مجله علوم وفنون دریایی، فصل نامه ی علمی پژوهشی

دوره ۲۰، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۸۶ تا ۹۴

مقاله پژوهشی

Available Online: *http://jmst.kmsu.ac.ir*

تغییر در رشد، تولید بتا-کاروتن و الگوی باند پروتئینی در ریزجلبک *Dunaliella salina* در حضور کلشیسین(اثر کلشیسین بر متابولیت ها و ویژگی‌های ریزجلبک دونالیلا سالینا)

نرگس علیرحیمی [۱*]، علاءالدین کرد نایبج [۱]، ایت الله رضایی [۱]، داریوش طالعی [۲]

۱. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۲. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

*** نویسنده مسئول، پست الکترونیک:**nalirahimi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۵/۰۸/۱۶

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22113/jmst.2016.38962

چکیده

با هدف بررسی تولید بتا-کاروتن، برخی صفات و الگوی باند پروتئینی در ریزجلبک *D. salina* در حضور کلشیسین پس از کشت ریزجلبک مورد نظر و ایجاد جمعیت مناسب، تیمارهای کلشیسین در قالب طرح تصادفی شامل غلظت‌های ۰، ۰/۰۵۰، ۰/۱ و ۰/۲ درصد وزنی به حجمی کلشیسین اعمال شد. تغییرات حاصل در رشد و میزان بتاکاروتن، کلروفیل A، B و کل و کاروتنوئیدهای تولید شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه گیری شد. همچنین از الکتروفورز به روش SDS-PAGE با هدف بررسی الگوی باندهای پروتئینی استفاده گشت. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف کلشیسین باعث تفاوت معنی دار در الگوی باندهای پروتئینی این جلبک در ۱۱ نمونه مورد بررسی نشد و تنها میزان تولید برخی پروتئین‌ها تحت تاثیر قرار گرفت. در حالی که این تیمار سبب ایجاد تفاوت میزان بتاکاروتن، کلروفیل A، B، کل، کاروتنوئید و رشد ریزجلبک شد. بتاکاروتن به عنوان مهم‌ترین متابولیت دونالیلا سالینا در تمام غلظت‌های کلشیسین افزایش داشت. با اعمال تیمار کلشیسین کاروتنوئید، کلروفیل A، B وکل افزایش یافت در حالی که رشد کاهش داشت. چنین نتیجه گیری می‌شود که اعمال تیمار کلشیسین سبب کاهش رشد و افزایش تولید بتاکاروتن، کلروفیل B, A و کل، کارتنوئیدها در دونالیلا می‌شود. در حالی که اثر معنی داری بر الگوی بیان پروتئین‌ها ندارد. پس استفاده از این ماده برای تولید بیش‌تر بتاکاروتن مناسب خواهد بود.

واژگان کلیدی: الکتروفورز، بتاکاروتن، دونالیلا سالینا، کلشیسین، متابولیت

Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

۱. مقدمه

D. salina به عنوان یکی از گونه‌های مهم این جنس، علاوه بر این‌که در غلظت‌های بسیار بالای نمک رشد می کند، می‌تواند مقادیر بالای بتاکاروتن را در کلروپلاست خود جمع کند (Nikookar *et al*., 2004; Fazeli *et al*., 2006; Borowitzka and Siva, 2007; Hadi *et al*., 2008). بتاکاروتن به عنوان منبع رنگیزه خوراکی برای فرآورده‌های غذایی و غذاهای رژیمی استفاده می‌شود. همچنین، بتاکاروتن به خاطر خاصیت ضدسرطانی و آنتی-اکسیدانی شناخته شده و در صنایع دارویی کاربرد فراوانی دارد. در سال‌های اخیر کشت این جلبک برای تولید کاروتنوئیدها افزایش یافته است است (Hosseini and shariati, 2009; Raja *et al*., 2007). مطالعات زیادی با هدف شناخت هرچه بیشتر جلبک دونالیلا انجام شده است. در مطالعه‌ای ویژگی‌های مختلف جلبک دونالیلا مورد بررسی قرار گرفت (Aharon, 1905-2005). بررسی اثرات عوامل شیمیایی بر ویژگی‌های رشد و نموی سلول‌ها در گیاهان و جانوران مختلف همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است. یکی از این مواد کلشیسین است که با اثرات خود بر روی فعالیت دستگاه دوک‌های تقسیم و به‌طور مشخص با فلج کردن الیاف پروئینی این دستگاه، می تواند از با جلوگیری از گذار سلول ها از مرحله متافاز به مرحله آنافاز، زمینه مضاعف شدن کرووزوم‌ها را پس از دوره بعدی همانندسازی در سلول‌های پس از تقسیم فراهم کند

