

اثر اکسین‌های مصنوعی و کینتین بر محتوای پروتئین و رنگیزه‌های فتوسنتزی جلبک

Chlorella sorokiniana

چکیده

به دلیل کاربرد، گونه‌های جلبک کلرلا در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی، استفاده از هورمون‌های گیاهی برای افزایش بیوماس و متابولیت‌های آن دارای ارزش اقتصادی است. در این پژوهش، سلول‌های جلبک *Chlorella sorokiniana* در محیط کشت پایه Bold اصلاح شده به شکل سترون کشت شد، به محیط کشت ۵ گرم در لیتر گلوکز منو هیدرات و غلظت‌های مختلف هورمون‌های نفتالن استیک اسید (NAA) (۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر) یا توفوردی (2,4-D) (۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر)، توأم با کینتین (Kin) (۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) افزوده شد. پس از ۷۲ ساعت وزن خشک، تعداد سلول و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین جلبک اندازه‌گیری شد. براساس آنالیز یک‌طرفه با $P \leq 0.05$ ، در ۷۵ درصد تیمارهای 2,4-D+Kin وزن خشک و در ۵۰ درصد آن‌ها کلروفیل‌های a یا b افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد که در بین آن‌ها حداکثر وزن خشک (۷۷ میلی گرم) و محتوای کلروفیل a (۶/۶۳ میلی گرم در یک میلی لیتر سوسپانسیون جلبک) در تیمار با 2,4-D (۰/۵ میلی گرم در لیتر) + Kin (۱ میلی گرم در لیتر) مشاهده شد. در تیمارهای NAA+Kin وزن خشک، تعداد سلول‌ها و محتوای پروتئین نسبت به شاهد افزایش غیر معنی‌داری ($P > 0.05$) را نشان داد. در تیمارهای NAA (۱۰ میلی گرم در لیتر) + Kin (۱، ۲ میلی گرم در لیتر) محتوای کلروفیل a (۷/۱۱ و ۶/۵۵ میلی گرم در میلی لیتر سوسپانسیون جلبک) به ترتیب، به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. این بررسی نشان داد که ترکیب Kin (۱ میلی گرم در لیتر) با NAA (۱۰ میلی گرم در لیتر) یا 2,4-D (۰/۵ میلی گرم در لیتر) سبب افزایش بیشتر بیوماس جلبکی و محتوای کلروفیل می‌گردد.

واژگان کلیدی: *Chlorella sorokiniana*، هورمون‌های گیاهی، پروتئین، رنگیزه‌های فتوسنتزی.

*مسئول مکاتبات

ameneh.jamshidi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۱

کد مقاله: ۱۳۹۶۰۴۰۵۳۱

این مقاله برگرفته از رساله دکتری است.

مقدمه

جلبک‌های کلرلا در صنایع غذایی، به‌عنوان غذای آبزیان و غذای دام و طیور، در صنایع دارویی به‌عنوان مکمل و کرم‌های پوست و در تصفیه فاضلاب به‌عنوان بیوفیلتر مورد استفاده قرار می‌گیرند (Tate et al., 2013; Zabochnicka-Swiatek, 2010). به دلیل کاربردی بودن این جلبک‌ها، افزایش بیوماس آن‌ها با استفاده از هورمون‌های گیاهی ارزشمند است. طبق گزارش محققین، تغییر در غلظت هورمون‌ها، می‌تواند سبب تغییر رشد جلبک گردد (Bajguz and Piotrowska-Niczyporuk, 2013; Stirk et al., 2013). محققین اثر نور و تاریکی و گلوکز را بر روی مقدار هورمون‌های جلبک *Chlorella minutissima* در طی ۴۸ ساعت آزمایش کردند، بیشترین مقدار ایندول‌ها در جلبک‌های

