بسم الله الرحمن الرحيم

١١٤٣٠٠

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی- علوم گیاهی گرایش فیزیولوژی گیاهی

بررسی اثر سالسیلیک اسید برروی رشد (تقسیم سلولی)، رنگیزه های فتوسنتزی و مقدار بتا-کاروتن در جلبک تک سلولی *Dunaliella salina Teod.*

استادان راهنما:

دکتر منصور شریعتی

دکتر عباس المدرس

استاد مشاور:

دکتر محسن حسینی

پژوهشگر:

مریم معین

اسفندماه ۱۳۸۶

مرکز اطلاعات مدارک علمی ایران
شعبه مدارک

۱۳۸۸/۴/ ۶

۱۱۴۳۰۰

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه اصفهان است.

شیوه نگارش پایان نامه
رعایت شده است.
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست‌شناسی گرایش فیزیولوژی گیاهی خانم مریم معین تحت عنوان

بررسی اثر سالسیلیک اسید برروی رشد (تقسیم سلولی)، رنگیزه های فتوسنتزی و مقدار بتا-کاروتن در جلبک تک سلولی *Dunaliella salina Teod*.

در تاریخ ۱۳۸۶/۱۲/۱۴ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه ..عالی..... به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای اول پایان نامه دکتر منصور شریعتی با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

۲. استاد راهنمای دوم پایان نامه دکتر عباس المدرس با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

۳- استاد مشاور پایان نامه دکتر محسن حسینی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۴- استاد داور داخل گروه دکتر مجید قادریان با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۵- استاد داور خارج از گروه علی اکبر رامین با مرتبه ی علمی‌دانشیار امضا

امضای مدیر گروه

گروه زیست شناسی ۱۳۴۴ Department Of Biology 1965

سپاسگزاری

بر خود لازم می دانم مراتب سپاس و تشکر ویژه را از زحمات جناب آقای دکتر منصور شریعتی که بزرگترین راهنما و مشوق من در به ثمر رساندن این پایان نامه بوده اند اعلام دارم و امیدوارم که در تمام مراحل زندگیشان سلامت، موفق و مؤید باشند. همچنین از مشاوره ها و راهنمایی های دلسوزانه جناب آقای دکتر محسن حسینی قدردانی می نمایم. از سرکار خانم ضوئی که در طول اجرای این پایان نامه یاری گر من بودند کمال تشکر و قدردانی را دارم و با تشکر از تمامی اساتید محترم گروه زیست شناسی که در تمام این مدت راهنما و روشنگر راهم بودند.

همچنین از تمام کسا نی که در امر تحصیل و در مقاطع مختلف یار و مشوقم بوده اند، بخصوص پدر و مادر عزیزم که دعای خیر آنها همیشه بدرقه راهم بوده و خواهد بود و خواهر و برادرم که در تایپ پایان نامه مرا یاری رساندند و در نهایت از همسر عزیزم که در این مدت بهترین مشوق من بوده و امید و دلگرمی من برای ادامه راه است، کمال سپاس و قدردانی را دارم.

چکیده

Dunaliella salina یک ریز جلبک سبز تک سلولی است که بیشتر در دریاهای شور یافت می شود. تعداد کمی از ارگانیسمهای زنده قادر به زندگی در چنین شرایط شوری نظیر حوضچه های تبخیر نمک می باشند. این ارگانیسمها برای زنده ماندن غلظت بالایی از گلیسرول را تولید می کنند که در برابر فشار اسمزی از آنها حفاظت می کند. برخی گونه های *Dunaliella* قادر به سنتز مقدار زیادی بتا-کاروتن تحت شرایط استرسهایی نظیر افزایش شدت نور و نمک یا کاهش مواد غذایی هستند. بتا-کاروتن به طور وسیع در مواد آرایشی و مکملهای غذایی استفاده می شود. سالسیلیک اسید یک هورمون گیاهی و یک ترکیب فنولیک قوی می باشد. این هورمون عملکردهای بسیاری در گیاهان دارد نظیر : ایجاد ارتباط بین پیری گلبرگها و القاء گل دهی، تنظیم ترموژنز در لی لیوم، القاء گل دهی، مهار جذب فسفات و پتاسیم ، مهار بیوسنتز اتیلن، بیان ژنهای کد کننده پروتئینهای مربوط به پاتوژنز و القاء مقاومت به بیماری در گیاهان. در ارتباط با اثر پیری سالسیلیک اسید به نظر می رسد این هورمون بتواند بر روی سنتز بتا-کاروتن در *Dunaliella salina* تاثیر داشته باشد. بنابراین در این آزمایش *Dunaliella salina* تحت تاثیر سالسیلیک اسید قرار گرفت و سنتز بتا-کاروتن و سایر پارامترها نظیر تقسیم سلولی و تولید پیگمنتهای کلروفیل در ۴ تکرار مطالعه شد. تاثیر ۶ غلظت مختلف سالسیلیک اسید(۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۷۵۰۰ میکرو مولار) بر روی رشد و سنتز پیگمنتها مخصوصا کلروفیل a و b ، بتا-کاروتن، فتوسنتز و تنفس تحت شرایط ثابت (محلول تغییر یافته جانسون شامل ۱/۵ مولار نمک ، محدوده۱۶/۸ (تاریکی/ نور)، شدت نور ۱۵۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالسیلیک اسید نسبت به سایر غلظتها تاثیر بیشتری داشته است. بنابراین برای تمامی آزمایشات این غلظت انتخاب شد: نتایج نشان داد که غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالسیلیک اسید تقسیم سلولی، کلروفیل و بتا-کاروتن را در واحد حجم کاهش داد ولی میزان بتا-کاروتن را در سلول افزایش داد. نتایج کلی که در این آزمایش به دست آمد عبارتند از: کاهش تقسیم سلولی در غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالسیلیک اسید و به دنبال آن کاهش بتا-کاروتن و کلروفیل در واحد حجم، افزایش بتا-کاروتن در سلول به دنبال کاهش تقسیم سلولی، افزایش میزان بتا-کاروتن در واحد حجم طی بررسیهای کوتاه مدت (۲۴ ساعت).

