

تاثیر فیتوهورمون جیبرلین بر پارامترهای رشد، رنگدانه ها، فاکتورهای فتوسنتزی و ترکیبات بیوشیمیایی ریز جلبک *Tetraselmis suecica*

احمد احمدی^۱، نصراله احمدی فرد^{۱*}، احمد ایمانی^۱، سجاد پیرسا^۲، بهروز آتشبار^۳

۱- گروه شیلات و آبزیان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه.

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه.

۳- گروه اکولوژی و ارزیابی ذخایر، پژوهشگاه آرتیمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه.

چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های نوین با رویکرد بهبود در محیط کشت ریز جلبک‌ها جهت افزایش بهره‌وری در تولید به طور چشم‌گیری افزایش یافته است. در این راستا استفاده از هورمون‌های گیاهی به عنوان تنظیم کننده‌های رشد اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند. در مطالعه حاضر تاثیر فیتوهورمون جیبرلین روی برخی فراستجه‌های فیزیولوژیک ریز جلبک *Tetraselmis suecica* بررسی شد. کشت جلبک در شرایط استاندارد با محیط کشت گیلارد، دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، شدت نور ۱۶۰۸ (روشنایی/تاریکی)، شوری ۲۵ میلی گرم در لیتر و هوادهی ۲۴ ساعته به مدت ده روز انجام شد. هورمون جیبرلین با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر به محیط کشت جلبک‌ها اضافه گردید سنجش فاکتور رشد، رنگدانه‌ها، فاکتورهای فتوسنتزی و ترکیبات بیوشیمیایی در مرحله رشد فاز لگاریتمی انجام گرفت. براساس نتایج بیشترین میزان رشد سلولی در تیمار ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین مشاهده شد اگرچه در سایر تیمارها نیز تفاوت معنی‌داری با کنترل مشاهده شد ($P < 0/05$). بیشترین میزان پروتئین و کربوهیدرات در تیمار ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین مشاهده شد ($P < 0/05$). میزان چربی کل نیز از ۱۵/۲۳ در کنترل به ۱۸/۵۳ در تیمار ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین افزایش یافت ($P < 0/05$). پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، رنگدانه‌ها، فاکتورهای فتوسنتزی و وزن خشک نیز در غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین نسبت به کنترل تفاوت معنی‌داری نشان دادند ($P < 0/05$). بیشترین میزان کلروفیل a و b در غلظت‌های ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین مشاهده گردید ($P < 0/05$). با توجه به یافته‌ها می‌توان گفت هورمون جیبرلین پتانسیل بالایی در تقسیم سلولی، تراکم نهایی، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، اندازه سلول و ترکیبات بیوشیمیایی ریز جلبک *Tetraselmis suecica* دارد. همچنین جلبک فوق‌الذکر می‌تواند نامزد مناسبی برای لارو آبزیان دریایی، داروها، آنتی‌اکسیدان‌ها و منبع غنی از ترکیبات در سوخت‌های زیستی مطرح باشد.

کلید واژه‌ها: فیتوهورمون، رشد، رنگدانه‌ها، فاکتورهای فتوسنتزی، ترکیبات بیوشیمیایی

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۱

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۰/۰۹/۳۰

*نویسنده مسئول:

N.ahmadifard@urmia.ac.ir

مقدمه

ریز جلبک جنس *Tetraselmis sp.* به عنوان یک منبع غذایی با ارزش برای بی‌مهرگان در آبی پروری، مانند سخت پوستان یا روتیفرها، پاروپایان و آرتیمیا در تفریخ گاه‌ها به دلیل غنی بودن ترکیبات بیوشیمیایی مهم (مانند: پروتئین، کربوهیدرات و رنگدانه‌ها) مورد استفاده قرار می‌گیرند.

از طرفی این جلبک توانایی رشد در طیف وسیعی از شرایط فیزیکی شیمیایی را دارا می‌باشد [۱]. همچنین، زیست توده ریز جلبک کاربردهای بی‌شماری به عنوان یک مکمل غذایی برای انسان و جانوران برای بهبود پاسخ ایمنی و باروری، منابع سوخت‌های زیستی، مکمل‌های آرایشی، مواد رنگی غذایی طبیعی، منبع مواد با ارزش بالا مانند اسیدهای چرب اشباع نشده، اسیدهای چرب ۳-ω و رنگدانه‌ها دارد [۳، ۴].

برخی از جلبک‌های سبز من جمله *Tetraselmis sp.* به عنوان منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در نظر گرفته می‌شوند. کاربرد آنها به دلیل قابلیت تعدیل سیستم ایمنی، ضد میکروبی، ضد ویروسی، آنتی‌اکسیدانی و ضد تومور امیدوارکننده است [۵]. پلی‌ساکاریدهای جلبکی حذف کننده رادیکال‌های آزاد هستند بنابراین اثرات آنتی‌اکسیدانی دارند و از آسیب اکسیداتیو در موجودات زنده جلوگیری می‌کنند [۶]. همچنین ریزجلبک *Tetraselmis suecica* حاوی مقادیر بالای از کاروتنوئیدها مانند گزانتوفیل لوتتین، ویولاگزانتین، نئوگزانتین، آنتراگزانتین و لوروگزانتین هستند. عصاره جلبکی آنها می‌تواند آسیب‌های اپیدرم سلولی در سرطان پوست و سرطان ریه (A549 line) را بهبود بخشد [۷].