قرار گرفته در تاریکی در محیط حاوی گلوکز ایجاد شد. درحالی‌که در جلبک‌های رشد یافته در محیط‌های کشت فاقد گلوکز، قرار گرفته در تاریکی افزایش در میزان هورمون‌ها مشاهده نمی‌شد و جلبک‌های رشد یافته در محیط کشت‌های فاقد گلوکز و فتوپریود (۱۴ ساعت نور، ۱۰ ساعت تاریکی) حاوی مقدار بیشتر سیتوکینین بودند (Stirk et al., 2014). برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول‌های جلبکی (et al., 2007) Tarakhovskaya مثل افزایش ابعاد و تعداد سلول، تغییر محتوای قندها، پروتئین و رنگیزه‌ها تحت کنترل چنین هورمون‌هایی هستند (Tate et al., 2013). در مواردی اثر یک هورمون بر روی رشد یا محتوای متابولیت جلبک‌ها مورد بررسی قرار گرفت، برای مثال اثر اکسین‌های طبیعی و سنتزی بر روی متابولیت‌ها، رشد و پاسخ آن‌ی اکسیدانی *Chlorella vulgaris* آزمایش شد و اثر اکسین‌های ایندول استیک اسید (IAA)، ایندول بوتیریک اسید (IBA) و فنیل استیک اسید (PAA) و NAA مورد بررسی قرار گرفت. PAA و NAA در غلظت ۱ میکرومول حداکثر فعالیت را نشان دادند. در این غلظت‌ها، رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین‌های محلول افزایش یافت (Piotrowska-Niczyporuk and Bajguz, 2014). Fu و همکاران (۲۰۰۶) اثر NAA (۲۵/۰-۴ میلی‌گرم در لیتر) را بر روی *C. vulgaris* مورد بررسی قرار دادند حداکثر رشد جلبک در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. طبق گزارش Bajguz و Piotrowska-Niczyporuk (۲۰۱۴) کینتین در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار (۲۱۵/۰ و ۲/۱۵ میلی‌گرم در لیتر) طی ۴۸ ساعت، سبب افزایش تعداد سلول‌های جلبک *C. vulgaris* گردید. طبق گزارش Ozioko و همکاران (۲۰۱۵) کاربرد IBA و IAA در غلظت ۱۵ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش وزن خشک و تعداد سلول‌های جلبک *C. sorokiniana* شد. در مواردی از دو یا چند هورمون برای افزایش رشد استفاده شده است. در تحقیقی اثر برهم‌کنش براسینو استروئیدها و سیتوکینین‌ها بر روی رشد جلبک *C. vulgaris* مورد بررسی قرار گرفت. سیتوکینین‌ها بابراسینو استروئیدها همکاری دارند و بالاترین اثر (تقسیم سلول‌ها، تجمع پروتئین، کلروفیل و منوساکاریدها) در مخلوط براسینولید با ترانس زاتین به دست آمد (Bajguz, 2000). در پژوهشی اثر همکاری بین اکسین‌ها و براسینو استروئیدها بر روی جلبک *C. vulgaris* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، مخلوط اکسین و براسینو استروئید طی ۴۸ ساعت تکثیر سلول‌ها و تجمع متابولیت‌ها (کلروفیل، پروتئین، منوساکارید) را تقریباً ۳ الی ۴ برابر بیشتر از هورمون تنها افزایش داد (Bajguz and Piotrowska-Niczyporuk, 2013). اثر تحریک‌کننده‌های بیوشیمیایی بر روی تولید بیوماس و حجم متابولیت‌ها در *C. sorokiniana* آزمایش شد. ترکیب هورمونی NAA همراه با اکسین‌های دیگر هیچ اثر همکاری یا تضاد نداشت. اما ترکیب NAA (۵ میلی‌گرم در لیتر) + زاتین (۱ میلی‌گرم در لیتر) یا ژیرلین (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) سبب افزایش وزن خشک گردید (Hunt et al., 2010). Jesus و Roposo (۲۰۱۳) اثر دو هورمون 2, 4-D و کینتین در غلظت‌های مختلف را بر روی دو جلبک *Haematococcus pluvialis* و *Dunaliella salina* بررسی کردند. نتایج نشان داد جلبک *H. pluvialis* در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و بدون کینتین، ۳۵۵ درصد و در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین، ۲۹۷ درصد و در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین، ۲۷۵ درصد نسبت به شاهد افزایش رشد نشان داد و در محیط واجد ۱۰-۵ درصد نمک، جلبک *D. salina* در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و بدون کینتین، ۱۸۴ درصد و در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۵ میلی‌گرم کینتین، ۲۹۱ درصد و در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2, 4-D و ۰/۵ میلی‌گرم کینتین، ۲۷۰ درصد نسبت به شاهد افزایش رشد نشان داد. با توجه به اهمیت‌های متعدد کاربردی *C. sorokiniana* در این تحقیق ترکیب برخی هورمون‌های اکسین مصنوعی و کینتین، در غلظت‌هایی که به‌تنهایی سبب رشد می‌شدند، استفاده گردید و اثر ترکیبی این هورمون‌ها بر روی برخی صفات رشدی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این جلبک مورد بررسی قرار گرفت تا بهترین ترکیب‌های هورمونی با بیشترین اثر تحریکی برافزایش صفات مورد مطالعه برای اهداف کاربردی معین شوند.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۵ در دانشگاه پیام نور تهران انجام پذیرفت. جلبک (*Chlorella sorokiniana* (IBRC-M 5008) از مرکز ذخایر ژنتیکی و بیولوژیکی ایران و مواد مورد نیاز از شرکت مرک خریداری شد. جلبک‌ها در Bold's Basal Medium (BBM) اصلاح شده (Andersen, 2005) با کمی تغییر (KH_2PO_4 : ۰/۰۷۵ گرم در لیتر) کشت شد. به محیط‌ها ۵ گرم در لیتر گلوکز منو هیدرات افزوده شد. هورمون‌های 2,4-D، NAA و Kin هم به محیط اضافه شد (Bajguz and Piotrowska-Niczyporuk, 2014). pH اولیه محیط حدود ۶ بود که با سود ۱ نرمال به ۶/۸ رسانده شد. ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱ اتمسفر اتوکلاو شد. برای کشت نمونه‌ها، یک میلی لیتر جلبک (۰/۰۲ گرم) در فاز لگاریتمی به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت تلقیح شد. فلاسک‌ها در اتاق کشت بر روی شیکر انکوباتور (GFL, 3031, Germany) با ۱۲۵ دور در دقیقه در دمای 25 ± 1 درجه سانتی گراد و شرایط نور (لامپ‌های فلوئورسنت، ۵۰ مول بر مترمربع بر ثانیه) و فتوپریود ۱۲ ساعت نور ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفت. فلاسک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در این شرایط نگهداری شد و سپس وزن خشک و تعداد سلول‌ها و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین جلبک پس از ۷۲ ساعت کشت اندازه‌گیری شد. آزمایش‌ها با روش کاملاً تصادفی انجام گرفت. تیمارها ۴ بار تکرار شد. هورمون‌هایی که به محیط‌های کشت افزوده شد، طبق جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱: نام و غلظت هورمون‌های استفاده شده در محیط کشت جلبک *chlorella sorokiniana* در ۱۳۹۵.

