دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری

مهندسی ژنتیک جلبک به منظور افزایش تولید چربی و بهبود عملکرد تولید بیودیزل

احمدفرهاد طالبی

بهار ۱۳۹۳

دانشکده کشاورزی

رساله دکتری

مهندسی ژنتیک جلبک به منظور افزایش تولید چربی و بهبود عملکرد تولید بیودیزل

احمدفرهاد طالبی

استادان راهنما:

دکتر عبدالرضا باقری

دکتر مسعود توحیدفر

استادان مشاور:

دکتر میثم طباطبائی

دکتر سعید ملک‌زاده شفارودی

دکتر هوشنگ علیزاده

تعهد نامه

عنوان رساله: مهندسی ژنتیک جلبک به منظور افزایش تولید چربی و بهبـــود عملکـــرد تولید بیودیزل

اینجانب **احمدفرهاد طالبی** دانشجوی دوره دکتری رشته **بیوتکنولوژی کشاورزی** دانشکده **کشاورزی** دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی **آقای دکتر باقری** متعهـــد مـــی شوم:

- نتایج ارائه شده در این رساله حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این رساله را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از رساله، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی رساله تاثیر گذار بوده اند در مقالات مسـتخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافتهای آنها برای انجام رساله، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ

نام و امضاء دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- **کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلـق دارد و بـدون اخـذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.**
- **استفاده از اطلاعات و نتایج این رساله بدون ذکر مرجع مجاز نیست.**

چکیده:

جلبک به عنوان نسل سوم تولید کننده سوخت‌های زیستی علی‌الخصوص بیودیزل تمام پیش‌شرط‌های لازم به منظور تبدیل شدن به منبع پایدار تولید سوخت زیستی، از جمله توانایی رقابت با سوخت‌های فسیلی در زمینه هزینه تولید ، عدم نیاز به زمین کشاورزی مستعد، مصرف آب محدود و توانایی بالای ترسیب CO_2 اتمسفر را دارا است. در این تحقیق نخست از بین ۱۱ گونه مختلف ریزجلبک انواع پربازده شناسایی شدند و معین شد که عملکرد تولید روغن، که خود مستقیماً از عملکرد تولید زیست توده تأثیر می‌پذیرد، خصوصیت مناسبی برای انتخاب و شناسایی گونه‌های پربازده می‌باشد. همچنین انواع تیمارهای بیوشیمیایی به منظور افزایش عملکرد تولید چربی بر روی گونه‌های موردنظر مطالعه شد. اعمال ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول ۵۰ درصد محتوی روغن سلولی را در گونه *Dunaliella salina* افزایش داد اما از آنجائی که روش‌های معمول مثل کنترل شرایط رشد (دما، pH و شوری) و تأمین مواد غذایی در محیط رشد جلبک کارایی لازم برای افزایش تولید چربی در بیومس را ندارند، دستکاری ژنتیکی آنزیم‌های کلیدی در سنتز اسیدهای چرب و افزایش بیان آن‌ها از طریق مهندسی کلروپلاست و هسته در دستور کار قرار گرفت. از جمله این ژن‌ها می‌توان *ME* و *AccD* را نام برد که در تحقیق حاضر بر روی سازه‌های ژنومی و کلروپلاستی ریزجلبک از جمله گونه *D. salina*، همسانه‌سازی شدند و نهایتاً ژن *AccD* در ژنوم کلروپلاست این گونه با موفقیت الحاق شد. بیان موفق این ژن از راه‌اندازهای دائمی ۱۶S اثرات محدودی بر روی میزان ونحوه تجمع چربی‌های سلولی در لاین‌های تراریخته را باعث شد اما بیان این تراژن خصوصیات کیفی بیودیزل تولیدی را بخوبی ارتقا داد. این نتیجه کارایی کاربرد رویکردهای ژنتیکی را در بهبود خصوصیات تولیدی روغن از منبع جلبک به تأیید رساند.

