

اثر الیسیتورها و ترکیب فیتوهورمون‌ها بر رشد، محتویات رنگیزه‌های فتوسنتزی و

پروتئین جلبک *Chlorella sorokiniana*

آمنه جمشیدی*^۱، محمدعلی ابراهیمی^۲، طیبه رجبیان^۳، غلامرضا بخشی خانیکی^۴ و شهلا مظفری^۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱

تاریخ تصویب: ۹۷/۲/۹

چکیده

جلبک کلرلا کاربرد دارویی، صنعتی و غذایی دارد. به همین دلیل بالا بردن بیوماس و متابولیت‌های آن ارزشمند است. هدف این پژوهش نیز به دست آوردن بهترین ماده یا ترکیب هورمونی برای افزایش بیوماس و متابولیت‌های ارزشمند *Chlorella sorokiniana* بود. در این پژوهش جلبک *C. sorokiniana* در محیط کشت پایه *Bold* ((*BBM*) اصلاح شده کشت شد. به محیط‌ها نسبت‌های مختلف هورمونی نفتالن استیک اسید ((*NAA*، ایندول بوتیریک اسید ((*IBA* لوکینتین (*Kin*))، نیترات و فسفات و تیامین پیروفسفات افزوده شد. در تیمار با *NAA* (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) + *Kin* (یک میلی‌گرم در لیتر) وزن خشک، محتویات رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت. این صفات در تیمار با *IBA* + *Kin* و تیامین پیروفسفات اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان نمی‌داد بالاترین افزایش معنی‌دار وزن خشک، محتویات رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین نسبت به شاهد در تیمار افزایش نیترات و فسفات مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: بیوماس، جلبک، نیترات و فسفات، هورمون گیاهی.

مقدمه

جلبک کلرلا در صنعت غذایی، دارویی، آرایشی، غذای آبزیان، غذای دام و طیور، به عنوان بیوفیلتر و منبع بیوگاز بیواتانول و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tate et al., 2013, Zabochnicka-Swiatek, 2010). به همین دلیل بالا بردن بیوماس و متابولیت‌های آن ارزشمند است. هورمون‌های گیاهی در جلبک‌ها وجود دارند و تغییر میزان آنها ممکن است سبب تغییر رشد جلبک‌ها گردد (Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2013, Stirk et al., 2013). برخی فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول‌های جلبکی تحت کنترل چنین هورمون‌هایی هستند (Tarakhovskaya et al., 2007). اگرچه مسیر سیگنالینگ برخی از فیتوهورمون‌های جلبک‌ها هنوز ناشناخته است (Tarakhovskaya et al., 2007, Lu & Xu, 2015). Skokan (۲۰۱۴) گزارش کرد که اسپروژیر قادر به متابولیسم اکسین‌های طبیعی مثل IAA است و دخول IAA به داخل سلول

۱. مربی گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور تهران، ایران

* (نویسنده مسئول : ameneh.jamshidi@gmail.com)

۲. دانشیار گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران، ایران

۳. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۴. استاد گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران، ایران

۵. استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور تهران، ایران

جلبک از طریق ناقلین ABC صورت می‌گیرد. محققین اثر نور و تاریکی را بر روی رشد و محتوای هورمون‌های جلبک *Chlorella minutissima* Fott & Novakova آزمایش کردند؛ بیشترین مقدار ایندول‌ها در تاریکی در محیط حاوی گلوکز ایجاد شد، در حالی که کشت‌های قرار گرفته در نور و تاریکی حاوی مقدار بیشتر سیتوکینین بودند (Stirk et al., 2014). در مواردی اثر یک هورمون بر روی رشد یا محتوای متابولیت‌های جلبک‌ها مورد بررسی قرار گرفت؛ برای مثال اثر اکسین‌های طبیعی و سنتزی بر روی متابولیت‌ها، رشد و پاسخ آنتی‌اکسیدانی جلبک *Chlorella vulgaris* Beijerinck آزمایش شد. از اکسین‌های طبیعی ایندول استیک اسید (IAA)، IBA و از اکسین‌های مصنوعی فنیل استیک اسید (PAA) و NAA مورد بررسی قرار گرفت. IAA و IBA در غلظت یک دهم میکرومولار باعث حداکثر افزایش رشد شدند. در حالی که NAA و PAA در غلظت یک میکرومولار حداکثر فعالیت را نشان دادند. در این غلظت‌ها، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین‌های محلول افزایش یافت (Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz, 2014). در بین اکسین‌ها IAA از IBA اثر بیشتری بر رشد داشت که بیشترین اثر خود را در ۵۰ میکرومولار نشان داد (Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2013). طبق گزارش Liu و همکاران (۲۰۱۷b)، NAA در غلظت‌های نیم، یک، یک و نیم، دو، دو و نیم میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش رشد *C. vulgaris* گردید و حداکثر رشد در غلظت یک میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در مواردی از دو یا چند هورمون برای افزایش رشد استفاده شده است. در تحقیقی اثر برهم کنش براسینواستروئیدها و سیتوکینین‌ها بر روی رشد جلبک *C. vulgaris* مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی از سیتوکینین‌های ترانس‌زاتین، دی فنیل اوره و کینتین استفاده شد. نتایج نشان داد که کلرلا نسبت به سیتوکینین‌ها حساسیت نشان می‌دهد. سیتوکینین‌ها با براسینواستروئیدها همکاری دارند و بالاترین اثر (تقسیم سلول‌ها، تجمع پروتئین، کلروفیل و مونوساکاریدها) در مخلوط براسینولید با ترانس‌زاتین به دست آمد و کمترین اثر در مخلوط ۲۸ هموکاستاسترول با ۱،۳ دی فنیل اوره حاصل شد. در اثر همکاری بین دو نوع هورمون، تعداد سلول‌ها و میزان متابولیت‌ها تقریباً به دو و نیم تا سه برابر هورمون تنها رسید (Bajguz, 2000). در پژوهشی آثار همکاری بین اکسین‌ها و براسینواستروئیدها بر روی جلبک *C. vulgaris* مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی اکسین‌های ایندول پیرویک اسید (IPA)، IBA و IAA به طور منفرد یا همراه با براسینواستروئیدها استعمال شد. با افزایش اکسین از یک میکرومولار تا ۵۰ میکرومولار، تعداد سلول‌ها، محتوای کلروفیل، پروتئین و مونوساکاریدها افزایش یافت، ولی در غلظت ۱۰۰ میکرومول هم‌آنها کاهش یافت. حداکثر رشد و مقدار متابولیت‌ها در ۵۰ میکرومولار مشاهده شد و در بین اکسین‌ها IAA حداکثر اثر را داشت. بیشترین اثر اکسین‌ها به ترتیب مربوط به IAA سپس IPA و بعد IBA بود. اکسین‌ها در همکاری با براسینواستروئیدها تکثیر سلول‌های جلبک را تحریک کرد و بالاترین تحریک در مخلوط IAA با براسینولید و کمترین تحریک در مخلوط IBA با ۲۸ هموکاستاسترول به دست آمد. مخلوط اکسین و براسینواستروئید تکثیر سلول‌ها و تجمع متابولیت‌ها (کلروفیل، پروتئین، مونوساکاریدها) را تقریباً سه تا چهار برابر بیشتر از