ریزجلبک‌ها به دلیل ویژگی‌های فیزیولوژیکی و انعطاف پذیری بالا می‌توانند در شرایط اتوتروفیک، هتروتروفیک و میکسوتروفیک رشد و پرورش یابند [۸، ۹]. کشت ریز جلبک‌ها بیشتر در شرایط اتوتروفی با استفاده از نور به عنوان منبع انرژی انجام می‌شود، که با عمل فتوسنتز به انرژی شیمیایی سبب ذخیره متابولیت‌های همچون پلی‌ساکاریدها، پروتئین و لیپیدها می‌شود [۱۰، ۱۱]. میزان متابولیت‌های تولید شده به تغییر در ترکیبات محیط کشت بستگی دارد، بنابراین به منظور به دست آوردن بهترین بازده از نظر بهره وری و زیست توده، بهینه سازی در محیط‌های کشت براساس ریزمغذی‌ها و درشت مغذی‌ها دنبال می‌شود. در این میان استفاده از هورمون‌های گیاهی به عنوان تنظیم کننده‌های رشد داخل و خارج سلولی اهمیت بالایی دارند [۸، ۱۲].

ریز جلبک‌ها و گیاهان آبزی فیتوهورمون‌هایی تولید می‌کنند که با غلظت کمی در محیط‌های آبی جریان می‌یابند. فیتو هورمون‌ها رشد و نمو گیاه و همچنین واکنش‌های استرس محیطی را تنظیم می‌کنند که در غلظت‌های پایین نانومولار موثر هستند. در دهه‌ی ۱۹۳۰ از فیتوهورمون‌ها جهت افزایش رشد و تقسیم سلولی در گیاهان عالی استفاده شد [۱۳]. امروزه در بسیاری از جلبک‌ها اثرات فیتوهورمون‌های آبسزیک اسید (ABA)، اکسین (IAA, IBA)، جبرلین (GAs)، اتیلن (ethylene)، براسینوستروئیدها (BRs) و سیتوکنین (Cytokinins) روی رشد، تقسیم سلولی، رنگدانه‌ها، بیوسنتز چربی، محتوای پروتئین، اندازه سلول و.. اثبات شده است [۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷]. جبرلین‌ها (GA) هورمون‌های گیاهی هستند که بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان مانند رشد طولی [۱۸، ۱۹]، توسعه بذر و جوانه زنی را تنظیم می‌کنند [۲۰]. آنها اسیدهای دی‌ترپنوئید هستند که بر بسیاری از مناطق رشد گیاه تأثیر می‌گذارند که باعث افزایش کشیدگی ساقه، تولید میوه و جوانه زنی بذر می‌شوند [۲۱]. شواهد کمی در مورد فعالیت جبرلین درونی در جلبک‌های سبز مشاهده شده است. اگرچه افزایش رشد در پاسخ به جبرلین‌ها در برخی از جلبک‌ها ثبت شده است اما مطالعات کمی برای کاربرد آن فراتر از گیاهان عالی انجام شده است. از طرف دیگر، ریز جلبک‌ها از نظر بسیاری از صفات فیزیولوژیکی به گیاهان شبیه هستند [۲۲، ۲۳]. بنابراین بیشتر تحقیقات روی گیاهان متمرکز شده است [۲۴]. برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول‌های جلبکی مثل افزایش ابعاد و تعداد سلول، تغییر محتوای قندها، پروتئین، آنزیم‌ها و رنگیزه‌ها تحت کنترل چنین هورمون‌های هستند. البته مسیر عملکرد فیتوهورمون‌ها در جلبک‌ها هنوز ناشناخته است. در پژوهش حاضر اثرات هورمون جبرلین بر پارامترهای رشد، رنگدانه‌ها، فاکتورهای فتوسنتزی و ترکیبات بیوشیمیایی در ریز جلبک *Tetraselmis suecica* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه جلبک، شرایط کشت و برداشت آن

جلبک سبز *Tetraselmis suecica* از پژوهشکده ی میگو کشور واقع در بوشهر تهیه گردید، و در شرایط استاندارد در محیط کشت گیلارد (F2) کشت داده شد. محیط کشت مورد استفاده مخلوطی از یک لیتر محلول ماکرومولکول‌ها و میکرومولکول‌ها با ۱۰۰ میلی لیتر از محلول ویتامین می‌باشد. کشت جلبک‌ها در شوری ۲۵ گرم درلیتر، دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶:۸ با هوادهی ۲۴ ساعته انجام شد. فاکتورهای رشد به طور روزانه محاسبه و جلبک‌ها در مرحله رشد لگاریتمی برداشت شدند.

نحوه آماده سازی هورمون و غلظت‌های مورد استفاده

جیبرلیک اسید از شرکت سیگما (کد: Sigma, G7645) در ویال ۱۰ گرمی تهیه شد. غلظت‌های مورد استفاده در این آزمایش براساس گزارشات قبل و پیش تست‌های انجام شده انتخاب شدند. هورمون اولیه به صورت استوک در آب مقطر حل و به ترتیب غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر به محیط‌های کشت جلبک اضافه گردید.

