

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

رقیه مخبری^۱، آیت‌الله رضایی^{۲*} و علاءالدین کردناییج^۲

^۱ گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، ^{۲*} گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۱۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۳/۲۱)

چکیده:

دستورزی کشت‌های سلولی با الیستیورها 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 غلاظت‌های ۲ و ۳ مولار کلریدسدیم و امواج فراصوت (۴۰ کیلو هرتز) به مدت زمان ۵/۲، ۱۰ و ۱۵ دقیقه و در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار قرار گرفت. شاخص‌های مورد اندازه‌گیری عبارت بودند از: رشد سلولی، محتوای پروتئین‌کل، رنگیزه‌های فتوستزی (کلروفیل a و b کلروفیل کل و کاروتینوئیدها)، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، قندهای محلول، بتاکاروتون و گلیسرول. نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان تابش امواج فراصوت و غلاظت شوری تعداد سلول‌ها و مقدار رنگیزه‌های فتوستزی کاهش یافت. در مقابل پروتئین‌کل، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، بتاکاروتون و گلیسرول افزایش یافت. بیشترین میزان بتاکاروتون و گلیسرول در شوری ۳ مولار و ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت به ترتیب ۱۴/۸ و ۱۶/۰۸ میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد. به نظر می‌رسد امواج فراصوت با تقویت اثر شوری پاسخ‌های دفاعی و تولید متابولیت‌های ثانویه را القا نمود و باعث افزایش مقدار بتاکاروتون و گلیسرول در سلول‌ها گردید.

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

مقدمه:

برای گیاهان برآمدند که با محدوده فضایی کم و شرایط نامناسب محیطی نیز بتوانند همان اثرات مفید استخراجی از گیاهان را به دست آورند و جلبک‌ها بهترین گزینه بودند. جلبک تکسلولی *Dunaliella salina* دارای مواد غذایی ضروری و ترکیباتی با خاصیت ضدآکسیدانی و ضدسرطانی همچون ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای چرب ضروری، پلی ساکاریدها و موادمعدنی می‌باشد. Amar (Gomez *et al.*, 2003; Poppel and Goldbohm 1995. Amar 2004)

طبق برآوردهای صورت گرفته در سال‌های اخیر، ارزش جهانی متابولیت‌های ثانوی مستقیم شده از گیاهان دارویی رشد قابل توجهی داشت. اما به دلایل 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

تا ۵۰ درصد وزن خشک خود را به گلیسروول اختصاص می- دهد (Oren, 2005; Hadi *et al.*, 2008) و Borowitzka همکاران (۱۹۹۰) و Cifuentes و همکاران (۱۹۹۶) ثابت کردند که افزایش شوری باعث تجمع کاروتونیئیدها در جلبک *D. Salina* شده است. همچنین در تحقیقی Hadi و D. salina همکاران (۲۰۰۸) طی بررسی دو گونه جلبک *viridis* و *D. salina* جدا شده از تالاب گاو خونی تحت غلاظت‌های مختلف نمک (۰/۱۷، ۱، ۲، ۳ و ۴ مولار) نشان دادند که شوری سبب کاهش رشد جلبک‌ها و افزایش میزان بتاکاروتون در جلبک *D. salina* گردید. Gilmour و همکاران (۱۹۸۲) نشان دادند که میزان فعالیت فتوستتری در جلبک *D. Salina* تحت تنش شوری کاهش یافت. غالباً یک اثر سینرژیستیک بین محرک‌ها یا الیستورهای مختلف در تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه یا کشت‌های سلولی مشاهده می‌شود. به عنوان مثال، اولیگوساکاریدهای کیتین یا کیتوزان می‌توانند اثر مตیل جاسمونات را در تولید پاکلی‌تاكسل (تاكسول) در سرخدار Linden and کانادایی (*T. Canadensis*) تقویت کرد (Phisalaphong, 2000 Umemura و همکاران ۲۰۰۲). مشاهده کردند که سربروزید گیاهی و N-استیل‌کیتوهگزاوز (N-acetylchitohexaose) به صورت سینرژیستیک تولید فیتوآلکسین را در کشت سلولی برنج تحریک کرد. همچنین رضایی و همکاران (۱۳۹۰) بیشترین تولید تاكسول را در کشت سلولی فندق تحت اثر تیمار همزمان امواج فرماصوت و دی- بوتیل‌فتالات نسبت به تیمارهای انفرادی به دست 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 فرماصوت و شوری بر رشد و تولید متابولیت در ریزجلبک *D. Salina* مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت دو هفته از اعمال تیمار فرماصوت اندازه‌گیری شاخص‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها:

شرایط کشت و رشد: مقدار ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی در

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در این جلبک کاروتونیئید می- باشد، از جمله کاروتونییدهای موجود آلفاکاروتون، زاگرانتین، کریپتواگرانتین، لوئین و دیگر رنگدانه‌های نارنجی یا قرمز که اصلی‌ترین آنها بتاکاروتون می‌باشد نیز از جلبک *D. salina* استخراج می‌شود (Borowitzka, 1990. Hadi *et al.*, 2008) توکلید و تجمع متابولیت‌های ثانوی در سلول‌ها، بخشی از پاسخ های دفاعی سلول‌ها می‌باشد که در پاسخ به محرک‌ها صورت می‌گیرد. 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 فرماصوت با شدت و انرژی کم به عنوان الیستور فیزیکی یا غیرزیستی مورد توجه قرار دارند. اخیراً مطالعات پراکنده‌ای روی اثرات زیستی امواج فرماصوت (Ultrasound) در کشت سلول گیاهی صورت گرفته اما در خصوص اثرات تحریک‌کننده‌گی آن در تولید متابولیت‌ها در سلول‌های جلبکی اطلاعات چندانی وجود ندارد. افزایش بیوستتر متابولیت‌های ثانوی در سلول‌های گیاهی توسط امواج فرماصوت 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 فرماصوت 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 فرماصوت روی سلول‌های زنده، افزایش در نفوذپذیری غشاء است که جذب ترکیبات خارجی و دفع فراورده‌های درون سلولی را توسط سلول‌ها افزایش می- دهد. گزارش‌هایی مبنی بر تغییر در بیان ژن، افزایش فعالیت آنزیم‌ها و هورمون‌های خاص توسط تابش امواج فرماصوت 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

که سلول‌ها متحرک بودند سلول‌های موجود در نمونه قبل از توسط بلورید بی‌حرکت شدند.