کلید واژه: *Dunaliella salina* ، بتا-کاروتن، کلروفیل، سالسیلیک اسید

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱- جلبک *Dunaliella* ۱

۱-۱-۱- تاریخچه شناخت و موقعیت جلبک *Dunaliella* ۱

۱-۱-۲ مورفولوژی جلبک *Dunaliella* ۲

۱-۱-۳ فیزیولوژی جلبک *Dunaliella* ۴

۱-۱-۴ طبقه بندی جلبک *Dunaliella* ۵

۱-۱-۵ تولید مثل غیر جنسی جلبک *Dunaliella* ۵

۱-۱-۶ تولیدمثل جنسی در جلبک *Dunaliella* ۶

۱-۱-۷ رفتار اسموتیک سلولهای *Dunaliella* ۷

۱-۱-۸ کاربرد ریزجلبکها در بیوتکنولوژی و صنعت ۷

۱-۲ رنگیزه های جلبک *Dunaliella* ۸

۱-۲-۱ کلروفیل(خواص، ساختمان،مسیر بیوسنتزی) ۹

۱-۲-۲ اثر تنش بررنگیزه کلروفیل ۹

۱-۲-۳ کارتنوئیدها ۱۰

۱-۲-۳-۱ساختار کارتنوئیدها ۱۱

۱-۲-۳-۲ مسیر بیوسنتزی کارتنوئیدها در جلبک ها و گیاهان عالی ۱۲

۱-۲-۳-۳ نقش کارتنوئیدها ۱۲

۱-۲-۳-۴ مکانیسم حفاظتی کارتنوئید ۱۳

۱-۲-۳-۵ انواع کارتنوئید ۱۳

۱-۲-۳-۶ انواع کارتنوئیدها در جنس *Dunaliella* ۱۴

۱-۲-۴ بتا-کاروتن ۱۴

۱-۲-۴-۱ساختمان بتا-کاروتن ۱۴

۱-۲-۴-۲ بتا-کاروتن در *D.salina* ۱۵

۱-۲-۴-۳ کاربرد تجاری بتا-کاروتن جلبک تک سلولی *D. salina* ۱۵

۱-۳ ترکیبات فنولیک ۱۶

۱-۳-۱ ساختار و خواص فیزیکی سالسیلیک اسید ۱۷

عنوان | صفحه

۱-۳-۲ بیوسنتز و متابولیسم سالسیلیک اسید ۱۷
۱-۳-۳ اثرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سالسیلیک اسید ۱۹
۱-۳-۴ اثر سالسیلیک اسید بر تقسیم سلولی ۲۱
۱-۳-۵ اثر سالسیلیک اسید در تحمل استرس شوری ۲۱
۱-۳-۶ اثر سالسیلیک اسید برتنفس و فتوسنتز ۲۲
۱-۴ تنفس و فتوسنتز در *Dunaliella* ۲۴

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱ منبع تامین جلبک *D. salina* ۲۶
۲-۲ تهیه محیط کشت مایع جهت رشد بهینه جلبک *D. salina* ۲۶
۲-۳ تهیه سوسپانسیون جلبکی ۲۷
۲-۴ انتخاب غلظت مناسب شوری برای انجام آزمایشات اصلی ۲۸
۲-۵ انتخاب غلظتهای مورد نیاز سالسیلیک اسید برای آزمایشات اصلی ۲۸
۲-۶ نمونه برداری از سوسپانسیون جلبکی جهت شمارش و اندازه گیری میزان رنگیزه های کلروفیلی ... ۲۸
۲-۶-۱ شمارش سلولها ۲۹
۲-۶-۲ اندازه گیری رنگیزه ها ۲۹
۲-۷ بررسی اعمال شوری و سالسیلیک اسید ۲۹
۲-۸ بررسی استرس شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک بر روی سلولهای جلبکی تیمارشده با سالسیلیک اسید به میزان ۲۴ ساعت ۳۰
۲-۹ بررسی اثر تنفس و فتوسنتز در جلبکهای شاهدو تیمار شده ۳۰
۲-۹-۱ روش تهیه بافر فسفات ۳۰
۲-۹-۲ نمونه برداری جهت انجام آزمایشات مربوط به اندازه گیری فتوسنتز و تنفس ۳۱
۲-۹-۳ اندازه گیری میزان فتوسنتز و تنفس ۳۱
۲-۱۰ اندازه گیری میزان جذب فسفر و پتاسیم در محیط کشت حاوی جلبک ۳۲
۲-۱۰-۱ اندازه گیری فسفر به روش اسپکتروفتومتری ۳۲
۲-۱۰-۲ اندازه گیری میزان پتاسیم محلول محیط کشت ۳۳
۲-۱۱ بررسی های آماری ۳۳

