دانشگاه محقق اردبیلی
معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده علوم
گروه آموزشی زیست شناسی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشته زیست شناسی گرایش فیزیولوژی گیاهی

اثرات نور ماوراء بنفش نوع B بر برخی فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جلبک آب شور دونالیلا سالینا

پژوهشگر:
زهرا فرجی

استاد راهنمای اول:
دکتر سیدمهدی رضوی

استاد راهنمای دوم:
دکتر علیرضا قاسمیان

بهمن ۱۳۹۸

عنوان و نام پدیدآور:	**اثرات نور ماوراء بنفش نوع B بر برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جلبک آب شور دونالیلا سالینا/ زهرا فرجی**
استاد راهنما:	دکتر سید مهدی رضوی
استاد راهنمای دوم:	دکتر علیرضا قاسمیان
تاریخ دفاع:	۱۳۹۸/۱۱/۲۱
تعداد صفحات:	**۶۵ ص.**
شماره پایان‌نامه:	**گروه زیست‌شناسی/**

چکیده:

هدف: هدف از این پژوهش، بررسی پاسخ های فیزیولوژیکی جلبک سبز دونالیلا سالینا در برابر چهار دوز مختلف اشعه UV-B، (۰/۳، ۱، ۳ و ۹ کیلو ژول بر متر مربع)، به‌منظور ارزیابی درجه مقاومت جلبک مذکور در برابر این تنش محیطی می باشد.

روش‌شناسی پژوهش: به میزان ۱۰۰ سی‌سی از محیط کشت حاوی جلبک به ۱۰۰۰ سی سی محیط کشت بدون جلبک منتقل و محیط کشت های جدید در ژرمیناتور با ۱۶ ساعت دوره روشنایی و ۸ ساعت دوره تاریکی، دمای ۱۵ درجه سانتیگراد و نور ۶۰۰۰ لوکس کشت داده شدند. ۴۰ روز بعد (بعد از رشد کامل جلبک ها) کشت ها به گروه شاهد و ۴ گروه تیمار تقسیم شدند. هر گروه در معرض سطح خاصی از UV-B قرار گرفت.گروه اول: ۰/۳، گروه دوم ۱، گروه سوم ۳ و گروه چهارم ۹ کیلوژول برمتر مربع. این تیمار دو روز پشت سر هم تکرار شد.تمامی آزمایش ها در سه تکرار انجام شد.

یافته‌ها: نتایج آزمایش ها نشان داد که اشعه ماوراء بنفش نوع B، تاثیر خود را روی پارامتر های فتوسنتزی بصورت افزایش Fo و کاروتنوئید و کاهش کارائی فتوشیمیایی فتوسیستم II، کاهش کلروفیل a و کاهش کلروفیل b نشان داد که میزان کاهش در کلروفیل b بیشتر از کلروفیل a بوده است. مقدار Fm نیز از شاهد تا تیمار یک کیلو ژول بر متر مربع UV-B، کاهش معنی دار و در تیمارهای بیشتر از آن یعنی ۳ و ۹ کیلو ژول بر متر مربع به صورت معنی داری افزایش یافت.از سوی دیگر بررسی نتایج حاصل از سنجش های بیوشیمیایی تحت تیمار با اشعه UV-B، منجر به کاهش محتوای پروتئین کل گردید و محتوای قندهای محلول، آمینواسیدهای آزاد کل و محتوای پرولین تحت تیمار UV-B، افزایش معنی داری از خود نشان دادند که نشان دهنده مکانیسم هایی است که جلبک دونالیلا سالینا توسط آنها با تنش مقابله می کنند. بعلاوه در سنجش های آنزیمی، با افزایش شدت تنش UV-B، میزان کاتالاز روند کاهشی و آنزیم های اسکوربات پراکسیداز، پروتئاز و پلی فنل اکسیداز روند افزایشی معنی داری در پیش گرفتند. همچنین افزایش UV-B موجب کاهش قابل توجهی در رشد و OD جلبک دونالیلا سالینا گردید.

نتیجه‌گیری: رشد و عملکرد فتوسنتزی جلبک دونالیلا تحت تاثیر شدت های بالای اشعه UV-B کاهش یافت.این در حالی است که اشعه UV-B موجب افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی چون اسکوربات پراکسیداز،پروتئاز و پلی فنل اکسیداز، تجمع قندهای محلول و آمینواسیدهای آزادی چون پرولین و نیز تجمع کاروتنوئیدها در جلبک دونالیلا سالینا گردید که با افزایش مقاومت جلبک در برابر تنش های اکسیداتیو و حفظ و صیانت از سیستم های فتوسنتزی آن همراه خواهد شد. در نتیجه گونه دونالیلا سالینا در برابر دوزهای نسبتاً بالای اشعه UV-B بعنوان

جلبک متحمل شناخته می شود.