کلروفیل و کاروتینوئید کل: مقدار کلروفیل a و b، کلروفیل کل (a+b) و کاروتینوئیدها با استفاده از روش اسپکتروفتوometri 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 به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. مخلوط حاصل مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان جذب نور محلول رویی در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۴ و ۴۵۲ نانومتر به کمک اسپکتروفتوومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد. به کمک رابطه‌های زیر میزان کلروفیل a، b و کاروتینوئید بر حسب میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد (Frank and Wingman, 1979).

$$C_{chl\alpha} = 10.3 \times E_{633} - 0.918 \times E_{644}$$

$$C_{chl\beta} = 19.7 \times E_{644} - 3.87 \times E_{633}$$

$$C_{car} = 4.20 \times E_{452.5} - 0.0264 \times C_{chl.\alpha} - 0.496 \times C_{chl.\beta}$$

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

ترکیبات فنلی: پنج میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ مایع رویی در ظرف جداگانه برای اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی خارج سلولی Folin-cicolteu نگهداری شد. مقدار ۱/۲۵ میلی‌لیتر از معرف RQIC شده (۱/۱۰) و ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷٪ به رسوب سلولی و ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی نمونه‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در حرارت ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در انتها میزان جذب مایع رویی در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتوومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد و مقدار کل ترکیبات فنلی با استفاده از استاندارد اسید سالیسیک تعیین شد. **پروتئین:** مقدار پروتئین به روش Bradford (۱۹۷۶) اندازه گیری گردید. برای تعیین غلظت پروتئین‌های سلول جلبک، ۱ میلی‌لیتر از کشت سلولی نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰

شرایط استریل به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع جانسون استریل (Johnson *et al.*, 1968)، با غلظت نمک دو مolar NaCl و اسیدیته ۷/۵ در ارلن مایرهایی با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر افزوده شد به طوری که تعداد سلول‌ها در هر ارلن مایر تقریباً 300×10^6 در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون جلبکی بود. سوسپانسیون‌های تهیه شده جلبکی در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۶ ساعت روشناخی و ۸ ساعت تاریکی بر روی شیکر با سرعت ۹۰ دور در دقیقه تحت تابش نور فلورستن با شدت ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲ هفته که کشت‌های جلبکی در اواسط مرحله خطی دوره رشد خود قرار گرفتند، تیمار فراصوت و شوری اعمال شد.

تیمار سلول‌ها با امواج فراصوت و شوری: برای به کارگیری امواج فراصوت در دامنه های کیلوهرتز پایین، از یک سیستم حمام اولتراسونیک (FALC Instruments, Italy) با فرکانس ۴۰ کیلو هرتز و پهنه‌ای باند ۳۲۰ هرتز به صورت پیوسته مطابق روش Rezaei و همکاران (۲۰۱۱) استفاده گردید. امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلو هرتز و توان 5 W/cm^2 در مدت زمان‌های ۰، ۰/۵، ۰/۱۰ دقیقه و تیمار شوری با غلظت ۲ و ۳ مولار، در روز چهاردهم واکنش سلول‌ها به کشت‌های سلولی در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار اعمال شد (با توجه به اینکه جلبک *D. salina* در محیط فاقد شوری به علت عدم انجام تعادل اسمزی قادر به رشد نبوده و از بین میروند، 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 مجدداً 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 نمونه جلبکی ۳۰ میکرولیتر برداشته شد و روی لام مخصوص شمارش (لام نثوبار) ریخته شد و زیرمیکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰ سلول‌ها شمارش گردید (Schoen, 1998). تعداد سلول‌های موجود در ۱۰ مریع از این لام شمارش شده و میانگین آن ثبت گردید. از آنجایی



شکل ۱- کشت سلولی جلبک *Dunaliella salina* تحت اثر تیمار تلفیقی شوری (۲ و ۳ مولار) و امواج فرا صوت (۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ دقیقه).

فنل ۵٪ و ۲/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ اضافه گردید. نمونه ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفته شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت های مختلف گلوکز ترسیم گردید. جذب نوری نمونه ها و استانداردها با استفاده از دستگاه اسپکترو فوتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) در طول موج ۴۹۰ nm ۴۹۰nm اندازه گیری شد (Dubois et al., 1956).

آنتوسیانین کل: ۳ میلی لیتر از سوسپانسیون های سلولی به مدت 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. نمونه ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفته شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی نمونه ها برداشته شد و نمونه ها به مدت یک شب در تاریکی قرار داده شدند و در انتهای جذب آنها در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکترو فوتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین، از ضریب خاموشی (Mazurkas et al., 2003) استفاده شد.

تعیین سطح پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء: مقدار آسیب به غشاء ها با اندازه گیری مقدار مالونیل دی آلوفید (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 نمونه ها ۳ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ اضافه شد. پس از همزدن نمونه ها آنها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با قدرت ۱۰۰ و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفتند. سپس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با

دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب سلولی بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار (pH ۶/۸) اضافه شد. برای متلاشی شدن سلول های جلبک و تسهیل در خروج پروتئین های داخل سلول ها، سوسپانسیون های سلولی به مدت ۱۵ دقیقه در معرض امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار داده شد. پس از انجام سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و به آن ۱ میلی لیتر محلول برادر فورد اضافه شد. مقدار جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ nm توسط دستگاه اسپکترو فوتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) قرائت شد و در انتهای با استفاده از نمودار استاندارد آلبومین سرم گاوی غلظت پروتئین نمونه ها بدست آمد.

فلاؤنوثیدلکل: برای سنجش فلاونوئیدها ابتدا ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی با سرعت ۶۰۰۰ هزار دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی دور ریخته شد. به سلول های باقی مانده به نسبت ۹۹ به ۱ اتانول و اسید کلریدریک اضافه گردید. نمونه ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفته شد. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از خنک شدن، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. میزان جذب نمونه ها توسط اسپکترو فوتومتر (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 میلی لیتر از سوسپانسیون های جلبکی با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و به سلول های جلبکی باقی مانده ۰/۵ میلی لیتر

طریق فرمول زیر به دست آمد (Jaspers, 1965).

$$\beta - \text{Carotene } (\mu\text{g/ml}) = 25.2 \times A_{450}$$

گلیسروول: پنج میلی لیتر از نمونه جلبکی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی پس از سانتریفیوژ دور ریخته شد، به این ترتیب گلیسروولی که از قبل درون نمونه بوده خارج گردید. به سلول‌های باقی مانده به میزان ۲ میلی لیتر از محیط کشت جانسون اضافه شد. چند ثانیه نمونه‌ها به آرامی تکان داده شد، سپس میزان ۲۰۰ میکرولیتر نمونه جلبکی جدا و به آن ۱ میلی لیتر پریوادات و ۲/۵ میلی لیتر استیل استن افزوده گردید و به آرامی تکان داده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها مجدداً به مدت 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 اسپکتروفتوتر (PerkinElmer, Lambda 650) خوانده شد و به وسیله رسم منحنی استاندارد غلظت گلیسروول 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 به روش 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 معنی دار 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

۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ ۱ میلی لیتر از هر کدام از نمونه‌ها برداشته شده و به آنها ۱ میلی لیتر تیوباریتوريک اسید ۰/۰۲۵٪ اضافه شد و سپس به مدت نیم ساعت نمونه‌ها در دمای ۱۰۰°C قرار داده شدند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، در طول موج‌های ۵۳۲ nm و ۶۰۰ nm مقدار (PerkinElmer, Lambda 650) جذب توسط اسپکتروفتوتر $\text{MDA} = \frac{\text{ندازه گیری گردید}}{\text{ندازه گردید}} \times 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه گردید (De Vos et al., 1991).