عنوان | صفحه

فصل سوم: بحث و نتایج

۳-۱ بررسی تاثیر غلظتهای مختلف شوری (۱، ۱/۵، ۲ و ۳ مولار) برروی میزان رشد سلولی (تقسیم سلولی) سلولهای *D. salina* جهت بررسی مقدماتی غلظت مناسب شوری ۳۴

۳-۲ تاثیر غلظتهای مختلف سالسیلیک اسید بر روند تقسیم سلولی جهت بررسی مقدماتی غلظت مناسب سالسیلیک اسید ۳۶

۳-۳ بررسی تاثیر سالسیلیک اسید بر پاسخ روند تقسیم سلولی جلبک *D. salina* به اعمال استرس شوری ۳۸

۳-۴ بررسی تاثیر سالسیلیک اسید بر روند تولید کلروفیل کل در واحد حجم در جلبک *D. salina* و اعمال استرس شوری ۴۱

۳-۵ بررسی تاثیر سالسیلیک اسید بر روند تولید کلروفیل در سلول در جلبک *D. salina* و اعمال استرس شوری ۴۳

۳-۶ بررسی تاثیر سالسیلیک اسید بر روند تولید بتا-کاروتن در واحد حجم در جلبک *D. salina* و اعمال استرس شوری ۴۵

۳-۷ بررسی تاثیر سالسیلیک اسید بر روند تولید بتا-کاروتن سلولی در جلبک *D. salina* و اعمال استرس شوری ۴۵

۳-۸ بررسی تاثیر کوتاه مدت روند رشد سلولی در سلولهای *D. salina* تحت ۲۴ ساعت پیش تیمار سالسیلیک اسید ۴۸

۳-۹ بررسی تاثیر کوتاه مدت روند تولید کلروفیل کل در واحد حجم در سلولهای *D. salina* تحت ۲۴ ساعت پیش تیمار با سالسیلیک اسید ۴۹

۳-۱۰ بررسی تاثیر کوتاه مدت روند تولید کلروفیل کل در سلول در سلولهای *D. salina* تحت ۲۴ ساعت پیش تیمار با سالسیلیک اسید ۵۲

۳-۱۱ بررسی تاثیر کوتاه مدت روند تولید بتا-کاروتن در واحد حجم در سلولهای *D. salina* تحت ۲۴ ساعت پیش تیمار با سالسیلیک اسید ۵۴

۳-۱۲ بررسی تاثیر کوتاه مدت روند تولید بتا-کاروتن سلولی در سلولهای *D.ssalina* تحت ۲۴ ساعت پیش تیمار با سالسیلیک اسید ۵۴

عنوان **صفحه**

۳-۱۳ بررسی روند طولانی مدت تغییرات میزان رشد سلولی *D. salina* تحت ۲۴ ساعت پیش تیمار سالسیلیک اسید و سپس اعمال استرس شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک ۵۷

۳-۱۴ بررسی روند طولانی مدت تغییرات میزان تولید کلروفیل کل در واحد حجم در سلولهای *D. salina* تحت ۲۴ ساعت پیش تیمار سالسیلیک اسید و سپس اعمال استرس شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک ۵۹

۳-۱۵ بررسی روند طولانی مدت تغییرات کلروفیل سلولی در سلولهای *D. salina* تحت ۲۴ ساعت پیش تیمار با سالسیلیک اسید و سپس اعمال استرس شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک ۶۱

۳-۱۶ بررسی روند طولانی مدت تغییرات میزان بتا-کاروتن در واحد حجم در سلولهای *D.salina* تحت ۲۴ ساعت پیش تیمار با سالسیلیک اسید و سپس اعمال استرس شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک ۶۳

۳-۱۷ بررسی روند طولانی مدت تغییرات میزان بتا-کاروتن سلولی در سلولهای *D.salina* تحت ۲۴ ساعت پیش تیمار با سالسیلیک اسید و سپس اعمال استرس شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک ۶۵

۳-۱۸ بررسی میزان جذب فسفر و پتاسیم موجود در محیط کشت توسط سلولهای *D. salina* تحت تیمار سالسیلیک اسید ۶۷

۳-۱۹ بررسی استرس شوری و تاثیر غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالسیلیک اسید در شوری ۱/۵ مولار بر فتوسنتز وتنفس درجلبک *D. salina* ۶۹

۳-۱۹-۱ بررسی میزان فتوسنتز خالص و فتوسنتز کل تحت استرس شوری ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک و غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالسیلیک اسید ۶۹

۳-۱۹-۲ بررسی تنفس تحت استرس شوری و تاثیر غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالسیلیک اسید در غلظت ۱/۵ مولار نمک ۷۲

فصل چهارم: جمع بندی نتایج

منابع و مأ خذ ۷۷

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱. عناصر و مواد غذایی مورد نیاز برای رشد جلبک *D. salina* جهت تهیه یک لیتر محلول غذایی ۲۷

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل۳-۱. تاثیر غلظتهای مختلف نمک (۱، ۱/۵، ۲ و ۳ مولار) بر روند تقسیم سلولی در جلبک *D. salina* ۳۵

