

## بررسی بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز بتاکاروتن در *Dunaliella salina*

### تحت شرایط متفاوت نور و شوری

لیلا زرنندی میاندوآب<sup>۱</sup>، محمدباقر باقریه نجار<sup>۱\*</sup>، محمدمین حجازی<sup>۲</sup> و نادر چاپارزاده<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران، <sup>۲</sup>پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی غرب و شمال غرب کشور، تبریز،

ایران، <sup>۳</sup>گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۲۰، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۹/۱۱)

#### چکیده:

ریز جلبک دونالیلا سالینا (*Dunaliella salina*) با قابلیت انباشتگی مقادیر قابل توجه بتاکاروتن به عنوان یک مدل مناسب جهت بررسی نحوه بیان ژن‌های فیتوژن‌دسچوراز و لیکوپین‌تاسیکلاز دخیل در مسیر بیوسنتز بتاکاروتن در شرایط محیطی متفاوت از نظر نور و شوری مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو شدت نور (۲۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع) و دو سطح شوری (۲ و ۴ مولار نمک کلرید سدیم) به مدت زمان ۴ روز طراحی و اجرا شد. افزایش بیان فیتوژن‌دسچوراز در تیمار نور ۲۰۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری ۴ مولار و نور ۱۰۰۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری ۲ مولار مشاهده گردید. ژن لیکوپین‌تاسیکلاز در تیمارهای (نور ۲۰۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری ۲ مولار)، (نور ۱۰۰۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری ۲ مولار) و (نور ۱۰۰۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری ۴ مولار) افزایش بیان داشت. بیشترین میزان بتاکاروتن در تیمار با شدت نور ۱۰۰۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری ۲ مولار مشاهده شد که نتیجه افزایش بیان همزمان ژن‌های مذکور می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت تغییر شدت نور بیش از تغییر میزان شوری محیط بر افزایش رونویسی دو ژن مسیر بیوسنتزی بتاکاروتن (فیتوژن‌دسچوراز و لیکوپین‌تاسیکلاز) تأثیر گذاشته که نتیجه نهایی این افزایش بیان، سنتز و انباشتگی بتاکاروتن جهت مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش اولیه نوری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بتاکاروتن، بیان ژن، دونالیلا سالینا، شوری، نور

#### مقدمه:

مطالعه مولکولی و بیوشیمیایی مسیر بیوسنتزی بتاکاروتن تحت شرایط ویژه محیطی (Fu et al., 2014; Ramos et al., 2011) کرده است. همچنین *D. salina* کاندید مناسبی جهت تولید بتاکاروتن طبیعی در مقیاس صنعتی می‌باشد (Ribeiro et al., 2011). امروزه از بتاکاروتن استفاده‌های گوناگون پزشکی، بهداشتی، آرایشی و غذایی به عمل می‌آید. به دلیل عدم توانایی انسان و حیوانات در بیوسنتز کاروتنوئیدهای ضروری، لازم است آن را از طریق منابع غذایی‌شان کسب کنند (Takaichi, 2011). این

دونالیلا سالینا (*Dunaliella salina*) یکی از ریز جلبک‌های تک سلولی متعلق به شاخه کلروفیتا می‌باشد. توانایی این جلبک در تحمل شرایط بسیار سخت محیطی از نظر شدت نور، دما، دسترسی به مواد غذایی و میزان شوری در بین موجودات فتوسنتز کننده بی‌نظیر است. بیوسنتز و انباشتن مقادیر قابل توجهی بتاکاروتن (تا حدود ۱۵٪ وزن خشک) در مواجهه با انواع تنش‌ها، *D. salina* را مدل مناسبی جهت

\*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: mb.bagherieh@gu.ac.ir

کاربردها به ویژگی‌های منحصر به فرد ایزومر ۹ سیس بتاکاروتن طبیعی مربوط می‌شود که تقریباً ۴۱٪ کل بتاکاروتن دونالیلا را شامل می‌شود (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009). از جمله این ویژگی‌ها می‌توان به اثرات ضد سرطانی، ضد پیری و پیش‌سازی سنتز ویتامین A برای موجودات مصرف کننده اشاره کرد (Mayne, 1996; Nishino et al., 2002). نقش فیزیولوژیکی بتاکاروتن به عنوان کاروتنوئید عمده دونالیلا (Cowan et al., 1992)، به خواصی چون جذب انرژی نور خورشید در محدوده سبز-آبی (Paniagua-Michel et al., 1994; Windhovel et al., 2009)، اثر آنتی‌اکسیدانی (Shariati and Hadi, 2011) و جاروب گونه‌های فعال اکسیژن، خاموش کننده کلروفل س‌ه تایی و اکسیژن یکتایی مربوط می‌شود (Fraser and Bramley, 2004).

