بررسی بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز بتاکاروتن در *Dunaliella salina* تحت شرایط متفاوت نور و شوری

لیلا زرندی میاندوآب[1و3]، محمدباقر باقریه نجار[1*]، محمدامین حجازی[2] و نادر چاپارزاده[3]

[1]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران، [2]پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی غرب و شمال‌غرب کشور، تبریز، ایران، [3]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

(تاریخ دریافت: ٩٣/٠٦/٢٠، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٣/٠٩/١١)

چکیده:

ریز جلبک دونالیلا سالینا (*Dunaliella salina*) با قابلیت انباشتگی مقادیر قابل توجه بتاکاروتن به عنوان یک مدل مناسب جهت بررسی نحوه بیان ژن‌های فیتوئن‌دسچوراز و لیکوپن‌بتاسیکلاز 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 کاملا تصادفی با دو شدت نور (٢٠٠ و ١٠٠٠ میکرو مول فوتون بر متر مربع) و دو سطح شوری (٢ و ٤ مولار نمک کلریدسدیم) به مدت زمان ٤ روز طراحی و اجرا شد. افزایش بیان فیتوئن‌دسچوراز در تیمار نور ٢٠٠ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری ٤ مولار و نور ١٠٠٠ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری ٢ مولار مشاهده گردید. ژن لیکوپن‌بتاسیکلاز در تیمارهای (نور٢٠٠ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری ٢ مولار)، (نور ١٠٠٠ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری٢ مولار) و (نور ١٠٠٠ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری ٤ مولار) افزایش بیان داشت. بیشترین میزان بتاکاروتن در تیمار با شدت نور ١٠٠٠ میکرو مول فوتون بر متر مربع و شوری ٢ 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 (فیتوئن‌دسچوراز و لیکوپن‌بتاسیکلاز) 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:

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 ١٥٪ وزن خشک) در مواجهه با انواع تنش‌ها، *D. salina* را مدل مناسبی جهت 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

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.13.3]

کاربردها به ویژگی‌های منحصربه‌فرد ایزومر ۹ سیس بتاکاروتن طبیعی مربوط می‌شود که تقریبا ٤۱٪ 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*., 2009; Windhovel *et al*., 1994)، اثر آنتی‌اکسیدانی (Shariati and Hadi, 2011) و جاروب گونه‌های فعال اکسیژن، خاموش کننده کلروفیل 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 نهایتا 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 تیلاکوییدی 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 لیکوپن‌بتاسیکلاز آنزیم‌های مهم و کلیدی مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها می‌باشند (Rabbani *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 غیرموالوناتی 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. لیکوپن‌بتاسیکلاز مسئول تشکیل حلقه‌های بتا در دو انتهای لیکوپن و تبدیل آن به بتاکاروتن می‌باشد (Ramos *et al*., 2011; Steinbrenner and Linden, 2003). آنزیم لیکوپن‌بتاسیکلاز دونالیلا دارای ٥٨٤ اسید آمینه و ٦٥ کیلودالتون وزن است. یک نسخه از ژن این آنزیم در ژنوم سیانوباکترها وجود دارد که همولوگ ژن‌های گیاهی و جلبکی رمز کننده لیکوپن‌بتاسیکلاز می‌باشد (Cunningham *et al*., 1994). نواحی تنظیم شونده و تحت کنترل نور با جزئیات کامل روی پروموتور ژن کروموپلاستی لیکوپن بتاسیکلاز گوجه فرنگی شناسایی شده است (Dalal *et al*., 2010). نیکوتین یک مهار کننده موثر برای لیکوپن‌سیکلاز می‌باشد و استفاده از آن به تجمع لیکوپن 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.13.3]

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 $۳۰\pm۲^{\circ}C$ انجام گرفت. جهت تابش یکسان نور به همه سلول‌ها (بر اساس طرح آزمایشی)، ارلن‌ها به مدت ٤ روز روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۰ دوردردقیقه هم زده شدند.

طراحی آزمایش: آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو سطح شوری (۲ و ٤ مولار NaCl) و دو سطح نور با شدت‌های ۲۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول‌فوتون‌برمترمربع‌برثانیه طراحی و با ۳ تکرار اجرا شد. تیمارها به صورت (۲۰۰-۲)، (۲۰۰-٤)، (۱۰۰۰-۲) و (۱۰۰۰-٤) 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 (Eijckelhoff and Dekker, 1997). به این ترتیب که پس از رسوبگیری از محیط حاوی سلول‌ها از استون۸۰٪ برای استخراج رنگدانه‌ها استفاده شد. عصاره حاصل با استفاده از سانتریفیوژ صاف گردید. میزان جذب محلول رنگین و شفاف رویی در طول‌موج‌های ٤۱۲، ٤۳۱، ٤٦۰ و ٤۸۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر تعیین شد. سپس با قرار دادن جذب‌های خوانده شده در روابط و فرمول های مربوطه میزان بتاکاروتن به صورت پیکوگرم بر سلول محاسبه گردید.