با توجه به این موضوع، کارهای زیادی برروی اثر تیمار کلشیسین بر سطح پلوئیدی و سایر ویژگی‌های بسیاری از گیاهان و جلبک‌ها و موجودات انجام شده است: بررسی اثر کلشیسین بر تقسیم سلولی جلبک سبز *Gonium Pectorale* توسط (Sarma & Shyam.1976)و همچنین بر کلنی جلبک‌های *Hydrodictyon* و *Pediastrum*و *Sorastrum* صورت گرفت (Marchant and Pickett, 1974). صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک و تعداد دانه در لیموترش پس از اعمال کلشیسین مورد ارزیابی قرار گرفت (Hamill *et al*, 1992).

با توجه به دوره رشدی کوتاه این جلبک و همچنین تولید مواد ارزشمندی مانند بتاکاروتن توسط آن، تلاش برای یافتن راه‌هایی برای افزایش تولید و استخراج این مواد می تواند دریچه ای برای بهبود دستیابی آسان‌تر و اقتصادی‌تر به این مواد باشد. یکی از روش‌های احتمالی برای دستیابی به این مهم، بررسی اثر کلشیسین بر تولید این مواد در ریزجلبک دونالیلا است. انتظار می‌رود با استفاده از کلشیسین و تغییرات حاصل از استفاده از آن در این ریزجلبک، تولید برخی از فراورده‌های ژنی از جمله متابولیت‌ها در یاخته‌ها افزایش یابند

۲.مواد و روش‌ها

برای تهیه نمونه‌ها از جمعیت جلبکی حاصل از نمونه برداری از دریاچه مهارلو استان فارس در سال ۱۳۹۲ استفاده شد. محیط کشت جانسون با (PH= 7.5) تهیه شد. برای دست‌یابی به شرایط مناسب رشدی و غلظتی از سلول‌ها ۲ بار واکشت صورت گرفت. در آخرین واکشت به ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت جانسون ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون جلبکی اضافه شد. پس از رسیدن به شرایط مطلوب، غلظت سلول‌ها در سوسپانسون جلبکی نزدیک به ۳×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر شد.

در این آزمایش از چهار تیمار کلشیسین (۰ ، ۰٫۰۵٪ ، ۰٫۱٪ ، ۰٫۲٪ وزنی به حجمی) استفاده گردید. برای اعمال تیمار مقدار مورد نظر از پودر کلشیسین به سوسپانسیون‌های جلبکی افزوده شد و نمونه‌ها مجددا به روی شیکر منتقل شدند. با انجام سانتریفیوژ کلشیسین از محیط جدا شد و محیط کشت جدید به آن افزوده شد.

به منظور انجام الکتروفورز، پس از استخراج پروتئین از نمونه‌های مورد نظر، پروتئین‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس ژل آماده شده و پروتئین‌های آماده شده در چاهک‌ها لود شدند. ژل ولتاژ ۹۰ ولت ران گردید. پس از گذشت ۲ ساعت این که ژل Run شده و پس از رنگ آمیزی از باندهای ایجاد شده عکسبرداری شد. اندازه گیری رشد با استفاده از لام نئوبار و با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰ صورت گرفت.

به منظور سنجش میزان بتاکاروتن، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریوفیوژ گردید. رسوب باقی مانده به نسبت ۲ به ۱ محلول اتانول هگزان اضافه شد. پس از ورتکس، نمونه‌ها مجددا به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت

۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریوفیوژ گردید. با جدا کردن فاز رویی (هگزان) و خواندن جذب در ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) میزان بتاکاروتن سلول‌ها به دست آمد (Eijckelhoff and Dekker, 1997). جهت سنجش کلروفیل و کاروتنوئید، ۱ میلی‌لیتر از سوپانسیون جلبکی سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب باقی مانده ۱ میلی لیتر استون ۸۵٪ ریخته شد و در تاریکی هم زده و به مدت ۵ دقیقه ماند، سپس دوباره سانتریوفیوژ شد. میزان جذب نور محلول رویی در دستگاه اسپکتوفتومتر (PerkinElmer, Lambda 650) با طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۶۴ و۴۵۲ نانومتر خوانده شد، نتایج در فرمول های زیر قرار داده شد تا به ترتیب میزان کلروفیل a ، b و کاروتنوئید به دست آید (Frank and Wegmann, 1979).

$$C\ chl.a = 10.3 \times E663 - 0.918 \times E644 \quad (۱)$$

$$C\ chl.b = 19.7 \times E644 - 3.87 \times E633 \quad (۲)$$

$$C\ car. = 4.20 \times E452.5 - 0.0264 \times C\ chl.a - 0.496 \times C\ chl.b$$

داده‌های حاصل به روش تجزیه واریانس در قالب طرح کاملا تصادفی آنالیز شدند. همچنین مقایسات میانگین تیمارها نیز به روش آزمون LSD انجام شد. برای این آنالیزها از نرم افزارهای MSTATC و SPSS استفاده شد.

