

القای تحمل به تنش ناشی از عصاره اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* از طریق تعدیلات متابولیکی و تولید بتاکاروتن

سحر مزنگ قاسمی^۱، علیرضا عینعلی^{۱*}، جعفر ولیزاده^۱ و میثم نوروزی فر^۲
^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
^۲ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

چکیده

آثار مفید یا زیانبار یک گیاه بر سایر گیاهان از طریق آزاد کردن ترکیبات شیمیایی موسوم به آلوکمیkal ها به محیط، آلوپاتی نامیده می‌شود. در پژوهش حاضر، اثر آلوپاتیک عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* L.) بر الگوی رشد و قابلیت تولید بتاکاروتن در جلبک سبز تک سلولی *Dunaliella salina* مطالعه شده است. بررسی عصاره‌ها نشان داد که میزان ترکیبات فنلی و همچنین قدرت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها نسبتاً پایین است. تیمار کشت‌های جلبکی با غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد عصاره نشان داد که روند تقسیم سلولی در مقایسه با شاهد متوقف می‌شود. با وجود این، غلظت کلروفیل و بتاکاروتن در این کشت‌های جلبکی به شدت افزایش می‌یابد و بالاترین مقادیر آنها در کشت‌های تیمار شده با غلظت ۳ درصد عصاره مشاهده می‌شود. درصد تغییرات وزن تر سلول‌ها، میزان قندهای محلول و غلظت پروتئین‌ها بین زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره متناسب با بالا رفتن غلظت عصاره افزایش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های *D. salina* می‌توانند تنش ایجاد شده توسط عصاره‌ها را از طریق تعدیلات متابولیک تحمل کنند. بنابراین، به نظر می‌رسد که سازوکارهای تحمل جلبک به آلوکمیkal ها با تعدیلات فیزیولوژیک و متابولیک همراه است و از طریق هدایت جریان کربن در جهت تولید بتاکاروتن، قندهای محلول و کلروفیل، سبب القای تحمل جلبک به شرایط تنش آلوپاتی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آلوکمیkal ها، اسطوخودوس، بتاکاروتن، متابولیت، *Dunaliella salina*

مقدمه

شیمیایی موسوم به آلوکمیkal ها به محیط، دارای

تأثیرات آلوپاتیک بر تمام جنبه‌های رشد و

اغلب گیاهان به واسطه آزاد کردن ترکیباتی

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: aeinali@science.usb.ac.ir، شماره تماس: ۰۵۴۳۱۱۳۶۳۳۸

ممانعت از رشد ریشه گیاه کاهو نیز گزارش شده است (Itani et al., 2013).

جلبک *Dunaliella*، یک جلبک سبز تک سلولی بدون دیواره و حایز اهمیت از لحاظ اقتصادی و بیوتکنولوژیک به شمار می‌رود و به دلیل تحمل و انعطاف‌پذیری بسیار بالا نسبت به شرایط نامساعد محیطی به عنوان یک سیستم مدل جهت مطالعه فیزیولوژی تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد (Avron and Ben-Amotz, 1992؛ and Ben-Amotz, 1992). این جلبک، منبع شگفت‌انگیز و فوق‌العاده‌ای از بتاکاروتن طبیعی است (Avron and Ben-Amotz, 1992). بتاکاروتن یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی است که در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی-بهداشتی کاربرد فراوان دارد (Chidambara Murthy et al., 2005؛ Dufosse et al., 2005). این جلبک، در پاسخ به شرایط نامساعد محیطی قادر به تولید مقادیر بسیار بالای بتاکاروتن است (Ben-Amotz and Avron, 1983؛ Salguero et al., 2003؛ Cowan et al., 1992). با توجه به این امر، می‌توان چنین تصور نمود که این جلبک می‌تواند از طریق محدود کردن رشد و تغییر در میزان بتاکاروتن به تنش حاصل از آلوکمیkal ها پاسخ دهد. عمده مطالعات آلوپاتیک، بر تأثیرات آلوکمیkal ها روی جوانه‌زنی و رشد علف‌های هرز تمرکز یافته و در مورد تأثیر احتمالی این ترکیبات بر رشد و نمو جلبک‌ها هنوز مطالعه‌ای صورت نگرفته است. از این رو، در تحقیق حاضر سعی شده است تا اثر عصاره‌های آبی حاصل از برگ گیاه اسطوخودوس بر روند رشد و تولید بتاکاروتن در جلبک سبز تک سلولی *D. salina* مشخص شود. همچنین، میزان ترکیبات فنلی

فیزیولوژیک سایر گیاهان هستند (Singh et al., 2003؛ Narwal, 2010). آلوکمیkal ها تقریباً در همه گیاهان و بافت‌های آنها مثل: برگ، ساقه، ریشه، گل و میوه وجود دارند (Weston and Duke, 2003). این ترکیبات به صورت محلول یا نامحلول در آب هستند و در مسیرهای متابولیک اصلی گیاهان تولید می‌شوند (Swain, 1977). برهمکنش‌های آلوپاتیک گیاهان می‌تواند دارای آثار مفید یا زیانبار باشد و از طریق بررسی برخی سازوکارهای فیزیولوژیک مثل جوانه‌زنی و رشد و نمو گیاه که در حضور آلوکمیkal ها ممانعت یا تحریک می‌شوند، ارزیابی می‌گردد (Suman et al., 2002؛ Weston and Duke, 2003).

اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* L.) یک گیاه علفی معطر و دارویی است. این گیاه در طب سنتی برای درمان بسیاری از اختلالات گوارشی و عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. عصاره‌ها و اسانس‌های روغنی گل‌ها و بخش‌های هوایی این گیاه دارای اثر ضد افسردگی، ضد تشنج، آرام‌بخش و همچنین اثر ضد میکروبی و ضد قارچی است (Leung and Foster, 1996؛ and Foster, 1996؛ Ghelardini et al., 1999؛ Kim and Cho, 1999؛ Hohmann et al., 1999). مطالعات فیتوشیمیایی نشان می‌دهد که برخی از مونو و سزکویی‌ترین‌ها، فلاونوئیدها و کومارین‌ها از اجزای اصلی تشکیل دهنده بخش‌های هوایی و گل‌های این گیاه هستند (Renaud et al., 2001؛ Leung and Foster, 1996). مطالعات آلوپاتیک نشان‌دهنده تأثیر بسیار منفی عصاره‌های آبی گل‌های این گیاه بر جوانه‌زنی و نمو بسیاری از علف‌های هرز است (Petrova et al., 2015). همچنین، تأثیر عصاره‌های آبی این گیاه بر

میزان فلاونوئید کل عصاره با استفاده از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم تعیین شد (Chang *et al.*, 2002). مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره آبی با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر سدیم استات ۱ مولار مخلوط شد. حجم نهایی مخلوط با آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب مخلوط حاصل پس از نگهداری آن به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد. میزان فلاونوئیدهای کل با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه و بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه بیان شد.

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس با استفاده از روش‌های دی‌فیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی احیاکنندگی آهن (FRAP) تعیین گردید.