هورمون تنها افزایش داد (Bajguz & Piotrowska-Niczyporuk, 2013). اثر تحریک کننده‌های بیوشیمیایی بر روی تولید بیوماس و حجم متابولیت‌ها بر روی جلبک *Chlorella sorokiniana* Shihira & Krauss آزمایش شد. ترکیبات هورمونی NAA همراه با هورمون‌های دیگر استفاده شد. ترکیب هورمونی NAA با اکسین‌های دیگر هیچ، اثر همکاری یا تضاد نداشت و ترکیب آن با زاتین یا ژیبیرلین سبب افزایش رشد گردید (Hunt et al., 2010). طبق گزارش Ozioko و همکاران (۲۰۱۵)، IAA در غلظت ۱۰-۱۵ میلی‌گرم در لیتر تا روز سوم، سبب افزایش غیرمعنی‌دار وزن خشک در جلبک *C. sorokiniana* گردید. در این غلظت‌ها IAA به تنهایی و همراه با ژیبیرلین، اثر معنی‌داری بر محتوای پروتئین نداشت. تغییر محیط کشت، سبب تغییر ترکیبات شیمیایی جلبک‌ها می‌شود (Sharma et al., 2012). طبق گزارش، مواد غذایی، به ویژه ترکیبات نیتروژنی و فسفری، اثر زیادی بر رشد و تولید پروتئین و رنگیزه‌های جلبک‌ها دارند (Riberio et al., 2013). Ramanna و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که اوره ماده نیتروژنی مهمی برای کشت *C. sorokiniana* در فاضلاب است و افزودن آن به فاضلاب، باعث افزایش رشد این جلبک می‌شود. طبق گزارش Nigam و همکاران (۲۰۱۱)، در محیط کشت *Chick Chlorella pyrenoidosa* با کاهش غلظت نیترات، بیوماس جلبک نیز کاهش می‌یافت. Ribeiro و همکاران (۲۰۱۳) اثر نیترات و فسفات را بر *Hypnea cervicomis* J. Agardh بررسی کردند. بیشترین میزان رشد جلبک در غلظت ۲۰۰ میکرومولار نیترات، در نسبت نیترات به فسفات، یک به ۱۰ به دست آمد. Ruiz و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش کردند که افزودن فسفات و ترکیبات نیتروژنی (آمونیمی و نیتراتی)، سبب رشد بیشتر *C. vulgaris*

و کاهش مواد معدنی و آلی محیط گردید. در بررسی که روی جلبک *C. minutissima* انجام پذیرفت، از مقادیر متفاوتی نیترات و فسفات استفاده شد، بیشترین میزان بیوماس، در محیط حاوی ۰/۱۲۵ گرم در لیتر نیترات سدیم و ۰/۰۷۵ گرم در لیتر دی‌پتاسیم فسفات به دست آمد. اثر هم‌افزایی نیتروژن و فسفر سبب افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی شد (Arora et al., 2016). کاهش نیترات از ۹۰ به ۴۰، ۶۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش تعداد سلول‌ها و افزایش محتوای لیپید جلبک *C. vulgaris* گردید (Robles-Heredia et al., 2015). Li و همکاران (۲۰۱۱) از نیترات آمونیوم، کازئین، سولفات آمونیوم و اوره به عنوان منبع نیتروژن استفاده کردند. بهترین منبع نیتروژن که سبب حداکثر رشد جلبک *C. minutissima* شد، کازئین بود. استفاده از کازئین همراه گلیسرین سبب حداکثر رشد جلبک گردید. تیامین پیروفسفات به عنوان کوآنزیم، آنزیم‌های چرخه کربس و پنتوز فسفات و متابولیسم اسیدهای آمینه عمل می‌کند. به همین دلیل افزودن این ماده به محیط کشت احتمالاً باعث سریع‌تر شدن چرخه‌های رشد جلبک خواهد شد. بر طبق گزارش محققین، افزودن تیامین پیروفسفات، به همراه با هورمون‌ها سبب افزایش رشد جلبک‌ها می‌گردد (McCaffrey et al., 2011). در این تحقیق، از ترکیبی از کینتین و هورمون‌های اکسینی (طبیعی و مصنوعی)، افزایش هم‌زمان نیترات و فسفات و افزودن تیامین پیروفسفات (TPP) استفاده شد تا مشخص

گردد کدام یک از این ترکیبات اثر بیشتری بر رشد و مقدار متابولیت‌های جلبک *C. sorokiniana* بومی ایران دارد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه و شرایط رشد