شدت نور و میزان شوری دو عامل محیطی مهم و موثر برای ریز جلبک دونالیلا می‌باشند زیرا این جلبک ساکن دریاچه‌های شور مناطق با تابش‌های شدید نور خورشید می‌باشد. وجود راهکارهای مناسب برای مقابله و سازش با شرایط محیطی سخت دونالیلا را قادر به زندگی در محیط طبیعی و متغیر خود کرده است. تابش‌های با شدت بالا و غلظت بالای نمک هر دو منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (El-Baky et al., 2004a) که از طریق تغییر حالت ردوکس زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی در کلروپلاست (Lamers et al., 2008; Steinbrenner and Linden, 2003) مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها را در سطح رونویسی تنظیم می‌کنند (Giuliano et al., 2008; Pecker et al., 1992; Rau, 1985). به طور کلی، عوامل تنش‌زای محیطی که منجر به تولید انواع اکسیدان‌ها در سلول می‌شوند نهایتاً به تولید مقادیر متنابهی بتاکاروتن منجر می‌شوند (El-Baky et al., 2004b). نتیجه تنظیم در سطح رونویسی ژن‌های مسیر بیوسنتز کاروتنوئید، انباشتگی بتاکاروتن در ساختارهای گویچه‌ای چربی در فضاهای بین تیلاکوئیدی می‌باشد (Shariati and Hadi, 2011). مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها در موجودات فتوسنتز کننده به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته و این مسیر در دونالیلا مشابه گیاهان عالی می‌باشد (Hirschberg et al., 1997). آنزیم‌های دخیل و همچنین ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های مذکور در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها شناسایی شده‌اند. با توجه به مطالعات پیشین، دو آنزیم فیتوئن‌دسچوراز و لیکوپین‌تاسیکلاز آنزیم‌های مهم و کلیدی مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها می‌باشند (Rabhani et al., 1998; Ramos et al., 2011). ژن‌های هر دو آنزیم هسته‌ای بوده و در سطح رونویسی توسط حالت ردوکس کلروپلاست تنظیم می‌شوند (Lamers et al., 2008). هر دو پروتئین پس از ترجمه توسط پپتید عبوری وارد کلروپلاست شده و از مسیر غیرمولوناتی بیوسنتز کاروتنوئیدها را در استرومای پلاستید پیش می‌برند (Ramos et al., 2011). در گیاهان آنزیم فیتوئن‌دسچوراز مسئول غیراشباع سازی فیتوئن و تبدیل آن به زتا کاروتن می‌باشد (Ramos et al., 2011). این آنزیم یک پلی پپتید منفرد با ۵۸۳ اسید آمینه (Pecker et al., 1992) (۵۵ کیلودالتون) می‌باشد. لیکوپین‌تاسیکلاز مسئول تشکیل حلقه‌های بتا در دو انتهای لیکوپن و تبدیل آن به بتاکاروتن می‌باشد (Ramos et al., 2011; Steinbrenner and Linden, 2003). آنزیم لیکوپین‌تاسیکلاز دونالیلا دارای ۵۸۴ اسید آمینه و ۶۵ کیلودالتون وزن است. یک نسخه از ژن این آنزیم در ژنوم سیانوباکترها وجود دارد که همولوگ ژن‌های گیاهی و جلبکی رمز کننده لیکوپین‌تاسیکلاز می‌باشد (Cunningham et al., 1994). نواحی تنظیم شونده و تحت کنترل نور با جزئیات کامل روی پروموتور ژن کروموپلاستی لیکوپین‌تاسیکلاز گوجه فرنگی شناسایی شده است (Dalal et al., 2010). نیکوتین یک مهار کننده موثر برای لیکوپین‌سیکلاز می‌باشد و استفاده از آن به تجمع لیکوپین می‌انجامد (Doddaiah et al., 2011).

هدف تحقیق حاضر بررسی نحوه و شدت بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز بتاکاروتن در شدت‌های مختلف نور و شوری می‌باشد، و اینکه تغییرات کدام ژن منجر به تغییر محتوی بتاکاروتن در دونالیلا می‌شود. تصور می‌شود پی بردن به این نکته که حداکثر بیان ژن‌های مذکور در چه شرایطی اتفاق می‌افتد، در تولید حداکثر بتاکاروتن توسط دونالیلا مفید و مؤثر باشد.

شدت نور و میزان شوری دو عامل محیطی مهم و موثر برای ریز جلبک دونالیلا می‌باشند زیرا این جلبک ساکن دریاچه‌های شور مناطق با تابش‌های شدید نور خورشید می‌باشد. وجود راهکارهای مناسب برای مقابله و سازش با شرایط محیطی سخت دونالیلا را قادر به زندگی در محیط طبیعی و متغیر خود کرده است. تابش‌های با شدت بالا و غلظت بالای نمک هر دو منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند (El-Baky et al., 2004a) که از طریق تغییر حالت ردوکس زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی در کلروپلاست (Lamers et al., 2008; Steinbrenner and Linden, 2003) مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها را در سطح رونویسی تنظیم می‌کنند (Giuliano et al., 2008; Pecker et al., 1992; Rau, 1985). به طور کلی، عوامل تنش‌زای محیطی که منجر به تولید انواع اکسیدان‌ها در سلول می‌شوند نهایتاً به تولید مقادیر متنابهی بتاکاروتن منجر می‌شوند (El-Baky et al., 2004b). نتیجه تنظیم در سطح رونویسی ژن‌های مسیر بیوسنتز کاروتنوئید، انباشتگی بتاکاروتن در ساختارهای گویچه‌ای چربی در فضاهای بین تیلاکوئیدی می‌باشد (Shariati and Hadi, 2011). مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها در موجودات فتوسنتز کننده به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته و این مسیر در دونالیلا مشابه

## مواد و روش‌ها:

جلبک مورد استفاده و شرایط کشت: جلبک *D. salina* سویه CCAP۱۹/۱۸ از کلکسیون پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور واقع در تبریز تهیه گردید. از محیط کشت تغییر یافته جانسون (Hejazi and Wijffels, 2003) برای کشت و نگهداری جلبک‌ها استفاده گردید. اسیدیته محیط‌های کشت با استفاده از بافر تریس در حدود ۷/۵ تنظیم شد. کشت جلبک درون ارلن‌مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت در دمای  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  انجام گرفت. جهت تابش یکسان نور به همه سلول‌ها (بر اساس طرح آزمایشی)، ارلن‌ها به مدت ۴ روز روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه هم زده شدند.

**طراحی آزمایش:** آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو سطح شوری (۲ و ۴ مولار NaCl) و دو سطح نور با شدت‌های ۲۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه طراحی و با ۳ تکرار اجرا شد. تیمارها به صورت (۲۰۰-۲)، (۲۰۰-۴)، (۱۰۰۰-۲) و (۱۰۰۰-۴) نامگذاری گردیدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد.

