اثر متقابل امواج فراصوت و شوری بر رشد و تولید متابولیت در سلول‌های *Dunaliella salina*

رقیه مخبری[۱]، آیت ا... رضایی[۲*] و علاءالدین کردنایبچ[۲]

[۱] گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، [۲*] گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹٤/۰۳/۲۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹٤/۰۸/۱۳)

چکیده:

دست‌ورزی کشت‌های سلولی با الیسیتورها یکی از روش‌های مهم جهت القای متابولیت‌های ارزشمند در بیوتکنولوژی گیاهی است. بدین منظور در این مطالعه اثر امواج فراصوت و تنش شوری بر رشد، تولید متابولیت‌های اولیه و ثانویه در کشت سلولی ریزجلبک *Dunaliella salina* مورد بررسی قرار گرفت. کشت‌های سلولی تحت اثر تیمارهای شوری با غلظت‌های ۲ و۳ مولار کلریدسدیم و امواج فراصوت (٤۰ کیلو هرتز) به‌مدت زمان ۲/۵، ۵ و۱۰ دقیقه و در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار قرار گرفت. شاخص‌های مورد اندازه‌گیری عبارت بودند از: رشد سلولی، محتوای پروتئین‌کل، رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل *a* و*b*، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها)، پتانسیل‌آنتی‌اکسیدانی، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، قندهای محلول، بتاکاروتن و گلیسرول. نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان تابش امواج فراصوت و غلظت شوری تعداد سلول‌ها و مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی کاهش یافت. در مقابل پروتئین‌کل، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای‌غشایی، مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، بتاکاروتن و گلیسرول افزایش یافت. بیشترین میزان بتاکاروتن و گلیسرول در شوری ۳ مولار و۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت به‌ترتیب ۱٤/۸ و ۱٦/۰۸ میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد. به‌نظر می‌رسد امواج فراصوت با تقویت اثر شوری پاسخ‌های دفاعی و تولید متابولیت‌های ثانویه را القا نمود و باعث افزایش مقدار بتاکاروتن و گلیسرول در سلول‌ها گردید.

کلمات کلیدی: امواج فراصوت، بتاکاروتن، *Dunaliella salina*، شوری، کشت سلولی، گلیسرول.

مقدمه:

طبق برآوردهای صورت گرفته در سال‌های اخیر، ارزش جهانی متابولیت‌های ثانوی مشتق شده از گیاهان دارویی رشد قابل توجهی داشت. اما به‌دلایل گوناگونی همچون کمبود فضای کافی برای رشد گیاهان و نبود همیشگی شرایط رشد مناسب برای آنها و از طرفی ارزش بالای اقتصادی و ارزش افزوده بالای متابولیت‌های ثانوی که در زمینه‌های دارویی، تغذیه‌ای، سوخت و کود دارند، دانشمندان به فکر گزینه‌ای جایگزین برای گیاهان برآمدند که با محدوده فضایی کم و شرایط نامناسب محیطی نیز بتوانند همان اثرات مفید استخراجی از گیاهان را به‌دست آورند و جلبک‌ها بهترین گزینه بودند. جلبک تک‌سلولی *Dunaliella salina* دارای مواد غذایی ضروری و ترکیباتی با خاصیت ضداکسیدانی و ضدسرطانی همچون ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، پلی ساکاریدها و موادمعدنی می‌باشد (Gomez *et al.*, 2003; Poppel and Goldbohm 1995. Amar 2004 ازجمله

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: arezaei@shahed.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در این جلبک کاروتنوئید می‌باشد، ازجمله کاروتنوییدهای موجود آلفاکاروتن، زاگزانتین، کریپتواگزانتین، لوتئین و دیگر رنگدانه‌های نارنجی یا قرمز که اصلی‌ترین آنها بتاکاروتن می‌باشد نیز از جلبک *D. salina* استخراج می‌شود (Borowitzka, 1990. Hadi *et al.*, 2008). القای تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویی در سلول‌ها، بخشی از پاسخ های دفاعی سلول‌ها می‌باشد که درپاسخ به محرک‌ها صورت می گیرد. از این رو تیمار سلول‌های جلبکی و گیاهی با چنین عواملی یکی از استراتژی‌های سودمند برای افزایش تولید متابولیت‌های مفید در کشت سلولی می‌باشد (Orenburg and Knorr, 1995).

امروزه امواج فراصوت با شدت و انرژی کم به‌عنوان الیسیتور فیزیکی یا غیرزیستی مورد توجه قرار دارند. اخیراً مطالعات پراکنده‌ای روی اثرات زیستی امواج فراصوت (Ultrasound) در کشت سلول گیاهی صورت گرفته اما در خصوص اثرات تحریک‌کنندگی آن در تولید متابولیت‌ها در سلول‌های جلبکی اطلاعات چندانی وجود ندارد. افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانوی در سلول‌های گیاهی توسط امواج فراصوت با انرژی کم، گزارش شده است (Wu and Lin, 2002. Wang *et al.*, 2006. Safari *et al.*, 2012). همچنین نشان داده شده است که امواج فراصوت با شدت و انرژی کم، طیف وسیعی از اثرات زیستی غیر کشنده داشته که از اهمیت بالقوه‌ای در بیوتکنولوژی برخوردار است. یکی از گسترده‌ترین اثرات غیرمخرب فراصوت روی سلول‌های زنده، افزایش در نفوذپذیری غشاء است که جذب ترکیبات خارجی و دفع فراورده‌های درون سلولی را توسط سلول‌ها افزایش می‌دهد. گزارش‌هایی مبنی‌بر تغییر در بیان ژن، افزایش فعالیت آنزیم‌ها و هورمون‌های خاص توسط تابش امواج فراصوت به سلول‌ها وجود دارد (Barton *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1987; Crisosto, 1996).

تحت اثر تنش شوری، تحریک سلول‌های گیاهی، تغییر در فرایندهای فیزیولوژیک و همچنین القای تولید متابولیت در آنها نشان داده شده است. جلبک *D. salina* برای حفظ فشار اسمزی درون سلولی خود بسته به غلظت نمک در محیط رشد تا ۵۰ درصد وزن خشک خود را به گلیسرول اختصاص می‌دهد (Oren, 2005; Hadi *et al.*, 2008). Borowitzka و همکاران (۱۹۹۰) و Cifuentes و همکاران (۱۹۹۶) ثابت کردند که افزایش شوری باعث تجمع کاروتنوئیدها در جلبک سبز *D.Salina* شده است. همچنین در تحقیقی Hadi و همکاران (۲۰۰۸) طی بررسی دو گونه جلبک *D. salina* و *D. viridis* جدا شده از تالاب گاو خونی تحت غلظت‌های مختلف نمک (۰/۱۷، ۱، ۲، ۳ و ٤ مولار) نشان دادند که شوری سبب کاهش رشد جلبک‌ها و افزایش میزان بتاکاروتن در جلبک *D. salina* گردید. Gilmour و همکاران (۱۹۸۲) نشان دادند که میزان فعالیت فتوسنتزی در جلبک *D. Salina* تحت تنش شوری کاهش یافت. غالباً یک اثر سینرژیستیک بین محرک‌ها یا الیسیتورهای مختلف در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه یا کشت‌های سلولی مشاهده می‌شود. به‌عنوان مثال، اولیگوساکاریدهای کیتین یا کیتوزان می‌توانند اثر متیل جاسمونات را در تولید پاکلی‌تاکسل (تاکسول) در سرخدار کانادایی(*T. Canadensis*) تقویت کرد (Linden and Phisalaphong, 2000). Umemura و همکاران (۲۰۰۲) مشاهده کردند که سربروزید گیاهی و N- استیل‌کیتوهگزاوز (N-acetylchitohexaose) به‌صورت سینرژیستیک تولید فیتوآلکسین را در کشت سلولی برنج تحریک کرد. همچنین رضایی و همکاران (۱۳۹۰) بیشترین تولید تاکسول را در کشت سلولی فندق تحت اثر تیمار همزمان امواج فراصوت و دی‌بوتیل‌فتالات نسبت به تیمارهای انفرادی به‌دست آوردند. با توجه به وجود اثر غالباً سینرژیستیک در برهم‌کنش عوامل محیطی بر سلول‌های گیاهی و کمبود اطلاعات در این خصوص، در این تحقیق کاربرد همزمان امواج فراصوت و شوری بر رشد و تولید متابولیت در ریزجلبک *D.Salina* مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت دو هفته از اعمال تیمار فراصوت اندازه‌گیری شاخص‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها:

شرایط کشت و رشد: مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی در

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

شرایط استریل به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع جانسون استریل(Johnson *et al.*, 1968)، با غلظت نمک دو مولار NaCl و اسیدیته ۷/۵ در ارلن مایرهایی با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر افزوده شد به طوری که تعداد سلول‌ها در هر ارلن مایر تقریباً ۳۰۰×۱۰^{۳} در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی بود. سوسپانسیون‌های تهیه شده جلبکی در انکوباتور در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بر روی شیکر با سرعت ۹۰ دور در دقیقه تحت تابش نور فلورسنت با شدت ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲ هفته که کشت‌های جلبکی در اواسط مرحلهٔ خطی دورهٔ رشد خود قرار گرفتند، تیمار فراصوت و شوری اعمال شد.

تیمار سلول‌ها با امواج فراصوت و شوری: برای به‌کارگیری امواج فراصوت در دامنه های کیلوهرتز پایین، از یک سیستم حمام اولتراسونیک (FALC Instruments, Italy) با فرکانس ۴۰ کیلو هرتز و پهنای باند ۳۲۰ هرتز به‌صورت پیوسته مطابق روش Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) استفاده گردید. امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلو هرتز و توان W/cm^3 ۵، در مدت زمان‌های ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ دقیقه و تیمار شوری با غلظت ۲ و۳ مولار، در روز چهاردهم واکشت سلول‌ها به کشت‌های سلولی در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار اعمال شد (با توجه به‌اینکه جلبک *D. salina* در محیط فاقد شوری به علت عدم انجام تعادل اسمزی قادر به رشد نبوده و از بین میرود، لذا سطح شوری صفر بررسی نگردید) (شکل ۱). سطح آب در داخل حمام اولتراسونیک حدوداً یک سانتیمتر بالاتر از سطح محیط کشت درون ارلن‌ها بود. کشت‌های سلولی مجددا در شرایط قبلی قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲ هفته از تاریخ اعمال تیمارها، از کشت‌ها جهت اندازه‌گیری شاخص‌های مختلف نمونه‌برداری شد.

رشد: توسط سمپلر از هر نمونهٔ جلبکی ۳۰ میکرولیتر برداشته شد و روی لام مخصوص شمارش (لام نئوبار) ریخته شد و زیرمیکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰ سلول‌ها شمارش گردید (Schoen, 1998). تعداد سلول‌های موجود در ۱۰ مربع از این لام شمارش شده و میانگین آن ثبت گردید. از آنجایی که سلول‌ها متحرک بودند سلول‌های موجود در نمونه قبلاً توسط بلورید بی‌حرکت شدند.

کلروفیل و کاروتنوئید کل: مقدار کلروفیل a و b، کلروفیل کل(a+b) و کاروتنوئیدها با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری گردید. ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی به مدت ۱۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد. بر روی رسوب سلولی باقی‌مانده ۵ میلی‌لیتر استون ۸۵٪ ریخته شد و بعد از هم‌زدن در تاریکی به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. مخلوط حاصل مجدداً به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان جذب نور محلول رویی در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۴ و ۴۵۲ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد. به کمک رابطه‌های زیر میزان کلروفیل a ، b و کاروتنوئید بر حسب میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد (Frank and Wingman, 1979).

$$C\,chla = 10.3 \times E633 - 0.918 \times E644$$
$$C\,chlb = 19.7 \times E644 - 3.87 \times E633$$
$$C\,car = 4.20 \times E452.5 - 0.0264 \times C\,chl.a - 0.496 \times C\,chl.b$$

E: مقدار جذب نور در طول موج مورد نظر میباشد.

