مجله سنجش و ایمنی پرتو، جلد ۸، شمارهٔ ٤، ویژه‌نامه پرتوهای یون‌ساز، ۱۳۹۹، صفحه ۳۳۳-۳٤۰
پنجمین کنفرانس ملی سنجش و ایمنی پرتوهای یون‌ساز و غیریون‌ساز (مهرماه ۱۳۹۷)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰٦/۰۱، تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۷/۰۱

اثر پیش‌تیمار ملاتونین بر پاسخ‌های رشدی و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی در ریزجلبک کلرلا ولگاریس (Chlorella vulgaris) تحت تنش پرتوهای یون‌زا

سید علی حسینی تفرشی[1*]، پیمان آقایی[2]، احمد رمضانی مقدم[3] و محمدامین طغیانی[1]

[1]گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان، کاشان، اصفهان، ایران.
[2]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.
[3]گروه فیزیک هسته‌ای، دانشکده فیزیک، دانشگاه کاشان، کاشان، اصفهان، ایران.
[*]اصفهان، کاشان، دانشگاه کاشان، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، کدپستی: ۸۷۳۱۷۵۳۱۵۳
پست‌الکترونیکی: sahosseini@kashanu.ac.ir

چکیده

ملاتونین به عنوان یک ترکیب ساخته شده توسط فتوسنتزکننده ها، از آن‌ها در برابر بسیاری از تنش‌های محیطی محافظت می‌کند. مکانیسم‌های تعدیل در محافظت ملاتونین به طور دقیق در یوکاریوت‌های ابتدایی مانند جلبک‌ها شناخته شده نیست. در این تحقیق سعی شده تا اثر پیش‌تیمار ملاتونین در ایجاد مقاومت جلبک کلرلا ولگاریس به پرتوهای یون‌زای گاما مورد بررسی قرار بگیرد. نتایج نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین، افزایش معنی‌داری را در رشد و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، بعنوان یکی از اجزاء سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی داشته است.

کلیدواژگان: جلبک کلرلا ولگاریس، ملاتونین، پرتوگاما، سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی ، رشد و فیزیولوژی.

۱. مقدمه

پرتوهای یون‌زا در حال حاضر به عنوان یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی محسوب می‌شوند. زباله‌های دارای سطوح بالای تشعشع رادیواکتیو (HLW[1]) به همراه افزایش تاثیرات پرتوهای کیهانی ناشی از تخریب لایه اوزون، نگرانی و معضل جدیدی برای محیط زیست بوجود آورده است [۱, ۲]. این نوع آلودگی‌ها در حال افزایش بوده و فقط تعداد کمی از موجودات زنده توانایی مقاومت و زیستن در چنین شرایطی را دارا هستند [۲]. روند تولید و انتشار این‌گونه مواد در حین جنگ سرد با تولید Pu239 از اورانیوم موجود در راکتورهای هسته‌ای آغاز شد. تمام گونه های رادیونوکلئید، تولیدات حاصل از شکاف هسته‌ای، سوخت نیروگاه‌های هسته‌ای و ترکیبات شیمیایی نانورادیواکتیو، هنگام استفاده، امکان احیاء شدن و نشر رادیواکتیو را دارا بوده و می‌توانند به HLW ها تبدیل بشوند [۳]. این درحالی‌است که مقاومت یا آسیب‌های ناشی از پرتوهای یون‌زا از سلولی به سلول دیگر و از یک گونه تا گونه دیگر متفاوت می‌باشد. عوامل فیزیولوژیکی که می‌توانند باعث شوند تا مقابله با این نوع پرتوها افزایش یابد،