واژه‌های کلیدی: جلبک، دونالیلا سالینا، ماوراء بنفش

۱- مقدمه و هدف

۱-۱- مقدمه

در دهه‌های اخیر به خاطر فعالیت‌های صنعتی انسان و تولید کلروفلوروکربن ها و سایر آلاینده ها، لایه اوزون استراتوسفری تخریب شده و متعاقب آن تابش نور ماوراء بنفش به لایه تروپوسفر افزایش پیدا کرده است (Hofmann et al., 2000). این نور، طول موج پایین تری از نور مرئی داشته و بالطبع انرژی زیادی برای ورود به بافت ها دارد و سه طیف (UV-A: 320 – 400 nm)، (UV-B: 280 – 320 nm) و (UV-C: 200 – 280 nm) را نیز شامل می شود (Hollosy, 2002). همچون سایر موجودات زنده، گیاهان نیز از اثرات این اشعه در امان نیستند. گیاهان مختلف پاسخ‌های متفاوتی به این نور می دهند: تاثیر این اشعه برای رشد بعضی گیاهان مثبت و بر برخی دیگر منفی ارزیابی شده است. برخی دیگر در مقابل آن حالت بی تفاوتی از خود نشان می‌دهند. از آنجا که گیاهان به طور مستمر و دائمی به نور خورشید نیاز دارند، لذا تاثیرات اشعه UV برای آنها غیرقابل اجتناب است. اثر UV روی گیاهان می تواند شامل آسیب در ماده ژنتیکی و پروتئین ها، کاستن از مقدار رنگیزه های فتوسنتزی و فتوسنتز، مواجهه با تنش های اکسایشی، ایجاد تغییر در مورفولوژی (تغییر شکل برگ، کاهش میانگره ها، وزن، ارتفاع، ...) و بیومس گیاه باشد. رادیکال‌های آزاد اکسیژنی چون سوپراکسید، اکسیژن منفرد و هیدروژن پروکسید هم در نتیجه UV در گیاه تولید می‌شوند که تعادل متابولیسمی سلول ها را برهم می زنند (Asada, 1999).

۱-۲ – هدف

امروزه اکثر تحقیقات انجام یافته مرتبط با بررسی اثرات اشعه UV-B روی میکروجلبک ها متمرکز شده است که فتوسنتز کننده بوده و با دارا بودن ترکیبات با ارزش از جمله بتاکاروتن، در صنایع شیمیایی - آرایشی و غذایی کاربردهای فراوان دارند. وجود رادیکال‌های آزاد ناشی از نور شدید خورشید، سیگار و استرس، از علل اصلی ایجاد سرطان به شمار می روند. بتاکاروتن، سلول‌های بدن را از وجود رادیکال‌های آزاد پاکسازی می‌کند. بتاکاروتن همچنین پیش ساز

ویتامین A هم به شمار می‌رود که سبب تقویت نیروی بینایی و کنترل سطح کلسترول خون می شود.

تولید تجاری بتاکاروتن به عنوان سومین صنعت در رابطه با میکرو جلبک ها طبقه بندی می شود و به دلیل قابلیت هضم بالای آنها و عدم وجود دیواره سلولی سخت، می توان آنها را به صورت کامل مصرف کرد (Arvanitoyannis et al., 2005). میکروجلبک دونالیلا به میزان زیادی بتاکاروتن تولید می کند (Borowitzka, 2005).

با توجه به تشدید روز افزون تشعشعات ماورای بنفش در سطح کره زمین و البته آب های سطحی آن که ناشی از تخریب لایه اوزون می باشد، بررسی نقش این عامل تنش زا برخصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی جلبک دونالیلا سالینا می‌تواند حائز اهمیت باشد.

۲- مبانی و پیشینه تحقیق

۲-۱- مقدمه

۸ الی ۹ درصد طیف نور خورشید را پرتوهای فرابنفش تشکیل می دهد که به سه باند (UV-A: 320 – 400 nm)، (UV-B: 280 – 320 nm) و (UV-C: 200 – 280 nm) تقسیم می شود (Booji- James et al., 2000).

۲-۲- انواع پرتو فرابنفش

۲-۲-۱- UV-A

توسط چند ترکیب بیولوژیکی جذب شده و می‌تواند برخی از فرآیندهای فیزیولوژیکی را تحت تاثیر قرار دهد. این اشعه باعث مرگ سلول ها نمی شود، بخش زیادی از انرژی خورشید را شامل می شود، از لایه اوزون عبور کرده و به سطح زمین می رسد؛ اما هیچ آسیبی به گیاهان وارد نمی کند (کافی و دامغانی، ۱۳۸۱).

۲-۲-۲- UV-B

مهمترین باند اشعه خورشید بوده و معمولاً به دلیل وجود لایه ازون از رسیدن آن به سطح زمین جلوگیری می شود (کافی و دامغانی، ۱۳۸۱).

۲-۲-۳- UV-C

بیشتر برای ضدعفونی کردن، از اشعه ای با این طیف استفاده می شود. این طیف نوری به شدت کشنده سلول است اما توسط اکسیژن و ازون در جو اتمسفر جذب شده و معمولاً به سطح زمین نمی رسد (کافی و دامغانی، ۱۳۸۱).

افزایش ترکیبات آلاینده جوزمین، مخصوصاً ترکیبات هالوژن دار ناشی از ترکیبات صنعتی بشر و پایداری این ترکیبات، سبب رسیدن این ترکیبات به سطح استراتوسفر شده و منجر به تخریب و کاهش لایه اوزون گردیده اند. این امر باعث افزایش ورود پرتوهای فرابنفش به سطح زمین شده و منشاء بروز مشکلاتی برای موجودات زنده شده است (Buchholz et al., 1995).

