اثر کمبود سولفور بر رشد سلولی، تولید بتاکاروتن، کلروفیل و فتوسنتز در جلبک *Dunaliella salina* جدا شده از مرداب شور گاوخونی اصفهان

پیمان آقایی[۱و۲] و منصور شریعتی*[۱]

[۱]اصفهان، دانشگاه اصفهان ، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲]اردستان، دانشگاه پیام نور مرکز اردستان، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۵/۰۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰۸/۱۸

چکیده

نظر به اینکه اطلاعات کمی در رابطه با تأثیر فاکتورهای محیطی گوناگون بر رشد سلولی و سنتز رنگیزه در سویه ایرانی جلبک *Dunaliella salina* (جدا شده از مرداب گاوخونی اصفهان) وجود دارد و هنوز تمامی قابلیتهای این سویه شناسایی نشده است، ضروری است که تحقیقات دقیق تر و بیشتری در این زمینه انجام گیرد. لذا در این تحقیق ضمن بررسی تأثیر چهار غلظت سولفات (۰، ۰/۲۵، ۰/۷۵و ۵ میلی مولار) بر روند رشد و میزان سنتز رنگدانه ها، تغییر میزان فتوسنتز جلبک نیز تحت شرایط محدودیت سولفات بررسی شد. بدین منظور سلولهای جلبکی در محیط غذایی با غلظتهای مختلف سولفات (۰،۰/۲۵،۰/۷۵ و ۵ میلی مولار) کشت، و غلظت ۵ میلی مولار سولفات بعنوان شاهد در نظر گرفته شد. سپس طی سی روز و در چهار تکرار، روند تقسیم سلولی، میزان تولید رنگدانه ها و پاسخ فتوسنتز جلبک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که محدودیت سولفات منجر به کاهش روند تقسیم سلولی، کاهش میزان کلروفیل و تا حدودی افزایش بتاکاروتن سلولی می گردد. همچنین بررسی فتوسنتز جلبک *D. salina* تحت شرایط محدودیت سولفور نشان داد که کاهش غلظت سولفور میزان فتوسنتز را بشدت کاهش می‌دهد.

واژه های کلیدی: کمبود سولفور، بتا کاروتن، کلروفیل، فتوسنتز *Dunaliella salina*

* نویسنده مسئول، تلفن تماس:۰۹۱۳۳۱۵۹۹۹۲ ، پست الکترونیک: mansour_shariati@yahoo.com

مقدمه

Dunaliella salina یک جلبک سبز تک یاخته‌ای، متحرک و فاقد دیواره سلولی است که همواره بعنوان یک سیستم مدل جهت مطالعات پاسخ موجود به تنشهای محیطی مورد توجه محققان است (۱۷، ۲۳). این جلبک مقاوم ترین موجود یوکاریوت نسبت به شوری است که در بسیاری از محیطهای حاوی نمک نظیر دریاچه‌های نمک، باتلاقهای نمکی و گودالهای آب شور نزدیک دریا یافت می‌شود (۱۵). یکی از ویژگیهای منحصر بفرد این جلبک توانایی تولید و تجمع مقادیر زیاد بتاکاروتن تحت شرایطی نظیر شوری زیاد، شدت نور بالا و محدودیت مواد غذایی است که منجر به نارنجی شدن رنگ سلول و سوسپانسیون جلبکی می شود (٤، ٥، ٩، ١٢، ١٣، ١٤). هنوز نمی توان درباره وظایف بتاکاروتن و علل افزایش سنتز آن در جلبک *Dunaliella* بصراحت اظهار نظر کرد. نقش بتاکاروتن بعنوان یک منبع ذخیره کربن جهت استفاده در شرایط: محدودیت رشد، فرونشاندن اکسیژن یکتایی کاتالیز شده توسط کلروفیل و مقابله با صدمات ناشی از نور شدید به کمک چرخه آپوکساید و نیز جذب انرژی اضافی و انتقال آن به کلروفیل، از جمله فرضیه های مطرح در این زمینه می باشد (۷، ۱۲، ۲۵، ۳۲). تاکنون تحقیقات متعددی در زمینه سنتز بتاکاروتن تحت تأثیر تنشهای مختلف بر روی سویه ایرانی جلبک *Dunaliella salina* صورت گرفته

Archive of SID

www.SID.ir

است که تأثیر فلزات سنگین، غلظت نیترات، شوری بالا و نور شدید از آن جمله اند (٤، ٥، ٦، ۳۳، ۳۵). کاهش سولفات نیز می تواند پاسخهای متعددی را در این جلبک القاء کند. عمومی ترین پاسخ به محدودیت سولفور کاهش رشد و فتوسنتز است (١٦، ١٩). همچنین گزارش شده است که کمبود سولفات تا حدودی باعث افزایش بتاکاروتن شده و میزان کلروفیل را کاهش می دهد (۱۳،۹) و تجزیه برخی پروتئینهای مهم درون سلولی از جمله روبیسکو افزایش می یابد (۲۳). ارزش اقتصادی بالای این جلبک (دارویی، تغذیه ای و صنعتی)، وجود اطلاعات کم و در پاره ای موارد غیر قابل استناد و ضد و نقیض (۳، ۹، ۱۱، ۲۹، ۳٦) در رابطه با تأثیر فاکتورهای محیطی بر جلبک *salina D*. لزوم انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه را آشکار می سازد. هدف از این تحقیق بررسی اثر غلظت سولفات بر روند تغییرات محتوای رنگدانه ای و پاسخ فتوسنتز سویه ایرانی جلبک *salina .D* به آن است.