کلید واژه‌ها: ریزجلبک، سوخت زیستی، بیودیزل، AccD.

سپاسگزاری

بهترین سپاس و ستایش برای خداوندی است که از روی حکمت خویش علم، اندیشه و قلم را به انسان بخشید و توفیق گام نهادن در مسیر علم و تحصیل دانش در جوار امام رضا (ع) را به من عطا فرمود. بر خود واجب می دانم مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به همه عزیزانی که مرا در به ثمر نشستن این تحقیق یاری نمودند ابراز نمایم.

از جناب آقای دکتر باقری و جناب آقای دکتر توحیدفر، اساتید راهنمای بزرگوارم به دلیل حمایت‌ها و راهنمایی‌های بی‌دریغ‌شان، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از دوست عزیز و برادر بزرگوار، از جناب آقای دکتر میثم طباطبائی، مشاور محترم این پایان نامه که همکاری‌های ایشان پشتوانه محکمی برای انجام مراحل پایان نامه‌ام بوده است تشکر می‌کنم. از اساتید مشاور دلسوزم جناب آقای دکتر ملک زاده و جناب آقای دکتر علیزاده به نوبه خود قدردانی می‌کنم.

از جناب آقای دکتر مرعشی و جناب آقای دکتر شهریاری و جناب آقای دکتر احمدزاده که داوری این پایان‌نامه را عهده‌دار شدند وهمچنین سرکارخانم دکتر مشتاقی، نماینده تحصیلات تکمیلی، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از تکنسین‌های محترم آزمایشگاه کشت بافت و انتقال ژن پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، به دلیل همکاری ایشان در انجام پایان‌نامه صمیمانه سپاسگزارم. همچنین مراتب قدردانی خود را از سایر اعضای هیئت علمی این پژوهشکده اعلام می‌دارم.

از دوستانم آقایان دکتر آزادی، دکتر معماری، مهندس سهیلی، مهندس کریمی به خاطر همکاری دوستانه‌شان سپاسگزارم.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱- مقدمه	۱
۲- فصل اول: بررسی منابع	۶
۲-۱- جلبک‌ها	۶
۲-۱-۱ ارتباط کشاورزی و جلبک‌ها	۶
۲-۱-۲- ارتباط بیوتکنولوژی با جلبک‌ها	۷
۲-۱-۳- گیاهشناسی جنس Dunaliella	۷
۲-۱-۴- اکولوژی	۱۳
۲-۱-۵- اهمیت اقتصادی جلبک Dunaliella	۱۴
۲-۱-۶- استخراج گلیسرول	۲۳
۲-۲- ترانسفورماسیون هسته ای در Dunaliella	۲۳
۲-۲-۱- نشانگرهای انتخابگر	۲۴
۲-۲-۲- پروموتورها و ژن‌های گزارشگر	۲۶
۲-۳- مهندسی ژنتیک کلروپلاست	۳۰
۲-۴- روش های مختلف استفاده شده برای تراریزش Dunaliella	۳۰
۲-۵- افزایش راندمان تولید ریزجلبک از طریق مهندسی ژنتیک	۴۰
۲-۶- جنبه‌های ایمنی زیستی جلبک تراریخته	۴۵
۳- فصل دوم: مواد و روش‌ها	۴۸
۳-۱ مواد شیمیایی ، آنزیم ها و کیت‌ها	۴۸
۳-۱-۱- بافرها، محیط کشت و آنتی بیوتیک‌ها و محلول‌ها	۴۹
۳-۱-۲- محیط کشت باکتری	۴۹
۳-۱-۳- تهیه آنتی‌بیوتیک	۵۰