مقدار UV-B رسیده به سطح زمین بستگی به عوامل مختلفی نظیر غلظت لایه اوزون، زاویه تابش خورشید نسبت به زمین، ذرات گرد و غبار، رطوبت هوا، پوشش ابر، برف، باران و ... دارد. همچنین شدت اشعه UV-B با افزایش ارتفاع و کم شدن عرض جغرافیایی افزایش می یابد (Kakani et al., 2003).

UV-B به علت پایین بودن طول موج نسبت به نور مرئی، انرژی زیادی برای نفوذ به بافت ها دارد. گیاهان از میان موجودات زنده، به دلیل نیاز اجتناب ناپذیرشان به نور برای فتوسنتز، بیشتر در معرض پرتوهای فرابنفش بوده و آسیب پذیرتر هستند (Booji- James et al., 2000).

اشعه UV-B بر روی DNA، ساختمان و عمل غشاهای زیستی، فتوسیستم ها، پروتئین ها، رنگدانه های فتوسنتزی و تنظیم کننده های رشد گیاهان موثرند (Jansen, 2002).

۳-۲- آسیب های ناشی از پرتو فرابنفش

۱-۳-۲- ماده ژنتیکی

اشعه فرابنفش می‌تواند اشکال مختلف اکسیژن فعال تولید کند. H_2O_2 ایجاد شده در شرایط تنش UV می‌تواند شکسته شده، در غشای سلول انتشار پیدا کند و منجر به آسیب و تخریب DNA شود. آنتی اکسیدان هایی مثل آنتوسیانین ها، رادیکال های آزاد را جمع آوری کرده و از طرف دیگر با تشکیل کمپلکس با مولکول های دیگر از جمله DNA، آنها را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می کنند (Sharma, 2001). اشعه UV علاوه بر آسیب به DNA، موجب آسیب رسیدن به مولکول های RNA هم می شود. چرا که این دو ساختار، طیف جدبی مشابهی دارند (Casat and Walbot, 2004).

۲-۳-۲- اثر بر فتوسنتز و رنگیزه های فتوسنتزی

آسیب ناشی از اشعه UV در دو سطح فیزیولوژیکی و ژنتیکی است. به لحاظ ژنتیکی با کاستن از میزان تنظیم بیان ژن و تاثیر بر بیان ژن های کد کننده رنگیزه های فتوسنتزی باعث کاهش سطح این رنگیزه ها می شوند (Liu et al., 2005). کلروفیل a نسبت به کلروفیل b کمتر تحت تاثیر اشعه UV قرار می گیرد (Hollosy, 2002). اشعه UV همچنین به لحاظ فیزیولوژیکی، مقدار پروتئین‌های محلول و فعالیت آنزیم روبیسکو را کاهش داده و بدین ترتیب فتوسیستم ‖ را از کار می‌اندازد (Liu et al., 2005).

کمپلکس پروتئینی مسئول اکسیداسیون آب، حساس ترین قسمت فتوسیستم ‖ نسبت به اشعه UV می باشد (Booji- James, et al 2000). کمپلکس سیتوکروم b/f که باعث انتقال الکترون بین دو فتوسیستم می شود نیز از تاثیر اشعه UV در امان نیست (Cen and Bornman, 1990).

۳-۳-۲- اثر اشعه UV بر لیپیدها

اشعه UV باعث تخریب اسیدهای چرب غیر اشباع، فسفولیپیدها و گلیکو لیپیدهای غشای سلول های گیاهی در حضور اکسیژن می شود (Karamer et al., 1991)

این اشعه ممکن است روی ترکیب لیپیدهای غشای کلروپلاست مانند مونو و دی گالاکتوزیل دی گلیسیریدها هم تاثیرگذار باشد (Hollosy, 2002).

٤-۳-۲- اثر بر پروتئین

اشعه UV می تواند هم به صورت مستقیم از طریق تخریب پروتئین ها و هم به صورت غیر مستقیم از راه آسیب RNA، با عث بروز اختلال در سنتز پروتئین ها شود (Casat and Walbot, 2004) علاوه بر این، اشعه باعث غیرفعال شدن یا از بین رفتن پروتئین ها و آنزیم‌ها نیز می‌شود. به طوری که اگر گروه های دی سولفید یا آمینو اسید های آروماتیک در جایگاه فعال آنزیم باشند، UV می‌تواند هم به طور مستقیم و هم به طور غیر مستقیم از طریق جذب توسط آمینو اسیدهای حلقوی و انتقال انرژی به آمینو اسید های واقع در جایگاه فعال، باعث غیرفعال شدگی این آنزیم ها شود (Hollosy, 2002).

٥-۳-۲- اثر بر رشد

اشعه UV می‌تواند با تغییر بیان ژن های تحریک شده با UV، منجر به تغییرات در سطح تنظیم کننده های رشد شود. یا ممکن است با افزایش فعالیت آنزیم های اکسیداتیو مثل پراکسیدازها بر روی این تنظیم کننده ها موثر شود. UV همچنین از طریق تخریب اکسین می تواند از رشد طولی گیاه بکاهد (Caldwell et al., 1998).