مواد و روشها

جلبک *D. salina* مورد مطالعه، از کلکسیون گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان، جدا شده از مرداب شور گاوخونی اصفهان تأمین گردید (۳۳). کشت و نگهداری آنها در محیط غذایی اصلاح شده جانسون و همکاران (۳٤) در pH حدود ۷/۲ انجام شد. سوسپانسیون حاصل به اتاقک رشد (Conviron E15, Canada) منتقل و تحت دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نوری حدود ۱۰۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع بر ثانیه، همچنین دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد برای روز و ۲۳ درجه سانتی‌گراد برای شب قرار گرفت. سوسپانسیون برروی دستگاه شیکر (INFORAGCH. 4130 BOTTNINGEN) با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه قرار داده شد. با شروع مرحله ایستایی رشد، ۱۰ میلی لیتر از نمونه جلبکی فوق به ۹۹۰ میلی لیتر محیط کشت فاقد سولفات تلقیح و پس از رشد، مرحله اخیر دو بار دیگر تکرار شد. به این ترتیب که هربار به سوسپانسیون جلبکی فاقد سولفات اجازه داده شد تا در شرایط فوق الذکر، مرحله تصاعدی رشد خود را طی کند و به فاز ایستایی رشد برسد، آنگاه تلقیح از این سوسپانسیون به محیط فاقد سولفات صورت می گرفت. بمنظور جبران کمبود منیزیم ناشی از حذف سولفات منیزیم، کلرید منیزیم ($MgCl_2$) متناسب با کاهش غلظت سولفات منیزیم به این محیط اضافه گردید. در ادامه با انجام یک دوره آزمایش مقدماتی با ۱۰ غلظت مختلف سولفات منیزیم (۰، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی مولار) و بررسی روند رشد جلبکها و میزان تولید رنگیزه های آنها، چهار غلظت از سولفات منیزیم (۰، ۰/۲۵، ۰/۷۵ و ۵ میلی مولار) جهت بررسی اثر غلظتهای مختلف سولفات بر میزان رنگیزه های بتاکاروتن و انواع کلروفیل و همچنین میزان فتوسنتز در طول یک دوره ۳۰ روزه انتخاب شد. در این آزمایشات، غلظت ۵ میلی مولار سولفات منیزیم بعنوان غلظت شاهد درنظر گرفته شد. جهت شمارش و تعیین روند رشد سلولها از لام شمارش سلولی Neobar (هموسایتومتر) و با بزرگنمایی ×۱۰۰ میکروسکوپ نوری استفاده شد و تعداد سلولها در واحد حجم (میلی لیتر) محاسبه گردید. جهت تعیین غلظت رنگیزه‌ها از روش اسپکتروفتومتری (Japan-SHIMADZU-UV-160A) با کمک استون ۸۰ درصد و در طول موج های ٤۱۲، ٤۳۱، ٤٦۰ و ٤۸۰ نانومتراستفاده شد. با قرار دادن مقدار جذبهای خوانده شده در روابط و فرمولهای مربوطه مقدار رنگدانه ها) کلروفیل کل و بتا کاروتن) بصورت میکرو گرم در میلی لیتر($\mu g.ml^{-1}$) و پیکوگرم در هر سلول ($Pg.Cell^{-1}$) محاسبه گردید (۲۰).

اندازه گیری میزان فتوسنتز در سه مرحله فاز لگاریتمی (روز هشتم)، فاز خطی (روز شانزدهم) و فاز سکون (روز سی ام) با استفاده از بافر فسفات با pH =۷/۵ و

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت NaCl مشابه با غلظت نمک سوسپانسیون اولیه انجام شد. به کمک دستگاه پلاروگراف (Hansatech, U.K) مقدار فتوسنتز خالص و فتوسنتز کل در شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه، براساس نرخ تولید اکسیژن (در جریان فتوسنتز)، برحسب نانومول اکسیژن بر میلی گرم کلروفیل بر دقیقه اندازه‌گیری شد. کلیه مراحل آزمایش در چهار تکرار برای هر تیمار در قالب طرحهای کامل تصادفی با اندازه های تکراری طراحی و نتایج بدست آمده در این تحقیق با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS و تحلیل واریانس تک متغیره (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت . همچنین برای مقایسه میانگینها از پس آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

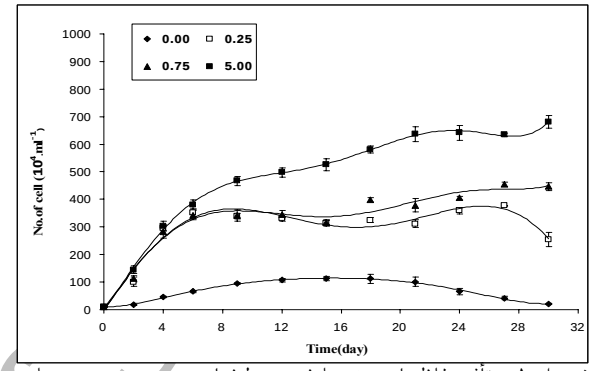
تأثیر غلظتهای مختلف سولفات بر روند تقسیم سلولی:

نمودار شماره ۱ روند رشد سلولی را در جلبک *D. salina* در غلظتهای مختلف سولفات در قیاس با شاهد (۵ میلی مولار) طی سی روز نشان می دهد. بررسی منحنیهای رشد جلبک بیانگر آن است که نرخ رشد سلولی در سوسپانسیونهای فاقد سولفات درمقایسه با سایر غلظتها بسیار کم است. وقوع تقسیم سلولی محدود در محیط فاقد سولفور می تواند بدلیل بهره گیری از منابع سولفور موجود در واکوئل اسیدی این جلبک باشد. علاوه براین، تصور می شود که کشت مقدماتی جلبکها در محیط فاقد سولفات، توانایی و پتانسیل سلولها را جهت جذب سولفات افزایش داده است (۲۳، ۳۰ ، ۳۸). نتایج مشابهی در خصوص برخی جلبکها نظیر *Chlamydomonas* و *Chlorella* که از بسیاری جهات مشابه *Dunaliella* می باشند گزارش شده است (۲٤، ۲۷،٤۰). با توجه به نقش کلیدی سولفور در ساختار اسیدهای آمینه گوگردی (سیستین، سیستئین و متیونین)، پروتئینها (آنزیمی و ساختمانی)، ویتامینها (تیامین و بیوتین) و کوآنزیمها، توقف تقسیمات سلولی در شرایط کمبود سولفور قابل پیش بینی است (۲). از طرفی کاهش فتوسنتز و در پی آن کاهش منابع مورد نیاز رشد و تقسیم سلول، شاید عمده ترین دلیل افت شدید سرعت تقسیم سلولی در محدودیت سولفور باشد (۱٦). بررسیهای آماری (جدول ۱) نیز نشان می دهد که بین سوسپانسیونهای جلبکی فاقد سولفات و سایر غلظتها اختلاف معنی داری وجود دارد. برخی مطالعات انجام شده برروی جلبک*Dunaliella salina* نتایج مشابهی را نشان می دهد (۱۳، ۱٦، ۲۳). در غلظتهای بالاتر سولفات تقریباً از روز هفتم به بعد سلولها با طی مرحله تصاعدی رشد، وارد مرحله رشد خطی می شوند. در غلظت ۵ میلی مولار سولفات بدلیل دارا بودن مقدار کافی سولفات، رسیدن به مرحله ایستایی رشد کند بوده و روند افزایش رشد تقریباً تا انتهای دوره با یک شیب ملایم ادامه می یابد، در صورتی که در دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میلی مولار، بدلیل کمتر بودن میزان سولفات آنها و مصرف سریع سولفات طی مرحله تصاعدی رشد، رسیدن به مرحله ایستایی سریع‌تر صورت می گیرد. در غلظت ۰/۲۵ میلی مولار، در روزهای پایانی دوره با تخلیه محیط از سولفات ضمن کاهش بسیار شدید تقسیمات سلولی، منحنی از یک روند نزولی با شیب تند تبعیت می کند. با بررسی منحنی رشد دو غلظت ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میلی مولار سولفات در مرحله ایستایی رشد، یک روند کند صعودی، از اواسط دوره (روز ۱۵) به بعد مشاهده می شود. بنظر می رسد که در این حالت سیستمهای جذب جدیدی برای سولفات القا شده اند که منجر به افزایش جذب سولفات بطور موقت می شود. چنین روندی با برخی گزارشهای ارائه شده درمورد القای سیستمهای جذبی با میل ترکیبی بالا (High Affinity Transport System) برای سولفات، تحت شرایط کمبود سولفور در جلبک *Dunaliella* مطابقت دارد (۳۰، ۳۸). این گزارشها براین مسئله تأکید دارد که چنین القایی قدرت جذب سولفات را تنها ۲ تا ۳ برابر شرایط طبیعی افزایش می دهد. درحالی که در شرایط کمبود