[1]High-level radioactive waste

هنوز مورد بحث بوده و کاملا شناخته شده نیستند. ظاهراً هر چه موجود زنده از لحاظ تکاملی سطح عالی‌تر و پیچیده‌تری داشته باشد، حساسیت بیش‌تری به پرتوهای یونزا داشته و بیش‌تر آسیب می‌بیند [٤]. آسیب ناشی از پرتوهای یونزا از طریق تخریب DNA و عدم وجود مکانیسم‌هایی موثر در بازسازی ماده‌ی ژنتیک باعث می‌شود. تغییر DNA می‌تواند باعث ورود سلول‌ها به فاز آپوپتوسیس یا مرگ برنامه‌ریزی شده، و در مواردی که دوز شدیدتری دریافت شود، باعث سرطان بشود [٥]. از طرف دیگر تولید مولکول‌های فعال و پرانرژی مانند ROS[1] هم در گونه‌هایی که در معرض تشعشع پرتوهای یونزا قرار داشته‌اند، مشاهده شده است. این تولیدات نوعی تاثیری ثانویه و در مواردی خطرناک‌تر از تاثیرات مستقیم پرتو بوده و خود می‌توانند آسیب بیش‌تری به ساختارهای سلولی از جمله DNA را وارد نماید. جالب آن‌که حدود ۸۰ درصد آسیب وارد شده به ماده‌ی ژنتیک، ناشی از اثرات ثانویه و مخرب ROS ها گزارش شده است. سایر تاثیرات منفی رادیکال‌های آزاد از طریق آسیب های وارد شده به دیگر مولکول‌های زیستی مانند متابولیت‌ها و پروتئین‌ها می‌باشد [٥, ٦].

در زمانی‌که شرایط محیط، عادی و عاری از تنش باشد، فرآیندهای متابولیسم سلولی مرتبط با سیستم دفاع آنزیمی و غیرآنزیمی توانایی تولید، کنترل و نابودی گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) را برای حفظ هموستازی دارا است. با اعمال تنش نور شدید، تشعشعات ماوراءبنفش و تنش‌های فلز سنگین و...، میزان تولید ROS (O2−، OH−، OH)افزایش پیدا می‌کند [٦]. این رادیکال‌های آزاد می‌توانند به طور مستقیم پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، اسیدهای نوکلئیک و غشاء لیپیدی را آسیب زده و تخریب نمایند. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان آنزیمی سلول، شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیوردکتاز (GR) و... می‌باشد. این آنزیم‌ها توانایی زدودن مقادیر اضافی و خطرناک ROS را دارند [٧, ٨].

ملاتونین از ترکیبات ایندوآمین ساخته شده در گیاهان و جلبک‌هاست و نقش‌های متنوعی هم‌چون دخالت در ریتم‌های رشد شبانه روزی و پاسخ به تنش‌ها دارد [٩, ١٠]. تحقیقات انجام شده در این زمینه نشان داده است که ملاتونین خود یک آنتی‌اکسیدان با پتاسیل بالا برای پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شود. تنظیم مثبت ژن‌های مقابله‌کننده با استرس برای حفظ عملکرد مناسب فتوسنتز، چرخه‌ی سلولی، بازسازی DNA، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و بیوسنتز لپیدها، از دیگر نقش‌های حیاتی ملاتونین می‌باشد. مشارکت در حفظ کارایی زنجیره ی انتقال الکترونی در شرایط کمبود آب، از دیگر وظایف ملاتونین می‌باشد [١١]. با این حال برای این‌که کلروپلاست از صدمات ایجاد شده توسط گونه‌ها فعال اکسیژنی حفظ شود، ملاتونین از طریق پاک‌سازی مستقیم ROSها و اثر روی بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی نقش محافظتی خود را بازی می‌کند [١٢]. در مجموع با وجود اثرات غیر قابل‌انکار نقش ملاتونین در تنش‌های غیرزیستی، اطلاعات کافی درباره ی اثرات ملاتونین در مقابله و تحمل به پرتوهای یونزا در سلول‌های یوکاریوتی ساده مثل ریزجلبک‌ها که پتانسیل بالایی در تحمل شرایط محیطی تنش‌زا دارند، وجود ندارد.

