Investigating the Effect of Hydrogen Peroxide on Biomass and Morphophysiological Indices of Microalga *Dunaliella Salina* Pretreated by Four Phytohormones: Auxin, Gibberellin, Cytokinin, and Salicylic Acid

Azin Ghafarizadeh
Department of Biology Plant Physiology, Faculty of Science, Lorestan University, Khoramabad, Iran, ghafarizadeh.az@fs.lu.ac.ir
Maryam Madadkar Haghjou*
Department of Biology Plant Physiology, Faculty of Science, Lorestan University, Khoramabad, Iran, madadkar.m@lu.ac.ir

Abstract

Introduction: Under unfavorable conditions, Reactive Oxygen Species (ROS) are produced inside living cells. Oxidant molecules such as H_2O_2 could be used to study the microorganism responses to oxidative stress. The treatment of algae with phytohormones can improve their physiological indices. In this study, the effect of H_2O_2 on unicellular green alga *Dunaliella salina*, pretreated by IAA (auxin), GA3 (gibberellin), Cyt (cytokinin), and SA (salicylic acid) was studied at three concentrations.

Materials and methods: A 23-days algal culture was treated by phytohormones (in three repetitions) at three concentrations, and two days later (day 25), H_2O_2 (0.1 mM) treatment was performed. Two controls were considered without hormone and without H_2O_2, respectively. Evaluation of the growth and number of cells, fresh and dry weights, cell size (length, width, and volume), Chl *a* and *b*, beta-carotene, soluble carbohydrate, and protein were performed in days 25 and 27.

Results: Hormones in most cases significantly improved the Indices (compared to the hormone-free control sample) ($p < 0.05$). H_2O_2 treatment, two days after pre-treatment with hormones, caused the improvement of indices in most cases, except for protein and beta carotene. In contrast to the protein, the amount of carbohydrate was not sensitive to H_2O_2. The best results were obtained with IAA at medium concentration, GA3 at high concentration, Cyt and SA at low concentration.

Discussion and conclusion: H_2O_2 positively influenced the effects of the four phytohormones on algae cells, especially in relation to increased algal biomass and cell division. The positive effect of H_2O_2 treatment on both pretreated with or without hormones was probably due to its concentration which was lower than the toxicity level. Therefore, algal cells have benefited more from the useful and signaling effects of this molecule.

Key words: Beta Carotene, Biomass, Hydrogen Peroxide, *Dunaliela Salina*, Phytohormone

* Corresponding author
Received: March 18, 2020/ **Accepted:** May 30, 2020

فصل‌نامه زیست شناسی میکروارگانیسم ها
معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه اصفهان
سال نهم، شماره ۳٤، تابستان ۱۳۹۹، صص ۸۷-۱۰٤
نوع مقاله: پژوهشی
تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۱۲/۲۸ ، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۰
Doi: 10.22108/BJM.2020.122183.1285

بررسی تأثیر پراکسیدهیدروژن بر زیست‌توده و شاخص‌های مورفوفیزیولوژیک میکروجلبک *Dunaliella salina* پیش‌تیمارشده با چهار تنظیم‌کنندهٔ رشد گیاهی اکسین، جیبرلین، سیتوکینین و سالیسیلیک‌اسید

آذین غفاری‌زاده: دانشجوی دکتری گروه زیست‌شناسی، فیزیولوژی گیاهی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران ، ghafarizadeh.az@fs.lu.ac.ir
مریم مددکار حق‌جو*: استادیار گروه زیست‌شناسی، فیزیولوژی گیاهی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، madadkar.m@lu.ac.ir

چکیده

مقدمه: در شرایط نامساعد محیطی، رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در سلول‌های زنده تولید می‌شوند. مولکول‌های اکسیدکننده نظیر H_2O_2 در بررسی پاسخ موجودات زنده به تنش اکسیداتیو کاربرد دارند. تیمار جلبک‌ها با فیتوهورمون‌ها سبب بهبود شاخص‌های فیزیولوژیک آنها می‌شود. در مطالعهٔ حاضر، تأثیر H_2O_2 بر جلبک سبز تک‌سلولی *Dunaliella salina* پیش‌تیمارشده با فیتوهورمون‌های IAA (اکسین)، GA_3 (جیبرلین)، Cyt (سیتوکینین) و SA (سالیسیلیک‌اسید) بررسی شد.

مواد و روش‌ها: کشت‌های ۲۳ روزهٔ جلبک در سه تکرار در معرض تیمار فیتوهورمون‌ها (هریک در سه غلظت) قرار گرفتند و دو روز بعد (روز ۲۵)، تیمار H_2O_2(۰/۱ میلی‌مولار) انجام شد. دو نمونهٔ شاهد به‌ترتیب بدون فیتوهورمون و بدون H_2O_2 در نظر گرفته شدند. ارزیابی شاخص‌های رشد و تعداد سلول‌ها، وزن تر و خشک، ابعاد سلولی (طول، عرض و حجم)، کلروفیل *a*، *b* و بتاکاروتن، کربوهیدرات محلول و پروتئین در روزهای ۲۵ و ۲۷ انجام شدند.

نتایج: در اغلب حالت‌ها، فیتوهورمون‌ها به‌طور معنادار ($P<0.05$) سبب بهبود شاخص‌ها نسبت به نمونهٔ شاهد بدون فیتوهورمون شدند. تیمار با H_2O_2 دو روز پس‌از پیش‌تیمار با فیتوهورمون‌ها سبب بهبود همهٔ شاخص‌ها در بیشتر غلظت‌ها به‌جز مقدار پروتئین و بتاکاروتن شد. برخلاف پروتئین، مقدار کربوهیدرات به تیمار H_2O_2 حساس نبود. بهترین نتایج را IAA در غلظت متوسط، GA_3 در غلظت زیاد، Cyt و SA در غلظت کم موجب شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: تأثیرگذاری مثبت H_2O_2 سبب بهبود و افزایش آثار مثبت فیتوهورمون‌ها بر سلول‌های جلبک و به‌ویژه دررابطه‌با افزایش زیست‌تودهٔ جلبکی و تقسیم‌های سلولی شد. احتمالاً تأثیر مثبت تیمار H_2O_2 بر اغلب شاخص‌ها در نمونه‌های پیش‌تیمارشده با فیتوهورمون و بدون آن به‌علت غلظت کمتر از حد سمیت آن است؛ بنابراین، به نظر می‌رسد سلول‌های جلبکی بیشتر از ویژگی‌های مفید و علامت‌دهی این مولکول بهره‌مند می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: بتاکاروتن، زیست‌توده، پراکسیدهیدروژن، *Dunaliella salina*، فیتوهورمون

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

جلبک‌ها به گروه بسیار بزرگ و متنوعی از ریزموجودات سادهٔ فتواتوتروف تعلق دارند (۱) که بیش از ۵۰ درصد کل تولیدات اولیه و پایهٔ زنجیرهٔ غذایی جهان را تأمین می‌کنند (۲). جنس *Dunaliella*، جلبک سبز تک‌سلولی بدون دیواره (Wall-less) و اغلب ویژهٔ آب‌های شور است (۳) که غنی از متابولیت‌های ارزشمند شامل کاروتنوئیدها (به‌ویژه بتاکاروتن)، ویتامین‌ها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و لیپیدهاست (۲ و ۴).

تنش‌های محیطی سبب اختلال در فرایندهای متابولیسمی و موجب کاهش بازده و تولید ترکیبات آلی در تولیدکنندگان و موجودات فتواتوتروف می‌شوند (۵). تنش اکسیداتیو (Oxidative stress) یکی از مهم‌ترین تنش‌هایی است که مدنظر بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است و به‌شکل تنش ثانویه در تنش‌های متعدد اتفاق می‌افتد (۶–۸). رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) بر اثر تنش‌های محیطی مختلف تولید می‌شوند و سبب بروز آسیب اکسیداتیو و درنهایت، مرگ سلول می‌شوند؛ اما نقش دیگری نیز برای ROS تعریف شده است و آن، عملکرد مفید این مولکول‌ها به‌شکل مولکول‌های علامت در پیام‌رسانی و آماده‌سازی سلول‌ها برای واکنش در برابر تنش است (۹). مولکول H_2O_2 یکی از مولکول‌های مهم با نقش دوگانه است و ازآنجاکه پایداری بیشتری نسبت به سایر رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد، در آزمایش‌های مختلف به‌منظور بررسی نقش‌های مثبت و منفی رادیکال‌های آزاد در متابولیسم و حیات موجودات زنده به‌طور تیمار خارجی (Exogen) استفاده می‌شود (۱۰). گزارش‌هایی از تأثیر H_2O_2 روی جلبک‌ها در بررسی میزان حساسیت جلبک به آن و تأثیر تنش بر حیات و فرایندهای متابولیسمی جلبک‌ها وجود دارند (۱۱ و ۱۲).

فیتوهورمون‌ها یا تنظیم‌کننده‌های رشد نقش‌های بسیار مهمی در علامت‌دهی و تنظیم فرایندهای درون‌سلولی و بافتی بر عهده دارند و اگرچه این هورمون‌ها در جلبک‌ها یافت می‌شوند (۱۳ و ۱۴)، تیمار جلبک‌ها با فیتوهورمون‌های طبیعی یا مصنوعی نتایج خوبی در پی داشته است. در مطالعه‌های یادشده، بهبود شاخص‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک جلبک‌ها، کاهش هزینه‌های تولید زیست‌توده و افزایش زیست‌پذیری اقتصادی جلبک‌ها بر اثر تیمار جلبک‌ها با فیتوهورمون‌ها حاصل شده است (۲، ۷ و ۱۵) و درحقیقت، استحصال مواد و ترکیبات مفید و ارزشمند درون‌سلولی از میکروجلبک‌های تک‌سلولی نظیر *Dunaliella* همواره مدنظر دانشمندان بوده است و ازاین‌رو، تیمارهای تحریک‌کنندهٔ آنها به‌طور مداوم بررسی شده‌اند (۴، ۶ و ۱۶). گام اول در افزایش تولیدات یادشده، افزایش زیست‌تودهٔ سلولی و بنابراین، تحریک رشد و تقسیم سلولی در سوسپانسیون سلولی جلبک است؛ به‌همین‌علت، آزمایش‌های بسیاری برای تحریک رشد و افزایش زیست‌تودهٔ سلول‌ها انجام و تیمارهای بسیاری در این زمینه بررسی شده‌اند (۲، ۱۷ و ۱۸).