۳. نتایج

در بررسی الکتروفورز انجام شده، الگوهای باندهای پروتئینی جلبک دونالیلا سالینا به وسیله SDS-PAGE بیش از ۲۹ باند پروتئینی با وزن مولکولی KD ۱۴-۱۰۰ مشاهده گردید که فراوانی آن‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. بین ۱۱ نمونه مورد بررسی تفاوت معنی داری ($P \leq 0.01$) وجود ندارد که به این معنی است که اعمال غلظت‌های مختلف کلشیسین اثر معنی داری ($P \leq 0.01$) بر الگوی باندهای پروتئینی این جلبک نداشته است.

بررسی رشد، نشان داد که غلظت های متفاوت این ماده اثر معنی داری بر تعداد سلول‌های جلبک داشته است. به گونه-ای که در غلظت ۰ (شاهد) بیشترین تعداد سلول شمارش شد. کم‌ترین میزان مربوط به غلظت ۰٫۰۵٪ بوده و دو غلظت ۰٫۱٪ و ۰٫۲٪ نیز تفات معنی داری نداشتند(شکل ۲).

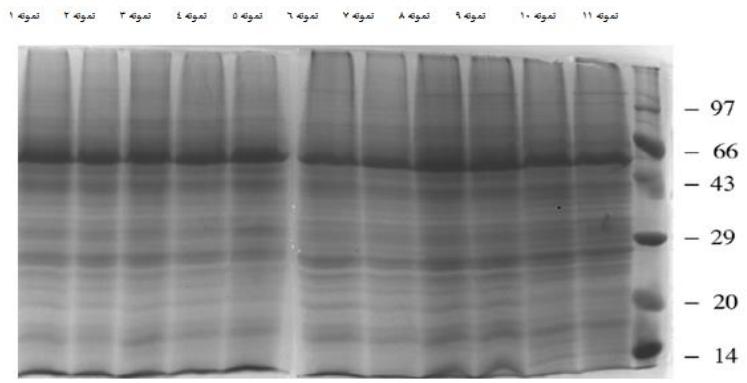
طبق شکل ۳ کم‌ترین میزان بتاکاروتن مربوط به غلظت ۰ کلشیسین (شاهد) می‌باشد در حالی که این میزان دارای تفاوت معنی داری با سایر غلظت‌هاست. این نشان می‌دهد که استفاده از کلشیسین سبب افزایش میزان کاروتن در جلبک دونالیلا سالینا می‌شود. مقادیر سه غلظت ۰ و ۰٫۰۵٪ و ۰٫۱٪ و ۰٫۲٪ کلشیسین تفاوت معنی داری ندارند

.

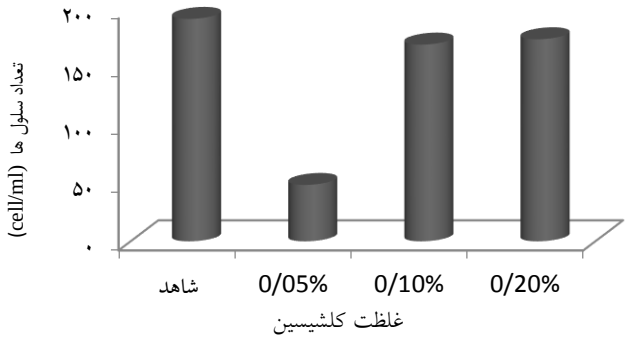
. جدول ۱- جدول تجزیه واریانس اثر کلشیسین بر جلبک *D.salina*

منابع تغییرات	df	کاروتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل B	کلروفیل A	تعداد سلول	بتاکاروتن
غلظت کلشیسین	۳	۱٫۴۰۳**	۱۴٫۱۳**	۲٫۱۶۴**	۲۴٫۲۳**	۳۸۶۷۷٫۳**	۳۰٫۹۰۷*
خطا		۰٫۱۶	۰٫۱۵۵	۰٫۰۲۵	۰٫۰۷۲	۳۱۲٫۷۶	۸٫۷۵۱
Cv		٪۱۵٫۲۱	٪۱۵٫۴۳	٪۲۰٫۷۲	٪۱۲٫۰۳	٪۱۲٫۱۱	٪۳۱٫۹۹