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس از طریق خنثی‌سازی رادیکال DPPH با استفاده از روش Kukic و همکاران (۲۰۰۸) همراه با تغییرات جزیی اندازه‌گیری شد. مقادیر عصاره‌های با غلظت‌های مختلف (از ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH مخلوط و حجم نهایی آن با متانول به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از متانول به عنوان بلانک تعیین شد. یک مخلوط بدون عصاره متشکل از ۱ میلی‌لیتر محلول رقیق شده در ۲ میلی‌لیتر متانول به عنوان شاهد استفاده شد. میزان خنثی‌سازی رادیکال DPPH

و خاصیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها و ارتباط آن با پاسخ جلبک بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تهیه عصاره: گیاه اسطوخودوس از باغ گیاه‌شناسی دانشگاه سیستان و بلوچستان جمع‌آوری، برگ‌های آن جدا و در معرض هوا و به دور از نور مستقیم خورشید خشک شد. برگ‌های این گیاه پس از خشک شدن با آسیاب برقی پودر شد. مقدار ۱۰ گرم از پودر حاصل با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت روی همزن برقی در درجه حرارت اتاق قرار گرفت. عصاره‌ها با عبور از دو لایه پارچه ململ صاف و سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ مجدداً صاف شدند. محلول صاف شده حاصل با غلظت ۱۰ درصد به عنوان منبع آلودگی‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی و

فلاونوئیدهای کل در عصاره: میزان ترکیبات فنلی در عصاره‌های آبی به دست آمده از برگ‌های گیاه اسطوخودوس با استفاده از معرف فولین اندازه‌گیری شد (Singleton *et al.*, 1999). مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره گیاهی با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۱۰ درصد مخلوط و پس از ۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق، ۲ میلی‌لیتر محلول Na_2CO_3 ۵ درصد به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق و تاریکی نگهداری و جذب آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. میزان ترکیبات فنلی با استفاده از منحنی استاندارد کتکول (catechol) محاسبه و بر اساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه بیان شد.

منابع تأمین و کشت جلبک: *Dunaliella*

salina سویه UTEX 200 در پژوهش حاضر از مجموعه کشت جلبک دانشگاه اصفهان تهیه شد. جلبک‌ها در محلول غذایی تعدیل شده جانسون با غلظت ۱/۵ مولار NaCl، بر اساس روش‌های یاد شده در منابع قبلی کشت شدند (Johnson *et al.*, 1968; Shariati and Lilley, 1994). کشت‌های جلبکی در اتاق کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت نور ۷۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه به مدت ۱۶ ساعت نور و با سرعت ۸ ساعت بر روی دستگاه شیکر به طور مداوم و با سرعت ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. زمانی که کشت‌های جلبکی به فاز نمایی رشد رسیدند، با غلظت‌های مختلف آلوکمی‌کال‌ها تیمار شدند.

تیمار کشت‌های جلبکی با غلظت‌های مختلف

آلوکمی‌کال‌ها: کشت‌های جلبکی در فاز نمایی رشد به درون ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری استریل در حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر انتقال یافت، سپس با غلظت‌های صفر، ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس تیمار شدند. کشت‌های جلبکی تیمار شده با آلوکمی‌کال‌ها در اتاق کشت با شرایط توصیف شده در بالا قرار گرفتند. کشت‌های جلبکی فاقد عصاره به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. سه تکرار جداگانه برای هر تیمار در نظر گرفته شد و نمونه‌برداری برای انجام آزمایش‌ها در زمان‌های صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار جلبک‌ها با غلظت‌های مختلف آلوکمی‌کال‌ها صورت گرفت.

بررسی کینتیک رشد و وزن تر توده‌های

جلبکی: بررسی کینتیک رشد از طریق شمارش تعداد سلول‌های جلبک در زمان‌های مختلف با استفاده از لام

(درصد ممانعت) در حضور غلظت‌های مختلف عصاره، با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

$$\text{رابطه ۱: } S (\%) = (A_C - A_S) / A_C \times 100$$

در این رابطه، A_C میزان جذب شاهد (محلول DPPH رقیق شده و بدون عصاره) و A_S میزان جذب نمونه مورد آزمایش است. در نهایت، نمودار درصد ممانعت در برابر غلظت‌های مختلف عصاره بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر رسم شده و مقدار IC_{50} که بیانگر غلظتی از عصاره است که در آن غلظت نیمی از رادیکال‌های DPPH خنثی می‌شوند (یعنی نصف درصد ممانعت به دست آمده از رابطه ۱)، از این نمودار به دست آمد و به عنوان میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در نظر گرفته شد. از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مثل آسکوربیک اسید به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

میزان پتانسیل آنتی‌اکسیدانی احیاکنندگی آهن عصاره‌ها بر اساس روش Benzie و Strain (۱۹۹۶) همراه با تغییراتی تعیین شد. مخلوط واکنش در یک حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر حاوی معرف FRAP و ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده است. معرف FRAP شامل بافر استات با اسیدیته برابر با ۳/۶، محلول ۱۰ میلی‌مولار تری پیریدیل-S-تری آزین (TPTZ) در ۴۰ میلی‌مولار هیدروکلریک اسید و محلول ۲۰ میلی‌مولار $FeCl_3$ با نسبت‌های ۱۰ به ۱ به ۱ بود. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت، سپس جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از محلول استاندارد $FeSO_4$ ، نتایج بر اساس میکرومول Fe^{2+} بر میلی‌گرم وزن خشک بیان شد.

شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. فاز رویی جدا و عمل استخراج با اتانول ۸۰ درصد چهار مرتبه دیگر تکرار شد. عصاره‌های حاصل، از طریق تبخیر اتانول تغلیظ شد و به حجم مشخصی کاهش یافت. برای حذف رنگیزه‌ها از عصاره تغلیظ شده، از زغال فعال استفاده شد. عصاره شفاف حاصل برای تعیین غلظت قندهای محلول از روش آنترن استفاده شد (McCready *et al.*, 1950).

استخراج پروتئین‌ها از رسوبات جلبکی، با استفاده از یک بافر استخراج با ترکیب ۱۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (اسیدیته برابر با ۷)، ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱۰ میلی‌مولار KCl، ۱ میلی‌مولار $MgSO_4$ ، ۱۰ درصد گلیسرول، ۱ درصد پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون، ۰/۱ درصد تریتون X-100 و ۵۰ میلی‌مولار بتا-۲-مرکاپتواتانول صورت گرفت (Einali and Valizadeh, 2015). میزان پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلومین تعیین شد (Bradford, 1976).

تحلیل آماری: همه نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار ($\pm SD$) حاصل از سه تکرار مستقل برای هر تیمار بیان شد. وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین نمونه‌های شاهد و تیمار شده با آلوکمی‌کال‌ها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون LSD در سطح ۰/۰۵ ($P < 0.05$) تعیین شد. همه آنالیزهای آماری با نرم‌افزار SigmaStat نسخه ۳ انجام گرفت.

نتایج و بحث

میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدهای کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره: میزان ترکیبات فنلی و

هموسایتومتر زیر میکروسکوپ نوری انجام شد (Schoen, 1988). برای تعیین وزن تر، ۳۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های جلبکی در یک لوله پلی‌اتیلنی به مدت ۱۰ دقیقه با نیروی ۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. رسوب جلبکی با حجم بسیار اندکی از محلول بالایی مجدداً همگن و به یک میکروتیوب با وزن مشخص منتقل و به مدت ۵ دقیقه با نیروی ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. برای نمک‌زدایی از رسوب جلبکی، توده جلبکی حاصل با محیط کشت حاوی ۰/۲ مولار نمک شستشو و سپس وزن شد (Haghjou *et al.*, 2014).

استخراج و اندازه‌گیری رنگیزه‌ها: به منظور

استخراج کلروفیل‌ها و بتاکاروتن، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های جلبکی به میکروتیوب منتقل و به مدت ۵ دقیقه با نیروی ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. پس از حذف محلول رویی، به رسوب باقی مانده یک میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد اضافه و پس از ورتکس شدید، عمل سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه تکرار شد. محلول رویی از میکروتیوب‌ها استخراج و برای اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌ها استفاده شد. میزان کلروفیل‌ها با روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد (Arnon, 1949). میزان بتاکاروتن با استفاده از ضریب جذب برابر با $E_{1cm}^{1\%} = 2273$ در طول موج ۴۸۰ نانومتر محاسبه شد (Ben-Amotz and Avron, 1983).