رشد جلبک بطور روزانه به مدت ده روز و جذب محلول حاوی جلبک در طول موج ۶۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر Uviline 9300-9600 (SECOMAM; France) قرائت شد. جهت ارزیابی وزن خشک (گرم در لیتر) جلبک‌ها در دور ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شدند خمیرجلبکی جداشده در پلت‌های وزن شده دوبار توسط آب مقطر شستشو داده شد تا میزان نمک‌ها آن حذف شود، در نهایت پلت‌ها در اون ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت خشک و توزین شدند. وزن خشک جلبک براساس اختلاف وزن اولیه و ثانویه محاسبه شد [۲۵، ۲۶].

سنجش میزان رنگدانه ها

برای سنجش میزان کلروفیل از نمونه تازه استفاده شد. ۵۰ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰ g سانتیفریوژ گردید تا رسوب کاملی بدست آید. سپس ۵ میلی لیتر متانول ۹۵ درصد به آن اضافه کرده، ۳۰ تا ۶۰ ثانیه هموژن گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شد، در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ g سانتیفریوژ شدند محلول رویی جمع آوری شده و سپس میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها بر اساس فرمول زیر محاسبه شد [۲۷].

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 16.72 A_{665.2} - 9.16 A_{652.4}$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 34.09 A_{652.4} - 15.28 A_{665.2}$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1.63 C_a - 104.96 C_b) / 221$$

تعیین نرخ فتوسنتز و تنفس

میزان فتوسنتز و تنفس جلبک *T. suecica* با استفاده از کیت WTW Oxi 3210 (ساخت آلمان) اندازه گیری شد. کل کشت‌های جلبکی به مدت ۳ دقیقه در تاریکی و روشنایی قرار گرفتند سپس تغییرات اکسیژن محلول در محیط برای محاسبه روند اکسیژن فتوسنتزی و میزان اکسیژن تنفسی اندازه گیری شد. تنفس و فتوسنتز واقعی با استفاده از معادلات شرح داده شده در زیر محاسبه شد [۲۸]:

$$Y1(Pmo1. cell. h) = \frac{(c2 - c1)}{p \times t}$$

Y1: نرخ فتوسنتز

P: تراکم سلول

t: زمان واکنش

C₁: غلظت اکسیژن اولیه

C₂: غلظت اکسیژن در ۳ دقیقه روشنایی

$$Y2(pmo1. cell. h) = \frac{(c2 - c3)}{p \times t}$$

Y2: نرخ تنفس

P: تراکم سلول

t: زمان واکنش

C₂: غلظت اکسیژن در ۳ دقیقه روشنایی

C₃: غلظت اکسیژن در ۳ دقیقه تاریکی

پتانسیل آنتی اکسیدانی

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از رادیکال‌های پایدار ۲ و ۲ دی فنیل پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) انجام گرفت^[۲۹]. دو میلی‌لیتر از عصاره جلبک به دو میلی‌لیتر از محلول اتانولی ۰/۸ مولار رادیکال آزاد DPPH افزوده و به مدت یک دقیقه با دستگاه ورتکس به خوبی مخلوط و ۳۰ دقیقه در دمای محیط در تاریکی نگهداری گردید. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره طبق فرمول زیر محاسبه و به صورت درصد RSA بیان شد.

$$\%RSA = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

A control: میزان جذب کنترل

A sample: میزان جذب نمونه

سنجش پروتئین براساس روش Lowry و همکاران انجام شد^[۳۰]. ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم جلبک توزین شد و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه هموژن شدند، ۰/۵ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم (NaOH 1N) نرمال به نمونه‌ها اضافه شد و ورتکس شدند. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند ۵ میلی‌لیتر از معرف بیکربنات سدیم (Na₂CO₃) و سدیم تارترات (NaK Tartrate) اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. نهایتاً ۰/۵ میلی‌لیتر فولین (Folin 1N) ۱ نرمال اضافه و به مدت سه ساعت در تاریکی نگه داشته شدند. جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتری با طول موج ۷۵۰ قرائت شد.

ارزیابی کربوهیدرات براساس روش فنل سولفوریک اسید انجام شد^[۳۱]. ۵۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبک با دور ۵۰۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شد، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه‌ها اضافه و سونیکت شدند. ۱ میلی‌لیتر فنل ۵٪ و ۳ میلی‌لیتر اسید سولفوریک به نمونه‌ها اضافه گردید، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند و عصاره حاصله در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. استخراج چربی به روش Dyer ، Bligh و اصلاح شده^[۳۲] انجام شد. ۱۰۰ میلی‌گرم جلبک خشک با ۲۰ میلی‌لیتر مخلوطی از کلروفرم/متانول (روش حجمی ۱ به ۲) اضافه شد در طی استخراج نمونه‌ها ورتکس شدند. بعد از فیلتر کردن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول روایی جداشد، نمونه‌ها در آون خشک شده و چربی آنها توزین گردید.