عنوان	صفحه
۳-۱-۴- آماده سازی محلول رنگ آمیزی Nile Red	۵۰
۳-۱-۵- تهیه ی استوک x-GlcA	۵۰
۳-۱-۶- ناقلین انتقال ژن	۵۱
۳-۱-۷- پرایمرها	۵۴
۳-۲- روش‌ها	۵۵
۳-۲-۱- کشت باکتری	۵۵
۳-۲-۲- تهیه سلول‌های مستعد	۵۵
۳-۲-۳- تخلیص پلاسمید در مقیاس کم و مقیاس زیاد	۵۸
۳-۳- خالص سازی ایزوله‌های خلیج فارس و شناسایی مولکولی آنها	۶۷
۳-۴- بهینه‌سازی شرایط کشت و پرورش ریزجلبک‌ها	۶۸
۳-۴-۱- شناسایی خصوصیات کمی و کیفی انواع گونه‌های ریزجلبک	۷۰
۳-۴-۲- آنالیز اسیدهای چرب	۷۲
۳-۴-۳- مطالعه فلورسنس تجمع چربی در سلول‌های ریزجلبک	۷۲
۳-۴-۴- عکس برداری از قطرات چربی سلولی توسط میکروسکوپ اپی‌فلورسنت	۷۴
۳-۴-۵- سنجش کمی فلورسنت تابش شده توسط میکروپلیت	۷۴
۳-۴-۶- سنجش کمی فلورسنت تابش شده توسط فلوسایتومتر	۷۵
۳-۴-۷- پیش‌بینی خصوصیات کیفی بیودیزل	۷۵
۳-۴-۸- دسته‌بندی و انتخاب گونه‌های پربازده برای تولید بیودیزل	۷۷
۳-۵- اعمال تغییرات بیوشیمیایی به منظور افزایش خصوصیات عملکردی	۷۷
۳-۵-۱- مطالعه اثر مولکولی تیمار بیوشیمیایی میواینوزیتول	۷۸
۳-۶- آزمون حساسیت ریزجلبک به آنتی بیوتیک	۸۲
۳-۶-۱- آزمون حساسیت ریزجلبک *C. vulgaris* به آنتی‌بیوتیک کانامایسین	۸۲

عنوان | صفحه

۳-۶-۲- آزمون حساسیت ریزجلبک *D. salina* به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل ۸۲

۳-۶-۳- آزمون حساسیت ریزجلبک *C. rehinhartii* به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین ۸۲

۳-۷- انتقال ژن به ریزجلبک به کمک روش‌های بمباران ژنی و ناقل اگروباکتریوم ۸۳

۳-۷-۱- دستورزی ریزجلبک *C. vulgaris* با ناقل pBI121 به روش بمباران با تفنگ ژنی ۸۳

۳-۷-۲- انتقال ژن به گونه *D. salina* به روش بمباران با تفنگ ژنی ۸۹

۳-۷-۳- انتقال ژن به گونه *C. rehinhartii* به روش همکشتی با آگروباکتریوم ۸۹

۳-۷-۴- استخراج DNA ژنومی از جلبک ۹۰

۳-۷-۵- آنالیز جلبک‌های تراریخته گونه *C. vulgaris* ۹۲

۳-۷-۶- آنالیز جلبک‌های تراریخته گونه *D. salina* ۹۶

۴- فصل سوم: نتایج و بحث ۹۸

۴-۱- خالص‌سازی و شناسایی ایزوله خلیج فارس ۹۸

۴-۱-۱- خالص‌سازی و شناسایی مورفولوژیک ۹۸

۴-۱-۲- شناسایی مولکولی ۹۹

۴-۲- غربال‌گری گونه‌های ریزجلبک بر اساس خصوصیات کمی و کیفی ۱۰۱

۴-۲-۱- بررسی خصوصیات رشدی ۱۰۱

۴-۲-۲- بررسی پروفایل اسیدهای چرب گونه‌های مورد مطالعه ۱۰۴

۴-۲-۳- دسته‌بندی گونه‌های جلبک به کمک روش‌های آماری ۱۰۶

۴-۳- بهینه کردن شرایط کشت و پرورش گونه‌های مستعد ۱۱۰

۴-۴- مطالعه اثرات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و مولکولی اعمال ترکیبات بیوشیمیایی ۱۱۵