**آنالیز رشد:** به منظور شمارش مستقیم تعداد سلول *D. salina* در هر میلی‌لیتر از محیط کشت از محلول لوگول، لام نئوبار (هماسیتومتر) و میکروسکوپ نوری استفاده شد (Hejazi and Wijffels, 2003).

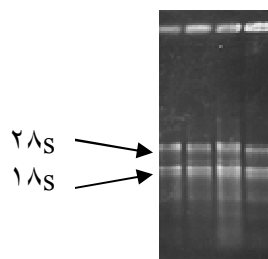
**سنجش بتاکاروتن:** جهت تعیین غلظت بتاکاروتن موجود در هر سلول از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد (Eijkelhoff and Dekker, 1997). به این ترتیب که پس از رسوبگیری از محیط حاوی سلول‌ها از استون ۸۰٪ برای استخراج رنگدانه‌ها استفاده شد. عصاره حاصل با استفاده از سانتریفیوژ صاف گردید. میزان جذب محلول رنگین و شفاف رویی در طول موج‌های ۴۱۲، ۴۳۱، ۴۶۰ و ۴۸۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر تعیین شد. سپس با قرار دادن جذب‌های خوانده شده در روابط و فرمول‌های مربوطه میزان بتاکاروتن به صورت پیکوگرم بر سلول محاسبه گردید.

**استخراج RNA و آماده سازی cDNA:** کلیه آنالیزهای

مولکولی بر طبق راهنمای استاندارد MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) انجام شد (Taylor et al., 2010).

پس از نمونه‌گیری (۲ میلی‌لیتر) در زمان‌های مورد نظر RNA هر نمونه با استفاده از محلول RNXplus (cat no: RNXplus - cinna Gen CO.) طبق دستور سازنده استخراج شد. کیفیت RNA‌های استخراج شده به روش اسپکتروفتومتری (نسبت‌های  $A_{260}/A_{320}$ ،  $A_{260}/A_{280}$  &  $A_{260}/A_{230}$ ) و الکتروفورز روی ژل تایید شد. کمیت RNA بر اساس جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه گردید. نمونه‌ای از RNA‌های استخراج شده در شکل ۱ نشان داده شده است. نمونه‌های حاوی ۵ الی ۱۰ میکروگرم RNA جهت سنتز cDNA با استفاده از کیت 2-steps RT-PCR (product code: RTPL12-vivan technologies) مورد استفاده قرار گرفتند. cDNA بدست آمده در دمای  $20^\circ\text{C}$  - نگهداری شدند. آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ برای ژن مرجع و دو ژن مورد بررسی به صورتی طراحی شدند که فقط بتوانند از روی cDNA تکثیر انجام دهند (نه DNA ژنومی). طول قطعات تکثیر شونده ۷۵ الی ۱۵۰ جفت باز در نظر گرفته شدند. شماره شناسه ژن‌های مورد استفاده جهت طراحی آغازگر، ترادف آغازگرها، وزن ماکولی آغازگرها، درصد GC، دمای جفت شدن آغازگر، طول آمپلیکون و نقطه ذوب آمپلیکون در جدول ۲ ارائه شده است.

آزمایشات qRT-PCR با بهره‌گیری از دستگاه (Bio Rad) Quanti-Tect SYBR Green CFX96 1000 و همچنین کیت PCR (ABI) صورت پذیرفت. مخلوط واکنش شامل ۰/۵ میکرولیتر cDNA، ۰/۲۵ میکرولیتر از آغازگر (۱۰ میکرومول) و ۵ میکرولیتر از مسترمیکس power SYBR<sup>®</sup> Green 2X با آب به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. پروفایل دمایی  $94^\circ\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه برای مرحله واسرشتی اولیه،  $94^\circ\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه برای مرحله واسرشتی،  $60^\circ\text{C}$  یا  $64^\circ\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه برای مرحله اتصال و  $72^\circ\text{C}$  به مدت ۱۵ ثانیه برای مرحله گسترش (۵۰×) و  $72^\circ\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه برای مرحله گسترش نهایی واکنش‌های PCR مورد استفاده قرار



شکل ۱- نمونه هایی از RNA های استخراج شده

جدول ۱- لیست پرایمرهای استفاده شده برای واکنش های RT-PCR

| Gene | Coding protein        | Ac.no      |   | Primer sequence       | Mw     | GC content | Tm    | Length of amplicon | Melt of amplicon | Second structures |
|------|-----------------------|------------|---|-----------------------|--------|------------|-------|--------------------|------------------|-------------------|
| 18S  | 18 s r RNA            | EF682843.1 | F | TGCATGGCCGTTCTTAGTGTG | 6130   | 50%        | 60-64 | 76                 | 77.1             | -                 |
| 18S  | 18 s r RNA            |            | R | ATTTAGCAGGCTGAGGTCTCG | 6477.3 | 52%        | 60-64 | 76                 |                  | -                 |
| pds  | phytoene desaturase   | GQ923693.1 | F | CGGCCTGCACATCTTCTTTG  | 6035   | 55%        | 60    | 80                 | 78.5             | -                 |
| pds  | phytoene desaturase   |            | R | ACTGCAGCCTGTCTGAGATG  | 6133   | 55%        | 60    | 80                 |                  | -                 |
| lyc  | lycopene beta-cyclase | EU327876.1 | F | TTCCACTGGCAAGGCTTCTTG | 6388.2 | 52%        | 60    | 137                | 83.6             | -                 |
| lyc  | lycopene beta-cyclase |            | R | ATTTGCACCACACTGGGATG  | 6406.2 | 52%        | 60    | 137                |                  | -                 |