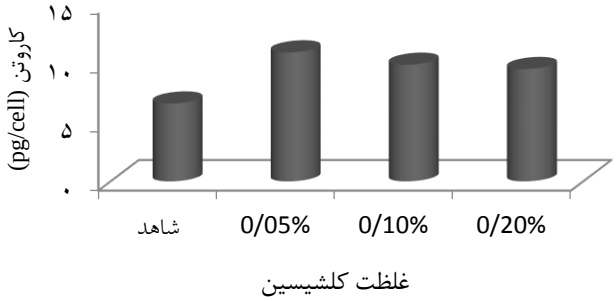
* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد می‌باشد.



شکل۱- الکتروفورز پروتئین‌ها به روش SDS-PAGE. ستون اول از سمت راست مربوط به سایز مارکر است. نمونه‌های ۱ و ۲ و ۳ مربوطه به غلظت ۰,۰۵٪ کلشیسین در زمان‌های ۶ و ۱۲ و ۲۴ ساعت، نمونه‌های ۴ و ۵ و ۶ مربوطه به غلظت ۰,۱٪ کلشیسین در زمان‌های ۶ و ۱۲ و ۲۴ ساعت، نمونه‌های ۷ و ۸ و ۹ مربوطه به غلظت ۰,۲٪ کلشیسین در زمان‌های ۶ و ۱۲ و ۲۴ ساعت و نمونه‌های ۱۰ و ۱۱ نیز نمونه‌های فاقد کلشیسین هستند.



شکل ۲- اثر غلظت های مختلف کلشیسین بر رشد یا تعداد سلول‌ها در ریزجلبک *D.salina*

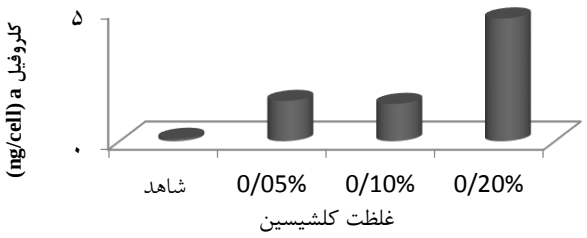


شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف کلشیسین بر بتا کاروتن در ریزجلبک *D.salina*

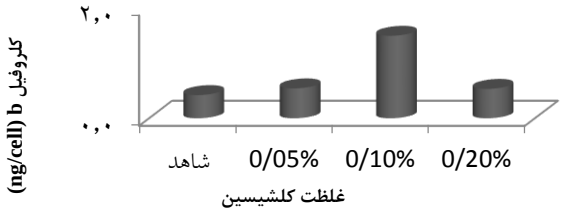
طبق نتایج با افزایش غلظت کلشیسین میزان تولید کلروفیل A به صورت معنی داری افزایش یافته است به این صورت که کم‌ترین میزان کلروفیل A تولید شده مربوط به غلظت ۰ (شاهد) و بیش‌ترین آن مربوط به غلظت ۰,۲٪ کلشیسین می باشد. (شکل ۴) همچنین غلظت‌های مختلف کلشیسین سبب افزایش در میزان کلروفیل B شده است به گونه ای که بیش‌ترین میزان این کلروفیل در غلظت ۰,۱٪ دیده می‌شود و با سایر غلظت‌ها تفاوت معنی داری دارد. این در حالی است که کم‌ترین میزان کلروفیل B در تیمار شاهد دیده شد. (شکل ۵). نتایج نشان داده شده در شکل ۶ نشان می دهد که با افزایش غلظت کلشیسین، میزان کلروفیل کل افزایش یافته است. کم‌ترین میزان کلروفیل

مربوط به غلظت ۰ (شاهد) بوده و این غلظت با سایر غلظت-ها تفاوت معنی داری دارد. میزان کلروفیل کل در دو غلظت ۰,۰۵٪ و ۰,۱٪ تفاوت معنی دار نداشت اما با دو غلظت دیگر تفاوت معنی دار نشان داد. بیش‌ترین میزان آن نیز مربوط به غلظت ۰,۲٪ بود. (شکل ۶)

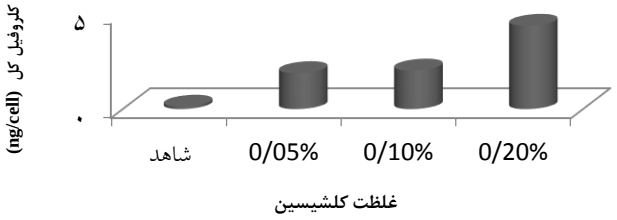
بررسی‌ها نشان می‌دهد که با افزایش غلظت کلشیسین میزان کاروتنوئید افزایش می‌یابد به گونه‌ای که کم‌ترین میزان آن مربوط به غلظت ۰ (شاهد) و بیش‌ترین آن مربوط به غلظت ۰,۲٪ کلشیسین می‌باشد مقادیر دو غلظت ۰,۰۵٪ و ۰,۱٪ تفاوت معنی داری نشان ندادند.