۴-۴-۱- اثر استعمال میواینوزیتول بر چربی تجمع یافته ۱۱۵

۴-۴-۲- پایش خصوصیات مورفولوژیک سلول‌ها در اثر تیمار میواینوزیتول ۱۱۸

۴-۴-۳- کمی سازی میزان فلورسنت تابش شده توسط میکروپلیت ریدر ۱۱۹

عنوان	صفحه
۴-۴-۴- مطالعه سلول‌های رنگ آمیزی شده توسط دستگاه فلوسایتومتر	۱۲۱
۴-۴-۵- بررسی نسبی بیان ژن با روش Relative Real time PCR	۱۲۳
۴-۵- نتایج حاصل از انجام آزمایش‌های انجام شده برای گزینش تراریخته‌ها	۱۲۶
۴-۵-۱- مطالعه نحوه واکنش و مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها	۱۲۶
۴-۵-۲- تایید تراریختی جلبک *C. vulgaris* با استفاده از آنالیز PCR	۱۳۱
۴-۵-۳- بررسی بیان گذرای ژن GUS در ریزجلبک‌های تراریخته *C. vulgaris*	۱۳۴
۴-۵-۴- نتایج بررسی محل و تعداد نسخ ژنی nptII در *C. vulgaris*	۱۳۴
۴-۶- تایید تراریختی جلبک *D. salina* با استفاده از آنالیز PCR	۱۳۵
۴-۶-۱- آزمون لکه گذاری سادرن در ریزجلبک‌های تراریخته *D. salina*	۱۴۱
۴-۶-۲- انجام مطالعات فیزیولوژیک بر روی ایزوله‌های تراریخته *D. salina*	۱۴۲
۴-۷- دستورزی ژنتیکی جلبک *C. reinhardtii* به واسطه آگروباکتریوم	۱۴۴
۵- فصل چهارم: نتیجه‌گیری و پیشنهادات	۱۴۸
۵-۱- انتخاب گونه‌های پربازده	۱۴۸
۵-۲- راهبردهای بیوشیمیایی	۱۵۰
۵-۳- راهبردهای ژنتیکی	۱۵۰
۵-۴- پیشنهادات	۱۵۲
۶- منابع مورد استفاده	۱۵۴
۷- پیوست‌ها	۱۵۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱. اشکال *Dunaliella* ی ارائه شده توسط تئودورسکو. ۱۰