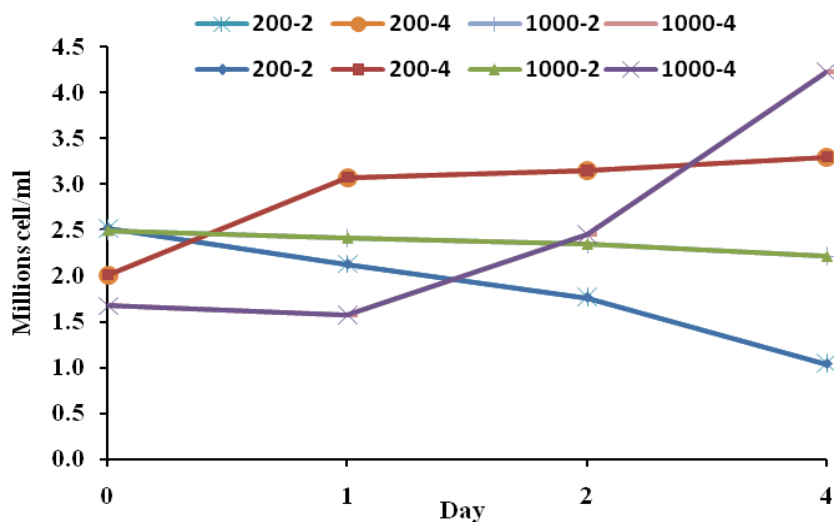
تغییرات سریع را به گونه‌ای کنترل کند که به ساختار سلولی و مخصوصاً دستگاه فتوسنتزی آسیب جدی وارد نیاید. عدم تغییر جدی در تعداد سلول‌ها در شرایط مختلف تیمارهای اعمال شده نشان‌دهنده ثبات نسبی ساختار سلولی و زنده ماندن سلول‌ها می‌باشد. هر چند که مطالعات پیشین حاکی از ترجیح هر گونه و سویه دونالیلا برای رشد در غلظت مشخصی از نمک در محیط کشت است (Fazeli et al., 2006; Narvaez- Zapata et al., 2011).

شکل ۳ (A الی D) میزان بیان ژن‌ها و محتوی بتاکاروتن را در تیمارهای متفاوت نشان می‌دهد. شکل ۳ A میزان بیان ژن‌های فیتوئن‌دسچوراز و لیکوپین‌بتاسیکلاز را در تیمار (۲۰۰-۲) نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود میزان رونویسی از ژن فیتوئن‌دسچوراز تغییر مشخصی را نشان نمی‌دهد. بیشترین تغییرات مربوط به میزان رونویسی از ژن لیکوپین‌بتاسیکلاز می‌باشد که ۴ ساعت پس از قرارگیری سلول‌ها در شرایط تیمار (۲۰۰-۲) به ۱۴ برابر مقدار اولیه رسیده‌است. در نهایت این تغییرات منجر به افزایش جزئی محتوی بتاکاروتن سلول‌ها شده‌است. شکل ۳ B مربوط به

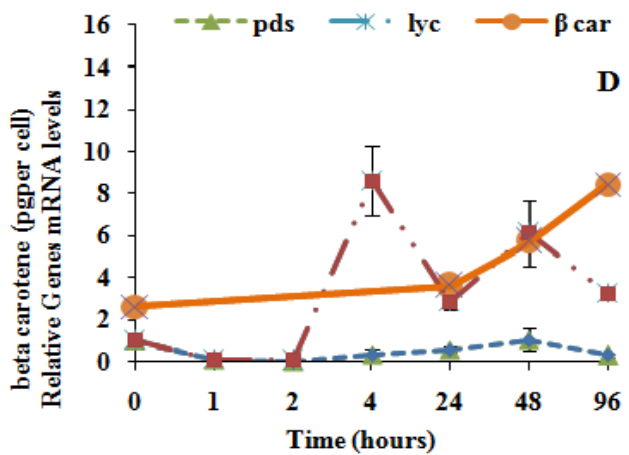
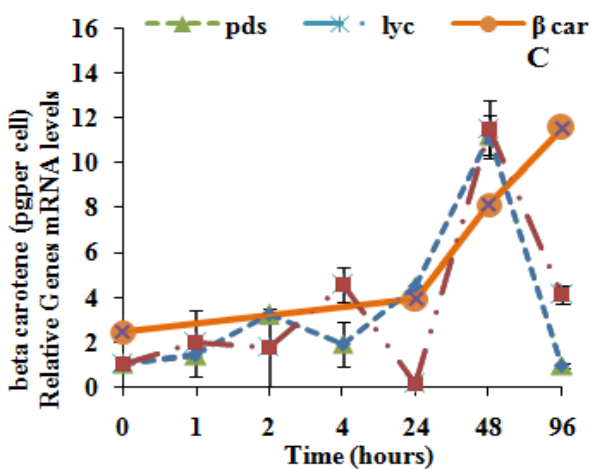
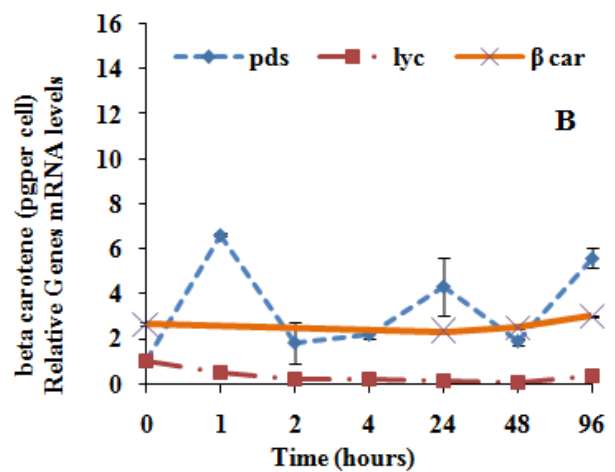
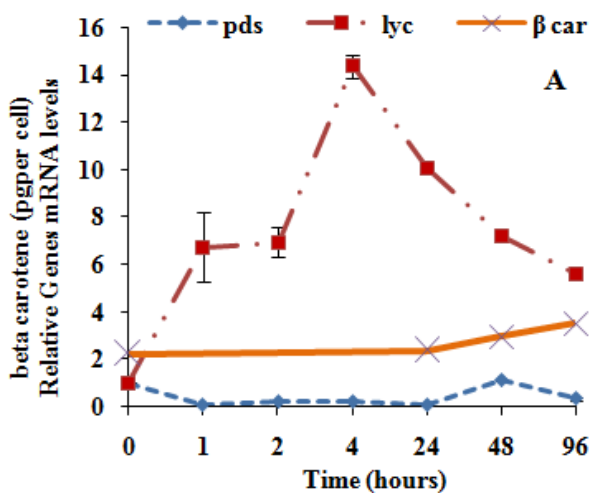
گرفت. منحنی ذوب محصولات در دمای بین ۶۵ تا ۹۵ °C (با فواصل نیم درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه) رسم شد. مقادیر کمی با استفاده از مقدار 18S rRNA به عنوان استاندارد درونی و روش  $\Delta\Delta CT$  نرمال سازی شدند.