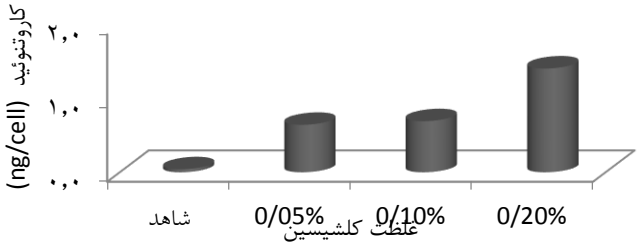
شکل ۴- اثر غلظت های مختلف کلشیسین بر کلروفیل A در ریزجلبک *D.salina*.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف کلشیسین بر کلروفیل B در ریزجلبک *D.salina*.



شکل ۶- اثر غلظت‌های مختلف کلشیسین بر کلروفیل کل در ریزجلبک *D.salina*.



شکل ۷- اثر غلظت‌های مختلف کلشیسین بر کاروتوئید در ریزجلبک

۴.بحث و نتیجه گیری

کلشیسین هنگام تقسیم سلول های عادی بر این تقسیم در محل میتوز اثر می گذارد. این ماده تقسیم میتوز را در متافاز متوقف می‌کند.کلشیسین اثرات آنتی نئوپلاستی را در تحقیقات درون و برون سلولی به خوبی نشان داده است ولی به علت سمیت، مصرف آن با محدودیت همراه است. کلشیسین مهم‌ترین عامل شیمیایی دوبرابر نمودن کروموزوم هاست که در سطح وسیع به کار می رود. در اغلب گونه‌های گیاهی القای پلی‌پلوئیدی و استفاده از مواد جهش‌زا مانند کلشیسین توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش تجاری را افزایش می دهد (Adaniya and Shira, 2001). همچنین این افزایش ممکن است در کمیت یا کیفیت این ترکیبات باشد (Dhawan and Lavania, 1996). برخی ترکیباتی که در زمان تنش در گیاهان افزایش پیدا می‌کنند ممکن است دارای اثرات دارویی نیز باشند، بسیاری از فراورده‌های ثانویه جزء این ترکیبات شیمیایی گیاهی هستند. این مسئله در شرایط آزمایشگاهی و توسط کشت بافت قابل اندازه‌گیری و نتیجه-گیری دقیق‌تری می‌باشد، چرا که شرایط قابل کنترل و دور از سایر تنش‌های محیطی می‌باشد. برای این تحقیقات از کشت سوسپانسیون و سلول گیاهی استفاده متعدد شده است (Rezaei *et al.*, 2011). تعدادسلول‌ها- ماده شیمیایی کلشیسین به عنوان یک ماده محرک و با هدف ایجاد پلی‌پلوئیدی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد و در کنار این حالت، این ماده می‌تواند اثرات جانبی دیگری نیز داشته باشد. از جمله تاثیر بر فرآیندهای رشد و نموی و سلول‌های جلبک دونالیلا سالینا با افزایش غلظت کلشیسین مورد استفاده در محیط کاهش یافته است که این نشان دهنده کاهش تکثیر و تولیدمثل سلول‌ها است. زیرا اساسا نباید انتظار داشت که تمامی سلول ها تحت اثر کلشیسین تعداد کروموزوم‌هایشان دو برابر شود. در واقع درصد اندکی از سلول‌ها ممکن است سطح پلوئیدی‌شان در اثر کلشیسین تغییر کند. علت اصلی مرگ و میر سلول‌ها به علت سمیت حاصل از کلشیسین است زیرا کلشیسین به عنوان یک ماده جهش زا و در عین حال سمی است که حتی غلظت‌های بسیار پایین آن می‌تواند سبب مرگ شود (برقعی و همکاران، ۱۹۹۹). نتایج مشابهی در زمینه اثر منفی تیمار کلشیسین بر رشد و نمو سلول‌ها و گیاهان مختلف وجود دارد. برای مثال افزایش غلظت تیمار کلشیسین در گونه‌های مختلف مرکبات افزایش مرگ و میر را به دنبال داشت (پوراکبری کسمایی، ۱۳۹۰). همچنین بررسی گیاه مرزنجوش تحت تیمار کلشیسین نشان داد که این ماده سبب کاهش رشد و نمو سلول‌های این گیاه شد (Hamill *et al.