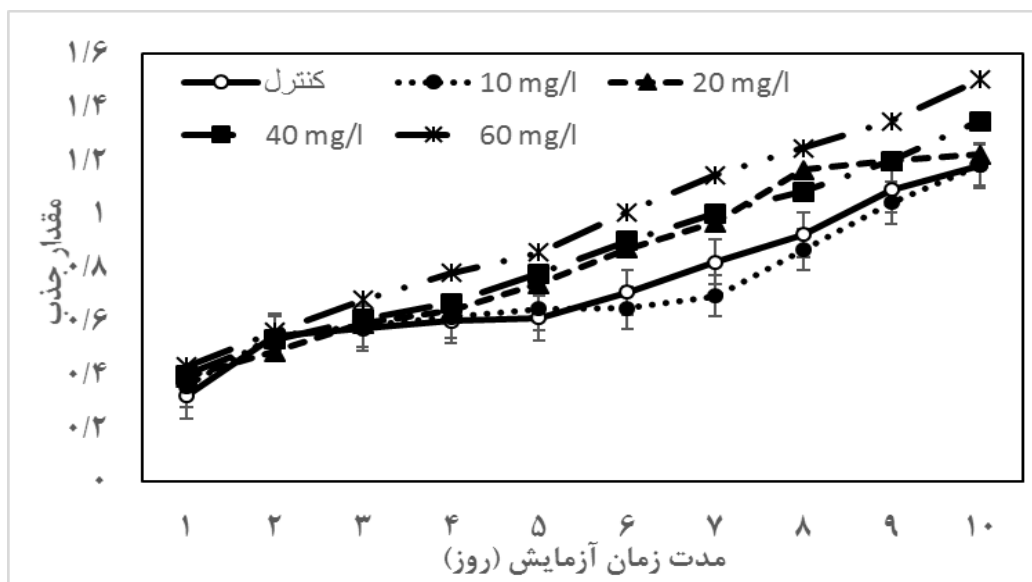
بعد از بررسی نرمال بودن توزیع داده و همگنی واریانس‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه^۱ برای بررسی داده‌ها و آزمون دانکن برای بررسی اختلاف بین میانگین‌ها استفاده گردید. از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ برای بررسی آماری داده‌ها و از Excel نسخه ۲۰۱۰ برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج

رشد

نمودار رشد جلبک *Tetraselmis suicica* در حضور ۴ غلظت ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر از هورمون جیبرلین در شکل ۱ آمده است. با توجه به نتایج با افزایش غلظت هورمون میزان رشد نیز افزایش یافت، در روزهای آغازین کشت تا روز سوم میزان رشد جلبک با کنترل منطبق بوده و از روز سوم تفاوت معنی داری در رشد نسبت به کنترل در غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده گردید ($P < 0/05$). کمترین میزان رشد در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و بیشترین میزان رشد جلبک در غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که تفاوت معنی داری نسبت به سایر تیمارها نشان دادند ($P < 0/05$).

¹ - ANOVA



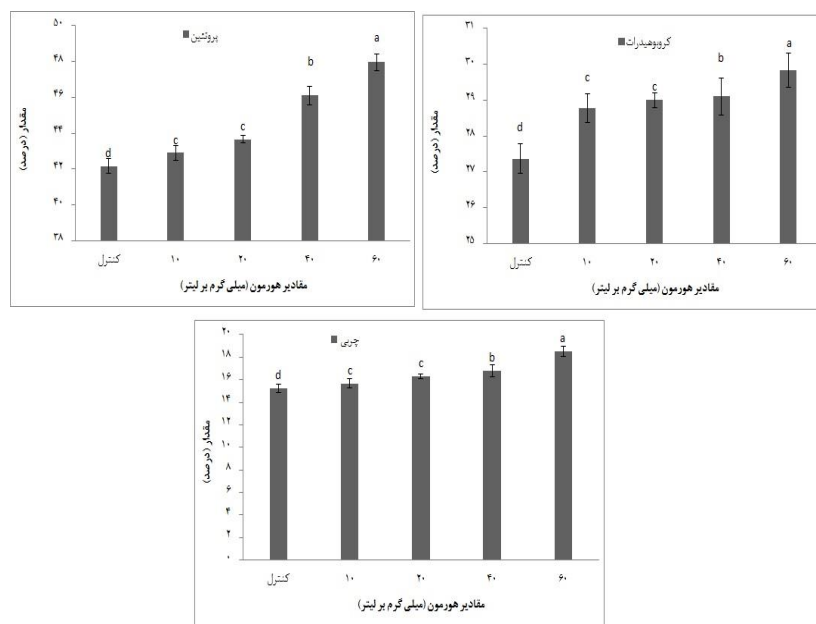
شکل ۱. نمودار رشد جلبک *Tetraselmis suieica* در حضور ۴ غلظت ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر از هورمون جیبرلین در طول مدت آزمایش (۱۰ روز)

ترکیبات آنالیز تقریبی

در شکل ۲ ترکیب بیوشیمیایی ریزجلبک *Tetraselmis suieica* در حضور غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین آورده شده است. میزان پروتئین از ۴۲٪ در کنترل به ۴۸٪ در ۶۰ میلی گرم هورمون افزایش یافت. بین تیمارهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین تفاوت معنی‌داری در میزان پروتئین مشاهده نشد ($P < 0/05$). هرچند تمام غلظت‌های ذکرشده با کنترل تفاوت معنی‌داری داشتند اما بیشترین میزان پروتئین در غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین مشاهده گردید ($P < 0/05$).

میزان کربوهیدرات در حضور غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین در شکل ۲ گزارش شده است، بیشترین میزان کربوهیدرات در غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر از هورمون جیبرلین مشاهده گردید. در تمام گروه‌ها میزان کربوهیدرات تفاوت معنی‌داری با کنترل نشان دادند ($P < 0/05$). اگرچه بین غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$).

