ملاتونین اگرچه می‌تواند تا اندازه‌ای با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی مانند تولید پرولین بیشتر، مقاومت جلبک کلرلا را افزایش دهد ولی این احتمال وجود دارد که این مقاومت بیشتر به سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی مرتبط بوده باشد.

**کلیدواژگان:** جلبک کلرلا ولگاریس، ملاتونین، پرتوگاما، فیزیولوژی، کلروفیل، پایداری غشاء، پرولین.

### ۱. مقدمه

متنوعی از متابولیت‌های ارزشمند و محافظتی و انعطاف بالای فیزیولوژیکی آن‌ها نسبت داده می‌شود [۳]. با وجود احتیاج حداقلی به مواد مغذی و فضای مورد نیاز برای زیستن، ریزجلبک‌ها محتوای روغنی و متابولیتی بالایی را از خود نشان می‌دهند. جالب‌تر آنکه این محتوای متابولیتی می‌تواند با قرار گرفتن جلبک در محیط‌های پر تنش به مراتب افزایش یابد

ریزجلبک‌ها<sup>۱</sup> گروه بسیار متنوعی از میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده را تشکیل می‌دهند. داشتن قدرت رشد و نمو سریع و زیست‌پذیری در شرایط بسیار دشوار از ویژگی‌های این موجودات مقاوم است [۱، ۲]. وجود چنین مزیت‌های منحصر به فردی بیشتر به ساختار سلولی ساده، وجود طیف

<sup>۱</sup> Microalgae

ملاتونین در بعضی گیاهان به اثبات رسیده است. مشارکت در حفظ کارایی زنجیره‌ی انتقال الکترونی در شرایطی که کمبود آب وجود دارد، از دیگر وظایف ملاتونین می‌باشد. در این حال، برای اینکه کلریلاست از صدمات ایجاد شده توسط گونه‌ها فعال اکسیژنی اجتناب کند، لازم است تا ملاتونین از طریق پاک‌سازی مستقیم ROها و اثر روی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی نقش محافظتی خود را بازی کند [۹]. در این خلال، نقص اطلاعات کافی درباره‌ی مطالعات اثرات تقویتی ملاتونین در مقابله و تحمل به پرتوهای یونزا و تغییرات متابولیت‌های ایجاد شده در هنگام تنش در سلول‌های یوکاریوتی مثل جلبک‌ها که پتانسیل بالایی در تحمل به این نوع تنش‌ها دارند، دیده می‌شود.

از روش‌های مطالعه‌ی عملکرد متابولیت‌های سلولی، تغییر سطح فیزیولوژی سلول به وسیله‌ی اعمال تنش‌های محیطی می‌باشد. پاسخ‌هایی که از این تغییرات عملکردی بدست می‌آید اطلاعات زیادی را درباره‌ی نحوه‌ی سازوکار تنظیمی و ارتباطات عملکردی متابولیت‌ها به نمایش می‌گذارد [۴]. علی‌رغم اینکه جلبک‌ها نقش‌های مهمی از نظر بوم‌شناختی دارند و می‌توانند به عنوان شاخص مهم تغییرات محیطی در نظر گرفته شوند، مطالعات جامعی پیرامون اثر پرتوهای یونیزان روی جلبک‌ها انجام نگرفته است. به‌ویژه آنکه مشخص شده است بسیاری از میکروارگانیسم‌های فتوسنتز کننده و غیر فتوسنتز کننده، پتانسیل‌های بالایی در مقاومت به مقادیر شدید رادیواکتیو، از خود نشان می‌دهند [۲، ۱۰-۱۲]. در پژوهش پیش رو، اثر پیش تیمار ملاتونین در افزایش مقاومت جلبک کلرلا ولگاریس به پرتوهای یونیزان مورد تحقیق قرار گرفته است. به منظور رمزگشایی از نحوه و سازوکار اثرات القائی مولکول‌های ملاتونین در ایجاد سازگاری به پرتوهای یونیزان، ریزجلبک سبز کلرلا ولگاریس تحت پیش تیمار غلظت‌های مختلف ملاتونین قرار گرفته و با اشعه‌ی گاما تنش داده شدند

[۲، ۴]. تمامی این ویژگی‌ها باعث شده است که ریزجلبک‌های فتوسنتز کننده‌ای مانند کلرلا به عنوان نامزدهای اصلی، جهت تأمین سوخت‌های تجدیدپذیر، منابع پایدار امنیت غذایی و مدل‌های مطالعاتی مناسب در مقابل تنش‌ها در نظر گرفته شوند.