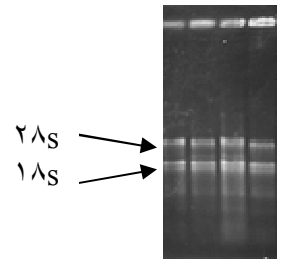
استخراج RNA وآماده سازی cDNA: کلیه آنالیزهای مولکولی بر طبق راهنمای استاندارد MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) انجام شد (Taylor *et al*., 2010).

پس از نمونه‌گیری (۲میلی‌لیتر) در زمان‌های مورد نظر RNA هر نمونه با استفاده از محلول RNXplus (cat no: RN7713C - cinna Gen CO.) طبق دستور سازنده استخراج شد. کیفیت RNA های 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 ۲٦۰ نانومتر محاسبه گردید. نمونه‌ای از RNAهای استخراج شده در شکل ۱ نشان داده شده‌است. 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 $-۲۰^{\circ}C$ نگهداری شدند. آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار پرایمر۳ 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 موکولی آغازگرها، درصدGC، دمای جفت شدن آغازگر، طول آمپلیکون و نقطه ذوب آمپلیکون در جدول۲ ارائه شده است.

آزمایشات qRT-PCR با بهره‌گیری از دستگاه (Bio Rad CFX96 1000) و همچنین کیت Quanti-Tect SYBR Green 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® Green 2X با آب به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. پروفایل دمایی $۹٤^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه برای مرحله واسرشتی اولیه، ($۹٤^{\circ}C$ به مدت ۱ دقیقه برای مرحله واسرشتی، $٦۰^{\circ}C$ یا $٦٤^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه برای مرحله اتصال و $۷۲^{\circ}C$ به مدت ۱۵ ثانیه برای مرحله گسترش)×۵۰ و $۷۲^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه برای مرحله گسترش نهایی واکنش‌های PCR مورد استفاده قرار

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.13.3]



شکل۱- نمونه هایی از RNA های استخراج شده

جدول۱- لیست پرایمرهای استفاده شده برای واکنش‌های RT-PCR

Gene	Coding protein	Ac.no		Primer sequence	Mw	GC content	Tm	Length of amplicon	Melt t of amplicon	Second structurs
18S	18 s r RNA	EF682843.1	F	TGCATGGCCGTTCTTAGTTG	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	ATTTGCACCACACCTGGGATG	6406.2	52%	60	137		-

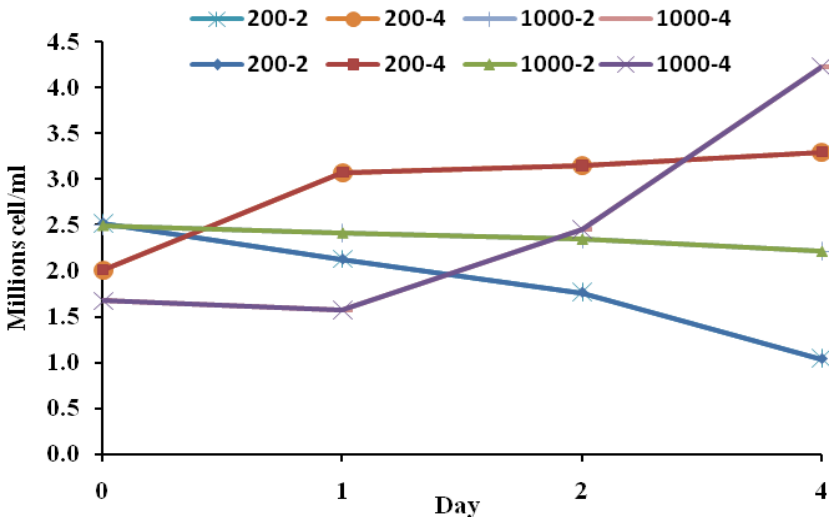
گرفت. منحنی ذوب محصولات در دمای بین ٦٥ تا ٩٥°C (با فواصل نیم درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه) رسم شد. مقادیر کمی با استفاده از مقدار 18S rRNA به عنوان استاندارد درونی و روش ΔΔCT نرمال سازی شدند.