میزان چربی کل با مقادیر مختلف از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر از هورمون جیبرلین در شکل ۲ آورده شده است. براساس نتایج میزان چربی از کنترل به سمت بالاترین غلظت شیب ملایمی داشت به طوریکه بالاترین میزان چربی در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی گرم هورمون جیبرلین مشاهده شد. میزان چربی در تمام تیمارها نسبت به کنترل تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$).



شکل ۲. نتایج آنالیز تقریبی جلبک *Tetraselmis suica* در حضور ۴ غلظت ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین در طول مدت آزمایش (۱۰ روز)

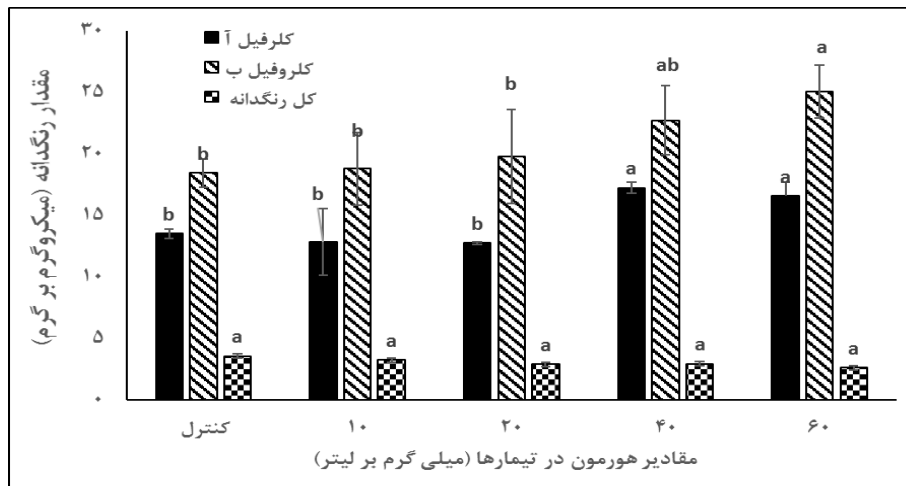
ظرفیت آنتی اکسیدانی، اندازه سلول، فاکتورهای فتوسنتزی و وزن خشک جلبک

در جدول ۱ پتانسیل آنتی اکسیدانی، اندازه سلول، فاکتورهای فتوسنتزی و وزن خشک آمده است. براساس نتایج بیشترین پتانسیل آنتی اکسیدانی در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین جلبک *Tetraselmis suica* مشاهده شد ($P < 0/05$). تفاوت معنی داری بین پایین ترین غلظت هورمون و کنترل مشاهده نشد ($P > 0/05$). اندازه سلول در تیمارهای مختلف با افزایش غلظت هورمون نسبت به کنترل افزایش یافت در حالیکه بیشترین اندازه سلول در غلظت ۴۰ میلی گرم هورمون جیبرلین مشاهده شد ($P < 0/05$). فاکتورهای فتوسنتزی نیز همزمان با رشد جلبک افزایش یافت طوری که بیشترین نرخ فتوسنتز در تیمار ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین مشاهده شد، نرخ تنفس نیز در تیمارهای مختلف نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری نشان داد. وزن خشک جلبک نیز همزمان با افزایش غلظت هورمون اختلاف معنی داری نسبت به کنترل نشان داد ($P < 0/05$).

جدول ۱. نتایج ظرفیت آنتی اکسیدانی (درصد)، اندازه سلول (میلی متر)، فاکتورهای فتوسنتزی ($\text{pmol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) و وزن خشک (میکروگرم در سلول) جلبک *Tetraselmis suica* در حضور ۴ غلظت ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین

تیمارها	ظرفیت آنتی اکسیدانی %	اندازه سلول	نرخ فتوسنتز	نرخ تنفس	وزن خشک
کنترل	$47/67 \pm 0/45^c$	$8/87 \pm 0/47^d$	$0/57 \pm 0/06^c$	$0/13 \pm 0/02$	$1/68 \pm 0/03^d$
۱۰ mg/l	$47/33 \pm 0/56^c$	$9/67 \pm 0/15^c$	$0/77 \pm 0/06^c$	$0/17 \pm 0/06$	$1/85 \pm 0/01^d$
۲۰ mg/l	$48/67 \pm 0/58^b$	$10/63 \pm 0/15^c$	$1/27 \pm 0/15^b$	$0/23 \pm 0/05$	$2/24 \pm 0/01^c$
۴۰ mg/l	$50/67 \pm 0/41^{ab}$	$12/53 \pm 0/25^a$	$2/20 \pm 0/10^a$	$0/33 \pm 0/01$	$2/56 \pm 0/02^b$
۶۰ mg/l	$51/67 \pm 0/58^a$	$11/50 \pm 0/26^b$	$2/73 \pm 0/21^a$	$0/37 \pm 0/04$	$2/92 \pm 0/03^a$

در شکل ۳ مقادیر رنگدانه‌های فتوسنتزی جلبک *Tetraselmis suica* در حضور هورمون جیبرلین با غلظت‌های مختلف آورده شده است. براساس نتایج با افزایش رشد میزان کلروفیل نیز در تیمارهای مختلف افزایش یافت، بیشترین میزان کلروفیل a در تیمار ۶۰ میلی گرم در لیتر و کلروفیل b در تیمار ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین مشاهده شد ($P < 0/05$). تفاوت معنی داری بین گروه‌های مختلف آزمایش در میزان کل کاروتنوئیدها مشاهده نشد ($P > 0/05$).