جلبک (*Chlorella sorokiniana* (IBRC-M 5008) از مرکز ذخایر ژنتیکی و بیولوژیکی ایران خریداری شد. مواد مورد نیاز از شرکت مرک آلمان خریداری شد. جلبک‌ها در BBM اصلاح شده (Andersen, 2005) با کمی تغییر (KH_2PO_4 : ۰/۰۷۵ گرم در لیتر) کشت گردید. به محیط‌ها پنج گرم در لیتر گلوکز منوهیدرات افزوده شد. هورمون‌ها و الیسیتورها هم به محیط اضافه شدند. pH محیط با سود یک نرمال به ۶/۸ رسانده شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه و فشار یک اتمسفر اتوکلاو گردید. برای کشت نمونه‌ها، یک میلی‌لیتر جلبک (۰/۰۲ گرم) در فاز لگاریتمی به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تلقیح شد. فلاسک‌ها بر روی شیکر با ۱۲۵ دور در دقیقه قرار گرفت. جلبک‌ها در دمای $25 \pm 1^\circ\text{C}$ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. نور توسط لامپ‌های فلوروسنت، حدود ۵۰ مول بر متر مربع بر ثانیه تأمین شد. فتوپریود ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی بود. وزن خشک و متابولیت‌های جلبک پس از ۷۲ ساعت کشت تعیین گردید. تیمارهایی که به محیط‌های کشت افزوده شد، طبق جدول ۱ می‌باشد. آزمایش‌ها در سال ۹۴ و ۹۵ در آزمایشگاه پیام نور تهران شرق انجام شد.

جدول ۱: نام و غلظت تیمارهای استفاده شده در محیط کشت

TPP (mg/l)	KH_2PO_4 (g/l)	K_2HPO_4 (g/l)	NaNO_3 (g/l)	Kin (mg/l)	IBA (mg/l)	NAA (mg/l)	treatment medium
0	0.075	0.075	0.25	1	0	5	A
0	0.075	0.075	0.25	2	0	5	B
0	0.075	0.075	0.25	1	0	10	C
0	0.075	0.075	0.25	2	0	10	D
0	0.075	0.075	0.25	1	5	0	E
0	0.075	0.075	0.25	2	5	0	F
0	0.075	0.075	0.25	2	10	0	G
0	0.075	0.075	0.25	2.5	10	0	H
0	0.15	0.15	0.5	0	0	0	I
5	0.075	0.075	0.25	0	0	0	J
0	0.075	0.075	0.25	0	0	0	(control) M

تخمین وزن خشک

۴۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی جلبک، ده دقیقه در ۴۰۰۰ g سانتیفریوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و رسوب جلبکی با آب مقطر شستشو گردید و بلافاصله در ۴۰۰۰ g سانتیفریوژ شد. قرص جلبکی ۷۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس توزین گردید (Agrawal & Paridhavi, 2007).

اندازه گیری محتوای پروتئین

برای سنجش محتوای پروتئین از نمونه خشک شده استفاده و با معرف برادفورد سنجیده شد. بدین منظور جلبک خشک شده با هاون پودر گردید. به پنج میلی گرم از ماده خرد شده یک میلی لیتر سود (نیم مولار) افزوده شد. نمونه ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته و گاه گاهی به هم زده شد، سپس در دمای آزمایشگاه سرد گردید و در ۲۰۰۰ g سانتیفریوژ شد و محلول رویی به لوله دیگری انتقال یافت و برای تعیین پروتئین مورد آزمایش قرار گرفت. سپس یک دهم میلی لیتر از محلول حاوی پروتئین به پنج میلی لیتر معرف برادفورد افزوده و پس از تکان دادن پس از دو دقیقه جذب در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. برای ترسیم منحنی استاندارد از سرم آلبومین گاوی استفاده شد و درصد پروتئین محاسبه گردید (et al., 2013).
(Kobayashi)

اندازه گیری رنگیزه های فتوسنتزی

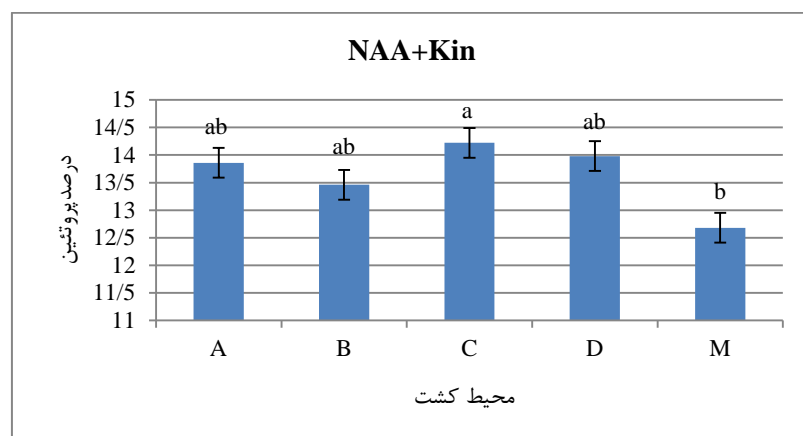
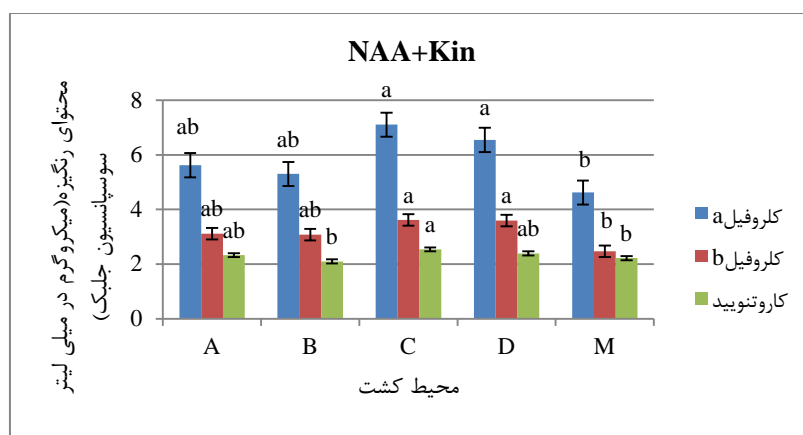
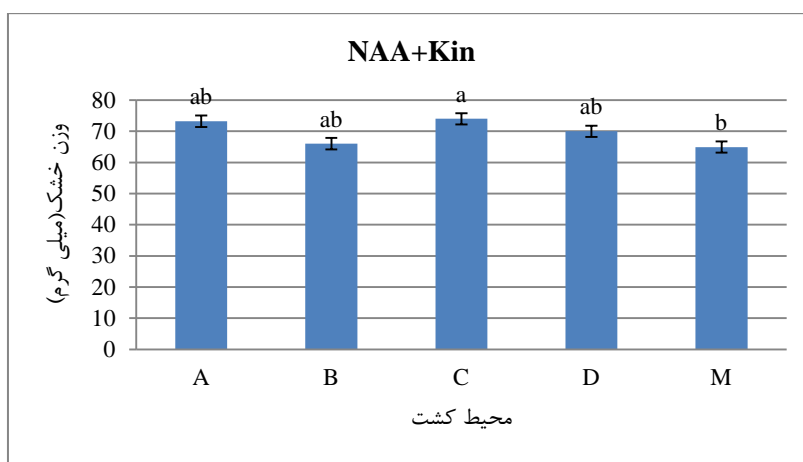
یک میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی در ۴۰۰۰ g سانتیفریوژ شد. محلول رویی دور ریخته و قرص جلبکی فریز گردید. به جلبک های فریز شده چهار میلی لیتر متانول ۹۹/۹ درصد افزوده شد و هنگامی که جلبک ها کاملاً سفید شدند، در ۲۰۰۰ g سانتیفریوژ و جذب محلول متانولی با اسپکتروفتومتر در طول موج های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر اندازه گیری شدند. میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید با استفاده از روش Wellburn (۱۹۹۴) محاسبه گردید.