پتانسیل آنتی‌اکسیدانی: دو میلی لیتر از سوسپانسیون‌های سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب سلولی ۲ میلی لیتر اتانول اضافه شد. نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در معرض امواج فراصوت با فرکانس ۴ کیلوهرتز قرار گرفته شد. به نمونه‌ها ۰/۸ میلی لیتر DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) مولار اضافه شد. بعد از گذشت نیم ساعت و انجام واکنش میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها در طوح موج ۵۱۷ نانومتر (PerkinElmer, Lambda 650) توسط دستگاه اسپکتروفتوتر میزان جذب نور محاسبه شد:

$$\text{AA\%} = \frac{100 \times \frac{\text{بلانک - نمونه}}{\text{کترل - A}}}{100}$$

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

بتابکاروتون: یک میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی هر کدام از نمونه‌های جلبک به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و به نسبت ۲ به ۱ هگزان و اتانول به رسوب باقی مانده اضافه شد. به مدت ۱ دقیقه نمونه‌ها با ورتکس شدیداً هم‌زده شدند و سپس مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه نمونه‌ها سانتریفیوژ گردید. با جدا کردن فاز رویی (هگزان) و خواندن جذب در nm ۴۵۰ توسط دستگاه اسپکتروفتوتر (PerkinElmer, Lambda 650) میزان بتاکاروتون سلول‌ها از

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

منابع تغییرات	DF	بناکاروتون	فنل خارج سلول	پتانسیل آتسی اکسیدانی	فلاؤنوتئید ۳۳۰ nm	فلاؤنوتئید ۳۰۰ nm	فلاؤنوتئید nm	پروتئین	تعداد سلول
تکرار	۲	۳/۶۳۰.۵ ns	۰/۳۶۷۵ ns	۰/۸۲۵۱ ns	۱/۲۴۳۱ ns	۳۳/۴۸۰ ns	۳/۵۷۴ ns	۲۸/۴۲۳ ns	۷۴۴۶۵۶۱۰۴/۲ ns
شوری	۱	۹۷/۳۰۷ **	۲۳۱/۶۵۹۸ **	۹/۶۸۶۸ ns	۱۴۲/۲۶۹ **	۲۸/۷۲۳۳ **	۱۴۰/۶۸۸ **	۱۷۲۲/۹۱۴ **	۴۵۸۷۱۳۵۰۰۰۰ **
فراصوت	۳	۲۲/۱۹۴۶ **	۱۴/۵۰۴۱ **	۲۶۴/۵۰۱ **	۴۸/۶۸۲ **	۱۰۹/۵۶۰۷ **	۲۹۰/۸۲۳ **	۱۳۰/۴۲۱ **	۲۴۵۶۹۹۹۲۰۰۰ **
فراصوت شوری	۳	۰/۷۰۲۶ **	۲/۷۷۴۸ **	۵۰/۶۵۲۲ **	۰/۴۴۷۲ **	۷۰/۹۹۶ **	۲۵/۴۳۵ **	۲۷/۷۶۵ **	۱۴۱۳۹۲۰۲۷۷۷۸ **
خطا	۱۴	۰/۶۵۸۴	۰/۹۱۴۰	۲/۱۴۹۵	۲/۸۰۰۱	۷/۸۴۵۰	۳/۳۶۸	۳/۴۶۴	۸۹۳۴۸۷۴۶۲۸
CV		۸/۱۹۱۰	۶/۳۹۹۷	۲/۱۱۲۳	۱۳/۵۳۲۲	۲۱/۰۸۴	۷/۹۷۲	۴/۸۰۹	۱۰/۰۹۹۶۷

** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۱٪

ادامه جدول ۱-

منابع تغییرات	DF	آتوسیانین	کلروفیل کل	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتونوئید ۱۰۳ ×	فل درون سلولی ۱۰۳ ×	گلیسیرون	قند محلول	MDA
تکرار	۲	۰/۰۰۲ ns	۰/۳ ns	۰/۰۰۵ ns	۰/۰۰۲ ns	۰/۰۰۸ ns	۰/۰۴ ns	۱۰/۶۰۸ ns	۷۲۷/۸ ns	۰/۰۰۰۰۰۳ ns
شوری	۱	۰/۰۰۳ **	۱۶۴/۷ **	۷۴/۴ **	۱۷/۶ **	۱۷۰/۰ **	۲۵۴۱/۰ **	۹۸/۴۹۰ **	۳۸۳۹۷۹ **	۰/۰۰۰۹۳ **
فراصوت	۳	۰/۰۳۱ **	۵۲/۴ **	۲۸/۱۱ **	۴/۰ **	۹/۰ **	۱۷۰۳/۰ **	۴۷/۵۰۶ **	۲۹۰۹۲/۵ **	۰/۰۰۰۹۶ **
شوری	۳	۰/۰۰۱ **	۵/۰ **	۲/۴ **	۰/۵ **	۱۴۴/۰ **	۱۰/۳ **	۱/۲۶۸ **	۲۰۳۹/۸ **	۰/۰۰۰۰۸ **
خطا	۱۴	۰/۰۰۰۲	۲/۱	۱/۰	۰/۲	۰/۵	۲۰/۰	۰/۲۶۵	۲۶۹/۴	۰/۰۰۰۰۲
CV		۳/۴۵	۹/۵۶	۸/۶۰	۱۳/۸۲	۹/۱۰۹	۹/۸۸	۵/۳۲	۷/۶	۹/۹۸۰۸

** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۱٪ ns

جذب پتاسیم توسط سلول‌ها در اثر رقابت با سدیم کاهش می‌یابد، به طوری‌که کاهش K^+ سبب کاهش فعالیت آنزیم‌ها، فتوستترز، ستز پروتئین و انتقال مواد می‌شود که این امر ممکن است منجر به آسیب به سلول‌ها شده و رشد کاهش یابد. از طرفی تنش شوری منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده از این طریق تنش وارد شده به سلول‌ها را تشدید می‌کند (Orcutt and Nielsen, 2000). این اثرات سبب کاهش فعالیت‌های متابولیکی از جمله فتوستترز شده و از رشد سلول‌ها در محیط‌های با شوری بسیار بالا می‌کاهد (Marschner, 1995. Greenway and Munds, 1980) بررسی‌های معین و شریعتی (۱۳۸۹) در اثر همزمان سالیسیک

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 این طریق مانع رشد و تکثیر سلول‌ها گردد. تنش شوری از طریق سمت 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).

۲ و ۳ 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 امواج فراصوت در غلظت شوری ۳ مولار به یک میزان 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 به طور جدیدی ساخته شوند، به طور مثال اسید آمینه متیونین به تنش اکسیداتیو بسیار حساس بوده و اکسایش متیونین به متیونین سولفواکسید (Met so) منجر به تغییر فعالیت آن و تشکیل بسیاری از پروتئین‌ها می‌شود (Davies, 2005) و یا به طوری نهادین در غلظت‌های پایین وجود داشته و هنگامی که سلول‌ها در معرض شوری قرار می‌گیرند، غلظت آنها افزایش می‌باید، و اینکه طبق نتایج بدست آمده در گذشته امواج فراصوت با شدت پایین بیوسنتز پروتئین‌ها را در سلول‌ها و پروتوبلاست‌های چغندر قند افزایش داد (Joersbo and Rundstedt, 1992). همچنین امواج فراصوت به عنوان یک الیستیور باعث تحریک ژن‌ها شده و به دنبال آن منجر به افزایش پروتئین‌ها و آنزیم‌های سیگنال و تولید متابولیت‌های ثانوی شده، به صورتی که با تابش امواج فراصوت بر سلول‌های بنیادی گل داودی محتوای RNA افزایش یافت و در پی آن 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 تجمعی اثرات آن‌ها بر سلول شده و منجر به پاسخ قویتری از سلول‌ها شد.