*, 1992). افت رشد و نمو و بهم ریختگی اندام‌های بوته‌های تیمار شده به طور کامل سبب مرگ و میر گیاه شد (Arthur, 1993). همچنین گیاه آویشن نشان داد که گیاهچه‌های حاصل از بذور تیمار شده با کلشیسین در مرحله جوانه زنی و برخی در مرحله دانه رست از بین رفتند. این مرگ و میر به دلیل اثر سمی کلشیسین بر جنین بذور می‌باشد (اصلانی و همکاران، ۱۳۹۳). همچنین نتایج مشابهی در استفاده از تیمار کلشیسین در مورد تک سلولی-ها و جلبک‌ها مشاهده شده است. برای مثال این ماده سبب کاهش رشد و مهار موقت تقسیم سلولی در جلبک کلامیدوموناس و *Conium* شد (Gavaudan and Kobozieffe, 1938; Cornman, 1942). همچنین در گیاه ریحان تیمار بذر با استفاده از محلول کلشیسین سبب کاهش جوانه زنی و مرگ جنین شد (ملک زاده شفارودی و همکاران، ۱۳۹۰). کلروفیل‌ها و کاروتنوئید- ساختمان-های درونی سلول‌های جلبک دونالیلا سالینا به دلیل داشتن کلروفیل و کلروپلاست و انجام فتوسنتز تا حدودی شبیه به ساختمان درونی سلول‌های گیاهی است کاروتنوئیدها گروهی از مولکول‌های ایزوپرونوئید هستند که توسط اندام-های فتوسنتزی ساخته می‌شوند و یکی از رنگیزه های کلیدی و مهم سیستم آنتی اکسیدانی در گیاهان هستند (Andrew *et al.*, 2008). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که غلظت‌های مختلف کلشیسین اثر معنی داری بر میزان کلروفیل (a, b و کل) و همچنین کاروتنوئیدتولید شده در سلول‌های جلبک دونالیلا سالینا داشتند به گونه ای که با افزایش غلظت کلشیسین میزان تولید کلروفیل و کاروتنوئید افزایش یافت. اندازه گیری‌های انجام شده نشان داد که میزان کلروفیل a و b و کل در گیاه سورگوم تحت تیمار غلظت‌های مختلف کلشیسین به صورت معنی داری افزایش یافته است. به گونه ای که حداکثر میزان کلروفیل اندازه گیری شده در غلظت ۰,۲٪ و زمان ۴۸ ساعت دیده شده است (ستوده اردبیلی و همکاران، ۱۳۹۳). (Mathyra et al.,2006) نشان دادند که در نوعی آکاسیا در اثر اعمال مواد جهش زا مانند کلشیسین میزان

کلروفیل تا ۴۰٪ افزایش می‌یابد. تیمار کلشیسین برگیاه لیموشیرین و همچنین گیاه نوروزک سبب افزایش میزان کلروفیل و کارتنوئید شد (پوراکبری کسمائی، ۱۳۹۰؛ استاجی، ۱۳۹۱). هم چنین در گیاه پروانش رقم روزنا نیز نشان داده‌شده که افزایش غلظت کلشیسین در این گیاه با افزایش تولید کلروفیل همراه است و بیش‌ترین میزان آن نیز در غلظت ۰,۴٪ کلشیسین مشاهده شد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۳).

اعمال این تیمار باعث افزایش کلروفیل و کاروتنوئید و به دنبال آن افزایش سازگاری به عوامل محیطی می‌شود (Liu *et al*., 2011). طبق نتایج این تحقیق و سایر مواردی که در بالا به برخی از آن‌ها اشاره شد سلول‌های جلبک‌ها و گیاهان در مواجهه با کلشیسین به منظور سازگاری با تغییر ایجاد شده، میزان کلروفیل و کاروتنوئید خود را افزایش می‌دهند. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش کلشیسین ماده ای مناسب در جهت افزایش میزان بتاکاروتن تولید شده توسط ریزجلبک *D.salina* می‌باشد. با توجه به کاهش رشد و تعداد سلول‌های تحت تیمار و افزایش میزان بتاکاروتن تولید شده می‌توان نتیجه گرفت که اگرچه تعداد سلول‌ها تحت این آزمون کاهش می‌یابند اما سلول‌های باقی مانده توانایی بالایی در تولید بتاکاروتن دارند. همچنین تغییرات حاصل از اضافه شدن کلشیسین به محیط سبب افزایش تولید کلروفیل و کاروتنوئید می‌شود که این افزایش در جهت افزایش مقاومت سلول‌ها در برابر تغییرات ایجاد شده و سازگاری بیشتر سلول‌ها است.