فیتوهورمون اکسین در رشد و توسعهٔ سلول‌ها، تقسیم سلولی و تمایز سلول‌ها نقش دارد (۱۹). نقش جیبرلین‌ها در تحریک تقسیم و توسعهٔ سلولی و افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی خلاصه می‌شود (۲ و ۲۰). سیتوکینین‌ها، فیتوهورمون‌هایی هستند که بر عملکرد دستگاه فتوسنتزی از طریق تنظیم سرعت فتوسنتز، تمایز کلروپلاست‌ها، بیوسنتز کلروفیل

و آنزیم‌های فتوسنتزی، جلوگیری از تخریب و تجزیهٔ کلروفیل اثر می‌گذارند (۴ و ۲۱). سالیسیلیک‌اسید از گروه ترکیبات فنولیکی است که امروزه مادهٔ شبه‌هورمونی محسوب می‌شود و در بسیاری از فرایندهای زیستی ازجمله نفوذپذیری غشا، کاهش نشت یونی، سرعت رشد، فتوسنتز، تنفس، گلیکولیز، سنتز اتیلن و ایجاد مقاومت نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارد (۲۰) و می‌تواند با تأثیر بر متابولیت‌هایی نظیر آسکوربیک‌اسید، گلوتاتیون و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از آثار ناشی از تنش بکاهد (۶ و ۲۲).

مشخص شده است توانایی فیتوهورمون‌ها در بهبود رشد و بیوسنتز میکروجلبک‌ها به غلظت آنها وابسته است و مؤثرترین غلظت‌ها در گزارش‌های مختلف با یکدیگر تفاوت دارند؛ چنین تفاوتی می‌تواند به‌علت تفاوت‌های فیزیولوژیک انواع مختلف میکروجلبک‌ها، شرایط رشد و مراحل رشد و نموی آنها باشد (۲۳).

در مطالعهٔ حاضر، چهار فیتوهورمون اکسین (IAA)، جیبرلین (GA3)، سیتوکینین (Cyt) و سالیسیلیک‌اسید (SA) (هریک در سه غلظت) برای پیش‌تیمار سوسپانسیون سلولی جلبک *Dunaliella* استفاده شدند و دو روز پس‌از تیمار، تأثیر هورمون‌ها بر بهبود احتمالی برخی از شاخص‌های فیزیولوژیک جلبک ازجمله تعداد سلول‌ها، زیست‌تودهٔ جلبک و تولید برخی متابولیت‌ها سنجیده و با نمونهٔ بدون هورمون (شاهد) مقایسه شد؛ سپس سوسپانسیون‌های سلولی حاوی هورمون و بدون آن در معرض تیمار H_2O_2 قرار گرفتند و آثار احتمالی مثبت و منفی این مولکول اکسیدان بر شاخص‌های فیزیولوژیک رشد و تولید متابولیت‌هایی نظیر کربوهیدرات‌ها، پروتئین و رنگدانه‌های جلبک (شامل کلروفیل‌ها و بتاکاروتن) در هر دو نمونهٔ دارای هورمون و بدون هورمون (شاهد) بررسی و مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی محیط کشت جلبک و طراحی تیمارها: جلبک *Dunaliella salina* از مجموعهٔ جلبکی دانشگاه اصفهان تهیه شد و تمام مواد شیمیایی لازم برای تهیهٔ محیط کشت جلبک‌ها از شرکت‌های سیگما یا مرک تهیه شدند. محیط کشت جانسون[1] (۲۴) که شریعتی[2] و لیلی[3] آن را تغییر داده‌اند (۲۵) با استفاده از پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات (۰/۲ میلی‌مولار)، پتاسیم‌نیترات (۵ میلی‌مولار)، سولفات‌منیزیم (۵ میلی‌مولار)، کلرید کلسیم (۰/۲ میلی‌مولار)، کلریدآهن (III) (۲ میکرومولار)، اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسیددی سدیم (۵ میکرومولار)، کلریدسدیم (۱ مولار)، کلریدکبالت (۱ میکرومولار)، کلریدمنگنز (۷ میکرومولار)، کلریدروی (۱ میکرومولار)، آمونیوم‌هپتامولیبدات (۱ میکرومولار)، کلریدمس (۱ میکرومولار)، بیکربنات‌سدیم (۴ گرم‌درلیتر) در اسیدیتهٔ ۷ و شرایط استریل تهیه شد.

مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت آماده‌شده در شرایط کاملاً استریل به ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری اتوکلاوشده منتقل شد. تلقیح سلول‌های جلبک در ارلن‌مایرها به‌شکلی انجام شد که حدود ۳×۱۰^{۵} سلول در هر میلی‌لیتر از محیط کشت جدید را فراهم کند؛ سپس ارلن‌های حاوی جلبک به‌مدت چهار هفته در دمای ۲±۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد، شرایط نوری ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه، دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. ۲۳ روز پس‌از

کشت، ارلن‌های حاوی جلبک‌ها با یکی از سه غلظت فیتوهورمون‌های اکسین (۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ نانومولار) (۷)، جیبرلین (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام) (۲۶)، سیتوکینین (۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ نانومولار) (۲۶) و سالیسیلیک‌اسید (۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار) (۲۷) تیمار شدند و این تیمار به‌مدت دو روز ادامه یافت. نمونهٔ بدون هورمون، شاهد در نظر گرفته شد. در روز ۲۵ کشت، افزودن H_2O_2 (آب‌اکسیژنهٔ صنعتی ۳۰ درصد، چگالی ۱/۱۱ گرم‌برسانتی‌مترمکعب در دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد) با غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار به تمام ارلن‌های حاوی هورمون و نمونهٔ بدون هورمون (شاهد) انجام شد و دوباره تمام ارلن‌ها به‌مدت دو روز در شرایط رشد با مشخصات یادشده قرار گرفتند. نمونه‌برداری به‌منظور سنجش و ارزیابی شاخص‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک در روز ۲۵ کشت (پیش‌از اعمال تنش H_2O_2) و روز ۲۷ (دو روز پس‌از اِعمال تنش H_2O_2) در شرایط کاملاً استریل انجام شد. به‌منظور استخراج ترکیبات درون‌سلولی جلبک، سه مرتبه از دستگاه سونیکیاتور (مدل SONIC 4D، شرکت جیمز انگلستان) و هر بار به‌مدت ۲ دقیقه در ۸۰ هرتز و ورتکس در مجاورت گلوله‌های شیشه‌ای کوچک استفاده شد (۲۸). غلظت پراکسیدهیدروژن بر اساس برخی پیش‌آزمون‌ها به‌شکلی تعیین شد که تا حد امکان تأثیر کشندگی بر سوسپانسیون جلبکی نداشته باشد (۲۹ و ۳۰).

شمارش سلولی: بلور ید برای ثابت‌کردن سلول‌ها استفاده شد و شمارش سلول‌ها با لام آینه‌ای هموسایتومتر و استفاده از میکروسکوپ نوری (با بزرگ‌نمایی ۴۰۰×) انجام شد. نتایج بر حسب تعداد سلول × 10^6 در میلی‌لیتر گزارش شدند (۳۱).

ارزیابی ابعاد و حجم سلول: روش ویدئو میکروسکوپی برای این مطالعه استفاده و میانگین طول و عرض ۱۰ سلول به‌طور تصادفی ارزیابی شد؛ سپس حجم سلول از رابطهٔ و بر حسب میکرومترمکعب به دست آمد (۳۲).

رابطهٔ ۱ $V=3/4\pi ab^2$

V: حجم سلول، a: $\frac{1}{2}$ طول سلول، b: $\frac{1}{2}$ عرض سلول

اندازه‌گیری وزن تر و خشک جلبک: به‌منظور اندازه‌گیری وزن تر جلبک، حجم همگنی از سوسپانسیون سلولی به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۵۰۰g سانتریفیوژ (مدل 16-4KS، شرکت سیگما آلمان) شد و برای حذف هر گونه نمک، سطح زیست‌تودهٔ تر جلبک سه بار با آب دوبارتقطیر شستشو و پس‌از خارج‌شدن کامل محلول رویی، توزین شد. به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک، زیست‌تودهٔ تر حاصل به‌مدت ۸ ساعت در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد درون آون خشک قرار گرفت و سپس توزین شد. وزن تر و خشک بر اساس میکروگرم بر 10^6 سلول گزارش شدند.

سنجش رنگدانه‌های فتوسنتزی: استخراج رنگدانه‌های کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و بتاکاروتن بر اساس روش ایجکلهوف[۴] و دکر[۵] (۳۳) و با استفاده از حلال استون ۸۰ درصد انجام شد. جذب نمونه‌ها با دستگاه میکروپلیت‌ریدر (مدل Epoch، شرکت بیوتک انگلستان) خوانده شد و نتایج با استفاده از روابط ۲، ۳ و ۴ محاسبه و بر حسب میکروگرم بر 10^6 سلول گزارش شدند.