هورمون	نفتالن استیک اسید	توفوردی	کینتین
محیط	(میلی گرم در لیتر)	(میلی گرم در لیتر)	(میلی گرم در لیتر)
A	۵	۰	۱
B	۵	۰	۲
C	۱۰	۰	۱
D	۱۰	۰	۲
E	۰	۰/۵	۱
F	۰	۰/۵	۲
G	۰	۱	۱
H	۰	۱	۲
J (شاهد)	۰	۰	۰

اندازه‌گیری رشد از طریق سنجش وزن خشک و شمارش تعداد سلول انجام پذیرفت. سنجش وزن خشک به روش Kong و همکاران (۲۰۱۳) با کمی تغییر، انجام پذیرفت. بدین منظور ۴۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی سلول جلبکی، ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ سانتریفوژ (Sigma, 2-16pk, Germany) شد. روشناور دور ریخته شد و رسوب جلبکی با آب مقطر شستشو و بلافاصله در ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. قرص جلبکی حاصل، ۷۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس توزین گردید (Agrawal and Paridhavi, 2007). شمارش سلول‌های جلبک توسط لام نئوبار طبق فرمول (تعداد سلول‌های جلبک در یک میلی لیتر = میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده در یک مربع بزرگ (به حجم ۰/۱ میلی مترمربع) $\times 10^4 \times$ ضریب رقت) صورت گرفت (رنجبر اقدم و همکاران، ۱۳۹۱). سنجش محتوای پروتئین به روش Kobayashi و همکاران (۲۰۱۳) انجام پذیرفت. بدین منظور جلبک خشک شده با هاون پودر شد. به ۵ میلی گرم از ماده خرد شده ۱ میلی لیتر سود (۰/۵ مولار) افزوده شد. نمونه ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و گاه‌گاهی به هم زده شد سپس در دمای آزمایشگاه سرد شد. نمونه در ۲۰۰۰ سانتریفوژ

شد و محلول رویی به لوله دیگری انتقال یافت و برای تعیین پروتئین و با افزودن معرف برادفورد سنجیده شد. منحنی استاندارد با سرم آلبومین گاوی ترسیم شد و درصد پروتئین (میلی گرم پروتئین در ۱۰۰ میلی گرم ماده خشک) محاسبه گردید. اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی به روش Hunt و همکاران (۲۰۱۰) با کمی تغییر صورت پذیرفت. یک میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی در ۴۰۰۰ سانتیفریوژ شد. قرص جلبکی فریز شد. به جلبک‌های فریز شده، به نسبت ۴ برابر حجم جلبک، متانول ۹۹/۱ درصد، افزوده شد و در تاریکی قرار گرفت. زمانی که جلبک‌ها کاملاً سفید شد در ۲۰۰۰ سانتیفریوژ شد و جذب محلول متانولی با اسپکتروفتومتر (Shimadzu, UV mini 1240, Japan) در طول موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای کلروفیل a، b و کاروتنوئید با استفاده از روش Wellburn (۱۹۹۴) بر طبق رابطه‌های ۱ تا ۳ زیر محاسبه گردید و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی برحسب میکروگرم در یک میلی لیتر سوسپانسیون جلبک بیان شد (Hunt et al., 2010).

$$\text{رابطه ۱: } a = (A_{665/2} - 0.16 A_{652/4}) \times 1000 = \text{کلروفیل a}$$

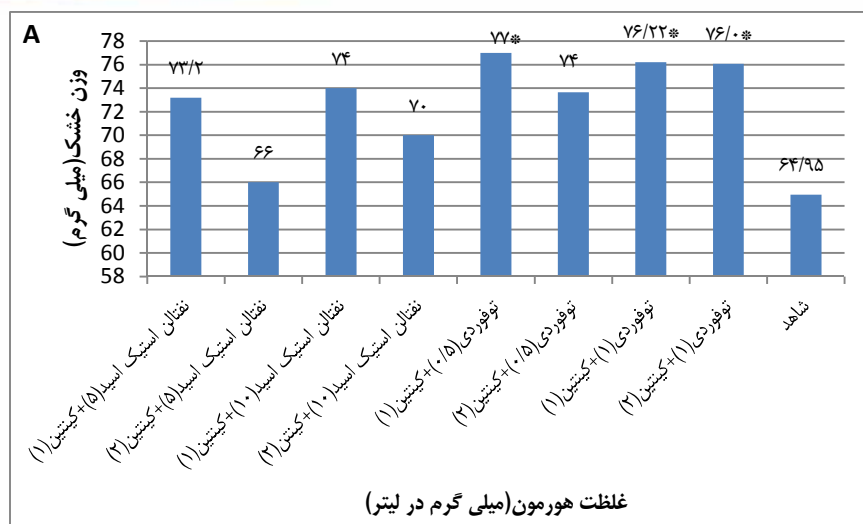
$$\text{رابطه ۲: } b = (A_{652/4} - 0.15 A_{665/2}) \times 1000 = \text{کلروفیل b}$$