Archive of SID

www.SID.ir

فسفات، القای سیستمهای جذبی با میل ترکیبی بالا، منجر به افزایش ۲۰ برابری جذب این عنصر در جلبک *Dunaliella* می شود (۳۸). در غلظت ۰/۷۵ میلی مولار سولفات، بنظر می رسد که القای سیستم جذب با میل ترکیبی بالا توانسته است، تا حدی نیازهای جلبک به سولفور را تأمین کند.



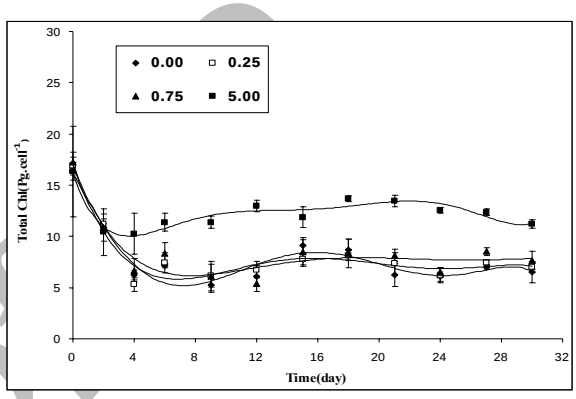
نمودار ۱- تأثیر غلظتهای مختلف سولفات منیزیم برحسب میلی مولار برروی روند تقسیم سلولی در جلبک *D. salina* در شوری ۱ مولار و شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه. هر مقدار میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار می باشد.

روند تغییرات کلروفیل کل درون سلولی: نمودار شماره ۲ تغییرات کلروفیل کل سلولهای جلبکی را در غلظتهای مختلف سولفات نشان می‌دهد. بررسی مقایسه‌ای منحنیهای مربوط به غلظتهای ۰/۲۵ و ۰/۷۵و محیط فاقد سولفور، بین روزهای نهم تا پانزدهم دوره آزمایش یک روند افزایشی آرام را نشان می دهد و پس از آن مجدداً یک روند کاهشی در محتوای کلروفیل کل سلولی مشاهده می‌گردد. مقایسه نمودار ۲ با نمودار مربوط به تقسیمات سلولی (نمودار ۱) این احتمال را قوت می بخشد که در طی این روزها احتمالاً فعال شدن سیستمی با میل ترکیبی بالا منجر به افزایش جذب سولفور گردیده است. این افزایش جذب بنوبه خود منجر به افزایش تقسیمات سلولی و درنتیجه رقت، منجر به کاهش کلروفیل درون سلولی می شود. بنابراین بنظر می رسد که بین محتوای کلروفیل هر سلول و سرعت تقسیمات سلولی رابطه‌ای معکوس برقرار است. همانطور که ملاحظه می گردد، در روزهای ابتدای آزمایش که تقسیمات سلولی برای تمامی غلظتها از سرعت بالایی برخوردار است محتوای کلروفیل سلولی نیز بسرعت کاهش می یابد. با توجه به اینکه سولفور بطور مستقیم در ساختمان کلروفیل شرکت نمی کند، انتظار می رفت که تحت شرایط کمبود سولفور محتوای کلروفیل سلولی، دچار تغییرات چندانی نشود. اما نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که محدودیت سولفور منجر به کاهش محتوای کلروفیل سلولی می‌گردد. نتیجه اخیر با نتایج حاصل از برخی مطالعات انجام شده برروی جلبک *Dunaliella* و سایر گیاهان مطابقت دارد (۹، ۱۳، ۱٦، ۲۲). بنظر می رسد که در شرایط کمبود سولفور، اختلالاتی در ساختار و عملکرد آنزیمهای دخیل در سنتز کلروفیل و آنزیمهای تنظیمی مسیرهای متابولیکی درگیر در سنتز مولکولهای کلروفیل روی می دهد (۹). آنزیمهای ALA سنتاز، PBG سنتاز (ALA– دهیدراتاز)، کوپروپورفیرینوژن دکربوکسیلاز و اوروپورفیرینوژن دکربوکسیلاز از جمله مهمترین آنزیمهای مسیر بیوسنتز کلروفیل می باشند که سولفور بصورت گروه تیول برای فعالیت آنها ضروری می باشد (۱). همچنین با توجه به نقشی که سولفور در ساختمان و عملکرد کوآنزیم A دارد، کاهش آن می‌تواند بشدت بر میزان سوکسینیل کوآنزیم A بعنوان پیش ساز اصلی سنتز کلروفیل مؤثر باشد. سوکسینیل کوآنزیم A و گلایسین دو ماده آغازگر مسیر بیوسنتز کلروفیل هستند (۷). همچنین کوآنزیم A، پیش ماده بنیادی ایزو پرنهاست که خود از سازندگان دم فیتولی مولکول کلروفیل می باشد (۲, ۷). از طرفی با توجه به نقش مهم S – آدنوزیل متیونین بعنوان یک متیل دهنده بیولوژیک در واکنشهای حد واسط مسیر بیوسنتز کلروفیل، کاهش سنتز کلروفیل در شرایط محدودیت سولفور دور از انتظار نیست (۳۷).