شکل ۲-۲. محل و نوع فعالیت آنزیمهای درگیر در کربوکسیلاسیون استیل کوآنزیم A. ۴۴

شکل ۳-۱. ساختار ژنومی پلاسمید pGH-ME. ۵۳

شکل ۳-۲. ساختار ژنومی پلاسمید pBI121 ..... ۵۲

شکل ۴-۱. نمودار گرافیکی سلول‌های ریزجلبک *D. salina*. ۱۰۰

شکل ۴-۲. فیلوگرام رسم شده براساس توالی ژنی 18S. ۱۰۱

شکل ۴-۳. رابطه مابین عملکرد تولید چربی با تولید زیست توده و درصد چربی ۱۰۴

شکل ۴-۴. دسته‌بندی گونه‌های جلبک بر اساس خصوصیات کیفی و عملکرد چربی. ۱۰۸

شکل ۴-۵. کلاسه‌بندی گونه‌های مختلف جلبک براساس خصوصیات کیفی ۱۰۹

شکل ۴-۶. منحنی رشد سلول‌های جلبک *D. salina* در محیط کشت‌های مختلف. ۱۱۲

شکل ۴-۷. مقایسه توان تولید زیست توده جلبک *D. salina* در محیط کشت‌های مختلف. ۱۱۲

شکل ۴-۸. بهینه کردن محیط کشت Lake با افزودن منابع غذایی مختلف. ۱۱۴

شکل ۴-۹. مشاهده میکروسکوپیک سلول‌های ریزجلبک *D. salina* ۱۲۰

شکل ۴-۱۰. ثبت کمی فلورسنت ساطع شده از سلول‌های جلبک *D. salina* ۱۲۱

شکل ۴-۱۱. سیگنال ثبت شده در کانال ۲ دستگاه فلوسایتومتر. ۱۲۳

شکل ۴-۱۲. منحنی ذوب نمونه‌های تکثیر شده پس از واکنش PCR. ۱۲۵

شکل ۴-۱۳. نمودار گرافیکی افزایش فلورسنت تابش شده حین انجام واکنش PCR ۱۲۶

شکل ۴-۱۴. سلول‌های تراریخته و غیرتراریخته جلبک *C. vulgaris* ۱۲۸

شکل ۴-۱۵. محنی رشد جلبک *C. vulgaris* ۱۲۹

شکل ۴-۱۶. تعیین غلظت آنتی بیوتیک کانامایسین با قدرت ۵۰ درصد کشندگی. ۱۳۱

شکل ۴-۱۷. نمایش گرافیکی سازه ژنی pBI121 ..... ۱۳۳
شکل ۴-۱۸. واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن nptII ۱۳۴
شکل ۴-۱۹. رنگ آمیزی هیستوشیمیایی GUS ۱۳۵
شکل ۴-۲۰. آنالیز سادرن بلات جلبک تراریخت *C. vulgaris* ۱۳۶
شکل ۴-۲۱. رشد نمونه تراریخته در مقابل توقف رشد نمونه شاهد جلبک *D. salina* ۱۳۷
شکل ۴-۲۲. واکنش PCR توسط توسط پرایمر اختصاصی ژن AccD و پرایمر M13. ..... ۱۳۸
شکل ۴-۲۳. مشاهده باند مربوط به ژن AccD پس از درج در ناقل pGH-ME. ۱۳۹
شکل ۴-۲۴. مشاهده باند مربوط به ژن *AccD* در سازه pGH-ME-AccD. ۱۳۹
شکل ۴-۲۵. نمایش سازه ژنی pGH-ME-AccD. ۱۴۰
شکل ۴-۲۶. واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن AccD به منظور اثبات حضور ژن نشانگر ۱۴۱
شکل ۴-۲۷. آنالیز سادرن بلات جلبک تراریخت *D. salina* برای تست الحاق تراژن. ۱۴۲
شکل ۴-۲۸. سازه ژنی pCAMBIA-ME برای دستورزی هسته‌ای ۱۴۶
شکل ۴-۲۹. تأیید درج صحیح کاست ژنی 16S promoter-ME در ناقل pCAMBIA. ۱۴۶
شکل ۷-۱. نمای کلی لام نئوبار. ۱۷۱
شکل ۷-۲. جلبک‌های موجود در پنج مربعی که با دایره‌ی سبز رنگ مشخص شده شمارش شدند. ۱۷۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱. رده‌بندی امروزی جلبک *Dunaliella* ۸

جدول ۳-۱. توالی پرایمرهای استفاده شده. ۵۵

جدول ۳-۲. ترکیبات بافر شماره یک استخراج پلاسمید. ۵۹

جدول ۳-۳. ترکیبات بافر شماره دو استخراج پلاسمید. ۶۰

جدول ۳-۴. ترکیبات بافر شماره سه استخراج پلاسمید ۶۰

جدول ۳-۵. ترکیبات بافر بار گذاری ۶۳

جدول ۳-۶. ترکیبات محیط کشت جانسون تغییر یافته‌ی ۶۴

جدول ۳-۷ ترکیبات نمکی سری محیط کشت‌های Moh202. .....۶۹

جدول ۳-۸ میزان نمک مورد استفاده در تهیه محیط کشت Lake Medium ۷۰

جدول ۳-۹ ترکیب محلول واکنش Real Time PCR.....۸۱

جدول ۳-۱۰ پارامترهای لحاظ شده برای ترانریزش کلرولا ولگاریس توسط بمباران با تفنگ ژنی.....۸۶

جدول ۳-۱۱ غلظت مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR برای تایید حضور ژن های *nptII* ۹۴

