Archive of SID

اثر همزمان سالیسیلیک اسید و تنش شوری برروی رشد (تقسیم سلولی)، رنگیزه های فتوسنتزی ومقدار بتا – کاروتن در جلبک تک سلولی *Dunaliella salina Teod.*

مریم معین و منصور شریعتی*

دانشگاه اصفهان دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۱۸

چکیده

جلبک تک سلولی *D. salina* در دریاها و دریاچه هایی با غلظت نمک بسیار بالا یافت می شود و جهت مقابله با تنش های محیطی ترکیبات مختلف سلولی از قبیل بتا–کاروتن تولید می کند. در این تحقیق تاثیر اثر همزمان سالیسیلیک اسید و شوری برروی رشد (تقسیم سلولی)، رنگیزه های فتوسنتزی و مقدار بتا–کاروتن در جلبک تک سلولی *D. salina* بررسی گردید. نتایج نشان داد که در کلیه آزمایشها استفاده از سالیسیلیک اسید به تنهایی یا همراه با تنش شوری باعث کاهش تقسیم سلولی گردید. وجود سالیسیلیک اسید تاثیرتنش شوری بر میزان بتا–کاروتن سلولی را کاهش داده که به تبع آن میزان کلروفیل سلولی نیز کاهش یافت. تنش شوری به تنهایی توانست باعث افزایش بتا–کاروتن سلولی گردد. تنش شوری و سالیسیلیک اسید به علت کاهش در تراکم سلولی، کاهش میزان کلروفیل و بتا –کاروتن در واحد حجم را به دنبال داشته است.

واژه های کلیدی: *Dunaliella* ، سالیسیلیک اسید، بتاکاروتن، تنش شوری

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۳۱۱–۷۹۳۲۴۷۲، پست الکترونیک: mansour_shariati@yahoo.com

مقدمه

جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella* از خانوادهٔ Chlorophyceae می باشد که بزرگترین گروه جلبکهای سبز است و به راستهٔ Volvocals تعلق دارند. (۱۰، ۲۱) جلبک *D. salina* تحت شرایطی نظیر شوری زیاد، شدت نور بالا و محدودیت مواد غذایی قادر به تولید رنگدانه های کارتنوئیدی از جمله مقادیر زیادی بتاکاروتن می باشد که در صنایع داروسازی، تولید آنتی بیوتیکها و صنایع غذایی کاربرد فراوان دارد (۱،۲، ۳، ۴، ۱۰).

سالیسیلیک اسید (SA) ترکیبی فنولی است که جزء فیتوهورمونها به شمار می آید و در میان ترکیبات فنولیک مشتقات بنزوئیک و سینامیک اسیدها دارای اثراتی 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 ساختار کلروپلاست می باشد(۵، ۱۲، ۱۳، ۱۹) مطالعات نشان داده است سالیسیلیک اسید با افزایش سطح برخی فیتوهورمونها، نظیر ابسیزیک اسید، پیری را در گیاهان تسریع کرده و تقسیم سلولی را کاهش داده و مرگ سلولی را سبب می گردد (۷، ۲۳). با توجه به اینکه حضور هورمون ابسیزیک اسید در جلبک *D. salina* گزارش شده است (۲۴) و برخی مطالعات نشان می دهد برخی از تنش ها با کاهش روند تقسیم سلولی باعث افزایش میزان بتا–کاروتن در جلبک *D. salina* می شود. لذا اثر اسید سالیسیلیک بر میزان سنتز بتا–کاروتن در جلبک *D. salina* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین نشان داده شده است که اسید سالیسیلیک تاثیر آسیبها و خسارتهای اکسیداتیو را در گیاهانی که تحت تنش شوری قرار می گیرند افزایش داده

www.SID.ir

Archive of SID

(۲۲، ۲۷) و قادر است توان آنتی اکسیدانتی گیاه را افزایش دهد (۹، ۱۷، ۲۸). لذا، در این تحقیق اثر همزمان اسید سالیسیلیک بهمراه تنش شوری بر رشد سلولی (تقسیم سلولی) و تولید رنگدانه های بتا-کاروتن و کلروفیل به منظور بررسی نقش استعمال خارجی اسید سالیسیلیک در کاهش یا افزایش تنش شوری در جلبک *D. salina* با توجه به عدم گزارش وجود سالیسیلیک اسید در جلبک *D. salina* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

جلبک *D. salina* سویه MUR8 جهت انجام آزمایش از پروفسور بورویتزکا از دانشگاه مرداک استرالیا تهیه شد. جهت تهیهٔ محیط غذایی مناسب مطابق با محیط کشت اصلاح شدهٔ (۲۶) جانسون و همکاران اقدام گردید(۱۶). بر این اساس محیط کشت با غلظت ۱/۵ مولار NaCl و در حجم یک لیتر تهیه و pH محیط کشت با استفاده از NaOH و HCl در حدود ۷ تنظیم گردید. سپس جهت حذف آلودگی های احتمالی اتوکلاو گردید. تحت شرایط استریل مقداری مشخص از جلبک به محیط ساخته شده اضافه گردید. سوسپانسیون جلبکی بر روی شیکر با سرعت ۱۰۵ دور در دقیقه، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و تحت تأثیر نوری در حدود ۲۰۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه با دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و درون اتاقک رشد (Conviron E15, Canada) قرار داده شد. پس از آنکه جلبکها در محیط کشت به اواسط رشد تصاعدی رسیدند حجم معینی از آنها به ارلن های ۲۵۰ میلی لیتر انتقال داده شد و سپس از محلول استوک سالیسیلیک اسید، به محیط های کشت بنحوی اضافه گردید که غلظت نهایی اسید سالیسیلیک در سوسپانسیون های جلبکی به ترتیب ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۷۵۰۰ میکرو مولار حاصل گردد. بمنظور تامین حجم مساوی از محیط های کشت مورد آزمایش، کمبود حجم با افزودن محیط کشت به ارلن های حاوی سوسپانسیون جلبکی تامین گردید بنحوی که تمامی سوسپانسیون ها در روز اول حاوی تعداد مساوی سلول باشند. پس از آن در زمان های مشخص نمونه برداری از سوسپانسیون جلبکی طی دو هفته تحت شرایط استریل آغاز شد. سپس شمارش سلولی با استفاده از لام نئوبار(هموسایتومتر) و با بزرگنمایی ۴۰ × میکروسکوپ نوری شمارش و تعداد سلول واحد در حجم محاسبه گردید (۲۵).

