زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره دهم، زمستان ۱۳۹۰، صفحه ۷۱-۸۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۵/۰۸
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۷/۰۳
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۷/۳۰

# القای مقاومت در *Dunaliella* نسبت به پاراکوات، توسط برخی پیش‌تیمارها

مریم مددکار حق‌جو *
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

## چکیده

تأثیر پاراکوات که یک علف‌کش القا کننده تنش اکسیداتیو است، بر روی جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella* طی ۲۴ ساعت، در نمونه‌های پیش‌تیمار شده در دمای ۱۴ درجه سانتیگراد، Buthionine Sulfoximine (BSO) و L-Galactonic Acid γ-lactone (GAL)، بررسی شد. کاهش شدید رنگدانه‌ها (کلروفیل‌ها و بتاکاروتن)، وزن تر سلول و تخلیه مخازن آسکوربات و گلوتاتیون که در نهایت سفیدشدگی و مرگ سلولی را به دنبال داشت، تحت شرایط تیمار با پاراکوات در دمای معمولی مشاهده شد. پیش‌تیمار سرما سبب افزایش وزن تر سلول‌ها، مقدار کلروفیل‌های a و b و بالا ماندن سطح بتاکاروتن، نسبت بتاکاروتن به کلروفیل کل و همچنین، تهی نشدن مخازن آسکوربات و گلوتاتیون سلول‌ها، پس از تیمار نمونه‌ها با پاراکوات گردید. سفیدشدگی در همهٔ نمونه‌های پیش‌تیمار شده با سرما مشاهده نشد و همهٔ سوسپانسیون‌ها سبز باقی ماندند. با آنکه نمونه پیش‌تیمار شده با GAL (پیش‌ساز آسکوربات) در دمای معمولی، افزایش در خور توجه مقادیر کلروفیل‌های a و b و باقی ماندن مقدار اندک آسکوربات احیا در تعداد اندک سلول‌های باقیمانده، پس از افزودن پاراکوات را نشان داد، اما تخلیه کامل مخزن گلوتاتیون، افزایش در خور توجه آسکوربات اکسید شده و به طور عمده کاهش شدید تعداد سلول‌ها، مشاهده شد و سبب بی‌رنگ شدن سوسپانسیون گردید. پیش‌تیمار با BSO (ممانعت‌کننده سنتز گلوتاتیون) در دمای معمولی و پس از افزودن پاراکوات سبب سفید شدن و مرگ نمونه شد، اما در نمونه‌های تیمار شده با سرما و پیش از افزوده شدن پاراکوات، از افزایش مقدار گلوتاتیون جلوگیری نمود و پس از افزودن آن نیز سبب پایین نگه داشتن مقدار گلوتاتیون گردید، ولی این نمونه سبز باقی ماند. به نظر می‌رسد پیش‌تیمار سرما به طور عمده و پیش‌تیمار با GAL تا حدودی، می‌توانند سبب القا و تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول شوند که تنها در مورد نمونه‌های سرما دیده، بقای سلول‌ها و سبز ماندن سوسپانسیون تحت شرایط تنش پاراکوات مشاهده می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** القای سیستم آنتی‌اکسیدانی، بیوتیونین سولفوکسایمین، پاراکوات، پیش‌تیمار سرما، جلبک *Dunaliella*، L- گالاکتونیک اسید γ- لاکتون

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: madadkar.m@lu.ac.ir، شماره تماس: ۰۶۶۱۲۲۰۱۶۶۹

**مقدمه**

ماده پاراکوات (متیل ویولوژن دی‌کلراید) با فرمول شیمیایی 1,1'-dimethyl -4, 4'-bipyridylium dichloride، علف‌کشی غیرانتخابی و غیرمحلول در حلال‌های آلی است، که اغلب به منظور کنترل علف‌های خشکی‌زی و آبزی از آن استفاده می‌شود (Sáenz *et al*., 1997; Ecobichon, 1991; Eisler, 1990). این ماده برای انسان و حیوانات بسیار سمّی بوده، گزارش‌های زیادی در خصوص بیماری یا مرگ پس از تماس با این ماده وجود دارد (Stevens and Sumner, 1991). در گیاهان این ترکیب از طریق جریان تعرق در گزیلم حرکت نموده (Slade and Bell, 2006)، در بافت‌های سبز با دریافت الکترون از زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم I، به رادیکال پاراکوات تبدیل می‌شود. رادیکال مورد نظر در مراحل بعدی با انتقال الکترون به اکسیژن، تولید رادیکال‌های هیدروکسیل را افزایش داده، موجب آسیب دیدن غشاها از طریق پراکسیداسیون لیپید، غیرفعال شدن پروتئین‌ها و آسیب به DNA و در نهایت خشک شدن و مرگ گیاه می‌گردد (Sáenz *et al*., 1997). پاراکوات استعمال شده، همچنین به شدت جذب خاک شده، در آن رسوب می‌کند و می‌تواند برای حداقل ۶ ماه بدون هر گونه تخریب قابل ملاحظه‌ای در خاک باقی بماند (Eisler, 1990). انستیتوی ملی تکنولوژی کشاورزی (INTA) در آرژانتین، استفاده از آن را برای کنترل علف‌های آبی به میزان ۰/۱ تا ۲ ppm توصیه کرده است (Eisler, 1990; Calderbank, 1972)، با این‌حال در اکوسیستم‌های آبی تشخیص آن به علت ورود به علف‌های آبی و نیز گل و لای بستر، کندتر صورت گرفته، اغلب تا قبل از ۸-۲۷ روز پس از استفاده اولیه به میزان ۱ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر، قابل تشخیص نیست (Summers, 1980). در ارتباط با جانداران آبزی، تحقیقات نشان می‌دهد با آنکه این ماده از طریق عرق و فضولات حیوانات دفع می‌شود، اما حضور آن در کبد و احشای ماهی‌ها اثبات شده است (Arias *et al*., 1991). در پژوهشی که روی تجمع زیستی (bioaccumulation) این ماده در استفاده از آن به عنوان علف‌کش آبی انجام گرفته، علف‌های نمونه‌برداری شده مقادیر در خور توجهی از تجمع این ماده را درون خود نشان دادند (Walker and Lawrence, 1992).

از سویی، اطلاعات نگران کننده‌ای در خصوص تأثیرات سمّی پاراکوات روی جلبک‌های میکروسکوپی، که اولین حلقه از زنجیره غذایی در آب به شمار می‌روند، وجود دارد. توقف رشد جلبک سبز-آبی *Gleeocapsa* پس از تیمار با غلظت ۰/۰۵ mM پاراکوات مشاهده شده است (Hammouda, 1994). همچنین، کاهش سرعت تقسیم سلولی و افزایش میزان رادیکال‌های آزاد در جلبک *Clamydomonas reinhardtii* پس از تیمار با غلظت متوسطی از پاراکوات (EC50)، (Jamers and Coen, 2010) و نیز سفیدشدگی محلول جلبکی *Dunaliela salina*، تحت تأثیر پاراکوات گزارش شده است (Rainowitch *et al*., 1987). کاهش میزان تثبیت کربن که در واقع شاخص میزان فتوسنتز جلبک‌های آبزی است، نیز تحت تأثیرات مخرب این ماده مشاهده شده است (Wong, 2000; Kosinski and Merkle, 1984).

با توجه به اینکه جمعیت جلبک‌های پلانکتونی از اجزاء بسیار مهم سیستم‌های آبی به شمار می‌رود،