جدول ۳-۱۲ شرایط دمایی و زمانی مراحل مختلف واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای *nptII* ۹۴

جدول ۳-۱۳ ترکیبات محلول رنگ آمیزی X-Gluc ۹۵

جدول ۴-۱. تعیین خصوصیات فیزیولوژیکی گونه‌های مختلف ریزجلبک. ۱۰۳

جدول ۴-۲. مقایسه قیمت تمام شده برای آماده سازی محیط کشت‌های مختلف رشد جلبک. ۱۱۳

جدول ۴-۳. مقایسه هزینه تولید کارتنوئید از منشأ جلبک *D. salina* ۱۱۵

جدول ۴-۴. تغییر در خصوصیات فیزیولوژیکی ریزجلبک *D. salina* ۱۱۷

جدول ۴-۵. تغییر در خصوصیات کیفی بیودیزل تولید شده از منبع ریزجلبک *D. salina* ۱۱۸

جدول ۴-۶. نتایج محاسبات اطلاعات بدست آمده از Real-time PCR. ۱۲۴

جدول ۴-۷. مطالعه اثر غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک کانامایسین بر روی شمار سلولی. ۱۳۰

جدول ۴-۸ فلورسنت ساطع شده از سلول‌های جلبک تاریخته و غیرتاریخته *D. salina*.....۱۴۴
جدول ۷-۱ درصد اسیدهای چرب تشکیل دهنده پروفایل روغن گونه‌های مختلف جلبک ۱۷۳
جدول ۷-۲خصوصیات کیفی بیودیزل تولید شده از منبع روغنی تولید شده توسط گونه‌های متنوع جلبک ۱۷۴
جدول ۷-۳تغییر در پروفایل اسیدهای چرب ریزجلبک *D. salina* ۱۷۵
جدول ۷-۴ تغییر در پروفایل اسیدهای چرب ریزجلبک *D. salina* در لاین‌های تاریخته و شاهد. ۱۷۶
جدول ۷-۵ مقایسه خصوصیات کیفیت بیودیزل از منبع ریزجلبک *D. salina*.....۱۷۷

فهرست علائم و اختصارها

علامت	معادل انگلیسی	معادل فارسی
Accase	Acetyl CoA carboxylase	استیل کوآنزیم آ
ACCase	Acetyl-CoA carboxylase	
APE	Allylic position equivalents	
ap_x	allylic positions in a specific fatty acid	
BAPE	Bis-allylic position equivalents	
CN	Cetane number	
CP	Cloud point	
FA	Fatty acid	
FAME	Fatty acid methyl ester	
IV	Iodine value	
LC	Lipid Content	
BP	Biomass Productivity	
LP	Lipid Productivity	
MSFA	Mono saturated FAs	
MUFA	Mono unsaturated FAs	
Pb	biomass productivity	
SFA	Total saturated fatty acids	
TAG	Tri AcylGlycerol	تری اسیل گلیسرول

۱- مقدمه

گونه‌های ریزجلبک *Dunaliella* در سلسله Plantae ، شاخه ی کلروفیتا[۱] ، راسته‌ی دونالیلالز[۲] و خانواده دونالیلاسه[۳] طبقه بندی شده‌اند (برویتزکا و سیوا، ۲۰۰۷). ریزجلبک *Dunaliella* تک سلولی بوده و فاقد دیواره‌ی سلولی می‌باشد. این جنس دارای گونه‌های متعددی است. یکی از مهم ترین گونه های این جنس که در انتقال ژن نیز عمدتاً از آن استفاده شده است *D. salina* می‌باشد. سایر گونه‌هایی که انتقال DNA خارجی به آنها گزارش شده است *Dunaliella tetiolecta* و *D. viridis* می‌باشند.