مطالعات نشان داده‌اند که پرتوهای یونیزان می‌توانند نفوذپذیری و سازماندهی غشای سلولی را از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و به طبع آن پراکسیداسیون لیپید و تعدیلات پروتئینی، تحت تأثیر قرار دهند [۵]. این اثرات سوء به حدی است که در شدت بالا می‌تواند دیواره‌ی سلول‌های موجودات فتوسنتز کننده و گیاهان عالی را کاملاً از بین ببرد. از دیدگاه متابولیتی نیز پرتوهای یونیزان، تغییر فعالیت فتوسنتزی، تعدیل سیستم آنتی‌اکسیدانی، تغییر سطوح مالون دی‌آلدئید (یک مارکر رادیکال‌های آزاد اکسیژنی) و افزایش تولید ترکیبات فنولی را باعث می‌شوند. پرتوهای یونزا از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS)، محرک فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی در سلول‌ها هستند [۶].

ملاتونین (N-استیل-۵-متوکسی تریپتامین) از ترکیبات ایندوآمین ساخته شده در گیاهان و جلبک‌ها بوده و نقش‌های متنوعی همچون دخالت در ریتم‌های رشد شبانه‌روزی و پاسخ به تنش‌ها را بر عهده دارد [۷]. تحقیقات انجام شده در این زمینه نشان داده است که ملاتونین پتانسیل بالایی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان و جاروب کننده‌ی رادیکال‌های آزاد دارد [۷، ۸]. ملاتونین باعث تنظیم مثبت ژن‌های مقابله‌کننده با استرس شده و در نتیجه عملکرد فتوسنتز، چرخه‌ی سلولی، بازسازی DNA، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و بیوسنتز لیپیدها را تحت شرایط تنش‌های غیرزیستی کنترل می‌کند [۷]. در تنش‌های محیطی، ملاتونین نقش کمکی برای فتوسنتز را بازی می‌کند. تحت تنش خشکی حفظ عملکرد روزنه‌ها از طریق کاهش تولید آبسزیک اسید و حفظ تعادل آبی سلول به وسیله‌ی

تا فیزیولوژی عملکرد آن‌ها در این شرایط مورد بررسی قرار گیرد.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱،۲. کشت سلول، پیش‌تیمار و اعمال تنش

کلرلا ولگاریس مورد آزمایش از بانک جلبکی دانشگاه تگزاس<sup>۱</sup> تهیه شد و در محیط کشت BBM<sup>۲</sup> تحت شرایط استریل و کنترل (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، تحت تابش نور سفید و آفتابی فلئورسنت با شدت نوری ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی ۸ ساعت تاریکی) کشت داده شد. در ادامه پس از تعیین مرحله ایستایی رشد، سوسپانسیون‌های جلبکی با حجم و تعداد سلول برابر تهیه گردید. سپس ملاتونین در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار به صورت پیش‌تیمار به این محیط‌ها اضافه شد. پس از طی زمان سازگاری (روز پنجم) نمونه‌ها به دو گروه تقسیم شده، گروه اول تحت تشعشع گاما با میزان ۳۰۰ گری قرار گرفتند.

پرتودهی با استفاده از یک چشمه کبالت ۶۰ در پژوهشکده کاربرد پرتوها، وابسته به سازمان انرژی اتمی تهران انجام شد. گروه دوم بدون تیمار با اشعه گاما پرتودهی شدند. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های جلبکی مورد تنش و بدون تنش، مجدداً در محیط کشت تازه‌ی BBM واکنش شدند. در یک بازه‌ی زمانی هجده روزه منحنی رشد جلبک‌ها که معرف توانایی بازیافت آن‌ها از شرایط سخت بود با تعیین تراکم نوری به روش طیف‌سنجی در طول موج ۶۸۳ نانومتر (اسپکتروفوتومتر مرئی-فرابنفش مدل، Bioave II) رسم شد. اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی در پایان روز هجدهم و پس از تثبیت جلبک‌ها در نیتروژن مایع صورت گرفت.