٦-۳-۲- اثر بر پرولین

پرولین یک اسمولیت سازگار بوده و بدون تخریب مولکول های بزرگ سلول، توانایی تجمع در غلظت های بالا در سلول را دارد. پرولین می تواند به دلیل پذیرش الکترون، نقش حفاظتی نیز ایفا کند و در زمان بازدارندگی نوری ناشی از ROSها از آسیب رسیدن به فتوسیستم ها پیشگیری کند (امینی و همکاران، ۱۳۹۳). سطح این ماده علاوه بر گیاهان، در شرایط تنش، در موجودات بسیاری از قبیل جلبکها، بی مهرگان دریایی، مخمرها و باکتری ها افزایش می یابد (Delauney & Verma, 1993).

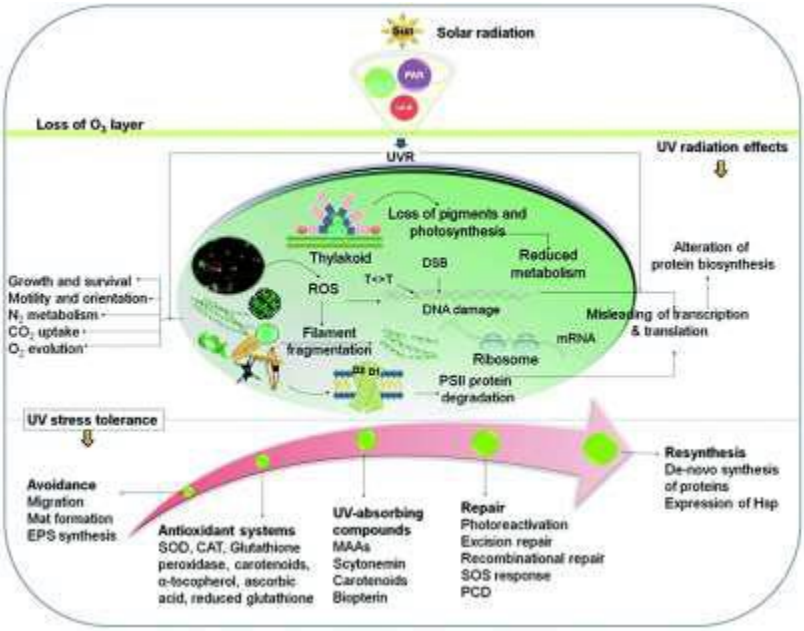
۷-۳-۲- فلورسانس کلروفیل

پس از اینکه انرژی نور خورشید به وسیله مولکولهای کلروفیل برگ جذب شد، در طول زنجیره انتقال الکترون انتقال می یابد و برای انجام فرآیندهای فتوشیمیایی فتوسنتز به مصرف

می رسد؛ و انرژی اضافه، یا طی فرآیندهای غیر فتوشیمیایی به صورت گرما به هدر می‌رود و یا طی فرآیندی موسوم به فلورسانس کلروفیل، به صورت نور قرمز بازتاب می شود (Baker, 2008). از آنجایی که این سه فرآیند به صورت رقابتی اتفاق می‌افتد، با اندازه گیری فلورسانس کلروفیل، اطلاعاتی در مورد اتلاف گرمایی و کارایی فتوشیمیایی به دست می‌آید (Lazar, 1999). ارزیابی تغییرات القایی در سیستم فتوسنتزی، بدون آسیب بافت گیاهی و بسیار سریع انجام می شود (Mehata et al. 2010). آسیب سیستم نوری ‖ و سایر اجزای زنجیره انتقال الکترون به واسطه تنش های زیستی و غیر زیستی، منجر به بازدارندگی یا کاهش شدید انتقال الکترون فتوسنتزی می شود که هدر رفت انرژی نورانی جذبی به صورت فلورسانس و گرما بیشتر خواهد شد (Rohacek et al., 2008).

۸-۳-۲- اشعه UV و تولید رادیکال های آزاد

تنش UV، منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود که آن نیز به نوبه خود منجر به ایجاد خلل در فرآیندهای فیزیولوژیکی سلول می شود. ROSها که در نتیجه اشعه UV تولید می شوند عبارتند از: آنیون پروکسید، هیدروژن پروکسید و رادیکال هیدروکسیل. احتمال ایجاد رادیکال های آزاد در بافت های فتوسنتزی بیشتر است (Costa *et al*., 2002). ROSها می‌توانند شدیدا با بیومولکول هایی مثل مواد ژنتیکی، پروتئین ها و لیپید ها وارد واکنش شده منجر به جهش مواد ژنتیکی، پراکسیداسیون لیپید و واسرشته شدن پروتئین ها شوند که در نهایت با ایجاد اختلال در متابولیسم طبیعی گیاه، منجر به مرگ سلولی می شود (Penny cooke et al., 2004).