استخراج و اندازه‌گیری قندهای محلول کل و

پروتئین‌ها: استخراج قندهای محلول کل از رسوبات جلبکی با استفاده از روش Omokolo و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. بدین منظور، به رسوبات حاصل از ۳۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی (همان‌طور که در بالا توصیف شد) مقدار ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه

یا چند حلقه آروماتیک همراه با یک یا چند گروه هیدروکسیل هستند. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی به تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل در این ترکیبات بستگی دارد (Rice-Evans *et al.*, 1995). بنابراین، ظرفیت نسبتاً پایین آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها می‌تواند به پایین بودن میزان ترکیبات فنلی در این عصاره‌ها نسبت داده شود.

فلاونوئیدهای کل به ترتیب ۱/۶۷ و ۱۳/۶۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گیاه تعیین گردید (جدول ۱). عصاره‌های اسطوخودوس دارای ظرفیت خنثی‌سازی رادیکال DPPH نسبتاً پایینی در مقایسه با شاهد مثبت یعنی آسکوربیک اسید هستند. این ظرفیت نسبتاً پایین در مورد قدرت احیاکنندگی آهن در عصاره‌ها نیز مشاهده می‌شود (جدول ۱). ترکیبات فنلی دارای یک

جدول ۱- میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. از آسکوربیک اسید به عنوان شاهد مثبت استفاده شده است.

مقادیر FRAP	میزان خنثی‌سازی رادیکال DPPH (IC50)	میزان فلاونوئید	میزان فنل	
(میکرومول Fe^{2+} بر میلی‌گرم وزن خشک)	(میکروگرم بر میلی‌لیتر)	(میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)	(میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)	
۱۱۸/۱۵ \pm ۰/۰۷	۱۲۹/۰۲ \pm ۰/۱۴	۱۳/۶۴ \pm ۰/۱۲	۱/۶۷ \pm ۰/۰۶	عصاره اسطوخودوس
۷۸۵/۹۲ \pm ۰/۰۴	۲/۵۱ \pm ۰/۰۳	-	-	آسکوربیک اسید

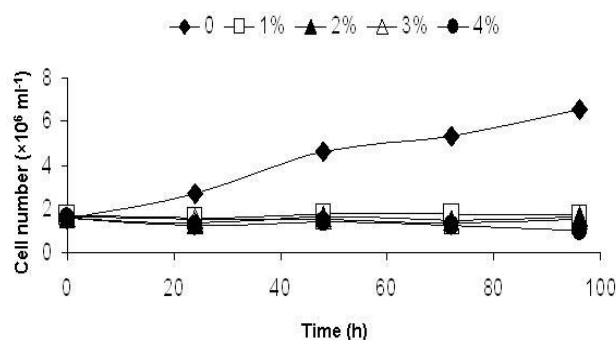
آمده است و مرگ سلولی پس از ۴۸ ساعت حتی در غلظت‌های بالای عصاره‌ها در مقایسه با زمان صفر به صورت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (جدول ۲)، می‌توان گفت که سلول‌های جلبک قادر به تحمل غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس باشند. هیچ اختلاف معنی‌داری در میزان وزن تر سلول‌های جلبکی کشت‌های فاقد عصاره (شاهد) بین زمان صفر و ۴۸ ساعت بعد وجود نداشت (جدول ۲). با وجود این، وزن تر سلول‌ها همراه با افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (شکل ۲-B و جدول ۲). چنین افزایشی در وزن تر که البته همراه با کاهش در تعداد سلول است، در جلبک‌های *D. viridis* تیمار شده با منادیون (ویتامین K3) نیز مشاهده شده است (Haghjou *et al.*, 2014). این حالت همچنین در جلبک‌های *Dunaliella* پیش‌تیمار شده با سرما و تیمار شده با پاراکوات (نوعی علف‌کش القاکننده تنش اکسیداتیو) نیز گزارش شده

اثر آلوکمی‌کال‌ها بر کینتیک رشد و وزن تر

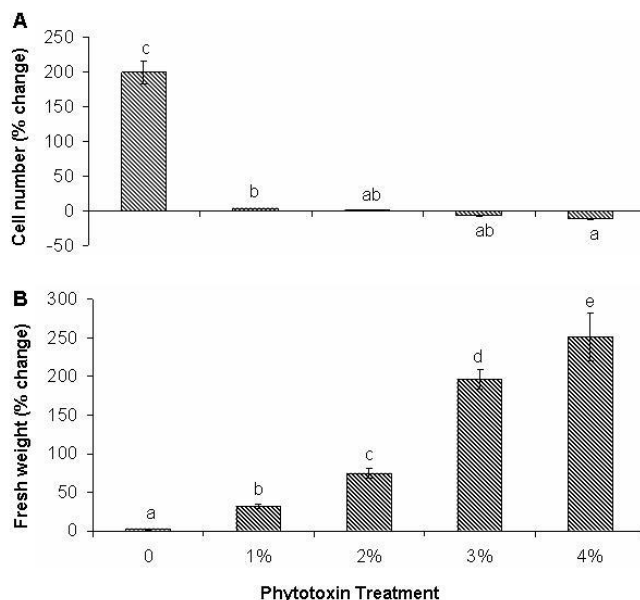
سلول‌های جلبک: اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی برگ گیاه اسطوخودوس بر الگوی رشد سلول در طول یک دوره ۹۶ ساعته در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، غلظت‌های مختلف عصاره سبب توقف رشد جلبک شده است. مقایسه تغییرات در تعداد سلول‌ها بین زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره‌ها نشان‌دهنده کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های جلبک در تمامی کشت‌های تیمار شده با آلوکمی‌کال‌ها در مقایسه با غلظت صفر (شاهد) است (شکل ۲-A). کاهش تعداد سلول‌ها در کشت‌های تیمار شده با غلظت ۴ درصد عصاره، در مقایسه با غلظت ۱ درصد بسیار بیشتر است اما با این حال، نسبت به غلظت‌های ۲ و ۳ درصد عصاره تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهد (شکل ۲-A). ممانعت از تقسیم سلول‌ها می‌تواند ناشی از سمیت عصاره‌ها باشد. به هر حال، از آنجا که تنها از تقسیم سلولی ممانعت به عمل

زیاد وزن تر سلول‌های جلبک تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها باشد. از این گذشته، تجمع نشاسته و لیپیدها در گونه‌های مختلف *Dunaliella* که تحت شرایط تنش اکسیداتیو القا می‌شود نیز در افزایش وزن تر سلول‌ها می‌تواند دخیل باشد (Tian and Yu, 2009؛ Yilancioglu et al., García-Gomez et al., 2012).

است (Haghjou, 2011). افزایش وزن تر سلول‌های جلبک با وجود توقف تقسیم سلولی می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که سلول‌های جلبک مقاومت بالایی را در برابر فیتوتوکسین‌های موجود در عصاره‌ها از خود نشان می‌دهند. تجمع بسیار بالای متابولیت‌های اندازه‌گیری شده در مطالعه حاضر نظیر: کلروفیل، بتاکاروتن، قندهای محلول و پروتئین‌ها می‌تواند دلیل افزایش بسیار



شکل ۱- الگوی رشد جلبک *D. salina* تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس در طول یک دوره ۹۶ ساعته. مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است.



شکل ۲- تغییرات در تعداد (A) و وزن تر (B) سلول‌های *D. salina* تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس. داده‌ها به صورت درصد تغییرات بین زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره‌ها بر اساس داده‌های جدول ۲ بیان شده است. مقادیر، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون LSD است.