### ۲،۲. اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاروتنوئیدی

محتوای کلروفیل‌ها و کاروتنوئید کل با روش لیچنتالر<sup>۳</sup> در ۱۹۸۳، اندازه‌گیری شد [۱۳]. بدین‌منظور ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی در دور ۵۰۰۰ rpm<sup>۴</sup> به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریژ شده و رسوب آن با ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد (V/V) همگن شد. مخلوط حاصل در rpm ۵۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتیفریژ شده و سپس جذب آن در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۶ و ۴۷۰ نانومتر شامل حداکثر جذب رنگیزه‌های به ترتیب کلروفیل a، b و کاروتنوئید، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای محاسبه محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاروتنوئیدها از فرمول لیچنتالر استفاده و نتایج به‌صورت میلی‌گرم در وزن تازه جلبک گزارش شد.

### ۳،۲. اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها

پایداری غشاهای سلولی به وسیله‌ی ثبت میزان نشت الکترولیت‌ها بر اساس روش لیو<sup>۵</sup> تعیین شد [۱۴]. ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی کلرلا ولگاریس در دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریژ شد. رسوب جلبکی حاصل با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر آبکشی و در نهایت در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. میزان نشت اولیه الکترولیت (EC1)<sup>۶</sup> با دستگاه هدایت‌سنج (Jenway, Model 4510)، بعد سپری شدن این زمان اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شد و دوبار با هدایت‌سنج، نشت ثانویه الکترولیت (EC2) اندازه‌گیری شد. میزان نشت یون‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

نشت الکترولیت:  $(EL) (\%) = ((EC1/EC2) \times 100)$

<sup>3</sup> Lichtenthaler

<sup>4</sup> Revolutions per minute

<sup>5</sup> Liu

<sup>6</sup> Electrolyte leakage

<sup>1</sup> UTEX Culture Collection of Algae

<sup>2</sup> Bold's Basal Medium

## ۴,۲. اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید

میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء با اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید<sup>۱</sup> (MDA) و به روش هیس<sup>۲</sup> در ۱۹۶۸، انجام شد [۱۵]. بدین منظور رسوب ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی در ۵ میلی‌لیتر محلول تری کلرو استیک اسید (TCA)<sup>۳</sup> ۵ درصد ساییده و سپس در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا شده و به ۱ میلی‌لیتر از آن ۱ میلی‌لیتر محلول تیوباربتوریک اسید<sup>۴</sup> (TBA) ۵ درصد اضافه شد. محلول حاصل در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد و سپس بلافاصله درون حمام یخ قرار گرفت و جذب آن در طول موج‌های ۵۳۲ نانومتر (کمپلکس صورتی MDA-TBA) و ۶۰۰ نانومتر (جذب سایر رنگیزه‌های غیر اختصاصی) خوانده شد. برای اندازه‌گیری میزان MDA از ضریب خاموشی  $EC=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  استفاده شد.

## ۵,۲. اندازه‌گیری میزان اسیدآمینه پرولین

محتوای پرولین جلبک به کمک روش بتیس<sup>۵</sup> در سال ۱۹۷۳، محاسبه گردید. ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی در ۱ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید<sup>۶</sup> ۳ درصد ساییده و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین<sup>۷</sup> و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال<sup>۸</sup> برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب قرار داده شد و پس از این زمان، بلافاصله در حمام یخ قرار گرفت و واکنش متوقف شد.

<sup>1</sup> Malondialdehyde

<sup>2</sup> Heath

<sup>3</sup> Trichloroacetic acid

<sup>4</sup> Thiobarbituric acid

<sup>5</sup> Bates

<sup>6</sup> Sulphosalicylic acid

<sup>7</sup> Ninhydrin

<sup>8</sup> Glacial acetic acid

سپس ۴ میلی‌لیتر ماده تولوئن<sup>۹</sup> به محلول فوق اضافه و با استفاده از ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه به خوبی یکنواخت شد. روشناور را که به رنگ قرمز و حاوی پرولین محلول در تولوئن بود، جدا کرده و جذب این محلول در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد.

## ۶,۲. طراحی آزمایش و آنالیز آماری

در این آزمایش برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. در هر یک از تکرارها، ۳ جلبک در ارلن کشت داده شد. داده‌های به‌دست‌آمده حاصل از سنجش پارامترها از طریق طرح کاملاً تصادفی و تجزیه واریانس با ضریب اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از آزمون Duncan ( $P \leq 0.05$ ) و به کمک نرم‌افزار SPSS تحلیل آماری شد و نمودارها به وسیله‌ی نرم‌افزار Excel رسم گردید.