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

اسید و تنش شوری بروی 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 امواج فراصوت 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 تأثیر 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*) منجر به 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 کش 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 از نظر رشد و زنده بودن تحت تأثیر قرار دادند به نظر می‌رسد در حالت ترکیبی اثر آنها تجمیع پیدا کرده و یا اثر هم‌دیگر را تقویت کرده و بنابراین به صورت موثرتر منجر به کاهش صفت مورد بررسی گردیدند.

محتوی پروتئین: طبق نتایج به دست آمده در جدول ۲ میزان پروتئین سلول‌های جلبک با افزایش غلظت شوری و افزایش زمان تابش امواج فراصوت بیشتر شد. در غلظت نمک‌های

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

کاروتوئید (ng/cell)	کلروفیل کل (ng/cell)	کلروفیل b (ng/cell)	کلروفیل a (ng/cell)	پروتئین (ng/cell)	تعداد سلول (cell/ml)	فراصوت (دقیقه)	شوری (M)
۰/۱۸۶۱۳ ^d	۰/۷۱۰۸۵ ^a	۰/۱۸۱۰۵ ^a	۰/۵۲۹۸ ^a	۲۱/۸۹۹ ^c	۱۵۹۱۶۶۷ ^a	۰	
۰/۱۹۳۵۰ ^d	۰/۵۸۱ ^b	۰/۱۰۵۳۶۱ ^{ab}	۰/۴۲۷۳۹ ^b	۳۰/۳۲۱ ^d	۹۹۷۵۰۰ ^b	۲/۵	۲
۰/۲۵۲۷۶ ^{bc}	۰/۵۵۸۱۲ ^{cd}	۰/۱۴۰۳۲ ^{bc}	۰/۴۱۷۸ ^b	۳۰/۲۵۷ ^d	۸۹۹۱۶۷ ^{bc}	۵	
۰/۲۵۷۶۶ ^{bc}	۰/۴۳۱۷۷ ^{de}	۰/۰۹۹۳۷ ^{de}	۰/۳۳۲۴ ^{cd}	۳۸/۴۱۶ ^c	۸۰۸۳۳۳ ^{cd}	۱۰	
۰/۲۱۹۰۵ ^{cd}	۰/۴۹۱۱۹ ^{bc}	۰/۱۱۲۷۹ ^{cd}	۰/۳۷۸۴ ^{bc}	۴۳/۲۹۱ ^b	۸۵۶۶۶ ^{bcd}	۰	
۰/۲۶۹۸۴ ^b	۰/۴۴۷۷۴ ^{de}	۰/۰۹۳۴۴ ^{def}	۰/۳۵۴۳ ^c	۴۸/۲۲۸ ^a	۸۳۴۳۳۳ ^{bcd}	۲/۵	۳
۰/۲۷۷۰۴ ^b	۰/۳۵۹۹۳ ^e	۰/۰۸۳۰۳ ^{ef}	۰/۲۷۶۹ ^{de}	۴۷/۶۷۸ ^a	۷۸۶۶۶۷ ^{cd}	۵	
۰/۳۳۲۲۳ ^a	۰/۳۲۰۰۸ ^c	۰/۰۶۷۹۸ ^f	۰/۲۵۲۱ ^e	۴۹/۴۷۹ ^a	۷۱۳۰۰ ^d	۱۰	

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

ادامه جدول ۲

فلاونوئید (330 nm) (pM/cell)	فلاونوئید (300 nm) (pM/cell)	فلاونوئید (270 nm) (pM/cell)	MDA (pM/cell)	قندهای محلول (pg/cell)	فراصوت (دقیقه)	شوری (M)
۷/۰۸۹ ^f	۵/۵۷۵ ^c	۸/۵۳ ^d	۰/۰۱۹۳ ^f	۱۰۶/۸۰ ^g	۰	
۹/۵۶۴ ^e	۱۲/۰۹۹ ^{ab}	۲۰/۴۹۴ ^c	۰/۰۳۵۰ ^e	۱۵۶/۵۱ ^f	۲/۵	۲
۱۰/۷۸۶ ^{de}	۱۴/۰۴۴ ^a	۲۴/۱۶۴ ^b	۰/۰۴۸۸ ^{bcd}	۲۰۵/۲۵ ^{cd}	۵	
۱۳/۲۸۶ ^{bcd}	۱۶/۵۴۱ ^a	۲۹/۲۰۷ ^a	۰/۰۵۴۹ ^b	۲۳۰/۲۵ ^c	۱۰	
۱۱/۶۸۸ ^{cde}	۸/۳۶۹ ^{bc}	۱۷/۵۸۴ ^c	۰/۰۴۲۳ ^{de}	۱۷۲/۳۲ ^{ef}	۰	
۱۴/۰۹۴ ^{bc}	۱۶/۱۵۱ ^a	۲۷/۶۹۹ ^a	۰/۰۴۶۵ ^{dc}	۱۹۵/۶۳ ^{de}	۲/۵	۳
۱۵/۱۶۷ ^b	۱۷/۲۵۳ ^a	۲۷/۴۴۶ ^a	۰/۰۵۳۹ ^{bc}	۲۹۴/۶۵ ^b	۵	
۱۸/۲۵۳ ^a	۱۵/۷۴ ^a	۲۹/۰۳۷ ^a	۰/۰۶۵۱ ^a	۳۵۶/۱۹ ^a	۱۰	

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

ساختمان‌های درونی سلول‌های جلبک *D. salina* به دلیل داشتن کلروفیل و کلروپلاست و انجام فتوسترنز تا حدود زیادی شبیه به ساختمان درونی سلول‌های گیاهان می‌باشد. کاهش در غلاظت کلروفیل یک نشانه بارز از تنفس اکسیداتیو است (Egret and Tevin, 2002)، که از هم‌پاشیدگی غشاء و کاهش کلروفیل از پیامدهای آن می‌باشد. کاهش کلروفیل می‌تواند حالتی از خوگیری سلول‌ها به تنفس باشد چراکه امکان آسیب بیشتر به دستگاه فتوسترنز را با تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط زیادی انژری کاهش می‌دهد (Jung, 2004). همچنین

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 در اثر 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* و *b* و کلروفیل کل را باعث شده است.