### نتایج و بحث:

رشد و تعداد سلول *D. salina* به شدت متأثر از شرایط محیطی حاکم بر این ریز جلبک می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده‌است تغییرات تعداد سلول در ۴ روز زیاد قابل ملاحظه نیست. با توجه به داده‌های شکل ۲ احتمالاً *D. salina* شوری ۴ مولار نمک و نور بالا را برای رشد در کوتاه مدت ترجیح می‌دهد. زیرا حداکثر رشد در حدود ۴/۵ میلیون سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت در تیماری حاصل شده که در محیط با شوری ۴ مولار و تحت تابش نور با شدت ۱۰۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه بوده‌است. دو تغییر محیطی عمده که اغلب به صورت شبانه‌روزی و فصلی در محیط زیست طبیعی دونالیلا اتفاق می‌افتد غلظت نمک و شدت تابش نور می‌باشد. بنابراین این ریز جلبک باید قادر باشد این



شکل ۲- اثر شدت های نور (میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه) و شوری های (مولار) مختلف بر تعداد سلول جلبک *D. salina*. داده ها میانگین ۳ تکرار  $\pm se$  می باشند.



شکل ۳- (A الی D) - میزان بیان نسبی رونوشت های دو ژن فیتون دسچوراز (لوزی آبی)، لیکوپن بتاسیکلاز (مربع قرمز) و محتوی بتاکاروتن (ضربدر) در *D. salina* در ساعات مختلف پس از قرار گرفتن در تیمارهای آزمایش. داده های ارایه شده میانگین ۳ تکرار  $\pm se$  می باشند.

تیمار (۲۰۰-۴) می‌باشد. با توجه به داده‌های ارائه شده در شکل مشخص می‌شود تغییر قابل توجهی در میزان بیان ژن لیکوپن بتاسیکلاز مشاهده نمی‌شود و حتی ۲ ساعت پس از اعمال تیمار میزان رونویسی به صفر تنزل می‌یابد. افزایش بیان قابل ملاحظه ژن فیتوئن دسچوراز نتوانسته تغییری در محتوی بتاکاروتن سلول‌های تحت تیمار نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و شوری ۴ مولار نمک ایجاد کند.

شکل ۳ C تغییرات بیان دو ژن مذکور را در تیمار با شدت نور ۱۰۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و شوری ۲ مولار نمک (۱۰۰۰-۲) ارائه می‌نماید. افزایش بیان ۱۲ برابری هر دو ژن مسیر بیوستنز بتاکاروتن پس از انتقال ریز جلبک‌ها به نور ۱۰۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و شوری ۲ مولار نمک مخصوصاً در روز دوم تیمار منجر به افزایش ۴ برابری محتوی بتاکاروتن سلول‌ها در روز دوم و ۶ برابری در روز چهارم شده است.

شکل ۳ D مربوط به تیمار با شدت نور ۱۰۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و شوری ۴ مولار (۱۰۰۰-۴) می‌باشد. در این تیمار تغییر بیان ژن لیکوپن بتاسیکلاز غیر یکنواخت و در عین حال غیر قابل چشم پوشی است. در حالیکه ژن فیتوئن دسچوراز تغییر قابل ملاحظه‌ای را در عرض ۴ روز پس از اعمال تیمار نشان نمی‌دهد. افزایش محتوی بتاکاروتن از روز اول آغاز شده و در روز چهارم به حداکثر مقدار خود و حدوداً ۴ برابر مقدار اولیه رسیده است.

تنش‌های غیرزیستی موجب تغییرات جدی در میزان بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم *D. salina* نسبت به سایر ژن‌های دخیل در رشد و سنتز پروتئین و غیره می‌شوند (Park et al., 2006). از این رو عملکرد مسیر بیوستنز کاروتنوئیدها نیز بشدت متأثر از تنش‌های محیطی می‌باشد. نقش کاروتنوئیدها در کنترل و تحمل تنش‌های یادشده به اثبات رسیده است (Lamers et al., 2008). کاروتنوئیدها مخصوصاً بتاکاروتن از سلول دونالیلا در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش‌های اولیه نور و شوری محافظت می‌نمایند (Coesel et al., 2008; Park et al., 2006). علاوه بر

نقش کاروتنوئیدها در خاموش سازی کلروفیل تحریک شده، گفته می‌شود هر مولکول بتاکاروتن قادر است تعداد زیادی رادیکال آزاد اکسیژن را خنثی کند (Dufosse et al., 2005). با توجه به اینکه شوری نیز مانند شدت نور بالا (Fu et al., 2013; Sanchez-Estudillo et al., 2006)، با تولید گونه‌های اکسیژن فعال بر دستگاه فتوسنتزی اثر می‌گذارد می‌توان نتیجه گرفت که اثر این دو فاکتور محیطی در تغییر بیان ژن‌های بیوستنز بتاکاروتن و تغییر رنگ سلول‌های ریزجلبک از سبز به قرمز نارنجی به منظور نگهداشتن کارایی بالای فتوسنتزی و به حداقل رساندن آسیب گونه‌های اکسیژن فعال، همسو خواهد بود (Ramos et al., 2011; Steinbrenner and Linden, 2003).