جدول ۲- تعداد سلول، وزن تر، میزان رنگیزه‌ها، میزان قندهای محلول و غلظت پروتئین در سلول‌های *D. salina* تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس در زمان‌های صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. علامت * نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار با آلوکمیکال‌ها در سطح ۵ درصد ($P < 0.05$) است.

غلظت عصاره (درصد)					زمان (ساعت)	
4	3	2	1	0		
0.30±0.01	0.28±0.01	0.30±0.03	0.29±0.02	0.29±0.03	0	وزن تر
1.04±0.07*	0.84±0.08*	0.52±0.06*	0.38±0.05*	0.29±0.06	48	(mg 10 ⁻⁶ cells)
1.53±0.25	1.52±0.10	1.55±0.15	1.57±0.16	1.63±0.19	0	کلروفیل a
2.79±0.16*	3.26±0.09*	2.84±0.23*	2.58±0.04*	1.86±0.06	48	(µg 10 ⁻⁶ cells)
0.31±0.07	0.32±0.11	0.33±0.06	0.31±0.03	0.33±0.13	0	کلروفیل b
0.62±0.15*	0.84±0.23*	0.69±0.21*	0.64±0.07*	0.47±0.09	48	(µg 10 ⁻⁶ cells)
1.92±0.24	1.96±0.19	1.89±0.24	1.93±0.21	2.10±0.49	0	کلروفیل کل
3.58±0.41*	4.28±0.33*	3.56±0.46*	3.25±0.11*	2.37±0.18	48	(µg 10 ⁻⁶ cells)
4.95±0.10	4.76±0.28	4.74±0.18	5.00±0.40	5.02±0.24	0	نسبت کلروفیل a/b
4.50±0.19*	3.88±0.08*	4.12±0.22*	4.03±0.36*	3.92±0.40*	48	
0.45±0.08	0.41±0.05	0.44±0.04	0.42±0.04	0.42±0.14	0	بتا کاروتن
0.61±0.05*	0.79±0.06*	0.66±0.07*	0.53±0.01*	0.45±0.03	48	(µg 10 ⁻⁶ cells)
0.24±0.02	0.21±0.03	0.23±0.01	0.22±0.02	0.20±0.01	0	نسبت بتا کاروتن به کلروفیل
0.17±0.03*	0.19±0.04	0.19±0.01*	0.16±0.01*	0.19±0.02	48	
4.38±0.26	4.21±0.18	3.75±0.39	4.09±0.47	3.85±0.62	0	قند محلول کل
28.69±2.76*	21.74±0.84*	14.42±1.64*	10.48±1.95*	8.49±0.95*	48	(µg 10 ⁻⁶ cells)
2.98±0.21	2.81±0.19	2.58±0.27	2.74±0.14	2.62±0.28	0	پروتئین
7.41±0.63*	6.19±0.58*	4.85±0.84*	3.38±0.49	2.94±0.24	48	(µg 10 ⁻⁶ cells)

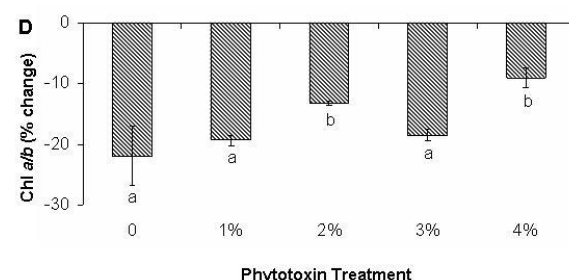
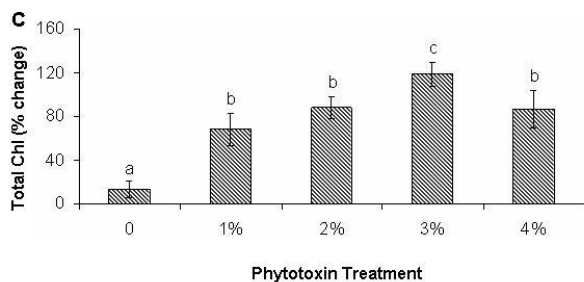
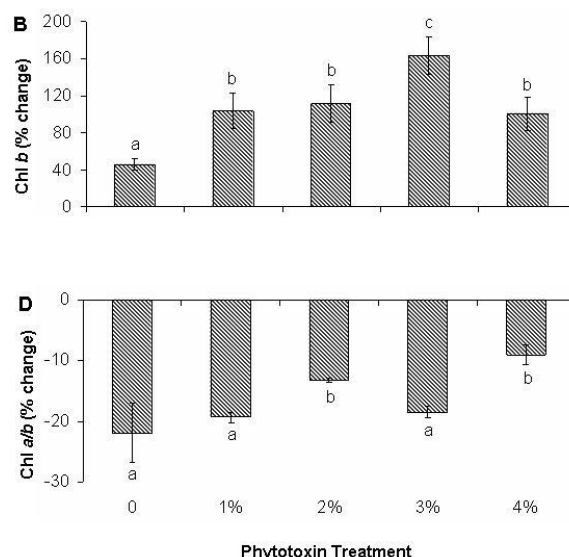
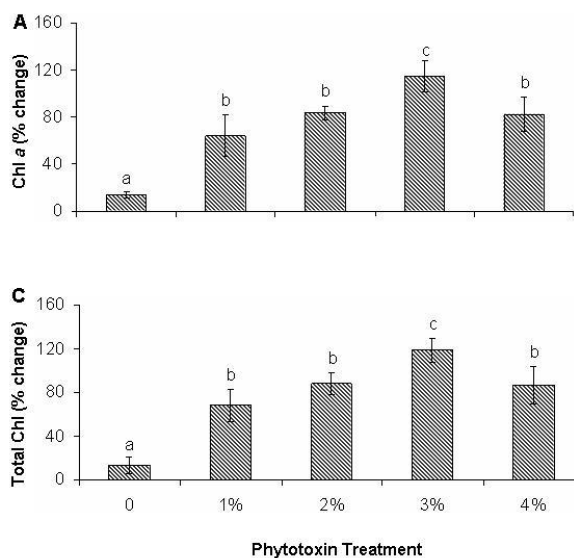
اثر عصاره‌ها بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی:

افزایش معنی‌داری در غلظت کلروفیل a پس از ۴۸ ساعت از تیمار کشت‌های جلبکی با غلظت‌های مختلف عصاره مشاهده شد (جدول ۲). چنین افزایشی در میزان درصد تغییرات کلروفیل a بین زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره‌ها نیز مشاهده شد (شکل ۳-۳A). بالاترین میزان کلروفیل a در جلبک‌های تیمار شده با غلظت ۳ درصد عصاره یافت شد. غلظت کلروفیل b نیز در حضور غلظت‌های مختلف عصاره افزایش یافت (جدول ۲). بالاترین میزان این افزایش که تقریباً ۱۶۴ درصد است، همانند کلروفیل a در حضور غلظت ۳ درصد عصاره مشاهده شد (شکل ۳-۳B). مقایسه درصد تغییرات کلروفیل a با کلروفیل b نشان داد که غلظت کلروفیل b در مقایسه با کلروفیل a افزایش بیشتری داشته است (شکل ۳-۳A

و ۳B). افزایش بیشتر در میزان کلروفیل b در مقایسه با کلروفیل a، در کشت‌های جلبکی *D. salina* تیمار شده با پروپیل گالات (یک آنتی‌اکسیدان سنتزی) (Einali and Valizadeh, 2015) و کشت‌های جلبکی *D. salina* رشد یافته در غلظت‌های مختلف نمک (Mishra et al., 2008) نیز گزارش شده است. این افزایش بالاتر در میزان کلروفیل b می‌تواند بیانگر این حقیقت باشد که تولید کلروفیل b جهت شکل‌گیری صحیح کمپلکس‌های جمع‌آوری‌کننده نور در کلروپلاست‌های جلبک‌های سبز و گیاهان عالی ضروری است (Eggink et al., 2001, 2004; Biswal et al., 2012). افزون بر این، افزایش بیوستنز کلروفیل b می‌تواند بیان یکسری از پروتئین‌های ویژه غشای تیلاکوئیدی را تنظیم کند و بدین ترتیب سبب افزایش اندازه کمپلکس‌های آنتنی و در نتیجه افزایش