شکل۳-۲. تاثیر غلظتهای مختلف (میکرومولار) سالسیلیک اسید بر روند رشد (تقسیم سلولی) در جلبک *D. salina* ۳۷

شکل۳-۳. بررسی اثر همزمان سالسیلیک اسید ۵۰۰۰ میکرومولار و استرس شوری(۱/۵ مولاربه ۳ مولار نمک) بر روند رشد سلولی در جلبک *D. salina* کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار نمک. ۳۹

شکل ۳-۴. بررسی اثر همزمان سالسیلیک اسید ۵۰۰۰ میکرومولار و استرس شوری(۱/۵ مولاربه ۳ مولار نمک) برتولید کلروفیل کل در واحد حجم (میکروگرم بر میلی لیتر) در جلبک *D. salina* کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار نمک. ۴۲

شکل۳-۵. بررسی اثر همزمان سالسیلیک اسید ۵۰۰۰ میکرومولار و استرس شوری(۱/۵ مولاربه ۳ مولار نمک) برتولید کلروفیل سلولی (پیکوگرم در سلول) در جلبک *D. salina* کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار نمک. ۴۴

شکل۳-۶. بررسی اثر همزمان سالسیلیک اسید ۵۰۰۰ میکرومولار و استرس شوری(۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک) برتولید سبتا-کاروتن در واحد حجم (میکروگرم بر میلی لیتر) در جلبک *D. salina* کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار نمک. ۴۶

شکل۳-۷. بررسی اثر همزمان سالسیلیک اسید ۵۰۰۰ میکرومولار و استرس شوری(۱/۵ مولاربه ۳ مولار نمک) برتولید بتا-کاروتن در سلول (پیکوگرم بر میلی لیتر) در جلبک *D. salina* کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار نمک. ۴۷

شکل۳-۸. روند تغییرات میزان رشد سلولی در سلولهای *D. salina* در مدت ۲۴ تیمار با سالسیلیک اسید ۵۰۰۰ میکرومولار و در محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl. ۵۰

شکل۳-۹. روند تغییرات کلروفیل کل در واحد حجم (میکروگرم در میلی لیتر) سلولهای *D. salina* در مدت ۲۴ ساعت تیمار با سالسیلیک اسید ۵۰۰۰ میکرومولار و در محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl. ۵۱

شکل۳-۱۰. روند تغییرات تولید کلروفیل کل در سلول (پیکوگرم در سلول) سلولهای *D. salina* در مدت ۲۴ ساعت تیمار با سالسیلیک اسید ۵۰۰۰ میکرومولار و در محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl. ۵۳

عنوان | صفحه

شکل۳-۱۱. روند تولید بتا-کاروتن در واحد حجم (میکروگرم در میلی لیتر) سلولهای *D. salina*، در مدت ۲۴ ساعت تیمار با سالسیلیک اسید ۵۰۰۰ میکرومولار و در محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl..... ۵۵
شکل۳-۱۲. روند تولید بتا-کاروتن سلولی (پیکوگرم در سلول) سلولهای *D. salina*، در مدت ۲۴ ساعت تیمار با سالسیلیک اسید ۵۰۰۰ میکرومولار و در محیط کشت ۱/۵ مولار NaCl..... ۵۶
شکل۳-۱۳. روند تغییرات میزان رشد سلولی *D. salina* تحت ۲۴ ساعت تیمار سالسیلیک اسید با غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار و سپس اعمال استرس شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک..... ۵۸
شکل۳-۱۴. روند تغییرات میزان تولید کلروفیل کل در واحد حجم (میکروگرم بر میلی لیتر) در سلولهای *D. salina* تحت ۲۴ ساعت تیمار با سالسیلیک اسید و سپس اعمال استرس شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک..... ۶۰
شکل۳-۱۵. روند تغییرات کلروفیل سلولی (پیکوگرم در سلول) *D. salina* تحت ۲۴ ساعت تیمار با سالسیلیک اسید با غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار و سپس اعمال استرس شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک..۶۲
شکل۳-۱۶. روند تغییرات میزان بتا کاروتن در واحد حجم (میکروگرم بر میلی لیتر)*D. salina* تحت ۲۴ ساعت تیمار با سالسیلیک اسید با غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار و سپس اعمال استرس شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک..... ۶۴
شکل۳-۱۷. روند تغییرات بتا کاروتن سلولی (پیکوگرم در سلول) *D. salina* تحت ۲۴ ساعت تیمار با سالسیلیک اسید با غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار و سپس اعمال استرس شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک..۶۶
شکل۳-۱۸. میزان جذب فسفر در ۴۸ ساعت دوره آزمایش توسط سلولهای *D. salina* تحت تیمار سالسیلیک اسید..... ۶۸
شکل۳-۱۹. میزان فتوسنتزخالص (برحسب نانومول اکسیژن آزاد شده بر میکروگرم کلروفیل بر دقیقه) قبل و بعد از استرس در جلبک *D. salina* سویه MUR8، در غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالسیلیک اسید و تحت استرس شوری ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک..... ۷۰
شکل۳-۲۰. میزان فتوسنتزکل (برحسب نانومول اکسیژن آزاد شده بر میکروگرم کلروفیل بر دقیقه) قبل و بعد از استرس در جلبک *D. salina* سویه MUR8، در غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالسیلیک اسید و تحت استرس شوری ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک..... ۷۱
شکل۳-۲۱ . میزان تنفس (برحسب نانومول اکسیژن جذب شده بر میکروگرم کلروفیل بر دقیقه) قبل و بعد از استرس در جلبک *D. salina* سویه MUR8، در غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالسیلیک اسید و تحت استرس شوری ۱/۵ مولار به ۳ مولار نمک..... ۷۳