## ۳. نتایج و بحث

## ۱,۳. اثر پیش‌تیمار ملاتونین بر میزان رنگیزه‌های

## فتوستنتزی تحت تنش گاما

در شکل ۱- الف اثر پیش‌تیمار غلظت‌های مختلف ملاتونین بر میزان کلروفیل a در سوسپانسیون جلبکی کلرلا و لگاریس نشان داده شد. به‌طور کلی تنش گاما باعث کاهش میزان کلروفیل شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود پیش‌تیمار ملاتونین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار توانسته محتوای کلروفیل a را نسبت به شاهد تا حدی افزایش دهد. روندی که در هر دو گروه نمونه‌های پرتو دیده و پرتو ندیده مشاهده می‌شود. در غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین اما نوعی اثر کاهشی روی محتوای کلروفیل a نمونه‌های پرتو ندیده قابل مشاهده است. نمونه‌های پرتو دیده این پیش‌تیمار (۵۰۰

<sup>9</sup> Toluene

## ۲.۳. اثر پیش تیمار ملاتونین بر میزان کاروتنوئید تحت

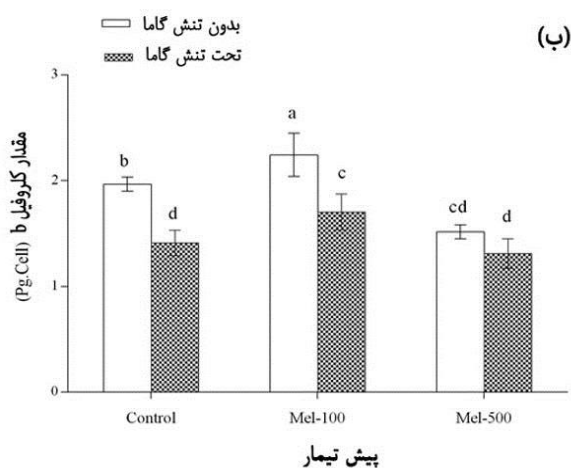
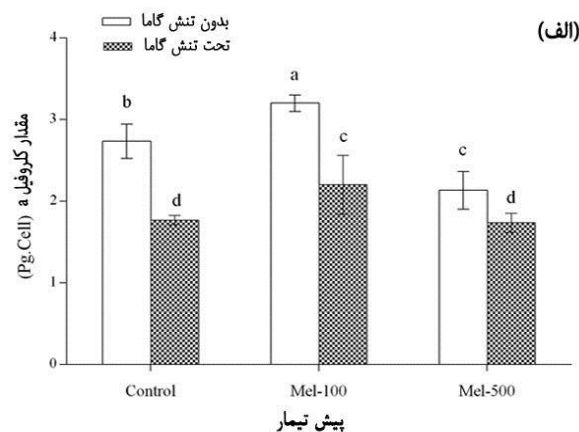
## تنش گاما

نتایج مربوط به تأثیر پیش تیمارهای مختلف ملاتونین (۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار) روی میزان کاروتنوئید در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس نمودار، غلظت ۵۰۰ میکرومولار پیش تیمار ملاتونین در سوسپانسیون جلبکی پرتو ندیده، میزان محتوای کاروتنوئیدها را کاهش داد. لیکن پیش تیمار جلبکها با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین اثر معنی داری نسبت به شاهد نداشته است. این نمودار نشان می دهد که افزایش کاروتنوئید جلبکها در شرایط تنشی احتمالاً ارتباط چندانی با پیش تیمار ملاتونین نداشته است. نشان داده شده که رنگیزه های فتوسنتزی حساس به تنش های محیطی می باشند. در گیاهان عالی فراوان ترین و ضروری ترین رنگیزه موجود کلروفیل ها می باشند [۱۷]. تحت تنش های زیستی و غیرزیستی محتوای کلروفیلی به دلیل تجزیه سریع تر کلروفیل ها یا معیوب شدن سنتز کلروفیل ها، کاهش می یابد [۱۸].