Archive of SID
www.SID.ir

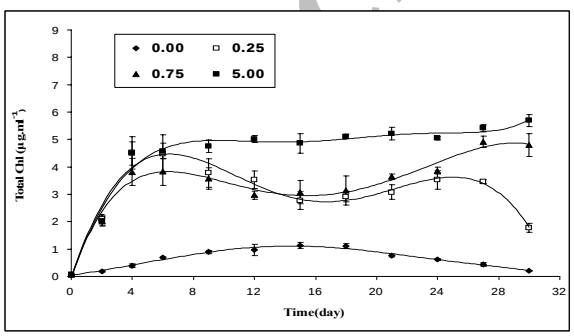
جدول۱- مقایسه میانگین بروش دانکن برای مقایسه دو به دویی چهار غلظت سولفات منیزیم (۰، ۰/۲۵، ۰/۷۵ و ۵ میلی مولار) بر شاخصهای اندازه گیری شده در جلبک *D.salina*. نتایج بر اساس چهار تکرار محاسبه شده است. حروف مشابه در هر ستون نشانه عدم معنی دار بودن اختلافات است. آزمون در سطح ۰/۰۵ انجام شده است.

غلظت سولفات (میلی لیتر)	تعداد سلول	کلروفیل کل سلولی	کلروفیل کل در واحد حجم	بتاکاروتن سلولی	بتاکاروتن در واحد حجم	فتوسنتز
صفر	٦٤/٩٥٨^{a}	٩/٥٨٩^{a}	٠/٦١٧٧^{a}	٣/٧١٢^{a}	٠/٢٣٥^{a}	٠/٠٨٤^{a}
٠/٢٥	٢٩٣/٥٨٣^{b}	٩/٩٣^{a}	٢/٨٨٠^{b}	٣/٩٠٧^{a}	١/١٤٥^{b}	٠/١٧٢^{b}
٠/٧٥	٣١٧/٧٩١^{b}	١٠/٠٧٤^{a}	٣/١٠٧^{b}	٥/٦٥^{b}	١/٦١١^{c}	٠/٣٣٢^{c}
٥	٤٥٨/٨٢٠^{c}	١٣/٠٢٣^{b}	٤/٥١٢^{c}	٣/٣٧٣^{c}	١/٨٣٥^{c}	٠/٢٦٦^{d}



نمودار ۲- تأثیر غلظتهای مختلف سولفات منیزیم برحسب میلی‌مولار بر میزان کلروفیل کل درون سلولی (پیکوگرم بر سلول) جلبک *D. salina* در قیاس با شاهد (غلظت ۵ میلی مولار سولفات) و شوری ۱ مولار با شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع برثانیه. هر مقدار میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار است.

تأثیر غلظتهای مختلف سولفات بر میزان کلروفیل در واحد حجم: نتایج حاصل از این بررسی بیانگر آن است که در محیط فاقد سولفات، میزان کلروفیل درمقایسه با غلظتهای بالاتر به میزان قابل توجهی کمتر است. در عوض در محیط حاوی سولفات کافی (غلظت ۵ میلی مولار)، میزان کلروفیل بیشتر از سایر غلظتها است. تصور می شود که ارتباط مستقیمی بین تعداد سلولها و میزان کلروفیل (در واحد حجم) برقرار باشد. در سوسپانسیونهای جلبکی بدون سولفات، بعلت تراکم سلولی بسیار پائین، میزان کلروفیل نیز در هر میلی لیتر بسیار پایین است و سیر منحنی آن تقریباً مشابه سیر منحنی رشد مربوط به غلظت صفر سولفات منزیم می باشد. چنین تشابهی، در غلظتهای بالاتر سولفات (۰/۲۵، ۰/۷۵ و ۵ میلی مولار) نیز مشاهده می‌گردد. مثلاً در غلظتهای ۰/۲۵ و ۰/۷۵ میلی مولار سولفات، جایی که بنظر می رسد القای سیستم با میلی ترکیبی بالا برای سولفات منجر به جذب بیشتر سولفات از محیط شده و تراکم سلولی افزایش یافته، میزان کلروفیل کل هم افزایش مشخصی را نشان می دهد (نمودار۳). مطالعات انجام شده توسط Giordano و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۲۳) نیز نشان می دهد که میزان کلروفیل در سوسپانسیونهای جلبکی وابسته به تراکم سلول بوده و در غلظتهای پایین سولفور (٦ میکرومولار) میزان کلروفیل بسیار کمتر از غلظتهای بالای سولفور (٤٨ میلی مولار) می باشد.



نمودار ۳- تأثیر غلظتهای مختلف سولفات منیزیم برحسب میلی‌مولار بر میزان کلروفیل کل در واحد حجم (میکروگرم در میلی‌لیتر) سوسپانسیونهای جلبکی *D. salina* در قیاس با شاهد (غلظت ۵ میلی مولار سولفات)، شوری ۱ مولار وشدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع برثانیه. هر مقدار میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.