رابطهٔ ۱ $C_a= -1.709\ A_{412}+ 11.970\ A_{431}- 2.998\ A_{460}- 5.708\ A_{480}$

رابطهٔ ۲ $C_b= -0.171\ A_{412}- 0.230\ A_{431}+ 11.871\ A_{460}- 13.248\ A_{480}$

رابطهٔ ۳ $C_c= -0.430\ A_{412}+ 0.251\ A_{431}- 4.376\ A_{460}+ 13.216\ A480$

C_a: غلظت کلروفیل *a*، C_b: غلظت کلروفیل *b*، C_c: غلظت بتاکاروتن

سنجش میزان کربوهیدرات محلول کل: ابتدا سوسپانسیون سلولی به‌مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۳۵۰۰ سانتریفیوژ (مدل 16-4KS، شرکت سیگما، آلمان) و سپس محلول رویی تخلیه شد. به‌منظور حذف تداخل رنگدانه‌ها، ابتدا استون ۱۰۰ درصد افزوده و سپس سانتریفیوژ به‌مدت ۱۵ دقیقه در g ۱۳۵۰۰ انجام شد (۳۴). رسوب برداشت‌شده سه بار در اتانول ۸۰ درصد فریز-ذوب-سونیک و ورتکس و دوباره سانتریفیوژ شد. پس‌از جداسازی مایع رویی، رسوب باقیمانده با اتانول هموژن شد و پس‌از ورتکس و سانتریفیوژ، مایع رویی جدا و با محلول به‌دست‌آمده از مرحلهٔ پیش مخلوط شد؛ سپس از طریق روش آنترون بر اثر واکنش با سولفوریک‌اسید (۷۲ درصد) در گرما (۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد) سنجش شد (۳۵). میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Epoch شرکت بیوتک، کشور انگلستان) خوانده و از گلوکز خالص برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. نتایج بر حسب میلی‌گرم‌برگرم وزن خشک جلبک گزارش شدند.

سنجش پروتئین محلول: مقدار پروتئین بر اساس روش برادفورد[۶] (۳۶) و با استفاده از پروتئین آلبومین گاوی (استاندارد) سنجیده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه میکروپلیت‌ریدر (مدل Epoch، شرکت بیوتک انگلستان) خوانده شد. نتایج بر حسب میلی‌گرم‌برگرم وزن تر جلبک گزارش شدند.

تجزیه‌وتحلیل آماری: تمام آزمون‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. محاسبه‌های داده‌ها و ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Excel، نسخهٔ ۲۰۱۶ و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) به کمک نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین دانکن (Duncan) در سطح احتمال $P<۰/۰۵$ انجام شد.

نتایج

نتایج تحلیل واریانس داده‌ها نشان‌دهندهٔ معناداربودن ($P<۰/۰۵$ و $P<۰/۰۱$) آثار اصلی عوامل تیمار یعنی هورمون و پراکسیدهیدروژن و معنادارنبودن آثار متقابل به معنای وجودنداشتن اختلاف معنادار میان نمونه‌های پیش‌تیمارشده با هورمون (در سه غلظت) تحت‌تأثیر پراکسیدهیدروژن بودند. تفاوت‌های معنادار میان غلظت‌های مختلف از طریق آزمون چنددامنهٔ دانکن مشخص شدند (جدول‌های ۱ و ۲).

جدول ۱- میانگین مربعات جدول تجزیه واریانس شاخص‌های ارزیابی‌شدهٔ جلبک *D. salina* بر اثر تیمارهای فیتوهورمون و پراکسیدهیدروژن

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات					
		تعداد سلول	طول سلول	عرض سلول	حجم سلول	وزن تر	وزن خشک
فیتوهورمون	۳	۱۸/۱۱۵**	۳/۴۹۳**	۰/۸۸۲**	۱۳۶۱۰/۹۰۵**	۱۶۰۴۲/۷۰۸**	۱۸۲/۴۷۰*
پراکسیدهیدروژن	۱	۲۵/۶۲۹**	۱۵/۸۰۱**	۳/۰۱۰**	۴۴۹۷/۷۹۳**	۱۸۳۲۷/۲۸۶**	۱۷۹۲/۰۵۹**
فیتوهورمون×پراکسیدهیدروژن	۳	۰/۳۵۴^{ns}	۰/۳۲۸^{ns}	۰/۲۲۸^{ns}	۷۷۷/۳۴۶^{ns}	۸۷۶/۴۵۹^{ns}	۱۱۵/۰۰۰^{ns}

خطا	۵۶	۲/۹۵۸	۰/۸۲۸	۰/۱۴۹	۱۸۷۴/۷۲۶	۲۴۸۲/۲۳۴	۱۴۳/۵۲۲
مجموع	۶۴						

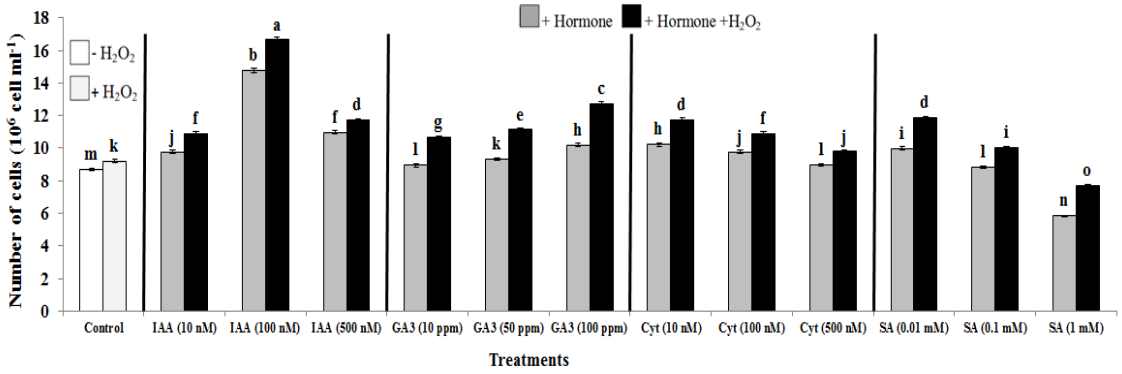
ns، * و ** به‌ترتیب وجودنداشتن اختلاف معنادار، وجود اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می‌دهند.

جدول ۲- میانگین مربعات جدول تجزیه واریانس شاخص‌های ارزیابی‌شدهٔ جلبک *D. salina* بر اثر تیمارهای فیتوهورمون و پراکسیدهیدروژن

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات					
		کلروفیل *a*	کلروفیل *b*	کلروفیل کل	بتاکاروتن	کربوهیدرات محلول	پروتئین
فیتوهورمون	۳	۰/۰۱۹**	۰/۰۰۳**	۰/۰۳۷**	۰/۰۰۱ ^{ns}	۱۸/۰۶۷ **	۱۳/۶۱۵ **
پراکسیدهیدروژن	۱	۰/۰۶۲**	۰/۰۰۶*	۰/۱۰۶**	۰/۰۰۲ ^{ns}	۷۶/۶۹۵**	۲۷۸/۸۰۹**
فیتوهورمون×پراکسیدهیدروژن	۳	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۲ *	۰/۰۵۰ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۷۳۳ ^{ns}	۵/۳۷۳ ^{ns}
خطا	۵۶	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱	۷/۳۶۴	۴/۶۸۸
مجموع	۶۴						

ns، * و ** به‌ترتیب وجودنداشتن اختلاف معنادار، وجود اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می‌دهند.

تاثیر تیمارها بر تعداد سلول‌ها در سوسپانسیون *Dunaliella*: در تمام تیمارها به‌جز غلظت زیاد SA، تیمار سوسپانسیون‌های سلولی جلبک *D. salina* با هورمون‌ها سبب افزایش تعداد سلول‌ها شد و بیشترین تعداد سلول‌ها در غلظت متوسط IAA به دست آمد که افزایش تقریباً دو برابری را نسبت به نمونهٔ شاهد نشان داد (شکل ۱).