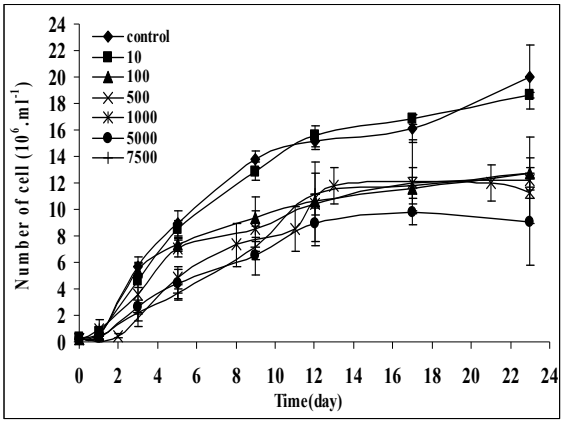
عمل فوق در مورد شاهد وسوسپانسیون های جلبکی تیمار شده با سالیسیلیک اسید در روزهای تعیین شده و در ۴ تکرار انجام شد. پس از انتخاب غلظت مناسب اسید سالیسیلیک در مرحله دوم آزمایش ها مجدد مطابق روش بالا مقدار مشخصی از سوپانسیون جلبکی به محیط کشت حاوی ۱/۵ مولار نمک تلقیح و زمانیکه سوسپانسیون جلبکی به اواسط رشد تصاعدی خود رسید. اعمال تنش شوری از ۱/۵ مولار به ۳ مولار به همراه افزودن غلظت انتخابی اسید سالیسیلیک از مرحله اول آزمایش (۵۰۰۰ میکرومولار) در چهار تکرار انجام و اثر تنش شوری و تنش سالیسیلیک اسید و اثر توام شوری و سالیسیلیک اسید با اندازه گیری روند تغییرات تعداد سلول و میزان کلروفیل و بتاکاروتن مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین غلظت رنگیزه های کلروفیل کل و بتا-کاروتن، یک میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی مورد نظر به میکروفیوژتیوپ منتقل گردید و داخل دستگاه سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ g و به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. محلول رویی با دقت زیاد خارج و یک میلی لیتر استون ۸۵٪ به رسوب حاصله اضافه شد. پس از مخلوط کردن توسط ورتکس ، به مدت ۳ دقیقه در ۱۳۰۰۰g سانتریفوژ شده و جذب محلول رویی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-160A Shimadzu) در طول موجهای ۴۱۲، ۴۳۱، ۴۶۰، ۴۸۰ خوانده شد. با قرار دادن جذب های خوانده شده در روابط و فرمولهای مربوطه میزان کلروفیل کل و بتا-کاروتن به صورت میکروگرم در میلی لیتر($\mu g. ml^{-1}$) و پیکو گرم در هر سلول($pg. cell^{-1}$) محاسبه گردید (۱۱).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

تاثیر غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید بر روند تقسیم سلولی: دراین آزمایش غلظتهای متفاوت سالیسیلیک اسید (۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰۰، ۷۵۰۰ میکرومولار) بر روی جلبکهایی که در غلظت ۱/۵ مولار نمک رشد کردند مورد آزمایش قرار گرفت. نمودار ۱، روند رشد سلولی را در جلبک *D. salina* سویه MUR8 درغلظت های مختلف سالیسیلیک اسید در مقایسه با شاهد نشان می دهد. همانطور که ملاحظه می گردد در بین شش غلظت استفاده شده روند رشد سلولی در غلظت ۱۰ میکرومولارتفاوت معنی داری با شاهد نداشته و مشابه با آن می باشد. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید در محیط، غلظتهای۱۰۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نسبت به شاهد و ۱۰ میکرومولار کاهش معنی داری مشاهده می گردد همچنین بررسی های آماری تفاوت معنی داری را بین غلظت ۱۰۰میکرومولار و غلظت ۷۵۰۰ میکرومولار نشان می دهد. چنین روندی با برخی گزارشهای ارائه شده در رابطه با تاثیر سالیسیلیک اسید بر روند تنظیم رشد سلولی و مرگ سلولی گیاهان مطابقت ندارد زیرا اکثر آزمایشهای انجام شده بر روی میزان رشد سلولی نشان دهنده کاهش وسعت مرگ سلولی دربرابر غلظتهای بالای اسید سالیسیلیک ایجاد شده است (۸ ، ۱۴، ۲۰). از آنجا که هیچگونه گزارشی مبنی بر وجود هورمون سالیسیلیک اسید در جلبک تک سلولی *D. salina* و سایر گونه های این جنس داده نشده است می توان مطمئن بود که کلیه تغییرات مشاهده شده در روند رشد سلولی احتمالا ناشی از اثر سالیسیلیک اسید خارجی استفاده شده در آزمایش می باشد. از آنجا که تاثیر سالیسیلیک اسید در غلظت های ۱۰۰ میکرومولار به بالا بر میزان رشد سلولی نسبت به شاهد تفاوت معنی داری دارد ($P< 0.05$) و از طرفی استفاده از غلظت ۷۵۰۰ میکرومولار در برخی آزمایش ها ایجاد رنگ قهوه ای نمود که احتمالا می تواند بواسطهٔ ایجاد سمیت باشد. لذا در این تحقیق بواسطه اطمینان از تاثیر کامل سالیسیلیک اسید غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید برای انجام کلیه آزمایشها استفاده گردید.