شکل ۲-۱- تاثیر UV **بر بیومولکول ها، واکنش های فیزیولوژیک و مکانسیم های ترمیمی و تعدیلی** (Hader (et al., 2015

٤-۲- راهکار های حفاظتی گیاه در برابر اشعه UV

برای موجودات زنده‌ای که در معرض اشعه UV قرار دارند، راهکارهای گوناگونی وجود دارد که بتوانند به وسیله آن از ورود اشعه UV به درون سلول خود ممانعت کنند(Jansen et al., 2001**)**. حساسیت گیاهان به نور UV بسته به مراحل رشد و نمو، شدت نور UV، شرایط رشد، رقم کشاورزی و گونه گیاهی، درجات متفاوتی دارد. در ساختمان مورفولوژیکی برگ بسیاری از گیاهانی که در معرض اشعه UV قرار دارند، تغییراتی از قبیل افزایش ضخامت و کاهش سطح اتفاق می‌افتد (Barnes et al., 1990). به دلیل مقاومتی که دو لپه ای ها نسبت به اشعه UV دارند، تعداد گونه‌های دو لپه ای در جامعه ای متشکل از ترکیب تک لپه ای و دو لپه ای معمولاً بیشتر است (Caldwell et al., 1998).

در کل یک سیستم آنتی اکسیدانی قوی برای خنثی کردن تاثیرات سمی ROS لازم است که مشتمل بر دو سیستم غیر آنزیمی و آنزیمی در یاخته گیاهان است (Hollosy, 2002). سیستم آنزیمی شامل کاتالازها، پراکسیدازها، سوپراکسید دیسموتازها، گلوتاتیون ردوکتازها، گلوتاتیون پراکسیدازها، دهیدرواسکوربات ردوکتاز و آسکوربات پراکسیداز است (Foyer et al., 1997). که باعث شکسته شدن H_2O_2 به آب و اکسیژن مولکولی می شوند (Janda et al., 2005). سیستم غیرآنزیمی بعضی از مواد مانند کاروتنوئیدها، آسکوربیک اسید، پلی آمین ها، آلکالوئیدها،

ویتامین E، آنتوسیانین ها و فلاونوئیدها به طور مستقیم و غیر آنزیمی باعث دفع رادیکال‌های آزاد اکسیژن می شوند(Hollosy, 2002). نقش مهم ترکیبات فنولی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامت انسان، به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی رادیکالی غیر قابل چشم پوشی است.

۵-۲- دونالیلا سالینا(Dunaliella salina)

دونالیلا سالینا جلبک سبز تک سلولی، مقاوم به شوری، دو تاژکی، فاقد دیواره سلولی، دارای چرخه زندگی ساده و دارای توانایی رشد در بسیاری از مناطق جغرافیایی است. مهمترین گونه جنس دونالیلا این گونه است که به تولید کننده اولیه محیط های شور شهرت دارد. *D .salina* می تواند رنگدانه تولید کند ومی توان از آن به عنوان منبع غنی از رنگدانه بتاکاروتن نام برد (عمادی و همکاران ۱۳۸۹). بعلاوه مطالعات حاکی از آن است که دونالیلا در شرایط تنش مانند کمبود مواد غذایی و یا شوری شدید، تجمع کاروتنوئیدهای خود را افزایش می‌دهد. از این رو برخی گونه های جلبک دونالیلا ضمن تحمل شوری آب، بتاکاروتن زیادی تولید می‌کنند و بنا به کاربرد وسیع بتاکاروتن در تولید لوازم آرایشی، تولیدات دارو و صنعت تغذیه، پرورش این جلبک با اطلاع از شرایط بهینه رشد برای ما ممکن شده است (Butinar et al., 2005).

۱-۵-۲- رده بندی دونالیلا

Michel Felix Dunal برای اولین بار این جلبک را در حوضچه های نمکی در مناطق جنوب کشور فرانسه در سال ۱۸۳۸ با نام **Haematococcus** معرفی کرد و رنگ قرمز این حوضچه ها را به حضور این جلبک نسبت داد.اما در سال ۱۹۰۵ Teodoresco نام آن را به **Dunaliella** تغییر داد (Teodoresco, 1905).

لرچ در سال ۱۹۳۸ به معرفی گونه هایی از این جنس مبادرت ورزید و پس از وی باچر در سال ۱۹۵۹ مطالعات مورفولوژیکی جدیدی جهت توصیف بهتر این جلبک انجام داد که ماحصل آن ارائه یک کلید ساده شناسایی بود (Brown & Borowitzka, 1979).

سرانجام در سال ۱۹۷۳، Massyuk کلید نسبتاً جامعی را جهت شناسایی دونالیلا ارائه نمود که مبتنی بر صفات مورفولوژیکی نظیر اندازه، شکل، تقارن سلولی، شکل کلروپلاست، حضور یا عدم حضور پیرنوئید، لکه چشمی و گرانول های سیتوپلاسمی بود و بر اساس آن جنس دونالیلا به دو زیرجنس **Dunaliella** و **Pascheria** تقسیم شده بود.زیرجنس **Pascheria** شامل پنج گونه است که به طور عمده ساکن آبهای شیرین است و از ویژگی های عمومی آنها وجود واکوئل های انقباضی در پروتوپلاست جلبک می‌باشد. در زیر جنس دونالیلا ۲۳ گونه در چهار بخش *Tertiolecta, Peireceinae, Dunaliella, Viridis* قرار می‌گیرند که همگی ساکن آب های شور و

فاقد واکوئل های انقباضی هستند. لی در سال ۱۹۸۹ جلبک سبز دونالیلا را متعلق به شاخه Chlorophyta و راسته Volvocales و از تیره Chlamydomonaceae معرفی کرد اما بنا به گزارش Ben-Amotz & Avron که در سال ۱۹۲۲ منتشر گردیده تعداد ۲۸ گونه برای جنس دونالیلا شناسایی و معرفی شده است. جدای از بررسی های مورفولوژیکی، مطالعات فیزیولوژیکی نظیر مقاومت به شوری و تجمع بتاکاروتن پیرامون کلروپلاست جهت تفکیک بخش های درون زیر جنس دونالیلا کاربرد فراوانی داشته است. به طور خلاصه امروزه جلبک دونالیلا در شاخه Chlorophyta رده Chlorophyceae راسته Volvocales زیر راسته Chlamydomonadinea خانواده Polybelpharidaceae و جنس **Dunaliella** رده بندی می شود.