در مطالعه حاضر، نشان داده شد که محتوای کلروفیل a و b کلرلا و لگاریس هنگام مواجهه با تنش گاما کاهش مشهودی یافته اند و در عوض رنگیزه های کاروتنوئیدی که عموماً حفاظت از کلروفیل ها را برعهده دارند افزایش قابل توجهی از خود نشان نداده است. بنابراین به نظر می رسد این افزایش اندک کاروتنوئیدی و ارتقای ناچیز سیستم حفاظتی، ارتباطی با اثر ملاتونین نداشته و با سازوکار دیگری در ارتباط باشد. نتایج حاضر با نتایج حاصل از گزارش هان<sup>۱</sup> و همکاران در ۲۰۱۷ که اثرات محافظتی پیش تیمار ملاتونین را به افزایش کاروتنوئیدها در تنش غیرزیستی سرما مرتبط دانسته، در تناقض است [۹]. بنابراین بطور خلاصه می توان گفت که اگرچه ملاتونین پایداری کلروفیل و متعاقب آن جلبک را افزایش داده ولی این پایداری احتمالاً از طرق دیگری غیر از افزایش کاروتنوئیدهای

میکرومولار ملاتونین) کاهش معنی داری را نسبت به نمونه کنترل پرتو دیده نشان نداد.

روند تغییرات در میزان کلروفیل b (شکل ۱-ب) نیز مشابه روند تغییرات کلروفیل a بود. میزان این رنگیزه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین در مقایسه با شاهد هنگام تنش حفظ و از کاهش بیشتر آن جلوگیری شده است. علی رغم آنکه سوسپانسیون های پرتو دیده، میزان کلروفیل a و b کمتری نسبت به جلبک های تنش ندیده دارند، لیکن پیش تیمار ملاتونین اثرات مثبت محافظتی خود را به ویژه در غلظت ها ۱۰۰ میکرومولار به خوبی نشان داد.



شکل (۱): اثر پیش تیمار ملاتونین بر میزان کلروفیل a (الف) و کلروفیل b (ب) تحت تنش و بدون تنش گاما. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم تفاوت معنی دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می باشد.

<sup>1</sup> Han

اعمال پیش‌ تیمار ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین در شرایط غیر تنشی نیز موجب افزایش نشت غیرکنترل شده الکترولیت‌ها از خلال غشاء شده است. همچنین مطابق نمودار، در شرایط غیرتنشی هم غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین میزان نشت الکترولیت‌ها را از سلول‌های جلبک کاهش داده است.

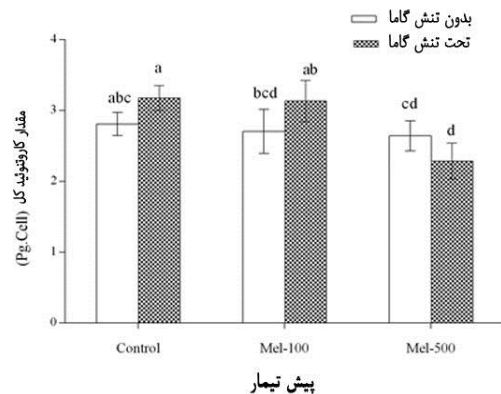
### ۴.۳. اثر پیش‌ تیمار ملاتونین بر میزان تولید مالون

#### دی‌آلدئید تحت تنش گاما

یکی از شاخص‌های اندازه‌گیری تنش‌های اکسیداتیو، سنجش میزان مالون دی‌آلدئید ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد [۱۹]. با توجه به شکل ۴، میزان MDA در سوسپانسیون‌های جلبکی پرتو دیده که با ملاتونین ۵۰۰ میکرومولار پیش‌ تیمار شده بودند، بالاترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید را داشتند. این در حالی بود که کمترین میزان MDA تولید شده پس از پیش‌ تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین ملاحظه شده و این نشان از اثر مثبت این غلظت ملاتونین در حفظ یکپارچگی سلول دارد. روندی که در نمونه‌های تحت تنش گاما نیز قابل مشاهده است. به طور معنی‌داری پیش‌ تیمار جلبک کلرلا با غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین مانع از افزایش بیشتر MDA در شرایط تنش گاما شده است. پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و متعاقب آن افزایش محتوای MDA در بسیاری از تنش‌های غیرزیستی گزارش شده است [۲۰، ۲۱].

نشت الکترولیت‌ها نیز شاخصی است که با میزان پراکسیداسیون غشاء در ارتباط بوده و معیاری برای نشان دادن میزان نفوذپذیری و آسیب به غشاء سلول در شرایط تنشی می‌باشد [۲۲، ۲۳]. در تحقیق حاضر نیز نشان داده شد که در شرایط تنش گاما نشت الکترولیت‌ها همزمان با افزایش MDA روی داده است. با این حال، پیش‌ تیمار ملاتونین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار توانست تا حد قابل ملاحظه‌ای مانع از افزایش MDA و نشت الکترولیت‌ها شود.