کلرلا ولگاریس از خانواده‌ی کلروفیسه، از ریزجلبک سبز تک سلولی و معمولاً در آب‌های شیرین زندگی می‌کند. این ریز جلبک یکی از کارآمدترین و قدیمی‌ترین سیستم‌های فتوسنتزی را دارا می‌باشد. توانایی تولید و انتقال علائمی که باعث تنظیم متابولیت سلول می‌شوند، یک جلبک سبز را قادر می‌سازد تا در محیط‌های پرتنش به حیات خود ادامه بدهد [٧].

[1] Reactive Oxygen Species

زیست‌نشان‌گرهایی مثل کلرلا می توانند ارزیابی خطرات اکولوژیکی موجود در محیط را بهتر نشان دهند. این جلبک توانایی فوق‌العاده‌ای در وفق دادن خود به محیط زندگی‌اش دارد. گزارش‌ها نشان داده است، این ریزجلبک مقاومت مثال زدنی در برابر انواع مختلفی از تنش‌ها مانند فلز سنگین، پرتوهای UV و شوری از خود نشان داده است [۲]. در این پژوهش اثرات پیش‌تیمار مولکول‌های ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان یا تحریک‌کننده سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی در ریزجلبک سبز کلرلا ولگاریس برای مقاومت به تنش اشعه‌ی گاما، مورد بررسی قرار گرفته است.

۲. مواد و روش‌ها

۱,۲. کشت سلول، پیش‌تیمار و اعمال تنش

کلرلا ولگاریس مورد آزمایش از بانک جلبکی دانشگاه تگزاس تهیه شد و در محیط کشت BBM[1] تحت شرایط استریل و کنترل (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، تحت تابش نور سفید و آفتابی فلوئورسنت، دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه) کشت داده شد. در ادامه پس از تعیین مرحله ایستایی رشد، سوسپانسیون‌های جلبکی با حجم برابر 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) جلبک‌ها به دو گروه تقسیم شده، گروه اول تحت تشعشع گاما با دوز ۳۰۰ گری قرار گرفتند. پرتودهی با استفاده از یک چشمه کبالت ۶۰ در پژوهشکده کاربرد پرتوها وابسته سازمان انرژی اتمی تهران انجام شد. گروه دوم بدون تیمار با اشعه گاما نگهداری شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های جلبکی مورد تنش و بدون تنش، مجدداً در محیط کشت تازه‌ی BBM واکشت شد. 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 تثبت جلبک‌ها در نیتروژن مایع صورت گرفت.

۲,۲. استخراج آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی کلرلا ولگاریس به کمک ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج (بافر سدیم فسفات ۲۰۰ میلی‌مولار) درون هاون بر روی یخ ساییده شد. مخلوط همگن و یکنواخت عصاره‌ی حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دور rpm ۱۳۰۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی به‌عنوان عصاره آنزیمی در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها مورداستفاده قرار گرفت.

۳,۲. اندازه‌گیری آنزیم‌های SOD، CAT و APX

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به کمک روش جیانوپولیتیس، ۱۹۷۷ اندازه‌گیری شد [۱۳]. برای این منظور مخلوط واکنش شامل بافرفسفات ۵۰ میلی‌مولار حاوی ۷۵ میکرولیتر ریبوفلاوین ۲ میلی‌مولار، Na-EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه تحت نور فلوئورسانس قرار گرفت و سپس جذب آن در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. هم‌چنین از یک لوله آزمایش حاوی مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی به عنوان شاهد استفاده

[1]Bold's Basal Medium

شد. یک واحد از فعالیت آنزیم SOD مقدار آنزیمی است که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیای نوری NBT می‌گردد.