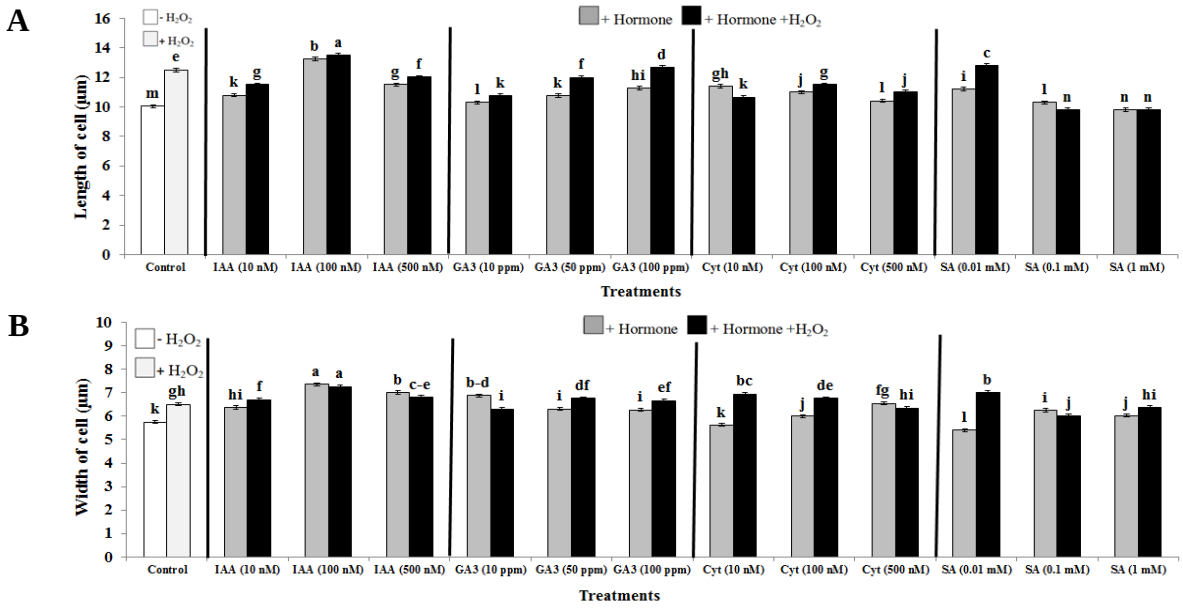


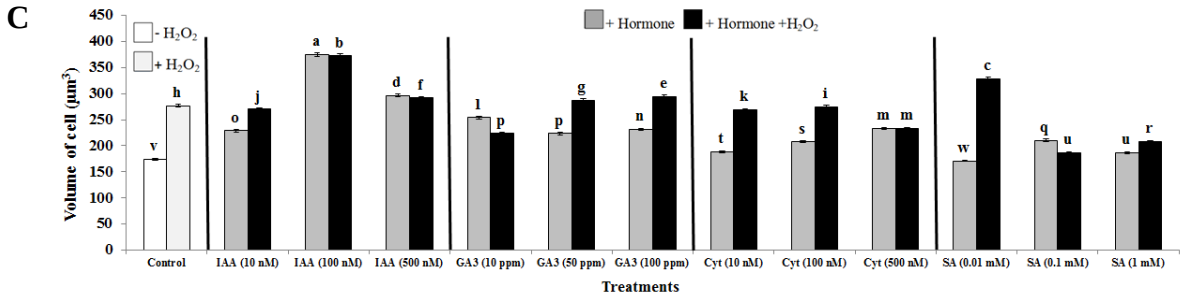
شکل ۱- تعداد سلول بر میلی‌لیتر در سوسپانسیون سلولی جلبک *D. salina* در شرایط: H_2O_2-) نمونهٔ شاهد بدون پراکسیدهیدروژن، H_2O_2+) نمونهٔ شاهد دو روز پس‌از تیمار پراکسیدهیدروژن، Hormone+) حاوی سه غلظت (کم، متوسط و زیاد) از هورمون‌های IAA (اکسین)، GA_3 (جیبرلین)، Cyt (سیتوکینین) و SA (سالیسیلیک‌اسید)، Hormone+H_2O_2+) دو روز پس‌از پیش‌تیمار با هورمون‌ها به‌علاوهٔ تیمار پراکسیدهیدروژن. مقادیر میانگین سه تکرار± SD هستند. حرف‌های متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنادار در سطح $P<۰/۰۵$ بر اساس آزمون دانکن هستند.

افزودن H_2O_2 به نمونهٔ شاهد و نمونه‌های حاوی هورمون‌ها (دو روز پس‌از اِعمال تیمارهای هورمونی) سبب تحریک بیشتر تقسیم سلولی در تمام سوسپانسیون‌ها شد. صرفاً سوسپانسیون‌های حاوی Cyt و SA با افزایش غلظت هورمون از کم به زیاد، روند کاهشی را در تعداد سلول‌هایشان نشان دادند و تعداد

سلول‌ها در هر دو حالت H_2O_2+ و H_2O_2– کاهش یافت؛ اما در سایر حالت‌ها، تعداد سلول‌ها افزایش یافت. تیمار با هورمون‌ها و نیز H_2O_2 سبب افزایش تعداد سلول‌ها در سوسپانسیون شد، ولی سوسپانسیون‌هایی که هورمون دریافت کرده بودند، پس‌از افزودن H_2O_2 دارای تعداد سلول بر میلی‌لیتر بیشتری شدند و بسته به غلظت هورمون، میزان تحریک تقسیم سلولی نیز متفاوت بود.

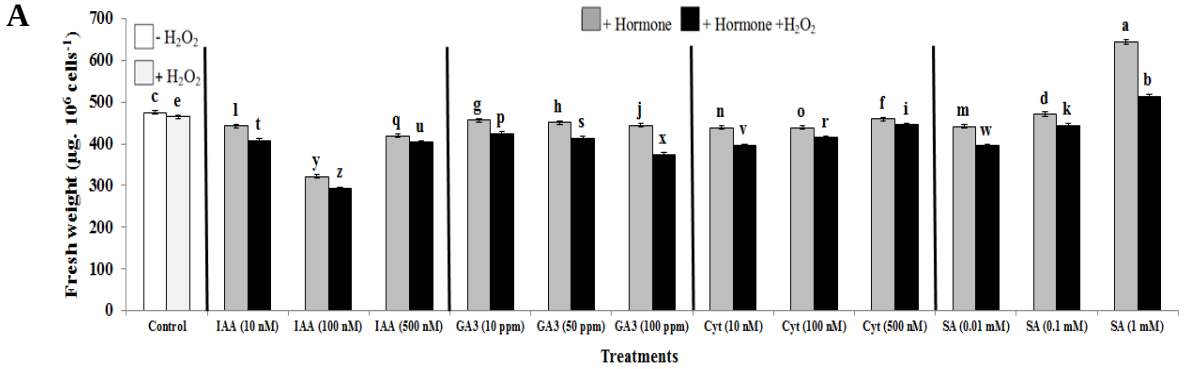
تأثیر تیمارها بر اندازه و ابعاد سلول: تیمار سوسپانسیون سلولی جلبک *Dunaliella* با هورمون‌های IAA، GA_3 و Cyt در تمام غلظت‌ها سبب افزایش معنادار ($P<0.05$) طول، عرض و حجم سلول‌ها در مقادیر متفاوت شد (به‌ترتیب شکل ۲، A، B و C)، اما بیشترین میزان افزایش حجم در غلظت متوسط هورمون IAA (۱۰۰ نانومولار) به میزان ۱۱۵ درصد نسبت به نمونهٔ شاهد مشاهده شد؛ از سوی دیگر، افزودن H_2O_2 به سوسپانسیون تیمارشده با کمترین غلظت SA سبب افزایش طول و عرض سلول‌ها به‌ترتیب به میزان ۱۴/۲ و ۲۹/۶ درصد شد و بنابراین، حجم سلول‌ها را به میزان ۹۱/۸ درصد افزایش داد؛ درحالی‌که غلظت‌های بیشتر SA، آنها را کاهش دادند. افزودن پراکسیدهیدروژن به نمونهٔ شاهد سبب افزایش طول، عرض و بنابراین، حجم سلول‌ها به میزان به‌ترتیب ۲۴/۵، ۱۳ و ۶۰ درصد شد و در سایر نمونه‌های حاوی هورمون، افزودن پراکسیدهیدروژن سبب افزایش یا کاهش طول، عرض یا حجم سلول شد؛ هرچند در بیشتر حالت‌ها به‌شکل افزایش نمایان شد.

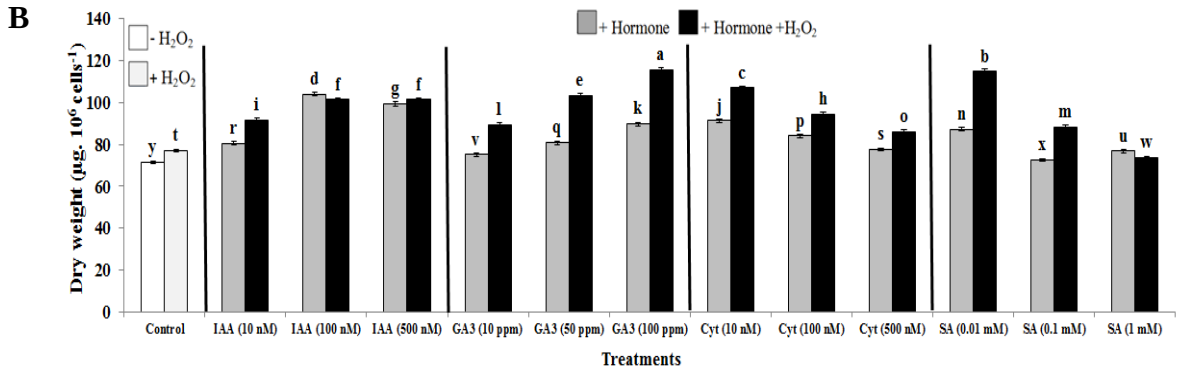




شکل ۲- طول (A)، عرض (B) و حجم (C) سلول جلبک *D. salina* در شرایط: H_2O_2-) نمونهٔ شاهد بدون پراکسیدهیدروژن، H_2O_2+) نمونهٔ شاهد دو روز پس‌از تیمار پراکسیدهیدروژن، Hormone+) حاوی سه غلظت (کم، متوسط و زیاد) از هورمون‌های IAA (اکسین)، GA_3 (جیبرلین)، Cyt (سیتوکینین) و SA (سالیسیلیک‌اسید)، Hormone+H_2O_2+) دو روز پس‌از پیش‌تیمار با هورمون‌ها به‌علاوهٔ تیمار پراکسیدهیدروژن. مقادیر میانگین سه تکرار± SD هستند. حرف‌های متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنادار در سطح $P<۰/۰۵$ بر اساس آزمون دانکن هستند.