محافظ کلروفیل‌ها، همچون ارتقای سیستم دفاع آنزیمی آنتی‌اکسیدانی و تجمع اسمولیت‌ها صورت گرفته است.

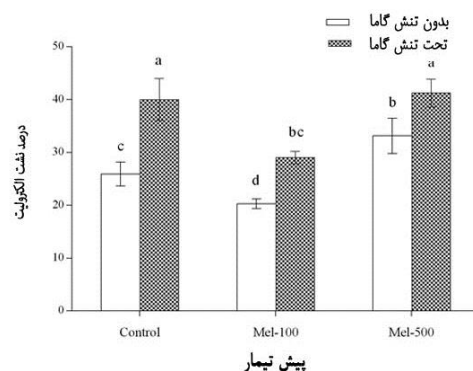


شکل (۲): اثر پیش‌ تیمار ملاتونین بر میزان کاروتنوئیدهای کل تحت تنش و بدون تنش گاما. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

### ۳.۳. اثر پیش‌ تیمار ملاتونین بر میزان نشت الکترولیت‌ها

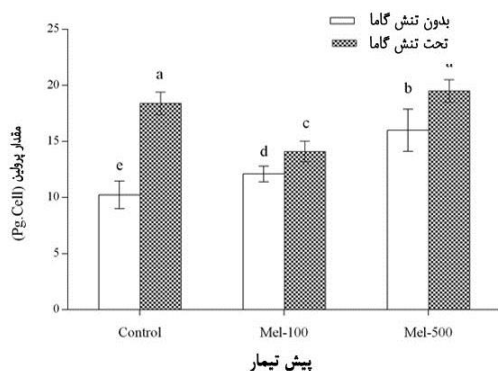
#### تحت تنش گاما

میزان پایداری سلول در شرایط عادی یا تنش، ارتباط مستقیم با میزان نشت الکترولیت‌ها از خلال غشاء سلول جلبک دارد. همانطور که در شکل ۳ دیده می‌شود، پیش‌ تیمار ملاتونین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، باعث کاهش ۱۸ درصدی در نشت الکترولیت‌های جلبک‌های تنش دیده شد. این در حالی بود که غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین نتوانست اثر معنی‌داری در حفظ پایداری غشاء هنگام تنش داشته باشد.



شکل (۳): اثر پیش‌ تیمار ملاتونین بر درصد نشت الکترولیت از سلول جلبک تحت تنش و بدون تنش گاما. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

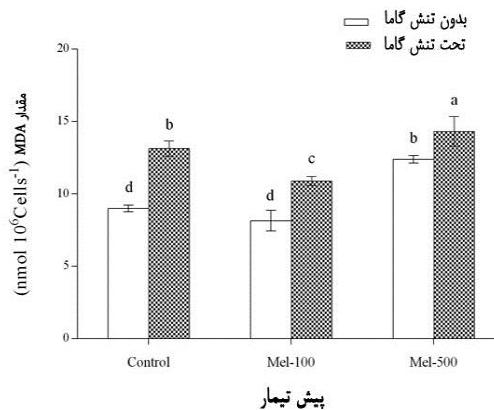
کمتری نسبت به شاهد بدون پیش تیمار ملاتونین تولید کردند. نشان داده شده که تولید پرولین بیشتر یک سازوکار دفاعی در مقابل شرایط تنش زاست. در شرایط تنش پرولین یک محلول سازگارکننده می باشد که قادر است با راهبردهایی مانند حذف رادیکال های آزادی چون ROSها و پایداری غشاء به سازگاری سلولها در شرایط تنش کمک کند [۲۴]. نتایج ما نشان داد که اگرچه با افزایش ملاتونین تا ۱۰۰ میکرومولار، هم مقاومت به تنش و هم تولید پرولین نسبت به شاهد بدون پیش تیمار افزایش یافته ولی این ارتباط در میزان بالاتر ملاتونین (۵۰۰ میکرومولار) دیده نشد. به عبارت دیگر پیش تیمار ملاتونین با غلظت ۵۰۰ میکرومولار باعث افزایش پرولین در سلول های جلبک کلرلا شد ولی این پرولین افزایش یافته اثری روی القای مقاومت بیشتر جلبک به پرتو گاما نداشت. از سویی شاید برخی تغییرات در محتوای پرولین سلولها در پاسخ به غلظت های مختلف ملاتونین را بتوان به رفتار شبه هورمونی این ماده نسبت داد. رفتاری که در غلظت های مختلف این ماده و روی پارامترهای گوناگون، به صورت متفاوتی بروز می نماید.