۲-۵-۲- اکولوژی جلبک دونالیلا

زیست شناسان دونالیلا را به دلیل توانایی انجام فتوسنتز، جزو فیتوپلانکتون‌ها در نظر می‌گیرند و برخی نیز به دلیل عدم حضور دیواره سلولی آن را یک پروتوزوا می‌دانند (Brown & Borowitzka,1979).

بعضی از گونه‌های دونالیلا را به خاطر زیستن در محیط های بسیار شور، فشار پایین، نور زیاد و گاه دمای پایین، به عنوان مقاوم‌ترین میکروارگانیسم‌های یوکاریوتیک در شرایط نامساعد می‌شناسند (Brown & Borowitzka, 1979). با وجود تحمل محدوده دمای کمتر از صفر و بیشتر از ۳۸ درجه سانتی‌گراد، بهینه دمایی دونالیلا در حدود ۱۲ تا ۲۸ درجه سانتیگراد می باشد. همچنین با وجود بهینه pH ۷/۵ – ۶/۲، این جلبک می‌تواند تغییرات pH در محدوده ۱۱ – ۱ را بسته به گونه تحمل کند(Wong et al., 2000).

جنس هایی از دونالیلا که ساکن اکوسیستم آب شور هستند به علت کمبود تنوع زیستی، کمتر مورد تغذیه جانوران قرار می گیرند و دو فاکتور غلظت CO_2 محلول در آب و مقدار مواد غذایی، اصلی ترین عوامل محدود کننده ازدیاد و رشد جنس دونالیلا در غلظت های بالای نمک آب است (Marano, 1976).

۳-۵-۲- گونه دونالیلا سالینا

گونه دونالیلا سالینا به لحاظ شکل تخم مرغی با دو تاژک در انتهای قدامی، کلروپلاست فنجانی شکل و پیرنوئید داخل آن از سایر گونه های جنس دونالیلا متمایز است در شرایط کمبود بعضی ریزمغذی ها و شدت زیاد نور، رنگ این جلبک سبز تغییر کرده و به قرمز و نارنجی متمایل می‌شود(Ben-Amotz & Avron, 1992).

٦-۲- ترکیبات حیاتی موجود در جلبک دونالیلا سالینا

۱-٦-۲- لیپیدها

لیپیدهای مختلفی در جلبک دونالیلا سالینا وجود دارد. بتاکاروتن نمونه‌ای از لیپید خنثی و مونو گالاکتوزیل و گلیسرول نمونه‌هایی از لیپیدهای قطبی به حساب می‌آیند. علی‌رغم وجود مقدار کمی اسید چرب با زنجیره بلند، اغلب اسیدهای چرب دونالیلا سالینا کوتاه و ۱۶ الی ۱۸ کربنه می باشند. (Evans et al., 1982).

۲-٦-۲- ویتامین ها

اشکال مختلف ویتامین های گروه B ویتامین C و بتاکاروتن به عنوان پیش ساز سنتز ویتامین A در جلبک دونالیلا یافت شده است (Dorkova et al., 1975).

۳-٦-۲- پروتئین ها

منبع نیتروژن مورد استفاده جلبک در محیط کشت، تعیین کننده مقدار پروتئین آن است. همچنین مقدار پروتئین در مراحل اولیه رشد بالاتر است. با گذر زمان، از حجم آن کاسته می شود (Krinsky, 1988).

٤-٦-۲-رنگیزه ها

گونه‌های مختلف دونالیلا، دارای کلروفیل های a و b و کاروتنوئیدهایی مانند α، β و γ، کاروتن، لوتئین، زئاگزانتین و ویولا گزانتین می باشند (Sandmann, 2001).

۷-۲- ترکیبات غذایی مورد نیاز جلبک دونالیلا سالینا

۱-۷-۲- کربن

از آنجایی که همه گونه‌های دونالیلا فتوتروف هستند، از این رو توانایی جذب HCO_3 و CO_2 برای فتوسنتز را دارند. به دلیل کاهش حلالیت کربن غیر آلی در آب های شور، برای کشت دونالیلا دی سالینا، ذخیره کربن غیر آلی بسیار مهم است (Aziawa et al., 1984).

۲-۷-۲- سدیم

تمام گونه‌های دریایی و شورپسند دونالیلا نیاز به سدیم دارند.

۳-۷-۲- آهن

آهن برای رشد دونالیلا سالینا به مقدار کم مورد نیاز است. غلظت بهینه آهن برای دونالیلا سالینا و دونالیلا ویریدیس بین ۱/۲۵ تا ۳/۷۵ میلی گرم در لیتر است (Mil'ko, 1962).