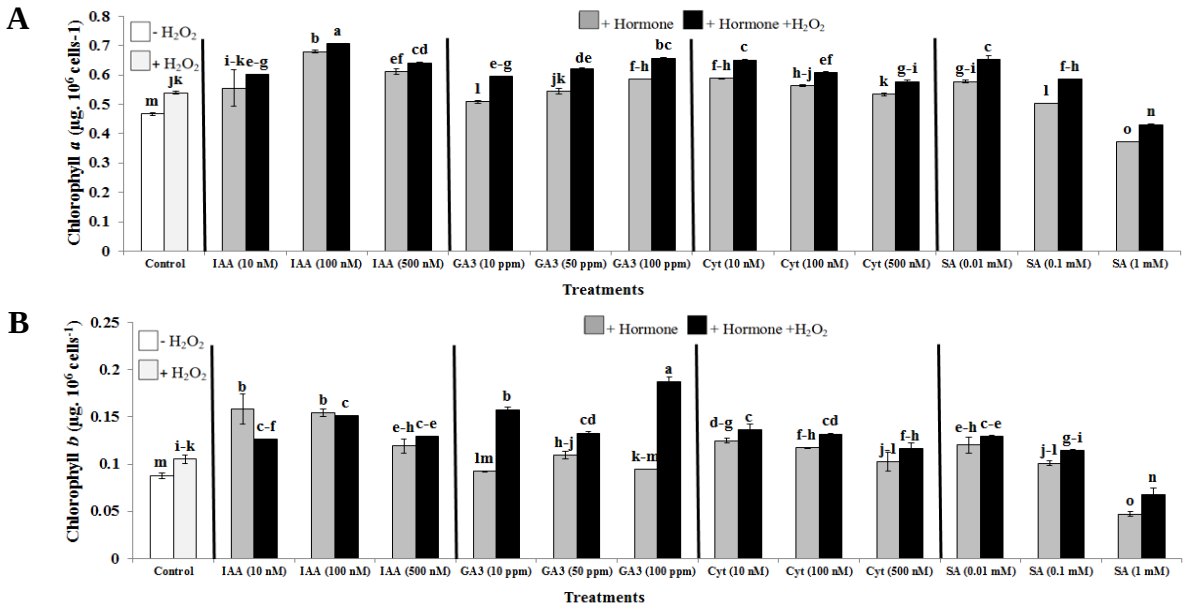
تأثیر تیمارها بر وزن تر و خشک سلول‌ها: مقایسهٔ وزن تر بر حسب میکروگرم در میلیون سلول (شکل ۳، A) با تعداد سلول‌ها (شکل ۱) و نیز با وزن خشک آنها بر حسب میکروگرم بر میلیون سلول (شکل ۳، B) نشان داد تطابق زیادی میان تعداد سلول‌ها بر میلی‌لیتر با وزن خشک سلول‌ها بر حسب میکروگرم بر سلول وجود دارد؛ درحالی‌که وزن تر سلول‌ها با تعداد سلول‌ها رابطهٔ عکس نشان می‌دهد. در غالب حالت‌ها، تیمار با هورمون‌ها سبب کاهش وزن تر نسبت به نمونهٔ شاهد شد؛ درحالی‌که میزان وزن خشک سلول‌ها را افزایش داد. افزودن H_2O_2 به سوسپانسیون‌های حاوی هورمون سبب تحریک تقسیم سلولی در تمام حالت‌ها شد و وزن خشک سلول‌ها را بر حسب میکروگرم بر میلیون سلول افزایش داد و سبب کاهش وزن تر سلول‌ها نسبت به حالت بدون H_2O_2 شد؛ به‌طوری‌که بیشترین میزان وزن تر در بیشترین غلظت SA و کمترین میزان وزن تر در غلظت متوسط IAA مشاهده شد. درمجموع می‌توان گفت تیمار با غلظت‌هایی از هورمون‌ها که سبب تحریک تقسیم سلولی می‌شوند، وزن خشک سلول‌ها را افزایش و وزن تر آنها را کاهش می‌دهد و تیمار با H_2O_2 که سبب تحریک بیشتر تقسیم سلولی می‌شود، وزن خشک سلول‌ها را افزایش می‌دهد، اما وزن تر را نسبت به حالت بدون H_2O_2 کمتر می‌کند.

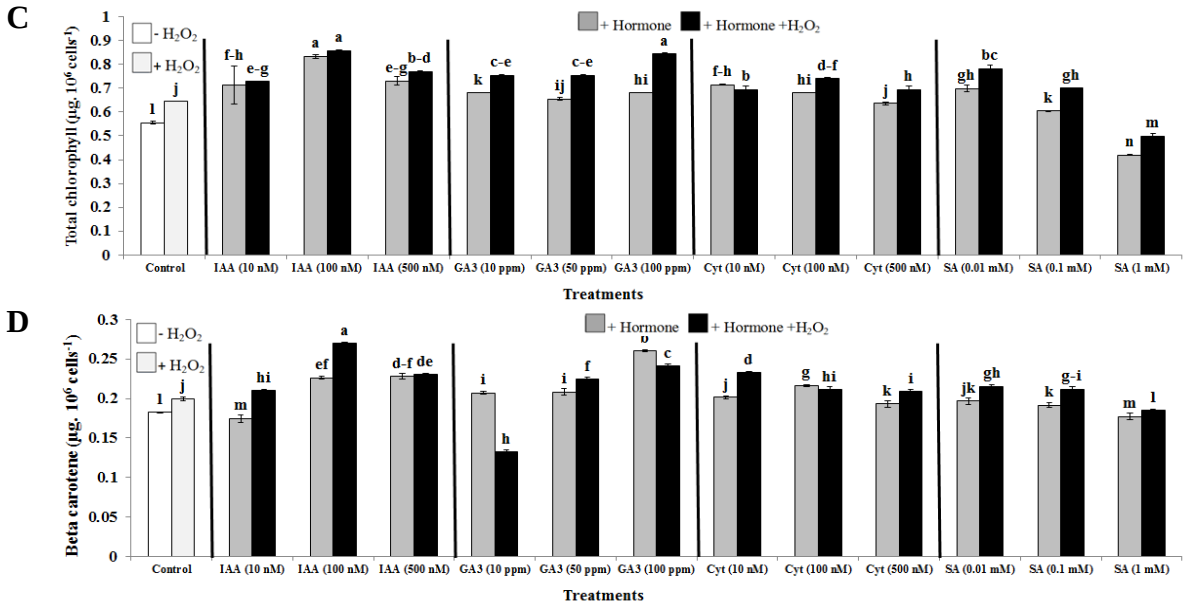




شکل ۳- وزن تر (A) و وزن خشک (B) جلبک *D. salina* در شرایط: H_2O_2-) نمونهٔ شاهد بدون پراکسیدهیدروژن، H_2O_2+) نمونهٔ شاهد دو روز پس‌از تیمار پراکسیدهیدروژن، Hormone+) حاوی سه غلظت (کم، متوسط و زیاد) از هورمون‌های IAA (اکسین)، GA_3 (جیبرلین)، Cyt (سیتوکینین) و SA (سالیسیلیک‌اسید)، Hormone+H_2O_2+) دو روز پس‌از پیش‌تیمار با هورمون‌ها به‌علاوهٔ تیمار پراکسیدهیدروژن. مقادیر میانگین سه تکرار± SD هستند. حرف‌های متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنادار در سطح $P<۰/۰۵$ بر اساس آزمون دانکن هستند.

تأثیر تیمارها بر رنگدانه‌های سلول‌ها: مقدار کلروفیل *a* (شکل ۴، A) نسبت به کلروفیل *b* (شکل ۴، B) همخوانی بیشتری با تغییرات تعداد سلول‌ها نشان داد؛ به‌طوری‌که مقدار آن با تیمارهای هورمونی و نیز با تیمار پراکسیدهیدروژن افزایش یافت. مقدار کلروفیل *b* همخوانی کمتری با تعداد تقسیم‌های سلولی نشان داد و مقدار آن بر اثر تیمار با غلظت زیاد GA_3 با H_2O_2 بیشتر از سایر تیمارها افزایش یافت.



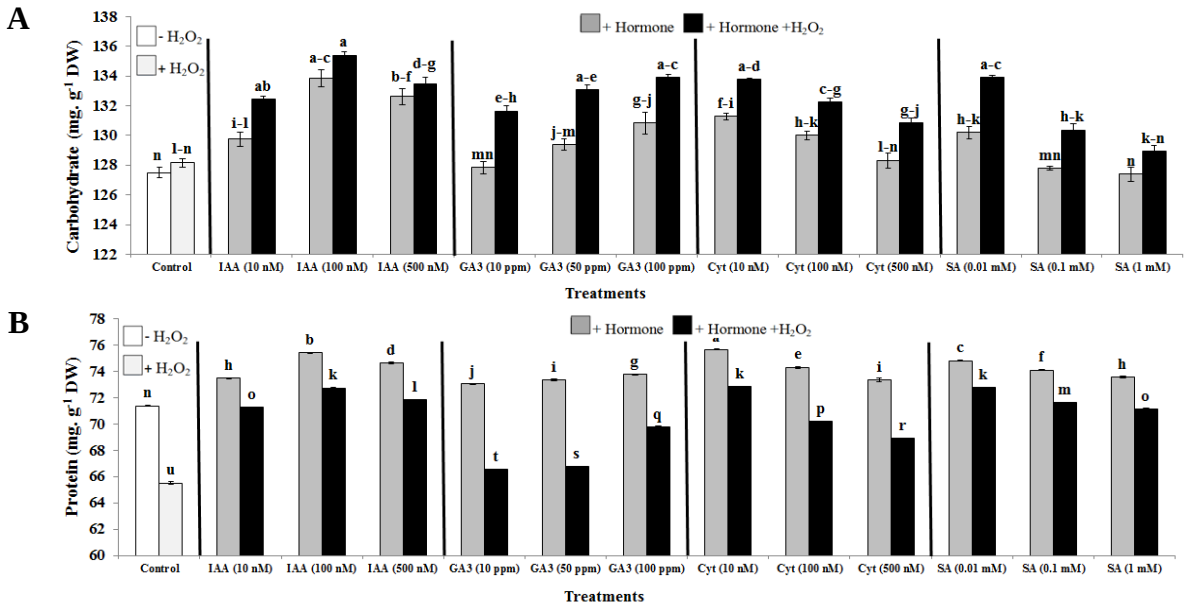


شکل ۴- مقادیر کلروفیل *a* (A)، کلروفیل *b* (B)، کلروفیل کل (C) و بتاکاروتن (D) در جلبک *D. salina* در شرایط: H_2O_2-) نمونهٔ شاهد بدون پراکسیدهیدروژن، H_2O_2+) نمونهٔ شاهد دو روز پس‌از تیمار پراکسیدهیدروژن، Hormone+) حاوی سه غلظت (کم، متوسط و زیاد) از هورمون‌های IAA (اکسین)، GA_3 (جیبرلین)، Cyt (سیتوکینین) و SA (سالیسیلیک‌اسید)، Hormone+H_2O_2+) دو روز پس‌از پیش‌تیمار با هورمون‌ها به‌علاوهٔ تیمار پراکسیدهیدروژن. مقادیر میانگین سه تکرار± SD هستند. حرف‌های متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنادار در سطح $P<۰/۰۵$ بر اساس آزمون دانکن هستند.