مقدمه:

ریزجلبکها گروهی از جلبکهای تک سلولی و به ندرت رشته ای هستند که اکثراً دارای تـاژک مـی باشـند و در محیطهای شور و مهارکنندهٔ رشد معمولی و در غلظتهای مختلف نمک قادر به تولید پیگمنتهـای کارتنوئیـدی فراوان هستند. ریز جلبکها منبع طبیعی بزرگی از ترکیبات قابل دسـترس شـامل انـواع مختلـف پیگمنـت هـا هستند، به این منظور میکروارگانیسم های فتوسنتز کننده در حال حاضر منبع بیولوژیکی وسیعی بـه حـساب می آیند. از کارتنوئیدهای زرد، نارنجی و قرمز استفاده های صنعتی در تولیدات غذایی و وسـیله هـای آرایـشی به عنوان مکمل های ویتامینی و تولیدات غذایی سالم و به عنوان اضافه کننده های غذایی سالم برای ماکیـان، چهارپایان، ماهیها و خرچنگها استفاده می شود.توسعه جهانی و ارزش ویـژه کارتنوئیـدها در دهـه هـای اخیـر مشخص شده است. این پیشرفت با هدف اثبات خواص آنتی اکسیدانتی کارتنوئیدها کامل شده است. اخیـرا در راستای سلامتی انسان استفاده های جدیدی از کارتنوئیدها کشف شده است و مـصرف کننـده هـای تولیـدات طبیعی از توسعه منابع بیولوژیکی پیگمنتها استفاده های وسـیعی مـی کننـد (Montanya *et al.*, 2006 and Del Campo *et al.*,2007). یکـی از ایـن ریزجلبکهـا *D. salina* اسـت کـه از خـانوادهٔ Chlorophyceae است که بزرگترین گروه جلبکهای سبز است. بهترین ریز جلبکهای شـناخته شـده نظیـر *Dunaliella , Chlamydomonas ,Chlorella* و *Haematococcus* متعلـق بـه ایـن گـروه هستند(Del Campo *et al.*, 2007 and Oren *et al.*, 2005) و به راسـتهٔ Volvocals تعلـق دارنـد. برخی ریز جلبکهای کلروفیسه ای کارتنوئیدها را به عنوان بخشی از وزن مولکولی در خود ذخیره می کنند، به طوریکه برخی از این پیگمنتها تنـاوب بیولـوژیکی شـگرفی را بـا منـابع اجـدادی خـود نـشان داده انـد(Del Campo *et al.*, 2007).

ریزجلبک *D. salina* مقاومترین موجود یوکاریوت نسبت به شوری است که در بسیاری از محیطهـای حـاوی نمک نظیر دریاچه ها و مرداب های آب شور یافت می شود. این جلبکهـا قـادر بـه تجمـع مقـادیر زیـادی β-کاروتن (بیش از ۱۰٪ وزن خشک) تحت شرایطی نظیر شوری زیاد، شدت نور بالا و محدودیت مواد غذایی می باشد. کشت و نگهداری این ریز جلبکها آسان است به طوریکه تکنولوژی تولید مواد (بـرای مثـال تولیـد بتـا-کـاروتن در جلبـک *D. salina* و آگزاگـزانتین در *Haematococcus* و لـوتئین درشـاخه هـای *Chlorophycean*) بر سیستمهای استخرهای باز یا بیو راکتورهای بسته پایه ریزی شده است و از آنجـا کـه فوتو بیوراکتورها پیشرفت شگرفی داشته اند تولیدات بهتر با کیفیت عالی تر از لحاظ بیومس مولکـولی از آنهـا به دست آمده است و قادر به تولید انواع مواد بیواکتیو (ضد میکروب و ضد ویروس)، توکسین ها، بتـا-کـاروتن، گلیسرول و انواع ویتامینها هستند که در صنایع داروسازی، تولید آنتی بیوتیکها و صنایع غذایی کـاربرد فـراوان دارد این سیستمها همگی برروی این میکروارگانسیم های فتوسنتز کننده پایه ریزی شده اند (Del Campo *et al.*, 2007).

بتا-کاروتن عضوی از خانوادهٔ کارتنوئیدها است و یک پیگمنت قابل حل در چربی است که بطور اختصاصی در جلبکها (*D. salina*) و گیاهان و باکتریهای فتوسنتزی یافت شده است. این ماده دارای فعالیت آنتی اکسیدانت است و ارتباطات درون سلولی را افزایش می دهد و دارای فعالیتهای immunomodulatory و ضد سرطانی است (Rao, and Agarwal, 2000). با استفاده از *D. salina* در موشهایی که دارای تومور سرطانی بوده اند، کاهش سطوح بسیاری از فاکتورهای شیمیایی موثر در سرطان، پائین آمدن تنظیم رسپتورهای فاکتورهای خاص اپیدرمی و کاهش فعالیت آدنیل سیکلاز را شاهد بودند(Raja *et al.*, 2007).