گردد. نسبت کلروفیل a به b پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار کشت‌های جلبکی با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها همانند شاهد به صورت معنی‌دار کاهش پیدا کرد (شکل ۳-D و جدول ۲). این امر بیانگر مقادیر بالاتر کلروفیل b در برابر کلروفیل a است. مقادیر بالاتر کلروفیل b به علت سنتز این کلروفیل از کلروفیل a از طریق جایگزینی گروه متیل حلقه دوم کلروفیل a با گروه فرمیل است (Porra *et al.*, 1994). همان‌طور که در شکل ۳-D مشاهده می‌شود، این نسبت در جلبک‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱ و ۳ درصد آلوکمیکال‌ها در مقایسه با شاهد تغییر معنی‌داری ندارد. این مورد به دلیل افزایش غلظت‌های کلروفیل a و b در کشت‌های جلبکی تیمار شده با این غلظت‌های عصاره در الگوی مشابه با شاهد است (شکل‌های ۳-A و B).

در میزان انتقال الکترون گردد (Tanaka *et al.*, 2001؛ Biswal *et al.*, 2012). میزان کلروفیل کل نیز همانند کلروفیل‌های a و b در تمام کشت‌های جلبکی تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره به صورت معنی‌دار افزایش یافت (جدول ۲). بالاترین میزان کلروفیل کل در غلظت‌های ۳ درصد عصاره مشاهده شد (شکل ۳-C). با وجود توقف رشد سلولی در کشت‌های تیمار شده با آلوکمیکال‌ها، افزایش غلظت کلروفیل‌ها می‌تواند نشان‌دهنده این حقیقت باشد که سلول‌های جلبک قادر به تحمل غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و افزایش مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی هستند. در حقیقت، افزایش میزان کلروفیل می‌تواند به عنوان واکنش سلول‌ها جهت جبران کاهش فعالیت‌های فتوسنتزی و متابولیکی در شرایط تنش ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف عصاره‌ها تلقی



شکل ۳-A) تغییرات در میزان کلروفیل a (B)، کلروفیل b (C)، کلروفیل کل (D) نسبت کلروفیل a/b در سلول‌های *D. salina* تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس. داده‌ها به صورت درصد تغییرات بین زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره‌ها بر اساس داده‌های جدول ۲ بیان شده است. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون LSD است.

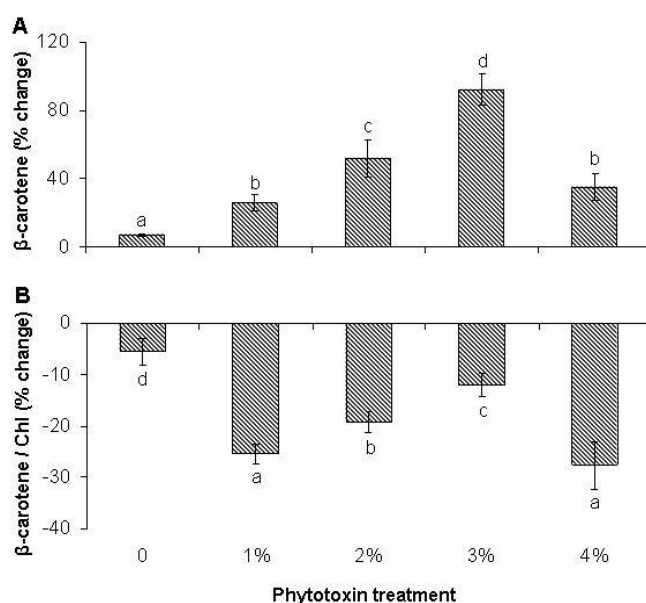
Einali and Shariati, 2012, 2015؛ Amotz, 1996؛ Einali and Valizadeh, 2015). به همین دلیل، جلبک *Dunaliella* به عنوان یک مدل شگفت‌انگیز برای مطالعات بیوسنتز بتاکاروتن مورد استفاده قرار می‌گیرد.

بر اساس مشاهدات پیشین، افزایش غلظت بتاکاروتن در جلبک *Dunaliella* تحت شرایط تنش با کاهش غلظت کلروفیل همراه می‌شود، به طوری که نسبت بتاکاروتن به کلروفیل با میزان رشد جلبک نسبت عکس داشته، در شرایطی که رشد متوقف می‌شود، این نسبت افزایش می‌یابد (Ben-Amotz *et al.*, 1982)؛ (Ben-Amotz and Avron, 1983). بر خلاف این مشاهدات، نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که افزایش غلظت بتاکاروتن با افزایش در میزان کلروفیل همراه می‌شود (شکل‌های ۳ و ۴). در حقیقت، نسبت بتاکاروتن به کلروفیل نه تنها افزایش نمی‌یابد بلکه در مقایسه با شاهد به طور معنی‌دار کاهش پیدا می‌کند (شکل ۴-B و جدول ۲). بنابراین افزایش میزان کلروفیل در مقایسه با افزایش بتاکاروتن با سرعت بالاتری انجام می‌شود. به هر حال، بالاترین نسبت بتاکاروتن به کلروفیل در کشت‌های تیمار شده با غلظت ۳ درصد عصاره در مقایسه با سایر تیمارها به غیر از شاهد مشاهده می‌شود (شکل ۴-B). این امر نشان می‌دهد که در این غلظت، میزان بتاکاروتن بیشتری نسبت به کلروفیل در مقایسه با سایر غلظت‌ها تولید می‌شود. بدین ترتیب، افزایش غلظت بتاکاروتن که در اثر تیمار کشت‌های جلبکی با آللوکمیkal‌ها القا شده است، می‌تواند سبب حفظ کلروفیل و همچنین القای بیوسنتز آن تحت شرایط تنش ایجاد شده با عصاره‌ها

میزان بتاکاروتن پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار کشت‌های جلبکی با عصاره‌ها به صورت معنی‌دار افزایش می‌یابد (جدول ۲). درصد تغییرات بتاکاروتن بین زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار با آللوکمیkal‌ها نیز در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۴-A). بالاترین درصد تغییرات غلظت بتاکاروتن در کشت‌های جلبکی تیمار شده با غلظت‌های ۳ درصد عصاره‌ها مشاهده شد (شکل ۴-A). بتاکاروتن به عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی مهم تلقی می‌شود که می‌تواند انرژی برانگیختگی اضافی مولکول کلروفیل را دریافت کند و بدین ترتیب از تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن ممانعت به عمل آورد و سبب حفظ کلروفیل و سایر سیستم‌های فتوسنتزی شود (Ben-Amotz *et al.*, 1989). به این ترتیب، بتاکاروتن می‌تواند از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاهای فتوسنتزی توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری نماید (Li؛ Demmig-Adams *et al.*, 1996)؛ (Li *et al.*, 2012). همچنین، بتاکاروتن تحت شرایط تنش به عنوان یک مخزن کربن عمل می‌کند و کربن‌های اضافی تولید شده در فرآیند فتوسنتز را ذخیره می‌کند (Borowitzka and Borowitzka, 1988). مطالعات مختلف نشان داده است که گونه‌های مختلف جلبک *Dunaliella* در شرایطی که سبب کند یا متوقف شدن تقسیم سلولی شود، مقادیر بسیار بالای بتاکاروتن را در خود ذخیره می‌کنند. بنابراین، شرایط نامساعد محیطی نظیر: کمبود مواد غذایی، غلظت نمک بالا، شدت نور بالا یا درجه حرارت پایین سبب افزایش تجمع بتاکاروتن در این جلبک می‌شود (Ben-Amotz *et al.*, 1982؛ Ben-Amotz and Avron, 1983)؛

با پروبیل گالات همخوانی و مطابقت دارد (Einali and Valizadeh, and Shariati, 2012, 2015). (2015)

شود. این استدلال با مشاهدات پیشین در مورد افزایش غلظت بتاکاروتن همراه با افزایش یا حفظ کلروفیل در جلبک *Dunaliella* تحت شرایط تنش شوری و تیمار



شکل ۴- تغییرات (A) غلظت بتاکاروتن و (B) نسبت بتاکاروتن به کلروفیل سلول‌های *D. salina* تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس. داده‌ها به صورت درصد تغییرات بین زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره‌ها بر اساس داده‌های جدول ۲ بیان شده است. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون LSD است.