تغییرات کلروفیل کل (شکل ۴، C) تطابق بیشتری با کلروفیل *a* داشت و بیشترین مقدار کلروفیل کل و کلروفیل *a* بر اثر تیمار غلظت متوسط IAA، غلظت زیاد GA_3 و کمترین غلظت‌های Cyt و SA با H_2O_2 به دست آمد. درکل، مقدار تولید کلروفیل *a*، کلروفیل *b* و کلروفیل کل بر اثر تیمار با هورمون‌ها و نیز H_2O_2 تحریک شد. اگرچه اندازه‌گیری مقدار بتاکاروتن سلولی (شکل ۴، D) تفاوت معناداری ($P<۰/۰۵$) در اثر کلی هورمون بر مقدار بتاکاروتن در مقایسه با نمونهٔ شاهد بدون هورمون را نشان نداد، تفاوت‌های معناداری ($P<۰/۰۵$) میان تأثیر تیمارها و غلظت‌های مختلف هورمونی مشاهده شدند. بیشترین مقدار بتاکاروتن بر اثر تیمار با هورمون‌های IAA و GA_3 به دست آمد. تیمار سوسپانسیون‌های سلولی با H_2O_2 در غلظت‌های مختلف هورمون نیز در بیشتر نمونه‌ها سبب افزایش و در برخی نمونه‌ها سبب کاهش مقدار بتاکاروتن شد.

تاثیر تیمارها بر کربوهیدرات و پروتئین سلولی:

مقدار کربوهیدرات محلول سلول‌ها (شکل ۵، A) بر اثر تیمار با اغلب غلظت‌های هورمون‌ها افزایش یافت. هورمون IAA در تمام غلظت‌ها توانست مقدار کربوهیدارت سلول‌ها را افزایش دهد؛ درحالی‌که صرفاً غلظت زیاد GA_3 و غلظت‌های کم Cyt و SA توانستند مقدار قند سلول‌ها را افزایش دهند که افزایش وابسته به غلظت هورمون‌ها را نشان می‌دهد. مقدار پروتئین سلول‌ها (شکل ۵، B) بر اثر تیمار با هورمون‌ها در همهٔ حالت‌ها افزایش یافت (مشابه کربوهیدرات)، اما تأثیر H_2O_2 بر میزان قند و پروتئین معکوس بود؛ به‌طوری‌که بر اثر تیمار با H_2O_2، مقدار کربوهیدرات در نمونه‌های حاوی هورمون افزایش و مقدار پروتئین در آنها کاهش یافت. تأثیر H_2O_2 بر نمونهٔ شاهد بدون هورمون به‌شکل کاهش درخور توجه مقدار پروتئین و تغییرنکردن مقدار کربوهیدرات سلول‌ها نمایان شد.



شکل ۵- مقادیر کربوهیدرات محلول (A) و پروتئین (B) در جلبک *D. salina* در شرایط: H_2O_2-) نمونهٔ شاهد بدون پراکسیدهیدروژن، H_2O_2+) نمونهٔ شاهد دو روز پس‌از تیمار پراکسیدهیدروژن، Hormone+) حاوی سه غلظت (کم، متوسط و زیاد) از هورمون‌های IAA (اکسین)، GA_3 (جیبرلین)، Cyt (سیتوکینین) و SA (سالیسیلیک‌اسید)، Hormone+H_2O_2+) دو روز پس‌از پیش‌تیمار با هورمون‌ها به‌علاوهٔ تیمار پراکسیدهیدروژن. مقادیر میانگین سه تکرار± SD هستند. حرف‌های متفاوت بیان‌کنندهٔ تفاوت معنادار در سطح $P<۰/۰۵$ بر اساس آزمون دانکن هستند.

نتیجه‌گیری و بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهندهٔ تأثیر مثبت وابسته به غلظت هورمون‌ها بر تعداد سلول‌ها و تقسیم‌های سلولی بودند و تأثیر H_2O_2 به‌شکل تأثیر فزاینده بر تعداد سلول‌های جلبک *D. salina* در حضور هر چهار هورمون و تمام غلظت‌ها نمایان شد. بر اساس برخی پژوهش‌ها، فیتوهورمون‌ها سبب تحریک تقسیم‌های سلولی در جلبک‌ها می‌شوند و مقدار زیست‌تودهٔ آنها را افزایش می‌دهند (۱۳). افزایش تقسیم‌های سلولی در گیاهان بر اثر استعمال خارجی (Exogen) هورمون‌های اکسین و سیتوکینین مشاهده شده است (۳۷). نتایج برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند پراکسیدهیدروژن در غلظت‌های بیشتر از ۱ میلی‌مولار از طریق ایجاد تنش اکسیداتیو بر فعالیت‌های سلولی تأثیر منفی می‌گذارد؛ اما برخی گزارش‌های دیگر به آثار علامت‌دهی و مثبت آن در غلظت‌های کمتر اشاره کرده‌اند (۱۰). در پژوهش حاضر، H_2O_2 در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار دارای تأثیر مثبت بر هر دو نمونهٔ دارای هورمون و بدون هورمون (نمونهٔ شاهد) به‌شکل تحریک‌کنندگی تقسیم‌های سلولی بود (شکل ۱). برخی پژوهش‌ها در زمینهٔ تأثیر پراکسیدهیدروژن خارجی بر جوانه‌زنی بذرهای نخود و رشد گیاهچهٔ آن نشان داده‌اند H_2O_2 از طریق افزایش مقدار و فعالیت آنزیم‌های اکسیدکنندهٔ آسکوربات سبب رشد طولی هیپوکوتیل نخود می‌شود و با تخفیف آثار هورمون ABA سبب تسریع رشد و تقسیم‌های سلولی ریشه‌چه، جوانه‌زنی بذر نخود و وزن تر بذرها می‌شود؛ درحالی‌که نمی‌تواند از آثار ممانعت‌کنندگی ABA بر درصد جوانه‌زنی و طویل‌شدن کولئوپتیل بکاهد (۳۸ و

۳۹). برخی دیگر از آزمایش‌ها به دخالت H_2O_2 در تنظیم آنزیم شبه‌پروتئین‌کیناز فعال‌کنندهٔ میتوز (MAPK) اشاره کرده‌اند که دال بر نقش علامت‌دهی این مولکول است (۳۹).

بر اساس گزارش‌ها، برخی هورمون‌ها نظیر IAA، Cyt و GA_3 می‌توانند اندازهٔ سلول‌ها را افزایش دهند (۱۹، ۴۰ و ۴۱). در پژوهش حاضر، تیمار خارجی هورمون‌های IAA، GA_3 و Cyt در تمام حالت‌ها و SA در برخی حالت‌ها سبب افزایش اندازه و حجم سلول‌های جلبک شد (شکل ۲)؛ در این میان، هورمون IAA در غلظت متوسط خود سبب بیشترین افزایش طول، عرض و حجم سلول‌های میکروجلبک *D. salina* شد. بر اساس اطلاعات موجود، افزایش اندازه و طویل‌شدن سلول‌ها از طریق اکسین به فرضیهٔ رشد اسیدی و تأثیر این هورمون در گسترش میکروفیبریل‌های سلولزی دیواره باز می‌گردد؛ باوجوداین، سلول میکروجلبک *D. salina* بدون دیواره است و ازاین‌رو، احتمال می‌رود استعمال خارجی هورمون IAA بتواند از آثار خود نظیر تحریک فعالیت پمپ‌های پروتون غشا، کانال‌های پتاسیم یا سایر گیرندگان غشایی جلبک برای ارسال علامت به داخل سلول و درنتیجه، تحریک افزایش اندازهٔ سلول بهره گیرد (۱۹). برخی پژوهش‌ها، تغییر نفوذپذیری غشای جلبک به‌واسطهٔ IAA از طریق فعال‌کردن پمپ‌های پروتون H^+-ATPase غشای پلاسمایی را نشان داده‌اند (۴۲). بر اساس نتایج، تأثیر تیمار H_2O_2 در برخی نمونه‌ها به‌شکل آثار مثبت بر افزایش طول و عرض سلول‌ها نمایان می‌شود که به نظر می‌رسد با آثار علامت‌دهی این مولکول بر تحریک‌کنندگی فرایندهای درون سلولی مرتبط باشد (۱۰)؛ از سوی دیگر، افزایش اندازهٔ سلول می‌تواند مرتبط با افزایش وزن تر یا وزن خشک سلول‌ها در نظر گرفته شود. بررسی میزان وزن تر و خشک سلول‌های میکروجلبک *D. salina* نشان داد در میان همهٔ تیمارهای هورمونی، تیمار غلظت متوسط اکسین سبب ایجاد بیشترین حجم سلولی و بیشترین مقدار وزن خشک سلول‌ها در مقایسه با سایر تیمارها می‌شود (شکل‌های ۲، C و ۳، B)؛ درحالی‌که وزن تر سلول‌ها در شرایط یادشده به مقدار زیادی کاهش می‌یابد (شکل ۳، A) و این نشان می‌دهد افزایش ترکیباتی نظیر کربوهیدرات‌ها، پروتئین و رنگدانه‌های سلول که بر اثر غلظت متوسط اکسین مشاهده می‌شوند (شکل‌های ۴ و ۵)، علت افزایش وزن خشک سلول‌هاست. برخی پژوهش‌ها در زمینهٔ تأثیر اکسین به تحریک ورود آب به درون سلول بر اثر تحریک ورود پتاسیم به‌منظور گسترش و توسعهٔ میکروفیبریل‌های دیوارهٔ سلولزی اشاره کرده‌اند (۴۳– ۴۵)، اما سلول‌های جلبک *Dunaliella* دیواره ندارند و دست‌کم در روز نمونه‌برداری، یعنی دو روز پس‌از اِعمال هورمون‌ها (به‌غیراز غلظت زیاد SA)، وزن تر سلول‌ها کاهش و وزن خشک آنها افزایش یافت؛ به نظر می‌رسد این وضعیت با تحریک تقسیم سلولی از طریق تیمارهای هورمونی و تیمار H_2O_2 مرتبط باشد. بر اساس گزارش‌ها، سلول‌هایی که از فاز رشد و تقسیم به فاز ایستایی می‌روند، وزن خشک خود را افزایش می‌دهند (۴۶)، اما افزایش وزن خشک هم‌گام با افزایش تعداد تقسیم‌ها می‌تواند به معنای بهبود شاخص‌های رشد و وزن خشک باشد.