سالسیلیک اسید (SA) یک ترکیب فنولیک بی نظیر است که جزء فیتوهورمونها به شمار می آید و در میان ترکیبات فنولیک مشتقات بنزوئیک و سینامیک اسیدها دارای اثراتی بی نظیر بر روی متابولیسم و بیوسنتز و همچنین فعالیتهای اکسیداتیو و فعالیتهای بیولوژیکی نظیر رشد و نمو، فتوسنتز، تنفس، جذب و انتقال یونها، تغییر فعالیت برخی آنزیمهای مهم و همچنین القاء تغییرات خاص در آناتومی برگ و ساختار کلروپلاست می باشد(Appel, 2005; Glass, 1973 and Krantev *et al.*, 2006).

از آنجا که طی مطالعات بسیاری نشان داده شده است سالسیلیک اسید با افزایش سطح برخی فیتوهورمونها نظیر ابسیزیک اسید پیری را در گیاهان تسریع کرده و کاهش تقسیم سلولی و مرگ سلولی را سبب می شود همچنین این فیتوهورمون تاثیر آسینها و خسارتهای اکسیداتیو را در گیاهانی که تحت تنش شوری و اسموتیک قرار می گیرند افزایش می دهد و علی رغم این اثر افزایش توان آنتی اکسیدانتی از جمله نقشهای اساسی سالسیلیک اسید گزارش شده است و از طرفی حضور هورمون ابسیزیک اسید در جلبک *D. salina* گزارش شده است همچنین کاهش روند تقسیم سلولی در این جلبک تحت تاثیر تنشهای محیط خارج سبب افزایش میزان بتا-کاروتن در جلبک *D. salina* می شود، لذا در این تحقیق نقش سالسیلیک اسید به همراه تنشهای اسموتیک و به دنبال آن روند تقسیم سلولی سنتز بتا-کاروتن و کلروفیل بررسی شد اهداف:

۱- با توجه به عدم گزارش وجود سالسیلیک اسید در جلبک *D. salina* ، آیا استعمال خارجی آن می تواند بر روی فعالیتهای متابولیکی نظیر بتا-کاروتن، کلروفیل، تنفس و فتوسنتز مؤثر باشد؟

۲- آیا سالسیلیک اسید با توجه به نقش آن در تسریع پیری در گیاهان و کاهش روند تقسیم سلولی می تواند در میزان سنتز بتا-کاروتن مؤثر باشد؟

۳- آیا با توجه به برخی گزارشها مبنی بر تاثیر سالسیلیک اسید بر افزایش خسارتهای اکسیداتیو، آیا سالسیلیک اسید می تواند با افزودن خسارتهای اکسیداتیو، جلبک را وادار به افزایش آنتی اکسیدان بتا-کاروتن جهت مقابله نماید؟

۴- آیا با توجه به نقش سالسیلیک اسید در گیاهان مبنی بر کاهش اثر شوری، سالسیلیک اسید می تواند بر استرس شوری در جلبک *D. salina* مؤثر باشد؟

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- جلبک *Dunaliella*[1]

۱-۱-۱- تاریخچه شناخت و موقعیت جلبک *Dunaliella*

در حدود یک قرن از شناخت جنس *Dunaliella* گذشته است، این جلبک سبز تک سلولی[2] است و به محیطهای بسیار شور جهان با تولید ترکیبات اولیه پاسخ می دهند(Oren , 2005) .

این جلبک اولین بار در سال۱۸۳۸ و توسط dunal با تبخیر دریاچه های شور در فرانسه دیده شد،dunal این ارگانیسم ها را *Haematococcus, salinus* و *Protococcus* نامید. در همین سال Clara Hamburger نیز توضیحاتی از این گونه ها منتشر کرد(dunal, 1838 به نقل از Oren, 2005) در سال ۱۹۰۵ جنس *Dunaliella* برای اولین بار نامگذاری شد و بر اساس کلکسیون جمع آوری شده ازدریاچه شور رومانی، *Dunaliella salina* به عنوان یک گونه معرفی شد (Teodoresco, 1905 به نقل از Preisig, 1992).

---

[1] *Dunaliella*
[2] Unicellular green algae

گونه های جدید که بیشتر شامل گونه های دریاچه ای بودند از سال ۱۹۳۵ تا ۱۹۵۹ توسط بسیاری از دانشمندان شناخته و معرفی شدند (Baas-Becking 1935; Lerch,1937; Butcher,1959 به نقل از Oren, 2005) و از قرن نوزدهم تا کنون مطالعات تاکزونومیک[1] فراوانی توسط بسیاری از دانشمندان از جمله Hamburger, Lerch و دیگران برروی این جلبک انجام شده است(Hamburger, 1838 and Lerch, 1937 به نقل از Borowitzka, and Siva, 2007). همچنین در سال ۱۹۷۳ به طور سیستماتیکی مفاهیم تاکزونومیک بررسی و آزمایش شد و بطور جامع جنسها و گونه ها با شناسایی ۲۹ جنس همچنین تعدادی از اشکال و واریته[2] ها، اصلاح گردید. درهمین سال massyuk ۲۳ گونه از جلبک یوکاریوت تاژکدار بدون دیواره جنس *Dunaliella* را در محیطهای شور پیدا کرد و رشد اپتیمم آن را در غلظتهای مختلف نمک که تحت شرایط خاص محیط کشت به شکل قرمز- نارنجی تغییر می یابند مشخص کرد (Massyuk *et al.*, 1973).