۵- تقدیر و تشکر

با تشکر از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شاهد و کلیه دوستانی که ما را در انجام این آزمایش یاری نمودند

bicolor cv. KFS2). مجله علوم زراعی ایران. جلد ۱۶، شماره ۲.

ملک‌زاده شفارودی، س.، غنی، ع.، حبیبی، م.، امیری، ا. (۱۳۹۰). بررسی امکان القا پلی پلوئیدی در گیاه ریحان (*ocimum basilicum l.*) با استفاده از کلشیسین. نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی). جلد ۲۵، شماره ۴. صفحات ۴۶۱-۴۶۹.

Adaniya, S. and Shirai, D. (2001). In vitro induction of tetraploid ginger (Zingiber officinale Roscoe) and its pollen fertility and germinability. Science Horticulture, 88 (4): 277-287.

Aharon, O. A hundred years of Dunaliella research: 1905–2005. doi: 10.1186/1746-1448-1-2. PMC1224875.

Andrew, J., Moreau, M., Kuntz, G. and Pagny, C. (2008). An investigation of carotenoid biosynthesis in Coffea canephora and Coffea arabica. Plant physiol. 165: 1087-1106.

Arthur, E. (1993). Oryzalin conversion of lilies. Nals yearbook, 46. Arkansas: 133-142.

Borowitzka, M.A. and Siva, C. J. (2007). The taxonomy of the genus Dunaliella (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. Journal of Applied Phycology 19: 567–590.

Comman, I. (1942). Susceptibility of Colchicum and *Clamydomonas* to colchicine. Bot. Gaz., 104: 50-61.

Dragland, S. (2003). Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. Journal Nutrition.133: 1286-1290.

اصلانی، ف.، برنارد، ف.آ.، میرزاجانی، ف.، هادیان، ج. (۱۳۹۳). مقایسه استفاده کلشیسین بر روی بذر و سرشاخه آویشن دنائی (*Thymus daenensis* Celak) از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی روزنه و محتوای DNA در گیاهچه‌های درون شیشه‌ای. فرایند و کارکرد گیاهی. جلد ۳، شماره ۱۰.

استاجی، ع. (۱۳۹۱). بررسی تأثیر تیمار کلشیسین بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مواد موثره در نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth.) . پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه ارومیه.

برقعی، س.ف.، ساریخانی، ح.، چاییچی، م.، میرجلیلی، م.ح. (۱۳۹۰). بررسی اثرات پلی‌پلوئیدی بر برخی صفات مورفولوژیکی و تغییرات شیمیایی اسانس در گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officials L.*). هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران، اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان.

پوراکبری کسمائی، ر. (۱۳۹۰). بررسی فلو سایتومتری و فیزیولوژیک تاثیر سطوح مختلف کلشیسین روی پلی پلوئیدی شدن در دو گونه ی مرکبات و اندازه گیری تعدادی از ویژگی های مورفولوژیک. پایان نامه کارشناسی ارشد.

حسینی، ح.، چهرازی، م.، نباتی احمدی، د.، محمودی سورستانی، م. (۱۳۹۳). القا اتوتراپلوئیدی در گل پروانش (*Catharanthus roseus* Don.) رقم روزنا به منظور ایجاد تنوع در ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیک و فتولوژیکی با استفاده از تیمار کلشیسین. فرایند و کارکرد گیاهی. جلد ۳، شماره ۹.

ستوده اردبیلی، گ.، اصغری زکریا، ر.، زارع، ن. (۱۳۹۳). اثر القای پلی پلوئیدی بر صفات مورفوفیزیولوژیک سورگوم (*Sorghum*

Dhawan, O.P., and Lavania, U. (1996). Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. Euphytica. 87: 81-89.

Eijckelhoff C. and Dekker JP. (1997). A routine method to determine the chlorophyll a, pheophytin and β- carotene contents of isolated photosystem II reaction center complexes. Photosynthesis Research. 52: 69-73.

Fazeli, M.R., Tofighi, H., Samadi, N. and Jamalifar, H. (2006). Effects of salinity on β-carotene production by Dunaliella tertiolecta DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran, Bioresource Technology 97(18): 2453-2456.