روش نمونه گیری و محاسبات آماری

آزمایش ها با روش کاملاً تصادفی انجام گرفت. تیمارها چهار بار تکرار شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش سیزدهم) از مسیر Anova یک طرفه انجام گرفت. مقایسه میانگین ها با استفاده از تست دانکن و معنی داری در سطح $P \leq 0.05$ تعیین و شکل ها با نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

در اکثر ترکیبات NAA+Kin وزن خشک، تعداد سلول و محتویات رنگیزه‌ها نسبت به شاهد افزایش یافت. اما فقط در تیمار با NAA (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) Kin+ (یک میلی‌گرم در لیتر) وزن خشک، محتویات رنگیزه‌ها و پروتئین و در تیمار با NAA (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) Kin+ (دو میلی‌گرم در لیتر) محتوای کلروفیل a و b به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۱). نتایج نشان می‌دهد که بهترین محیط برای رشد و تولید متابولیت‌های این جلبک محیط NAA (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) Kin+ (یک میلی‌گرم در لیتر) می‌باشد و افزایش کینتین از (یک به دو میلی‌گرم در لیتر) در هر دو غلظت NAA (۱۰ و پنج میلی‌گرم در لیتر) اکثراً سبب کاهش غیرمعنی‌دار رشد و محتوای متابولیت‌ها شد (شکل ۱).

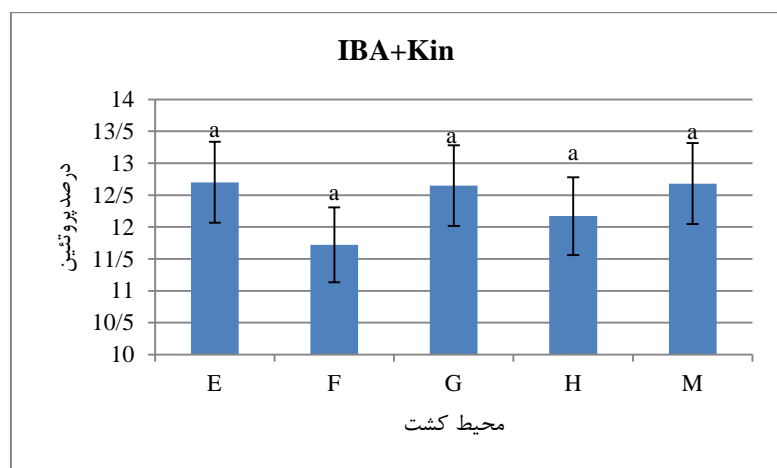
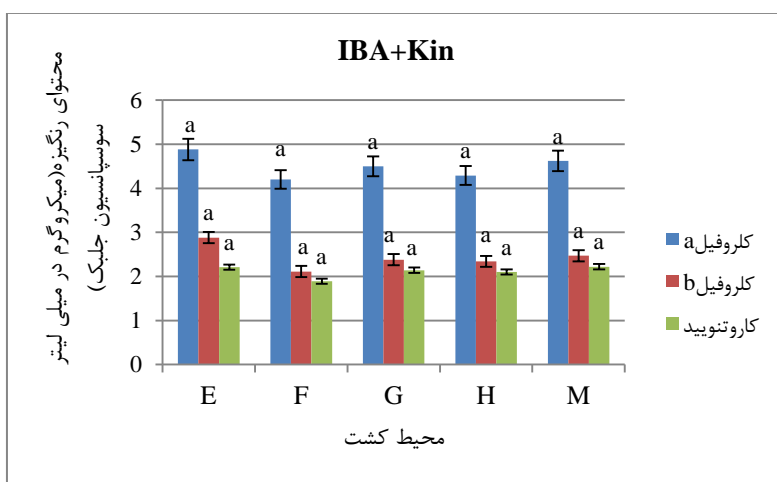
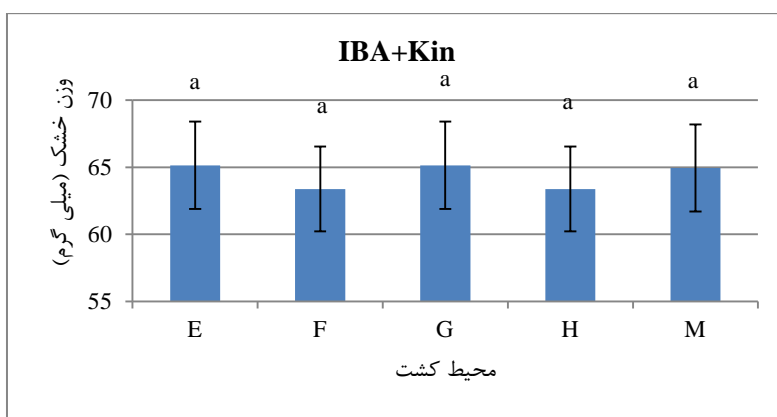


شکل ۱: میزان وزن خشک ۴۰ میلی لیتر سوسپانسیون جلبک، رنگیزه‌ها و درصد پروتئین جلبک در تیمار با ترکیب

A: NAA(۵)+ Kin(۱) : B: NAA(۵)+ Kin(۲) : C: NAA(۱۰)+ Kin(۱) : D: NAA(۱۰)+ Kin(۲) : M: شاهد.