ترکیبات فنلی: پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی سانتریفیوژ شد. پس‌از اتمام سانتریفیوژ مایع رویی در ظرف جداگانه برای اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی خارج سلولی نگهداری شد. مقدار ۱/۲۵ میلی لیتر از معرف Folin-cicolteu رقیق شده (۱/۱۰) و ۱ میلی لیتر کربنات سدیم ۷٪ به رسوب سلولی و ۰/۵ میلی لیتر از مایع رویی نمونه‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها به‌مدت نیم ساعت در حرارت ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در انتها میزان جذب مایع رویی در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد و مقدار کل ترکیبات فنلی با استفاده از استاندارد اسید سالیسیک تعیین شد.

پروتئین: مقدار پروتئین به‌روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه گیری گردید. برای تعیین غلظت پروتئین‌های سلول جلبک، ۱ میلی‌لیتر از کشت سلولی نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]



شکل۱- کشت سلولی جلبک *Dunaliella salina* تحت اثر تیمار تلفیقی شوری (۲ و ۳ مولار) و امواج فراصوت (۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ دقیقه).

دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب سلولی بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار (pH ٦/۸) اضافه شد. برای متلاشی شدن سلول‌های جلبک و تسهیل در خروج پروتئین‌های داخل سلول‌ها، سوسپانسیون‌های سلولی به‌مدت ۱۵ دقیقه در معرض امواج فراصوت با فرکانس ٤۰ کیلوهرتز قرار داده شد. پس از انجام سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و به آن ۱ میلی‌لیتر محلول برادفورد اضافه شد. مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) قرائت شد و در انتها با استفاده از نمودار استاندارد آلبومین سرم گاوی غلظت پروتئین نمونه‌ها به‌دست آمد.

فلاونوئیدکل: برای سنجش فلاونوئیدها ابتدا ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی با سرعت ٦۰۰۰ هزار دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی دور ریخته شد. به سلول‌های باقی مانده به نسبت ۹۹ به ۱ اتانول و اسید کلریدریک اضافه گردید. نمونه‌ها به‌مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با فرکانس ٤۰ کیلوهرتز قرار گرفته شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از خنک شدن، نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ٦۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. میزان جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد و مقدار فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد آپی‌ژنین محاسبه گردید (Djeridane *et al.*, 2006).

قندهای محلول: یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های جلبکی با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و به سلول‌های جلبکی باقی‌مانده ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵٪ و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸٪ اضافه گردید. نمونه‌ها به‌مدت نیم ساعت در معرض امواج‌فراصوت با فرکانس ٤۰ کیلوهرتز قرار گرفته شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز ترسیم گردید. جذب نوری نمونه‌ها و استانداردها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) در طول موج ٤۹۰nm اندازه‌گیری شد (Dubois, 1956).

آنتوسیانین کل: ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های سلولی به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و ۳ میلی لیتر متانول اسیدی (شامل متانول و اسید کلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱) به آن اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با فرکانس ٤۰ کیلوهرتز قرار گرفته شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی نمونه‌ها برداشته شد و نمونه‌ها به‌مدت یک شب در تاریکی قرار داده شدند و در انتها جذب آنها در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد. برای محاسبهٔ غلظت آنتوسیانین، از ضریب خاموشی $۳۳۰۰۰ M^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد (Mazurkas *et al.*, 2003).

تعیین سطح پراکسیداسیون لیپیدهای غشائی: مقدار آسیب به غشاءها با اندازه‌گیری مقدار مالونیل دی آلوئید (MDA) به عنوان فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء تعیین شد. پنج میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و به نمونه‌ها ۳ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ اضافه شد. پس از هم‌زدن نمونه‌ها آنها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با قدرت ۱۰۰ و فرکانس ٤۰ کیلوهرتز قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ ۱ میلی لیتر از هرکدام از نمونه‌ها برداشته شده و به آنها ۱ میلی لیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۲۵٪ اضافه شد و سپس به مدت نیم ساعت نمونه‌ها در دمای ^{O}C ۱۰۰ قرار داده شدند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، در طول موج های ۵۳۲ nm و ۶۰۰ nm مقدار جذب توسط اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) اندازه‌گیری گردید و مقدار MDA به‌کمک ضریب خاموشی $155 mM^{-1}cm^{-1}$ محاسبه گردید (De Vos *et al.*, 1991).

پتانسیل آنتی‌اکسیدانی: دو میلی لیتر از سوسپانسیون‌های سلولی به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب سلولی ۲ میلی لیتر اتانول اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفته شد. به نمونه‌ها ۰/۸ میلی لیتر DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ۰/۳ میلی-مولار اضافه شد. بعد از گذشت نیم‌ساعت و انجام واکنش میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها در طوح موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد. درصد فعالیت آنتی اکسیدانی طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$AA\% = 100 - \left[\frac{\text{A نمونه} - \text{A بلانک} \times 100}{\text{A کنترل}}\right]$$

محلول بلانک: ۰/۸ میلی لیتر اتانول + ۲ میلی لیتر از نمونه و محلول کنترل: ۸ /۰ میلی لیتر DPPH + ۲ میلی لیتر اتانول.
A: جذب نور

بتاکاروتن: یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی هرکدام از نمونه‌های جلبک به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول‌رویی دور ریخته شد و به‌نسبت ۲ به ۱ هگزان و اتانول به رسوب باقی مانده اضافه شد. به‌مدت ۱ دقیقه نمونه‌ها با ورتکس شدیداً هم‌زده شدند و سپس مجدداً به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه نمونه‌ها سانتریفیوژ گردید. با جدا کردن فاز رویی (هگزان) و خواندن جذب در ۴۵۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) میزان بتاکاروتن سلول‌ها از طریق فرمول زیر به دست آمد (Jaspers, 1965).

$$\beta - Carotene\ (\mu g/ml) = 25.2 \times A450$$

گلیسرول: پنج میلی‌لیتر از نمونه جلبکی به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی پس از سانتریفیوژ دور ریخته شد، به‌این‌ترتیب گلیسرولی که از قبل درون نمونه بوده خارج گردید. به سلول‌های باقی مانده به‌میزان ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت جانسون اضافه شد. چند ثانیه نمونه‌ها به‌آرامی تکان داه شد، سپس میزان ۲۰۰ میکرولیتر نمونهٔ جلبکی جدا و به آن ۱ میلی لیتر پریودات و ۲/۵ میلی لیتر استیل استن افزوده گردید و به آرامی تکان داده شد. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجهٔ سانتی گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها مجدداً به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن میزان جذب نور مایع رویی در طول موج ۴۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد و به‌وسیله رسم منحنی استاندارد غلظت گلیسرول محاسبه شد (Chitlaru and Pick, 1989).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این تحقیق توسط آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها به‌روش دانکن با استفاده از نرم افزار SAS و Excel 2010 انجام شد.

نتایج و بحث:

هدف از انجام این آزمایش، ارزیابی اثر امواج فراصوت و شوری بر رشد و تولید متابولیت در کشت سلولی جلبک *D. salina* بود نتایج تجزیه واریانس اثر امواج فراصوت و شوری بر کشت سلولی جلبک *D. salina* در جدول ۱ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود تاثیر زمان‌های مختلف تابش امواج فراصوت و شوری و اثرات متقابل آنها بر صفات اندازه گیری شده معنی‌دار بود.

رشد سلولی: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت شوری و زمان تابش امواج فراصوت از تعداد سلول‌ها کاسته شد. بیشترین تعداد سلول‌ها در تمامی تیمارها مربوط به شوری ۲

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر امواج فراصوت و شوری بر کشت سلولی D. salina.

منابع تغییرات	DF	بتاکاروتن	فنل خارج سلول	پتانسیل آنتی اکسیدانی	فلاونوئید ۳۳۰nm	فلاونوئید ۳۰۰ nm	فلاونوئید ۲۷۰ nm	پروتئین	تعداد سلول
تکرار	۲	۳/٦۳۰۵^{ns}	۰/۳٦۷۵^{ns}	۰/۸۲۵۱^{ns}	۱/۲٤۳۱^{ns}	۳۳/٤۸۰^{ns}	۳/۵۷٤^{ns}	۲۸/٤۲۳^{ns}	۷٤٤٦۵٦۱۰٤/۲^{ns}
شوری	۱	۹۷/۳۰۷۰**	۲۳۱/٦۵۹۸**	۹/٦۸٦۸^{ns}	۱٤۲/۲٦۹**	۲۸/۷۲۳۳**	۱٤۰/٦۸۸**	۱۷۲۲/۹۱٤**	٤۵۸۷۱۳۵۰۰۰۰۰**
فراصوت	۳	۲۲/۱۹٤٦**	۱٤/۵۰٤۱**	۲٦٤/۵۰۱**	٤۸/٦۸۲**	۱۰۹/۵٦۰۷**	۲۹۰/۸۳۳**	۱۳۰/٤۲۱**	۲٤۵٦۹۹۲۵۰۰**
فراصوت x شوری	۳	۰/۷۰۲٦**	۲/۷۷٤۸**	۵۰/٦۵۲۲**	۰/٤٤۷۲**	٦/۰۹۹٦**	۲۵/٤۳۵**	۲۷/۷٦۵**	۱٤۱۳۹۲۰۲۷۷۷۸**
خطا	۱٤	۰/٦۵۸٤	۰/۹۱٤۰	۲/۱٤۹۵	۲/۸۰۰۱	۷/۸٤۵۰	۳/۳٦۸	۳/٤٦٤	۸۹۳٤۸۷٤٦۲۸
CV		۸/۱۹۱۰	٦/۳۹۹۷	۲/۱۱۲۳	۱۳/۵۳۲۲	۲۱/۰۸٤	۷/۹۷۲	٤/۸۰۹	۱۰/۰۹۹٦۷

$^{**, ns}$ به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۱٪

ادامه جدول ۱-

منابع تغییرات	DF	آنتوسیانین	کلروفیل کل×$۱۰^{۳}$	کلروفیل a ×$۱۰^{۳}$	کلروفیل b ×$۱۰^{۳}$	کاروتنوئید ×$۱۰^{۳}$	فنل درون سلولی×$۱۰^{۳}$	گلیسیرول	قند محلول	MDA
تکرار	۲	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۳^{ns}	۰/۰۵^{ns}	۰/۰۰۲ ^{ns}	۰/۰۰۸ ^{ns}	۰/۰٤^{ns}	۱۰/٦۰۸^{ns}	۷۲٦/۸^{ns}	۰/۰۰۰۰۰۳^{ns}
شوری	۱	۰/۰۰۳**	۱٦٤/۷**	۷٤/٤**	۱۷/٦**	۱٦/۰**	۲۵٤۱/۰**	۹۸/٤۹۰**	۳۸۳۹٦/۹**	۰/۰۰۰۹۳**
فراصوت	۳	۰/۰۳۱**	۵۲/٤**	۲۸/۱۱**	٤/۰**	۹/۰**	۱۷۰۳/۰**	٤٦/۵۵٦**	۲۹۰۹۲/۵**	۰/۰۰۰۹٦**
فراصوت × شوری	۳	۰/۰۰۱**	۵/۰**	۲/٤**	۰/۵**	۱۰/۳**	۱٤٤/۰**	۱/۲٦۸**	۲۰۳۹/۸**	۰/۰۰۰۰۸**
خطا	۱٤	۰/۰۰۰۲	۲/۱	۱/۰	۰/۲	۰/۵	۲۰/۰	۰/۲٦۵	۲٦۹/٤	۰/۰۰۰۰۲
CV		۳/٤۵	۹/۵٦	۸/٦۰	۱۳/۸۲	۹/۱۰۹	۹/۸۸	۵/۳۲	۷/٦	۹/۹۸۰۸