تنش نقش بسیار کلیدی ایفا می‌کنند (Mishra *et al.*, 2008). پیش‌تر، تجمع اسمولیت‌های سازگار در پاسخ به تنش‌های مختلف از جمله تنش حاصل از آلوکیمیکال‌ها گزارش شده است (Prado *et al.*, 2000؛ Gill *et al.*, 2001؛ Durán-Serantes *et al.*, 2002؛ Mishra *et al.*, 2008). این اسمولیت‌ها می‌توانند بدون دخالت در واکنش‌های معمول بیوشیمیایی به عنوان محافظت‌کننده از سلول‌ها در برابر تنش اسمزی عمل کنند (Durán-Serantes *et al.*, 2002). تجمع مقادیر بسیار بالای قندهای محلول در سلول‌های جلبک *D. salina* در پاسخ به غلظت‌های

اثر آلوکیمیکال‌ها بر غلظت قندهای محلول و

پروتئین‌ها: غلظت قندهای محلول در سلول‌های جلبک متناسب با افزایش غلظت عصاره‌ها، افزایش می‌یابد، به طوری که این میزان در کشت‌های تیمار شده با غلظت ۴ درصد عصاره پس از ۴۸ ساعت در مقایسه با زمان صفر به اندازه تقریباً ۷ برابر افزایش نشان می‌دهد (جدول ۲). درصد تغییرات قندهای محلول بین زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره‌ها نیز در غلظت‌های بیش از ۱ درصد عصاره در مقایسه با شاهد به صورت معنی دار افزایش پیدا کرد (شکل ۵-A). قندهای محلول در حفظ تنظیم اسمزی سلول‌ها در طول

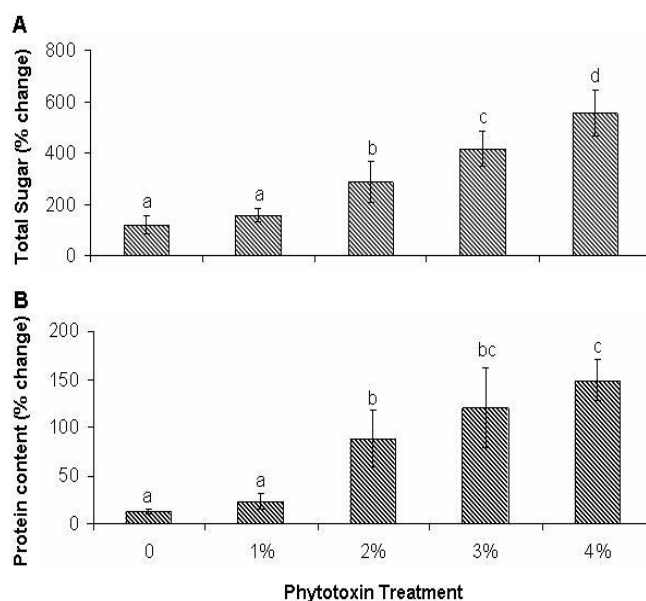
بودن پتانسیل اسمزی عصاره آفتابگردان (حدود ۱/۱- مگاپاسکال)، اثر ممانعت‌کنندگی بر جوانه زنی دانه‌های خردل ناشی از سمیت عصاره‌ها بوده است تا کاهش پتانسیل اسمزی محیط (Kupidłowska et al., 2006). به هر حال، همان‌طور که پیش‌تر عنوان شد، تجمع اسمولیت‌ها نوعی پاسخ به تنش گیاهان به شمار می‌رود و بیانگر سازگاری با شرایط تنش نیست (Hanson, 1980؛ Singh and Singh, 1993). بنابراین، این امر محتمل است که جلبک *Dunaliella* می‌تواند سمیت ناشی از عصاره‌ها را تحمل کند.

غلظت پروتئین‌ها همانند قندهای محلول به صورت متناسب با غلظت عصاره‌ها در سلول‌های جلبکی افزایش می‌یابد (جدول ۲). درصد تغییرات در غلظت پروتئین، بین زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره‌ها نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ۱ درصد عصاره به صورت معنی‌داری سبب افزایش غلظت پروتئین در مقایسه با شاهد شدند (شکل ۵-B). مطالعات نشان داده است که سلول‌های جلبک *D. salina* در پاسخ به غلظت‌های بسیار بالای نمک (حدود ۵/۵ مولار) غلظت پروتئین خود را تقریباً به میزان ۱۰۰ درصد در مقایسه با شاهد افزایش داده‌اند (Mishra et al., 2008)؛ که این امر در راستای نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر است. همچنین، آلودگی‌های حاصل از چهار گونه بیابانی شامل: *Sebastiania*، *Accacia sedillense*، *Sicyos deppei* و *adenophora* به ترتیب، از رشد ریشه گیاهان زراعی: *Zea mays*، *Phaseolus* و *Cucurbita pepo, vulgaris* و *Lycopersicon esculentum* ممانعت می‌کنند، اما سبب القای افزایش

مختلف نمک گزارش شده است (Mishra et al., 2008). از آنجا که افزایش در غلظت نمک با کاهش شدید در پتانسیل اسمزی همراه است (Golldack et al., 1995؛ بنابراین، تجمع قندها در برابر افزایش غلظت نمک در جلبک‌ها طبیعی به نظر می‌رسد. به علت این که عصاره‌های گیاهی دارای ترکیبات فنلی گوناگون هستند، این ترکیبات می‌توانند از طریق کاهش پتانسیل اسمزی در محیط رشد گیاه، تنش اسمزی ایجاد کنند (Kupidłowska et al., 2006). به هر حال، تجمع بسیار بالای قندهای محلول در جلبک‌ها نمی‌تواند تنها ناشی از کاهش پتانسیل اسمزی محیط رشد جلبک که توسط عصاره‌ها القا می‌شود، باشد. این بدان علت است که تجمع قندهای محلول در سلول‌های جلبک *Dunaliella* تحت شرایط شوری بسیار بالا (حدود ۵/۵ مولار) (Mishra et al., 2008) در مقایسه با تجمع این اسمولیت‌ها تحت شرایط تنش آلودگی‌های (شکل ۵-A) بسیار پایین‌تر است. در حقیقت، کاهش پتانسیل اسمزی القا شده توسط عصاره‌ها در مقایسه با غلظت بالای نمک بسیار ناچیز است و نمی‌تواند باعث تجمع مقادیر بسیار بالای قندهای محلول در جلبک‌ها شود. بنابراین، تجمع قندهای محلول در سلول‌های جلبک تیمار شده با عصاره‌ها می‌تواند ناشی از سمیت عصاره‌ها باشد تا کاهش پتانسیل اسمزی. در حقیقت، افزایش بسیار زیاد غلظت قندهای محلول می‌تواند به عنوان پاسخ جلبک‌ها در برابر غلظت‌های مختلف آلودگی‌ها در نظر گرفته شود. در توافق با این فرضیه، مطالعه روی تأثیر عصاره‌های آبی برگ گیاه آفتابگردان بر ممانعت از جوانه‌زنی دانه‌های خردل نشان داد که با وجود پایین

شوری، خشکی و تنش حاصل از آلوکمیkalها افزایش بیان پیدا کنند (Bray, Vierling, 1991؛ 1993). بنابراین، به دلیل وجود مقادیر بسیار بالای پروتئینها در جلبکهای تیمار شده با عصارهها چنین استنباط می شود که بیان برخی از پروتئینها در پاسخ به آلوکمیkalها افزایش پیدا می کند.