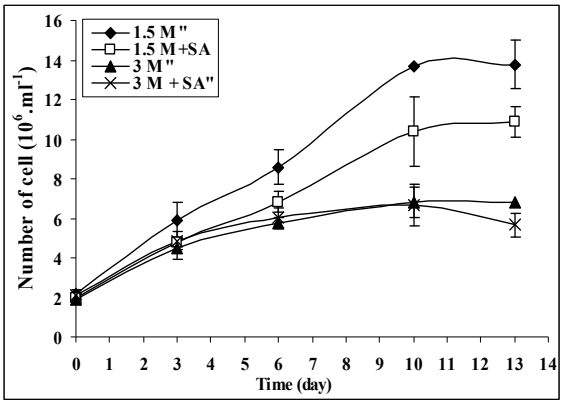
نمودار۱- تاثیر غلظتهای مختلف (میکرومولار) سالیسیلیک اسید بر روند رشد(تقسیم سلولی) در جلبک *D. salina* . مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می باشد.

تاثیر همزمان سالیسیلیک اسید و شوری بر پاسخ روند تقسیم سلولی: در این آزمایش سوسپانسیون جلبکی کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار نمک بطور همزمان در معرض غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید و تنش شوری ۳ مولار نمک در مدت دو هفته قرار گرفتند. نمودار۲، تغییرات میزان رشد سلولی در غلظت ۱/۵مولار و ۳ مولار نمک و در حضور و عدم حضور غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید را نشان می دهد. با مقایسه منحنی رشد در غلظت ۱/۵ مولار نمک(شاهد) با منحنی رشد در غلظت ۱/۵ مولار نمک همراه با سالیسیلیک اسید مشاهده شد که سالیسیلیک اسید تاثیر معنی داری را در کاهش رشد سلولی داشته ($P< 0.05$) به طوریکه هر دو منحنی در روز دهم دوره آزمایش وارد مرحله ایستایی رشد خواهند شد با این تفاوت که رشد سلولی شاهد با تراکم سلولی بالاتر و رشد سلولی در محیط حاوی سالیسیلیک اسید با تراکم سلولی پائین تر وارد مرحله ایستایی گردید. از طرفی روند رشد سلولی و شیب مرحله تصاعدی رشد در غلظت ۳ مولار نمک در حضور اسید سالیسیلیک در مقایسه با غلظت ۳

www.SID.ir

Archive of SID

مولار نمک بدون اسید سالیسیلیک، یکسان است و هیچگونه تفاوت معنی داری بین غلظتهای ۳ مولار همراه با سالیسیلیک اسید و بدون سالیسیلیک اسید مشاهده نمی گردد.



نمودار۲- بررسی اثر همزمان سالیسیلیک اسید و تنش شوری بر روند رشد سلولی در جلبک *D. salina* کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار نمک. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می باشد

در هر دو حالت با حضور و یا عدم حضور سالیسیلیک اسید، تنش شوری ۳ مولار باعث کاهش معنی داری در میزان رشد سلولی نسبت به رشد سلولی شاهد(غلظت ۱/۵ مولار نمک) شده است($P< 0.05$). لذا به نظر می رسد سالیسیلیک اسید نتوانسته است اثر تنش شوری بر روند رشد سلولی را بهبود بخشد.

در خصوص تاثیر اسید سالیسیلیک در گیاهان گزارشهای ضد و نقیضی وجود دارد که بستگی به نوع گیاه نتایج متفاوت است. برخی گزارشها حاکی از تاثیر مثبت سالیسیلیک اسید بر تقسیم سلولی و در نتیجه کاهش وسعت مرگ سلولی در گیاه جو و آرابیدوپسیس می باشد (۱۵، ۲۶). از طرفی برخی از گزارشات حاکی از آنست که سالیسیلیک اسید در گیاه تنباکو به عنوان یک مهار کننده عمل کرده و می تواند موقعیت III را در زنجیره تنفسی بلوکه کند. بنابراین سطح ATP داخل سلولی به سرعت کاهش یافته و احتمالا همین امر بر میزان تقسیم سلولی نیز اثر خواهد گذاشت زیرا فرایندهای تقسیم سلولی چه در روش تولید مثل جنسی و چه تولید مثل غیر جنسی نیاز به انرژی دارد (۲۱).

همچنین مدارکی مبنی بر نقش سالیسیلیک اسید در خسارتهای اکسیداتیو ایجاد شده بوسیله تنش شوری و تنشهای اسموتیک ارائه شده است (۷). به طوریکه سالیسیلیک اسید آسیب اکسیداتیو ایجاد شده بوسیلهٔ تنش اسمزی و NaCl را افزایش می دهد و یک همکاری بین سالیسیلیک اسید و NaCl در ایجاد تنش وجود داشته و سالیسیلیک اسید با از بین بردن سیستم آنتی اکسیدانی، تنش اکسیداتیو را شدت بخشیده و مسیر مرگ سلولی حساس به O_3 را نیز فعال می کند(۷). نتایج آزمایش ما حاکی از آنست که در غلظت ۳ مولار نمک، سالیسیلیک اسید اثر تشدید کننده یا تعدیل کننده تنش شوری بر تقسیم سلولی نداشته است.