امروزه می‌دانیم که تغییر محتوی بتاکاروتن در دونالیلا همانند سایر جلبک‌های شاخه کلروفیتا و گیاهان عالی ممکن است نتیجه تغییر در میزان بیان ژن‌های آنزیم‌های بیوستنز مسیر تولید بتاکاروتن می‌باشد (Coesel et al., 2008; Steinbrenner and Linden, 2003). استفاده از مهارکننده‌های رونویسی از انباشتگی مقادیر قابل توجه بتاکاروتن در شوری بالا و یا تحت تابش نورهای بالا جلوگیری می‌کند. در برخی مطالعات به ثبات در رونویسی و تغییر در فعالیت آنزیم‌ها هم اشاره شده است که می‌تواند به تنظیم ظریف مسیر بیوستنز توسط ترکیبی از چندین مکانیسم تنظیمی مربوط باشد. یکی از این مکانیسم‌های کنترلی در تجمع کاروتنوئیدها ممکن است مربوط به دخالت گویچه‌های لیپیدی در فضا‌های بین تیلاکوئیدی کلروپلاست، جایی که مولکول‌های کاروتنوئیدها تجمع می‌یابند، باشد. همچنین تنظیم ترجمه رونوشت‌ها و فعالیت آنزیم هم باید در نظر گرفته شود (Rabbani et al., 1998).

در آزمایشاتی که افزایش نور یا شوری با محدودیت مواد غذایی از محیط کشت دونالیلا همراه بوده افزایش قابل توجه در میزان بیان ژن‌های بیوستنز کاروتنوئیدها مشاهده شده است (Coesel et al., 2008). در سلول‌های *D. bardawil* وقتی از نظر وجود مواد غذایی در محیط کشت مشکلی نداشتند، بیان ژن فیتوئن دسچوراز با افزایش نور تابشی تغییری

نکرد. چنین نتیجه‌گیری شده که رونویسی از ژن فیتوئن‌دسچوراز در حضور مواد غذایی در محیط کشت مهار می‌شود (Rabhani et al., 1998). در گزارشی *D. salina* ۱۹/۳۰ بعد از سازش با شوری کم (۰.۴٪) بیشترین میزان بتاکاروتن را طی ۴ روز انباشته کرد ولی با افزایش میزان شوری مقدار بتاکاروتن کاهش یافت (Coesel et al., 2008).

در گزارش راد (۲۰۱۱) سویه دونالیا جدا شده از دریاچه ارومیه در شوری ۳ مولار بیش از دو برابر شوری ۲ مولار بتاکاروتن تولید کرد (Rad et al., 2011). نتایج آزمایش حاضر نیز حاکی از تغییر میزان بیان ژن‌های موثر مسیر بیوستز بتاکاروتن تحت شرایط متفاوت نور و شوری می‌باشد که منجر به تغییر در میزان سنتز بتاکاروتن می‌شود. در تحقیق دیگری، به افزایش میزان کاروتنوئیدها در نور ۵۰۰ نسبت به نور ۶۵ میکرومول فوتون‌برمترمربع‌برثانیه، به شرط آنکه مواد غذایی محیط محدود نباشد، اشاره شده‌است (Coesel et al., 2008). در تحقیق فوق سلول‌های *D. salina* ۱۹/۳۰ تغییر بیان ژن فیتوئن‌دسچوراز با افزایش شوری جزئی و قابل اغماض بوده (و شوری منجر به انباشتگی کاروتنوئیدها نگردد)، در صورتیکه با افزایش شدت نور افزایش نسبی بیان ژن یاد شده مشاهده گردید. بیان ژن فیتوئن‌سنتاز در محیط حاوی مقادیر کافی از منبع نیتروژنی ثابت می‌ماند (Sanchez-Estudillo et al., 2006). با انتقال *D. bardawil* از نور ۴۶ به ۶۹۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه، طی ۷۲ ساعت علی‌رغم افزایش بتاکاروتن هیچ تغییری در فعالیت ویژه فیتوئن‌دسچوراز و میزان رونویسی از ژن مربوطه مشاهده نگردید (Rabhani et al., 1998). گزارش دال بر تنظیم ژن فیتوئن‌دسچوراز فقط تحت نور آبی وجود دارد (Bohne and Linden, 2002). باید توجه داشت نور آبی بیشتر موجب سرریز زنجیره انتقال الکترون فتوستتزی و تولید گونه‌های اکسیژن فعال و در نهایت آسیب اکسیداتیو می‌شود. از آنجا که نور آبی در باکتری‌های غیرفتوستتزی نظیر *Myxococcus xanthus* نیز قادر به تحریک بیوستز کاروتنوئیدها می‌باشد (Botella et al., 1995) احتمال می‌رود مسیر ترانسسانی علامت نور آبی در دونالیا نیز دخیل باشد (Fu