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. کاروتوئنیدها گروه بزرگی از مولکول‌های ایزوپروپونئید هستند که توسط اندام‌های فتوستتری ساخته می‌شوند (Andrew *et al.*, 2008)، که یکی از رنگیزه‌های کلیدی و مهم سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاهان هستند، اما آنها به تخرب اکسیداتیو بسیار حساس می‌باشند. برطبق نتایج بدست آمده در این آزمایش با افزایش زمان تابش امواج فراصوت و افزایش غلظت NaCl میزان کاروتوئنید سلول‌ها کاسته شد. برطبق مشاهدات Nikokar و همکاران (۲۰۰۴) که تأثیر شوری بر روند رشد و رنگیزه‌ها و آسکوربات پراکسیداز را در جلبک *D. salina* بررسی کردند، بیشترین مقدار رنگیزه‌ها و کاروتوئنید در روز بیست و هشتمن 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 بیوسنتر رنگیزه‌ها در جلبک *D. salina* بین ۳/۵ تا ۰/۴ مولار انجام شده بود، نشان داده شد که مقدار کاروتوئنید تولید شده از رابطه خاصی تعیت نمی‌کند و Gomez و همکاران (۲۰۰۳) نیز این نتایج را اذعان کردند. تابش امواج فراصوت در زمان‌های بیشتر به عنوان یک تنفس اکسیداتیو برای سلول به شمار می‌رود و سلول با افزایش میزان کاروتوئنید درون سلولی خود به عنوان آنتی‌اکسیدان به مقابله با تنفس می‌پردازد. تابش امواج *Porphyridium ceruentum* باعث افزایش میزان ۲۷٪ در کاروتوئنید سلول‌ها گردید و کاروتوئنیدها در جلوگیری از تنفس 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 شاهده مشاهده شود. به صورتی که بیشترین مقدار قندهای محلول در سلول‌هایی مشاهده شد که به مدت زمان ۱۰ دقیقه در معرض تابش امواج فراصوت و در غلظت شوری ۳ مولار قرار گرفته بودند. این میزان تقریباً ۳/۳ برابر مقدار

با افزایش میزان شوری میزان کلروفیل کل و نیز مقدار کلروفیل *a* و کلروفیل *b* کاهش یافت. جریان یون سدیم (Na^+) پتانسیل غشاء را بهم می‌ریزد و جذب یون (Cl^-) را تسهیل می‌کند. یون کلر موجب کاهش تولید ریبیولوزیس فسفات شده و از این طریق به جذب و مصرف گاز کربنیک و درنهایت انجام عمل فتوستتر آسیب می‌رساند و در ضمن Na^+ باعث تولید اشکال فعال اکسیژن می‌شود (Mahajan and Tuteja, 2005) 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 (۲۰۰۴) که تأثیر تنفس 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 ۴ مولار میزان کلروفیل کاهش یافت. در طی تحقیقی توسط معین و شریعتی (۱۳۸۹) اثر همزمان سالیسیک اسید و تنفس شوری بر روی رشد، تقسیم سلولی، رنگیزه‌های فتوستتری و مقدار بتا-کاروتین در جلبک *D. salina* مورد بررسی قرار گرفت و طبق نتایج بدست آمده نشان داده شد که تنفس شوری و سالیسیک اسید به علت کاهش در تراکم سلولی، کاهش میزان کلروفیل را در پی داشت. همچنین در ارزیابی ارقامی از سورگوم، گیاهان در شرایط تنفس شوری، کاهش میزان کروفیل کل، کروفیل *a* و *b* در نمونه‌های مورد آزمایش گزارش شده است (یارنیا، ۱۳۸۶). برهمکنش شوری با فراصوت باعث تقویت اثر آنها روی مقدار کلروفیل کل گردید. با توجه به اینکه هر یک از آنها در حالت انفرادی به صورت نوعی تنفس سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دادند در حالت ترکیبی اثر همدیگر را تقویت کرده و بنابراین به صورت موثرتر منجر به کاهش کلروفیل *a* و کل شدند.

کاروتوئنید: بررسی میزان کاروتوئنید موجود در سلول‌ها در تیمارهای مختلف (جدول ۲) نشان داد که با افزایش غلظت شوری و افزایش زمان تابش امواج فراصوت بر میزان این ترکیبات افزوده شد. بیشترین میزان کاروتوئنید در سلول‌های

اکسیداتیو که توسط استرس حاصل از الیستورها بر سلول ایجاد می‌شود، پراکسید هیدروژن و رادیکال سوپراکسید تشکیل می‌شود، رادیکال‌های ایجاد شده باعث پراکسیداسیون غشاء شده و ساختار پروتئین‌های غشائی را تغییر می‌دهند (Wang, 1999)، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و افزایش مالون دی‌آلدهید به عنوان 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، تنفس شوری باعث افزایش سطح مالون دی‌آلدهید در جو و در دو گونه از چغندر شده است (El tayeb, 2005). افزایش سطح مالون دی‌آلدهید در تنفس 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 Rezae (Wu and Gee, 2004) و همچنین در تحقیقات گردید (Fischer and Hull, 1991) که امواج فراصوت به همراه متیل جاسمونات باعث افزایش در تولید مالون دی‌آلدهید در سلولهای فندق شد. در تحقیقی که توسط Wu و Lin (2002) 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 ۴۸/۶٪ در نشت الکتروولیت‌ها در سلول‌های جلبک قرمز (*Cruentum porphyridium*)، پس از تابش امواج فراصوت مشاهده شد (Chen *et al.*, 2008). با توجه به اینکه هر یک از این استرس‌ها در حالت انفرادی به صورت نوعی تنفس سلول‌ها را تحت تاثیر قرار دادند در حالت ترکیبی اثر همدیگر را تقویت کرده و بنابراین به صورت موثرتر منجر به 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 فلاونوئید اندازه‌گیری شده سلول‌ها در غلظت

قدنهای 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 تنفس شوری تجمع قندها به همراه محلول‌های سازگار دیگر به پایداری غشاء سلولی و پروتئین‌ها کمک می‌کند (Sanchez *et al.*, 1998). گاهی در تنظیم اسمزی در هنگام بروز تنفس شوری مولکول‌های پلیمری به مولکول‌های کوچک شکسته می‌شوند، به عنوان مثال نشاسته به ساکارز و سپس به مولکول‌های کوچک‌تری مانند گلوكز و فروکتوز تبدیل می‌شوند. بنابراین افزایش در غلظت قندهای محلول ممکن است نتیجه تجزیه نشاسته باشد (El Tayeb, 2005). 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 (Dubey and Singh, 1999). Binzel *et al.*, 1989 برطبق این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که برهم‌کش 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 الکتروولیت‌ها 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 تنفس‌های

فلاؤنونئیدی 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 دی‌آلدید (MDA) در سلول‌ها جهت محافظت از اجزای سلولی، اسیدهای چرب غیراشبع، 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 فلاؤنونئید از جمله آنتی اکسیدانی، آنتی میکروبی، ضدالتهاب و واژودیلاتور (گشاد کننده رگ‌ها) آنها در بسیاری از بررسی‌ها گزارش شده است (Jamshidi *et al.*, 2010). در کل در تنش‌های محیطی مانند زخم‌های مکانیکی، حمله پاتوژن‌ها، تنش سرمایی، تنش نوری بالا، کمبود مواد غذایی و تنش‌های شوری، افزایش مقدار فلاؤنونئید در سلول‌ها گزارش شده است (Dixon and Pavia, 1995).