٤-۷-۲- فسفر

بهترین منبع فسفر برای جلبک دونالیلا، فسفات با غلظت بهینه ۰/۰۲ تا ۰/۰۲۵ گرم در لیتر فسفات پتاسیم می باشد (Mil'ko, 1962).

۸-۲- تولید مثل جلبک دونالیلا سالینا

تولیدمثل دونالیلا به روش غیرجنسی و جنسی اتفاق می افتد. در شرایط مناسب، تولید مثل رویشی با تقسیم هسته آغاز می‌شود که توسط یک شیار سلولی که از راس تا انتهای تاژک دار دنبال می‌شود و شکاف در انتهای سلول به طور همزمان با تقسیم سیتوپلاسم و پیرنوئید پیشروی می کند تا زمانی که سلول های دختر حاصل شود. این سلول ها فقط به وسیله یک پل سیتوپلاسمی کم رنگ و باریک، در محدوده وسط، بین انتهای جلویی و عقبی سلول ها متصل هستند. در این حال هر یک از سلولهای دختری، تاژک دوم خود را تولید می‌کند. لکن در تولید مثل جنسی که در شرایط نامساعدی از قبیل کاهش مواد غذایی و غلظت نمک اتفاق می‌افتد، دو سلول از نوک تاژک هایشان شروع به متصل شدن می‌کنند. قبل از جوانه زنی، محتویات جنین متمایل به سبز است. پس از جوانه زنی طی فرایند میتوز، سلول های دختری از طریق یک شکست در دیواره جنین آزاد می شوند. (Michael et al., 2007).

۹-۲- مروری بر تحقیقات گذشته در ایران

مرادی و پوراکبر در سال ۱۳۹۵ به منظور بررسی تاثیر تنش UV-B بر روی رنگیزه های فتوسنتزی گیاه زعفران، پس از کشت بنه زعفران در گلدان های حاوی پرلیت و بعد از مرحله دو برگی، به مدت یکماه (هر روز به مدت ۳۰ و ۴۵ دقیقه)، تیمار UV-B را بر روی گیاه اعمال کرده و شاخص‌های رشد و فیزیولوژیکی گیاه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که پرتو ماورای بنفش باعث افزایش مقدار کلروفیل a و b، کاروتنوئیدها، طول اندام هوایی و ریشه شده و وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه تحت تیمار را کاهش داد (مرادی، معصومه و پور اکبر، لطیفه، ۱۳۹۵).

حاجی حسینلو و همکاران در سال ۱۳۹۲ اثر اشعه UV-B روی برخی فرایندهای بیوشیمیایی و آناتومیکی گیاه کدو مسمایی را مطالعه نمودند. ایام تیمار با UV-B به مدت ۱۴ روز بود. نتایج

نشان داد که ضخامت ساقه و برگ بر اثر اشعه UV-B افزایش معنی دار پیدا می کند. همچنین تیمار با اشعه UV-B باعث افزایش میزان فنول کل و فلاونوئید می شود.

سلمانی نژاد در سال ۱۳۹۱ به بررسی اثرات نور و شوری بر کاروتنوئیدهای دونالیلا سالینای دریاچه ارومیه پرداخت. شوری در سه سطح ۶۰، ۷۵ و ۲۹۰ واحد و شدت های نور در ۳ سطح ۲۰۰۰، ۶۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ لوکس و دمای انجام پژوهش ۲۵+ درجه سانتیگراد بوده و نتایج نشان داد افزایش تابش نور و میزان شوری و اثرات متقابل این دو فاکتور، بر تولید کاروتنوئید تاثیر معنی داری داشته به طوری که بیشترین میزان کاروتنوئید درشوری ۱۷۰ واحد در ۱۰۰۰ با شدت نور ۱۰۰۰۰ لوکس و کمترین میزان در شوری ۶۰ واحد در هزار و شدت نور ۱۰۰۰۰ لوکس مشاهده شد.

تولایی و همکاران در سال ۱۳۹۷ به بررسی تولید بتاکاروتن از سویه بومی جلبک دونالیلا سالینا پرداختند. کشت ها در محیط کشت جانسون و در شرایط NaCl و pH مختلف اتفاق افتاد. بررسی ها در یک دوره رشد ۴۰ روزه صورت گرفت. نتایج حاصل نشان داد که تولید رنگیزه متناسب با روند رشد بوده و بیشترین میزان رشد و تولید کاروتنوئید، در محیط کشت با شوری ۱۰٪ (در مقایسه با شوری ۲۰ و ۳۰٪) و pH برابر ۸/۵ (در مقایسه با pHهای ۷/۵ و ۹/۵) مشاهده گردید. در روز چهل و دوم و در حدود ۱۴/۹۵ میلی‌گرم در لیتر از محیط کشت بیشترین میزان تولید کاروتنوئید در محیط فوق ارزیابی گردید.

هادی و همکاران در سال ۲۰۰۸ به منظور ارزیابی تولید گلیسرول و بتاکاروتن در جلبک سبز دونالیلا سالینا و دونالیلا ویریدیس استخراج شده از تالاب گاوخونی با استفاده از غلظت های مختلف نمک نتیجه گرفتند که رشد جلبک ها در شوری کاهش و میزان کاروتنوئید دونالیلا سالینا در شوری افزایش یافت.