تیمار با اغلب غلظت‌های هورمون‌های GA_3، Cyt و SA سبب کاهش وزن تر و افزایش وزن خشک شد که این روند بر اثر تیمار با H_2O_2 نیز به همین شکل ادامه یافت؛ این اطلاعات گویای تأثیر مثبت هورمون‌های

یادشده بر بیوسنتز مواد و ترکیبات درون‌سلولی است. در مطالعه‌ای با اعمال خارجی هورمون‌های سیتوکینین و جیبرلین بر گیاه ذرت متوجه شدند با افزایش غلظت هورمون‌ها از ۵۰ به ۱۵۰ میکرومولار، شاخص‌های رشد بذر و گیاهچه بهبود و میزان وزن خشک گیاهچه افزایش می‌یابند (۲۶). در پژوهش حاضر، افزایش غلظت هورمون جیبرلین از کم و متوسط (حدود ۳۰ و ۱۵۰ میکرومولار) به زیاد (حدود ۳۰۰ میکرومولار) سبب بهبود شاخص‌ها و افزایش میزان وزن خشک جلبک شد؛ درحالی‌که افزایش غلظت هورمون سیتوکینین از کم (۱۰ نانومولار) به زیاد (۵۰۰ نانو مولار)، کاهش میزان وزن خشک و سایر ترکیبات را در پی داشت؛ این تفاوت در اثربخشی غلظت‌ها را می‌توان علاوه‌بر نوع هورمون، ناشی از تفاوت میان جلبک‌ها و گیاهان دانست.

مقدار کلروفیل *a* و کلروفیل کل (که بخش اعظم آن کلروفیل *a* است) تحت‌تأثیر تیمار هورمونی و نیز تیمار H_2O_2 در حالت وابسته به نوع و غلظت هورمون افزایش یافتند که تأیید دیگری بر بهبود شرایط متابولیسمی سلول‌هاست (۱۷)؛ اما مقدار کلروفیل *b* نسبت به کلروفیل *a* تغییرات بیشتری را نشان داد. یافته‌ها نشان می‌دهند کلروفیل *b* علاوه‌بر آنکه رنگدانهٔ کمکی است، در تشکیل‌شدن گیرنده‌های نوری و تناسب اندازهٔ گیرنده‌ها با میزان انرژی دریافتی مشارکت دارد (۴۷) و ازاین‌رو می‌تواند در فرایندهایی نقش داشته باشد که سبب تحریک فتوسنتز و تولیدات فتوسنتزی نظیر کربوهیدرات‌ها می‌شوند. میکروجلبک *D. salina* ازنظر تولید بتاکاروتن اهمیت زیادی دارد؛ به‌طوری‌که در برخی شرایط، بتاکاروتن بیشتر از ۱۰ درصد وزن خشک جلبک را شامل می‌شود. تاکنون مطالعه‌ها و پژوهش‌های فراوانی برای یافتن راهکارهای افزایش میزان بتاکاروتن در میکروجلبک‌ها انجام شده‌اند (۲، ۶، ۴۸ و ۴۹). افزایش مقدار بتاکاروتن در برخی غلظت‌های هورمونی که با پراکسیدهیدروژن تیمارشده یا بدون پراکسیدهیدروژن بودند، مشاهده شد؛ اما در نمونه‌هایی، تیمار با H_2O_2 سبب افزایش مقدار این رنگدانه در غلظت‌های متفاوت هورمونی شد. تأثیر مثبت هورمون‌ها بر افزایش مقدار کاروتنوئیدها در برخی آزمایش‌ها گزارش (۶ و ۵۰) و آثار منفی برخی غلظت‌های آنها بر مقدار کاروتنوئیدها در برخی آزمون‌ها مشاهده شده است (۷).

باتوجه‌به بهبود سایر شاخص‌های فیزیولوژیک نظیر افزایش تقسیم‌های سلولی و افزایش مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی، تیمار هورمون‌ها آثار مثبتی بر فعالیت‌های فیزیولوژیک و تحریک متابولیسم سلول‌ها داشت و بیشترین مقدار آن در غلظت متوسط هورمون IAA مشاهده شد. در زمینهٔ رنگدانه‌ها پیشنهاد شده است اکسین می‌تواند حالت ردوکس سلولی را در سلول‌های جلبک تنظیم و از تخریب اکسیداتیو رنگدانه‌های فتوسنتزی ممانعت کند (۵۱)؛ از سویی، افزودن H_2O_2 به سلول‌های پیش‌تیمارشده با هورمون در مقایسه با سلول‌های تیمارنشده با هورمون (نمونهٔ شاهد) نشان داد تنها در سوسپانسیون‌های پیش‌تیمارشده با هورمون، آمادگی افزایش بیشتر کربوهیدرات‌های محلول وجود دارد و تغییری در نمونهٔ شاهد ایجاد نمی‌شود. بهبود شاخص بر اثر پیش‌تیمار هورمونی دررابطه‌با تقسیم‌های سلولی، وزن خشک و مقدار رنگدانه‌ها در مقایسه با نمونهٔ شاهد که بدون پیش‌تیمار هورمونی بود، مشاهده

شـد؛ ایـن مطلـب نشـان می‌دهـد متابولیسـم و تجمـع کربوهیـدرات محلـول در سـلول‌های *Dunaliella* بـه H_2O_2 حساسـیت نـدارد؛ درحالی‌کـه مقـدار پـروتئین به‌شدت تحت‌تأثیر آن قرار می‌گیرد. میزان افـت پـروتئین پس‌از تیمار با H_2O_2 به وجودداشتن یا نداشتن پیش‌تیمـار هورمونی، نوع هورمون و غلظت هورمـون وابسـته اسـت. نتایج آزمایش‌هـای چکشـی[۷] و همکـاران (۵۲) و لـی[۸] و همکاران (۵۳) حساسیت متابولیسـم پروتئین‌هـا در سـلول بـه تـنش اکسـیداتیو حاصـل از تـنش شـوری و فلـزات سـنگین را نشـان می‌دهنـد. تـأثیر تحریک‌کننـدگی سـیتوکینین بـر افـزایش مقـدار پـروتئین کـه در پـژوهش حاضر مشاهده شد، بر اساس پژوهش‌ها می‌توانـد بـه‌علت افزایش تمایل اتصال tRNAs به ریبوزوم‌ها باشد (۴).

باتوجه‌به عملکرد وابسته بـه غلظـت مولکـول H_2O_2، مشاهده می‌شود در غالب پژوهش‌های انجام‌شده از نقش مخرب و کشندگی آن برای حذف جلبک‌های مختلـف در صنعت و محیط‌هـای آبـی و نیـز محـدودکردن رشـد جلبک‌ها در محدودهٔ رشـد گیاهـان اسـتفاده شـده اسـت (۵۴-۵۷)؛ اما در پژوهش حاضر کـه از غلظـت کـم ایـن مـاده روی جلبـک *Dunaliella* اسـتفاده شـد، آثـار آن به‌شکل تحریک رشد و تقسیم‌های سـلولی آشـکار شـد. باتوجه‌بـه اهمیـت افـزایش زیسـت‌توده در اسـتفاده از جلبک‌ها و درنظرگرفتن کم‌بودن خطر آثار سمی غلظت استفاده‌شده که به‌تدریج در محیط‌کشت تجزیه می‌شـود، به نظر می‌رسد بتـوان از ایـن تیمـار در تحریـک افـزایش زیست‌تودهٔ جلبک *Dunaliella* بهره گرفت.

References

(1) Zhang S., Duijn B. Cellular auxin transport in algae. *Plants* 2014; 3(1): 58-69.

(2) Mousavi P., Morowvat MH., Montazeri-Najafabady N., Abolhassanzadeh Z., Mohagheghzadeh A., Hamidi M., et al. Investigating the effects of phytohormones on growth and β-carotene production in a naturally isolates stain of *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2016; 6(8): 164-171.

(3) Leliaert F., Smith DR., Moreau H., Herron MD., Verbruggen H., Delwiche CF., et al. Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2012; 31(1): 1-46.

(4) Zarandi miandoab L., Hejazi MA., NaSAri M. The effect of cytokinin on growth and physiology of *Dunaliella salina*. *Applied Biology* 2018; 31(1): 121-132.