$^{**, ns}$ به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۱٪

مولار و شاهد (زمان صفرتابش امواج فراصوت) بود که این تعداد در غلظت شوری ۳ مولار و زمان ۱۰ دقیقه تابش به کمترین مقدار یعنی نصف تعداد اولیه کاهش یافت. این کاهش را می‌توان این گونه توجیه کرد که سطوح بالای سدیم و کلر اثرات سمی مستقیمی بر سیستم‌های غشایی و آنزیمی سلول‌ها ایجاد می‌کند. و اینکه شوری ممکن است سبب کمبود عناصر ضروری و عدم تعادل یونی در سلول‌ها شده و از این‌طریق مانع رشد و تکثیر سلول‌ها گردد. تنش شوری از طریق سمیت ناشی از املاح سدیم و کلر و مداخله با جذب عناصر معدنی خصوصاً پتاسیم مانع از رشد و تکثیر سلول‌ها می‌شود (Tester and Davenport, 2005). در شرایط شوری بالا، جذب پتاسیم توسط سلول‌ها در اثر رقابت با سدیم کاهش می‌یابد، به‌طوری‌که کاهش K^+ سبب کاهش فعالیت آنزیم‌ها، فتوسنتز، سنتز پروتئین و انتقال مواد می‌شود که این امر ممکن است منجربه آسیب به سلول‌ها شده و رشد کاهش یابد. ازطرفی تنش شوری منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده از این‌طریق تنش وارد شده به سلول‌ها را تشدید می‌کند (Orcutt and Nielsen, 2000). این اثرات سبب کاهش فعالیت‌های متابولیکی از جمله فتوسنتز شده و از رشد سلول‌ها در محیط‌هایی با شوری بسیار بالا می‌کاهد (Marschner, 1995. Greenway and Munds, 1980). برطبق بررسی‌های معین و شریعتی (۱۳۸۹) در اثر همزمان سالیسیک

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

اسید و تنش شوری برروی رشد و تقسیم سلولی *D. salina*، مشخص شد که تنش شوری باعث کاهش تراکم سلولی و تعداد سلول‌ها در این جلبک می‌شود. در مطالعات انجام شده توسط Jahnke و White (۲۰۰۳) که سرعت تقسیم سلولی را تحت تأثیر شوری‌های مختلف (بین ۰/۰۵ تا ۳ مولار) بر جلبک *D.tertiolecta* مورد بررسی قرار دادند ، مشاهده نمودند که با افزایش غلظت شوری از سرعت رشد این جلبک کاسته می‌شود. از طرفی به کارگیری امواج‌فراصوت در خصوص کشت‌های تعلیقی سبب ایجاد وقایع هیدرودینامیکی پرانرژی نظیر حفره‌زایی آکوستیک (Acoustic cavitation) و جریانات میکروسکوپی (Microstreaming) می‌شود که باعث آسیب‌های مکانیکی و تنش برشی (Shear stress) به سلول‌ها می‌شود (Wu and Lin, 2002).بنابراین احتمال وجود تنش‌های مکانیکی در اثر امواج فراصوت وجود داشته که رشد سلول‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در ارتباط با اثر امواج فراصوت بر سلول گزارش شده است که افزایش مدت زمان تیمار امواج فراصوت با کاهش رشد و زنده بودن در سلول‌های گیاهی همراه بود (Liu *et al.*, 2003). برطبق مشاهدات Wang و همکاران (۲۰۰۶)، تابش امواج فراصوت به سلول‌های سرخدار (*Taxus yunnanensis*) منجربه کاهش محسوس درصد زنده بودن سلولی گردید. از طرفی تابش کوتاه مدت فراصوت اثر معنی‌داری روی تولید زی‌توده در کشت سلولی سرخدار (*Taxus chinensis*) نداشت (Wu and Lin, 2003). بر هم کنش شوری با فراصوت باعث تقویت اثر آنها روی صفات مورد بررسی گردید. باتوجه به‌اینکه هر یک از آنها در حالت انفرادی به‌صورت نوعی تنش سلول‌ها را از نظر رشد و زنده بودن تحت تاثیر قرار دادند به‌نظر می‌رسد در حالت ترکیبی اثر آنها تجمیع پیدا کرده و یا اثر همدیگر را تقویت کرده و بنابراین به‌صورت موثرتر منجر به کاهش صفت مورد بررسی گردیدند.

محتوی پروتئین: طبق نتایج به‌دست آمده در جدول ۲ میزان پروتئین سلول‌های جلبک با افزایش غلظت شوری و افزایش زمان تابش امواج فراصوت بیشتر شد. در غلظت نمک‌های ۲و۳ مولار با افزایش زمان تابش امواج فراصوت تا زمان ۱۰ دقیقه، میزان پروتئین افزایش یافت. مقدار غلظت پروتئین سلول‌ها در غلظت شوری ۳ مولار و ده دقیقه تابش امواج-فراصوت، ۲/۲۵ برابر میزان آن در شوری دو مولار و زمان شاهد بود. در زمان‌های ۲/۵ و ۵ دقیقه و ۱۰ دقیقه تابش امواج‌فراصوت در غلظت شوری ۳ مولار به یک‌میزان افزایش مشاهده شد. افزایش محتوای پروتئین سلول‌ها در غلظت‌های شوری بالا می‌تواند به علت القای پروتئین‌های متعدد باشد که یا در پاسخ به تنش شوری ممکن است به‌طور جدیدی ساخته شوند، به‌طور مثال اسید آمینه متیونین به تنش اکسیداتیو بسیار حساس بوده و اکسایش متیونین به متیونین سولفواکسید (Met so) منجربه تغییر فعالیت آن و تشکیل بسیاری از پروتئین‌ها می‌شود (Davies, 2005) و یا به‌طوری نهادین در غلظت‌های پایین وجود داشته و هنگامی که سلول‌ها در معرض شوری قرار می‌گیرند، غلظت آنها افزایش می‌یابد، و اینکه طبق نتایج بدست آمده در گذشته امواج فراصوت با شدت پایین بیوسنتز پروتئین‌ها را در سلول‌ها و پروتوپلاست‌های چغندر قند افزایش داد (Joersbo and Rundstedt, 1992). همچنین امواج فراصوت به عنوان یک الیسیتور باعث تحریک ژن‌ها شده و به دنبال آن منجربه افزایش پروتئین‌ها و آنزیم‌های سیگنال و تولید متابولیت‌های ثانوی شده، به‌صورتی‌که با تابش امواج فراصوت بر سلول‌های بنیادی گل داوودی محتوای RNA افزایش یافت و در پی‌آن محتوای پروتئین محلول نیز افزایش یافت. بین میزان RNA و پروتئین ضریب هم‌بستگی ۹۸٪ وجود دارد (Liu *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008) در مورد اثرات همزمان شوری و فراصوت بر سلول‌ها هنوز تحقیق و پژوهشی انجام نگرفته. کاربرد هم‌زمان این دو استرس باعث تجمیع اثرات آن‌ها بر سلول شده و منجر به پاسخ قویتری از سلول‌ها شد.

کلروفیل: نتایج مربوط به پاسخ کلروفیل به تیمارها در جدول۲ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در غلظت شوری ۲ مولار و فقدان امواج فراصوت مقدار کلروفیل کل با اختلاف معنی‌دار نسبت‌به بقیه تیمارها در بیشترین مقدار

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

جدول ۲- اثر متقابل فراصوت و شوری بر رشد و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی در کشت سلولی *D. salina*.

شوری (M)	فراصوت (دقیقه)	تعداد سلول (cell/ml)	پروتئین (ng/cell)	کلروفیل *a* (ng/cell)	کلروفیل *b* (ng/cell)	کلروفیل کل (ng/cell)	کاروتنوئید (ng/cell)
۲	۰	۱۵۹۱۶۶۷^{a}	۲۱/۸۹۹^{e}	۰/۵۲۹۸^{a}	۰/۱۸۱۰۵^{a}	۰/۷۱۰۸۵^{a}	۰/۱۸۶۱۳^{d}
	۲/۵	۹۹۷۵۰۰^{b}	۳۰/۳۲۱^{d}	۰/۴۲۷۳۹^{b}	۰/۱۵۳۶۱^{ab}	۰/۵۸۱^{b}	۰/۱۹۳۵۰^{d}
	۵	۸۹۹۱۶۷^{bc}	۳۰/۲۵۷^{d}	۰/۴۱۷۸^{b}	۰/۱۴۰۳۲^{bc}	۰/۵۵۸۱۲^{cd}	۰/۲۵۲۷۶^{bc}
	۱۰	۸۰۸۳۳۳^{cd}	۳۸/۴۱۶^{c}	۰/۳۳۲۴^{cd}	۰/۰۹۹۳۳^{de}	۰/۴۳۱۷۳^{de}	۰/۲۵۷۶۶^{bc}
۳	۰	۸۵۶۶۶۷^{bcd}	۴۳/۲۹۱^{b}	۰/۳۷۸۴^{bc}	۰/۱۱۲۷۹^{cd}	۰/۴۹۱۱۹^{bc}	۰/۲۱۹۰۵^{cd}
	۲/۵	۸۳۴۳۳۳^{bcd}	۴۸/۲۲۸^{a}	۰/۳۵۴۳^{c}	۰/۰۹۳۴۴^{def}	۰/۴۴۷۷۴^{de}	۰/۲۶۹۸۴^{b}
	۵	۷۸۶۶۶۷^{cd}	۴۷/۶۷۸^{a}	۰/۲۷۶۹^{de}	۰/۰۸۳۰۳^{ef}	۰/۳۵۹۹۳^{e}	۰/۲۷۷۰۴^{b}
	۱۰	۷۱۳۰۰۰^{d}	۴۹/۴۷۹^{a}	۰/۲۵۲۱^{e}	۰/۰۶۷۹۸^{f}	۰/۳۲۰۰۸^{c}	۰/۳۳۲۳۵^{a}

حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

ادامه جدول ۲

شوری(M)	فراصوت (دقیقه)	قندهای محلول (pg/cell)	MDA (pM/cell)	فلاونوئید (270 nm) (pM/cell)	فلاونوئید (300 nm) (pM/cell)	فلاونوئید (330 nm) (pM/cell)
۲	۰	۱۰۶/۸۰^{g}	۰/۰۱۹۳^{f}	۸/۵۳^{d}	۵/۵۷۵^{c}	۶/۰۸۹^{f}
	۲/۵	۱۵۶/۵۱^{f}	۰/۰۳۵۰^{e}	۲۰/۴۹۴^{c}	۱۲/۵۹۹^{ab}	۹/۵۶۴^{e}
	۵	۲۰۵/۲۵^{cd}	۰/۰۴۸۸^{bcd}	۲۴/۱۶۴^{b}	۱۴/۰۴۴^{a}	۱۰/۷۸۶^{de}
	۱۰	۲۳۰/۲۵^{c}	۰/۰۵۴۹^{b}	۲۹/۲۰۷^{a}	۱۶/۵۴۱^{a}	۱۳/۲۸۶^{bcd}
۳	۰	۱۷۲/۳۲^{ef}	۰/۰۴۲۳^{de}	۱۷/۵۸۴^{c}	۸/۳۶۹^{bc}	۱۱/۶۸۸^{cde}
	۲/۵	۱۹۵/۶۳^{de}	۰/۰۴۶۵^{dc}	۲۷/۶۹۹^{a}	۱۶/۱۵۱^{a}	۱۴/۰۹۴^{bc}
	۵	۲۹۴/۶۵^{b}	۰/۰۵۳۹^{bc}	۲۷/۴۴۶^{a}	۱۷/۲۵۳^{a}	۱۵/۱۶۷^{b}
	۱۰	۳۵۶/۱۹^{a}	۰/۰۶۵۱^{a}	۲۹/۰۳۷^{a}	۱۵/۷۴^{a}	۱۸/۲۵۳^{a}

حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

قرار داشت. در مجموع برطبق نتایج بدست آمده با افزایش مدت زمان تابش امواج فراصوت و غلظت شوری میزان کلروفیل به صورت معنی‌داری کاسته شد و تیمار امواج فراصوت باعث تشدید اثر شوری در روند کاهشی مشاهده شده گردید. این کاهش را می‌توان به کاهش تعداد سلول‌ها دراثر استرس حاصل از امواج فراصوت نسبت داد و اینکه در اثر استرس اکسیداتیو حاصل از امواج فراصوت ساختمان مولکول‌های درون سلولی و کلروپلاست از بین رفته و کاهش میزان کلروفیل *a*، *b* وکلروفیل کل را باعث شده است. ساختمان‌های درونی سلول‌های جلبک *D. salina* به‌دلیل داشتن کلروفیل و کلروپلاست و انجام فتوسنتز تا حدود زیادی شبیه به ساختمان درونی سلول‌های گیاهان می‌باشد. کاهش در غلظت کلروفیل یک نشانه بارز از تنش اکسیداتیو است (Egret and Tevin, 2002)، که ازهم‌پاشیدگی غشاء و کاهش کلروفیل از پیامدهای آن می‌باشد. کاهش کلروفیل می‌تواند حالتی از خوگیری سلول‌ها به تنش باشد چراکه امکان آسیب بیشتر به دستگاه فتوسنتز را با تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط زیادی انرژی کاهش می‌دهد (Jung, 2004). همچنین

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

با افزایش میزان شوری میزان کلروفیل کل و نیز مقدار کلروفیل*a* و کلروفیل*b* کاهش یافت. جریان یون سدیم (Na^+) پتانسیل غشاءِ را بهم می‌ریزد و جذب یون (CL^-) را تسهیل می‌کند. یون کلر موجب کاهش تولید ریبولوزبیس فسفات شده و از این طریق به جذب و مصرف گاز کربنیک و درنهایت انجام عمل فتوسنتز آسیب می‌رساند و درضمن Na^+ باعث تولید اشکال فعال اکسیژن می‌شود (Mahajan and Tuteja, 2005). برطبق نتایج تحقیقات سلمانی نژاد (۱۳۹۱) نشان داده شد که در *D. salina* با افزایش شوری و کاهش نور، میزان کلروفیل *a* به کمترین میزان خود رسید. هم‌چنین طبق بررسی‌های Nikokar و همکاران (۲۰۰٤) که تأثیر تنش شوری را بر روند رشد، رنگیزه‌ها و آسکوربات پراکسیداز جلبک *D. salina* مورد بررسی قرار دادند، به این نتیجه رسیدند که بیشترین میزان کلروفیل a در شوری ۲ مولار مشاهده شد و با افزایش شوری تا سطح ٤ مولار میزان کلروفیل کاهش یافت. در طی تحقیقی توسط معین و شریعتی (۱۳۸۹) اثر همزمان سالیسیک اسید و تنش شوری بر روی رشد، تقسیم سلولی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و مقدار بتا- کاروتن در جلبک *D. salina* مورد بررسی قرار گرفت و طبق نتایج بدست آمده نشان داده شد که تنش شوری و سالیسیک اسید به‌علت کاهش در تراکم سلولی، کاهش میزان کلروفیل را در پی داشت. همچنین در ارزیابی ارقامی از سورگوم، گیاهان در شرایط تنش شوری، کاهش میزان کروفیل کل، کروفیل *a* و *b* در نمونه‌های مورد آزمایش گزارش شده است (یارنیا، ۱۳۸٦). برهم‌کنش شوری با فراصوت باعث تقویت اثر آنها روی مقدار کلروفیل کل گردید. با توجه به‌اینکه هر یک از آنها در حالت انفرادی به صورت نوعی تنش سلول‌ها را تحت تاثیر قرار دادند در حالت ترکیبی اثر همدیگر را تقویت کرده و بنابراین به صورت موثرتر منجر به کاهش کلروفیل *b*،*a* و کل شدند.

کاروتنوئید: بررسی میزان کاروتنوئید موجود در سلول‌ها در تیمارهای مختلف (جدول ۲) نشان داد که با افزایش غلظت شوری وافزایش زمان تابش امواج فراصوت بر میزان این ترکیبات افزوده شد. بیشترین میزان کاروتنوئید در سلول‌های تیمار شده با شوری ۳ مولار و زمان ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت و کمترین آن در تیمار شوری ۲ مولار و فقدان امواج فراصوت اندازه گیری گردید. کاروتنوئیدها گروه بزرگی از مولکول‌های ایزوپرونوئید هستند که توسط اندام‌های فتوسنتزی ساخته می‌شوند(Andrew *et al.*, 2008) ، که یکی از رنگیزه‌های کلیدی و مهم سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاهان هستند، امّا آنها به تخریب اکسیداتیو بسیار حساس می‌باشند. برطبق نتایج بدست آمده در این آزمایش با افزایش زمان تابش امواج فراصوت و افزایش غلظت NaCl میزان کاروتنوئید سلول‌ها کاسته شد. برطبق مشاهدات Nikokar و همکاران (۲۰۰٤) که تأثیر شوری بر روند رشد و رنگیزه‌ها و آسکوربات پراکسیداز را در جلبک *D. salina* بررسی کردند، بیشترین مقدار رنگیزه‌ها و کاروتنوئید در روز بیست و هشتم رشد و در شوری ۲ مولار مشاهده شد. با استفاده از نتایج بدست آمده از تحقیقات Orset و Young (۲۰۰۰) که بر روی تأثیر شوری بر بیوسنتز رنگیزه‌ها در جلبک *D. salina* بین ۰/٤ تا ۳/۵ مولار انجام شده بود، نشان داده شد که مقدار کاروتنوئید تولید شده از رابطهٔ خاصی تبعیت نمی‌کند و Gomez و همکاران (۲۰۰۳) نیز این نتایج را اذعان کردند. تابش امواج فراصوت در زمان-های بیشتر به‌عنوان یک تنش اکسیداتیو برای سلول به شمار می‌رود و سلول با افزایش میزان کاروتنوئید درون سلولی خود به‌عنوان آنتی‌اکسیدان به مقابله با تنش می‌پردازد. تابش امواج فراصوت بر سلول‌های جلبک *Porphyridium ceruentum* باعث افزایش میزان ۲۷٪ در کاروتنوئید سلول‌ها گردید و کاروتنوئیدها درجلوگیری ازتنش اکسیداتیو در سلول‌ها عمل کردند (Chen *et al.*, 2008).

قندهای محلول: بر طبق نتایج مندرج در جدول ۲، در سلول‌های جلبک افزایش زمان تابش امواج فراصوت و شوری باعث شد، افزایش معنی‌داری در مقدار قندهای محلول سلول‌ها نسبت به گروه شاهد مشاهده شود. به‌صورتی‌که بیشترین مقدار قندهای محلول در سلول‌هایی مشاهده شد که به‌مدت زمان ۱۰ دقیقه در معرض تابش امواج فراصوت و درغلظت شوری ۳ مولار قرار گرفته بودند .این میزان تقریبا ۳/۳ برابر مقدار

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

قندهای محلول مربوط به سلول‌های تحت تیمار شوری با غلظت ۲ مولار در گروه شاهد بود. با افزایش زمان تابش امواج فراصوت تا زمان ۱۰ دقیقه در هر دو گروه غلظت شوری ،افزایش معنی‌داری در میزان قندهای محلول مشاهده شد که البته در شوری با غلظت ۳ مولار این مقدار افزایش بیشتر داشت یعنی عامل دیگری که در افزایش میزان قندهای محلول سلول‌ها تاثیر داشت غلظت شوری محیط کشت بود. این واقعه را می‌توان این‌طور توجیه کرد که تجمع قندهای محلول در تنظیم اسمزی سلول‌ها و تسهیل جذب آب نقش مهمی را بر عهده دارد (Pessarakli, 1999). همچنین تحت تنش شوری تجمع قندها به‌همراه محلول‌های سازگار دیگر به پایداری غشاء سلولی و پروتئین‌ها کمک می‌کند (Sanchez *et al.*, 1998). گاهی در تنظیم اسمزی در هنگام بروز تنش شوری مولکول‌های پلیمری به مولکول‌های کوچک شکسته می‌شوند، به‌عنوان مثال نشاسته به ساکارز و سپس به مولکول‌های کوچک‌تری مانند گلوکز و فروکتوز تبدیل می‌شوند. بنابراین افزایش در غلظت قندهای محلول ممکن است نتیجهٔ تجزیه نشاسته باشد (Fischer and Hull, 1991). گرچه اثر شوری بر این صفت در جلبک بررسی نشده است ولی در گیاهان وجود کلرید سدیم و نمک باعث افزایش قندهای محلول در جو و گوجه فرنگی شده است (El Tayeb, 2005). همچنین افزایش و تجمع قندهای محلول سلول‌ها در تنش‌های شوری و خشکی گزارش شده است (Dubey and Singh, 1999. Binzel *et al.*, 1989). برطبق این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که برهم‌کنش شوری با فراصوت باعث تقویت اثر آنها روی افزایش قندهای محلول شد.

پراکسیداسیون لیپیدها: طبق اعداد درج شده در جدول ۲ با افزایش زمان تابش امواج فراصوت و افزایش غلظت شوری محیط از ۲ مولار به ۳ مولار، افزایش معنی‌داری در میزان MDA و نشت الکترولیت‌ها از سلول‌ها در مقایسه با نمونه‌های شاهد دیده شد. میزان MDA و هدایت الکتریکی سلول‌ها در زمان ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت در غلظت شوری ۳ مولار اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت و بیشترین میزان (۳ برابر گروه شاهد) را به خود اختصاص داد. در تنش‌های اکسیداتیو که توسط استرس حاصل از الیسیتورها بر سلول ایجاد می‌شود، پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید تشکیل می‌شود، رادیکال‌های ایجاد شده باعث پراکسیداسیون غشاء شده و ساختار پروتیئن‌های غشائی را تغییر می‌دهند (Wang, 1999)، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و افزایش مالون دی‌آلدهید به‌عنوان محصول نهایی این اکسیداسیون نشان دهنده تخریب و افزایش نفوذپذیری غشاء سلول‌ها است (Plazek and Zur, 2003. Zhou *et al.*, 2011). در تحقیقات انجام شده در گیاهان، تنش شوری باعث افزایش سطح مالون دی‌آلدهید در جو و در دو گونه از چغندر شده است (El tayeb, 2005). افزایش سطح مالون‌دی‌آلدهید در تنش خشکی در ذرت مشاهده شده است (Li *et al.*, 1998). همچنین امواج فراصوت با انرژی کم در کشت سلولی تعلیقی سرخدار چینی (*T. chinensis*) باعث القای پراکسیداسیون لیپید گردید (Wu and Gee, 2004) و همچنین در تحقیقات Rezae و همکاران (۲۰۱۱) مشخص شد که امواج فراصوت به همراه متیل جاسمونات باعث افزایش در تولید مالون‌دی‌آلدهید در سلولهای فندق شد. در تحقیقی که توسط Wu و Lin (۲۰۰۲) انجام شد، تابش امواج فراصوت بر سلول‌ها ، باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در داخل و خارج سلول‌ها و به دنبال آن افزایش MDA شد. همچنین افزایش محتوای مالون دی‌آلدهید(MDA) و یک افزایش ٤٨/٦٪ در نشت الکترولیت‌ها در سلول‌های جلبک قرمز (C*ruentum porphyridium*)، پس از تابش امواج فراصوت مشاهده شد (Chen *et al.*, 2008). با توجه به‌اینکه هر یک از این استرس‌ها در حالت انفرادی به‌صورت نوعی تنش سلول‌ها را تحت تاثیر قرار دادند در حالت ترکیبی اثر همدیگر را تقویت کرده و بنابراین به‌صورت موثرتر منجربه افزایش میزان MDA شدند.