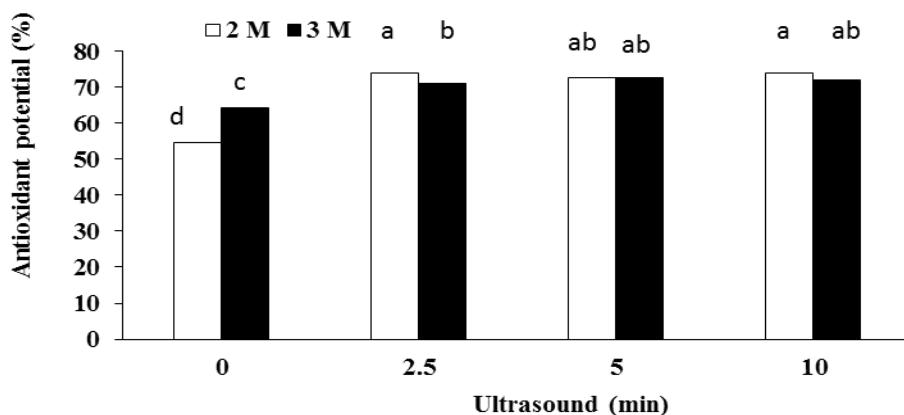
پتانسیل آنتی اکسیدانی: بر طبق داده‌های بدست آمده در شکل ۲ مشخص شد که درصد ترکیبات آنتی اکسیدانی در سلول‌های جلبک دونالیلا سالینا در هر دو غلظت شوری نمک ۲ و ۳ مولار NaCl در همهٔ تیمارها با افزایش زمان تابش امواج فراصوت نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. بدین صورت که در زمان‌های ۲/۵ و ۵ و ۱۰ دقیقه 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 آنتی اکسیدانی مربوط به غلظت ۲ مولار و تیمار شاهد فراصوت، بود. در اثر مواجه سلول‌ها با هرگونه تنش، از جمله 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 و سلول‌ها می‌شوند و در موقعی باعث فعل شدن مسیر علامت رسانی (سیگنانلینگ) سلولی و بروز پاسخ‌های دفاعی می‌گردند. این پاسخ دفاعی در برخی موارد به شکل افزایش تولید

شوری ۳ مولار در همهٔ زمان‌های تابش نسبت به شاهد افزایش یافت (البته میزان فلاؤنونئید موجود در غلظت شوری سه مولار و زمان‌های ۲/۵ و ۵ و ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت باهم تفاوت معنی‌داری نداشتند 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 و ۵ و ۱۰ دقیقه و غلظت شوری ۳ مولار و زمان‌های ۲/۵ و ۵ و ۱۰ دقیقه با افزایش غلظت شوری و زمان تابش امواج فراصوت میزان فلاؤنونئید سلول‌ها افزایش یافت.

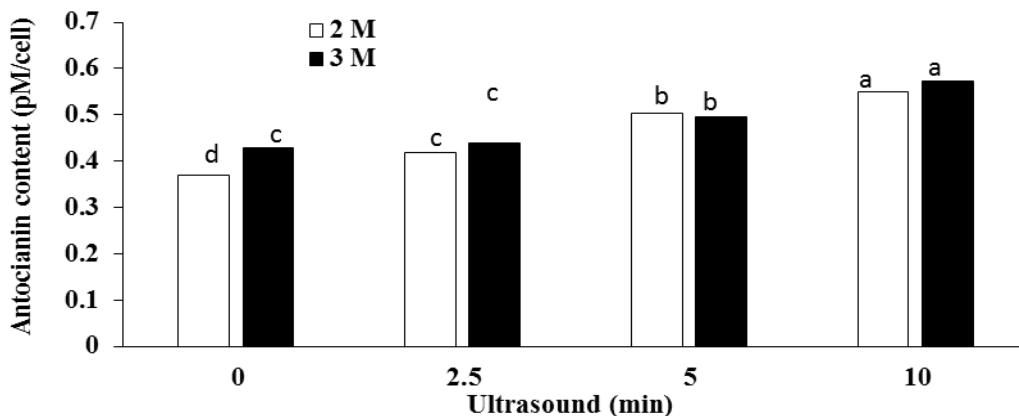
همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد با افزایش زمان تابش امواج فراصوت در هر دو غلظت شوری ۲ مولار و ۳ مولار نمک طعام افزایش معنی‌داری در میزان فلاؤنونئید طول موج ۳۰۰ نانومتر، نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید. به‌طوری که در هر دو گروه شاهد، در غلظت‌های ۲ و ۳ مولار کمترین میزان فلاؤنونئید و در بقیهٔ تیمارها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

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

در مجموع بر طبق نتایج به‌دست آمده میزان فلاؤنونئید محاسبه شده در هر سه طول موج ۲۷۰ و ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر با افزایش زمان تابش امواج فراصوت و غلظت شوری، افزایش یافت. سلول با استفاده از مکانیسم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌تواند غلظت گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهد و از این طریق از اثرات مخرب آن بکاهد. سلول‌ها با افزایش ترکیبات



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 معنی دار 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 معنی دار ندارند.

یک میزان (بدون داشتن اختلاف معنی دار) از شاهد افزایش داشتند و بیشترین میزان آنتوسیانین را به خود اختصاص داده بودند. کمترین میزان آنتوسیانین که اختلاف معنی داری با بقیه تیمارها نشان داد مربوط به غلظت شوری ۲ مولار و شاهد بود. ترکیبات آنتوسیانینی از جمله ترکیبات دفاعی بوده که سلول‌ها در زمان تنفس افزایش می‌دهند. مطالعات ارتباط مثبتی بین مقدار این ترکیبات و فعالیت آنتیاکسیدانی را نشان داده‌اند (Cain *et al.*, 2004). فعالیت آنتیاکسیدانی این ترکیبات اساساً به علت ویژگی‌های ردوکس آنها می‌باشد که سبب می‌گردد تا به عنوان عوامل احیا کننده، دهنده هیدروژن و خاموش کننده گونه‌های فعال اکسیژن نزیر H_2O_2 عمل نمایند. سلول‌ها تحت تنفس شوری از دو عامل تنفس اسمزی و اثرات اختصاصی

متابولیت‌های ثانوی مفید از جمله ترکیبات آنتیاکسیدانی می‌باشد (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 به عنوان سریعترین واحدهای مقابله کننده در برابر حمله اکسیژن‌های فعال در تنفس 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

(Boscaiu *et al.*, 2010). افزایش غلظت ترکیب‌های فنلی در شرایط تنش شوری در گیاهان مختلفی نظری (Muthukumarasamy *et al.*, 2000) *Raphanus sativus L.* و فلفل (Navarro *et al.*, 2006) گزارش شده است و نیز امواج فراصوت باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی در بادام زمینی شد (Wu *et al.*, 2010). همچنین تحقیقات Lin (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.