نتایج و بحث:

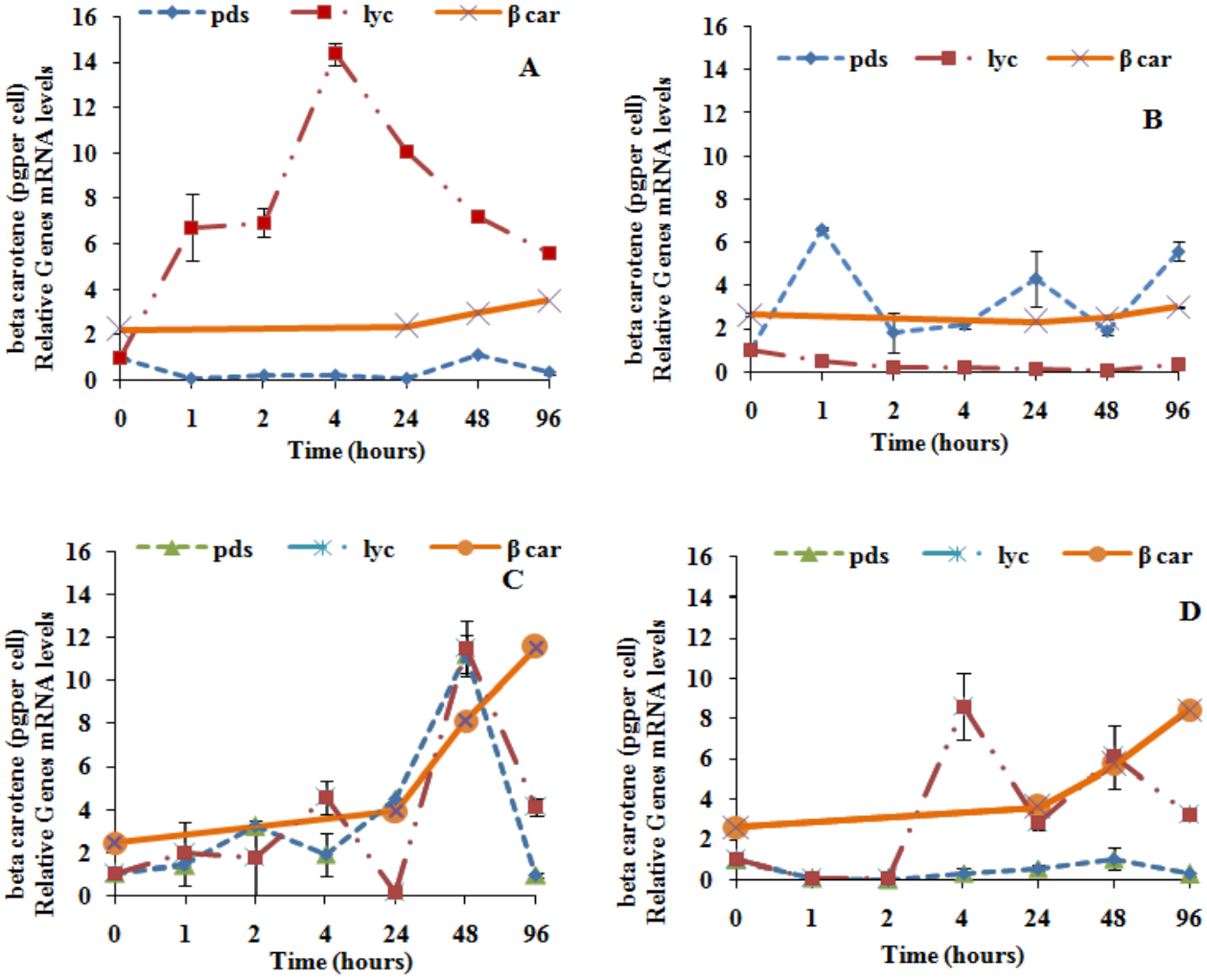
رشد و تعداد سلول *D. salina* به‌شدت متاثر از شرایط محیطی حاکم بر این ریز جلبک می‌باشد. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده‌است تغییرات تعداد سلول در ٤ روز زیاد قابل ملاحظه نیست. با توجه به داده‌های شکل ۲ احتمالاً *D. salina* شوری ٤ مولار نمک و نور بالا را برای رشد در کوتاه مدت ترجیح می‌دهد. زیرا حداکثر رشد در حدود ٤/٥ میلیون سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت در تیماری حاصل شده که در محیط با شوری ٤ مولار و تحت تابش نور با شدت ۱۰۰۰ میکرومول‌فوتون‌برمترمربع‌برثانیه 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 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).