فلاونوئید: برطبق نتایج درج شده در جدول ۲ میزان فلاونوئید سلول‌های جلبک *D. salina* در طول موج ۲۷۰ نانومتر در غلظت شوری دو مولار با افزایش زمان تابش امواج فراصوت تا زمان ۱۰ دقیقه به صورت معنی‌داری افزایش یافت. همچنین میزان فلاوونوئید اندازه‌گیری شده سلول‌ها در غلظت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

شوری ۳ مولار در همهٔ زمان‌های تابش نسبت به شاهد افزایش یافت (البته میزان فلاونوئید موجود در غلظت شوری سه مولار و زمان‌های ۲/۵و ۵ و۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت باهم تفاوت معنی‌داری نداشته و به یک میزان افزایش را نسبت به گروه شاهد از خود نشان دادند). در غلظت شوری ۲ مولار و زمان ۱۰ دقیقه و غلظت شوری ۳ مولار و زمان‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ دقیقه تابش، بدون داشتن اختلاف معنی‌دار بیشترین مقدار فلاوونوئید مشاهده شد. در مجموع با افزایش غلظت شوری و زمان تابش امواج فراصوت میزان فلاوونوئید سلول‌ها افزایش یافت.

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد با افزایش زمان تابش امواج فراصوت در هر دو غلظت شوری ۲ مولار و ۳ مولار نمک طعام افزایش معنی‌داری در میزان فلاوونوئید طول موج ۳۰۰ نانومتر، نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید. به‌طوری‌که در هر دو گروه شاهد، در غلظت‌های ۲ و ۳ مولار کمترین میزان فلاوونوئید و در بقیهٔ تیمارها (بدون داشتن اختلاف معنی‌دار) بیشترین میزان فلاوونوئید (تقریباً ۳ برابر شاهد)، دیده شد.

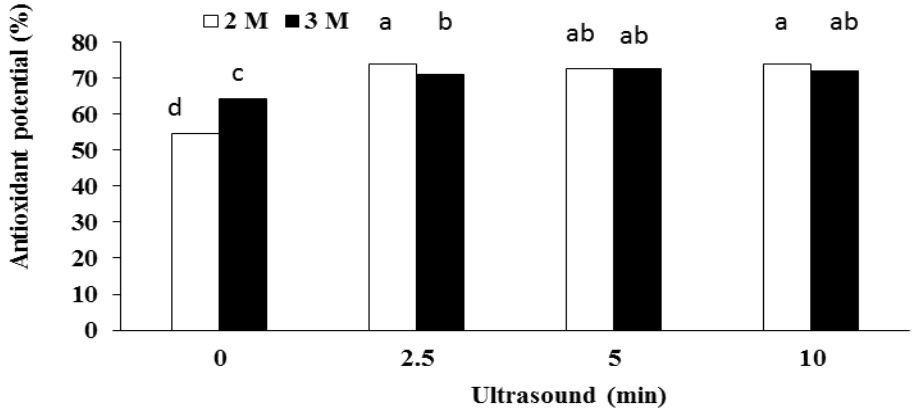
بر طبق نتایج مندرج در جدول ۱ با افزایش غلظت شوری و زمان تابش امواج فراصوت میزان فلاوونوئید در طول موج ۳۳۰ نانومتر افزایش یافت به‌طوری‌که با افزایش زمان تابش امواج فراصوت در هر دو غلظت شوری افزایش معنی‌داری در میزان فلاوونوئید در همهٔ تیمارها نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. در زمان شاهد و غلظت شوری ۲ مولار کمترین مقدار فلاوونوئید نسبت به سایر تیمارها وجود داشت و در شوری ۳ مولار و زمان ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت، (به میزان سه برابر۲مولار شاهد)، بیشترین میزان فلاونوئید مشاهده شد.

در مجموع برطبق نتایج به‌دست آمده میزان فلاونوئید محاسبه شده در هر سه طول موج ۲۷۰ و۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر با افزایش زمان تابش امواج فراصوت وغلظت شوری، افزایش یافت. سلول با استفاده از مکانیسم‌های آنزیمی وغیرآنزیمی می تواند غلظت گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهد و از این طریق از اثرات مخرب آن بکاهد. سلول‌ها با افزایش ترکیبات فلاونوئیدی به عنوان ترکیبات غیرآنزیمی از گروه آنتی اکسیدان‌ها در شرایط استرس، از اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن می‌کاهند (Blazek and Zur, 2003). القای تولید این ترکیبات با توجه به افزایش میزان پراکسید هیدروژن و مالون دی‌آلدیید (MDA) در سلول‌ها جهت محافظت از اجزای سلولی، اسیدهای چرب غیراشباع، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک که از اهداف مهم گونه‌های فعال اکسیژن بوده و همچنین پیشگیری از اختلالات متابولیکی و سلولی منطقی به نظر می‌رسد (Martinez and Crayola, 1995). فعالیت بیولوژیک متنوع ترکیبات فلاونوئید از جمله آنتی اکسیدانی، آنتی میکروبی، ضدالتهاب و وازودیلاتور (گشاد کننده رگ‌ها) آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است (Jamshidi *et al.*, 2010). در کل در تنش‌های محیطی مانند زخم‌های مکانیکی، حملهٔ پاتوژن‌ها، تنش سرمایی، تنش نوری بالا، کمبود مواد غذایی و تنش‌های شوری، افزایش مقدار فلاونوئید در سلول‌ها گزارش شده است (Dixon and Pavia, 1995).

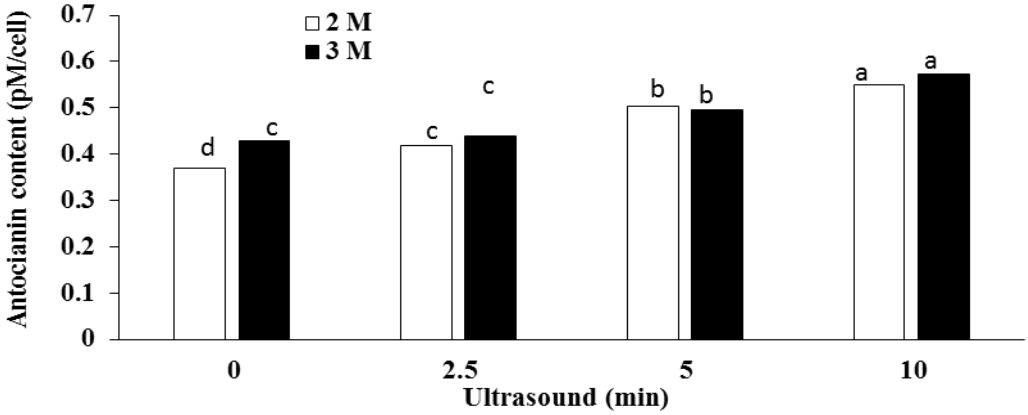
پتانسیل آنتی اکسیدانی: برطبق داده‌های بدست آمده در شکل ۲ مشخص شد که درصد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های جلبک دونالیلا سالینا در هر دو غلظت شوری نمک ۲ و۳ مولار NaCl در همهٔ تیمارها با افزایش زمان تابش امواج فراصوت نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. بدین صورت که در زمان‌های ۲/۵ و ۵ و ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت در هر دو غلظت شوری بدون داشتن اختلاف معنی دار، (به یک میزان افزایش)، بیشترین مقدار ترکیبات آنتی اکسیدانی مشاهده شد و اینکه کمترین میزان درصد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مربوط به غلظت ۲ مولار و تیمار شاهد فراصوت، بود. دراثر مواجه سلول‌ها با هرگونه تنش، ازجمله امواج فراصوت در سلول‌ها، گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن دارای نقش‌های متفاوت و دوگانه‌ای هستند به‌گونه‌ای که گاهی باعث تشدید خسارت به بافت وسلول‌ها می‌شوند و درمواقعی باعث فعال شدن مسیر علامت رسانی(سیگنالینگ) سلولی و بروز پاسخ‌های دفاعی می‌گردند. این پاسخ دفاعی در برخی موارد به شکل افزایش تولید

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]



شکل ۲- اثر متقابل امواج فراصوت و شوری بر پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در کشت سلولی *D. salina*. حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.



شکل ۳- اثر متقابل امواج فراصوت و شوری بر محتوی آنتوسیانین در کشت سلولی *D. salina*. حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

متابولیت‌های ثانوی مفید ازجمله ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می باشد (Date *et al.*, 2000). اثر امواج فراصوت بر تولید و افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در تحقیقات گذشته اثبات شده است (Holkova *et al.*, 2010. Komaraiah *et al.*, 2005). همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان سریعترین واحدهای مقابله کننده در برابر حمله اکسیژن‌های فعال در تنش شوری توسط محققان متعددی گزارش شده است(Parade and Das, 2005. Satyendra *et al.*, 1999).

آنتوسیانین: برطبق نتایج حاصل از شکل ۳ میزان آنتوسیانین سلول‌ها در هر دو غلظت شوری با افزایش زمان تابش امواج فراصوت به یک میزان افزایش یافت. میزان آنتوسیانین کل در غلظت‌های شوری ۲ مولار و ۳ مولار و در زمان ۱۰ دقیقه به یک میزان (بدون داشتن اختلاف معنی‌دار) از شاهد افزایش داشتند و بیشترین میزان آنتوسیانین را به خود اختصاص داده بودند. کمترین میزان آنتوسیانین که اختلاف معنی‌داری با بقیهٔ تیمارها نشان داد مربوط به غلظت شوری ۲ مولار و شاهد بود.

ترکیبات آنتوسیانینی ازجمله ترکیبات دفاعی بوده که سلول‌ها در زمان تنش افزایش می‌دهند. مطالعات ارتباط مثبتی بین مقدار این ترکیبات و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داده‌اند (Cain *et al.*, 2004). فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات اساساً به‌علت ویژگی‌های ردوکس آنها می‌باشد که سبب می گردد تا به‌عنوان عوامل احیا کننده، دهنده هیدروژن و خاموش کننده گونه‌های فعال اکسیژن نظیر H_2O_2 عمل نمایند. سلول‌ها تحت تنش شوری از دو عامل تنش اسمزی و اثرات اختصاصی

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

یون‌ها تأثیر می‌پذیرند. بنابراین تنش شوری از طریق القای اسمزی می‌تواند موجب القای تجمع آنتوسیانین‌ها گردد زیرا که آنتوسیانین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌های بالقوه‌ای می‌باشند (Cong *et al.*, 2008). تجمع آنتوسیانین‌ها در ریشه‌های ذرت (Kaliamoorthy and Rao, 1994)، آرابیدوپسیس (Mishra *et al.*, 1997) و عشقه (Murray, 1994) در استرس شوری گزارش شده است.

ترکیبات فنلی: میزان ترکیبات فنلی برون سلولی اندازه‌گیری شده در سلول‌های جلبک *D. Salina* (شکل ٤) نشان داد که با افزایش زمان تابش امواج فراصوت و افزایش غلظت شوری بر مقدار این ترکیبات اضافه شد و باعث افزایش معنی‌دار این ترکیبات نسبت به گروه شاهد در غلظت شوری ۲ مولار شد. بیشترین مقدار ترکیبات فنلی (تقریبا ۷ برابر بیشتر از مقدار آن در۲ مولار و شاهد) مربوط به غلظت شوری ۳ مولار و ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت بود. البته میزان ترکیبات فنلی برون سلولی در زمان‌های ۱۰ و ۵ و ۲/۵ دقیقه در هر دو غلظت شوری به یک میزان افزایش داشتند.