افزایش گستره دانش بشر در خصوص تأثیرات مواد سمّی بر رشد این جلبک‌ها بسیار حایز اهمیت است. *Dunaliella* یک جلبک سبز تک سلولی بدون دیواره است، علاوه بر آنکه یک فیتوپلانکتون مهم و اولین حلقه زنجیره غذایی در آب محسوب می‌شود، به دلیل انعطاف‌پذیری رفتارهای فیزیولوژیک در شرایط تنش و پاسخ مناسب سیستم آنتی‌اکسیدانی، به عنوان یک سیستم مدل در بررسی‌های فیزیولوژی گیاهی نیز مورد توجه است (Cowan *et al*., 1992). این جلبک در شرایط نامساعد محیطی نظیر نور شدید، شوری بالا، کمبود مواد غذایی و سرما، قادر به رشد است (Avron and Ben-Amotz, 1992). مطالعات انجام شده در زمینهٔ بررسی فعالیت اجزای سیستم آنتی‌اکسیدانی *Dunaliella* در برخی تنش‌ها، پاسخ برخی از این اجزاء به منظور سازگاری جلبک با تنش را نشان می‌دهد (Jahnke and White, 2003; White and Jahnke, 2002; Abe *et al*., 1999). با این حال، به نظر می‌رسد در شرایط مقابله با یک تنش اکسیداتیو شدید مانند آلودگی به پاراکوات، آمادگی قبلی سیستم آنتی‌اکسیدانی جلبک احتمالاً بتواند در مقابله بهتر با شرایط تنش و حفظ حیات جلبک نقش تعیین‌کننده داشته باشد. اگرچه منطقی به نظر می‌رسد که سلول در مواجهه با تنش‌های متفاوت از مکانیسم‌های متفاوتی برای مقابله بهره گیرد، اما گاهی مشاهده شده است که برخی مسیرهای مشابه در تنش‌های متفاوت به کار گرفته شده‌اند. برای مثال، نتایج برخی تحقیقات نشان داده است که پیش‌تیمار سرما در غلات با برانگیختن و القای بیان برخی ژن‌ها، سبب بروز مقاومت نسبت به آلودگی پاتوژن‌ها می‌گردد (Hon *et al*., 1995). بنابراین، به نظر می‌رسد با القا و برانگیختن برخی اجزای آنتی‌اکسیدانی سلول تحت تأثیر برخی پیش‌تیمارها، بتوان مقاومت و حیات سلول را در مواجهه بعدی با تنش اکسیداتیو پاراکوات امکان‌پذیر نمود.

بدین منظور، بررسی تأثیر علف‌کش پاراکوات به عنوان یک ترکیب تنش‌زا و آلاینده آب، بر جلبک تک سلولی *Dunaliella*، در غیاب و همچنین، حضور برخی پیش‌تیمارهای مؤثر در القای مقاومت و یا برعکس جلوگیری از آن، در دستور کار این پژوهش قرار گرفت. از آنجا که پاراکوات عموماً در تشکیل رادیکال‌های آزاد مشارکت می‌نماید، بنابراین، در تشدید و وخیم‌تر نمودن آسیب اکسیداتیو نقشی اساسی دارد و همین امر اجازه می‌دهد تا تحت تیمارهای مختلف القاکننده یا بازدارنده مقاومت، ظرفیت‌های برانگیختگی سیستم آنتی‌اکسیدانی *Dunaliella* و روش‌های فیزیولوژیک به کار گرفته شده توسط این جلبک بهتر ارزیابی شود.

## مواد و روش‌ها

کشت جلبک *Dunaliella* sp. در محیط کشت مایع اصلاح شده جانسون و همکاران (Johnson *et al*., 1968; Shariati and Lilley, 1994)، با مولاریته ۱/۵ مولار نمک NaCl صورت گرفت و اسیدیته محیط کشت در حدود ۷/۴ تنظیم گردید. همهٔ مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت‌های Merk و Sigma تهیه شد. تلقیح سلول‌ها در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری، تحت شرایط استریل، به گونه‌ای صورت گرفت که تعداد سلول‌های اولیه تقریباً $۲۴\times۱۰^{۴}$ سلول در هر میلی‌لیتر از محیط کشت باشد. سوسپانسیون‌های جلبکی پس از این مرحله در شرایط دمایی $۲۸^{\circ}C$ و شدت نور $۵۰\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ و شرایط

فتوپریودیک ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، روی شیکر (با سرعت ۹۰ دور در ثانیه) قرار گرفتند. میزان نور با دستگاه فوتون‌متر مدل Hansatech QSPAR-U.K. اندازه‌گیری شد. با رسیدن سلول‌ها به مرحله لگاریتمی رشد، طراحی شرایط پیش‌تیمار و شاهد نمونه‌ها، به شرح ذیل در مورد سوسپانسیون‌های جلبکی، صورت گرفت.

پیش‌تیمار TB شامل یک میلی‌مولار Buthionine sulfoximine، (BSO، ممانعت‌کننده سنتز گلوتاتیون)، پیش‌تیمار TG شامل ۵ میلی‌مولار L-galactonic acid γ-lactone (GAL، پیش‌ساز آسکوربات) و نمونه حاوی یک میلی‌مولار BSO به علاوه ۵ میلی‌مولار GAL، به عنوان پیش‌تیمار TBG، هر یک در ارلن‌های مجزا حاوی سوسپانسیون‌های جلبکی تهیه شدند. همهٔ ارلن‌های یاد شده به همراه نمونه‌ای که فاقد هر گونه ماده اضافی بود، به عنوان پیش‌تیمار $T_1$ یا شاهد سرما، به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دایم دمایی ۱۴°C و نوری $۵۰\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ درون اتاقک کشت قرار گرفتند. شایان ذکر است که هم‌زمان با نمونه‌های فوق، یک نمونه بدون هیچ‌گونه ماده افزودنی به عنوان تیمار شاهد ($C_1$) به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمایی ۲۸°C و نوری $۵۰\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ مداوم درون اتاقک کشت دیگری قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، برداشت مقدار مشخصی از سوسپانسیون‌های جلبکی (به صورتی که بعداً ذکر خواهد شد)، از هر یک از ارلن‌ها به منظور شمارش تعداد سلول‌ها، و اندازه‌گیری ترکیبات آنتی‌اکسیدان آسکوربات کل، آسکوربات اکسید شده، گلوتاتیون کل، گلوتاتیون اکسید شده، کلروفیل‌های a و b و مقدار بتاکاروتن انجام گرفت. پس از این مرحله، به باقیمانده سوسپانسیون‌های جلبکی در داخل ارلن‌های مربوطه، ماده پاراکوات به گونه‌ای اضافه شد که مولاریته ۶۰۰ میکرومولار پاراکوات در داخل هر ارلن به دست آید (این مولاریته بر اساس مجموعه‌ای از آزمون‌های اولیه به عنوان حداقل مقدار کشنده پس از طی ۲۴ ساعت به دست آمد). بدین ترتیب، ارلن‌های قبلی برداشت شده از شرایط سرما، اکنون به صورت حاوی BSO و پاراکوات (تیمار TBP)، حاوی GAL و پاراکوات (تیمار TGP)، حاوی BSO، GAL و پاراکوات (تیمار TBGP) و حاوی پاراکوات (تیمار TP) تهیه شدند و از این پس به مدت ۲۴ ساعت دیگر، این بار در شرایط دمایی ۲۸°C و نوری $۵۰\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ مداوم قرار گرفتند.

بنابراین، همان‌گونه که ذکر شد، ترکیبات BSO و GAL به نمونه‌هایی که قرار بود در سرما قرار داده شوند، از همان ابتدا افزوده گردید و سپس همگی به همراه نمونه شاهد ($T_1$) به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای پایین (۱۴°C) قرار گرفتند، اما در مورد ارلن‌های نمونه شاهد ($C_1$)، این مواد در ابتدای ۲۴ ساعت دوم به ارلن‌ها اضافه گردید و معرفی به ترتیب فوق، به صورت تیمارهای CB، CG و CBG انجام شد. سپس این نمونه‌ها به همراه $C_1$ که فاقد هر گونه ماده اضافی بود، در شرایط دمایی ۲۸°C و نوری $۵۰\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ قرار گرفتند. پس از گذشت ۶ ساعت پاراکوات با غلظت مورد نظر به آنها اضافه گردید (بر اساس برخی مکاتبات شخصی با پروفسور Smirnoff, N.)، این زمان برای تأثیر پیش‌تیمارها کافی به نظر می‌رسد، اما از آنجا که در سرما سرعت متابولیسم سلولی تا حدودی کاهش

می‌یابد، احتمالاً به زمان بیشتری برای اعمال اثر پیش‌تیمارها نیاز است. بنابراین، مطابق توضیح فوق، افزودن پاراکوات با مولاریته مزبور به ارلن‌های قرار گرفته در شرایط معمولی نیز انجام شد و نمونه‌ها به ترتیب به صورت تیمارهای CBP، CGP، CBGP و CP معرفی شدند.

نمونه‌های شاهد $C_1$ و $T_1$ این بار نیز بدون افزودن هر گونه ماده‌ای، به همراه سایر نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در شرایط دمایی $۲۸^{\circ}C$ و نوری $۵۰\mu mol.m^{-2}s^{-1}$ قرار گرفته، پس از گذشت این مدت، مجدداً به عنوان نمونه شاهد در شرایط معمولی ($C_2$) و شاهد تیمار سرما ($T_2$) معرفی شدند.