$$\text{رابطه ۳: } \text{کاروتنوئیدها} = (A_{470} - 1.82 A_{665/2} - 0.48 A_{652/4}) \times 1000$$

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش سیزدهم) از مسیر Anova یک‌طرفه انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از تست LSD و معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ تعیین شد. شکل‌ها با نرم‌افزار Excel رسم شد.

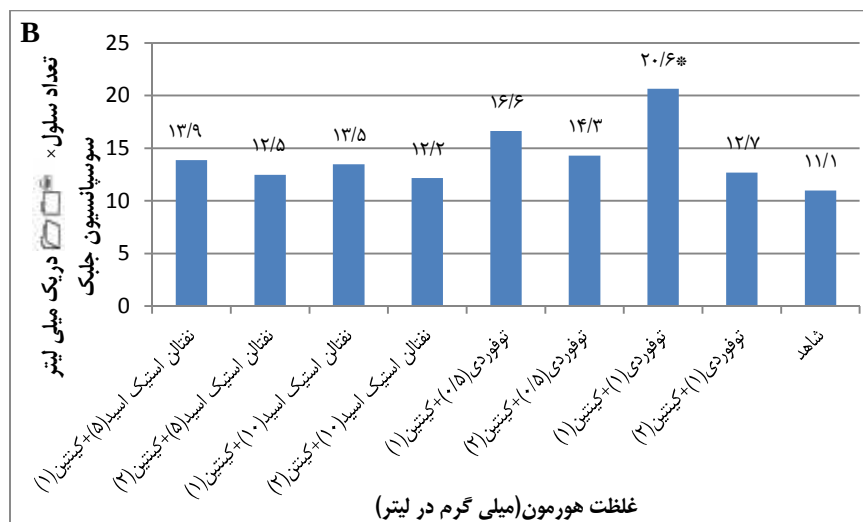
نتایج

وزن خشک در همه‌ی تیمارهای 2,4-D+Kin (شکل ۱) و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، در ۷۵ درصد آن‌ها (شکل ۳) نسبت به شاهد افزایش نشان داد. بالاترین مقدار وزن خشک و محتوای کلروفیل a، در تیمار 2,4-D (۰/۵ میلی گرم در لیتر) Kin+ (۱ میلی گرم در لیتر) مشاهده شد که مقادیر آن در تیمار و شاهد به ترتیب وزن خشک، ۷۷ و ۶۴/۹۵ میلی گرم، محتوای کلروفیل a، ۶/۶ و ۴/۶ میکروگرم در میلی لیتر بود و به‌طور معنی‌داری با شاهد اختلاف داشت (شکل‌های ۱ و ۳). محتوای کلروفیل b در تیمار 2,4-D (۱ میلی گرم در لیتر) Kin+ (۲ میلی گرم در لیتر)، افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد، که مقادیر آن به ترتیب ۳/۹ و ۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر بود (شکل ۳). تعداد سلول در همه‌ی این تیمارها نسبت به شاهد افزایش نشان داد، اما فقط در تیمار با 2,4-D (۱ میلی گرم در لیتر) Kin+ (۱ میلی گرم در لیتر) معنی‌دار بود (شکل ۲). محتوای پروتئین در همه‌ی تیمارهای 2,4-D+Kin نسبت به شاهد کاهش غیر معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴). بررسی محیط کشت این تیمارها نشان داد که پروتئین به محیط دفع شده است. در پژوهش حاضر وزن خشک، تعداد سلول و محتوای پروتئین در همه‌ی محیط‌های حاوی NAA+Kin نسبت به شاهد افزایش غیر معنی‌داری را نشان داد (شکل‌های ۱، ۲، ۳، ۴). محتوای رنگیزه‌ها در ۸۳ درصد این تیمارها نسبت به شاهد افزایش نشان داد. محتوای کلروفیل a در تیمار با NAA (۱۰ میلی گرم در لیتر) Kin+ (۱، ۲ میلی گرم در لیتر) افزایشی معنی‌دار داشت که مقادیر آن در تیمارها و شاهد به ترتیب، ۷/۱، ۶/۵۵ و ۴/۶ میکروگرم در میلی لیتر بود (شکل ۳).