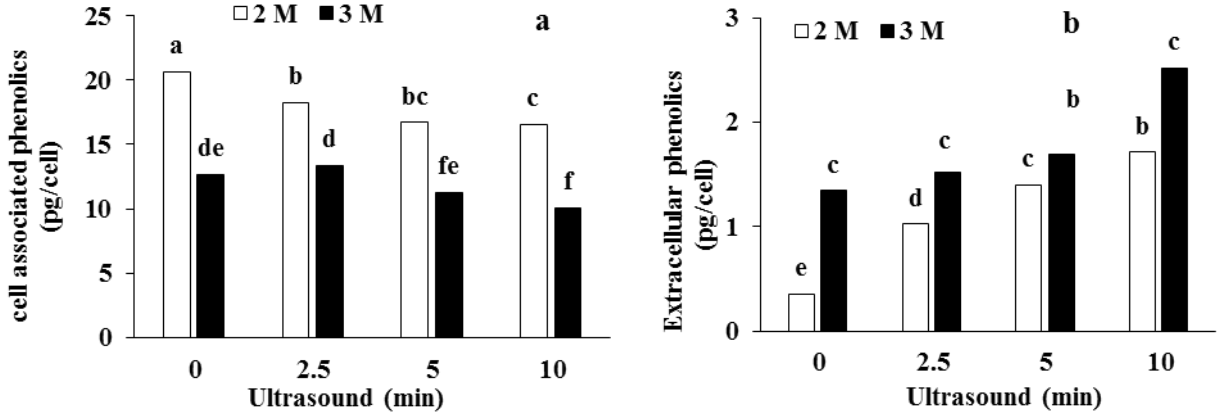
تیمار سلول‌های جلبک با شوری و امواج فراصوت نشان داد که هر چه میزان غلظت شوری و زمان تابش امواج فراصوت بیشتر شد از میزان ترکیبات فنلی درون سلولی سلول‌های جلبک کاسته شد به‌صورتی‌که مقدار آن از (pg/cell) ۲۰/٦۷ در غلظت شوری ۲ مولار و ۱۰ دقیقه تابش فراصوت، به(pg/cell) ۱۰/۰۸ در غلظت شوری ۳ مولار و زمان ۱۰ دقیقه تابش فراصوت رسید. با افزایش ترکیبات فنلی سلول‌ها و به‌دلیل نداشتن دیواره سلولی در جلبک *D. salina* و حلالیت بالای این ترکیبات در محیط کشت، ترکیبات فنولی درون سلول‌ها به بیرون از سلول‌ها نشت یافته و باعث شد ترکیبات فنولی درون سلول‌ها با افزایش زمان تابش امواج فراصوت و افزایش غلظت شوری کم شده و مقدار آن در محیط خارج سلولی در سطح معنی‌داری افزایش یابد. ترکیبات فنلی به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند و می‌توانند به طور مؤثری رادیکال‌های گروه هیدروکسیل و پروکسیل را حذف کنند و از اکسید شدن چربی‌ها ممانعت به عمل آورند (Boscaiu *et al.*, 2010). افزایش غلظت ترکیب‌های فنلی در شرایط تنش شوری در گیاهان مختلفی نظیر *Raphanus sativus* L. (Muthukumarasamy *et al.*, 2000) و فلفل (Navarro *et al.*, 2006) گزارش شده است و نیز امواج فراصوت باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در بادام زمینی شد (Sales and Resurrection, 2010). همچنین تحقیقات Wu وLin (۲۰۰۲) نیز نشان دادند که امواج فراصوت باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در کشت سلولی جینسینگ گردید که Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) نیز در سلول‌های فندق قرار گرفته در معرض امواج فراصوت چنین مشاهده‌ای داشتند.

گلیسرول: طبق نتایج ارائه شده در شکل ۵ با افزایش میزان غلظت شوری و مدت زمان تابش امواج فراصوت بر میزان گلیسرول سلول‌های تحت تیمار، اضافه شد و افزایش معنی-داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد. به‌این صورت که بیشترین میزان گلیسرول مربوط به گروه شوری با غلظت ۳ مولار و ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت بود (pg/cell ۱٦/۰۸) و کمترین میزان گلیسرول در غلظت ۲ مولار و گروه شاهد (pg/cell ۵/۰۱) مشاهده شد یعنی با افزایش شوری و زمان تابش امواج فراصوت میزان گلیسرول ۳ برابر بیشتر شد.

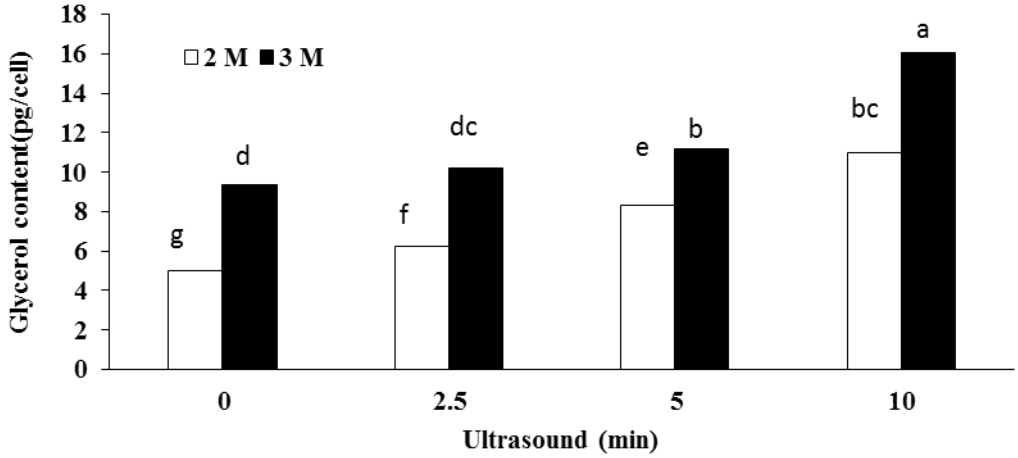
این افزایش را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که در غلظت-های بالای شوری میکروارگانیسم‌های نمک دوست و مقاوم به شوری و بعضی از ماکروارگانیسم‌ها، حل شوندهای اسمزی را ذخیره می‌کنند تا تغییرات اسمزی سلول را با محیط‌شان به‌حال تعادل در آوردند. حل شونده‌های اسمزی بسیاری، در ارگانیسم‌های هوازی شناسایی شده‌اند و گلیسرول ساده‌ترین حل شونده‌ی آلی می‌باشد که فقط در یوکاریوت‌ها یافت می‌شود. گلیسرول حل شونده‌ی اسمزی شناخته شده جلبک *D. salina* می‌باشد. مقدار گلیسرول موجود در این جلبک نظریه‌ی حل شونده‌ی اسمزی را مطرح کرد به دلیل اینکه سنتز آن آسان است و از لحاظ مصرف انرژی هزینه کمتری را نسبت به حل شونده‌های دیگر دارد، با آب در هر نسبتی مخلوط می‌شود. بنابراین محدودیت واقعی در غلظتی که می‌تواند درون سلول ذخیره شود وجود ندارد و از فعالیت آنزیم‌ها جلوگیری

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]



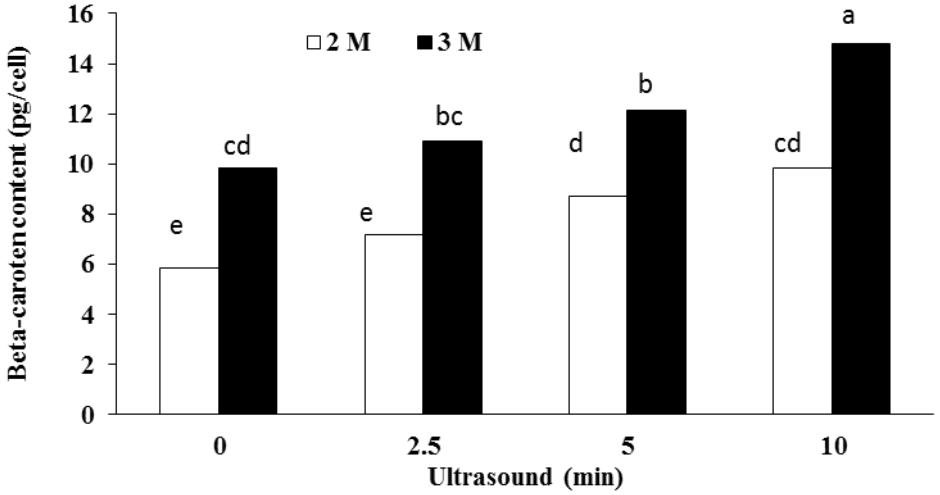
شکل ٤- اثر متقابل امواج فراصوت و شوری بر محتوی ترکیبات فنلی درون سلولی (*a*) و برون سلولی (*b*) در کشت سلولی *D. salina*. حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.



شکل ۵- اثر متقابل امواج فراصوت و شوری بر محتوی گلیسرول سلول در کشت سلولی *D. salina*. حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

نمی‌کند (Oren, 2007). طی بررسی‌های Amotz و Avron (۱۹۷۳) برجلبک *Dunaliella parva* ، مشاهده کردند که در شوری ۵/۱ مولار در این جلبک ۱/۲ مولار گلیسرول ذخیره می شود و همچنین مشاهده کردند زمانیکه غلظت خارج سلولی نمک افزایش یا کاهش یافت گلیسرول داخلی سلولی بر طبق آن تغییر کرد و تعادل اسمزی حدوداً بعد از نود دقیقه حاصل گردید. آنها این تغییرات در میزان گلیسرول را در نتیجه تشکیل متابولیکی و تجزیه گلیسرول داخل سلولی تفسیر کردند و به حضور نوعی از تنظیم اسمزی جلبک اشاره کردند که وابسته به سنتز یا تجزیه گلیسرول داخلی سلولی در پاسخ به غلظت نمک خارج سلولی می‌باشد. در پی اثرات استرس اسمزی بر میزان گلیسرول جلبک *D. salina* که *توسط* Zhou و همکاران (۲۰۰٦) انجام شد نشان داده شد که میزان گلیسرول وابستگی نزدیکی به غلظت نمک محیط کشت دارد. همچنین در تحقیقات Chen و همکاران در سال ۲۰۰۹ که پاسخ‌های اسمزی *D. salina* را توسط مطالعه رشد سلولی، تغییرات میزان گلیسرول و فعالیت آنزیم (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (یک آنزیم کلیدی جهت متابولیسم گلیسرول) در شوری‌های متفاوت (۰/۵ – ۵ مولار) بررسی کردند. نتایج نشان داد که شوری دو مولار (حدود ۱۲۰ گرم در لیتر نمک) شوری بهینه برای رشد *D. salina* می‌باشد و با افزایش شوری دو مولار به چهار مولار میزان گلیسرول ٦۱/٤۳ درصد افزایش یافت در حالی که با کاهش شوری از ۲ مولار به ۰/۵ میزان گلیسرول ۵۲/۰۵ درصد کاهش یافت آنها پیشنهاد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]



شکل ٦- اثر متقابل امواج فراصوت و شوری بر محتوی بتا-کاروتن سلول در کشت سلولی *D. salina* حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

کردند که میزان گلیسرول جلبک *D. salina* وابستگی نزدیکی به شوری محیط کشت دارد.

نتایج تحقیقات قاسمی و همکاران (۱۳۷۹) برروی دو نژاد از جلبک *D. salina* تحت شوری‌های متفاوت ۰/۵ تا ۵/۳ مولار جهت سنجش میزان گلیسرول نشان داد که هرچه شوری زیاد می‌شود تولید گلیسرول داخلی سلولی به‌ازای هر سلول زیاد می‌شود و پیشنهاد کردند که اگر *D. salina* در غلظت NaCl لازم برای تهیه رشد بهینه پرورش داده شود و پس از رسیدن به اواخر فاز لگاریتم غلظت NaCl محیط کشت به ۵/۳ مولار افزایش یابد گلیسرول بیشتری تولید خواهد شد. از طرف دیگر امواج‌فراصوت به‌عنوان الیسیتوری برای تحریک سلول‌ها جهت تولید گلیسرول بیشتر، به‌کار رفت. امواج فراصوت باعث افزایش تولید گلیسرول در سلول‌های گیاهان روغنی شده که می‌تواند برای سوخت‌های زیستی کاربرد داشته باشد (Fukuda *et al.*, 2008). و روغن‌های گیاهی را افزایش می دهد (Satis *et al.*, 2006). در مجموع بر هم کنش شوری با فراصوت باعث تقویت اثر آنها روی صفات مورد بررسی گردید. با توجه به اینکه هر یک از آنها در حالت انفرادی به صورت نوعی تنش سلول‌ها را تحت تاثیر قرار دادند به‌نظر می‌رسد در حالت ترکیبی اثر آنها تجمیع پیدا کرده و یا اثر همدیگر را تقویت کرده و بنابراین به صورت موثرتر منجر به افزایش گلیسرول گردیدند.