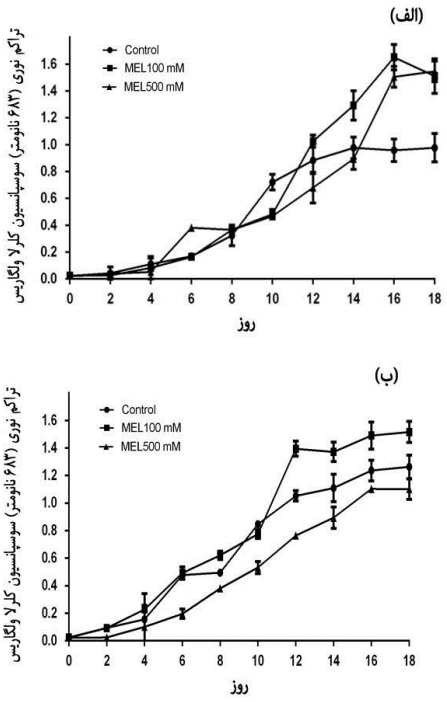
سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Aebi اندازه‌گیری شد [۱٤]. مخلوط واکنش حاوی بافرفسفات ۵۰ میلی‌مولار، H_2O_2 ۳۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. تجزیه هیدروژن پراکسید و کاهش در جذب در طول‌موج ۲٤۰ نانومتر در مدت ٦۰ ثانیه میزان فعالیت آنزیم را نشان داد. فعالیت آنزیم با استفاده از EC=39.4 Mm-1 cm-1 محاسبه و برحسب میکرومول هیدروژن پراکسید در میلی‌گرم پروتئین در واحد زمان بیان شد.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از روش Nakano استفاده شد [۱۵]. در این روش مخلوط واکنش شامل بافرفسفات ۵۰ میلی‌مولار ، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، آسکوربات ۰/۳ میلی‌مولار ، H_2O_2 ۰/۱ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم منحنی کاهش جذب ناشی از اکسیداسیون آسکوربات در طول‌موج ۲۹۰ نانومتر در مدت ٦۰ ثانیه خوانده شد. فعالیت آنزیم با استفاده از $EC=2.8\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ و برحسب میکرومول آسکوربات در میلی‌گرم پروتئین در واحد زمان بیان گردید.

۳. نتایج و بحث

۱،۳. اثر پیش‌تیمار ملاتونین بر رشد سوسپانسیون کلرلا ولگاریس تحت تنش اشعه گاما

نمودار شکل ۱- الف و ۱- ب، به ترتیب منحنی رشد سوسپانسیون جلبک‌های تحت تنش گاما و نمونه‌های بدون تنش کلرلا ولگاریس را در بازه‌ی زمانی ۱۸ روزه پس از اعمال پیش‌تیمار ملاتونین نشان داده است. نتایج حاصل از این دو نمودار نشان می‌دهد که ملاتونین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار در هر دو گروه الف و ب اثر القایی مثبتی روی رشد کلرلا ولگاریس داشته است. هم‌چنین دیده می‌شود که پیش‌تیمار ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین، در سوسپانسیون‌های اشعه دیده اثر تقویتی در رشد داشته است (با تراکم نوری حدود ۱/۵ در روز ۱۸ام). در گروه ب (بدون تنش گاما)، غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین، کم‌ترین تراکم نوری کلرلا (۱/۱) را باعث شده است. به نظر می‌رسد پیش‌تیمار ملاتونین در هر دو غلظت، باعث القای مقاومت به تحت تنش رادیواکتیو روی جلبک‌ها داشته است. این نتایج با نتایج حاصل از گزارش‌های قبلی در مورد افزایش بیان ملاتونین در گونه‌های فتوسنتزکننده‌ای که در معرض تنش‌های مختلف غیرزیستی مانند خشکی، شوری و اشعه قرار داشته‌اند، مطابقت داشت [۱۱]. در تمامی این گزارش‌ها افزایش بیان ملاتونین از طریق دست‌کاری ژن‌های مسیر سنتز آن، رشد را در شرایط تنشی تقویت کرده است. هم‌چنین تن و همکاران در ۲۰۰۷، ادعا داشتند که گیاهان تیمار شده با ملاتونین، قادر به جذب این مولکول بودند [۱٦]. نتایج آن‌ها با شواهد بدست آمده از پژوهش حاضر مطابقت داشته و اثر تقویت‌کنندگی ملاتونین در ایجاد مقاومت به تنش و بهبود عملکرد گیاه در این شرایط را تایید می‌کند. با این وجود مشخص شده است که غلظت‌های بالای ملاتونین اثر عکس داشته و مانع از رشد و نمو قسمت‌های مختلف گیاه شده است.