عموماً انجام تغییرات ژنتیکی بر روی ریز جلبک‌ها بخصوص در مورد *Dunaliella salina* برای اهداف زیر انجام می شود: ۱) احتمال افزایش تولید ترکیبات سنتی جلبک‌ها (مانند رنگدانه‌هایی نظیر کارتنوئیدها) و تولید ترکیبات زیست فعال جدید برای کاربردهای صنعتی و

---

[۱] *Chlorophyta*

[۲] *Dunaliellales*

[۳] *Dunaliellaceae*

داروئی از طریق مهندسی متابولیک (لئون بانارز و همکاران، ۲۰۰۴)؛ ۲) بعلاوه ریز جلبک‌ها می توانند به عنوان میزبان‌های یوکاریوتی مدل (بخصوص در مواردی که ژن‌ها نمی‌توانند در مخمر بیان شوند در رابطه با ژن‌های مربوط به عملکرد فلاژل‌ها، فتوسنتز و جذب نور) مورد استفاده قرار می‌گیرند (لئون بانارز و همکاران، ۲۰۰۴؛ هریس، ۲۰۰۱؛ رچایکس و همکاران، ۱۹۹۸)؛ ۳) ریز جلبک‌ها می‌توانند برای بیان پروتئین های پستانداران مثل هورمون ها یا آنتی بادی‌ها نیز مهندسی شوند (لئون بانارز و همکاران، ۲۰۰۴)؛ ۴) اخیراً گونه‌های ریزجلبک به عنوان منابع پایدار تولید کننده ترکیبات انرژی‌زا که انرژی نورانی خورشید را با کارایی بالا در محصولات هیدروکربنی ذخیره می‌کنند، معرفی شده‌اند (چیستی، ۲۰۰۷). این ترکیبات پتانسیل استفاده به عنوان نسل‌های جدید انرژی‌های نو و سبز را اعم از بیواتانول و بیودیزل دارا هستند.

در حال حاضر *D. salina* بهترین منبع تجاری تولید بتاکاروتن طبیعی در جهان می‌باشد. به علاوه گونه‌های مختلف Dunaliella می‌توانند مقادیر قابل توجهی از مواد شیمیایی با ارزش مثل کاروتنوئیدها ، گلیسرول، لیپیدها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و پروتئین‌ها را در سلول‌های خود انباشته کنند (تفرشی و شریعتی، ۲۰۰۹).

ریز جلبک *D. salina* در آب‌های شور تا خیلی شور رشد می‌کند بنابراین کشت در سطح وسیع آن، با کشاورزی متداول، در منابع محدود مثل زمین‌های قابل زرع و آب شیرین رقابت نمی‌کند (واکر و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین این ریزجلبک‌ها هیچ گونه سمی تولید نمی‌کنند و از این رو در لیست منابع غذایی سالم [۱] طبقه بندی شده‌اند (واکر و همکاران، ۲۰۰۵). بنابراین

[۱] Generaly Regarded As Safe (GRAS)

بسیاری از ترکیبات با ارزش بالای تولید شده توسط این ریز جلبک به عنوان پودر یخ- خشک شده بدون انجام استخراج، قابل مصرف می‌باشد.

پتانسیل تولید ترکیبات زیست سازگار و استفاده از این ریزجلبک به عنوان منبع غذایی به علاوه کشت آسان و ارزان آن به همراه تحمل شوری بالای محیط کشت که مانع رشد سایر ارگانیسم‌ها در محیط می‌شود؛ همچنین عدم وجود دیواره‌ی سلولی که باعث تسهیل در انتقال وکتور به داخل سلول و خالص‌سازی پروتئین‌های بیان شده می‌شود، این ریزجلبک را کاندید خوبی برای انتقال ژن خارجی و تولید پروتئین‌های نوترکیب نموده است (واکر و همکاران، ۲۰۰۵).