بتا کاروتن: بر طبق داده‌های به‌دست آمده در شکل ٦، با افزایش میزان غلظت شوری و افزایش زمان تابش امواج فراصوت میزان بتاکاروتن سلول‌های جلبک *D. salina* افزایش معنی‌داری را درهمهٔ تیمارها نسبت به گروه شاهد نشان داد. بیشترین میزان بتاکاروتن در غلظت شوری ۳ مولار و زمان ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت (١٤/٨١ pg/cell) مشاهده شد و کمترین میزان بتاکاروتن مربوط به غلظت شوری دو مولار و زمان شاهد(٥/٨٤ pg/cell) بود.

استرس‌های محیطی باعث افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن در سلول می‌شود. افزایش فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله بتاکاروتن به‌عنوان سریع‌ترین واحدهای مقابله کننده در برابر حمله اکسیژن‌های فعال در شرایط تنش گزارش شده است (Satyendra *et al.*, 1999). جلبک *D. salina* به‌دلیل نداشتن دیواره سلولی محکم در پاسخ به تغییرات خارج سلولی هیپو یا هیپراسموتیکی مثل شوری‌های بالا با تجمع بتاکاروتن و دیگر تغییرات درون سلولی تا حدی به حفظ تعادل اسمزی خود کمک می‌کند (Raja *et al.*, 2007). تحقیقات انجام شده توسط مقدسی و همکاران (۱۳۹۰) بر اثر غلظت‌های نمک ۵ و ۱۰ و ۱۵ و ۲۰ و ۲۵ و ۳۰ و ۳۵ و ٤٠ درصدی روی تولید بتاکاروتن، در جلبک *D. salina* نشان داد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

که با افزایش شوری تا میزان ۲۵ درصد مقدار بتا کاروتن نیز افزایش یافت و در شوری‌های بالاتر این میزان کاهش یافت. هم‌چنین در تحقیقات Takagi و همکاران (۲۰۰٦) به‌دست آمد که افزایش غلظت‌های مختلف نمک تا یک میزان (شوری ۲۵ درصد) باعث افزایش غلظت بتاکاروتن گردید و امّا در غلظت‌های بسیار بالاتر نمک، مقدار بتا کاروتن کمتر شد. جلبک *D. salina* در شرایط استرس شوری مقدار زیادی بتاکاروتن را در خود ذخیره می‌کند امّا اگر میزان شوری محیط بسیار بالاتر از حد تحمل سلول جلبک باشد، جلبک با مهار کردن واکنش‌های متابولیکی خود باعث افزایش بقاء خود برای یک مدت طولانی در شرایط نامساعد می‌شوند (Alyabyev *et al.*, 2007). در تحقیقات انجام شده توسط Garcia و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که افزایش نمک از ۱۰ به ۳۵ درصد باعث افزایش رشد و تجمع بتاکاروتن در جلبک *D. salina* شد. طی تحقیقاتی که توسط Gomez و همکاران (۲۰۰۳) و Amotz و همکاران (۱۹۸۸) بر روی اثرات شوری بر تجمع کاروتنوئیدها در *D. salina* و *D.bardawil* انجام شد ثابت کردند که افزایش نمک باعث افزایش تولید بتاکاروتن شد و همچنین تحقیقات Fazeli و همکاران (۲۰۰٦) و Cifuentes و همکاران (۱۹۹٦) نشان دادند که شوری ۲/۹ درصد بر روی *D.terteolecta* باعث افزایش قابل ملاحظه‌ی بتاکاروتن در درون سلول شده است. طی تحقیقی که شریعتی و مددکار (۱۳۷۹) با بررسی روی جلبک *D. salina* جداسازی شده از مرداب گاوخونی اصفهان تحت غلظت‌های ۰/۵ – ٤ مولار و شرایط نور زیاد و کم انجام شد نشان دادند که افزایش میزان شوری سبب افزایش مقدار بتا کاروتن در محیط کشت می‌گردد.

نتیجه گیری:

در این تحقیق پارامترهای چون پروتئین کل، پتانسیل آنتی اکسیدانی، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، بتاکاروتن و گلیسرول تحت اثر تیمارها افزایش یافت. بیشترین میزان بتاکاروتن و گلیسرول در حالت تیمار تلفیقی تابش امواج فراصوت و شوری، به مقدار ۱٤/۸ و ۱٦/۰۸ میلی گرم در لیتر به‌ترتیب اندازه گیری شد. به‌نظر می‌رسد امواج فراصوت و شوری ضمن تقویت اثر یکدیگر بر سلول‌ها، با تحریک سلول ها و القای پاسخ‌های دفاعی و متابولیت ثانویه، باعث افزایش مقدار بتاکاروتن و گلیسرول گردیدند. با توجه به‌اینکه تهیه و به‌کارگیری این تیمارها و روش‌ها در دست‌ورزی‌های بیوتکنولوژیک تولید متابولیت بسیار راحت و ارزان است امکان استفاده از آن می‌تواند به بالا بردن کارایی تولید متابولیت‌های ارزشمند نظیر بتاکاروتن نماید که یکی از اهداف مهم تولید تجاری این ماده مهم جهت مصارف مختلف غذایی، دارویی و صنعتی است.

منابع:

سلمانی نژاد، م. (۱۳۹۱) اثرات نور و شوری بر کاروتنوئید *Dunaliella salina* دریاچه ارومیه. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

شریعتی، م.، مددکار حق جو، م. (۱۳۷۹) بررسی اثر تنش شوری بر میزان بتاکاروتن و کلروفیل محتوای جلبک تک سلولی *Dunaliella salina* جدا شده از مرداب گاوخونی اصفهان. مجله زیست شناسی ایران. ۱٤ (۲): ۵۵-٦٦.

رضایی، آ.، قناتی، ف.، بهمنش، م. (۱۳۹۰) افزایش تولید و آزادسازی توسط متیل جاسمونات ، امواج فراصوت و دی بوتیل فتالات در کشت سلولی فندق (Corylus avellana L.) زیست شناسی گیاهی. ۷: ۵۵-۷۲.

قاسمی، ح.، مظاهراسدی، م. وکیانی‌راد، م. (۱۳۷۹) بررسی میزان گلیسرول در جلبک *Dunaliella salina* .پژوهش و سازندگی. ۱۳(٤): ۸۸-۸٤

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

معین، م. و شریعتی، م. (۱۳۸۹) اثر هم‌زمان سالیسیک اسید و تنش شوری بر روی رشد(تقسیم سلولی)رنگیزه‌های فتوسنتزی و مقدار بتا کاروتن در جلبک *Dunaliella salina* . مجله زیست شناسی ایران. ۲۳(۵): ۶۳۸-۶۴۸.

مقدسی، ز.، امتیازجو، م.، ربانی، م.، آذرگشسب، ا. و مصطفی، ن. (۱۳۹۰) پتانسیل تولید بتاکاروتن از جلبک*Dunalilla salina* دریاچه شاهی تحت استرس شوری. مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آذرشهر. ۵(۲): ۹۳-۱۰۰.

یارنیا، م. (۱۳۸۶) ارزیابی تعدادی از شاخص‌های فیزیولوژیکی ارقام سورگوم در شرایط تنش شوری. مجله علوم کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز ۳۲: ۱-۴۱.

Alyabyev, A. J., Loseva, N. L., Gordon, L. K., Andreyev a, I. N., Rachimova, G. G., Tribunskih, V. I., Ponomareva, A. A. and Kempb, R. B. (2007) The Effect of Changes in Salinity on the Energy yielding Processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* Cells. Thermochemical Acts 458:65-70

Amar, E. C., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. (2004) Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Japan. 16: 527-537.

Andrew, J. S., Moreau, H., Kuntz, M., Pagny, G., Lin, C., Tanksley, S. and McCarthy, J. (2008) An Investigation of Carotenoid Biosynthesis in Coffea canephor and *Coffea arabica*. Journal of Plant Physiology 165: 1087-1106.

Barton, S., Bullock, C. and Weir, D. (1996) The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. Enzyme and Microbiology Technology 18: 190-194.

Binzel, M. L., Pane-Hess, F., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. (1989) Mechanism of adaptation to salinity in cultured glycophyte cells. In: Environmental Stress in Plant (ed. Cherry, J. H.) Pp.139-157. Springer-Verlag, Berlin.

Blazek, A., Zur, I. (2003) Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. Plant Science 164: 1019-1028

Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J., Kessly, D. (1990) Effect of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *D. salina*. Journal of Applied Phycology 2: 111-119.

Boscaiu, M., Sanchez, M., Bautista, I., Donta, P., Lid on, A., Linares, J., Lull, C., Mayoral, O. and Vicente, O. (2010) Phenolic compounds as stress markers in plants from gypsum habitats. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Horticulture 67: 44-49.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Cain, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences 74: 2157–2184.

Chen, B., Huang, J., Wang, J. and Huang, L. (2008) Ultrasound effects on the ant oxidative defense systems of *Porphyridium cruentum*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 16:88–92

Chen, H., Jiang, J. G. and Wu, G. H. (2009) Effects of Salinity Changes on the Growth of *Dunaliella salina* and its Isozyme Activities of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 6178–6182.

Chitlaru, E., and Pick, U. (1989) Selection and characterization of *Dunaliella salina* mutants defective in haloadaptation. Plant Physiology 91: 788-794.

Cong, L., Zheng, H. C., Zhang,. Y. X. and Chai, T. Y. (2008) Arabidopsis DREB1A Confers High Salinity Tolerance and Regulates the Expression of GA Deoxygenizes in Tobacco. Plant Science 174: 156 – 64.

Date, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F. (2000) Duel action of the active oxygen s pieces during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences 57: 779-795.

Davies, M. J. (2005) the Oxidative Environment and Protein Damage. Biochimica et Biophysical Acta 703: 93-109.

De vos, C. H. R., Schat, H., De Waal, M. A. M., Vooijs, R. and Ernst, W. H. O. (1991) Increased resistance to copper-induced damage of the root plasma membrane in copper tolerant Silence cucubalus. Physiologia Plantarum 82: 523–528.

Cifuentes, A. S., Gonzalez, M. A., and Parra, O. (1996) The Effect of Salinity on the Growth and Carotenogenesis in Two Chilean Strains of *Dunaliella salina Teodoresco*. Biological Research 29: 227-236.

Crisosto, C. (1996) Optimum procedures for ripening stone fruit. Management of Ripening Fruit (Univ. of California, Davis). Postharvest Horticulture Series 9: 28-30.

Dixon, R. A. and Pavia, N. (1995) Stress induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell 7: 1085-1097.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. and Vidal, N. (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry 97: 654–660.

Dubey, R. S., Singh, A. K. (1999) Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolizing enzymes in rice plants**.** Biologia Plantarum 42: 233-239.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, F. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.

Egret, M. and Tevin, M. (2002) Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). Environmental Experimental Botany48: 43-49.

El Tayeb, M. A. (2005) Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. Plant Growth Regulation 45: 215-224.

Fazeli, M. R., Tofighi, H., Samadi, N., and Jamalifar, H. (2006) Effect of Salinity on βcarotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Uremia salt lake, North of Iran. Bioresource Technology 97: 2453-2456.

Fischer, C., Holl W. (1991) Food reserves of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) I. Seasonal changes in the carbohydrate and fat reserves of pine needles. Trees 5:187–195.

Frank, G. and Wegmann, K. (1979) Physiology and biochemistry of glycerol biosynthesis In *Dunaliella*. Biol Biologisches Zentralblatt 93: 707-723.