شکل۳ (A الی D) میزان بیان ژن‌ها و محتوی بتاکاروتن را در تیمارهای متفاوت نشان می‌دهد. شکل۳ A میزان بیان ژن‌های فیتوئن‌دسچوراز و لیکوپن‌بتاسیکلاز را در تیمار (۲۰۰-۲) نشان می‌دهد. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود میزان رونویسی از ژن فیتوئن‌دسچوراز تغییر مشخصی را نشان نمی دهد. بیشترین تغییرات مربوط به میزان رونویسی از ژن لیکوپن‌بتاسیکلاز می‌باشد که ٤ ساعت پس از قرارگیری سلول ها در شرایط تیمار (۲۰۰-۲) به ١٤ برابر مقدار اولیه رسیده‌است. در نهایت این تغییرات منجر به افزایش جزئی محتوی بتاکاروتن سلول‌ها شده‌است. شکل ۳ B مربوط به

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.13.3]



شکل۲- اثر شدت های نور(میکرومول‌فوتون‌برمترمربع‌برثانیه) و شوری‌های(مولار) مختلف بر تعداد سلول جلبک *D. salina*. داده‌ها میانگین ۳ تکرار± se می باشند.



شکل ۳- (A الی D)- میزان بیان نسبی رونوشت‌های دو ژن فیتوئن‌دسچوراز (لوزی آبی)، لیکوپن‌بتاسیکلاز (مربع قرمز) و محتوی بتاکاروتن(ضربدر) در *D. salina* در ساعات مختلف پس از قرارگرفتن در تیمارهای آزمایش. داده‌های ارایه شده میانگین ۳ تکرار±se می‌باشند.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.13.3]

تیمار (۲۰۰–٤) می‌باشد. با توجه به داده‌های ارائه شده در شکل مشخص می‌شود تغییر قابل‌توجهی در میزان بیان ژن لیکوپن‌بتاسیکلاز مشاهده نمی‌شود و حتی ۲ ساعت پس از اعمال تیمار میزان رونویسی به صفر تنزل می‌یابد. افزایش بیان قابل ملاحظه ژن فیتوئن‌دسچوراز نتوانسته تغییری در محتوی بتاکاروتن سلول‌های تحت تیمار نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه و شوری ٤ مولار نمک ایجاد کند.

شکل ۳ C تغییرات بیان دو ژن مذکور را در تیمار با شدت نور ۱۰۰۰ میکرومول فوتون برمترمربع‌برثانیه و شوری ۲ مولار نمک (۱۰۰۰–۲) ارائه می‌نماید. افزایش بیان ۱۲ برابری هر دو ژن مسیر بیوسنتز بتاکاروتن پس از انتقال ریز جلبک‌ها بـه نـور ۱۰۰۰ میکرومول‌فوتون‌برمترمربع‌برثانیه و شوری ۲ مولار نمک مخصوصاً در روز دوم تیمار منجر به افزایش ٤ برابری محتوی بتاکاروتن سلول‌ها در روز دوم و ٦ برابری در روز چهارم شده است.

شکل ۳ D مربوط به تیمار با شدت نور ۱۰۰۰ میکرومول‌فوتون‌برمترمربع‌برثانیه و شوری ٤ مولار (۱۰۰۰–٤) می‌باشد. در این تیمار تغییر بیان ژن لیکوپن بتاسیکلاز غیر یکنواخت و در عین حال غیر قابل چشم پوشی است. در حالیکه ژن فیتوئن‌دسچوراز تغییر قابل ملاحظه‌ای را در عرض ٤ 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 ٤ برابر مقدار اولیه رسیده‌است.

تنش‌های غیرزیستی موجب تغییرات جدی در میزان بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم *D. salina* نسبت به سایر ژن‌های دخیل در رشد و سنتز پروتئین وغیره می‌شوند (Park *et al*., 2006). از این رو عملکرد مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها نیز بشدت متاثر از تنش‌های محیطی می‌باشد. نقش کاروتنوئیدها در کنترل و تحمل تنش‌های یادشده به اثبات رسیده‌است (Lamers *et al*., 2008). کاروتنوئیدها مخصوصا 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 بیوسنتز 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 بیوسنتزی مسیر تولید بتاکاروتن می‌باشد (Coesel *et al*., 2008; Steinbrenner and Linden, 2003). استفاده از مهار کننده‌های 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 شده‌است که می‌تواند به تنظیم ظریف مسیر بیوسنتزی 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 بیوسنتزی 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 فیتوئن‌دسچوراز با افزایش نور تابشی تغییری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.13.3]