در هیچ یک از ترکیبات IBA+Kin وزن خشک، محتویات رنگیزه‌ها و پروتئین نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت

(شکل ۲).

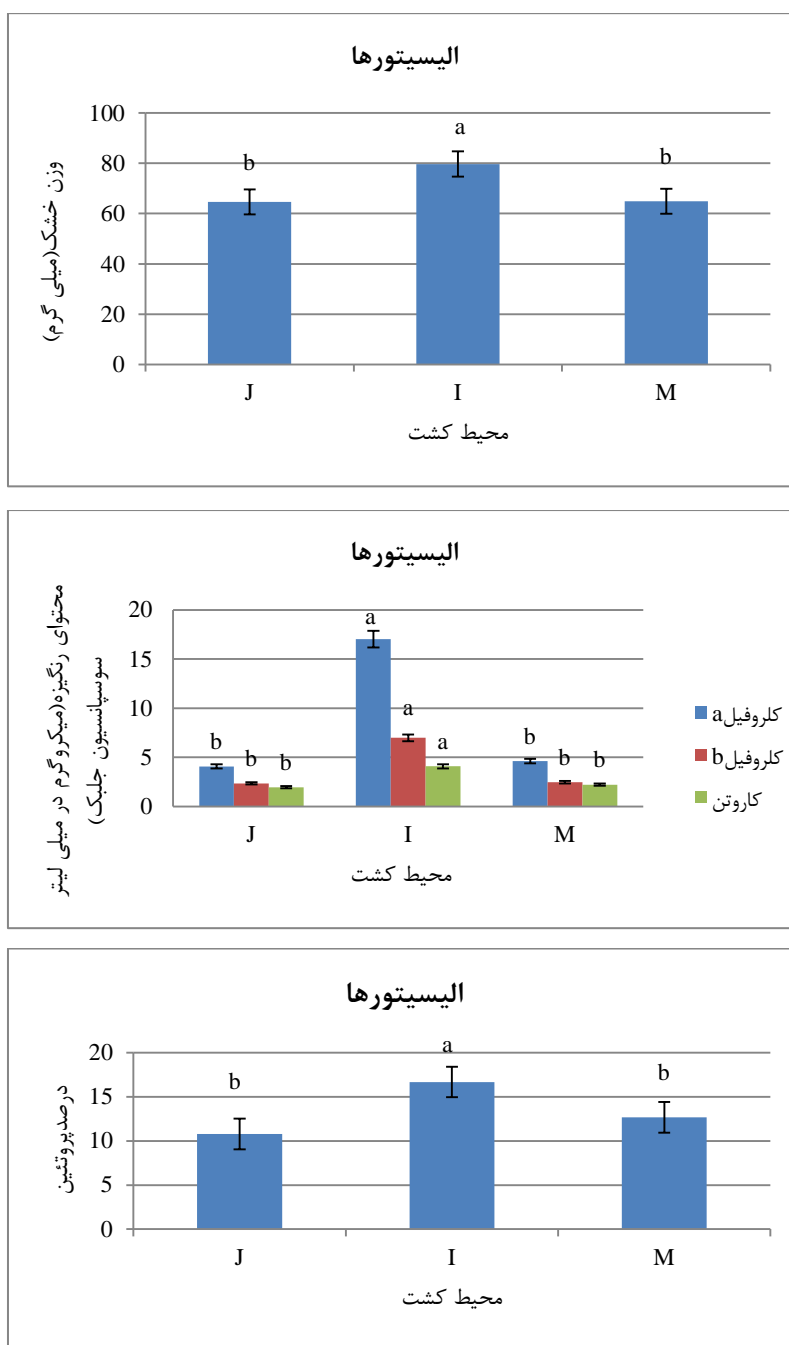


شکل ۲: میزان وزن خشک ۴۰ میلی لیتر سوسپانسیون جلبک، رنگیزه‌ها و درصد پروتئین جلبک در تیمار با ترکیب

E: JBA(۵)+ Kin(۱) . F: JBA(۵)+ Kin(۲) . G: JBA(۵)+ Kin(۲) . H: JBA(۱۰)+ Kin(۲/۵) . M: شاهد

با تیمار دو برابر نیترات و فسفات رشد و محتوای متابولیت‌ها و رنگیزه‌ها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری یافت، اما افزایش

تیامین پیروفسفات اثر معنی‌داری بر رشد و محتوای متابولیت‌ها نداشت (شکل ۳).