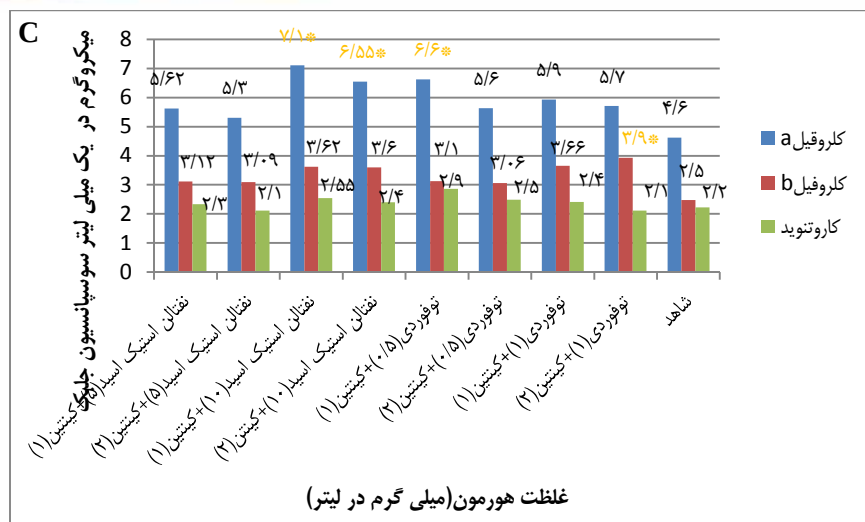
شکل ۱: بررسی اثر غلظت‌های مختلف NAA+Kin و 2,4-D+ Kin بر وزن خشک در جلبک *Chlorella Sorokiniana* کشت شده در BBM.

علامت ستاره نشان می‌دهد بر اساس آزمون LSD، میانگین‌ها در سطح $P \leq 0/05$ با شاهد تفاوت معنی‌دار دارند.



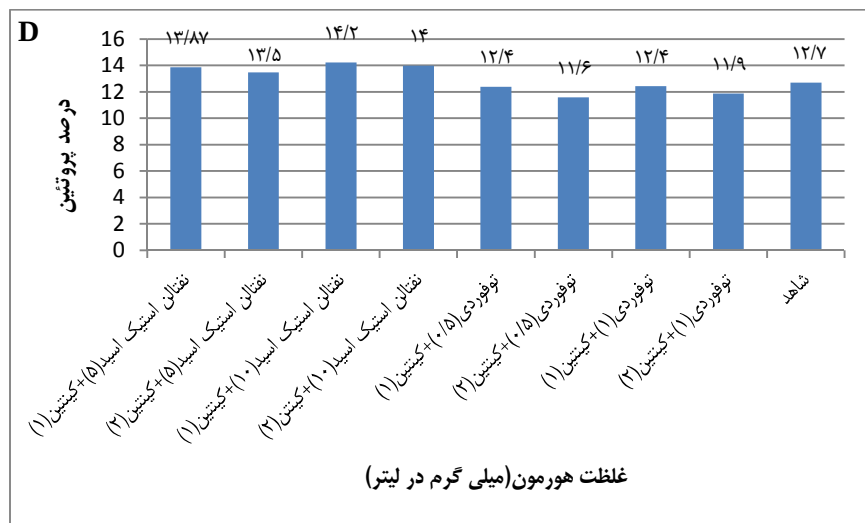
شکل ۲: بررسی اثر غلظت‌های مختلف NAA+Kin و 2,4-D+ Kin بر تعداد سلول $\times 10^7$ در یک میلی لیتر سوسپانسیون جلبک *Chlorella Sorokiniana* کشت شده در BBM.

علامت ستاره نشان می‌دهد بر اساس آزمون LSD، میانگین‌ها در سطح $P \leq 0/05$ با شاهد تفاوت معنی‌دار دارند.



شکل ۳: بررسی اثر غلظت‌های مختلف NAA+Kin و 2,4-D+ Kin بر محتوای رنگیزه‌ها (کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید) میکروگرم در یک میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبک *Chlorella Sorokiniana* کشت‌شده در BBM.

علامت ستاره نشان می‌دهد بر اساس آزمون LSD، میانگین‌ها در سطح $P \leq 0.05$ با شاهد تفاوت معنی‌دار دارند.



شکل ۴: بررسی اثر غلظت‌های مختلف NAA+Kin و 2,4-D+ Kin بر درصد پروتئین (میلی گرم در ۱۰۰ میلی گرم وزن خشک) جلبک *Chlorella Sorokiniana* کشت‌شده در BBM.

علامت ستاره نشان می‌دهد بر اساس آزمون LSD، میانگین‌ها در سطح $P \leq 0.05$ با شاهد تفاوت معنی‌دار دارند.