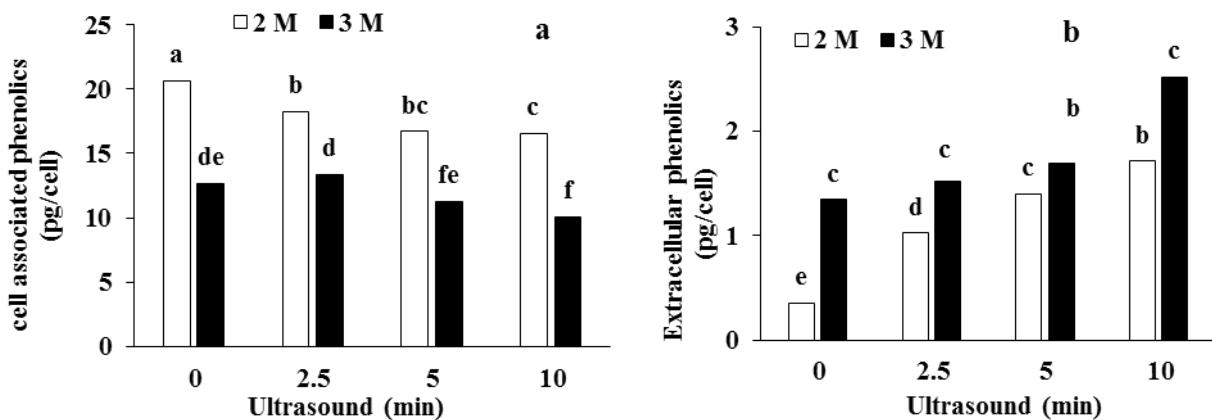
گلیسرول: طبق نتایج ارائه شده در شکل ۵ با افزایش میزان غلظت شوری و مدت زمان تابش امواج فراصوت بر میزان گلیسرول سلول‌های تحت تیمار، اضافه شد و افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان داد. بهاین صورت که بیشترین میزان گلیسرول مربوط به گروه شوری با غلظت ۳ مولار و ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت بود (۱۶/۰۸ pg/cell) و کمترین میزان گلیسرول در غلظت ۲ مولار و گروه شاهد تابش امواج فراصوت میزان گلیسرول ۳ برابر بیشتر شد.

این افزایش را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که در غلظت‌های 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 به حال تعادل در آورند. حل شوندهای اسمزی بسیاری، در ارگانیسم‌های هوایی شناسایی شده‌اند و گلیسرول ساده‌ترین حل شونده‌ی آلتی 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 ستز 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

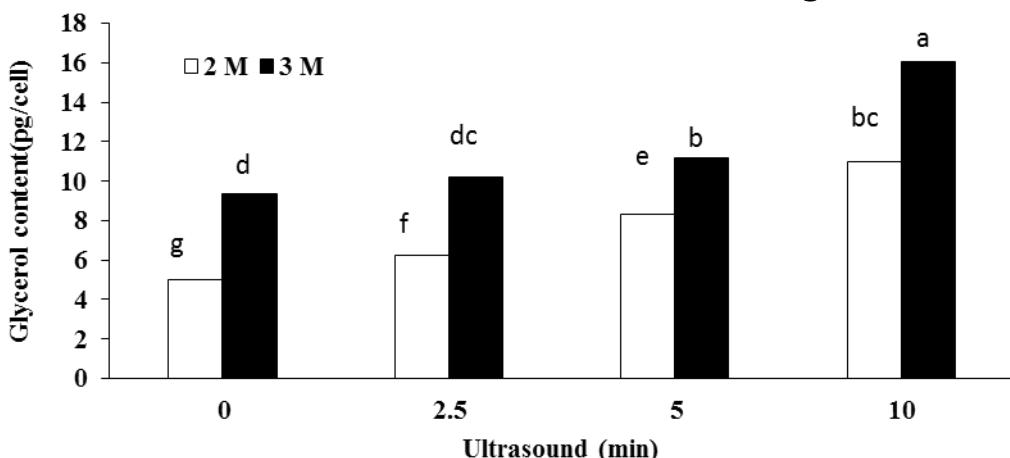
یون‌ها تأثیر می‌پذیرند. بنابراین تنش شوری از طریق القای اسمزی می‌تواند موجب القای تجمع آنتوکسین‌ها گردد زیرا که آنتوکسین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌های بالقوه‌ای می‌باشند (Cong *et al.*, 2008). تجمع آنتوکسین‌ها در ریشه‌های ذرت (Kaliathooray and Rao, 1994)، آرابیدوپسیس (Murray, 1994) و عشقه (Mishra *et al.*, 1997)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

ترکیبات فنلی: میزان ترکیبات فنلی برون سلولی اندازه‌گیری شده در سلول‌های جلبک *D. Salina* (شکل ۴) 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 (تقریباً ۷ برابر بیشتر از مقدار آن در ۲ 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 بهصورتی که مقدار آن از ۲۰/۶۷ (pg/cell) در غلظت شوری ۲ مولار و ۱۰ دقیقه تابش فراصوت، به ۱۰/۰۸ (pg/cell) 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 نشست 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.



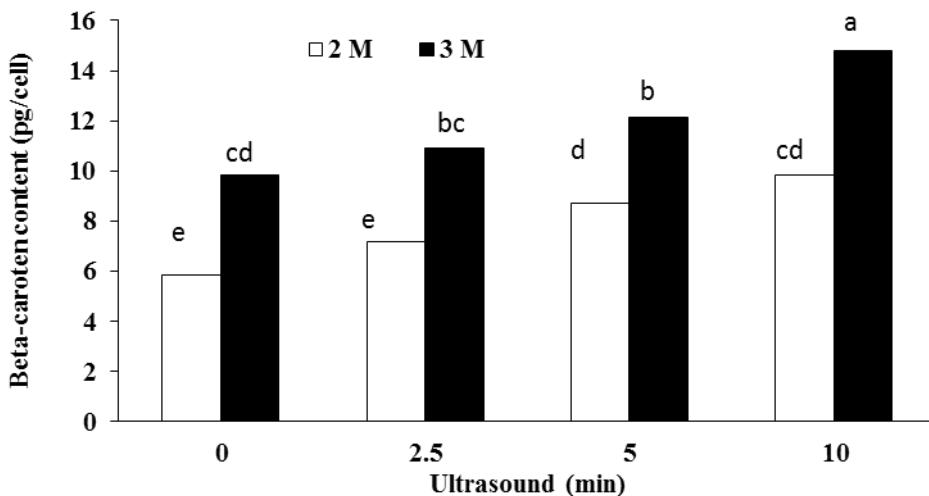
شکل ۴- اثر متقابل امواج فرماصوت و شوری بر محتوی ترکیبات فنلی درون سلولی (a) و برون سلولی (b) در کشت سلولی *D. salina* حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی دار ندارند.



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

(۲۰۰۶) 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 (GAPDH) 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* می باشد و با افزایش شوری دو مولار به چهار مولار میزان گلیسرول ۶۱/۴۳ درصد افزایش یافت در حالی که با کاهش شوری از ۲ مولار به ۰/۵ میزان گلیسرول ۵۲/۰۵ درصد کاهش یافت آنها پیشنهاد

نمی کند (Oren, 2007). طی بررسی های Avron و Amotz (۱۹۷۳) بر جلبک *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 می باشد. در پی اثرات استرس اسمزی بر میزان گلیسرول جلبک *D. salina* و همکاران Zhou که توسط



شکل ۶- اثر متقابل امواج فراصوت و شوری بر محتوی بتا-کاروتون سلول در کشت سلولی *D. salina* حروف مشترک براساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی دار ندارند.