Frank, G,. and Wegmann, K. (1979). Physiology and biochemistry of glycerol biosynthesis in Dunaliella. Biol.Zbl. 93: 707-723.

Gavaudan, P. and Kobozieff, N. (1938). Action de la colchicine sur la caryocinese et la

cytodierese des *Chlamydomonadinees.* C.R. Biol. Paris, 127: 790-793.

Hadi, M.R., Shariati M. and Afsharzadeh S. (2008). Microalgal biotechnology: carotenoid and glycerol production by Dunaliella sp. algae isolated from the Gave khooni salt marsh, Iran. Biotechnology and Bioprocess Engineering 13(5): 540-544.

Hamill, S.D., Smith, M.K. and Dodd, W.A. (1992). In vitro induction of banana autoteteraploidy by colchicines treatment of micro propagated diploids. Australian Journal Botany. 40: 887-96.

Hosseini,T. A and Shariati, M. (2009). Dunaliella biotechnology: methods and applications. Journal of Applied Microbiology,107(1): 14-35.

Liu, S., Chen, S., Chen, Y., Guan, Z., Yin, D. and Chen, F. (2011). In vitro induced tetraploid of *Dendranthema nankingense* (Nakai) Tzvel. shows an improved level of abiotic stress tolerance. Scientia Hortic. 127: 411-419.

Marchant, H. and Pickett, H. (1974). The effect of colchicine on colony formation in the algae Hydrodictyon, Pediastrum and Sorastrum. Planta. Dec;116(4):291-300.

Mathura, S., Fossey, A. and Beck, S. (2006). Comparative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black Wattle *(Acacia mearnsii*). Forestry. 79: 381-388.

Nikookar, K., Moradshahi, H. and Kharati, M. (2004). Influence of salinity on the growth pigmentation and ascorbate peroxidase activity of Dunaliella salina isolated from Maharlu salt Lake in Shiraz. Iranian Journal of Science and Technology,Transaction 28(A1): 117-125.

Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D. and Rengasamy, R. (2007). PCR-identification of Dunaliella salina (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. Microbiological Research 162(2): 168-76.

Rezaei, A., Ghanati, F. and Behmanesh M. (2011). Promotion of Taxol production and release by methyl jasmonate, ultrasound, and in situ extraction from hazelnut (*Corylus avellana* L.) cell culture. Iranian Journal of Plant Biology. 6(7): 55-72.

Shyam, R. and Sarma, Y.S.R.K. (1976). Effects of Colchicine on the Cell Division of a Colonial Green Algal Flagellate Gonium Pectorale Muller, Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 29:1, 27-33.

Journal of Marine Science and Technology

Winter 2021, Vol. 20, No. 4. P: 86-94.

Available Online: ***http://jmst.kmsu.ac.ir***

Original Article

Changes in Growth, Beta Carotene Production, Traits and Pattern of Protein Band in Dunalitella Salina Microtage in The Pressence of Colchicine

Narges Alirahimi * [1], Alaeddin Kordenaeej [1], Ayatollah Rezaei [1], Daryush Talei [2]

1. Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Medicinal Plant Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.

* Corresponding Author E-mail: nalirahimi@gmail.com

Received: 3 February 2016 **Accepted:** 6 November 2016

DOI: 10.22113/jmst.2016.38962

Abstract

To evaluate the production of beta-carotene, traits and patterns of protein band in *D. salina* microalgae in the presence of colchicine, after microalgae cultivation, colchicine treatments randomized design concentrations of 0, 0.05 and 0.1 and 0.2% Volumetric weight was applied. Changes in growth and beta-carotene, chlorophyll A, B and total and carotenoids produced by spectrophotometer measurements, as well as electrophoresis on SDS-PAGE analysis was used to investigate the protein patterns**.** The results showed that concentrations of colchinicine did not result in significant differences in protein pattern in 11 samples and it just affacted the production of certain proteins.. While this treatment causes a difference in beta-carotene, chlorophyll A, B, total carotenoids and growth. Beta-carotene is the most important metabolites increased in all concentrations of colchicine. Treatment increased the carotenoids, chlorophyll A, B, and total while reduced growth. So the treatment of colchicine reduced the growth and increase the production of beta-carotene, chlorophyll A, B, total and carotenoids is in *Dunaliella*. While no significant effect on the pattern of protein expression. Therefore , it can be concluded that using treatment of colchicine will be useful in beta-carotene productions.

Key words: electrophoresis, beta-carotene, Dunaliella Salina, colchicine, metabolites

Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.