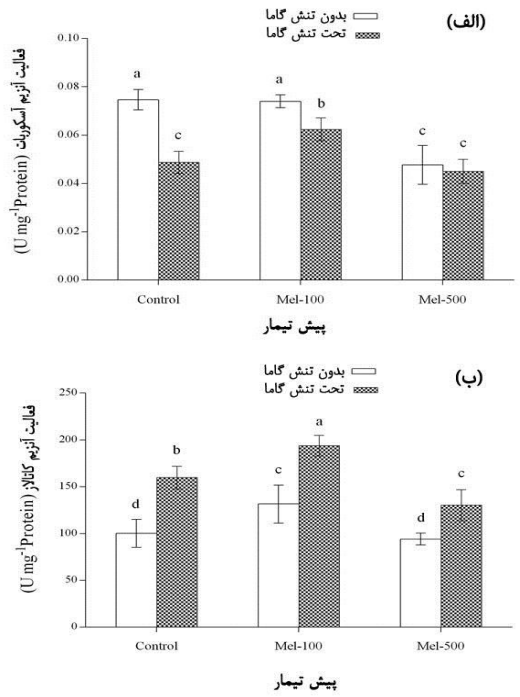


شکل (۱): اثر پیش‌تیمار ملاتونین روی تراکم نوری سوسپانسیون جلبک کلرلا ولگاریس به عنوان معیاری از میزان رشد بعد از تنش گاما. بخش (الف) و (ب) به ترتیب بیان‌گر سوسپانسیون جلبکی تحت پرتو و بدون تنش گاما است.

۲،۳. اثر پیش‌تیمار ملاتونین بر میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، APX و SOD تحت تنش گاما

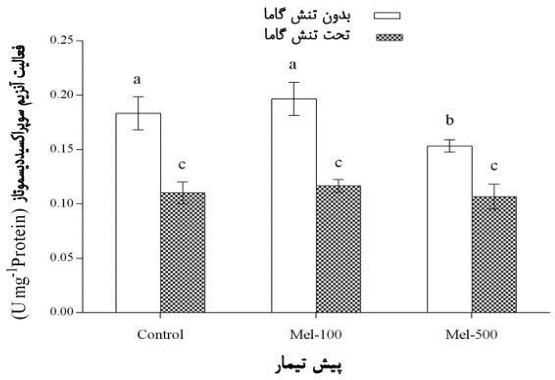
در شکل ۲-الف. اثر پیش‌تیمارهای ملاتونین روی میزان فعالیت آنزیمی APX در سوسپانسیون جلبکی کلرلا ولگاریس نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در مجموع، اعمال پیش‌تیمار با غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین موجب کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم APX سوسپانسیون جلبکی بدون تنش گاما شده است. از سویی در شرایط بدون پیش‌تیمار و پیش‌تیمار ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم APX جلبک‌های تحت تنش گاما با جلبک‌های پرتو ندیده، قابل مشاهده است. در این نمونه‌ها نوعی کاهش در فعالیت آنزیم APX قابل مشاهده است. قابل توضیح است. که این کاهش در سوسپانسیون‌های پیش‌تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین از شدت کم‌تری برخوردار است.

تابش پرتوگاما در سوسپانسیون‌های جلبکی باعث افزایش سطح آنزیم کاتالاز در تمامی نمونه‌ها (شاهد و پیش‌تیمار) شد (شکل ۲-ب). در جلبک‌های پیش‌تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین این افزایش به میزان بیش از ۹۳ درصد نسبت به سوسپانسیون‌های جلبکی فاقد تنش گاما شده است. در حالی‌که پیش‌تیمار جلبک‌ها با غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین در شرایط بدون پرتو باعث افزایش ۳۰ درصدی در فعالیت آنزیم کاتالاز شده است. در سوسپانسیون‌های پیش‌تیمار شده با غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین هیچ گونه افزایش معنی‌داری در فعالیت CAT در نمونه‌های پرتو ندیده مشاهده نشد.