همچنین علی رغم اینکه گزارش شده است که در گیاهان سالیسیلیک اسید اثر منفی شوری را کاهش می دهد (۲۸) ولی با توجه به نتایج حاصل از اثر سالیسیلیک اسید خارجی در کاهش روند تقسیم سلولی در حالت بدون تنش شوری (۱/۵ مولارنمک) و از طرفی با توجه به کاهش تقسیم سلولی در تنش شوری ۳ مولار بدون حضور اسید سالیسیلیک خارجی به نظر می رسد نباید انتظار داشت که در چنین حالتی سالیسیلیک اسید بتواند تاثیر منفی شوری بر تقسیم سلولی را تعدیل نماید.

علاوه بر این گزارش شده است تیمار جوانه های گندم با سالیسیلیک اسید مقاومت گیاهان به تنش شوری را افزایش می دهد. به طوریکه سالیسیلیک اسید تجمع زیادی از ابسیزیک اسید را سبب می شود که به یکباره طیف وسیعی از واکنشهای ضد تنش را در گیاهان القاء می کند. در واقع ابسیزیک اسید به عنوان یک حدواسط در ایجاد این عمل حفاظتی دخالت دارد. در مقابل سالیسیلیک اسید با افزایش سطح ابسیزیک اسید در گیاهان باعث تسریع پیری نیز خواهد شد از آنجا که وجود هورمون ابسیزیک اسید در *D.*

www.SID.ir

Archive of SID

salina گزارش شده است (۲۴، ۲۶) . لذا به نظر می رسد این امر می تواند دلیلی بر کاهش تقسیم سلولی در روند رشد سلولی تحت تأثیر سالیسیلیک اسید در غلظت ۱/۵ مولارنمک باشد.

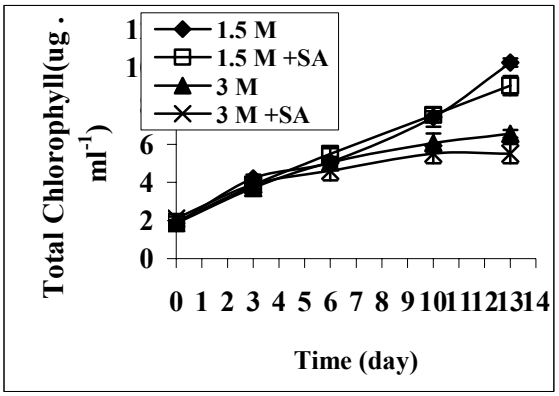
تاثیر همزمان سالیسیلیک اسید و شوری بر روند تولید کلروفیل کل: نمودار۳، تغییرات میزان کلروفیل کل را در واحد حجم و در غلظت ۱/۵مولار و ۳ مولار نمک و غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید طی ۱۳ روز نشان می دهد. همانطور که در کلیه تیمارها مشاهده می شود میزان کلروفیل تا روز ششم به یک اندازه و با یک شیب ثابت، روند افزایشی دارد و از روز ششم به بعد میزان کلروفیل کل در غلظتهای ۱/۵ مولار (بدون سالیسیلیک اسید و همراه با سالیسیلیک اسید) و میزان کلروفیل کل غلظتهای ۳ مولار (بدون سالیسیلیک اسید و همراه با سالیسیلیک اسید) وارد مرحله تصاعدی شده بطوریکه شیب مرحله تصاعدی در غلظتهای ۱/۵ مولار بیشتر شده است. با مقایسه منحنی رشد سلولی (نمودار۲) و منحنی تولید کلروفیل در واحد حجم (نمودار۳) مشاهده می گردد که میزان تقسیم سلولی در غلظتهای ۳ مولار نمک در حضور و عدم حضور سالیسیلیک اسید از روز ششم به بعد وارد مرحله ایستایی شده و با توجه به تراکم سلولی بسیار پائین میزان کلروفیل نیز در هر میلی لیتر کاهش می یابد. با بررسی نمودار۳ مشاهده می شود که بین کلیه تیمارها اختلاف معنی داری وجود نداشته و فقط شوری ۳ مولار به همراه سالیسیلیک اسید اختلاف معنی داری را با شاهد (۱/۵ مولار بدون سالیسیلیک اسید) نشان می دهد. لذا افزودن سالیسیلیک اسید در حالت بدون تنش شوری وهمچنین تنش شوری به تنهایی نمی تواند تاثیری بر روی میزان کلروفیل کل در واحد حجم داشته باشد از طرفی شوری ۱/۵ مولار به همراه سالیسیلیک اسید نیز نمی تواند بر روی کلروفیل کل تاثیر معنی داری داشته باشد ولی به نظر می رسد هم تنش شوری و هم سالیسیلیک اسید به علت کاهش معنی دار در تراکم سلولی (نمودار۲) بالطبع باعث کاهش کلروفیل در واحد حجم گردیده است. ولی با توجه به اینکه در غلظت ۱/۵ مولار نمک افزودن سالیسیلیک اسید باعث کاهش میزان تقسیم سلولی می گردد (نمودار۲) و از طرفی میزان کلروفیل در واحد حجم کاهش نمی یابد (نمودار۳) شاید بتوان نتیجه گیری کرد که شدت تاثیر سالیسیلیک اسید بر کاهش روند تقسیم سلولی شدیدتر از تاثیر آن بر روی میزان کلروفیل باشد. با توجه به اینکه خسارتهای احتمالی اکسیداتیو بر روند تقسیم سلولی اثر گذاشته است ولی نتوانسته بر روند تولید رنگیزه های کلروفیل در واحد حجم اثر داشته باشد. به نظر می رسد که در سلولهای تحت تاثیر سالیسیلیک اسید سیستمهای آنتی اکسیدانتی فعال شده و با سنتز پروتئین های جدید از تخریب کلروفیل جلوگیری می کنند بنابراین بدین صورت مانع از ایجاد خسارتهای اکسیداتیو برسیستمهای متابولیسمی وبیوسنتزی جلبک *D. salina* گردیده است لذا تولید رنگیزه های کلروفیلی مسیر طبیعی خود را طی می کند (۶).