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش وزن خشک در همه‌ی تیمارهای 2,4-D + Kin مشاهده شد که در تیمارهای 2,4-D (۰/۵ میلی گرم در لیتر) + Kin (۱ میلی گرم در لیتر) و 2,4-D (۱ میلی گرم در لیتر) + Kin (۱، ۲ میلی گرم در لیتر) معنی‌دار است (شکل ۱). محتوای کلروفیل‌ها در همه تیمارهای 2,4-D + Kin نسبت به شاهد افزایش یافت ولی فقط کلروفیل a در تیمار 2,4-D (۰/۵ میلی گرم در لیتر) + Kin (۱ میلی گرم در لیتر) و کلروفیل b در تیمار 2,4-D (۱ میلی گرم در لیتر) + Kin (۲ میلی گرم در لیتر) افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۳). محتوای کاروتنوئیدها در هیچ‌یک از تیمارها اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نداد. Saygideger و Okay (۲۰۰۸) گزارش کردند که 2, 4-D در غلظت (۱۰^{-۵}، ۱۰^{-۴}) × ۹ میلی مولار (۰/۲، ۰/۴ میلی گرم در لیتر) سبب افزایش رشد و کلروفیل در *C. vulgaris* و *Spirulina platensis* شد و در غلظت (۱۰^{-۳}، ۱۰^{-۲}) × ۹ میلی مولار از رشد آن‌ها ممانعت می‌کرد. طبق گزارش Sarma و همکاران (۲۰۰۱) 2,4-D در غلظت بالا (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) سبب کاهش رشد *Chlorella* گردید. طبق گزارش Wong (۲۰۰۰) 2,4-D در غلظت پایین (۰/۲ و ۰/۴ میلی گرم در لیتر) سبب افزایش رشد *Scenedesmus quadricauda* گردید. طبق گزارش Jesus Roposo و Morais (۲۰۱۳) کاربرد 2,4-D (۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر) و 2,4-D (۲ میلی گرم در لیتر) همراه با کینتین (۰/۵ میلی گرم در لیتر) سبب افزایش رشد *Dunaliella salina* گردید و کاربرد 2,4-D (۱ میلی گرم در لیتر)، 2,4-D (۱ میلی گرم در لیتر) همراه با کینتین (۱ میلی گرم در لیتر) و 2,4-D (۰/۵ میلی گرم در لیتر) همراه با کینتین (۲ میلی گرم در لیتر) سبب افزایش رشد *Haematococcus pluvialis* گردید. Liu و همکاران (۲۰۱۷b) گزارش دادند که 2, 4-D در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر سبب افزایش رشد (بیوماس) *C. vulgaris* گردید و حداکثر رشد در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر مشاهده شد؛ که نتایج محققین مذکور با نتایج پژوهش کنونی همخوانی دارد. در پژوهش حاضر محتوای پروتئین در همه‌ی تیمارهای 2,4-D + Kin نسبت به شاهد کاهش غیر معنی‌داری را نشان داد (شکل ۴). بررسی محیط کشت این تیمارها نشان داد که پروتئین به محیط دفع شده است. طبق گزارش Bukowska (۲۰۰۶) 2,4-D می‌تواند با اتصال به آنزیم‌ها سبب تغییر فعالیت آن‌ها، تعامل با فسفولیپیدهای غشاء سلول و فعل‌وانفعالات فیزیکی در غشاء سلول گردد. در پژوهش حاضر به نظری رسد یکی از علل کاهش پروتئین، به دلیل تغییر در ساختار غشاء پلاسمایی و فعل‌وانفعالات فیزیکی در غشاء سلول است که سبب خروج پروتئین به محیط کشت شده به همین دلیل علی‌رغم افزایش رشد، درصد پروتئین، نسبت به شاهد کاهش غیر معنی‌داری را نشان داد. در پژوهش حاضر در همه‌ی تیمارهای NAA+Kin وزن خشک (شکل ۱)، تعداد سلول (شکل ۲) و محتوای کلروفیل a و b (شکل ۳) و پروتئین (شکل ۴) نسبت به شاهد افزایش نشان داد. افزایش کلروفیل در تیمارهای NAA (۱۰ میلی گرم در لیتر) + Kin (۱ و ۲ میلی گرم در لیتر) معنی‌دار است. طبق گزارش‌های Hunt و همکاران (۲۰۱۰، ۲۰۱۱)، ترکیب NAA (۵ میلی گرم در لیتر) + زاتین (۱ میلی گرم در لیتر) و ترکیب NAA (۵ میلی گرم در لیتر) + اتانول (۰/۵ میلی لیتر در لیتر) سبب افزایش رشد به ترتیب به میزان ۱۳۶ درصد و ۱۲۰ درصد در جلبک *C. sorokiniana* شد و هورمون NAA (۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر) سبب افزایش رشد جلبک گردید؛ که نتایج پژوهش حاضر با نتایج این محققین همخوانی دارد در پژوهش حاضر در همه‌ی ترکیب‌های هورمونی، وزن خشک، تعداد سلول‌ها، محتوای رنگیزه‌ها و پروتئین در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر کینتین بیشتر از ۲ میلی گرم در لیتر بود (شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴). طبق گزارش Bajguz و Piotrowska-Niczyporuk (۲۰۱۴) با افزایش غلظت کینتین از ۱ به ۱۰ میکرومولار (۰/۲۱۵ به ۲/۱۵ میلی گرم در لیتر) رشد جلبک *C. vulgaris* کاهش یافت؛ که مشابه نتایج کنونی است. در مواردی محققین با کاربرد غلظت‌های متفاوتی از هورمون نتیجه گرفته‌اند، مثلاً Liu و همکاران (۲۰۱۷a) گزارش کرده‌اند که در تنش آمونیوم (محیط واجد ۱ تا ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آمونیوم) کینتین با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر سبب افزایش رشد (بیوماس) *C. Pyrenoidosa* گردید. طبق گزارش‌هایی NAA در غلظت پایین‌تر از پژوهش کنونی سبب رشد جلبک شد. Liu و همکاران (۲۰۱۷b) گزارش دادند NAA در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر سبب افزایش رشد *C. vulgaris* گردید و حداکثر رشد در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر مشاهده شد. طبق گزارش Fu و همکاران (۲۰۰۶) نیز، با استفاده از NAA در