شکل ۳: میزان وزن خشک ۴۰ میلی لیتر سوسپانسیون جلبک، رنگیزه‌ها و درصد پروتئین جلبک در تیمار با ترکیب

I: ۵ میلی گرم در لیتر TPP، I: نیترات و فسفات دوبرابر، M: شاهد

مقایسه کلی تیمارها با هم نشان می‌دهد که افزایش هم‌زمان نیترات و فسفات اثر افزایشی معنی‌داری بر رشد و محتوای متابولیت‌های جلبک دارد؛ در صورتی که ترکیب هورمونی اثر کمتری بر رشد و صفات رشد دارد (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه اثر هورمون‌ها و ایستتورها بر صفات رشد جلبک

Protein percent	(mg/l) caroten	chlorophyll b (mg/l)	chlorophyll a (mg/l)	Dry weight (mg)	treatment
16.6 ^a	4.09 ^a	6.99 ^a	17.04 ^a	79.7 ^a	2(nitrate+phosphate)
10.3 ^d	1.97 ^b	2.7 ^b	4.48 ^{bc}	70.5 ^{ab}	TPP
12.7 ^{bc}	2.2 ^b	2.8 ^b	4.8 ^{bc}	65.1 ^b	IBA(5)+ Kin(1)
11.7 ^{bcd}	1.89 ^b	2.11 ^b	4.2 ^c	63.3 ^b	IBA(5)+ Kin(2)
12.6 ^{bc}	2.14 ^b	2.38 ^b	4.5 ^{bc}	65.14 ^b	IBA(10)+ Kin(2)
12.1 ^{bcd}	2.1 ^b	2.34 ^b	4.29 ^c	63.3 ^b	IBA(10)+ Kin(2.5)
13.8 ^{ab}	2.33 ^b	3.11 ^b	5.6 ^{bc}	73.2 ^{ab}	NAA(5)+ Kin(1)
13.4 ^{bc}	2.1 ^b	3.08 ^b	5.3 ^{bc}	66 ^b	NAA(5)+ Kin(2)
14.2 ^{ab}	2.54 ^b	3.62 ^b	7.1 ^b	74 ^{ab}	NAA(10)+ Kin(1)
13.9 ^{ab}	2.39 ^b	3.59 ^b	6.55 ^b	70 ^{ab}	NAA(10)+ Kin(2)
12.68 ^{bc}	2.22 ^b	2.47 ^b	4.6 ^b	64.9 ^b	control

میانگین‌هایی که در هر ستون و برای هر صفت دارای حروف مشابه می‌باشند، بر اساس آزمون دانکن و $P \leq 0.05$ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند

طبق گزارش محققین، اثر اکسین‌ها بر جلبک‌ها در مواردی اثر بر دیواره سلولی، فعال‌سازی پمپ ATPase و طویل شدن سلول (Stirk *et al.*, 2014) و تقسیم سلولی است (Bajguz, 2000) و اثر سیتوکینین در جلبک تحریک تقسیم سلول، فعال‌سازی رشد و تولید پروتئین و تشدید برخی فرایندهای فتوسنتزی است (Kiseleva *et al.*, 2012, García-Jiménez *et al.*, 1998). در این پژوهش، در تیمار با اکثر ترکیبات NAA+ Kin بیوماس و سایر صفات رشد نسبت به شاهد افزایش یافت. اما در تیمار با NAA (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) + Kin (یک میلی‌گرم در لیتر) این افزایش، معنی‌دار بود. در تیمار با NAA (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) + Kin (دو میلی‌گرم در لیتر) فقط افزایش کلروفیل‌ها معنی‌دار بود. گزارش کنونی مشابه گزارش Czerpak و همکاران (۱۹۹۴) است که هورمون NAA در غلظت 5×10^{-5} مولار (۹/۳ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین تأثیر را بر افزایش وزن تر، وزن خشک و محتوای کلروفیل، کاروتن، پروتئین محلول و خاکستر جلبک *C. pyrenoidosa* داشت و تقریباً مشابه گزارشات Hunt و همکاران (۲۰۱۰، ۲۰۱۱) در مورد جلبک *C. sorokiniana* است که در مورد اول از ترکیب پنج پی پی ام، NAA + یک پی پی ام، ZT (زآتین) و در مورد دوم از ترکیب پنج پی پی ام، NAA + ۵۰ پی پی ام، اتانول استفاده شد که به ترتیب سبب ۱۳۶ و ۱۲۰ درصد افزایش رشد جلبک گردید. البته در پژوهش حاضر نیز در تیمار با NAA (پنج میلی‌گرم در لیتر) + Kin (یک و دو میلی‌گرم در لیتر) رشد و متابولیت‌ها افزایش یافت، ولی تفاوت‌ها معنی‌دار نبود. ترکیب IBA+ Kin اثر چندانی روی رشد نداشت، در همه غلظت‌های IBA+ Kin رشد و محتوای متابولیت‌ها با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. گزارش حاضر با گزارش Mehdizadeh Allaf (۲۰۱۳) هم‌خوانی دارد. در بعضی موارد، مثلاً ترکیبات IBA (پنج و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) + Kin (یک میلی‌گرم در لیتر) سبب اندکی افزایش رشد گردید که مشابه گزارش Bajguz و Piotrowska-Niczyporuk (۲۰۱۴) است که تیمار IBA (۱۰ میکرومول) سبب اندکی افزایش رشد شد. طبق گزارش Ozioko و همکاران (۲۰۱۵)، کاربرد