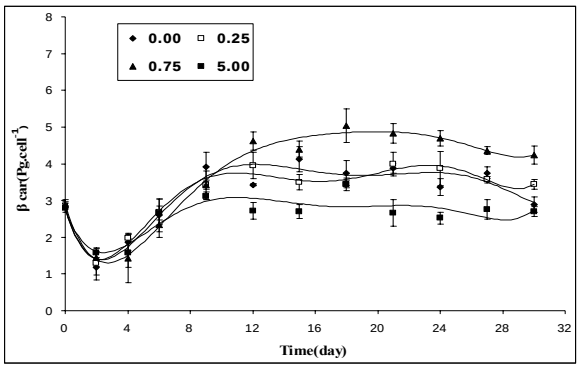
www.SID.ir

روند تغییرات محتوای بتاکاروتن سلولی: نمودار ٤، روند تغییرات محتوای بتاکاروتنی سلولهای جلبکی را در چهار غلظت مختلف سولفات نشان می دهد. بررسیهای آماری (جدول۲) بیانگر آن است که غلظت سولفات اثر معنی داری بر محتوای بتاکاروتن سلولی دارد. در غلظت ۰/۷۵ میلی مولار سولفات، بیشترین و در غلظت ۵ میلی‌مولار سولفات کمترین مقدار بتاکاروتن سلولی را داریم. احتمالاً پایین بودن محتوای بتاکاروتن سلولی در غلظت ۵ میلی مولار سولفات، به بالا بودن سرعت تقسیمات سلولی در این غلظت مربوط می شود. بنظر می رسد که سنتز بتاکاروتن در این غلظت بخوبی صورت می‌گیرد. زیرا همانطور که در نمودار ۵ مشاهده می شود میزان بتاکاروتن در واحد حجم سوسپانسیونهای جلبکی حاوی غلظت ۵ میلی مولار سولفات، دچار کاهش نشده است. بنابراین ادامه تقسیمات و افزایش تراکم سلولی در این غلظت مانع تجمع بتاکاروتن و منجر به رقیق شدن غلظت آن در سلول می گردد. در غلظت ۰/۲۵ میلی مولار سولفات و محیط فاقد سولفات چنین بنظر می رسد که کمبود سولفور از یک سو منجر به کند شدن سرعت تقسیمات سلولی و در پی آن افزایش محتوای بتاکاروتن درون سلولی می گردد و از سوی دیگر محدودیت شدید سولفور با تأثیر بر فتوسنتز و کاهش نسبی آن منجر به اختلال در فراهم آوری اسکلت کربنی لازم جهت سنتز بتا کاروتن می گردد (١٦، ٢١، ٢٣). همچنین ممکن است که بتاکاروتن تجمع یافته در این شرایط (محدودیت شدید سولفور)، فاقد ثبات ساختاری لازم باشد. پیشنهاد شده است که احتمالاً حضور یک پروتئین ۳۵ کیلودالتونی به نام Caroten globule protein(Cgp) برای حفظ ساختار و ثبات گویچه های بتاکاروتن در کلروپلاست ضروری می باشد. در برخی از سویه های *D. salina* نشان داده شده که عدم وجود این پروتئین منجر به کاهش میزان بتاکاروتن می شود (٢٦). این احتمال وجود دارد که محدودیت شدید سولفور در غلظت ۰/۲۵ و محیط فاقد سولفور، منجر به کاهش سنتز پروتئین مذکور و برخی دیگر از پروتئینها و آنزیمهای درگیر در مراحل تهیه اسکلت کربنی لازم جهت سنتز بتا کاروتن (نظیر روبیسکو و پروتئینهای سازنده کمپلکس پروتئینی جمع کننده نور) گردد (۲۱، ۲۳). همانطور که در نمودار ٤ ملاحظه می گردد ، غلظت ۰/۷۵ میلی مولار سولفات دارای بالاترین محتوای بتاکاروتن درون سلولی می باشد. نتایج آماری (جدول ۱) نیز بیانگر آن است که بین این غلظت و سایر غلظتهای سولفور اختلاف معنی داری در محتوای بتاکاروتن سلولی وجود دارد. احتمالاً علل و عوامل زیر در این افزایش مؤثر است. اول آنکه در غلظت ۰/۷۵ میلی مولار سولفات، کمبود سولفور در حدی نیست که منجر به وقوع اختلالات متابولیکی شدید در مسیر بیوسنتز بتاکاروتن گردد. از طرفی همانطور که در نمودار ۱ ملاحظه می شود این غلظت از سولفور منجر به کند شدن سرعت تقسیمات سلولی می‌گردد، اما موجب توقف کامل این تقسیمات نمی گردد. پیشنهاد شده است (١٤) که ارتباط معکوسی بین سرعت تقسیمات سلولی و سنتز بتاکاروتن در این جلبک برقرار می باشد و شرایطی که منجر به تجمع بتاکاروتن می شود (نظیر نور شدید، شوری بالا و محدودیت غذایی)، موجب کاهش نرخ رشد شده و سرعت تقسیمات سلولی را کند می نماید. با کاهش نرخ تقسیم سلولی، هر سلول مدت زمان بیشتری در معرض نور قرار می گیرد و به سیستم فتوسنتزی تضعیف شده فرصت بیشتری جهت فعالیت می دهد. درنتیجه میزان تولید ATP در سلول افزایش می یابد. بنظر می‌رسد که ATP اضافی حاصل، در فرآیند تقسیم سلولی بکار نمی رود بلکه صرف تهیه اسکلت کربنی لازم جهت سنتز بتا کاروتن می شود تا سلول را در برابر تشعشعات دریافتی اضافی حفظ نماید(۳، ۱۳). نتایج حاصل از این تحقیق با برخی گزارشهای موجود در رابطه با اثر افزایشی محدودیت سولفور بر تولید بتاکاروتن مطابقت دارد (۹، ۱۳، ۲۳). برخی دیگر از محققین معتقدند که کاهش مصرف عوامل احیاکننده ناشی

Archive of SID

www.SID.ir

از واکنشهای نوری فتوسنتز در محدودیت غذایی، منجر به تولید کلروفیلهای برانگیخته می شود. چنین مولکولهایی قادرند با اکسیژن واکنش داده و اشکال مختلفی از اکسیژن فعال را در داخل سلول بوجود آورند. این ترکیبات علاوه بر اعمال آسیبهای شدید و جبران ناپذیر ممکن است که بعنوان پیامهای تنظیم کننده، فعالیتهای متابولیکی و سنتز متابولیتهای ثانویه را کنترل نمایند (۷، ۸، ۹، ۱۱، ۱۸، ۲۵، ٤۱). اثرات القائی اکسیژن رادیکالی در تشدید بیان ژنهای دخیل در مسیر بیوسنتز بتاکاروتن در جلبک *Dunaliella* بـــه اثبات رسیده است (۳۲).



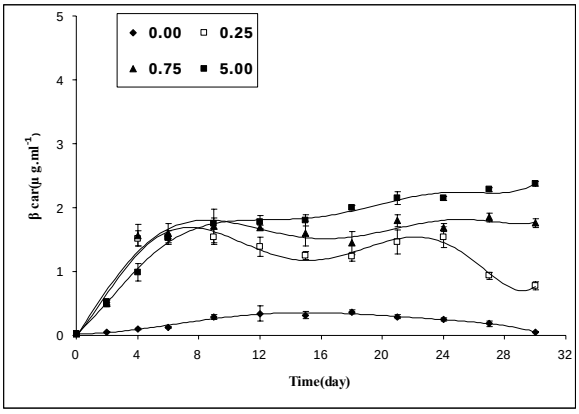
نمودار٤- تأثیر غلظتهای مختلف سـولـفـات منیزیم بـرحـسـب میلی‌مولار برروی محتوای بتاکاروتن درون سلولی (پیکوگرم در سلول) جلبک *D. salina* در قـیـاس با شـاهد (غلظت ۵ میلی مولار سولفات) در شـوری ۱ مولار وشدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع برثانیه. مقادیر میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.