نکرد. چنین نتیجه‌گیری شده که رونویسی از ژن فیتوئن‌دسچوراز در حضور مواد غذایی در محیط کشت مهار می‌شود (Rabbani *et al*., 1998). در گزارشی *D. salina* ۱۹/۳۰ بعد از سازش با شوری کم (٤٪) بیشترین میزان بتاکاروتن را طی ٤ روز انباشته کرد ولی با افزایش میزان شوری مقدار بتاکاروتن کاهش یافت (Coesel *et al*., 2008). در گزارش راد (۲۰۱۱) سویه دونالیلا 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 بیوسنتز 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 ٦٥ 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 نگردید)، 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 ٤٦ به ٦٩٠ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه، طی۷۲ ساعت علی رغم افزایش بتاکاروتن هیچ تغییری در فعالیت ویژه فیتوئن‌دسچوراز و میزان رونویسی از ژن مربوطه مشاهده نگردید (Rabbani *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 فتوسنتزی و تولید گونه‌های اکسیژن فعال و در نهایت آسیب اکسیداتیو می‌شود. از آنجا که نور آبی در باکتری‌های غیرفتوسنتزی نظیر *Myxococcus xanthus* نیز قادر به تحریک بیوسنتز کاروتنوئیدها می‌باشد (Botella *et al*., 1995) احتمال می‌رود مسیر ترارسانی علامت نور آبی در دونالیلا نیز دخیل باشد (Fu *et al*., 2013). غیر فعال شدن ژن فیتوئن‌دسچوراز حداقل ۲۰ مسیر متابولیک (بیوسنتز کاروتنوئیدها، کلروفیل و جیبرلین) را در آرابیدوپسیس متاثر می‌سازد. اثر فیدبک منفی تجمع فیتوئن بر این مسیرها نیز محتمل می‌باشد (Qin *et al*., 2007).

Zhang و همکاران (۲۰۱۱) دریافتند که رونویسی از ژن لیکوپن‌بتاسیکلاز 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 بیوسنتز کاروتنوئیدها در پاسخ به افزایش میزان تابش از ۲۰ به۱۵۰ 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 فتوسنتزی همبستگی داشت که این افزایش بیان و بیوسنتز هم در نور آبی و هم در نور قرمز اتفاق می‌افتد. طی ساعات اولیه انتقال کلامیدوموناس از تاریکی به نور ۲۰۰ میکرومول‌فوتون‌برمترمربع‌برثانیه افزایش قابل ملاحظه در بیان ژن فیتوئن‌دسچوراز مشاهده می‌شود در حالی که چنین افزایشی پس از انتقال از نور ۳۰ به نور ۲۰۰ میکرو مول فوتون بر متر مربع بر ثانیه مشاهده نشد. هم اکنون فرضیه دخالت مخزن پلاستوکینون کلروپلاستی از طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال طی تنش‌های غیرزیستی در تنظیم ژن‌های مسیر بیوسنتز 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 Rabbani (۱۹۹۸) در مورد نقش افزایش تولید لیپید در بیش تولید کاروتنوئیدها می‌تواند صحیح باشد زیرا با افزایش بیوسنتز 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 فراورده نهایی را از روی آنزیم برداشته و این آنزیم با افزایش فعالیت موجبات سنتز و انباشتگی بیشتر کاروتنوئیدها را فراهم می‌آورد. Al-Hasan و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.13.3]

همکاران (۱۹۸۷) مشاهده کردند که با افزایش شوری از ۲/۵ به ۲۰ درصد فعالیت فتوسنتزی افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا می کند. رنگدانه‌های فتوسنتزی نیز با افزایش شوری افزایش حاصل می‌کنند ولی میزان افزایش کاروتنوییدها 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 فیتوئن‌دسچوراز به تنهایی به مقدار جزئی و افزایش بیان لیکوپن‌بتاسیکلاز 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 لیکوپن‌بتاسیکلاز افزایش چند برابری میزان بتاکاروتن در هر سلول *D. salina* طی ٤ 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 لیکوپن‌بتاسیکلاز گردیده است.

منابع:

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 β-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 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.

Eijckelhoff, C. and Dekker, J. P. (1997) A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin a and β-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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.13.3]

Research 17: 471-482.

Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J. V., Hugueney, P. and Kleinig, H. (1998) Induced -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 -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 β-carotene production. Food and Bioprocess Technology 4: 693-701.

Sanchez-Estudillo, L., Freile-Pelegrin, 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 β-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 sali*na 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-β-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

.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.13.3]

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.12.13.3]