شکل ۳. مقدار رنگدانه‌ها در جلبک *Tetraselmis suica* در حضور ۴ غلظت ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین در طول مدت آزمایش (۱۰ روز)

بحث

در مطالعه حاضر اثر غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلین روی رشد، فاکتورهای فتوسنتزی، ترکیب بیوشیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی ریزجلبک *Tetraselmis suica* ارزیابی شد و نتایج نشان داد که هورمون‌های استخراج شده از گیاهان عالی می‌تواند اثرات مثبتی روی رشد و تراکم جلبک‌ها داشته باشد. در مطالعه حاضر اثر هورمون جیبرلین روی رشد، تراکم سلولی، اندازه سلول و رنگدانه‌های فتوسنتزی معنی دار بود. Cho et al., 2015 گزارش کردند که غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین می‌تواند بیوماس جلبک *D. salina* در مرحله رشد لگاریتمی را بهبود بخشد. آنها گزارش دادن که غلظت‌های پایین سایر فیتوهورمون‌ها مثل آبسزیک اسید و اکسین می‌تواند اثر معناداری روی رشد داشته باشد [۳۳]. همچنین مطالعه [۳۴] نشان داد که هورمون‌های جیبرلین و اکسین می‌تواند اثرات مثبت معنی داری مشابهی در ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* داشته باشد. نتایج این بررسی نشان داد که عملکرد فیتوهورمون‌ها می‌تواند مکانیزم‌های پاسخ مانند رشد، تقسیم سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه در جلبک‌های سبز باشد.

ترکیب بیوشیمیایی ریزجلبک‌ها چهار گروه اصلی از مولکول‌ها: پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها در نسبت‌های مختلف بر اساس گروه‌های جلبکی را شامل می‌شود [۳۵]. در مطالعه‌ی حاضر چربی کل از ۱۵/۲۳ در کنترل به ۱۸/۵۳ در تیمار ۶۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین افزایش پیدا کرده است به نظر می‌رسد هورمون جیبرلین اثرات به مراتب کمتری در میزان چربی کل نسبت به سایر ترکیبات در جلبک *Tetraselmis suica* داشته است که به فیزیولوژی سلولی جلبک ارتباط دارد. گزارشات محققین Jusoh et al., 2019 حاکی از آن است که هورمون جیبرلین اثر معنی داری در افزایش میزان چربی در جلبک *Chlorella vulgaris* نداشته است و بیان کردند هورمون فوق الذکر می‌تواند در تقسیم و تراکم سلولی آن نقش داشته باشد [۳۶]. میزان پروتئین در مطالعه حاضر ۴۲/۱، ۴۲/۹، ۴۳/۶، ۴۶/۱ و ۴۷/۹ به ترتیب در کنترل و غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم هورمون جیبرلین گزارش شد که با مطالعه تیمار هورمونی جیبرلین، سیتوکنین و آبسزیک اسید روی

جلبک *Chlorella sorokinian* در شرایط فتواتوتروفیک انجام شده مطابقت دارد این محققین Ozioko et al., 2015 گزارش دادند که ارتباط مستقیمی بین رشد و محتوای پروتئین جلبک‌های سبز وجود دارد [۳۴].

اندازه سلول به عنوان یک فاکتور مهم در برداشت و عمل آوری جلبک‌ها مطرح است و یک چالش در تولید زیست توده جلبکی محسوب می‌شود [۳۸، ۳۷]، ۲۰ الی ۳۰٪ هزینه‌های تولید جهت برداشت آنها به شمار می‌رود [۳۹]. در مطالعه حاضر بالاترین اندازه سلولی در تیمار ۴۰ میلی گرم در لیتر هورمون جیبرلین مشاهده شد که با مطالعه محققین در مورد جلبک *Chlorella sorokinian* مطابقت دارد [۳۴].

فتوسنتز و تنفس دو فرآیند متابولیکی کلیدی هستند که بیوماس تولید ارگانیزم‌های فتوسنتزی را تعیین می‌کنند. از طرفی امکان دارد فیتوهورمون‌ها اثرات فیزیولوژیکی کمتری به وسیله تغییر در بیوماس تولیدی مانند رشد و تراکم سلولی انعکاس دهند بنابراین ارزیابی نرخ فتوسنتز و تنفس توسط فیتوهورمون‌ها به قابلیت تثبیت کربن در سویه‌ها بستگی دارد [۲۸]. گزارش شده که سطوح مختلف جیبرلین در مراحل آغازین و انتهای رشد می‌تواند بر میزان فتوسنتز و تنفس جلبک *D. salina* موثر باشد که در مطالعه حاضر نیز سطوح بالاتر اثر معنی داری بر میزان فاکتورهای فتوسنتزی داشته است.

GA3 می‌تواند باعث افزایش رشد در *Euglena gracilis* [۴۰]، افزایش سنتز RNA و تجمع استاگزانتین در جلبک *Haematococcus pluvialis* شود [۴۱]. همچنین برخی مطالعات نشان می‌دهد که شکل فعال جیبرلین (GA3)، رشد، محتوای پروتئین، کلروفیل a و b، کاروتنوئیدها و مونوساکاریدها در جلبک *Chlorella vulgaris* را افزایش دهد. علاوه بر این جیبرلین می‌تواند مکانیزم‌های دفاعی را افزایش و آسیب‌های اکسیداتیو در جلبک *Ch. vulgaris* را کاهش دهد [۳۳، ۴۲].