شکل (۵): اثر پیش تیمار ملاتونین بر میزان پرولین تولید شده در سلول تحت تنش و بدون تنش گاما. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم تفاوت معنی دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می باشد.

#### ۴. نتیجه گیری

به عنوان نتیجه گیری می توان گفت که استفاده از پیش تیمار ملاتونین مقاومت به تنش گاما را در کلرلا ولگاریس تحت تنش تا حدی افزایش داده است. پاسخ سازگاری کلرلا به تنش



شکل (۴): اثر پیش تیمار ملاتونین بر میزان MDA سلول به عنوان

معیاری از میزان پروکسیداسیون غشاء حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم تفاوت معنی دار بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می باشد. این یافته ها با نتایج حاصل از مطالعات قبلی در مورد سایر تنش های غیرزیستی مطابقت داشته [۲۰، ۲۲] و نشان می دهد که حداقل یکی از اثرات حفاظتی ملاتونین روی جلبک کلرلا در شرایط تنش گاما احتمالاً از طریق پایداری سازی غشاء این جلبک صورت می گیرد. از آنجایی که ملاتونین رفتارهای شبه هورمونی دارد، بسیاری از پاسخ های گیاه به آن وابسته به غلظت است. این مساله احتمالاً می تواند رفتارهای دوگانه آن را در غلظت های متفاوت پیش تیمار تا حد زیادی توجیه نماید.

#### ۵.۳. اثر پیش تیمار ملاتونین بر میزان تولید پرولین تحت

##### تنش گاما

با توجه به نتایج به دست آمده میزان پرولین با افزایش غلظت ملاتونین در سوسپانسیون جلبکی پرتو ندیده، یک روند افزایشی معنی دار را از خود نشان داد (شکل ۵). بر همین اساس پیش تیمار ملاتونین با غلظت ۵۰۰ میکرومولار، باعث تولید بالاترین میزان پرولین در نمونه های بدون تابش پرتو، شده است. در جلبک های پرتو دیده بالاترین میزان پرولین در گروه بدون پیش تیمار ملاتونین و پیش تیمار ملاتونین با غلظت ۵۰۰ میکرومولار بدست آمد. در این میان، جلبک هایی که با ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین پیش تیمار شده بودند، در حالت بدون تنش گاما پرولین بیشتری و در هنگام تنش گاما پرولین

با این حال افزایش مقاومت به گاما پس از پیش تیمار ملاتونین ممکن است بیشتر به فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی باشد تا غیر آنزیمی که باید در مطالعه مستقلی مورد بررسی قرار گیرد.

## ۵. قدردانی

این تحقیق توسط تحصیلات تکمیلی دانشگاه کاشان حمایت مالی شده است.

گاما وابسته به غلظت ملاتونین بود به طوری که غلظت ۱۰۰ برخلاف غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین باعث حفظ بیشتر رنگیزه‌های فتوسنتزی، یکپارچگی غشاء و نشت کمتر یونها از آن شد. نتایج نشان داد که اگرچه افزایش پرولین تا اندازه‌ای ممکن است مسئول افزایش مقاومت به تنش گاما در کلرلا باشد ولی این ارتباط برای دوزهای بالاتر ملاتونین برقرار نشد. برخی رفتارهای وابسته به غلظت ملاتونین را شاید بتوان به ساختار و رفتار شبه هورمونی این ماده در سلول‌ها نسبت داد.