IBA در غلظت ۱۰-۱۵ میلی گرم در لیتر اثر معنی داری بر محتویات کلروفیل و پروتئین جلبک *C. sorokiniana* نداشت که با نتایج کنونی هم خوانی دارد. در این پژوهش در اکثر ترکیبات IBA و NAA با Kin افزایش کینتین از (یک به دو یا دو ونیم میلی گرم در لیتر) سبب کاهش غیرمعنی دار صفات رشد گردید که با گزارش Bajguz (۲۰۱۴) هم خوانی دارد. در برخی موارد، محققین با کاربرد غلظت های هورمونی متفاوت، از پژوهش کنونی نتیجه گرفتند؛ مثلاً Liu و همکاران (۲۰۱۷ a) گزارش کردند که در تنش آمونیوم (محیط واجد یک تا ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آمونیوم) کینتین با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر سبب افزایش رشد (بیوماس) *C. Pyrenoidosa* گردید. طبق گزارش های NAA در غلظت پایین تر از پژوهش کنونی سبب رشد جلبک شد. بر اساس گزارش Liu و همکاران (۲۰۱۷ b)، NAA در غلظت های نیم، یک، دو و دو ونیم میلی گرم در لیتر سبب افزایش رشد *C. vulgaris* گردید و حداکثر رشد در غلظت یک میلی گرم در لیتر مشاهده شد. طبق گزارش Fu و همکاران (۲۰۰۶) نیز با استفاده از NAA در غلظت بیست و پنج صدم، دو و چهارمیلی گرم در لیتر بر روی جلبک *C. vulgaris* بهترین غلظت برای افزایش رشد جلبک، غلظت دو میلی گرم در لیتر بود. به گزارش Hunt و همکاران (۲۰۱۰)، حداکثر رشد جلبک *C. sorokiniana* در غلظت پنج پی پی ام، IBA مشاهده گردید. طبق گزارش Piotrowska-Niczyporuk و Bajguz (۲۰۱۴) کاربرد یک دهم میکرو مول (دو صدم میلی گرم در لیتر) IBA در محیط کشت جلبک *C. vulgaris* باعث حداکثر افزایش رشد جلبک شد. احتمالاً علت اختلاف بین گزارشات متفاوت محققین، متفاوت بودن میزان هورمون های درونی جلبک یا متفاوت بودن گونه جلبک و محتویات محیط کشت و شرایط نوری است. نتایج حاضر نیز با برخی محققین مشابه و با برخی متفاوت است. اما به طور کلی طبق این گزارش ها هورمون ها به شکلی سبب تغییر میزان رشد جلبک می شود. Kawano (۲۰۰۳) پیشنهاد کرد که اکسین ممکن است رشد سلول را از طریق مهار رادیکال آزاد اکسیژن انجام دهد. در طی سست شدن دیواره سلولی توسط اکسین، ممکن است ماده اصلی مکانیزم بیوشیمیایی، رادیکال آزاد اکسیژن باشد (Kiseleva et al., 2012). اکسین خارجی سبب افزایش سطح فعالیت آنزیم های مهار کننده رادیکال آزاد اکسیژن می شود (Piotrowska-Niczyporuk & Bajguz, 2014). اکسین های طبیعی (IAA) و مصنوعی (2,4-D) می توانند فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان مثل کاتالاز و پراکسیداز را تحریک کنند (Szechyn 'ska-Hebda et al., 2007). اکسین های طبیعی و مصنوعی سبب کاهش تجمع رادیکال آزاد اکسیژن ظرف ۴۸ ساعت می گردند. کاهش رادیکال آزاد اکسیژن سبب پیشرفت چرخه سلولی و تمایز دیواره ثانویه سلول می شود. هورمون سیتوکینین نیز سبب تحریک تقسیم سلول، فعال سازی رشد و تولید پروتئین و تشدید برخی فرایندهای فتوسنتزی جلبک می شود (Kiseleva et al., 2012). در نتیجه فتوسنتز و رشد جلبک افزایش می یابد. در پژوهش حاضر، در تیمار با دو برابر نیترات و فسفات رشد و محتوای متابولیت ها و رنگیزه ها نسبت به شاهد افزایش معنی داری یافت. از آن جایی که نیتروژن و فسفر هردو در ساختار ماکرومولکول های آلی، مثل پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک شرکت می کنند، افزایش آنها سبب

افزایش رشد می‌گردد (Fried *et al.*, 2003). در این شرایط نیترا ت و فسفات به شکل پروتئین و رنگیزه‌های فتوسنتزی درمی‌آیند (Ribeiro *et al.*, 2013) و سبب افزایش معنی‌دار این مواد شده، رنگیزه‌های فتوسنتزی هم سبب افزایش فتوسنتز و رشد می‌گردند. Nigam و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که افزایش نیترا ت پتاسیم از پنج صدم به چهار دهم گرم در لیتر سبب افزایش رشد جلبک *C. pyrenoidosa* شد که گزارش‌های این محققین با نتایج کنونی هم‌خوانی دارد. Mccaffrey و همکاران (۲۰۱۱) از تیمین پیروفسفات همراه با هورمون‌ها استفاده کردند و سبب رشد بیشتر جلبک کلرا شدند. در پژوهش حاضر کاربرد تنه‌های تیمین پیروفسفات افزایش معنی‌داری در رشد و متابولیت‌های جلبک ایجاد نکرد و این موضوع نشان می‌دهد که در صورت کمبود مواد اصلی سازندهٔ ماکرومولکول‌ها، وجود فراوان کوآنزیم کم‌اثر یا بی‌اثر است.

نتیجه گیری

طبق نتایج کنونی، برای رشد جلبک *C. sorokiniana* وجود مواد معدنی (نیترا ت و فسفات) سازندهٔ ماکرومولکول‌ها از وجود هورمون‌ها مؤثرتر است؛ زیرا هورمون‌ها به طریقی سبب افزایش تقسیم یا طویل شدن سلول‌ها می‌شوند که برای هر دوی این فعالیت‌ها نیاز به مواد اولیهٔ سازندهٔ ماکرومولکول‌های سازنده سلول می‌باشد. مقایسهٔ کلی بین تیمارها نشان می‌دهد که افزایش هم‌زمان نیترا ت و فسفات نسبت به کاربرد هورمون‌ها اثر بیشتری بر رشد و محتوای متابولیت‌های جلبک دارد. به همین علت استفاده از آن برای افزایش بیوماس و تولید متابولیت‌های این جلبک مناسب‌تر است.