سنتز پروتئین در ریشههای این گیاهان شدهاند (Romero-Romero *et al.*, 2002). شرایط نامساعد محیطی سبب القای بیان پروتئینهایی موسوم به پروتئینهای تنش می شود که در محافظت از سلولها در برابر تنشهای محیطی دخیل هستند. این پروتئینها می توانند طی تنشهای گوناگون محیطی از جمله:



شکل ۵- تغییرات در (A) میزان قندهای محلول و (B) غلظت پروتئین سلولهای *D. salina* تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی برگ گیاه اسطوخودوس. داده‌ها به صورت درصد تغییرات بین زمان صفر و ۴۸ ساعت پس از تیمار با عصاره‌ها بر اساس داده‌های جدول ۲ بیان شده است. مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون LSD است.

آلوکمیkalها روی می دهد، به عنوان یک رویکرد رایج جلبک *Dunaliella* در راستای تحمل شرایط تنش در نظر گرفته می شود. افزایش قندهای محلول می تواند به عنوان پاسخ جلبکها جهت تحمل غلظت‌های مختلف عصارهها در نظر گرفته شود. همچنین، افزایش غلظت پروتئینها نیز نشان دهنده بیان پروتئینهای پاسخ دهنده به آلوکمیkalها است که می تواند مکانیسمهای تحمل جلبک به شرایط تنش را

نتیجه گیری نهایی

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان می دهد که عصاره های آبی برگ گیاه اسطوخودوس دارای تأثیرات آلوپاتیک بر جلبک *D. salina* است و سبب توقف تقسیمات سلولی آن می شود؛ با وجود این، جلبک مقادیر بالایی از کلروفیل را سنتز می کند و می تواند غلظت های بالای عصاره ها را تحمل کند. تحریک بیوسنتز بتاکاروتن که در پاسخ به

جمله انعطاف‌پذیری فیزیولوژیکی و متابولیک است و سبب می‌شود که بتواند شرایط ناپایدار محیطی را تحمل کند و در نتیجه، پتانسیل‌های صنعتی و بیوتکنولوژیکی این جلبک را ایجاد نماید.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه سیستان و بلوچستان به خاطر حمایت مالی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد سحر مزنگ قاسمی سپاسگزاری می‌نمایند.

تقویت کند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که مکانیسم‌های تحمل به آلوکمیکال‌ها در جلبک *D. salina* با تعدیلات فیزیولوژیکی و متابولیکی همراه است که از طریق هدایت جریان کرین به سمت سنتز اسمولیت‌هایی مثل قندهای محلول و مولکول‌های آنتی‌اکسیدان اختصاصی مثل بتاکاروتن صورت گیرد و سبب افزایش تحمل جلبک به فیتوتوکسین‌ها می‌شود. این ویژگی‌های سودمند *Dunaliella* نشان می‌دهد که این جلبک دارای قابلیت‌های ذاتی و منحصر به فردی از

منابع

- Arnon, D. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.
- Avron, M. and Ben-Amotz, A. (1992) *Dunaliella*: physiology, biochemistry and biotechnology. CRC Press, Boca Raton.
- Ben-Amotz, A. (1996) Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil* (*Chlorophyta*). *Journal of Phycology* 32: 272-275.
- Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1983) On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halo-tolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology* 72: 593-597.
- Ben-Amotz, A. Shaish, V. and Avron, M. (1989) Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiology* 91: 1040-1043.
- Ben-Amotz, A., Katz, A. and Avron, M. (1982) Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (*Chlorophyceae*). *Journal of Phycology* 18: 529-537.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
- Biswal, A. K., Pattanayak, G. K., Pandey, S. S., Leelavathi, S., Reddy, V. S., Govindjee, Tripathy, B. C. (2012) Light intensity-dependent modulation of chlorophyll *b* biosynthesis and photosynthesis by overexpression of chlorophyllide a oxygenase in tobacco. *Plant Physiology* 159: 433-449.
- Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J. (1988) Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoor cultures of *D. salina*. In: *Algal biotechnology* (Eds. Stadler, T., Mollion, J., Berdus, M. C., Karamanos, Y., Morvan, H. and Christiane, D.) 139-150. Elsevier Applied Science, Barking.
- 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.
- Bray, E. A. (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103: 1035-1040

- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. and Chern, J. C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Chidambara Murthy, K. N., Vanitha, A., Rajesha, J., Mahadeva, S., Swamy, M., Sowmya, P. R. and Ravishankar, G. A. (2005) *In vivo* antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*, a green microalga. *Life Science* 76: 1381-1390.
- Cowan, A. K., Rose, P. D. and Horne, L. G. (1992) *Dunaliella salina* a model system for studying the response of plant cells to stress. *Journal of Experimental Botany* 43: 1535-1547.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A. M. and Adams, W. W. (1996) Carotenoids 3: *in vivo* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB Journal* 10: 403-412.
- Dufosse, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Chidambara Murthy, K. N. and Ravishankar, G. A. (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in Food Science and Technology* 16: 389-406.
- Durán-Serantes, B., González, L. and Reigosa, M. J. (2002) Comparative physiological effects of three allelochemicals and two herbicides on *Dactylis glomerata*. *Acta Physiologiae Plantarum* 24: 385-392.
- Eggink, L. L., LoBrutto, R., Brune, D. C., Brusslan, J., Yamasato, A., Tanaka, A. and Hooper, J. K. (2004) Synthesis of chlorophyll b: localization of chlorophyllide *a* oxygenase and discovery of a stable radical in the catalytic subunit. *BMC Plant Biology* 4: 5-21.
- Eggink, L. L., Park, H. and Hooper, J. K. (2001) The role of chlorophyll b in photosynthesis: hypothesis. *BMC Plant Biology* 1: 2-9.
- Einali, A. and Shariati, M. (2012) Effects of n-propyl gallate on photosynthesis and physiological parameters in *Dunaliella salina* are affected by stressful conditions. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 24: 193-202.
- Einali, A. and Shariati, M. (2015) Effects of propyl gallate on photosystem II efficiency in *Dunaliella bardawil* under high illumination as investigated by chlorophyll fluorescence measurements. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 27: 61-73.
- Einali, A. and Valizadeh, J. (2015) Propyl gallate promotes salt stress tolerance in green microalga *Dunaliella salina* by reducing free radical oxidants and enhancing b-carotene production. *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 83.
- García-Gomez, C., Parages, M. L., Jimenez, C., Palma, A., Mata, M. T. and Segovia, M. (2012) Cell survival after UV radiation stress in the unicellular chlorophyte *Dunaliella tertiolecta* is mediated by DNA repair and MAPK phosphorylation. *Journal of Experimental Botany* 63: 5259-5274.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Salvatore, G. and Mazzanti, G. (1999) Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Medica* 65: 700-703.
- Gill, P. K., Sharma, A. D., Singh, P. and Bhullar, S. S. (2001) Effect of various abiotic stresses on the growth, soluble sugars and water relations of sorghum seedlings grown in light and darkness. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 27: 72-84.
- Golldack, D., Deitz, K. and Gimmler, H. (1995) The effect of sudden salt stress on protein synthesis in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Plant Physiology* 146: 508-514.
- Haghjou, M. M. (2011) Induction of paraquat tolerance in *Dunaliella* by using some pre-treatments. *Iranian Journal of Plant Biology* 3: 86-71 (in Persian).
- Haghjou, M. M., Colville, L. and Smirnoff, N. (2014) The induction of menadione stress tolerance in