نمودار۴، تغییرات میزان کلروفیل در واحد سلول و در غلظت ۱/۵مولار و ۳ مولار نمک و غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید را نشان می دهد . با مقایسه منحنی رشد سلولی (نمودار ۲) و منحنی تولید کلروفیل سلولی (نمودار۴) مشاهده می شود که با افزایش میزان تقسیم سلولی و وارد شدن روند رشد سلولی به مرحله تصاعدی، تولید کلروفیل در واحد سلول کاهش یافته که این روند تا روز سوم در تمامی تیمار ها ادامه دارد این روند تقریبا در سلول های شاهد با توجه به افزایش تقسیم سلولی در غلظت ۱/۵ مولار (نمودار۲) با شدت کمتری ادامه می یابد و در انتهای آزمایش بعلت کاهش تقسیم سلولی اندکی افزایش می یابد. این میزان کاهش در سلولهای کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار حاوی سالیسیلیک اسید در قیاس با شاهدکمتر بوده و پس از روز سوم تغییری نیافته و در سطح بالاتر و معنی داری نسبت به

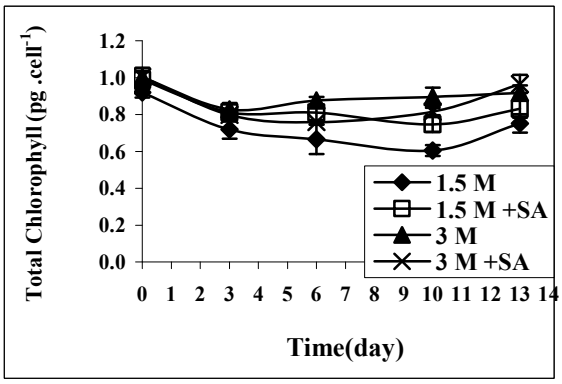
www.SID.ir

Archive of SID

شاهد به علت تقسیم سلولی قرارمی گیرد. به نظر می رسد بالاتر بودن میزان کلروفیل در واحد سلول در این سلولها نسبت به شاهد به علت کمتر شدن تقسیم سلولی نسبت به شاهد بواسطه حضور سالیسیلیک اسید می باشد. میزان کلروفیل در سلول در سلولهای تحت تنش شوری ۳ مولار نمک بهمراه سالیسیلیک اسید و بدون سالیسیلیک اسید با توجه به کاهش تقسیم سلولی آنها (نمودار۲) نسبت به شاهد افزایش یافته است ولی بین حالت شوری بهمراه سالیسیلیک اسید و بدون سالیسیلیک اسید اختلاف معنی داری وجود ندارد. نتایج این آزمایش حاکی از آن است که اعمال تنش شوری به تنهایی و تنش شوری به همراه سالیسیلیک اسید در مقایسه با سلولهای شاهد به طور معنی داری باعث افزایش میزان کلروفیل در سلول می گردد ($P< 0.05$). علی رغم اینکه در گیاه آرابیدوپسیس بر نقش حفاظتی سالیسیلیک اسید درآسیبهای اکسیداتیوی تنشهایی نظیر NaCl و تنشهای اسموتیک تاکید شده است (۷، ۲۵)، ولی به نظر می رسد در جلبک *Dunaliella* به علت مقاوم بودن به شوری و دارا بودن سازوکار های مناسب جهت مقابله با شوری و تنش اکسیداتیو ناشی از آن، نیازی به استفاده از نقش حفاظتی سالیسیلیک اسید در حفظ و پایداری کلروفیل نداشته باشد.



نمودار۳- بررسی اثر همزمان سالیسیلیک اسید و تنش شوری برتولید کلروفیل کل در واحد حجم (میکروگرم بر میلی لیتر) در جلبک *D. salina* کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار نمک. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می باشد.

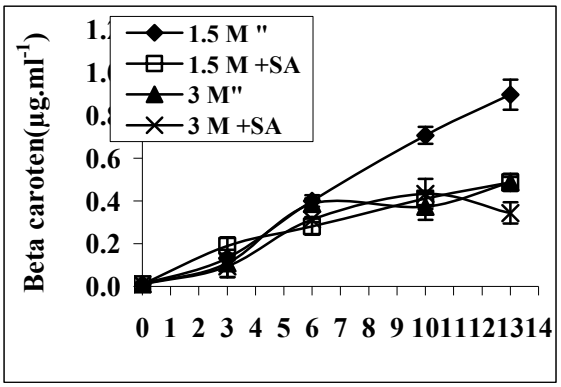


نمودار۴- بررسی اثر همزمان سالیسیلیک اسید و تنش شوری برتولید کلروفیل سلولی (پیکوگرم در سلول) در جلبک *D. salina* کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار نمک. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می باشد.