شکل (۲): اثر پیش‌تیمار ملاتونین بر میزان فعالیت آنزیم‌های APX و CAT تحت تنش و بدون تنش گاما. حروف مشابه در هر ستون بیان‌گر عدم تفاوت معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

نتایج مربوط به تاثیر پیش‌تیمارهای مختلف ملاتونین (۱۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار) روی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سوسپانسیون‌های با و بدون تنش گاما در شکل ۲- ج نشان داده شده است. نتایج بیان‌گر آن است که در شرایط غیر تنشی (بدون تابش گاما)، غلظت ۵۰۰ میکرومولار ملاتونین نسبت به حالت بدون پیش‌تیمار، باعث افزایشی حدود ۱۶/۵ درصدی در فعالیت آنزیم SOD شده است. در حالی‌که غلظت ۱۰۰ میکرومولار ملاتونین در این شرایط اثر معنی‌دار بر فعالیت آنزیم نداشت. از طرف دیگر، تحت تابش اشعه گاما، سوسپانسیون‌های شاهد، افت حدود ۳۹ درصدی در فعالیت آنزیم نشان دادند و مشابه همین روند در سوسپانسیون‌های پیش‌تیمار شده با ملاتونین هم مشاهده شد.



شکل (۳): اثر پیش‌تیمار ملاتونین بر میزان فعالیت آنزیم SOD تحت تنش و بدون تنش گاما. حروف مشابه در هر ستون بیان‌گر عدم تفاوت معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

۴. نتیجه‌گیری

گیاهان از سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی یا غیر آنزیمی برای حفظ تعادل ردوکس استفاده می‌کنند [۱۷, ۱۸]. در این بین، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با داشتن نقش کلیدی رادیکال‌های سوپراکسید را به اکسیژن و هیدروژن پراکساید تغییر می‌دهد. حال آن‌که کاتالاز و آسکورپوربات پراکسیداز، هیدروژن پراکساید و دیگر رادیکال‌های آزاد را شکسته و با تولید آب از آن‌ها در مسیرهای مختلف گیاهی استفاده می‌کنند [۱۹]. ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و جاروب‌کننده‌ی رادیکال‌های مهم در نظر گرفته می‌شود. هم‌چنین تنظیم فعالیت دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نیز از وظایف ملاتونین در نظر گرفته شده است [۲۰]. استفاده از ملاتونین به عنوان یک تیمار خارجی ممکن است باعث فعال شدن سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی یا غیرآنزیمی شده است و ازین رو تعادل روکس سلول را حفظ کند. یافته‌های شی و همکاران وی در ۲۰۱۵ نشان داده که تیمار ملاتونین تجمع گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS) را در فتوسنتزکننده‌هایی که تحت تنش سرما بوده‌اند، تقلیل داده است [۲۱]. در تحقیق حاضر پیش‌تیمار ملاتونین منجر به افزایش فعالیت آنزیم CAT شده است. با وجود آن‌که فعالیت SOD تحت تنش گاما در هیچ یک از غلظت‌های پیش‌تیمار ملاتونین افزایش نداشته است، لیکن روند کاهش را نیز تجربه نکرده و ثابت مانده است که ممکن است ناشی از این واقعیت بوده که با توجه به ذخیره غنی و بالای آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی در کلرلا، ملاتونین از مسیرهای آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی پتانسیل ردوکس سلول را حفظ کرده و نیازی به افزایش فعالیت SOD نبوده است. هم‌چنین با وجود آن‌که فعالیت آنزیم APX در سوسپانسیون‌های تحت تابش گاما نسبت به سوسپانسیون‌های پرتو گاما کاهش داشته، لیکن جلبک‌های پیش‌تیمار شده با ملاتونین به ویژه غلظت ۱۰۰ میکرومولار آن نسبت به نمونه‌های شاهد در شرایط تنش پرتو، فعالیتشان کم‌تر کاهش یافته که نشان می‌دهد ملاتونین اثر مثبتی روی حفظ فعالیت این آنزیم داشته است. در کل اعمال پیش‌تیمارهای ملاتونین در غلظت‌های زیر حد اشباع برای کلرلا ولگاریس، تاثیر مثبت در افزایش رشد و فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی و احتمالا غیر آنزیمی دارد.