منابع

- Agrawal, S.S. and Paridhavi, M. (2007) Herbal Drug Technology. Universities Press, 730Pp, Hyderabad.
- Andersen, R. A. (2005) Algal Culturing Techniques. Elsevier Inc, 578Pp, New York.
- Arora, N., Patel, A., Pruthi, P. A. and Pruthi, V. (2016) Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. Bioresource Technology 213 : 79–87.
- Bajguz, A. and Piotrowska-Niczyporuk, A. (2013) Synergistic effect of auxins and brassinosteroids on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry 71:290-7.
- Bajguz, A. (2000) Effect of brassinosteroids on nNucleic acids and protein content in cultured of *Chlorella vulgaris*. Plant Physiology and Biochemistry 38: 209–215.
- Bajguz, A. and Piotrowska-Niczyporuk, A. (2014) Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, mono saccharide, and protein content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry 80:176-83.
- Czepak, R., Bajguz, A., Bialecka, Ba., Wierzchołowska, L. E. and Wolańska, M. M. (1994) Effect of auxin

- precursors and chemical analogues on the growth and chemical composition in *Chlorella pyrenoidosa*, *Acta Societatis Botanicum Poloniae* 63: 279-286.
- Fried, S., Mackie, B. and Nothwehr, E. (2003) Nitrate and phosphate levels positively affect the growth of algae species found in Perry Pond. *Tillers* 4: 21-24.
- Fu, L., Wei-feng, L. and Xiang-gen, SH. (2006)** The Effects of NAA on the growth, chlorophyll and protein content of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Yancheng Institute of Technology* 2: 917-921.
- García-Jiménez, P., Rodrigo, M. and Robaina, R.R. (1998) Influence of Plant growth regulators, polyamines and glycerol interaction on growth and morphogenesis of carposporelings of *Grateloupia doryphora* cultured in vitro. *Journal of Applied Phycology* 10 :95–100.
- Hunt, R.W., Chinnasamy S., Bhatnagar, A. and Das, K.C. (2010) Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalgae, *Chlorella sorokiniana*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162: 2400-2410.
- Hunt, R.W., Chinnasamy, S. and Das, K.C. (2011) The effect of naphthalene-acetic acid on biomass productivity and chlorophyll content of green algae, coccolithophore, diatom, and cyanobacterium cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164:1350–1365.
- Kawano, T. (2003) Roles of reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports*. 9:829–837.
- Kiseleva, A.A., Tarachovskaya, E.R. and Shishova, M.F. (2012) Biosynthesis of phytohormones in algae. *Russian Journal of Plant Physiology* 59: 595-610.
- Kobayashi, N., Noel, E., Barnes, A., Watson, A., Rosenberg, J., Erickson, G. and Oyler, G. (2013)* Characterization on three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. *Bioresource Technology* 150: 377–386.
- Li, Z., Yuan, H., Yang, J.Sh. and Li, B.Z. (2011) Optimization of the biomass production of oil algae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology* 102 9128–9134.
- Lu, Y. and Xu, J. (2015) Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology. *Trends in Plant Science* 20: 273-282.
- Lui, J., Qiu, W., Song, Y., Peng, H. and Zhao, Y. (2017a) The growth and lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* enhanced by plant hormones under ammonium stress. *Environmental Progress & Sustainable Energy* 0 : 1-7.
- Lui, T., Liu, F., Wang, C., Wang, Z. and Li, Y. (2017b) Lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* by supplementation of synthetic phytohormone analogs. *Bioresource Technology* 232: 44-52.
- Mehdizadeh Allaf, M. (2013) Effect of plant hormones on the production of biomass and lipid in microalgae. Thesis (Master of Engineering Science) University of Western Ontario London, Ontario Canada. Pp109.
- Nigam, S., Prakash Rai, M. and Sharma, R. (2011) Effect of nitrogen on growth and lipid content of *Chlorella pyrenoidosa*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 7 : 124-129.
- Ozioko, F.U., Chiejina, N.V. and Ogbonna, J.C. (2015) Effect of some phytohormones on growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* IAM-C212 under photoautotrophic conditions. *African Journal of Biotechnology* 14: 2367-2376.
- Piotrowska-Niczyporuk, A. and Bajguz, A. (2014) The effect of natural and synthetic auxins on the growth,

- metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Plant Growth Regulator* 73:57–66.
- Ramanna, L., Guldhe, A., Rawat, I. and Bux, F. (2014) The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. *Bioresource Technology* 168:127-131.
- Ribeiro, A., Tesima, K., Souza, J. and Yokoya, N. (2013) Effects of nitrogen and phosphorus availabilities on growth, pigment, and protein contents in *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 25: 1151-1157.
- Robles-Heredia, J.C., Sacramento-Rivero, J.C., Canedo-López, Y., Ruiz-Marín, A. and Vilchiz-Bravo, L. E. (2015) A multi stage gradual nitrogen reduction strategy for increased lipid productivity and nitrogen removal in wastewater using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 32: 335 – 345.
- Ruiz, J., Alvarez, P., Arbib, Z., Garrido, C., Barragán, J. and Perales, J.A. (2011) Effect of nitrogen and phosphorus concentration on their removal kinetic treated urban wastewater by *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Phytoremediation* 13:884-96.
- Sharma, R., Singh, G.P. and Sharma, V.K. (2012) Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 3: 1000131.
- Srivastava, L.M. (2002) *Plant growth and development: hormones and environment*. Academic Press. 772 pp, San Diego.
- Stirk, W.A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Strnad, M., Ördög, V. and Van Staden, J. (2013) Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brassinosteroids. *Plant Physiology and Biochemistry* 70:348-53.
- Stirk, W.A., Bálint, P., Tarkowská, D., Novák, O., Maróti, G., Ljung, K., Turečková, V., Strand, M., Ördög, V. and Staden, J. (2014) Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry* 79: 66-76.
- Szechynska-Hebda, M., Skrzypek, E., Daubrowska, G., Biesaga-Koscielniak, J., Filek, M. and Wedzony, M. (2007) The role of oxidative stress induced by growth regulators in the regeneration process of wheat. *Acta Physiologia Plantarum* 29:327–33.
- Tarakhovskaya, E.R., Maslov, Y.I. and Shishova, M. (2007) Phytohormones in algae. *Russian Journal of Plant Physiology* 54:163-170.
- Tate, J.J., Gutierrez-Wing, M.T., Rusch, K.A. and Benton, M.G. (2012) The effects of plant growth substances and mixed cultures on growth and metabolite production of green algae *Chlorella sp.*: A Review. *Journal of Plant Growth Regulation* 32:417–428.
- Wellburn, A.R. (1994) The spectral determination chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313.
- Yokoya, N.S. and Handro, W. (1996) Effects of auxins and cytokinins on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiology* 326/327: 393–400.
- Zabochnicka-Swiatek, M. (2010) Algae feedstock of the future. *Archivum Combustionis* 30 : 225–236.