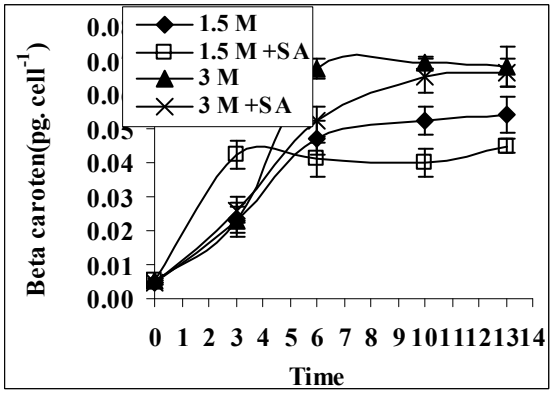
تاثیر همزمان سالیسیلیک اسید و شوری بر روند تولید بتا-کاروتن: نمودار۵، تغییرات بتا-کاروتن در واحد حجم و در غلظت ۱/۵مولار و ۳ مولار نمک و غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید را نشان می دهد. با مشاهده منحنی رشد سلولی (نمودار۲) می توان منحنی میزان بتا-کاروتن در واحد حجم سوسپانسیونهای جلبکی (نمودار۵) را تفسیر نمود. با مقایسه منحنی دو نمودار (نمودار۲و نمودار۵) مشاهده می شود که میزان تقسیم سلولی در غلظت ۱/۵ مولار نمک با سالیسیلیک اسید و غلظتهای ۳ مولار نمک بدون سالیسیلیک اسید و همراه با سالیسیلیک اسید از روز ششم به بعد وارد مرحله ایستایی شده و تقسیم سلولی متوقف می شود در نتیجه تراکم سلولی در واحد حجم بسیار کاهش می یابد. نتایج حاکی از آن است که تیمار سالیسیلیک اسید و تیمار شوری و تیمار سالیسیلیک اسید به همراه شوری علی رغم عدم اختلاف معنی دار با یکدیگر ولی میزان بتا-کاروتن در واحد حجم همگی آنها بطور معنی داری ($P< 0.05$) کمتر از شاهد می باشد. با توجه به نمودار۲ و کاهش میزان تقسیم سلولی در حضور سالیسیلیک اسید به تنهایی و در حضور شوری، می توان نتیجه گرفت کاهش تقسیم سلولی می تواند کاهش میزان بتا -کاروتن در واحد حجم را به دنبال داشته باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۵- بررسی اثر همزمان سالیسیلیک اسید و تنش شوری برتولید بتا-کاروتن در واحد حجم (میکروگرم بر میلی لیتر) در جلبک *D. salina* کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار نمک. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می باشد.



نمودار۶- بررسی اثر همزمان سالیسیلیک اسید و تنش شوری برتولید بتا-کاروتن در سلول (پیکوگرم بر میلی لیتر) در جلبک *D. salina* کشت شده در غلظت ۱/۵ مولار نمک. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار می باشد

نمودار۶، روند تغییرات محتوای بتا-کاروتن سلولی های جلبکی را تحت تنشهای مختلف شوری، سالیسیلیک اسید و تنش شوری و سالیسیلیک اسید نشان می دهد. همانطوریکه در نمودار۵ ملاحظه می گردد در روزهای ابتدای آزمایش برای تمامی غلظتها افزایشی در میزان بتا-کاروتن سلولی دیده می شود که این افزایش برای ۱/۵ مولار نمک به همراه سالیسیلیک اسید بیشتر بوده ولی بعد از روز سوم به حالت ثابت می رسد. این افزایش برای سایر تیمارها ادامه یافته و تقریبا بعد از روز ششم به حالت ثابت می رسد. این میزان افزایش در تمامی تیمار ها بطور معنی داری نسبت به تیمار ۱/۵ مولار نمک به همراه سالیسیلیک اسید بیشتر می باشد. با مقایسه منحنی رشد سلولی در نمودار۲ و منحنی تولید بتا-کاروتن سلولی درنمودار۶ مشاهده می شود که با افزایش میزان تقسیم سلولی و وارد شدن منحنی رشد سلولی به مرحله تصاعدی رشد، در سلولهای شاهد و سلولهایی که تحت تاثیر سالیسیلیک اسید و تنش شوری قرار گرفته اند، علی رغم انتظار کاهش میزان بتا-کاروتن سلولی ولی شاهد افزایش میزان آن می باشیم. .به نظر می رسد در سلولهای شاهد تنش ناشی از کاهش مواد غذایی حاصل از رشد و تقسیم سلولی باعث افزایش میزان بتاکاروتن سلولی باشد (۳، ۴). روند تقسیم سلولی در تیمار ۱/۵ مولار نمک به همراه سالیسیلیک اسید کمتر از شاهد می باشد (نمودار ۲) و این افزایش میزان بتاکاروتن سلولی را در این تیمار در روز های اول آزمایش توجیه می کند. به نظر می رسد عدم افزایش میزان بتاکاروتن سلولی در روز های بعدی علی رغم کمتر بودن تقسیم سلولی آن نسبت به شاهد، به احتمالا به علت اثر بلند مدت سالیسیلیک اسید برروی کاهش اثرات شوری اندک ۱/۵ مولار نمک باشد. در تیمار تنش شوری سنتز بتاکاروتن سلولی در پاسخ به شوری به علت پاسخ آنتی اکسیدانی جلبک به افزایش تنش اکسیداتیو ناشی از تنش شوری می باشد. گزارش های فراوانی در خصوص سنتز بتاکاروتن در پاسخ به شوری در جلبک *Dunaliella* وجود دارد (۲، ۲۱). در مقایسه تنش های شوری ۳ مولار نمک در حضور و عدم حضور سالیسیلیک اسید علی رغم اینکه روند تقسیم سلولی در هر دو تیمار یکسان می باشد ولی روند افزایش سنتز بتاکاروتن در عدم حضور سالیسیلیک اسید زودتر بوده و در تیمار تنش شوری بهمراه سالیسیلیک اسید اندکی کندتر انجام ولی نهایتا با تاخیر در پایان آزمایش با هم برابر می گردد. با توجه به عدم تاثیر سالیسیلیک اسید برروی تقسیم سلولی در دو نوع تیمار تنش شوری لذا تفاوت در میزان بتاکاروتن مربوط به تقسیم سلولی نمی باشد. به نظر می رسد کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