Zhang و همکاران (۲۰۱۱) دریافتند که رونویسی از ژن لیکوپین‌تاسیکلاز در کیسه‌چه‌های آبدار citrus کشت شده در شیشه توسط نور آبی، ساکارز و مانیتول تنظیم و کنترل می‌شود. در مورد جلبک سبز تک سلولی *Haematococcus pluvialis* Bohne and Linden (۲۰۰۳) گزارش کرده‌اند، ژن‌های مسیر بیوستز کاروتنوئیدها در پاسخ به افزایش میزان تابش از ۲۰ به ۱۵۰ میکرومول فوتون‌برمترمربع‌برثانیه افزایش بیان قابل توجه یافتند که با سنتز و تجمع آستاگزانتین همسو بود. افزایش بیان و همچنین افزایش میزان کاروتنوئید با وضعیت ردوکس زنجیره انتقال الکترون فتوستتزی همبستگی داشت که این افزایش بیان و بیوستز هم در نور آبی و هم در نور قرمز اتفاق می‌افتد. طی ساعات اولیه انتقال کلامیدوموناس از تاریکی به نور ۲۰۰ میکرومول فوتون‌برمترمربع‌برثانیه افزایش قابل ملاحظه در بیان ژن فیتوئن‌دسچوراز مشاهده می‌شود در حالی که چنین افزایشی پس از انتقال از نور ۳۰ به نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه مشاهده نشد. هم‌اکنون فرضیه دخالت مخزن پلاستوکینون کلروپلاستی از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال طی تنش‌های غیرزیستی در تنظیم ژن‌های مسیر بیوستز کاروتنوئیدها در مرحله رونویسی بسیار مورد توجه است (Lamers et al., 2008).

اگر میزان سنتز و نحوه تنظیم آنزیم‌ها به غلظت محصول نهایی مرتبط باشد، فرضیه Rabhani (۱۹۹۸) در مورد نقش افزایش تولید لیپید در بیش تولید کاروتنوئیدها می‌تواند صحیح باشد زیرا با افزایش بیوستز لیپید و تشکیل گویچه‌های لیپیدی کاروتنوئیدهای تولید شده در کلروپلاست از آن خارج شده و درون این گویچه‌ها قرار می‌گیرند. کاهش غلظت کاروتنوئیدها در کلروپلاست، مهار مربوط به فرآورده نهایی را از روی آنزیم برداشته و این آنزیم با افزایش فعالیت موجبات سنتز و انباشتگی بیشتر کاروتنوئیدها را فراهم می‌آورد. Al-Hasan و

فیتوئندسچوراز به تنهایی به مقدار جزئی و افزایش بیان لیکوپینبتاسیکلاز به مقدار بیشتر موجب سنتز بتاکاروتن می‌گردد. بیشینه بیوسنتز بتاکاروتن در تیماری مشاهده می‌شود که میزان بیان هر دو ژن به صورت قابل توجهی افزایش بیان نشان می‌دهند. نتیجه افزایش همزمان رونویسی از دو ژن فیتوئندسچوراز و لیکوپینبتاسیکلاز افزایش چند برابری میزان بتاکاروتن در هر سلول *D. salina* طی ۴ روز بود. احتمال دارد نتیجه برهم‌کنش تنش نوری و شوری بروز تنش اکسیداتیو بوده باشد که به نوبه خود موجب افزایش بیان ژن‌های فیتوئندسچوراز و لیکوپینبتاسیکلاز گردیده است.

همکاران (۱۹۸۷) مشاهده کردند که با افزایش شوری از ۲/۵ به ۲۰ درصد فعالیت فتوسنتزی افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا می‌کند. رنگدانه‌های فتوسنتزی نیز با افزایش شوری افزایش حاصل می‌کنند ولی میزان افزایش کاروتنوئیدها بیش از کلروفیل‌هاست به طوری که در شوری بالا نسبت کاروتن به کلروفیل چندین برابر می‌گردد. هر چند که در آزمایش حاضر اثر نور واضح‌تر و موثرتر از اثر افزایش میزان شوری در محیط کشت *D. salina* بود.

### نتیجه‌گیری:

در کل می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که افزایش بیان

### منابع:

- growth and carotenoid production in *Dunaliella bardawil*. Journal of Food Science and Technology 50: 1130-1136.
- Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N. and Ravishankar, G. A. (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? Trends in Food Science and Technology 16: 389-406.
- Eijkelhoff, C. and Dekker, J. P. (1997) A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and  $\beta$ -carotene contents of isolated Photosystem II reaction center complexes. Photosynthesis Research 52: 69-73.
- El-Baky, A., El-Baz, F. K. and El-Baroty, G. S. (2004a) Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. International Journal of Agriculture and Biology 6: 49-57.
- El-Baky, H. H. A., El-Baz, F. K. and El-Baroty, G. S. (2004b) Production of lipids rich in omega 3 fatty acids from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. Biotechnology 3: 102-108.
- Fazeli, M. R., Tofighi, H., Samadi, N., Jamalifar, H. and Fazeli, A. (2006) Carotenoids accumulation by *Dunaliella tertiolecta* (lake urmia isolate) and *Dunaliella salina* (ccap 19/18 and wt) under stress conditions. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 14:146-150.
- Fraser, P. D. and Bramley, P. M. (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Progress in Lipid Research 43: 228-265.
- Fu, W., Guomundsson, O., Paglia, G., Herjolfsson, G., Andresson, O. S., Palsson, B. O. and Brynjolfsson, S. (2013) Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. Applied microbiology and Biotechnology 97:2395-2403.
- Fu, W., Paglia, G., Magnusdottir, M., Steinarsdottir, E. Al-Hasan, R., Ghannoum, M., Sallal, A., Abu-Elteen, K. and Radwan, S. (1987) Correlative changes of growth, pigmentation and lipid composition of *Dunaliella salina* in response to halostress. Journal of General Microbiology 133: 2607-2616.
- Bohne, F. and Linden, H. (2002) Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochimica et Biophysica Acta 1579: 26-34.
- Botella, J. A., Murillo, F. J. and Ruiz-Vazquez, R. (1995) A cluster of structural and regulatory genes for light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. European Journal of Biochemistry 233: 238-248.
- Coesel, S. N., Baumgartner, A. C., Teles, L. M., Ramos, A. A., Henriques, N. M., Cancela, L. and Varela, J. C. S. (2008) Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. Marine Biotechnology 10: 602-611.
- Cowan, A., Rose, P. and Horne, L. (1992) *Dunaliella salina*: a model system for studying the response of plant cells to stress. Journal of Experimental Botany 43: 1535-1547.
- Cunningham, F. X., Sun, Z., Chamovitz, D., Hirschberg, J. and Gantt, E. (1994) Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942. The Plant Cell 6: 1107-1121.
- Dalal, M., Chinnusamy, V. and Bansal, K. C. (2010) Isolation and functional characterization of lycopene  $\beta$ -cyclase (CYC-B) promoter from *Solanum habrochaites*. BMC Plant Biology 10: 61.
- Doddaiah, K. M., Narayan, A., Aswathanarayana, R. G. and Ravi, S. (2011) Effect of metabolic inhibitors on