- the marine microalga, *Dunaliella viridis*, through cold pretreatment and modulation of the ascorbate and glutathione pools. *Plant Physiology and Biochemistry* 84: 96-104.
- Hanson, A. D. (1980) Interpreting the metabolic responses of plants to water stress. *Horticultural Science* 15: 623-629.
- Hohmann, J., Zupko, I., Redei, D., Csanyi, M., Falkay, G. and Mathe, I. (1999) Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Planta Medica* 65: 576-578.
- Itani, T., Nakahata, Y. and Kato-Noguchi, H. (2013) Allelopathic activity of some herb plant species. *International Journal of Agriculture and Biology* 15: 1359-1362.
- Johnson, M. K., Johnson, E. J., Macelroy, R. D., Speer, H. L. and Bruff, B. S. (1968) Effects of salts on halophilic alga *Dunaliella viridis*. *Journal of Bacteriology* 95: 1461-1468.
- Kim, H. M. and Cho, S. H. (1999) Lavender oil inhibits immediate-type allergic reaction in mice and rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51: 221-226.
- Kukic, J., Popovic, V., Petrovic, S., Mucaji, P., Ciric, A., Stojkovic, D. and Sokovic, M. (2008) Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry* 107: 861-868.
- Kupidłowska, E., Gniazdowska, A., Stępień, J., Corbineau, F., Vinel, D., Skoczowski, A., Janeczko, A. and Bogatek, R. (2006) Impact of sunflower (*Helianthus annuus* L.) extracts upon reserve mobilization and energy metabolism in germinating mustard (*Sinapis alba* L.) seeds. *Journal of Chemical Ecology* 32: 2569-2583
- Leung, A. Y. and Foster, S. (1996) *Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Li, Z., Keasling, J. D. and Niyogi, K. K. (2012) Overlapping photoprotective function of vitamin E and carotenoids in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology* 158: 313-323.
- McCready, R. M., Guogolz, J., Silvtera, V. and Owens, H. S. (1950) Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry* 22: 1156-1160.
- Mishra, A., Mandoli, A. and Jha, B. (2008) Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 1093-1101.
- Narwal, S. S. (2010) Allelopathy in ecological sustainable organic agriculture. *Allelopathy Journal* 25: 51-72.
- Omokolo, N. D., Tsala, N. G. and Djocgoue, P. F. (1996) Changes in carbohydrate, amino acid and phenol content in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. And Grif. *Annals of Botany* 77: 153-158.
- Petrova, S. T., Valcheva, E. G. and Velcheva, I. G. (2015) A case study of allelopathic effect on weeds in wheat. *Ecologia Balkanica* 7(1): 121-129.
- Porra, R. J., Schafer, W., Cmiel, E., Katheder, I. and Scheer, H. (1994) The derivation of the formyl-group oxygen of chlorophyll b in higher plants from molecular oxygen. Achievement of high enrichment of the 7-formyl-group oxygen from $^{18}\text{O}_2$ in greening maize leaves. *European Journal of Biochemistry* 219: 671-679.
- Prado, F. E., Boero, C., Gallardo, M. and Gonzalez, J. A. (2000) Effect of NaCl on germination, growth and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* wild seeds. *Botanical Bulletin Academia*

- Sinica 41: 27-34.
- Renaud, E. N. C., Charles, D. J. and Simon, J. E. (2001) Essential oil quantity and composition from 10 cultivars of organically grown lavender and lavandin. *Journal of Essential Oil Research* 13: 269-273.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M. and Pridham, J. B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 23: 375-383.
- Romero-Romero, T., Luisa Anaya, A. and Cruz-Ortega, R. (2002) Screening for effects of phytochemical variability on cytoplasmic protein synthesis Pattern of crop plants. *Journal of Chemical Ecology* 28: 617-629.
- Salguero, A., de la Morena, B., Vigar, J., Vega, J. M., Vilchez, C. and Leon, R. (2003) Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomolecular Engineering* 20: 249-253.
- Schoen, M. (1988) Cell counting. In: *Experimental phycology* (Eds. Lobban, C., Champan, D. and Kermer, B. P.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Shariati, M. and Lilley M. C. C. (1994) Loss of intracellular glycerol from *Dunaliella* by electroporation at constant osmotic pressure: subsequent restoration of glycerol content and associated volume changes. *Plant, Cell and Environment* 17: 1295-1304.
- Singh, H. P., Batish, D. R. and Kohli, R. K. (2003) Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. *Critical Review in Plant Sciences* 22: 239-311.
- Singh, K. P. and Singh, K. (1993) Influence of stimulated water stress on free proline accumulation in *Triticum aestivum* L. (wheat). *Indian Journal of Plant Physiology* 26: 319-321.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178
- Suman, A., Shahi, H. N., Singh, P. and Guar, A. (2002) Allelopathic influence of *Vigna mungo* (black gram) seeds on germination and radical growth of some crop plants. *Journal of Plant Growth Regulation* 38: 69-74.
- Swain, T. (1977) Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 479-501.
- Tanaka, R., Koshino, Y., Sawa, S., Ishiguro, S., Okada, K. and Tanaka, A. (2001) Overexpression of chlorophyllide a oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 26: 365-373.
- Tian, J. Y. and Yu, J. (2009) Changes in ultrastructure and responses of antioxidant systems of algae (*Dunaliella salina*) during acclimation to enhanced ultraviolet-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 97: 152-160.
- Vierling, V. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 579-620.
- Weston, L. A. and Duke, S. O. (2003) Weed and crop allelopathy. *Critical Review in Plant Sciences* 22: 367-389.
- Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B. and Cetiner, S. (2014) Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PLOS One* 9: e91957.

Tolerance induction to stress caused by lavender (*Lavandula angustifolia*) extracts in the microalga *Dunaliella salina* through metabolic modifications and β -carotene production

Sahar Mazang-Ghasemi¹, Alireza Einali^{1*}, Jafar Valizadeh¹ and Meisam Noroozifar²

¹ Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

² Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

Abstract

The inhibitory or stimulatory effect of one plant on other plant species through the released chemical compounds into the environment, known as allelochemicals, is called allelopathy. In the present study, effect of aqueous extracts of lavender (*Lavandula angustifolia*) leaves on growth pattern and ability of β -carotene production in unicellular green alga, *Dunaliella salina* was investigated. Based on these results, phenolics content and antioxidant capacity of the extracts was relatively low. Treated cultures with extract concentrations of 1, 2, 3 and 4 % showed that the process of cell division was ceased because of extracts phytotoxicity. However, the chlorophyll and β -carotene concentration pronouncedly increased in phytotoxin-treated cells, so that the highest of these values were detected in 3 % extracts-exposed cells. Percentage change of all three fresh weight, total sugar and protein between 0 and 48 h of phytotoxins treatment was significantly increased concurrently with increasing dose of extracts. These results suggest that *D. salina* tolerate allelochemicals-induced stress by metabolic modifications. Therefore, phytotoxins-tolerance mechanisms in *D. salina* are associated with physiological and metabolic adjustments by allocating the carbon flux to the synthesis of the sugars, chlorophyll and β -carotene, which induce phytotoxins stress tolerance in this alga.

Key words: Allelochemicals, Lavender, β -carotene, Metabolites, *Dunalilla salina*

* Corresponding Author: aeinali@science.usb.ac.ir