سنتز بتاکاروتن در اثر تنش شوری در حضور سالیسیلیک اسید در قیاس با تیمار تنش شوری بدون سالیسیلیک اسید بعلت اثر بلند مدت سالیسیلیک اسید می باشد که باعث کاهش اثر تنش شوری و در نتیجه کاهش تنش اکسیداتیو در جلبک شده و نیاز به پاسخ انتی اکسیدانی توسط بتاکاروتن در جلبک را کاهش می دهد . از آنجائیکه گزارش شده است بتاکاروتن در شرایط تنشی نظیر نور زیاد و شوری می تواند کلروفیل را در برابر رادیکالهای آزاد محافظت نماید لذا در شرایط تنش شوری بهمراه سالیسیلیک اسید، سنتز کمتر بتاکاروتن می تواند حفاظت کلروفیل را کمتر کرده و منجر به کاهش میزان کلروفیل در سلول در روزهای ششم به بعد در جلبکهای تحت تیمار تنش شوری بهمراه سالیسیلیک اسید نماید که این امر در نمودار ۴ مشهود می باشد.

جمع بندی: نتایج حاصل از تاثیر غلظتهای مختلف سالیسیلیک اسید بر روند رشد سلولی نشان داد که در بین غلظتهای۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۷۵۰۰ میکرومولار غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار نسبت به شاهد و سایر غلظتها تاثیر قابل توجهی بر روند رشد سلولی دارد و از طرفی نسبت به غلظت ۷۵۰۰ میکرومولار که احتمالا به دلیل ایجاد سمیت در محیط کشت آن را به رنگ قهوه ای در می آورد مطمئن تر است. غلظت ۵۰۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید می تواند منجر به کاهش روند تقسیم سلولی نسبت به شاهد گردد به طوریکه در کلیه آزمایشها استفاده از سالیسیلیک اسید به تنهایی یا همراه با تنش شوری باعث کاهش تقسیم سلولی نسبت به سلولهای شاهدگردید که این امر می تواند ناشی از کاهش سطح انرژی سلول تحت تاثیر سالیسیلیک اسید باشد نتایج آزمایش حاکی از آنست که در غلظت ۳ مولار نمک، سالیسیلیک اسید اثر تشدید کننده یا تعدیل کننده تنش شوری بر تقسیم سلولی نداشته است. همچنین هم تنش شوری و هم سالیسیلیک اسید به علت کاهش معنی دار در تراکم سلولی بالطبع باعث کاهش کلروفیل در واحد حجم گردیده است و از طرفی با کاهش نیافتن میزان کلروفیل در واحد حجم در غلظت ۱/۵ مولار نمک بهمراه سالیسیلیک، می توان نتیجه گیری کرد که شدت تاثیر سالیسیلیک اسید بر کاهش روند تقسیم سلولی شدیدتر از تاثیر آن بر روی میزان کلروفیل باشد که این امر می تواند ناشی از خسارتهای احتمالی اکسیداتیو بر روند تقسیم سلولی باشد و اعمال تنش شوری به تنهایی و تنش شوری به همراه سالیسیلیک اسید در مقایسه با سلولهای شاهد به طور معنی داری باعث افزایش میزان کلروفیل در سلول می گردد همچنین کاهش میزان تقسیم سلولی در حضور سالیسیلیک اسید به تنهایی و در حضور شوری، کاهش میزان بتا – کاروتن در واحد حجم را به دنبال داشته است و سنتز بتاکاروتن سلولی در اثر تنش شوری در حضور سالیسیلیک اسید در قیاس با تیمار تنش شوری بدون سالیسیلیک اسید کاهش می یابد که بعلت اثر بلند مدت سالیسیلیک اسید می باشد و باعث کاهش اثر تنش شوری و در نتیجه کاهش تنش اکسیداتیو در جلبک شده و نیاز به پاسخ انتی اکسیدانی توسط بتاکاروتن در جلبک را کاهش می دهد بنابراین در شرایط تنش شوری بهمراه سالیسیلیک اسید، سنتز کمتر بتاکاروتن می تواند حفاظت کلروفیل را کمتر کرده و منجر به کاهش میزان کلروفیل در سلول گردد.

منابع

۱- شریعتی، م. و مددکار حق جو، م. ۱۳۷۷. بررسی رابطه میزان بتا- کاروتن و محتوای کلروفیلی در جلبک سبز *Dunaliella salina* در پاسخ به نور شدید. مجله زیست شناسی ایران. ۷، ۱۱۲-۱۳۲.