یافته‌های حاضر نشان دادند که هورمون جیبرلین می‌تواند اثر مثبتی روی برخی فاکتورهای فیزیولوژیک جلبک *Tetraselmis suicica* مانند رشد، کربوهیدرات، پروتئین و رنگدانه‌های فتوسنتزی داشته باشد.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- E.W. Becker, Microalgae for aquaculture: nutritional aspects, Handbook of Microalgal Culture, John Wiley & Sons, Ltd., 2013, pp. 671–691.
- 2- Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renewable and sustainable energy reviews. 2010 Jan 1;14(1):217-32.
- 3- Suganya T, Varman M, Masjuki HH, Renganathan S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2016 Mar 1; 55:909-41.
- 4- Da Silva Vaz B, Moreira JB, de Moraes MG, Costa JA. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. Current Opinion in Food Science. 2016 Feb 1; 7:73-7.

- 5- De Jesus Raposo, M.F.; de Moraes, A.M.; de Moraes, R.M. Bioactivity and Applications of Polysaccharides from Marine Microalgae. In Polysaccharides; Ramawat, K., Mérillon, J., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2015; pp. 1683–1727.
- 6- Rupérez, P.; Ahrazem, O.; Leal, J.A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 840–845.
- 7- Sansone C, Galasso C, Orefice I, Nuzzo G, Luongo E, Cutignano A, Romano G, Brunet C, Fontana A, Esposito F, Ianora A. The green microalga *Tetraselmis suecica* reduces oxidative stress and induces repairing mechanisms in human cells. *Scientific reports.* 2017 Jan 24;7(1):1-2.
- 8- Brennan, L.; Owende, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2010, 14, 557–577.
- 9- Vásquez-Piñeros, M.A.; Rondón-Barragan, I.S.; Eslava-Mocha, P.R.; Marina, B. Inmunoestimulantes en
- 10- Huang, G.; Chen, F.; Wei, D.; Zhang, X.; Chen, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energy* 2010, 87, 38–46.
- 11- Acién, F.; Gómez-Serrano, C.; Morales-Amaral, M.; Fernández-Sevilla, J.; Molina-Grima, E. Wastewater treatment using microalgae: How realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 9013–9022.
- 12- Borowitzka, M.A. Algal Physiology and Large-Scale Outdoor Cultures of Microalgae. In *The Physiology of Microalgae: Developments in Applied Phycology*; Borowitzka, M., Beardall, M., Rave, J., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; Volume 6, pp. 601–652.
- 13- Piotrowska-Niczyporuk A, Bajguz A, Zambrzycka E, Godlewska-Żyłkiewicz B. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry.* 2012 Mar 1;52:52-65.
- 14- Davies, P.J. *Plant Hormones*, Kluwer Academic Publishers. 2004 (716 pp. Published online 2013)
- 15- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ. Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature.* 2001 Mar; 410(6826):327-30.
- 16- Pastori GM, Foyer CH. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant physiology.* 2002 Jun 1;129(2):460-8.
- 17- Tuteja N. Absciscic acid and abiotic stress signaling. *Plant signaling & behavior.* 2007 May 1;2(3):135-8.
- 18- Cowling RJ, Harberd NP. Gibberellins control *Arabidopsis* hypocotyl growth via regulation of cellular elongation. *Journal of Experimental Botany.* 1999 Aug 1; 50(337):1351-7.
- 19- Reid JB, Ross JJ, Swain SM. Internode length in *Pisum*: a new, slender mutant with elevated levels of C 19 gibberellins. *Planta.* 1992 Jan 1;462-7.

- 20- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. The Plant Cell. 2003 Jul 1; 15(7):1591-604.
- teleosteos: Probióticos, _glucanos y LPS. Orinoquia 2012, 16, 46–62.
- 21- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T. Identification and characterization of *Arabidopsis gibberellin* receptors. The Plant Journal. 2006 Jun; 46(5):880-9.
- 22- Jennings RC. Gibberellins as endogenous growth regulators in green brown algae. Planta. 1968; 80:34-42.
- 23- Joseph I, Chennubhotla VSK. Gibberellic acid and 2, 4-D as growth regulators in laboratory culture of seaweeds. Indian J. Mar. Sci. 1999; 28:66-69.
- 24- Ozioko FU, Chiejina NV, Ogbonna JC. Effect of some phytohormones on growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* IAM-C212 under photoautotrophic conditions. African Journal of Biotechnology. 2015 Aug 28; 14(30):2367-76.
- 25- Andersen RA, editor. Algal culturing techniques. Elsevier; 2005 Mar 4.
- 26- Mulumba N, Farag IH. Tubular photobioreactor for microalgae biodiesel production. International Journal of Engineering Science and Technology. 2012 Feb;4(2):703-9.
- 27- Lichtenthaler HK. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in enzymology. 1987 Jan 1; 148:350-82.
- 28- Lv H, Wang QE, Wang S, Qi B, He J, Jia S. Enhancing biomass production of *Dunaliella salina* via optimized combinational application of phytohormones. Aquaculture. 2019 Mar 30;503:146-55.
- 29- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology. 1995 Jan 1; 28(1):25-30.
- 30- Waterborg JH. The Lowry method for protein quantitation. In The protein protocols handbook 2009 (pp. 7-10). Humana Press, Totowa, NJ.
- 31- Zavřel T, Očenášová P, Sinetova MA, Červený J. Determination of storage (starch/glycogen) and total saccharides content in algae and cyanobacteria by a phenol-sulfuric acid method. Bio-protocol. 2018 Aug 5; 8(15):e2966.
- 32- Breil C, Abert Vian M, Zemb T, Kunz W, Chemat F. “Bligh and Dyer” and Folch methods for solid–liquid–liquid extraction of lipids from microorganisms. Comprehension of solvation mechanisms and towards substitution with alternative solvents. International journal of molecular sciences. 2017 Apr; 18(4):708.
- 33- Cho K, Kim KN, Lim NL, Kim MS, Ha JC, Shin HH, Kim MK, Roh SW, Kim D, Oda T. Enhanced biomass and lipid production by supplement of myo-inositol with oceanic microalga *Dunaliella salina*. Biomass and Bioenergy. 2015 Jan 1;72:1-7.
- 34- Park WK, Yoo G, Moon M, Kim CW, Choi YE, Yang JW. Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production. Applied biochemistry and biotechnology. 2013 Nov;171(5):1128-42.