۳- روش تحقیق

۳-۱- تهیه ماکروالمان ها

جلبک دونالیلا سالینا در محیط کشت مایع شامل شوری طبیعی در حد ۱/۵ مولار رشد می کند. برای تهیه یک لیتر محیط کشت Johnson با غلظت ۱/۵ مولار برای این جلبک، املاح زیر بطور جداگانه توزین شدند:

جدول ۳-۱- عناصر ماکروالمان

مواد	NaCl	$MgCl_2.6H_2O$	$CaCl_2.2H_2O$	Na_2SO_4	K_2SO_4	Tris-base
مقدار (گرم)	۸۷/۷۵	۹/۸	۰/۵۳	۳/۲	۰/۸۵	۳/۲۵

املاح فوق به نوبت در مقداری آب با استفاده از مگنت حل گردید. Tris–base برای حفظ pH است. سپس pH محلول در حد ۷/۵ تنظیم شد. بعد از آن که املاح فوق به محیط اضافه و pH تنظیم گردید؛ محیط کشت که در ارلن بزرگ است در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد بعد از اتوکلاو، املاح KNO3 با غلظت یک مولار، Trase element و KH_2PO_4 با غلظت ۱۰۰ میلی مولار از هر کدام به حجم مساوی ۵ میلی لیتر به محیط اضافه گردید. املاح مذکور بدلیل حساسیت به حرارت بعد از اتوکلاو به محیط اضافه شدند.

نکته: برای به حجم رساندن محیط کشت، همزمان مقداری آب مقطر نیز اتوکلاو گردید.

۳-۱-۱- تهیه KNO_3 یک مولار

۲۵/۲۷ گرم توزین و در مقداری آب مقطر توسط دستگاه ورتکس به خوبی حل گردید سپس با اضافه کردن آب، حجم آن به ۲۵۰ میلی لیتر رسانده شد.

۳-۲- تهیه میکروالمان ها

برای تهیه میکروالمان ها مقادیر زیر از املاح توزین و حل گردید:

Title and Author:	**The effects of UV-B radiation on some physiological and biochemical processes of *Dunaliella Salina* salt waters algae/ Zahra Faraji**
Supervisor & Chairman:	**Seyed Mehdi Razavi**
Second superviver:	**Alireza Ghasemian**
Graduation date:	**2020/02/10**
Number of pages:	**65**

Abstract

Research Aim: The purpose of this study is to investigate the physiological responses of green algae **Dunaliella salina** to four different doses of UV_B radiation (0.3, 1, 3 and 9 kj/m^2), to evaluate the degree of resistance of the above-mentioned algae to this environmental stress.

Research methods: 100ml of media containing algae is transfered to a 1000ml algoa free media, the new culture medium was cultured in germinator with 16 hours of lighting period, 8 hours of darkness period and a temperature of 15 °C and the light of 6000 Lux. After 40 days, medium was divided into a control group and four experimental groups. Eech group was exposed to a specific level of UV_B. Group I: 0.3, group II: 1 , group III: 3 and group IV 9 kj/m^2 respectively. The treatment was repeated 2 days in a row. All the experiments were performed in three replications.

Findings: Experimental results showed that UV-B had its effect on photosynthetic parameters such as increase in Fo and carotenoids and decrease in photochemical efficiency of photosystem II,comparison of decrease in chlorophyll a and chlorophyll b showed that the decrease in chlorophyll b was more than chlorophyll a. The Fm also decreased significantly from control to 1 kJ / m^2 UV-B treatment and increased significantly in the above treatments (3 and 9 kJ / m ^{2}). On the other hands, evaluation of the results of UV-B-treated biochemical assays resulted in a decrease in total protein content. The content of soluble sugars, total free amino acids and proline content under UV-B treatment showed a significant increase indicating the mechanisms by which the algae Dunaliella salina cope with stress. Regarding enzymatic activity as the intensity of UV-B stress increased, the catalase activity decreased and ascorbate peroxidase, protease and polyphenol oxidase enzymes significantly increased. The increase in UV-B also caused a significant decrease in the growth and OD of Dunaliella salina algae.

Conclusion: Growth and photosynthetic function of Dunaliella algae decreased due to high intensities of UV-B radiation. However, UV-B radiation increased the activity of antioxidant enzymes such as ascorbate peroxidase, protease and polyphenol oxidase, the accumulation of soluble sugars and free amino acids such as proline, as well as the accumulation of carotenoids in the algae Dunaliella salina. This will be accompanied by increased resistance of the algae to oxidative stress and protection of its photosynthetic systems. As a result, Dunaliella salina relatively tolerats high doses of UV-B.

Keywords: Algea, Dunaliella Salina, UV

University of Mohaghegh Ardabili
Faculty of Science
Department of Biology

Thesis submitted in partial fulfillment for the degree of
M.Sc. in Plant Physiology

The effects of UV-B radiation on some physiological and biochemical processes of *Dunaliella Salina*, salt waters algae

By:
Zahra Faraji

Supervisor:
Seyed Mehdi Razavi (Ph. D)

Second superviver:
Alireza Ghasemian (Ph. D)

February 2020