جدول۲- تحلیل واریانس مربوط به اثرات اصلی چهار غلظت سولفات منیزیم (۰، ۰/۲۵، ۰/۷۵ و ۵ میلی مولار) بر شاخصهای اندازه گیری شده در جلبک *D. salina*. نتایج بر اساس چهار تکرار محاسبه شده است. (*) معنی دار بودن اثر عامل در سطح P=٪۵ می باشد وns بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح P≥۰/۰۵ است. همچنین درجه آزادی خطا برای تمام شاخصها ۱٤٤ می باشد.

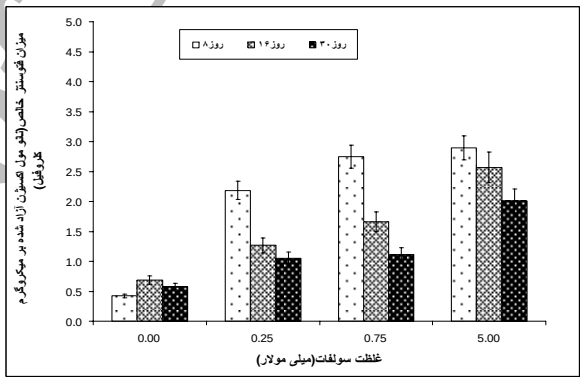
منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات شاخص	مجموع مربعات خطا	میانگین مربعات شاخص	میانگین مربعات خطا	F
تعداد سلول	۳	۳۸۲۹۷٦۵/٦	۲۷۵۳۷/۷	۱۲۷٦۵۸۸/۵	۱۹۱/۲۳٤	٦٦۷۵/۵۱۸*
کلروفیل کل سلولی	۳	۵٤/۲٦۹	۲۱/۹۲۷	۱۸/۰۹۰	۰/٦۳۸	۲۷/۳۳۷*
کلروفیل کل در واحد حجم	۳	۳۷٤/۱۵۳	٤/۷۲۱	۱۲٤/۷۱۸	۰/۰۳۲۷	۳۸۰٤/۲۱٦*
بتاکاروتن سلولی	۳	۱٤۹/۰۷۲	۷/٤۰۱	٤۹/٦۹۱	۰/۰۵۱	۹٦٦/۷۸*
بتاکاروتن در واحد حجم	۳	۷۲/۲٤٦	۰/۹۳۵	۲٤/۰۸۲	۰/۰٦۵	۳۷۱۰/۳*
فتوسنتز	۳	۱/٦۸۸	۰/۳۱۲	۰/۵٦۳	۰/۲۱۷	۲۵۹/۲۵٦*

بررسی میزان بتاکاروتن در واحد حجم سوسپانسیونهای جلبک: نمودار ۵ بیانگر اثر غلظتهای مختلف سولفات بر میزان بتاکاروتن در واحد حجم سوسپانسیونهای جلبکی می باشد. از طرفی مقایسه میانگینها به روش دانکن نشان می دهد (جدول ۱) که بین غلظتهای ۵ و ۰/۷۵ میلی مولار سولفات از نظر این شاخص اختلافات معنی داری وجود ندارد. بیشتر بودن میزان بتاکاروتن در غلظت ۵ میلی مولار سولفات را می‌توان به تراکم سلولی بالا در این غلظت نسبت داد. عدم وجود تفاوت معنی دار در محـیـط کشتهای حـاوی ۰/۷۵ میلی مولار سولفات در قیاس با غلظت ۵ میلی مولار سولفات را می توان به افزایش محتوای بتاکاروتن سلولی در این محیطها نسبت داد. بنظر می‌رسدکه تجمع بیشتر بتاکاروتن درون سلولی در این غلظت، می تواند جایگزین برای افزایش میزان بتاکاروتن در واحد حجم سوسپانسیونهای جلبکی باشد. از طرفی در محیط فاقد سولفور بدلیل تراکم پایین سلولی، میزان بتاکاروتن در واحد حجم بسیار کمتر از سایر غلظتها می باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

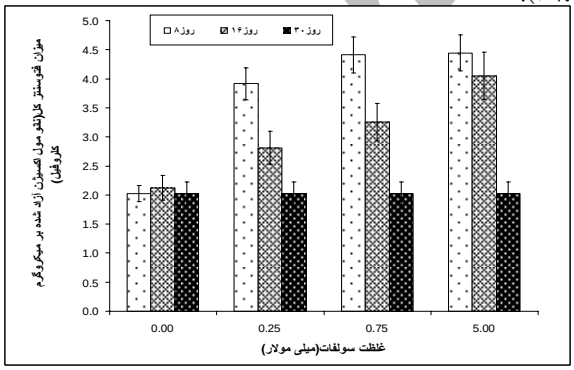


نمودار ۵- تأثیر غلظتهای مختلف سولفات منیزیم برحسب میلی‌مولار بر میزان بتاکاروتن در واحد حجم (میکروگرم در میلی لیتر). سوسپانسیونهای جلبکی *D. salina* در قیاس با شاهد (غلظت ۵ میلی مولار سولفات)، شوری ۱ مولار وشدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع برثانیه. هر مقدار میانگین چهار تکرار ± انحراف معیار می‌باشد.



نمودار ٦- اثر غلظتهای مختلف سولفات منیزیم بر میزان فتوسنتز خالص (برحسب نانومول اکسیژن آزاد شده بر میکروگرم کلروفیل) در جلبک *D. salina* در قیاس با شاهد (غلظت ۵ میلی مولار سولفات)، شوری ۱ مولار و شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع برثانیه. اندازه‌گیری در سوسپانسیونهای جلبکی در روزهای ۸، ۱٦ و ۳۰ انجام گرفت.