غلظت ۲۵/۰، ۲ و ۴ میلی گرم در لیتر بر روی *C. vulgaris* بهترین غلظت برای افزایش رشد جلبک، غلظت ۲ میلی گرم در لیتر بود، که احتمالاً علت اختلاف بین نتایج کنونی و گزارش برخی محققین، متفاوت بودن میزان هورمون‌های درونی جلبک، یا متفاوت بودن گونه جلبک است. اما به‌طور کلی طبق این گزارش‌ها هورمون‌ها به شکلی سبب تغییر میزان رشد جلبک می‌شود. مسیر سیگنالینگ برخی از فیتوهورمون‌های جلبک‌ها هنوز ناشناخته است (Lu and Xu, 2015). طبق نظر برخی محققین، اثر اکسین‌ها بر جلبک‌ها به دلیل اثر این هورمون‌ها بر دیواره سلولی، فعال‌سازی پمپ ATPase و طولیل شدن سلول (Stirk et al., 2014) و تقسیم سلولی است (Bajguz, 2000). Kawano (۲۰۰۳) پیشنهاد کرد که اکسین ممکن است رشد سلول را از طریق مهار رادیکال آزاد اکسیژن انجام دهد. در طی سست شدن دیواره سلولی، توسط اکسین، ممکن است ماده اصلی مکانیزم بیوشیمیایی، رادیکال آزاد اکسیژن باشد (Kiseleva et al., 2012). طبق گزارش‌ها سلول‌های جلبک نسبت به اکسین‌های خارجی با تغییرات سطح اکسیداسیون، پاسخ می‌دهند. اکسین خارجی سبب افزایش سطح فعالیت آنزیم‌های مهارکننده رادیکال آزاد اکسیژن می‌شود (Piotrowska-Niczyporuk and Bajguz, 2014). اکسین‌های طبیعی (IAA) و مصنوعی (2,4-D) می‌توانند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مثل کاتالاز و پراکسیداز را تحریک کنند (Piotrowska-Niczyporuk, Szechyn'ska-Hebda et al., 2007). and Bajguz, 2012). اکسین‌های طبیعی و مصنوعی سبب کاهش تجمع رادیکال آزاد اکسیژن ظرف ۴۸ ساعت می‌گردند. کاهش رادیکال آزاد اکسیژن سبب پیشرفت چرخه سلولی و تمایز دیواره ثانویه سلول می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهد که اثر هورمون اکسین بر رشد و متابولیسم جلبک از طریق تنظیم سطح رادیکال آزاد اکسیژن صورت می‌پذیرد (Piotrowska-Niczyporuk and Bajguz, 2014). هورمون اکسین از تجزیه اکسیداتیو رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند. به‌علاوه هورمون‌های اکسین سبب تحریک اتصال دی‌اکسید کربن با ریبولوزیس فسفات و فسفریل‌اسیون فتوسنتزی می‌شوند (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2008). در نتیجه فتوسنتز و رشد افزایش می‌یابد. هورمون سیتوکینین نیز سبب تحریک تقسیم سلول، فعال‌سازی رشد و تولید پروتئین و تشدید برخی فرآیندهای فتوسنتزی جلبک می‌شود (Kiseleva et al., 2012). به‌طور کلی نتایج بررسی حاضر نشان داد که کاربرد ترکیب هورمون‌های NAA و 2,4-D همراه با Kin در غلظت‌های مناسب سبب افزایش بیوماس و محتوای کلروفیل جلبک می‌گردد و استفاده از این هورمون‌ها برای افزایش رشد جلبک و به دست آوردن بیوماس بیشتر، مناسب است.

منابع

- رنجبر اقدم، م.، حجازی، م.، آیین فر، س. و حسین زاده، ن.، ۱۳۹۱. بررسی تأثیر چهار آنتی‌بیوتیک در رشد و کارایی آن‌ها در عاری سازی آلودگی محیط کشت جلبک تک‌سلولی *Dunaliella sp.* علوم محیطی (ویژه‌نامه اولین کنفرانس ملی جلبک‌شناسی ایران)، جلد ۹، صفحات ۸-۱.
- Andersen, R. A., 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Inc, pp: 589.
- Agrawal, S. S. and Paridhavi, M., 2007. Herbal Drug Technology. Hyderabad, Universities Press, pp: 519-530.
- Bajguz, A., 2000. Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured of *Chlorella vulgaris*. Plant Physiology and Biochemistry, 38: 209-215.
- Bajguz, A. and Piotrowska-Niczyporuk, A., 2014. Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, mono saccharide, and protein content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry. 80:176-83.
- Bajguz, A. and Piotrowska-Niczyporuk, A., 2013. Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry, 71:290-7.
- Bukowska, B., 2006. Toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid – molecular mechanisms, Polish Journal of Environtal Studies, 15 (3): 365-374.