پس از گذشت این مدت، برداشت سلول‌ها به منظور اندازه‌گیری ترکیبات ذکر شده، برای بار دوم و در هر دو نوبت نیز به شکل ذیل انجام گرفت: مقدار ۴۰ میلی‌لیتر از هر یک از ارلن‌های حاوی سوسپانسیون‌های جلبکی برداشت شده، پس از سانتریفیوژ در g ۱۵۰۰، محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب حاصل مقداری محیط کشت اضافه و مجدداً به مدت ۳ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از محاسبه وزن تر رسوب، آماده‌سازی نمونه‌ها برای اندازه‌گیری ترکیبات آنتی‌اکسیدان آسکوربات مطابق روش Kampfenkel و همکاران (۱۹۹۵) و گلوتاتیون بر اساس روش Baker و همکاران (۱۹۹۰) بر حسب نانومول ماده آنتی‌اکسیدان بر $۱۰^{۶}$ سلول و به روش اسپکتروفتومتری (مدل Versa, S/NB 02963) انجام شد. برای اندازه‌گیری مقدار رنگدانه‌ها، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون از هر ارلن برداشت و به مدت ۳ دقیقه در g ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. اندازه‌گیری به طریق اسپکتروفتومتری (مدل Shimatzu, UV-160) و مطابق روش Eijckelhoff و Dekker (۱۹۹۷) انجام شد و مقدار رنگدانه‌ها بر حسب میکروگرم رنگدانه بر سلول محاسبه شد. شمارش سلول‌ها نیز با استفاده از لام هموسایتومتر و محلول ید برای ثابت کردن سلول‌ها انجام گرفت و تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی شمارش گردید.

بررسی آماری داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس ANOVA، در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه Tukey در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ صورت گرفت.

## نتایج

### وزن تر و تعداد سلول‌ها

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان وزن تر سلول‌ها نشان داد (شکل ۱)، وزن تر سلول‌ها پس از گذشت ۲۴ ساعت در نمونه‌های تیمار شده در سرما (TBG، TG، TB و $T_1$)، تغییر معنی‌داری را نسبت به یکدیگر و حتی نسبت به $C_1$ و $C_2$ که نمونه‌های شاهد در دمای معمولی هستند، نشان نمی‌دهند. بررسی تعداد سلول‌ها (شکل ۲) نیز گویای وجود نتایجی مشابه با وزن تر در این تیمارهاست، در حالی‌که پس از گذشت ۲۴ ساعت دوم، تعداد سلول‌ها در تیمار $T_2$ نسبت به $T_1$ و $C_2$ نسبت به $C_1$ مقداری افزایش یافته است (شکل ۲)، که این مورد می‌تواند به انجام تقسیمات سلولی در نمونه‌های شاهد پس از گذشت ۲۴ ساعت نسبت داده شود.

بررسی وزن تر سلول‌ها در نمونه‌های پیش‌تیمار شده با BSO، GAL و سرما پس از افزودن پاراکوات (TP, TBP, TGP, TBGP) (شکل ۱)، همین‌طور افزایش مشخصی را نسبت به نمونه شاهد سرما ($T_2$)

نشان می‌دهد، در حالی‌که تعداد سلول‌ها (شکل ۲) در این تیمارها نسبت به $T_2$ تا حدودی کاهش یافته است. به نظر می‌رسد کاهش تعداد سلول‌ها همراه با افزایش وزن تر سلول‌های باقیمانده در نمونه‌های TBGP، TGP، TBP و TP بتواند به تنش حاصل از تیمار با پاراکوات و احتمالاً ماده‌سازی و سنتز برخی ترکیبات ضروری برای مقابله با تنش نسبت داده شود. بررسی نمونه‌های پیش‌تیمارنشده با سرما (CBGP، CGP، CBP و CP) حاکی از کاهش شدید تعداد سلول‌ها همراه با کاهش شدید وزن تر سلول، به جز در تیمار CGP است. تیمارهای TGP و TBGP، بیشترین افزایش وزن تر (شکل ۱) و تیمارهای CP، CBP و CBGP بیشترین کاهش تعداد سلولی را نشان می‌دهند (شکل ۲).

**بررسی میزان رنگدانه‌ها**

میزان کلروفیل a در تیمارهایی که در سرما قرار گرفته‌اند، قبل از افزودن پاراکوات ($T_1$, TB, TG, TBG)، نسبت به $C_1$ که در دمای معمولی بوده، کاهش نشان می‌دهد (شکل ۳). این کاهش در تیمار $T_2$ نیز که به دمای معمولی بازگشته است هنوز مشاهده می‌شود، درحالی‌که همین نمونه‌ها پس از افزودن پاراکوات (TBGP، TGP، TBP و TP)، افزایش قابل توجه کلروفیل a را نشان می‌دهند. بر خلاف کاهش اندکی که در میزان کلروفیل a نمونه شاهد $C_2$ پس از ۲۴ ساعت دوم نسبت به $C_1$ مشاهده شد، پس از افزودن پاراکوات، میزان کلروفیل a در نمونه‌های CP، CBP و CBGP نسبت به $C_2$ به شدت کاهش یافت، درحالی‌که میزان این رنگیزه در تیمار CGP افزایش درخور توجهی نشان داد. مقدار کلروفیل a در واقع، در نمونه‌های CBGP، CBP و CP نسبت به سایر نمونه‌ها از حداقل مقادیر برخوردار است (شکل ۳).

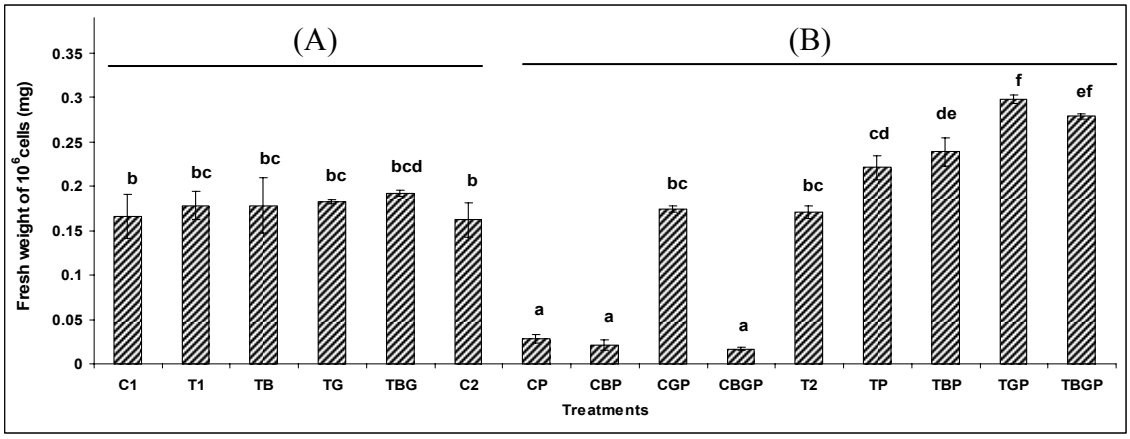
بررسی تغییرات کلروفیل b (شکل ۴)، نیز نشان می‌دهد اگرچه مقدار کلروفیل b در همهٔ نمونه‌های پیش‌تیمار شده با سرما طی ۲۴ ساعت اول، تغییر معنی‌داری را نسبت به شاهد $C_1$ و نیز $C_2$ نشان نمی‌دهد، اما پس از افزودن پاراکوات در ۲۴ ساعت دوم افزایش معنی‌دار مقدار کلروفیل b در نمونه‌های (TGP، TBP، TP و TBGP)، نسبت به $T_2$ و نیز شرایط قبل از تیمار با پاراکوات مشهود است. نمونه‌های تیمار شده با BSO و GAL در دمای معمولی نیز پس از افزودن پاراکوات (CBGP، CGP و CBP) افزایش مقدار کلروفیل b را با برتری مشخص CGP نسبت به $C_1$ و گاهی نسبت به $C_2$ نشان می‌دهند. نمونه شاهد در دمای معمولی که با پاراکوات تیمار شده (CP)، کاهش شدید کلروفیل b را نشان می‌دهد.

بنابراین به طور کلی به نظر می‌رسد که تیمار سرما سبب کاهش مقدار رنگدانه‌های کلروفیلی شده، درحالی‌که پس از افزودن پاراکوات به همین نمونه‌ها، میزان رنگدانه‌های کلروفیلی a و b به طور مشخصی افزایش می‌یابد. افزایش کلروفیل‌ها همچنین به طور مشخص در شاهد تیمار شده با پیش‌ساز آسکوربات به‌علاوه پاراکوات (CGP) مشاهده می‌شود.