در قرن نوزدهم جلبکهای دو تاژکی قرمز توسط Dunal و سایر بیولوژیستها در دریاچه های شور مشاهده شدند و به هر یک از این ارگانسیم ها اسامی مختلفی داده شد. از آن زمان جنس *Dunaliella* موضوع بسیاری از مطالعات فیزیولوژی، بیوشیمی، اکولوژی و کاربردهای تجاری شده است که در نتیجه فاکتورهایی نظیر ۱)سهولت کشت بسیاری از گونه ها ۲) توانایی چندین گونه برای رشد در محدوده وسیعی از شوری وهمچنین شوریهای بینهایت ۳) تجمع وسیعی از بتا-کاروتن در *D. salina* ۴)تحمل وسیعی از فلزات سنگین و آفت کش ها توسط برخی از گونه ها به دست آمده است (Borowitzka, and Siva, 2007) و در سال ۱۹۹۲ توسط Cowan et al. از *Dunaliella* به عنوان یک مدل سیستم، برای مطالعات سازگاری به شوری استفاده شد(Cowan *et al.*,1992).

۱-۱-۲ مورفولوژی جلبک *Dunaliella*

Melkonian et al. در سال ۱۹۸۰ با مطالعه بروی مورفولوژی *Dunaliella* گزارش کرد که سلولهای *Dunaliella* به علت پتانسیلی که برای ایجاد تنوع در شکل سلولی و در شرایط مختلف محیطی دارند می توانند بیضی[3]، تخم مرغی[4] و تقریبا کروی[5]، گلابی شکل[1] یا دوکی شکل[2] باشند.

---

[1] Taxonomic
[2] Variety
[3] Ellipssoid
[4] Ovoid
[5] Spherical

تحت بسیاری شرایط و به دنبال شوک اسمزی برای چند دقیقه سلولها اغلب کروی می شوند و سپس به حالت طبیعی بر می گردند. در محیطهای قدیمی و به خصوص در نور کم سلولها غول پیکر و نامنظم و آمیبی شکل[۳] می شوند. تاثیر دمای پائین احتمالا در ارتباط با شکسته شدن میکروتوبولهای[۴] سایتواسکلتون[۵] می باشد). اگرچه تحت شرایط طبیعی شکل سلولی بسیار پایدار است و یک مشخصهٔ بسیار خوب تاگزونومیک می باشد (Melkonian *et al.*, 1980 به نقل از Ben -Amotz *et al.*, 1992). با بررسی سلولهای این جنس توسط میکروسکوپ الکترونی مشخص گردید که اعضاء جنس *Dunaliella* فاقد دیواره سلولی هستند ولی دارای یک پوشش سلولی گلیکوپروتئینی- سلولزی است که ازفیبریلهای طویل ۲۵-۲۰۰ نانومتری تشکیل شده است (Oliveira *et al.*, 1980) ، همچنین توسط میکروسکوپ الکترونی وجود یک لایه غیر شفاف نازک را در اطراف سلول تشخیص داده شده است (Montanya *et al.*, 2006) درسلولهای پیرتر یک پوشش موسیلاژی[۶] از نوع گلیکوکالیکسی[۷] با ضخامت متنوع دیده شد (Borowitzka, and Siva, 2007). با مطالعات مورفولوژیکی وسیعی که برروی جنس *Dunaliella* انجام گرفته است مشخص شد که سلولهای متحرک دارای دو تاژک[۸] هستند که تاژک در انتهای قدامی سلول قرار دارد. طول تاژک در بین گونه های مختلف متفاوت است و به نظر می رسد مشخصهٔ تاگزونومیک خوب و پایداری برای شناسایی گونه ها باشد. همچنین یک برآمدگی کوچک در انتهای تاژک به خصوص در سلولهای جوان مشاهده می شود.

یک کلروپلاست بزرگ قسمت خلفی بیشتر سلولهای *Dunaliella* را اشغال کرده است که فنجانی شکل، مقعر و پهن است و در قسمت انتهای ضخیم شده همه گونه ها به استثناء برخی گونه های آب شیرین شامل پیرنوئید[۹] می باشد(Borowitzka, and Siva, 2007). اندازه سلولهای جنس *Dunaliella*، مانند بسیاری از جلبکهای تک سلولی، ارتباط معکوسی با میزان رشد سلولی دارد. همچنین با افزایش شوری در همهٔ سویه ها افزایش طول، عرض و حجم سلولی مشاهده می شود(Uriarte *et al.*, 1993). این افزایش در حجم و اندازه

---

[1] Pyriform
[2] Fusiform
[3] Amoeboid
[4] Microtubules
[5] Cytoskeletal
[6] Mucilaginous
[7] Glycocalyx
[8] Flagella
[9] Pyrenoid

می تواند با تجمع محلول گلیسرول[1] که بعنوان اسمولیت[2] اصلی در گونه های *Dunaliella* ذخیره می شود ارتباط مستقیمی داشته باشد(Borowitzka, and Brown, 1974 and Borowitzka *et al.*, 1977) .