- 35- Sajjadi B, Chen WY, Raman AA, Ibrahim S. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2018 Dec 1;97:200-32.
- 36- Jusoh M, Loh SH, Aziz A, San Cha T. Gibberellin promotes cell growth and induces changes in fatty acid biosynthesis and upregulates fatty acid biosynthetic genes in *Chlorella vulgaris* umt-m1. Applied biochemistry and biotechnology. 2019 Jun;188(2):450-9.
- 37- Wang B, Li Y, Wu N, Lan CQ. CO₂ bio-mitigation using microalgae. Applied microbiology and biotechnology. 2008 Jul;79(5):707-18.
- 38- Brennan L, Blanco-Ferriandez A, Mostaert AS, Owende P. Enhancement of BODIPY05/215 lipid fluorescence method for application in biofuel-directed microalgae production. J. Microbiol. Methods 2012 9(2): 137-142.
- 39- Gudín C, Thepenier C. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. Advances in biotechnological processes (USA). 1986.
- 40- Bralczyk J, Wielgat B, Wasilewska-Dabrowska LD, Kleczkowski K. Growth accelerating response of *Euglena gracilis* Z. to gibberellic acid. Plant Science Letters. 1978 Aug 1;12(3-4):265-71.
- 41- Lu Y, Jiang P, Liu S, Gan Q, Cui H, Qin S. Methyl jasmonate-or gibberellins A3-induced astaxanthin accumulation is associated with up-regulation of transcription of β -carotene ketolase genes (bcts) in microalga *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology. 2010 Aug 1;101(16):6468-74.
- 42- Falkowska M, Pietryczuk A, Piotrowska A, Bajguz A, Grygoruk A, Czerpak R. The effect of gibberellic acid (GA₃) on growth, metal biosorption and metabolism of the green algae *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) Beijerinck exposed to cadmium and lead stress. Pol J Environ Stud. 2011 Jan 1;20(1):53-9.

Effect of gibberellin on growth parameters, pigments, photosynthetic factors and biochemical composition of *Tetraselmis suecica*

Ahmad Ahmadi¹, Nasrolah Ahmadifard^{1*}, Ahmad Imani¹, Sajad Pirsai², Behruz Atashbar³

1- Department of fishery, Faculty of Natural resources, Urmia University, Urmia iran.

2- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University.

3- Department of Ecology and Resource Evaluation, Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University.

ABSTRACT

In recent years, the application of new methods with an approach to improvement in microalgae culture medium to increase production efficiency has increased significantly. In this case, the use of plant hormones as growth regulators (PGRs) has become very important. In the present study, the effect of phytohormone gibberellin on some physiological parameters of *Tetraselmis suecica* microalgae was investigated. Algae culture was performed under standard conditions with Gillard culture medium, temperature 25 ± 2 C°, light intensity 16: 8 (light/dark), salinity 25 ± 2 mg / l, and 24-hour aeration for ten days. Concentrations of 10, 20, 40, and 60 mg / l were added to the algae culture medium. Growth factors, pigments, photosynthetic factors, and biochemical composition were measured in the log phase. Based on results, the highest rate of cell growth was observed in the treatment of 60 mg / l, although in other treatments there was a significant difference with the control ($P < 0.05$). The highest amount of protein and carbohydrates was observed in the treatment of 60 mg / l ($P < 0.05$). Total lipid content increased from 15.23 in control to 18.53 in 60 mg / l ($P < 0.05$). Antioxidant potential, pigments, photosynthetic factors, and dry weight also showed a significant difference in the concentration of 60 mg / l compared to the control ($P < 0.05$). The highest amount of chlorophyll a and chlorophyll b was observed at concentrations of 60 mg / l ($P < 0.05$). Based on the results, gibberellin has a high potential for cell division, final density, antioxidant potential, cell size, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica*. Also, *Tetraselmis suecica* can be a good candidate for marine aquatic larvae, drugs, antioxidants, and a rich source of compounds in biofuels.

KEYWORDS: Phytohormones, Growth, Pigments, Photosynthetic factors, Biochemical composition

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 24 May 2021

Accepted: 2 December 2021

ePublished: 21 December 2021

* Corresponding Author:

Email address: N.ahmadifard@urmia.ac.ir

Tel:

© Published by Tarbiat Modares University

eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513