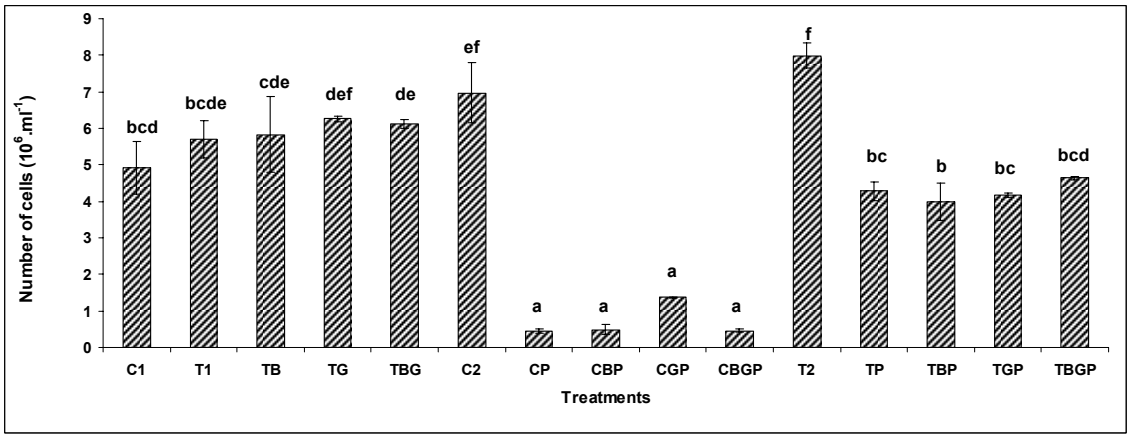
بررسی میزان کلروفیل کل (شکل ۵) نیز به علت آنکه قسمت اعظم آن از کلروفیل a تشکیل شده، الگویی تقریباً مشابه با تغییرات کلروفیل a را نشان می‌دهد.

مقدار بتاکاروتن سلول‌ها پس از اعمال تنش سرما بدون پاراکوات (TBG، TG، TB و $T_1$) و یا پس از

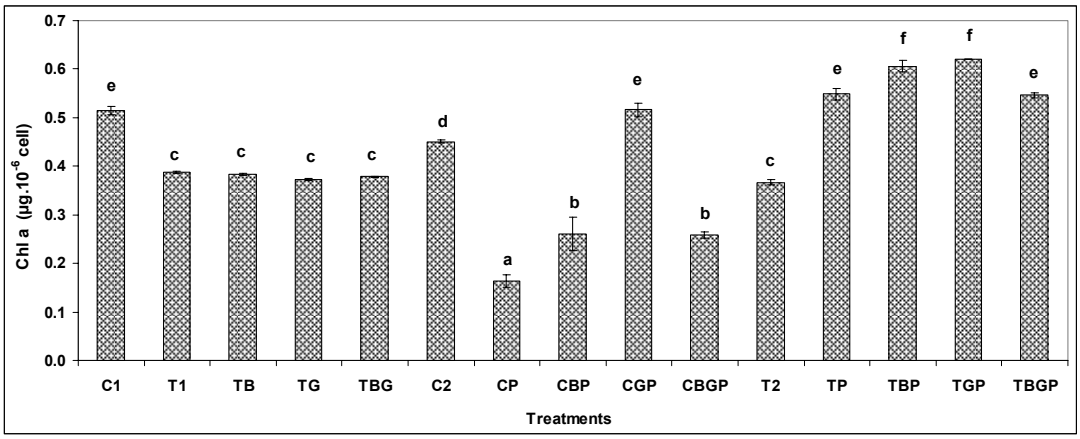
افزودن آن در دمای معمولی (CBGP، CGP، CBP و CP)، تغییرات کاهشی را به ترتیب نسبت به $C_1$ و $C_2$ نشان می‌دهد (شکل ۶)، در حالی‌که پیش‌تیمار سرما به طور واضحی از کاهش میزان بتاکاروتن سلول‌ها پس از افزودن با پاراکوات (TBGP، TGP، TBP و TP) جلوگیری می‌کند. افزایش مقدار بتاکاروتن حتی در برخی نمونه‌های تیمار شده با BSO و GAL قابل مشاهده است (TBP و TGP نسبت به $T_2$).



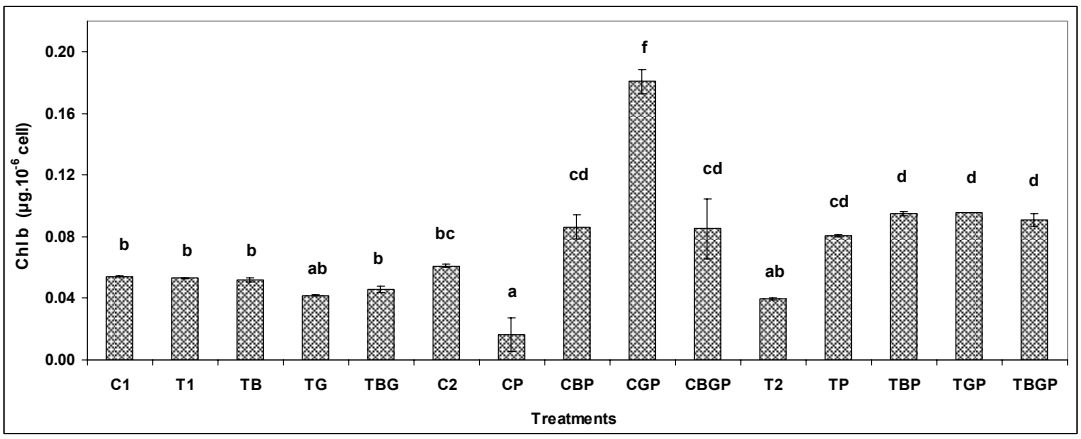

شکل ۱- وزن تر سلول‌های جلبک *Dunaliella* بر حسب میلی‌گرم در $10^6$ سلول، در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های پیش‌تیمار شده. A) پس از گذشت ۲۴ ساعت اول شامل $C_1$: نمونه شاهد در دمای ۲۸C° و نمونه‌های پیش‌تیمار شده در دمای ۱۴C° به صورت $T_1$: شاهد سرما، TB: پیش‌تیمار BSO، TG: پیش‌تیمار GAL، TBG: پیش‌تیمار BSO به علاوه GAL. B) پس از گذشت ۲۴ ساعت دوم شامل نمونه‌ها در دمای ۲۸C° بوده به صورت $C_2$: نمونه شاهد $C_1$ پس از گذشت ۲۴ ساعت بدون هر گونه پیش‌تیمار، CP: نمونه $C_1$ پس از افزودن پاراکوات، CBP: نمونه $C_1$ پیش‌تیمار شده با BSO پس از افزودن پاراکوات، CGP: نمونه $C_1$ پیش‌تیمار شده با GAL پس از افزودن پاراکوات، CBGP: نمونه $C_1$ پیش‌تیمار شده با BSO و GAL پس از افزودن پاراکوات، $T_2$: نمونه شاهد $T_1$ پس از گذشت ۲۴ ساعت بدون هرگونه پیش‌تیمار، TP: نمونه $T_1$ پس از افزودن پاراکوات، TBP: نمونه TB پس از افزودن پاراکوات، TGP: نمونه TG پس از افزودن پاراکوات، TBGP: نمونه TBG پس از افزودن پاراکوات. مقادیر میانگین سه تکرار±SD بوده و حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح $P<0.05$ است.



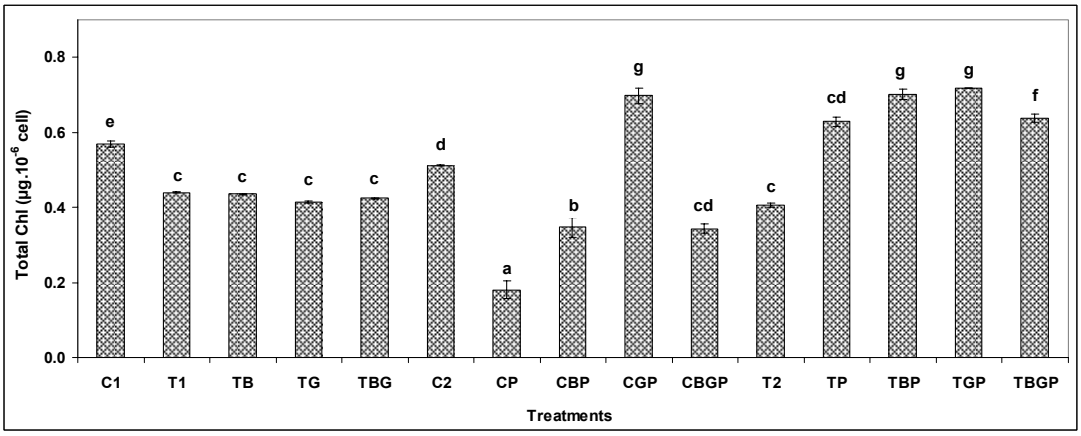

شکل ۲- تعداد سلول‌های جلبک *Dunaliella* در میلی‌لیتر محیط کشت، در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های پیش‌تیمار شده. شرح تیمارها همگی مطابق شکل ۱ است. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده و حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح $P<0.05$ است.