تأثیر غلظت سولفات بر فتوسنتز: نمودار ٦، میزان فتوسنتز خالص و نمودار ۷ میزان فتوسنتز کل را در جلبک *D.salina* تحت تیمار با غلظتهای مختلف سولفات برحسب نانومول اکسیژن آزاد شده بر میکروگرم کلروفیل در روزهای ۸، ۱٦ و ۳۰ دوره آزمایش نشان می‌دهد. بررسیهای آماری (جدول۲) بیانگر آن است که غلظت سولفور بشدت بر میزان فتوسنتز تأثیرگذار است. همانطور که در نمودار ٦ و ۷ ملاحظه می گردد با کاهش غلظت سولفور نسبت به شاهد، میزان فتوسنتز خالص کاهش می یابد. همچنین میزان فتوسنتز خالص در هریک از غلظتها، در طول دوره آزمایش در روزهای ۸، ۱٦ و ۳۰ با کاهش همراه است. گزارشهای متعددی در خصوص کاهش فتوسنتز تحت شرایط محدودیت سولفور در *Dunaliella* و برخی گیاهان دیگر وجود دارد (۱٦، ۲۸). نشان داده شده است که کمبود سولفور منجر به کاهش برخی پروتئینهای حاوی سولفور نظیر روبیسکو و پروتئینهای سازنده کمپلکس پروتئینی جمع کننده نور در فتوسیستمها می‌گردد (۲۱، ۲۳). همچنین مشخص شده است که کمبود سولفور منجر به تخریب نوعی چربی ساختاری در کلروپلاست بنام سولفوکوئینوزیل دی‌آسیل گلیسرول می شود که منجر به برهم خوردن نظم ساختاری کلروپلاست‌ها می‌گردد. بنظر می‌رسد که بروز چنین اختلالاتی نیز در کاهش میزان فتوسنتز مؤثر باشد (۳۱). کاهش فعالیت فتوسیستم II در شرایط فقر سولفات نیز می تواند یکی از دلایل کاهش فتوسنتز در این شرایط باشد (۳۹). ضمن آنکه گزارشهایی مبنی بر تأثیر کمبود سولفور بر کاهش اکسیداسیون آب در فتوسنتز نیز وجود دارد (۲۸، ۳۹).



نمودار ۷- اثر غلظتهای مختلف سولفات منیزیم بر میزان فتوسنتز کل (برحسب نانومول اکسیژن آزاد شده بر میکروگرم کلروفیل) در جلبک *D. salina* در قیاس با شاهد (غلظت ۵ میلی مولار سولفات)، شوری ۱ مولار و شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع برثانیه. اندازه‌گیری سوسپانسیونهای جلبکی در روزهای ۸، ۱٦ و ۳۰ انجام گرفت.

www.SID.ir

جمع بندی نتایج: بررسی روند رشد سلولی و تغییرات میزان رنگیزه ها در سویه ایرانی جلبک *D.salina* بیانگر کاهش میزان تقسیمات سلولی، میزان کلروفیل، نرخ فتوسنتز و نیز افزایش محتوای بتا کاروتن سلولی در کمبود سولفات است. با این وجود مقدار افزایش میزان بتاکاروتن در قیاس با برخی گزارشات (۹، ۲۳) بالا نمی باشد. لذا لزوم طراحی آزمایشی گسترده تر بر اساس تأثیر همزمان سایر عوامل دخیل در افزایش میزان بتا کاروتن نظیر نور شدید، کمبود نیترات، سولفات بهمراه شوری، ضروری بنظر می رسد.

منابع

۱- ابراهیم زاده، ح. ۱۳۷۲. فیزیولوژی گیاهی ٤ (فتوسنتز). انتشارات دانشگاه تهران.

۲- گینبار، ژ. ل. ۱۳٦۸. سیری در زیست شیمی گیاهی. ترجمه حیدری، ر. مرکز نشر دانشگاهی تهران.

۳- شریعتی، م. و ذوفن، پ. ۱۳۸۲. بررسی اثر کمبود نیترات بر تقسیم سلولی و سنتز رنگیزه های بتا کاروتن و کلروفیل در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* جدا شده از مرداب شور گاوخونی اصفهان، مجله پژوهش و سازندگی. ۵۹ ۱۳-۷.

٤- شریعتی، م. و مددکارحق جو، م. ۱۳۷۷. بررسی رابطه میزان بتاکاروتن و محتوای کلروفیلی در جلبک سبز *Dunaliella salina* در پاسخ به نور شدید. مجله زیست شناسی ایران. ۷. ۱۳۲-۱۱۲.

۵- شریعتی، م. و مددکارحق جو، م. ۱۳۷۹. بررسی اثر تنش شوری بر میزان بتاکاروتن و کلروفیل محتوای جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* جدا شده از مرداب شور گاوخونی اصفهان. مجله پژوهشی علوم دانشگاه اصفهان. ١٤، ٦٦-٥٥.

٦- شریعتی، م. و یحیی آبادی. س. ۱۳۸۰. تأثیر غلظتهای مختلف یون مس بر میزان رشد و رنگیزه‌های کلروفیل و بتاکاروتن و محتوای کلسیم و منیزیم درون سلولی در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* . مجله زیست شناسی ایران. ۱۱، ٤٦-۳۷.

۷- نوجوان، م. ۱۳۷٤. فتوسنتز و تنفس در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه.

8- Beligni, M.V. and Lanttina, L. 2002. Nitric oxide interferes with plant photo oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. Plant Cell Environ. 25: 737-748.

9- Ben-Amotz, A. and Avron, M. 1983. On the factors which determine massive β-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 72: 593-597.

10- Ben-Amotz, A. and Averon, M. 1990. The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. TIBTECH. 8: 127-136.

11- Ben-Amotz, A., and Levy, Y. 1996. Bioavailability of anatural isomer mixture compared with synthetic all-trans beta-carotene in human serum. Am. J. Clin. Nut. 63: 729-734.

12- Ben-Amotz, A. and Shaish, A. 1992. β-carotene biosynthesis. In: *Dunaliella*: Physiology, biochemistry and biotechnology. (eds. Avron, M. and Ben-Amotz, A.), CRC Press, Boca Raton. 205-216.

13- Ben-Amotz, A.1987. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* (Volvocales, Chlorophyta). J. Plant Physiol. 131: 479-487.

14- Borowitzka, L. J. and Borowitzka, M. A. 1990. Commercial production of β-carotene by *Dunaliella salina* in open ponds. Bull. Mar. Sci. 57: 244-252.

15- Brown, A. D. and Borowitzka, L. J. 1979. Halotolerance of *Dunaliella*, In: Biochemistry and physiology of protozoa. (eds. Levandowsky, M. and Hutner, S. H.) Academic Press. New York.