- Fu, L., Wei-feng, L. and Xiang-gen, SH., 2006. The Effects of NAA on the Growth, Chlorophyll and Protein Content of *Chlorella vulgaris*, Journal of Yancheng Institute of Technology, 2: 917-921.
- Hunt, R. W., Chinnasamy, S., Bhatnagar, A. and Das, K. C., 2010.** Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalga, *Chlorella sorokiniana*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162 (8): 2400-2414.
- Hunt, R. W., Chinnasamy, S. and Das, K. C., 2011.** The Effect of Naphthalene-Acetic Acid on biomass productivity and chlorophyll content of green algae, Coccolithophore, Diatom and Cyanobacterium cultures, Applied Biochemistry and Biotechnology, 164: 1350-1365.
- Jesus Roposo, M. F. and Morais, R. M. S. C., 2013.** Influence of the growth regulators Kinetine and 2,4,D on the growth of two chlorophyte, microalgae, *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*, Journal of Basic&Applied Sciences, 9: 302-308.
- Kawano, T., 2003.** Roles of reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. Plant Cell Reports, 9:829-837.
- Kiseleva, A. A., Tarachovskaya, E. R. and Shishova, M. F., 2012.** Biosynthesis of phytohormones in algae, Russian Journal of Plant Physiology, 59 (5): 595-610.
- Kobayashi, N., Noel, E., Barnes, A., Watson, A., Rosenberg, J., Erickson, G. and Oyler, G., 2013.** Characterization on three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested ef fluent from cattle manure. Bioresource Technology, 150: 377-386.
- Kong, W. B., Yang, H., Cao, Y. T., Song, H., Hua, S. F. and Xia, C. G., 2013.** Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture, Food Technology and Biotechnology, 51 (1): 62-69.
- Lui, J., Qiu, W., Song, Y., Peng, H. and Zhao, Y., 2017 a.** The growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* enhanced by plant hormones under ammonium stress, Environmental Progress and Sustainable Energy, 0 (0) :1-7.
- Liu, T., Liu, F., Wang, C., Wang, Z. and Li, Y., 2017 b.** Lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* by supplementation of synthetic phytohormone analogs. Bioresource Technology, (232): 44-52
- Lu, Y. and Xu, J., 2015.** Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology, Trends in Plant Science, 20 (5): 273-282.
- Ozioko, F. U., Chiejina, N. V. and Ogbonna, J. C., 2015.** Effect of some phytohormones on growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* IAM-C212 under photoautotrophic conditions, African Journal of Biotechnology, 14(30): 2367-2376.
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, A. and Godlewska-Żyłkiewicz, B., 2012.** Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). Plant Physiology and Biochemistry, 52: 52-65
- Piotrowska-Niczyporuk, A. and Bajguz, A., 2014.** The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae), Plant Growth Regulator, 73:57-66.
- Sarma, S. S. S., Ramírez-Pérez, T., Nandini, S. and Peñalosa Castro, I., 2001.** Combined Effects of Food Concentration and the Herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on the Population Dynamics of *Brachionus patulus* (Rotifera), Ecotoxicology 10 (2): 91-9
- Saygideger, S. D. and Okkay, O., 2008.** Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on growth, protein and chlorophyll-a content of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* cells, Journal of Environmental Biology, 29 (2): 175-178.
- Stirk, W. A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Strnad, M., Ördög, V. and Van Staden, J., 2013.** Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. Plant Physiology and Biochemistry, 70:348-53.

- Stirk, W. A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Maróti, G., Ljung, K., Turečková, V., Strand, M., Ordög, V. and Staden, J., 2014.** Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 79: 66-76.
- Szechyn'ska-Hebda, M., Skrzypek, E., Dałbrowska, G., Biesaga-Koscielniak, J., Filek, M. and Wedzony, M., 2007.** The role of oxidative stress induced by growth regulators in the regeneration process of wheat. *Acta Physiologia Plantarum*, 29: 327-337.
- Tarakhovskaya, E. R., Maslov, Y. I. and Shishova, M., 2007.** Phytohormones in algae, *Russian Journal of Plant Physiology*, 54 (2): 163-170.
- Tate, J. J., Gutierrez-Wing, M. T., Rusch, K. A. and Benton, M. G., 2013.** The effects of plant growth substances and mixed cultures on growth and metabolite production of green algae *Chlorella sp.*: a review, *Journal of Plant Growth Regulators*, 32:417-428.
- Wellburn, A. R., 1994.** The spectral determination chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144: 307-313.
- Wong, P. K., 2000.** Effect of 2, 4,D, glyphosphate and paraquat on growth photosynthesis and chlorophyll a synthesis of *Senedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere*, 41:177-182. **Zabochnicka-Swiatek, M., 2010.** Algae-feedstock of the future. *Archivum Combustionis* 30 (3): 225-236.