شکل ۳- مقدار کلروفیل a در سلول‌های جلبک *Dunaliella*، در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های پیش‌تیمار شده. شرح تیمارها همگی مطابق شکل ۱ است. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده و حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح $P<0.05$ است.

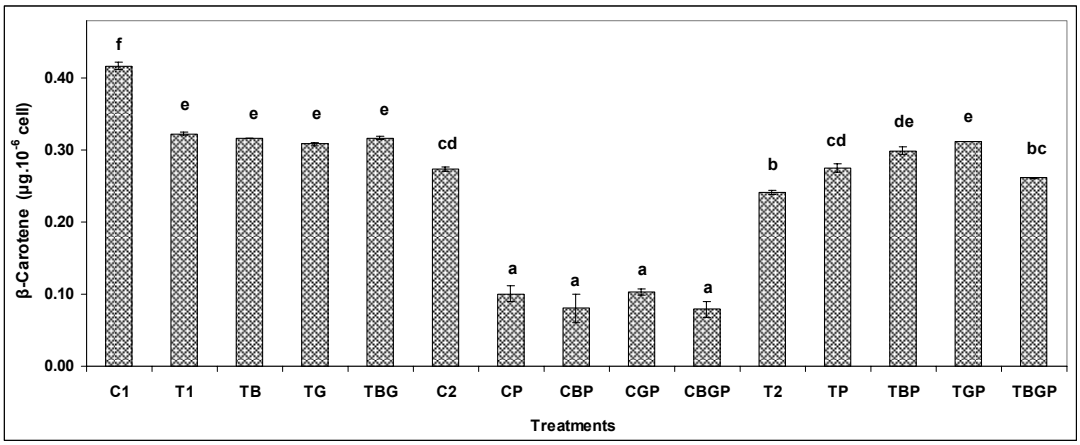



شکل ۴- مقدار کلروفیل b در سلول‌های جلبک *Dunaliella*، در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های پیش‌تیمار شده. شرح تیمارها همگی مطابق شکل ۱ است. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده و حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح $P<0.05$ است.

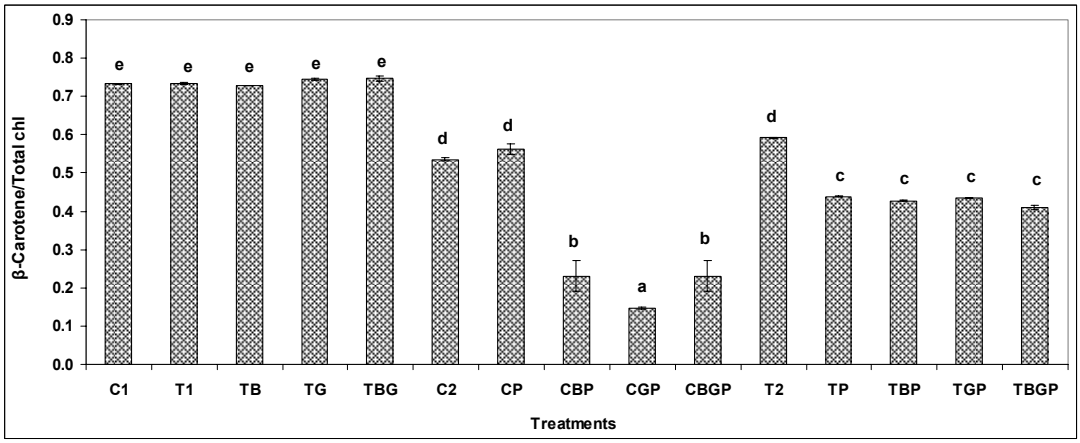



شکل ۵- مقدار کلروفیل کل در سلول‌های جلبک *Dunaliella*، در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های پیش‌تیمار شده. شرح تیمارها همگی مطابق شکل ۱ است. مقادیر میانگین سه تکرار± SD بوده حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح $P<0.05$ است.

بررسی نسبت بتاکاروتن به کلروفیل کل (شکل ۷)، حاکی از کاهش مقدار این نسبت تقریباً در همهٔ نمونه‌های تیمار شده با پاراکوات به جز CP بوده، کاهش بیشتری را در نمونه‌های CBGP، CGP و CBP نشان می‌دهد، اگرچه این نسبت در نمونه‌های سرما دیده قبل از افزودن پاراکوات (TBG، TG، TB و $T_1$)، تا حدی قابل مقایسه با $C_1$ است. نمونه‌های CP و $C_2$ تفاوت معنی‌داری را از نظر آماری نشان نمی‌دهند؛ بدین معنی که شاهد تیمار شده با پاراکوات در دمای معمولی در مقایسه با نمونه تیمار نشده وضعیت یکسانی را نشان داده، اما در بررسی دقیق‌تر مشخص می‌شود که محتوای کلروفیل و بتاکاروتن در نمونه $C_2$ بسیار بیشتر از CP بوده است و در تیمار CP هر دوی این مقادیر تقریباً به طور یکسان کاهش یافته‌اند. در نمونه‌های TBGP، TGP، TBP و TP نیز کاهشی نسبت به $T_2$ در مقدار بتاکاروتن مشاهده می‌شود. بنابراین، در یک جمع‌بندی می‌توان گفت که به طور کلی، هیچ یک از پیش‌تیمارها قادر به افزایش نسبت بتاکاروتن به کلروفیل سلولی در شرایط تنش پاراکوات نبوده، در بیشتر حالات تغییرات به صورت کاهشی هستند.




شکل ۶- مقدار بتاکاروتن در سلول‌های جلبک *Dunaliella*، در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های پیش‌تیمار شده. شرح تیمارها همگی مطابق شکل ۱ است. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح $P<0.05$ است.




شکل ۷- نسبت بتاکاروتن به کلروفیل کل در سلول‌های جلبک *Dunaliella*، در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های پیش‌تیمار شده. شرح تیمارها همگی مطابق شکل ۱ است. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح $P<0.05$ است.

**بررسی تغییرات آسکوربات**

کاهش میزان آسکوربات کل، طی ۲۴ ساعت اول در کلیه نمونه‌های تیمار شده در سرما و توسط سایر پیش‌تیمارها مشاهده می‌شود (TBG، TG، TB و $T_1$ در مقایسه با $C_1$) (شکل ۸). اگرچه پس از طی ۲۴ ساعت دیگر در شرایط معمولی، نمونه $C_2$، نیز مقداری کاهش در میزان آسکوربات کل را نسبت به $C_1$ نشان می‌دهد که به نظر می‌رسد به علت تداوم شرایط نوری و دمایی بر اثر انتقال کشت‌ها از شرایط فتوپریودیک به شرایط ثابت باشد. مقدار آسکوربات کل در همهٔ نمونه‌های تیمار شده با سرما، پس از افزودن پاراکوات مجدداً کاهش نشان داده، در تیمارهای سرما ندیده CBGP، CBP و CP به صفر نزدیک می‌شود، درحالی‌که این میزان در تیمار CGP از کاهش کمتری برخوردار است. بررسی وضعیت آسکوربات اکسید شده در تیمارهای سرما ندیده حاکی از غالبیت آن نسبت به نوع احیا شده، به ویژه در تیمار CGP است که حاوی مقادیر قابل ملاحظه‌ای آسکوربات است و این در شرایطی است که نسبت آسکوربات احیا به آسکوربات اکسید شده در همهٔ تیمارهای سرما دیده TBGP، TGP، TBP و TP از وضعیت متعادل‌تری برخوردار است. میزان آسکوربات کل در این تیمارها نیز پس از افزودن پاراکوات کاهش یافته است. مقایسه وضعیت تیمار $T_2$ نسبت به تیمار $T_1$ وضعیت مشابهی را به صورت میزان قابل ملاحظه نوع احیا شده و بخش اندک آسکوربات اکسید شده نشان می‌دهد.