افزایش گلیسرول گردیدند.

بتا کاروتون: بر طبق داده‌های به دست آمده در شکل ۶، با افزایش میزان غلظت شوری و افزایش زمان تابش امواج فراصوت میزان بتاکاروتون سلول‌های جلبک *D. salina* افزایش معنی‌داری را در همه تیمارها نسبت به گروه شاهد نشان داد. بیشترین میزان بتاکاروتون در غلظت شوری ۳ مولار و زمان ۱۰ دقیقه تابش امواج فراصوت ($14/81$ pg/cell) مشاهده شد و کمترین میزان بتاکاروتون مربوط به غلظت شوری دو مولار و زمان شاهد ($5/84$ pg/cell) بود.

استرس‌های محیطی باعث افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن در سلول می‌شود. افزایش فعالیت ترکیبات آنتی اکسیدانی از جمله بتاکاروتون به عنوان سریع‌ترین واحدهای مقابله کننده در برابر حمله اکسیژن‌های فعال در شرایط تنفس گزارش شده است (Satyendra *et al.*, 1999). جلبک *D. salina* به دلیل نداشتن دیواره سلولی محکم در پاسخ به تغییرات خارج سلولی هیپو یا هیپراسموتیکی مثل شوری‌های بالا با تجمع بتاکاروتون 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 ۴۰ درصدی روی تولید بتاکاروتون، در جلبک *D. salina* نشان داد

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 $0/5$ تا $5/3$ مولار جهت سنجش میزان گلیسرول نشان داد که هرچه شوری زیاد می‌شود تولید گلیسرول داخلی سلولی به ازای 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 اوخر فاز لگاریتم غلظت $NaCl$ محیط کشت به $5/3$ مولار افزایش یابد گلیسرول بیشتری تولید خواهد شد. از طرف دیگر امواج فراصوت به عنوان ایسیستوری برای تحریک سلول‌ها جهت تولید گلیسرول بیشتر، به کار 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 می‌دهد (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 تنفس سلول‌ها را تحت تاثیر قرار دادند به نظر می‌رسد در حالت ترکیبی اثر آنها تجمعی پیدا کرده و یا اثر هم‌دیگر را تقویت کرده و بنابراین به صورت موثرتر منجر به

مرداب گاوخونی اصفهان تحت غلظت‌های ۰/۵ - ۴ مولار و شرایط نور زیاد و کم انجام شد نشان دادند که افزایش میزان شوری سبب افزایش مقدار بتا کاروتون در محیط کشت می‌گردد.

نتیجه گیری:

در این تحقیق پارامترهای چون پروتئین کل، پتانسیل آتنی اکسیدانی، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسینین‌ها، بتاکاروتون و گلیسرول تحت اثر تیمارها افزایش یافت. بیشترین میزان بتاکاروتون و گلیسرول در حالت تیمار تلفیقی تابش امواج فراصوت و شوری، به مقدار ۱۴/۸ و ۱۶/۰۸ میلی گرم در لیتر به ترتیب اندازه گیری شد. به نظر می‌رسد امواج فراصوت و شوری ضمن تقویت اثر یکدیگر بر سلول‌ها، با تحریک سلول‌ها و القای پاسخ‌های دفاعی و متابولیت ثانویه، باعث افزایش مقدار بتاکاروتون و گلیسرول گردیدند. با توجه به اینکه تهیه و به کارگیری 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 بتاکاروتون نماید که یکی از اهداف مهم تولید تجاری این ماده مهم جهت مصارف مختلف غذایی، دارویی و صنعتی است.

که با افزایش شوری تا میزان ۲۵ درصد مقدار بتا کاروتون نیز افزایش یافت و در شوری‌های بالاتر این میزان کاهش یافت. هم‌چنین در تحقیقات Takagi و همکاران (۲۰۰۶) به دست آمد که افزایش غلظت‌های مختلف نمک تا یک میزان (شوری ۲۵ درصد) باعث افزایش غلظت بتاکاروتون گردید و اما در غلظت‌های بسیار بالاتر نمک، مقدار بتا کاروتون کمتر شد. جلبک *D. salina* در شرایط استرس شوری مقدار زیادی بتاکاروتون را در خود ذخیره می‌کند اما 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 بتاکاروتون در جلبک *D. salina* شد. طی تحقیقاتی که توسط Gomez و همکاران (۲۰۰۳) و Amotz و همکاران (۱۹۸۸) بر روی اثرات شوری بر تجمع کاروتونوئیدها در *D. salina* و *D. bardawil* انجام شد ثابت کردند که افزایش نمک باعث افزایش تولید بتاکاروتون شد Cifuentes و Fazeli و همکاران (۲۰۰۶) و همچنین تحقیقات Garcia و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند که شوری ۲/۹ درصد بر روی *D. tertaelecta* باعث افزایش قابل ملاحظه‌ی بتاکاروتون در درون سلول شده است. طی تحقیقی که شریعتی و مددکار (۱۳۷۹) با بررسی روی جلبک *D. salina* جداسازی شده از

منابع:

- سلمانی نژاد، م. (۱۳۹۱) اثرات نور و شوری بر کاروتونوئید *Dunaliella salina* دریاچه ارومیه. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شریعتی، م.، مددکار حق جو، م. (۱۳۷۹) بررسی اثر تنش شوری بر میزان بتاکاروتون و کلروفیل محتوای جلبک تک سلولی *Dunaliella salina* جدا شده از مرداب گاوخونی اصفهان. مجله زیست‌شناسی ایران. ۱۴ (۲): ۵۵-۶۶.
- 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.*) زیست‌شناسی گیاهی. ۷: ۵۵-۷۲.
- قاسمی، ح.، مظاہراسدی، م. و کیانی‌راد، م. (۱۳۷۹) بررسی میزان گلیسرول در جلبک *Dunaliella salina*. پژوهش و سازندگی. ۸۸-۸۴ (۴): ۱۳.

- معین، م. و شریعتی، م. (۱۳۸۹) اثر هم زمان سالیسیک اسید و تنش شوری بر روی رشد (تقسیم سلولی) رنگیزه‌های فتوستزی و مقدار بتا کاروتون در جلبک *Dunaliella salina*. مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۳(۵): ۶۴۸-۶۳۸.
- مقدسی، ز.، امتیازجو، م.، ربانی، م.، آذرگشتب، ا. و مصطفی، ن. (۱۳۹۰) پتانسیل تولید بتاکاروتون از جلبک *Dunalilla salina* در یاچه شاهی تحت استرس شوری. مجله شیلات دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آذربایجان. ۹۳(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(۱-۴): 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 canephora 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., Vandenebeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F. (2000) Dual action of the active oxygen species 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 *Silene 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.

- 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 Botany* 48: 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 β -carotene 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-Pelegriñ, 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 Mandenius, 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.

- 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 Maharl 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 and mycosporine-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.

- 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.

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

Roghayyeh Mokhberi¹, Ayatollah Rezaei^{2*} and Alaeedin Kordenaeej²

¹Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Payame-Noor University, Tehran, Iran, ²Department 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