Fukuda, H. (2008) Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. Trends in Biotechnology 26: 668–673

Garcia, F., Freile-Pelegrín, Y., Robledo, D. (2007) Physiological Characterization of *Dunaliella* sp. 3 (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. Bioresource Technology 98: 1359-1365.

Gilmour, D.J., Hopkins, F. and Boney, A.D. (1982) The Effect of Salt Stress on the Primary Processes of Photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta.* Plant Science 26: 325-330.

Gomez, P. I., Barriga, A., Cifuentes, A. S. and Gonzalez, M. A. (2003) Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* accumulated (strain ONC-007) and *Dunaliella bardawil* (ATCC30861) chlorophyta. Biological Research 36(2): 185-192.

Greenway, H. and Munds, R. (1980) Mechanism of Salt Tolerance in No halophytes. Annual Review of Plant Physiology 31: 149-190.

Hadi, M. R., Shariati, M. and Afsharzadeh, S. (2008) Microalgal Biotechnology: Carotenoid and glycerol production by the green algae *Dunaliella* isolated from the Gave-Khooni salt marsh Iran. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 13: 540-544.

Holkova, I., Bezáková, L., Bilka, F., Balazová, A., Vanko, M. and Blanárik, V. (2010) Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinary accumulation in *Papaver somniferum* suspension cultures. Plant Physiology and Biochemistry 48: 887-892.

Jamshidi, M., Ahmadi, H. R., Rezazadeh, S. h., Fathi, F. and Mazanderani, M. (2010) Study on phenolic and antioxidant activity of some selected plant of Mazandaran province. Medicinal Plant 9(34): 177-183. [In Persian]

Jahnke, L.S. and White, A. L. (2003) Long-term hypo saline and hyper saline stress produce distinct antioxidant responses in the marine algae *Dunaliella tertiolecta.* Journal of Plant Physiology 160 (10): 1193-202.

Jaspers, E.M.W. (1965) Pigmentation of tobacco crown-gall tissues cultured in vitro in dependence of the composition of the medium. Physiologia Plantarum 18: 933-940.

Joersbo, M. and Rundstedt, J. (1992) Sonication: a new method for gene transfer to plants. Physiological Plantarum 85: 230-234.

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

Jung, S. (2004) Variation in Antioxidant Metabolism of Young and Mature Leaves of *Arabidopsis thaliana* Subjected to Drought. Plant Science 166: 459-466.

Kaliamoorthy, S. and Rao, A. S. (1994) Effect of salinity on anthocyanin accumulation in the root of maize. Plant Physiology 37: 169-170.

Komaraiah, P., Kishore, P. B. K., Carlson, M., Magnusson, K.E. and Mandeni us, C. F. (2005) Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. Plant Science 168: 1337–1344.

Li, L., VanStaden, J., and Jagger, A. K. (1998) Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water Stress. Plant Growth Regulators 25: 81–87.

Linden, J. C. and Phisalaphong, M. (2000) Oligosaccharides potentiate methyl jasmonate-induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis*. Plant Science 158: 41–51.

Liu, Y. Y., Wang, B. C. and Zhao, H. C. (2001) Alternative stress effects on the Ca^{2+} distribution in the *Chrysanthemum* callus cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 22: 245–249.

Liu, Y.Y., Yoshikoshi, A., Wang, B. C. and Sakanishi, A. (2003) Influence of ultrasonic stimulation on the growth and proliferation of *Oryza sativa* Nippon bare callus cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 27: 287–293.

Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005) Cold, Salinity and Drought Stress.An Overview. Archives of Biochemistry and Biophysics 444: 139-148.

Marschner, H., (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.

Martinez-Crayola, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. Biochimie 77: 147–161.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

Mazurkas, H., Karin, O. and Kyoto, H. (2003) Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. Plant Science 164(2): 259 - 265.

Mishra, A. N., Sadhu, S. M., Mishra, M., Singh, P., Meer, I., Das, N., Kar, M. and Sahu, P. (1997) Sodium chloride induced changes in leaf growth, and pigment and protein contents in two Rice cultivars. Biologia Plantarum 39: 257-262.

Murray, Y. (1994) Ca^{2+} regulation of outward rectifying K^+ channel in the plasma membrane of tobacco cultured cells in suspension: A role of the K^+ channel in mitigation of salt-stress effects by external Ca^+. Plant Cell Physiology 39: 1039-1044

Muthukumarasamy, M., Gupta, S. D. and Pannerselvam, R. (2000) Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase activities by triadimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L. Journal of Biologia Plantarum 43: 317-320.

Navarro, J. M., Flores, P., Garrido, C. and Martinez, V. (2006) Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages as affected by salinity. Food Chemistry 96: 66-73.

Nikokar, K., Moradshahi, A. and Kharati, M., (2004) Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity *Dunaliella salina* isolated from Maharlu salt lake in shiraz. Iranian Journal of Science & Technology, Transaction, A 28: 117-125.

Orcutt, D. M. and Nielsen, E. T. (2000) The physiology of plants under stress, soil and biotic factors. John Wiley and Sons, New York. Pp 177-235.

Oren, A. and Gunde-Cimerman, N. (2007) Mycosporines andmycosporine-like amino acids. UV protectants or multipurpose secondary metabolites. FEMS Microbiology Letter 269: 1–10.

Oren, A. (2005) A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005, Saline Systems 1: 2.

Orenburg, H. and Knorr, D. (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. Enzyme and Microbial Technology 17: 674–684.

Orset, S. C. and Young, A. J. (2000) Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-cis β , β-Carotene in *Dunaliella salina* (Teod). Plant Physiology 122: 609-618.

Parida, A. K. and Das, B., (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60: 324-349.

Pessarakli, M. (1999) Handbook of plant and crop stress. Second Edition. Marcel Dekker, Inc. Plant Science 164: 1019-1028.

Blazek, A. and Zur, I. (2003) Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. Plant Science 164: 1019-1028

Poppel, G.V. and Goldohm, R. A. (1995) Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer Prevention. American Journal of Clinical Nutrition, 62: 1393-1402.

Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D. and Rengasamy, R. (2007) PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvo ales, Chlorophyta) and its Growth Characteristics. Microbiological Research 162 (2): 168-176.

Rezaei, A., Ghanati, F. and Behmanesh, M. (2011) Ultrasound potentiated salicylic acid-induced physiological effects and production of taxol in hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. Ultrasound in Medicine and Biology 37: 1938–1947.

Safari, M., Ghanati , F., Hajnorouzi, A., Rezaei, A., Abdolmaleki, P. and Mokhtari-Dizaji, M. (2012) Maintenance of membrane integrity and increase of Texans production in hazel (*Corylus avellana* L.) cells induced by low-intensity ultrasound. Biotechnology Letters 34: 1137–41.

Sanchez, F. J., Manzanares, M., Andres, E. F., Tentoria, J. L., Ayer be, L. and Andres, E. F. (1998) Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. Field Crops Research 59: 225-235.

Sales, J. M. and Resurrection, A. V. A. (2010) Phenolic profile, antioxidants, and sensory acceptance of bioactive-enhanced peanuts using ultrasound and UV. Food Chemistry 122: 795-803.

Satyendra, N. R., Stephan, W. B., Gossett, D. R. and Lucas, M.C. (1999) Antioxidant response to salt stress during fiber development in cotton ovules. The Journal of Cotton Science 3:11-18.

Satis, N. G., Kamari's, A. C., Pappas, C. S. and Tarantilis, P. A. (2006) Improvement of biodiesel production based on the application of ultrasound: monitoring of the procedure by FTIR spectroscopy. Journal of the American Oil Chemists' Society 83: 53-57.

Schoen, S. (1988) Cell counting. In: Experimental Phycology (eds. Lobban, C. S, Chapman, D. J, Kremer, B. P),Pp. 16-22. A Laboratory Manual. Cambridge U. P., Cambridge.

Schmidt, P., Rosenfeld, E., Milner, R., and Schellenberger, A. (1987) Effects of ultrasound on the catalytic activity of matrix-bound Glico amylase. Ultrasonic 25: 295-299.

Takagi, M., Karson, and Yoshida, T. (2006) Effect of Salt Concentration on Intracellular Accumulation of Lipids and Tri acyl glyceride in Marine Microalgae *Dunaliella* Cells. Journal of Bioscience and Bioengineering 101: 223-226.

Tester, M. and Davenport, R. (2003) Na^+ tolerance Na^+ transport in higher plants. Annals of Botany 91: 503-527.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

Umemura, K. N., Ogawa, J., Koga, M., and Iwata, H. (2002) Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. Plant Cell Physiology 43: 778-784.

Wang, S.Y. (1999) Methyl jasmonate reduces water stress in strawberry. Plant Growth Regulation 18: 127-134.

Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. and Tan, R.X. (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. Nitric Oxide 15: 351-358.

Wang, X. J., Wang, B. C., Jian, Y., Hugo, D. Q. and Duane, C. R. (2003) Effect of sound stimulation on cell cycle of chrysanthemum (*Gerbera jamesonii*). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 29: 103-107.

Wu, J. and Lin, L. (2002) Ultrasound-induced stress responses of *Panax ginseng* cells: enzymatic browning and phenolics production. Biotechnology Progress 18: 862-866.

Wu, J. and Lin, L. (2003) Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. Applied microbiology and biotechnology 62: 151-155.

Wu, J. and Gee, X. (2004) Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. Biotechnology and Bioengineering 85:714-721.

Zhou, L., Ming, X. H., Liu, C. S., Yu, L .J. and Chen, X. G. (2006) Effects of osmotic stress on intracellular glycerol content and enzyme activity in *Dunaliella salina*. Chinese Bulletin of Botany 23(2): 145-51.

Zhou, R., Li, Y., Yan, L. and Die, J. (2011) Effect of edible coatings on enzymes, cell-membrane integrity, and cell-wall constituents in relation to brittleness and firmness of Huangpu pears (*Pyrus pyrifolia* Makai, cv. Huangpu) during storage. Food Chemistry 124: 569-575.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]

The interaction effect of ultrasound and salinity on growth and metabolite production in *Dunaliella salina* cells

Roghayyeh Mokhberi[1], Ayatollah Rezaei[2*] and Alaedin Kordenaeej[2]

[1]Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Payame-Noor University, Teharn, Iran, [2]Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran

Received: 11 June 2015, Accepted: 4 November 2015)(

Abstract:

Manipulating cell cultures by elicitors is one of the important strategies for induction of valuable metabolites in plant biotechnology. Therefore, in this study the effect of ultrasound and salinity on growth, primary and secondary metabolite production were studied in *Dunaliella salina* microalgae cell culture. Cell cultures were treated with sodium chloride salt at concentrations of 2 and 3 M and ultrasound (40 kHz) for the 2.5, 5 and 10 minutes in a completely randomized design with three replications. The evaluated parameters induced cell growth, total protein content, photosynthesis pigments (chlorophyll *a* and *b*, total chlorophyll and carotenoids), antioxidant potential, membrane lipid peroxidation, amount of phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, soluble sugars, β-carotene and glycerol. The results showed that with increasing duration of exposure to ultrasound and salt concentration the cell growth and photosynthetic pigments declined. In contrast, total protein, antioxidant potential, membrane lipid peroxidation, the amount of phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, β-carotene and glycerol increased. The highest amount of β-carotene was achieved in the case of individual treatment of ultrasound irradiation at 10 min, 3 M salinity and combination of the two factors, with values of 12.3, 11.9 and 14.8 mg/l, respectively. The highest content of glycerol was measured in 3 M salinity, 10 min ultrasound irradiation and combined treatment of the two factors, 11.7, 13.5 and 16.8 mg/l, respectively. It appeared that ultrasound intensified the salinity effect and induced defense responses, secondary metabolism and so increased the amount of cells β-carotene and glycerol.

Keywords: *Dunaliella Salina*, Cell culture, Ultrasound, Salinity, β-carotene, Glycerol.

*corresponding author, Email: arezaei@shahed.ac.ir

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-28]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1395.5.17.16.3]