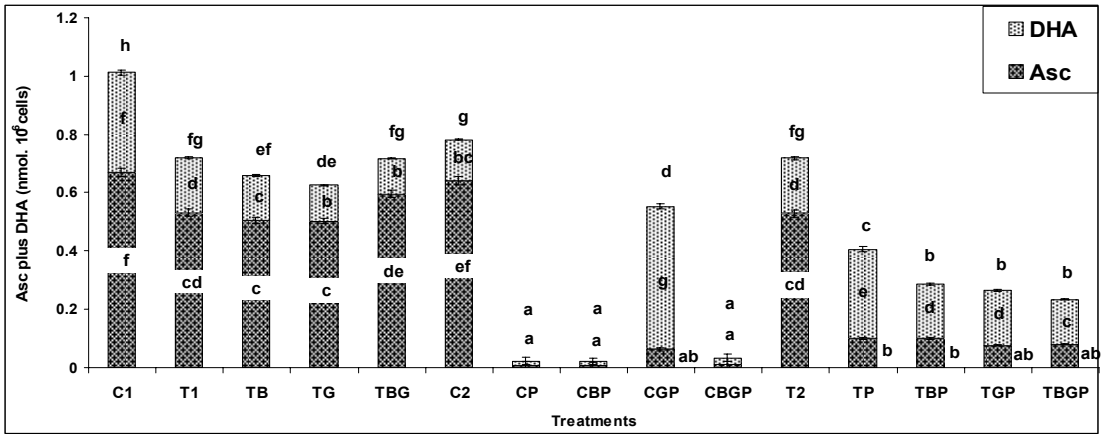
با آنکه مقدار آسکوربات احیا در $C_2$ نسبت به $T_2$ بیشتر است، اما همان‌گونه که در نتایج (شکل ۸) ملاحظه می‌شود، پس از افزودن پاراکوات، تخلیه مخزن آسکوربات، به ویژه از نوع احیا شده به شدت در همهٔ نمونه‌هایی که در شرایط معمولی قرار داشته‌اند (CGP، CBP و CP) مشاهده می‌شود. در همهٔ نمونه‌های پیش‌تیمار شده در سرما (TBGP، TGP، TBP و TP) اگرچه میزان آسکوربات کل پس از افزودن پاراکوات کاهش یافته، اما هنوز مقداری نوع احیا شده (در مقایسه با آسکوربات کل) در سلول‌ها وجود دارد. بنابراین، می‌توان گفت در کلیه حالات تیمار با پاراکوات، میزان آسکوربات اکسید به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. تیمار CGP که با پیش‌ساز آسکوربات تیمار شده، وجود مقدار اندک آسکوربات احیا را نسبت به تیمارهای CBP، CP و CBGP نشان می‌دهد.

**بررسی تغییرات گلوتاتیون**

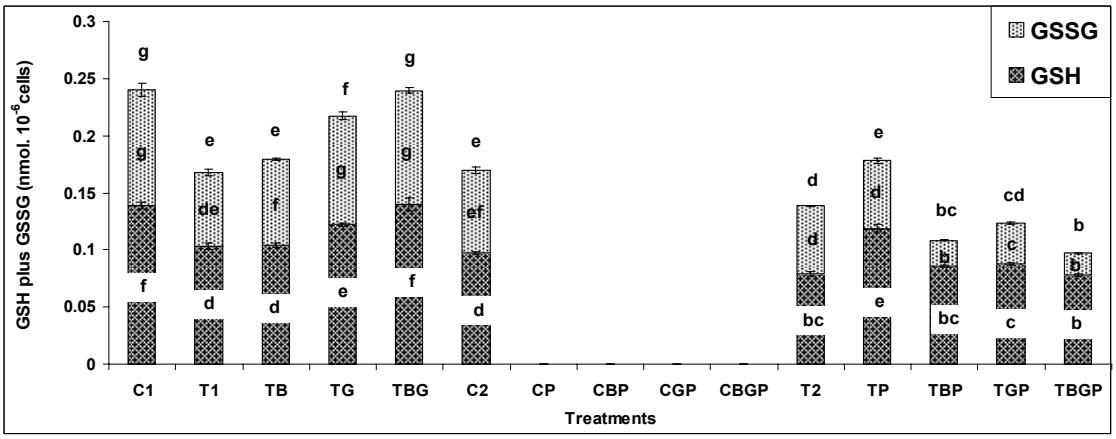
کاهش مقدار گلوتاتیون کل (شکل ۹) در تیمار $C_2$ نسبت به $C_1$ همانند وضعیت آسکوربات مشاهده می‌شود که می‌تواند به تداوم شرایط آزمون به مدت ۲۴ ساعت دیگر در مقابل شرایط فتوپریودیک مربوط باشد. نمونه TGP مقدار گلوتاتیون کل خود را با برتری مشخص نوع احیا شده، تا حد $T_2$ افزایش داده که حاکی از توان سلول در افزایش مقدار گلوتاتیون، تحت تأثیر همزمان دو پیش‌تیمار است. در همهٔ نمونه‌های تیمار شده در دمای معمولی (CBGP، CGP، CBP و CP) که شامل پیش‌تیمار با ممانعت کننده گلوتاتیون به تنهایی و یا در تلفیق با GAL هستند، تخلیه کامل مخزن گلوتاتیون مشاهده می‌شود، درحالی‌که این وضعیت در نمونه‌های تیمار شده با سرما (TBGP، TGP، TBP، TP و $T_2$) مشاهده نمی‌گردد.

نتایج همچنین نشان می‌دهد که بازگرداندن نمونه‌ای

که با سرما پیش‌تیمار شده ($T_1$) به شرایط معمولی ($T_2$) سبب کاهش بیشتر مقدار گلوتاتیون آن نسبت به شرایط اولیه آزمون ($C_1$) می‌شود؛ اما پس از افزودن پاراکوات (TP) مقدار گلوتاتیون تا حد ($C_2$) افزایش یافته، ولی در هر صورت میزان آن کمتر از ($C_1$) باقی می‌ماند. به نظر می‌رسد که میزان گلوتاتیون کل در نمونه‌های پیش‌تیمار شده (TBP, TGP, TBGP) بر اثر افزودن پاراکوات کاهش می‌یابد، درحالی‌که این مقدار در نمونه سرما دیدهٔ فاقد هر گونه پیش‌تیمار دیگر ($T_2$)، پس از افزودن پاراکوات (TP) افزایش می‌یابد. با مشاهده دقیقتر تیمارهای TBGP، TGP، TBP و TP می‌توان دریافت که هر چند مخزن گلوتاتیون در این نمونه‌ها کوچکتر شده، اما از برتری بیشتر حالت احیا شده نسبت به حالت اکسید شده برخوردار است.




شکل ۸- مقدار آسکوربات احیا شده (Asc)، آسکوربات اکسید شده (DHA) و آسکوربات کل در سلول‌های جلبک *Dunaliella*، در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های پیش‌تیمار شده. شرح تیمارها همگی مطابق شکل ۱ است. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح $P<0.05$ است.




شکل ۹- مقدار گلوتاتیون احیا شده (GSH)، گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) و گلوتاتیون کل در سلول‌های جلبک *Dunaliella*، در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های پیش‌تیمار شده. شرح تیمارها همگی مطابق شکل ۱ است. مقادیر میانگین سه تکرار ± SD بوده، حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون توکی در سطح $P<0.05$ است.

## بحث

علف‌کش پاراکوات به عنوان یک عامل تنش‌زا که سبب بروز آسیب اکسیداتیو در گیاهان می‌شود، مطرح بوده و اخیراً تحقیقاتی نیز در زمینه مقاوم‌سازی گیاهان تراریخت نسبت به پاراکوات با استفاده از ژن‌های باکتریایی انجام شده است (Jo *et al*., 2004). مطالعات نشان داده است که میزان مقاومت و شیوهٔ پاسخگویی سلول‌ها در گیاهان و یا جلبک‌های مختلف به پاراکوات می‌تواند متفاوت باشد (Ibrahim, 1990). گزارش‌های زیادی از پاسخ مناسب سیستم آنتی‌اکسیدانی *Dunalilella* به تنش‌های متفاوت محیطی وجود دارد که گویای توانایی بسیار زیاد این جلبک تک‌سلولی در ارائه پاسخ‌های مناسب فیزیولوژیک به شرایط دشوار محیطی و در نتیجه، تضمین بقای سلول است، اما همان‌گونه که در نتایج این تحقیق مشاهده گردید، تیمار با پاراکوات سبب بروز آسیب اکسیداتیو، تجزیه شدن رنگدانه‌ها و تخلیه مخزن آسکوربات و گلوتاتیون می‌گردد که نهایتاً سفیدشدگی و مرگ سلولی را به همراه دارد. مطالعات نشان داده است که برخی تنش‌های محیطی، مانند تنش دمای پایین به دلیل بر هم زدن تعادل میان تولید و مصرف انرژی در سلول و در نتیجه، تولید رادیکال‌های آزاد (Havaux and Davaud, 1994) قادر به برانگیختن برخی اجزای سیستم آنتی‌اکسیدانی *Dunaliella*، به ویژه مخازن آسکوربات و گلوتاتیون بوده، از این طریق سبب ایجاد مقاومت به تنش مزبور، در این جلبک می‌شوند (Haghjou *et al*., 2009)، بنابراین، به نظر می‌رسد می‌توان با القا و برانگیختن سیستم آنتی‌اکسیدانی *Dunalilella* از طریق پیش‌تیمارها، آن را در برابر تنش پاراکوات مقاوم نمود.