16- Cao, H., Zhang, L. and Melis, A. 2001. Bioenergetic and metabolic processes for the survival of sulfur-deprived *Dunaliella salina* (chlorophyta). J. App. Phycol. 13: 25-34.

17- Cowan, A. K., Rose, P. P. and Horne, L.G. 1992. *Dunaliella salina* -A model system for studying the response of plant cells to stress. J. Exp. Bot. 43: 1535-1547.

18- Dat, J., Vandenabeeie, S.,Vranova, E., Montagu, M.V., Inze, D. and Breusegem, F.V. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell. Mol. Life Sci. 57: 779-795.

19- Davies, J. P. and Grossman, A. R. 1998. Responses to deficiencies in macronutrients. In: The molecular biology of chloroplast and

Archive of SID

www.SID.ir

mitochondria in *Chlamydomonus*. (eds. Goldschmidt, M. and Merchant, S.). Kluwar Academic Publishers, Amsterdam, 613-633.

20- Eijckelhoff, C. and Dekker, J. P. 1997. A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin α and β-carotenes of isolated photosystem II reaction center complexes. Photosyn. Res. 52: 63-67.

21- Ferreira, R. and Teixeira, A. 1992. Sulfur starvation in *Lemna* leads to degradation of ribolose-bisphosphate carboxylase without plant death. J. Biol. Chem 267: 7253-7257.

22- Gilbert, S. M., Clarkson, D. T., Cambridage, M., Lambers, H. and Hawkesford, M. J. 1997. SO deprivation has an early effect on the content of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, chlorophyll and photosynthesis in young leaves of wheat. Plant Physiol. 115: 1231-1239.

23 -Giordano, M., Pezzoni, V. and Hell, R. 2000. Strategies for the allocation of resources under sulfur limitation in the green alga *Dunaliella salina*. Plant Physiol. 124: 857-864.

24- Grossman, A. 2000. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment. Available: http://www.Urdanfischer. Del jornals/protist.

25- Grossman, A. and Takahash, H. 2001. Macronutrient utilization by photosynthesis eukaryotes and fabric of interaction. Anna. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 163-210.

26- Katz, A., Jimenez, C. and Pick, U. 1995. Isolation and characterization of a protein associated with carotene globules in the alga *Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 108: 1557-1664.

27- Matsuda, Y. and colman, B. 1995. Characterization of sulfate transport in the green alga *Chlorella ellipsoidea*.Plant Cell Physiol. 36: 1291-1296

28- Melis, A., Zhang L., Forestier, M., Ghirardi, M. L. and Seibert, M. 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol.122: 127-136.

29- Park, D. H., Ruy, H.W., Lee, K.Y., Kang, C.H., Kim, T.H. and Lee, H.Y. 1998. The production of hydrocarbons from photoautotrophic growth of *Dunaliella salina* 1650. Appl. Biochem. Biotech. 70: 739-747.

30- Pezzoni,V. and Giordano, M. 2002. Molecular physiology of sulfate uptake and activity of ATP sulfurylase in the green alga *Dunaliella salina*. J. Physiol. Res. 33: 122-139.

31- Schiff, J. A., Stern, A. I. and Suidha, T. 1993. Some molecular aspects of sulfate metabolism in photosynthetic organisms. SPB. Acad. Pub. The Hague. 21-36.

32- Shaish, A., Avron, M., Pick, U. and Ben-Amotz, A. 1993. Are active oxygen species involved in induction of β-carotene in *Dunaliella bardawil*. Planta 190: 363-368.

33- Shariati, M. 2003. Characterization of three species of *Dunaliella salina*, *Dunaliella parva* and *Dunaliella psuedosalina* from salt marsh of Gavkhoni of Isfahan. Iranian J. Sci. and Technol. Vol. 27, No. A1, 185-190.

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

35- Shariati, M. and Yahyaabadi, S. (2006). The effects of different concentrations of cadmium on the growth rate and beta-carotene synthesis in unicellular green alga *Dunaliella salina.* Iranian J. Sci. and Technol. Vol. 30, No. A1, 57-63.

36- Thakur, A. and Kumar, H. D. 1999. Nitrate, ammonium and phosphate uptake by the immobilized cells of *Dunaliella salina*. Environ. Cont. Toxicol. 62: 70-78.

37- Wedding, R.T. and Kayblack, M. 1989. Uptake and metabolism of sulfate by *chlorella*. Eur. J. Phycol. 46: 3-19.

38- Weiss, M., Haimovich, G. and Pick, U. 2001. Phosphate and Sulfate uptake in the halotolerant alga *Dunaliella* are driven by Na^+-symport mechanism. J. Plant Physiol. 158: 1519-1525.

39- Wykoff, D. D., Davies, J. P., Melis, A. and Grossman, A. R. 1998. The regulation of photosynthetic electron-transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 117: 129-139.

40- Yildiz, F. H., Davies, J. P. and Grossman, A. R. 1994. Characterization of sulfate transport in *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur-limited and sulfur-sufficient growth. Plant Physiol. 104: 981-987.

41- Young, A. and Britton, G. 1990. Carotenoids and stress. In: Stress responses in plants: Adaptation and acclimation mechanisms. (eds. Alscher, R. G. and Cumming, J. R.) Willey-Liss. New York. 87-112.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of sulfate deficiency on cell division, beta-carotene, chlorophyll accumulation, and photosynthesis in green alga *Dunalliella salina* (isolated from salt marsh of Gavkhoni, Isfahan)

Aghaie P.[1] and Shariati M.[2]

[1] **Biology Dept.,Payame-noor University, Ardestan, I.R of Iran**

[2] **Biology Dept., Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, I.R of Iran**

Abstract

There is not enough information about the effects of various environmental factors, on cell division and pigments synthesis in Iranian strain of *Dunaliella salina* (isolated from salt marsh of Gavkhoni, Isfahan**).** Therefore, more studies must be carried out. In this study, influence of different concentrations of sulfate on cell division, content of pigments and photosynthesis were investigated. The algal cells were cultured in four concentrations (0, 0.25, 0.75 and 5 mM) of $MgSO_4$. Trend of cell growth, content of pigments and rate of photosynthesis were measured in four replicates during 30 days of experiment. The results showed that sulfate deficiency led to decrease in cell division and content of chlorophyll but increased beta-carotene cell content. Also sulfate deficiency decreased the photosynthesis.

Keywords: *Dunaliella salina*, *Sulfate deficiency, Chlorophyll, Photosynthesis*

Archive of SID

www.SID.ir