۲- شریعتی، م. و مددکار حق جو، م. ۱۳۷۹. بررسی اثر تنش شوری بر میزان بتا-کاروتن و کلرفیل محتوای جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* جدا شده از مرداب شورگاو خونی اصفهان. مجله پژوهشی علوم دانشگاه اصفهان. ۱۴، ۵۵-۶۶ .

www.SID.ir

Archive of SID

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 شورگاو خونی اصفهان. مجله پژوهش و سازندگی. ۵۹، ۷-۱۳.

۴-شریعتی، م. و آقایی، پ. ۱۳۸۵. اثر کمبود سولفور بر رشد سلولی، تولید بتاکاروتن، کلروفیل و فتوسنتز در جلبک *Dunaliella salina* جدا شده از مرداب شورگاو خونی اصفهان. مجله زیست شناسی ایران. ۲۰، ۱۵۳-۱۶۳.

5-Appel، H. M. 2005. Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation. Journal of Chemistry and Ecology. 19, 1521-1552.

6-Avancini, G., Abreu, I. N., Saldana, M. D. A., Mohamed, R. S. and Mazzafera, P. 2003. Induction of pilocarpine formation in jaborandi leaves by salicylic acid and methyljasmonate. Phytochemistry. 63, 171-175

7-Borsani, O., Valpuesta, V. and Botella, A. M. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiology. 126, 1024–1030.

8-Brodersen, P., Malinovsky, F. G., Hématy, K., Newman, M. A. and Mundy, J. 2005. The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis acd11*. Plant Physiology. 138, 1037-1045.

9-Deef, H. E. 2007. Influence of salicylic acid on stress tolerance during seed germination of *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. Advances in Biological Research. 1, 40-48.

10-Del Campo, J. A., García-González, M. and Guerrero A. M. G. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. Microbiology and Biotechnology. 74, 1163–1174.

11-Eijckelhoff, C. and Dekker, J. P. 1997. A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin and beta- carotene content of isolated photosystem II reaction center complexes. Photosynthesis and Respiration. 52, 63-67.

12-Glass, A. D. M. 1973a. Influence of phenolic acids on ion uptake I. inhibition of phosphate uptake. Plant Physiology. 51, 1037-1041.

13-Glass, A. D. M. 1973b. Influence of phenolic acids on ion uptake II. Depolarization of membrane potentials. Plant Physiology. 54, 855-858.

14-Greenberg, J. T., Silverman, F. P. and Liang, H. 2000. Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. Genetics. 156, 341-350.

15-Hélène, V., Lu, H., Debra, N., R. and Jean, T. G . 2001. A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. Plant Journal. 28, 209-216.

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

17-Korkmaz, A., Uzunlu, M. and Demirkiran, A. R. 2007. Treatment with acetyl salicylic acid protects muskmelon seedlings against drought stress. Acta Physiologia Plantarum. 29, 503-508

18-Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G. and Popova, L. 2006. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. Journal of Plant Physiology. 165, 920-31.

19-Mateo, A., Funck, D., Mühlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P. M. and Karpinski, S. 2006. Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. Journal of Experimental Botany. 57, 1795-1807.

20-Norman, Ch., Howell, K. A., Millar, A. H., Whelan, J. M. and Day, D. A. 2004. Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. Plant Physiology. 134, 492–501.

21-Oren, A. 2005. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. Saline Systems. 25.

22-Sakhabutdinova, A. R., Fatkhudinova, D. R., Bezrukova, M.V. and Shakirova, F. M. 2003. Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plant. Journal of Plant Physiology. 314-319.

23-Sarmad, J., Shariati, M. and Madadkar Haghjou, M. 2007. Relationship between endogenous abscisic acid and beta-carotene synthesis in unicellular green alga *Dunaliella*. American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science. 2, 559-564.

24-Schoen, M. 1988. Cell counting In *dunaliella*: Experimental pycology (eds. Labban, C., Chapnoon, D. and Kermer, B. P.). Cambridge University press.

www.SID.ir

Archive of SID

25-Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova Rymma, M. V., Fatkhutdinova, A. and Fatkhutdinova, D. R. 2003. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Science. 164, 317-322.

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

27-Stevens, J., Senaratna, T. and Sivasithamparam, K. 2006. Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilization. 49, 77-83.

28-Szepesi, Á., Csiszár, J., Bajkán, S., Gémes, K., Horváth, F., László, E., Deér, A. K., Simon, M. L. and Tari, I. 2005. Role of salicylic acid pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt- and osmotic stress. Acta Biologica Szegediensis. 49, 123-125.

Effect of salicylic acid and salt stress on growth (cell division), photosynthetic pigments and beta-carotene content of unicellular alga *Dunaliella salina* Teod

Moein M. and Shariait M.

Department of Biology, University of Isfahan, Hezarjarib st., Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Dunaliella salina is unicellular green micro-algae living in lakes and marine habitats containing high salt concentration. This alga produces different cellular compounds such as beta-carotene under environmental stresses. In this research, the effect of both salt stress and salicylic acid on growth rate, photosynthesis pigments and beta-caroten content of the cells were investigated. Results showed in all experiments, the salicylic acid or combination of salicylic acid and salt stress decreased cell division rate. The presence of salicylic acid reduced the effect of salt stress on beta-carotene and chlorophyll content of the cells. The result indicated that salt stress can increase beta-carotene content. Both salt stress and salicylic acid due to decrease in cell division decreased chlorophyll and beta-carotene per volume unit.

Key words: *Dunaliella*, salicylic acid, beta-carotene, salt stress

www.SID.ir