۵. قدردانی

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

۵. مراجع

[1] 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) 333-41.

[2] M. P. Tale, R. devi Singh, B. P. Kapadnis, S. B. Ghosh. Effect of gamma irradiation on lipid accumulation and expression of regulatory genes involved in lipid biosynthesis in *Chlorella* sp. Journal of Applied Phycology. 30 (2018) 277-86.

[3] C. E. Bagwell, S. Bhat, G. M. Hawkins, B. W. Smith, T. Biswas, T. R. Hoover. Survival in nuclear waste, extreme resistance, and potential applications gleaned from the genome sequence of Kineococcus radiotolerans SRS30216. PloS one. 3 (2008) 3878.

[4] J. Brown, B. Alfonso, R. Avila, N. A. Beresford, D. Copplestone, A. Hosseini. A new version of the ERICA tool to facilitate impact assessments of radioactivity on wild plants and animals. Journal of environmental radioactivity. 153 (2016) 141-8.

[5] 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 microbiology reviews. 29 (2005) 361-75.

[6] S. S. Sukhi, R. Shashidhar, S. A. Kumar, J. R. Bandekar. Radiation resistance of *Deinococcus radiodurans* R1 with respect to growth phase. FEMS microbiology letters. 297 (2009) 49-53.

[7] Bajguz A. An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress. Environmental and Experimental Botany. 68 (2010) 175-179.

[8] J. Mrázek. New technology may reveal mechanisms of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 99 (2002) 10943-4.

[9] X. Zhou, H. Zhao, K. Cao, L. Hu, T. Du, F. Baluška. Beneficial roles of melatonin on redox regulation of photosynthetic electron transport and synthesis of D1 protein in tomato seedlings under salt stress. Frontiers in plant science .7 (2016) 1823.

[10] R. Sharif, C. Xie, H. Zhang, M. Arnao, M. Ali, Q. Ali. Melatonin and Its Effects on Plant Systems. Molecules. 23 (2018) 2352.

[11] 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. Frontiers in plant science. 8 (2017) 785.

[12] N. Zhang, Q. Sun, H. Zhang, Y. Cao, S. Weeda, S. Ren. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. Journal of Experimental Botany. 66 (2014) 647-56.

[13] Giannopolitis CN, Ries SK. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. Plant physiology. 59 (1977) 309-314.

[14] Aebi H. Catalase in vitro. Methods in enzymology: Elsevier, (1984).

[15] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and cell physiology. 2 (1981) 876-882.

[16] D. X. Tan, L. C. Manchester, M. P. Terron, L. J. Flores, R. J. Reiter. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? Journal of pineal research. 42 (2007) 28-42.

[17] R. Mittler. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in plant science. 7 (2002) 405-10.

[18] P. Sharma, A. B. Jha, R. S. Dubey. Oxidative stress and antioxidative defense systems in plants growing under abiotic stresses. Handbook of plant and crop stress: CRC press, (2016).

[19] J. Ning, S. Ai, S. Yang, L. Cui, Y. Chen, L. Sun. Physiological and antioxidant responses of *Basella alba* to NaCl or Na_2SO_4 stress. Acta Physiologiae Plantarum. 37 (2015)126.

[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 regulation. 74 (2014) 139-52.

[21] H. Shi, C. Jiang, T. Ye, D. X. Tan, R. J. Reiter, H. Zhang. Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin. Journal of experimental botany. 66 (2014) 681-94.