بررسی نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که به طور کلی، همهٔ نمونه‌هایی که تحت پیش‌تیمار سرما به تنهایی و یا به همراه سایر پیش‌تیمارها قرار گرفته‌اند، پس از افزودن پاراکوات و گذشت ۲۴ ساعت دچار سفیدشدگی نشده و سبز باقی مانده‌اند، درحالی‌که این پدیده در نمونه‌های پیش‌تیمار نشده با سرما، قابل مشاهده است. آزمایش‌های انجام شده توسط Rabinowith و همکاران (۱۹۸۷) نیز سفیدشدگی وابسته به زمان و غلظت را در جلبک *Dunalilella* بر اثر افزودن پاراکوات نشان می‌دهد. بررسی وضعیت تعداد سلول‌ها و نیز وزن تر آن‌ها، حاکی از کاهش شدید میزان وزن تر، در نمونه‌های قرار گرفته در دمای معمولی پس از افزودن پاراکوات (CBGP، CBP و CP) است که مرگ سلولی را در این سوسپانسیون‌های جلبکی نشان می‌دهد، درحالی‌که وضعیت در نمونه‌هایی که در دمای پایین پیش‌تیمار شده‌اند (TBGP، TGP، TBP و TP)، متفاوت است. در این نمونه‌ها اگرچه پس از افزودن پاراکوات تعداد سلول‌ها تا حدودی کاهش یافته است، اما وزن تر سلول‌های باقیمانده در این شرایط افزایش نشان می‌دهد، که احتمالاً می‌تواند به ماده‌سازی و سنتز ترکیبات ضروری برای مقابله با تنش مربوط باشد. تحقیقات، القای برخی ژن‌های ضروری و نیز ماده‌سازی برای مقابله سلول با شرایط تنش‌زا را نشان داده‌اند (Crosatti *et al*., 1999; Kurepa *et al*., 1998).

در ارتباط با وضعیت رنگدانه‌ها تحت شرایط تنش که عامل مهمی در ارزیابی میزان فعالیت فتوسنتزی سلول‌هاست، نتایج برخی تحقیقات نشان داده است که

مقدار کلروفیل‌ها و بتاکاروتن تحت شرایط سرما تا حدودی کاهش می‌یابد (Haghjou *et al*., 2009) که دلایل احتمالی متفاوتی، از جمله صدمه دیدن توسط گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، (Wise and Naylor, 1987) و یا تعدیل اندازه و تعداد گیرنده‌های فتوسنتزی (Huner *et al*., 1998) می‌تواند در رابطه با آن مورد توجه قرار گیرد. مورد یاد شده؛ یعنی کاهش مقدار رنگدانه‌ها پس از تیمار با سرما (TBGP، TBP، TB و $T_1$) در نتایج این تحقیق نیز مشاهده شد.

اما در همین نمونه‌ها پس از افزوده شدن پاراکوات، افزایش قابل توجه مقدار کلروفیل‌های a و b و نیز بالا نگه داشته شدن سطح بتاکاروتن، مشاهده می‌شود. مقایسه این نمونه‌ها با نمونه‌های تیمار نشده در سرما که پاراکوات به آنها اضافه شده، دلالت بر وقوع مجموعه‌ای از فرآیندهای فیزیولوژیک و کسب آمادگی‌هایی دارد که نه تنها از تخریب رنگدانه‌ها در تیمار با تنش بعدی جلوگیری نموده، بلکه سبب افزایش رنگدانه‌ها در این شرایط نیز گردیده است. نتایج برخی تحقیقات، کاهش تخریب کلروفیل در برگ‌های تیمار شده با پاراکوات را که مقادیر آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر گلوتاتیون و آسکوربات در آنها افزایش داده شده، نشان می‌دهد (Streb and Feierabend, 1999)؛ اما همان‌گونه که در این پژوهش ملاحظه گردید، با افزودن پاراکوات به نمونه‌های سرما دیده، حتی مقدار کلروفیل‌ها (به ویژه کلروفیل a) تا حدودی افزایش یافت، که این مورد احتمالاً می‌تواند به وضعیت بهتر فتوسنتزی در این شرایط نسبت داده شود. بر اساس نتایج به دست آمده توسط Haldimann (۱۹۹۹)، حفظ محتوای کلروفیلی بالاتر می‌تواند یک مزیت به حساب آمده، دلیلی برای برتری کارایی فتوسنتزی واریته‌های غیرحساس ذرت به واریته‌های حساس در شرایط کاهش دما باشد.

علاوه بر افزایش درخور توجه محتوای کلروفیلی و نیز بالا بودن مقدار بتاکاروتن پس از افزوده شدن پاراکوات در نمونه‌های سرما دیده، تهی نشدن کامل مخزن آسکوربات که هنوز حاوی مقادیری آسکوربات از نوع احیا شده است و نیز وجود مقادیر درخور توجهی گلوتاتیون از نوع احیا شده، می‌تواند به بقای جلبک در شرایط تنش اکسیداتیو کمک کند. مخازن آسکوربات و گلوتاتیون به عنوان دو منبع مهم در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش دارند (Smirnoff, 1995).

بررسی وضعیت سلول‌ها در نمونه‌های تیمار شده در دمای معمولی پس از افزودن پاراکوات (CBGP، CBP و CP)، حاکی از کاهش شدید کلروفیل a و در برخی موارد کلروفیل b و نیز رنگدانه بتاکاروتن در این شرایط است. از سویی، بررسی وضعیت آسکوربات و گلوتاتیون، تهی شدن کامل مخزن را نشان می‌دهد که دال بر درگیری شدید این دو آنتی‌اکسیدان در مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از تأثیر پاراکوات بر سلول است.

با این همه، بررسی تیمار CGP که نمونه پیش‌تیمار شده با پیش‌ساز آسکوربات در دمای معمولی است، تا حدودی وضعیت متفاوتی را با تیمارهای دیگر نشان می‌دهد. در تعداد اندک سلول‌های باقیمانده، هرچند مخزن آسکوربات هنوز وجود مقادیری آسکوربات از نوع احیا شده را نشان می‌دهد و مقدار کلروفیل‌های a و b نیز افزایش درخور توجهی نسبت به سایر تیمارها دارند که در مجموع وضعیت بهتری را برای تیمار

CGP نسبت به سایر تیمارها پیشنهاد می‌کنند، اما کاهش شدید تعداد سلول‌ها و به عبارتی وقوع مرگ سلولی و بروز پدیده سفیدشدگی، نشان دهنده شدت وقوع آسیب اکسیداتیو در سلول است. با این‌حال، در این شرایط وزن تر سلول‌های باقیمانده کاهش نمی‌یابد، اما مقایسه نمونه TGP با سایر تیمارهای هم ردیف (TBGP، TBP و TP) نشان می‌دهد که تیمار سلول با پیش‌ساز آسکوربات سبب افزایش وزن تر، مقدار کلروفیل a و بتاکاروتن سلول شده، ولی در سایر موارد، از جمله آسکوربات، اختلافی با سایر تیمارها نشان نمی‌دهد. بنابراین، به نظر می‌رسد که تیمار با پیش‌ساز آسکوربات در دمای معمولی و سرما هر دو سبب افزایش کلروفیل شده، درحالی‌که بقای سلول‌ها بیشتر به دلیل پیش‌تیمار سرماست، تا تیمار با پیش‌ساز آسکوربات. تیمار سلول‌ها با BSO در دمای پایین و پیش از افزودن پاراکوات (TG)، از افزایش مقدار گلوتاتیون تحت شرایط سرما، جلوگیری کرده، پس از افزودن پاراکوات نیز چه به تنهایی (TBP) و چه در تعامل با GAL (TBGP)، سبب پایین‌تر ماندن سطح گلوتاتیون کل در مقایسه با TGP و TP می‌گردد.

بنابراین، در یک جمع‌بندی، هر چند نمی‌توان اهمیت فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های مهمّی، نظیر آسکوربات و گلوتاتیون را که می‌توانند تحت تأثیر برخی پیش‌تیمارها افزایش یابند و در دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش بسزایی ایفا نمایند، از نظر دور داشت و در واقع، می‌توان با توجه به وضعیت این دو مخزن، یک برآورد نسبی از وضعیت سلول نمود، اما به نظر می‌رسد که تنشی نظیر سرما به طور جامع‌تر قادر است مسیرهایی از مقاومت را در سلول به راه اندازد که از جمله آنها می‌توان به القای احتمالی سایر اجزای سیستم آنتی‌اکسیدانی و یا تولید و تجمع برخی متابولیت‌های مهم دیگر اشاره نمود که می‌توانند در برطرف نمودن یک آسیب اکسیداتیو قوی نظیر تنش پاراکوات به سلول کمک کرده، سبب بقای آن گردند.