- Research 17: 471-482.
- Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J. V., Hugueney, P. and Kleinig, H. (1998) Induced  $\beta$ -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology* 116: 1239-1248.
- Rad, F. A., Aksoz, N. and Hejazi, M. A. (2011) Effect of salinity on cell growth and  $\beta$ -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. *African Journal of Biotechnology* 10: 2282-2289.
- Ramos, A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J. C., Jin, E. and Valera, J. (2011) The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae* 26: 3-20.
- Rau, W. (1985) Mechanism of photoregulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Pure and Applied Chemistry* 57: 777-784.
- Ribeiro, B. D., Barreto, D. W. and Coelho, M. A. Z. (2011) Technological aspects of  $\beta$ -carotene production. *Food and Bioprocess Technology* 4: 693-701.
- Sanchez-Estudillo, L., Freile-Pelegri, Y., Rivera-Madrid, R., Robledo, D. and Narvaez-Zapata, J. A. (2006) Regulation of two photosynthetic pigment-related genes during stress-induced pigment formation in the green alga, *Dunaliella salina*. *Biotechnology Letters* 28: 787-791.
- Shariati, M. and Hadi, M. R. (2011) Microalgal biotechnology and bioenergy in *Dunaliella*. In: *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* (ed. Carpi, A.) Pp.483-506. InTech, Rijeka, Croatia.
- Steinbrenner, J. and Linden, H. (2003) Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. *Plant Molecular Biology* 52: 343-356.
- Takaichi, S. (2011) Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs* 9: 1101-1118.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. and Nguyen, M. (2010) A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50: S1-S5.
- Windhovel, U., Geiges, B., Sandmann, G. and Boger, P. (1994) Expression of Erwinia uredovora phytoene desaturase in *Synechococcus* PCC7942 leading to resistance against a bleaching herbicide. *Plant Physiology* 104: 119-125.
- Zhang, L., Ma, G., Kato, M., Yamawaki, K., Takagi, T., Kiriiwa, Y., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Yoshioka, T. and Nesumi, H. (2012) Regulation of carotenoid accumulation and the expression of carotenoid metabolic genes in citrus juice sacs *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* 63: 871-886.
- A., Gudmundsson, S., Palsson, B. O., Andresson, O.S. and Brynjolfsson, S. (2014) Effects of abiotic stressors on lutein production in the green microalga *Dunaliella salina*. *Microbial Cell Factories* 13: 3.
- Giuliano, G., Tavazza, R., Diretto, G., Beyer, P. and Taylor, M. A. (2008) Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Biotechnology* 26: 139-145.
- Hejazi, M. and Wijffels, R. (2003) Effect of light intensity on  $\beta$ -carotene production and extraction by *Dunaliella salina* in two-phase bioreactors. *Biomolecular Engineering* 20: 171-175.
- Hirschberg, J., Cohen, M., Harker, M., Lotan, T., Mann, V. and Pecker, I. (1997) Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure and Applied Chemistry* 69: 2151-2158.
- Hosseini Tafreshi, A. and Shariati, M. (2009) *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology* 107: 14-35.
- Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J. and Wijffels, R. H. (2008) Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology* 26: 631-638.
- Mayne, S. T. (1996) Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *The FASEB Journal* 10: 690-701.
- Narvaez-Zapata, J. A., Rojas-Herrera, R., Lopez-Uc, Y. and Sanchez-Estudillo, L. (2011) Different physiological responses influenced by salinity in genetically related *Dunaliella salina* isolates. *Biotechnology Letters* 33: 1021-1026.
- Nishino, H., Murakoshi, M., Ii, T., Takemura, M., Kuchide, M., Kanazawa, M., Mou, X. Y., Wada, S., Masuda, M. and Ohsaka, Y. (2002) Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews* 21: 257-264.
- Paniagua-Michel, J., Capa-Robles, W., Olmos-Soto, J. and Gutierrez-Millan, L. E. (2009) The carotenogenesis pathway via the isoprenoid- $\beta$ -carotene interference approach in a new strain of *Dunaliella salina* isolated from Baja California Mexico. *Marine Drugs* 7: 45-56.
- Park, S., Polle, J. E., Melis, A., Lee, T. K. and Jin, E. (2006) Up-regulation of photoprotection and PSII-repair gene expression by irradiance in the unicellular green alga *Dunaliella salina*. *Marine Biotechnology* 8: 120-128.
- Pecker, I., Chamovitz, D., Linden, H., Sandmann, G. and Hirschberg, J. (1992) A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to zeta-carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 4962-4966.
- Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X. W., Chen, Z. and Qu, L. J. (2007) Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell*