(5) Stirk WA., Bálint P., Tarkowská D., Novák O., Strrnad M., Ördög V., et al. Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brasSAnosteroids. *Plant Physiology and Biochemistry* 2013; 70: 348-353.

(6) Ahmed F., Fanning K., Netzel M., Schenk PM. Induced carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* and *Tetraselmis suecica* by plant hormones and UV-C radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015; 99(1): 9407-9416.

(7) Mansouri H., Talebizadeh R. Effects of indole-3-butyric acid on growth, pigments and UV-screening compounds in *Nostoc linckia*. *Phycological Research* 2017; 65(3): 212-216.

(8) Raman V., Ravi S. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of *Haematococcus pluvialis*. *Acta Physiologiae Plantarum* 2011; 33(3): 1043-1049.

(9) Sharma P., Jha AB., Dubey RS., Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012; Jan 26 pages.

(10) Noctor G., Mhamdi A., Foyer CH. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant, Cell and Environment*

2016; 39(5): 1140-1160.

(11) Jia P., Zhou Y., Zhang X., Zhang Y., Dai R. Cyanobacterium removal and control of algal organic matter (AOM) release by UV/H_2O_2 pre-oxidation enhanced Fe (II) coagulation. *Water Research* 2018; 131: 122-130.

(12) Kakkou C., Barták M., Hájek J., Skácelová K., Hazdrová J. Effects of controlled oxidative stress and uncouplers on primary photosynthetic processes in vegetative cells of Antarctic alga *Zygnema* sp. *Czech Polar Reports* 2016; 6: 96-107.

(13) Han X., Zeng H., Bartocci P., Fantozzi F., Yan Y. Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: A review. *Fermentation* 2018; 4(2): 25.

(14) Davies PJ. The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. Dordrecht: Springer; 2010.

(15) Hunt RW., Chinnasamy S., Bhatnagar A., Das KC. Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalga, *Chlorella sorokiniana*. *Applied Biochemistry and Biotechnolog* 2010; 162(8): 2400-2414.

(16) Akbari F., Madadkar Haghjou M. Improvement of nutritional values of TWO *Dunaliella* (Green microalgae) species, by changing in medium factors. *Journal of Fisheries* 2018; 70(3): 243-261.

(17) Akbari F., Madadkar Haghjou M. Increase in biomass and growth of *Dunaliella* microalga under vanillin treatment. *Journal of Plant Process and Function* 2018; 7(24): 211-228.

(18) Pourbozorgi Rudsari N., Madadkar Haghjou M., Ghiasvand A. Comparative study of growth, physiological and biochemical indices of blue-green alga *Spirulina platensis* in two Zarrouk and Johnson nutrient media under vanillin treatment. *Iranian Journal of Plant Biology* 2019; 10(4): 80-109.

(19) Majda M., Robert S. The role of auxin in cell wall expansion. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19(4): 951.

(20) Keikha M., Noori M., Keshtehgar A. Effect of salicylic acid and gibberellin on yield and yield components of Mungbean (*Vigna radiata*). *Iranian Journal of Pulses Research* 2016; 7(2): 138-151.

(21) Tarakhovskaya ER., Maslov YI., Shishova MF. Phytohormones in Algae. *Russian Journal of Plant Physiology* 2007; 5(2):163-170.

(22) Hashemi S., Asrar Z., Pourseyedi S. Effects of seed pretreatment by salicylic acid on growth and some phySAological and biochemical parameters in *Lepidium sativum*. *Iranian Journal of Plant Biology* 2010; 2(2): 1-10.

(23) Kozlova TA., Hardy BP., Krishna P., Levin DB. Effect of phytohormones on growth and accumulation of pigments and fatty acids in the microalgae *Scenedesmus quadricauda*. *Algal Research* 2017; 27: 325-334.

(24) Johnson MK., Johnson EJ., MacElroy RD. Speer HL., Bruff BS. Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology* 1968; 95(4): 1461-1468.

(25) Shariati M., Lilley R. 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* 1994; 17(12): 1295-1304.

(26) Rashidi S., Abbas Dukht H., Gholami A., Tavakol Afshari R. Effect of planting pattern and plant density on growth, dry matter remobilization and grain yield of maize (*Zae mays* L.). *Crop Physiology Journal* 2017; 9(34): 79-96.

(27) Keshavarz H., Modarres Sanavy SAM. Effect of salicylic acid on chlorophyll, some growth characteristics and yield of two canola varieties. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2015; 7(4): 167-178.

(28) Moraes CC., Sala L., Cerveira GP., Kalil SJ. C-phycocyanin extraction from *Spirulina platenSAs* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2011; 28(1): 45-49.

(29) Madadkar Haghjou M. Change in ascorbate and tocopherol contents under hydrogen peroxide oxidative stress in microalga Dunaliella. 20th National and 8th International Congress of Biology. Maragheh University, Maragheh, Iran; 2018.

(30) Madadkar Haghjou M. Application of exogen H_2O_2 on the photosynthetic system and chlorophyll fluorescence of two Dunaliella isolates (D-1 and D-2) alga. 20th National and 8th International Congress of Biology. Maragheh University, Maragheh, Iran; 2018.

(31) Martinez MR., Chakroff RP., Pantastico JB. Note on direct phytoplankton counting technique using the haemocytometer. *Philippine Agricultural* 1975; 59: 1-12.

(32) Berube KA., Roessler J., Jones TP., Janes S. The determination of volume of *Dunaliella* cells by transmisSAon electron microscopy and image analySAs. *Annals of Botany* 1994; 73(5): 481-491.

(33) Eijckelhoff C., Dekker JP. A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and β-carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes. *Photosynthesis Research* 1997; 52(1): 69-73.

(34) Marshall JD. Drought and shade interact to cause fine-root mortality in Douglas-fir seedlings. *Plant and Soil* 1986; 91(1): 51-60.

(35) Irigoyen JJ., Einerich DW., Sánchez-Díaz M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated Alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 1992; 84(1): 55-60.

(36) Bradford MM. A rapid and sensative method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72(1): 248-254.

(37) Boivin S., Fonouni-Farde C., Frugier F. How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions. *Frontiers in Plant Science* 2016; 7: 1240.

(38) Barba-Espin G., Diaz-Vivancos P., Clemente-Moreno MJ., Albacete A., Faize L., Faize M., et al. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant Cell Environment* 2010; 33(6): 981-994.

(39) Zhao C., Haigh AM., Holford P., Chen ZH. Roles of chloroplast retrograde signals and ion transport in plant drought tolerance. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19(4): 963-986.

(40) Takatsuka H., Umeda M. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *Journal of Experimental Botany* 2014; 65(10): 2633-2643.

(41) Lee ZH., Hirakawa T., Yamaguchi N., Ito T. The roles of plant hormones and their interactions with regulatory genes in determining meristem activity. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20(16): 4065.

(42) Ren H., Gray WM. SAUR proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth. *Molecular Plant* 2015; 8(8): 1153-1164.

(43) Thiel G., Weise R. Auxin augments conductance of K^+ inward rectifier in maize coleoptile protoplasts. *Planta* 1999; 208(1): 38-45.

(44) Philippar K., Ivashikina N., Ache P., Christian M., Lüthen H., Palme K., et al. Auxin activates KAT1 and KAT2, two K^+-channel genes expressed in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 2004; 37(6): 815-827.

(45) Perrot-Rechenmann C. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2010; 2(5): a001446.

(46) Fleischer A., Titel C., Ehwald R. The boron requirement and cell wall properties of growing and stationary suspension-cultured *Chenopodium album* L. cells. *Plant Physiology* 1998; 117(4): 1401-1410.

(47) Tanaka R., Tanaka A. Chlorophyll *b* is not just an accessory pigment but a regulator of the photosynthetic antenna. *Porphyrins* 2000; 9(1): 240-245.

(48) Borowitzka MA. High-value products from microalgae-their development and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 2013; 25 (1): 743-756.

(49) Lamers PP., Janssen M., De Vos RCH., Bino RJ., Wijffels RH. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol* 2008; 26(11): 631-638.

(50) Li J., Khan ZU., Tao X., Mao L., Luo Z., Ying, T. Effects of exogenous auxin on pigments and primary metabolite profile of postharvest tomato fruit during ripening. *Scientia Horticulturae* 2017; 219: 90-97.

(51) Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Growth Regulation* 2014; 73(1): 57-66.

(52) Chokshi K., Pancha I., Ghosh A., Mishra S. Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus Dimorphus*. *Bioresource Technology* 2017; 244: 1376-1383.

(53) Li X., Yang WL., He H., Wu S., Zhou Q., Yang C., Lou W. Responses of microalgae *Coelastrella* sp. to stress of cupric ions in treatment of anaerobically digested swine wastewater. *Bioresource Technology* 2018; 251: 274-279.

(54) Fan F., Shi X., Zhang M., Liu C., Chen K. Comparison of algal harvest and hydrogen peroxide treatment in mitigating cyanobacterial blooms via an in situ mesocosm experiment. *Science of the Total Environment* 2019; 694: 133721.

(55) Bauzá L., Aguilera A., Echenique R., Andrinolo D., Giannuzzi L. Application of hydrogen peroxide to the control of eutrophic lake s systems in laboratory assays. *Toxins* 2014; 6: 2657-2675.

(56) Randhawa V., Thakkar M., Wei L. Applicability of hydrogen peroxide in brown tide control– culture and microcosm studies. *Plos One* 2012; 4(10): 1-11.

(57) Vänninen I., Koskula H. Effect of hydrogen peroxide on algal growth, cucumber seedlings and the reproduction of shore flies *(Scatella stagnalis)* in rock wool. *Crop Protection* 1998; 17(6): 547-553.

[1]- Johnson
[2]- Shariati
[3]- Lilley
[4]- Eijckelhoff
[5]- Dekker
[6]- Bradford
[7]- Chokshi
[8]- Li