۱-۱-۳-فیزیولوژی جلبک *Dunaliella*

جلبک *Dunaliella* قابلیت فیزیولوژیکی بسیار اختصاصی از خود نشان داده است به گو نه ای که تکامل صفات فیزیولوژیکی آن نقش مهمی را در گسترش بیوتکنولوژی برای کشت وسیع این گونه ها فراهم ساخته است. این جلبک با تولید بتا-کاروتن[3] در محیطهای بسیار شور و در غلظتهای مختلف نمک قادر است تحت حالتهای خاص به شکل قرمز- نارنجی درآید (Goyal *et al.*, 2007 and Borowitzka *et al.*, 1990). Aasen و همکاران در سال ۱۹۶۹ با بررسی میزان بتا-کاروتن در گونه های *Dunaliella* بیان کردند که برخی گونه‌های *D. salina* می توانند مقدار زیادی از این کاروتنوئید[4] را تولید و انباشته نمایند. بنابراین در دریاچه‌ها بیش از ۱۳/۸٪ از ماده آلی خشک *D. salina* و در محیط کشت بیش از ۱۰٪ یا بیشتر وزن خشک آنها بتا-کاروتن تخمین زده شده است که درصد بالایی از آن شامل ایزومر ۹-سیس است(Aasen *et al.*, 1969).

از طرفی این ارگانسیم های متحرک خود را با محدوده وسیعی از غلظتهای نمک سازگار کرده اند به طوریکه سلولهای *Dunaliella* می توانند با تجمع گلیسرول (عنصر اسموتیک داخلی)، افزایش دفع یونهای Na^+ و تجمع پروتئینهای خاص به استرس شوری پاسخ دهند(Uri, 2004).

درسال ۱۹۷۳ Ben-Amotz et al. سازگاری با محیطهای بسیار شور را به دلیل تجمع گلیسرول بعنوان یک محلول اسمولیت که داخل سلول گونه های *Dunaliella* ذخیره می شود دانست به طوریکه در پاسخ به غلظت خارجی نمک، گلیسرول داخل سلولی تجزیه یا سنتز می شود (Ben-Amotz, and Avron, 1973 and Borowitzka, and Siva, 2007).

طی آزمایشاتی که Chitlaru و همکاران در سال ۱۹۹۱ بر روی مسیر بیو سنتزی *Dunaliella* انجام دادند مشخص گردید که سنتز گلیسرول در داخل سلولهای *Dunaliella* طی دو واکنش متوالی از دهیدروکسیلاسیون فسفات(DHAP) و نه از راه سیکل گلیسرول متابو لیزه می شود. آنزیمهای لازم برای انجام این دو واکنش شامل گلیسرول ۳- فسفات دهیدروژناز[5] یا DHAP ردکتاز[1] و گلیسرول ۳- فسفات فسفاتاز[2] می

---

[1] Glycerol
[2] Osmolyte
[3] Beta-caroten
[4] Cartenoid
[5] Glycerol 3-phosphate dehydrogenase

باشد، از طرفی گلیسرول می تواند بوسیله گلیسرول دهیدروژناز[3] و دهیدروکسی استون کیناز[4] تجزیه شود (Chitlaru, and Pick, 1991).

۱-۱-۴ طبقه بندی جلبک *Dunaliella*

طبقه بندی جنس *Dunaliella* در حال حاضر به دلیل وسعت شرایط طبیعی که جلبکها در آن رشد می کنند و قابلیت تغیرپذیری مورفولوژیکی شان(به علت نبود دیواره سلولی) هنوز تحت بررسی است (Ben-Amotz, and Shaish, 1992 and Borowitzka, and Siva, 2007).

طبقه بندی جنس *Dunaliella* در سال ۱۹۷۳ اصلاح شد و تهیه مونوگراف[5] از آن توسط Preisig در سال۱۹۹۲ پایه ریزی یک بررسی وسیع تر از تاگزونومی جنس *Dunaliella* را به همراه داشت (Massyuk, 1973).

به طور کلی *Dunaliella* و دیگر تاژکداران[6] سبز بدون دیواره همگی در خانواده Polyblepharidaceae و در راسته Volvocales طبقه بندی شدند(Avron *et al.*, 1992) ولی با مطالعات بیشتر بر روی این تاژکداران سبزطبقه بندی جدیدی شکل گرفت به طوریکه *Dunaliella* و ۱۶ جنس دیگر در خانواده Chlorophyceae قرار داده شد (Ettl , 1976 به نقل از Borowitzka, and Siva, 2007).

از سال ۱۹۹۹ به بعد تکنیکهای فیلوژنی[7] ملکولی بسیاری برای مطالعات تاگزونومی بکار گرفته شده است. این مطالعات براساس ژنهای ۱۸sRNA و مناطق جداکننده رونویسی همچنین براساس مقایسه توالی ژن های محدودکننده پایه‌ریزی شده است به طوریکه براساس توالی ژنهای ۱۸sRNA اختلافات بین *D.salina* *D.parva, D.bardawill* به گونه‌ای است که به ترتیب دارای ۱،۲و۳ اینترون[8] در ژن ۱۸ sRNA هستند(Oren, 2005).

۱-۱-۵ تولید مثل غیر جنسی جلبک *Dunaliella*

---

[1] DHAP-redoctase
[2] Glycerol 3-phosphate phosphatase
[3] Glycerol dehydrogenase
[4] Dehydroxy acetone kinase
[5] Monograph
[6] Flagellar
[7] phylogeny
[8] Intron