## منابع


Abe, K., Nishimura, N. and Hirano, M. (1999) Simultaneous production of beta carotene vitamin E and vitamin C by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. Journal of Applied Phycology 11: 331-336.

Arias, G. S., Martinez Tabche, L. and Galar, I. (1991) Effects of paraquat and lead on fish *Oreochromis hornorum*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 46: 237-241.

Avron, M. and Ben-Amotz, A. (1992) *Dunaliella*: physiology, biochemistry and biotechnology. CRC Press, Boca Raton.

Baker, M. A., Cerniglia, G. J. and Zaman, A. (1990) Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. Analytical Biochemistry190: 360-365.

Calderbank, A. (1972) Experimental considerations in the development of diquat and paraquat as aquatic herbicides. Outlook Agriculture 7: 51-54.

Cowan, A. K., Rose P. D. and Horne, L. G. (1992) *Dunaliella salina* a model system for studying the response of plant cells to stress. Journal of Experimental of Botany 43: 1535-1547.

Crosatti, C., Laureto, P. P., Bassi, R. and Cattivelli, L. (1999) The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene *cor14b* and the accumulation of the corresponding protein. Plant Physiology

119: 671-680.

Ecobichon, D. J. (1991) Toxic effects of pesticides in casarett and doull's toxicology. In: The basic science of poisons. (eds. Madur, M. O., Doull, J. and Klaassen C. D.) 284. Pergamon Press, New York.

Eijckelhoff, C. and Dekker, J. P. (1997) A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and b-carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes. Photosynthesis Research 52: 69-73.

Eisler, R. (1990) Paraquat hazards to fish, wildlife, and invertebrates, a synoptic review. Biology Report, Washington DC.

Haghjou, M. M., Shariati, M. and Smirnoff, N. (2009) The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate–glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. Physiologia Plantarum 135: 272-280.

Haldimann, P. (1999) How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mayz* genotypes differing in sensitivity to low temperature? Journal of Experimental of Botany 50: 543-550.

Hammouda, O. H. E. (1994) Superoxide dismutase level in response to paraquat and high temperature in the *cyanobacterium Gloeocapsa* sp. Biologia Plantarum 36: 229-236.

Havaux, M. and Davaud, A. (1994) Photoinhibition of photosynthesis in chilled potato leaves is not correlated with a loss of photosystem II activity. Preferential inactivation of photosystem I. Photosynthesis Research 40: 75-92.

Hon, W. C., Griffith, M., Mlynarz, A., Kwok, Y. C. and Yang, D. S. C. (1995) Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. Plant Physiology 109: 879-889.

Huner, N. P. A., Öquist, G. and Sahran, F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. Trends in Plant Science 3: 224-230.

Ibrahim, E. A., (1990) The influence of the herbicide paraquat gramoxone on the growth and metabolic activity of three chlorophytes. Journal of Water-Air and Soil Pollution 51: 89-93.

Jahnke, L. S. and White, A. L. (2003) Long-term hyposaline and hyper saline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. Journal of Plant Physiology 160: 1193-1202.

Jamers, A. and Coen, W. D. (2010) Effect assessment of the herbicide paraquat on a green alga using differential gene expression and biochemical biomarkers. Environmental Toxicology and Chemistry 29: 893-901.

Jo, J., Won, S. H., Son, D. and Lee, B. H. (2004) Paraquat resistance of transgenic tobacco plants over-expressing the Ochrobacterum anthropi pqrA gene. Biotechnology Letter 26: 1391-1396.

Johnson, M. K., Johnson, E. J., Macelroy, R. D., Speer, H. L. and Bruff, B. S. (1968) Effects of salts on halophilic alga *Dunaliella viridis*. Journal of Bacteriology 95: 1461-1468.

Kampfenkel, K., Van Montagu, M. and Inze´, D. (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. Analytical Biochemistry 225: 165-167.

Kosinski, J. R. and Merkle, M. G. (1984) The effect of four terrestrial herbicides on the productivity of artificial stream algal communities. Journal of Environmental Quality 13: 75-82.

Kurepa, J., Smalle, J., Montagu, M. V. and Inzé, D. (1998) Polyamines and paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology 39: 987-992.

Rainowitch, H. D., Privalle, C. T. and Freidovich, I. (1987) Effects of paraquat on the green alga *Dunaliella salina*: protection by the mimic of superoxide dismutase, desferal-Mn (IV). Free Radical Biology and Medicine 3: 125-131.

Sáenz, M. E., Alberdi, J. L., Di Marzio, W. D., Accorinti, J. and Tortorelli, M. C. (1997) Paraquat toxicity to different green algae. Bulletin Environment Contamination Toxicology 58: 922-928.

Shariati, M. and Lilley, R. M. (1994) Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure–subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. Plant Cell and Environment 17: 1295-1304.

Slade, P. and Bell, E. G. (2006) The movement of paraquat in plants. Weed Research 6: 267-274.

Smirnoff, N. (1995) Smirnoff, N. (1995). Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Environment and plant metabolism, flexibility and acclimation (ed. Smirnoff, N.) 217-243. Bios Scientific Publishers, Oxford.

Stevens, J. T. and Sumner, D. D., (1991) Classes of pesticides. In: Herbicides in handbook of pesticide toxicology (eds. Hayes, W. J. and Law, E. R.). vol. 3. Academic Press, New York.

Streb, P. and Feierabend, J. (1999) Significance of antioxidants and electron sinks for the cold-hardening-induced resistance of winter rye leaves to photo-oxidative stress. Plant, Cell and Environment 22: 1225-1237.

Summers, L. A. (1980) The bipyridium herbicides. Academic Press, New York.

Walker, M. M. and Lawrence, H. K. (1992) EPAS pesticide fact sheet database. Lewis Publishers, Chelsea.

White, A. L. and Jahnke, L. S. (2002) Contrasting effects of UVA and UVB on photosynthesis and photoprotection of β-carotene in two *Dunaliella* spp. Plant Cell Physiology 43: 877-884.

Wise, R. R. and Naylor, A. W. (1987) Chilling- enhanced photooxidation. Plant Physiology 83: 278-282.

Wong, P. K. (2000) Effects of 2, 4-D, glyphosphate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll–a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. Chemosphere 41: 177-182.

# Induction of paraquat tolerance in *Dunaliella* by using some pre-treatments

**Maryam Madadkar Haghjou ***

Department of Biology, Faculty of Sciences, Lorestan University, Khoram abad, Iran

## Abstract

The effect of paraquat as a pestiside, inducer of oxidative stress, has been investigated on a unicellular green alga *Dunalilella* during 24 h, pretreated with 14ºC temperature, Buthionine sulfoximine (BSO) and L-galactonic acid γ-lactone (GAL). High decrease in pigment contents (chlorophylls and β-carotene), fresh weight of the cells and depletion of ascorbate and glutathione pools that was followed by bleaching and dying the cells, were seen after treatment with paraquat under control temperature. Cold pretreatment caused an increase in the fresh weight of the cells and also Chlorophyll a and b contents. In addition, staying high β-carotene content, β-carotene/chl and no depletion of ascorbate and glutathione pools after paraquat treatment were seen. No bleaching was observed in the cold pretreated samples and all suspensions remained green. However, pretreated sample with GAL (ascorbate precursor substrate) in control temperature, showed a big increase in Chl a, b and a small amount of remained reduced ascorbate in a few alive cells, after papraquat treatment, but the complete depletion in glutathione pool, a great increase in oxidized ascorbate and the decrease of cell numbers basically, have been observed and resulted in the bleaching of cell suspension. Pretreatment with BSO (inhibitor of glutathione synthesis) caused bleaching and dying the cells under control temperature after paraquat addition, but it inhibited glutathione increase in cold pretreated cells before adding the paraquat. This pretreatment resulted in keeping the glutathione in low level after adding the paraquat however, this sample remained green. It seems that, cold pretreatment basically and pretreatment with GAL nearly, could induce antioxidant system but the green cell suspensions were seen just in cold pretreated samples under papraquat treatment.

**Key words:** Antioxidant system induction, BSO, Cold pretreatment, *Dunaliella* alga, GAL, Paraquat

* Corresponding Author: madadkar.m@lu.ac.ir