جلبک به عنوان نسل سوم تولید کننده سوخت‌های زیستی علی‌الخصوص بیودیزل تمام پیش‌شرط‌های لازم به منظور تبدیل شدن به منبع پایدار تولید سوخت زیستی، از جمله توانایی رقابت هزینه تولید با سوخت‌های فسیلی، عدم نیاز به زمین‌های کشاورزی مستعد، مصرف آب محدود و توانایی ترسیب CO_2 اتمسفر را دارا هستند. بسیاری از ریزجلبک‌های یوکاریوتیک این توانایی را دارند که حجم قابل توجهی از ترکیبات غنی از انرژی همانند تری اسیل گلیسرول (TAG) و نشاسته را ذخیره نمایند که می‌توانند برای تولید چندین نوع سوخت زیستی شامل بیودیزل و اتانول بکار روند. چشم انداز سال‌های باقی مانده از دهه دوم تجاری سازی محصولات تراریخته در جهان (۲۰۰۶ تا ۲۰۱۵) امیدوار کننده است و پیش‌بینی سرویس بین المللی دستیابی و استفاده از بیوتکنولوژی کشاورزی در مورد این است که در این دهه سطح زیر کشت، تعداد کشاورزان و تعداد کشورهایی که محصولات تراریخته را کشت می‌کنند به دو برابر افزایش خواهد یافت. امروزه بکارگیری بیوتکنولوژی یکی از راه حل‌های بدست آوردن محصولات کشاورزی بیشتر از زمین‌های کشاورزی فعلی است. تنها مشکل امروزی جوامع بشری تأمین غذا یا تولید غذای بیشتر نیست بلکه معضلاتی چون انواع بیماری‌ها، مشکلات بهداشت عمومی، از بین رفتن محیط

زیست و کاهش ذخایر ژنتیکی و تولید بیش از حد گازهای گلخانه‌ای از جمله آسیب‌هایی است که محیط زندگی را برای انسان ناامن کرده است. بنابراین باید برای مقابله با آن‌ها به اقدامات جدیدی دست زد. در این راستا انواع گونه‌های جلبک با توانایی کاهش آلودگی‌های زیست محیطی از جمله توانایی ترسیب دی اکسیدکربن، تجزیه ترکیبات صنعتی سمی و تولید متابولیت‌ها و پروتئین‌های دارویی و تولید سوخت سبز (بیودیزل و بیواتانول)، از ابزارهای قوی بیوتکنولوژی کشاورزی بشمار می‌آیند. تولید سوخت‌های زیستی و تثبیت CO_2 با استفاده از ریزجلبک‌ها با رویکرد زیست محیطی و نیز تولید سوخت مورد نیاز در بخش‌های مختلف طی سه دهه گذشته تحقیقات زیادی را به خود اختصاص داده است. ترکیب سه نقش ریزجلبک‌ها در تثبیت CO_2، تصفیه پساب و تولید سوخت های زیستی، پتانسیل مناسبی برای افزایش راندمان در سیستم‌های تولید سوخت‌های زیستی ایجاد می‌نماید و در حال حاضر تحقیقات گسترده‌ای بر روی این موضوع در حال انجام می باشد. البته حجم تحقیقات صورت گرفته بر روی ساخت پایلوت‌های صنعتی و همچنین بهینه‌سازی فرآیندی بسیار کمتر می‌باشد.

از آنجائی که دستورزی روش‌های معمول مثل کنترل شرایط رشد (دما، pH و شوری) و تامین مواد غذایی محیط رشد جلبک، کارایی لازم برای افزایش تولید چربی در بیومس را ندارند، دستکاری ژنتیکی آنزیم‌های کلیدی در سنتز اسیدهای چرب و بیان بالای آن از طریق مهندسی کلروپلاست و هسته می‌تواند ثمربخش باشد.

استعداد رشد و پرورش جلبک‌ها در زیستگاه‌های متنوع به مدد توانایی‌های منحصر بفرد فیزیولوژیکی، آنها را به موجوداتی ایده‌آل برای تحقق طیفی از اهداف بیوتکنولوژی گیاهی منطبق با اصول ایمنی زیستی، بدل نموده است. لذا در این پژوهش سعی شده است نخست با شناسایی تنوع طبیعی و پتانسیل تولید روغن به منظور تولید بیودیزل، دسته بندی گونه‌های جلبک‌های سبز انجام