## ۶. مراجع

- [1] F.C. de Abreu, P.N. da Costa, A.M. Brondi, E.J. Pilau, F.C. Gozzo, M.N. Eberlin. Effects of cadmium and copper biosorption on *Chlorella vulgaris*. Bull Environ Contam Toxicol. 93 (2014) 405–409.
- [2] K. Ganapathy, K. Chidambaram, R. Janarthanan, R. Ramasamy. Effect of UV-B radiation on growth, photosynthetic activity and metabolic activities of *Chlorella vulgaris*. J. Microbiol. Biotechnol. 6 (2017) 53–60.
- [3] S. Hiremath, P. Mathad. Impact of salinity on the physiological and biochemical traits of *Chlorella vulgaris*. Beijerinck. J. Algal Biomass Utiln. 1 (2010) 51–59.
- [4] S.A. Schaffer. The bioenergetic response of *Chlorella vulgaris* to alpha radiation. Environ Exp Bot. 25 (1985) 1–6.
- [5] M. Potts. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. Eur J Phycol. 34 (1999) 319–328.
- [6] J-Y. Oh, I.S. Fernando, Y-J. Jeon. Potential applications of radioprotective phytochemicals from marine algae. Algae. 31 (2016) 403–414.
- [7] N. Zhang, Q. Sun, H. Zhang, Y. Cao, S. Weeda, S. Ren. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. J. Exp. Bot. 66 (2014) 647–656.
- [8] R. Sharif, C. Xie, H. Zhang, M. Arnao, M. Ali, Q. Ali. Melatonin and Its Effects on Plant Systems. Molecules. 23 (2018) 23–52.
- [9] Q-H. Han, B. Huang, C-B. Ding, Z-W. Zhang, Y-E. Chen, C. Hu. Effects of melatonin on anti-oxidative systems and photosystem II in cold-stressed rice seedlings. Front. Plant Sci. 8 (2017) 785.
- [10] D. Ghosal, M.V. Omelchenko, E.K. Gaidamakova, V.Y. Matrosova, A. Vasilenko, A. Venkateswaran. How radiation kills cells: survival of *Deinococcus radiodurans* and *Shewanella oneidensis* under oxidative stress. FEMS Microbiol Rev. 29 (2005) 361–75.
- [11] J-i. Choi, M. Yoon, S. Lim, G.H. Kim, H. Park. Effect of gamma irradiation on physiological and proteomic changes of Arctic *Zygnema* sp. (Chlorophyta, Zygnematales). Phycologia. 54 (2015) 333–341.
- [12] D. Billi, E.I. Friedmann, K.G. Hofer, M.G. Caiola, R. Ocampo-Friedmann. Ionizing-radiation resistance in the desiccation-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*. Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000) 1489–1492.
- [13] H.K. Lichtenthaler, A.R. Wellburn. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Portland Press LTD. 5 (1983) 67–79.
- [14] C. Liu, Y. Liu, K. Guo, D. Fan, G. Li, Y. Zheng. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. ENVIRON EXP BOT. 71 (2011) 174–183.
- [15] R.L. Heath, L. Packer. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125 (1968) 189–198.
- [16] L. Bates, R. Waldren, I. Teare. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil. 39 (1973) 205–207.
- [17] M. Ashraf, P. Harris. Photosynthesis under stressful environments: an overview. Photosynthetica. 51 (2013) 163–190.
- [18] S. Perveen, M. Shahbaz, M. Ashraf. Regulation in gas exchange and quantum yield of photosystem II (PSII) in salt-stressed and non-stressed wheat plants raised from seed treated with triacontanol. Pak J Bot. 42 (2010) 3073–3081.
- [19] S. Baccouch, A. Chaoui, E.I. Ferjani, E. Nickel. Toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. J Plant Nutr. 24 (2001) 1085–1097.
- [20] H. Turk, S. Erdal, M. Genisel, O. Atici, Y. Demir, D. Yanmis. The regulatory effect of melatonin on physiological, biochemical and molecular parameters in cold-stressed wheat seedlings. Plant Growth Regul. 74 (2014) 139–152.
- [21] Z. Hu, J. Fan, Y. Xie, E. Amombo, A. Liu, M.M. Gitau. Comparative photosynthetic and metabolic analyses reveal mechanism of improved cold stress tolerance in *Bermudagrass* by exogenous melatonin. Plant Physiol Biochem. 100 (2016) 94–104.
- [22] J. Liu, W. Wang, L. Wang, Y. Sun. Exogenous melatonin improves seedling health index and drought tolerance in tomato. Plant Growth Regul. 77 (2015) 317–326.
- [23] N. Zhang, H. J. Zhang, B. Zhao, Q.Q. Sun, Y.Y. Cao, R. Li. The RNA-seq approach to discriminate gene expression profiles in response to melatonin on cucumber lateral root formation. J. Pineal Res. 56 (2014) 39–50.
- [24] Z. Elmi Anaraki, M. Shariati, S.A. Hosseini Tafreshi. Transient silencing of phytoene desaturase reveals critical roles on plant response to salinity stress. Acta Physiol Planta. 39 (2017) 161–178.