



مطالعه مکانیسم دفاعی ریز جلبک *Haematococcus pluvialis* طی آلودگی به قارچ *Paraphysoderma sedebokerensis*

بهاره ناهیدیان^۱، فائزه قناتی^{۱*}، مریم شهبازی^۲، ندا سلطانی^۳، مرتضی غلامی^۴

^۱ گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
^۲ گروه فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
^۳ گروه میکروبیولوژی نفت، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران
^۴ گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

* Email: ghangia@modares.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۰۴

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۸

چکیده

پاسخ اولیه سلولی ریزجلبک *Haematococcus pluvialis* طی آلودگی به قارچ کیتريد در این پژوهش مطالعه شد. برای این منظور، شکل پالموئید ریزجلبک *H. pluvialis* در سه محیط آلوده به قارچ کیتريد، محیط بازیافتی ریزجلبک‌های سالم و محیط بازیافتی ریزجلبک آلوده به قارچ کیتريد برای دو روز کشت شد و سپس فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، غلظت پراکسید برون سلولی و آمینواسیدهای آزاد درون سلولی با فنون طیف سنجی UV/vis و HPLC سنجیده شد. بیشترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در سلول‌های آلوده به کیتريد به ترتیب در ساعت‌های ۲۴، ۲۴ و ۴۸ و به میزان ۲/۳، ۶/۷ و ۲/۶ برابر نمونه‌های شاهد بود. بیشترین فعالیت این آنزیم‌ها در سلول‌های کشت شده با محیط بازیافتی سلول‌های آلوده در ۱۲، ۱۲ و ۳۶ ساعت به ترتیب ۲/۱، ۲/۵ و ۲/۶ برابر بیشتر از فعالیت این آنزیم‌ها در نمونه‌های شاهد بود. همچنین میزان پراکسید برون سلولی در ریزجلبک کشت شده در محیط بازیافتی سلول‌های آلوده حدود ۴ برابر بیشتر از سایر نمونه‌ها بود و این در حالی است که سطح پراکسید در سلول‌های آلوده به کیتريد با شیب ملایمی از ۱/۳ به ۱/۸ میکرومولار طی ۴۸ ساعت کشت افزایش یافت. آمینواسیدهای هیستیدین، آلانین، آسپاراژین، آسپاراتیک اسید، آرژنین و متیونین با بیشترین افزایش و فنیل آلانین و تریپتوفان با بیشترین کاهش همراه بودند. نتایج نشان می‌دهد که ریزجلبک *H. pluvialis* از طریق فعال کردن مسیرهای آنتی‌اکسیداتیو آنزیمی و نیز برخی آمینواسیدهای ویژه به مقابله با کیتريد و افزایش سطح پراکسید سلولی ناشی از آلودگی می‌پردازد.

کلیدواژه‌ها: آمینواسیدهای آزاد درون سلولی، ریزجلبک *Haematococcus pluvialis*، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، قارچ کیتريد، هیدروژن پراکسید.

مقدمه

آستازانتین^۱ یک رنگدانه قرمز رنگ از نوع کتوکاروتنوئیدها با فرمول مولکولی $C_{40}H_{52}O_4$ و وزن مولکولی $596.86 \text{ g mol}^{-1}$ است که می‌تواند از اثرهای مضر پرتو فرابنفش بر کلروفیل و غشای فتوسنتز کننده جلوگیری کند [۵]. شواهد حاکی از ویژگی آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی آستازانتین (تا حدود ۵۰۰ بار بیشتر از ویتامین C و E) و یا از سایر کاروتنوئیدها همانند بتا-کاروتن، لیکوپن، لوتئین و زازانتین است [۶]. این ویژگی آستازانتین باعث شده است تا پژوهش‌های پیش‌بالینی بسیاری با هدف آزمایش تاثیر آستازانتین بر درمان سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی و افزایش کارایی سیستم ایمنی شکل گیرد [۵].

بیش از ۹۵٪ بازار امروزی آستازانتین بر پایه‌ی روش‌های ساخت شیمیایی بنا شده است [۱۷]. در سال‌های پیش، استفاده از ترکیب‌های ساختگی شیمیایی به دلیل تولید فراورده‌های جانبی سمی با محدودیت شدیدی روبرو شده است و این سبب افزایش تقاضا برای آستازانتین طبیعی گشته است [۲۳]. در همین راستا، سلول‌های محدودی که توان سنتز آستازانتین را دارند به‌عنوان منبع طبیعی این ماده مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این میان، ریزجلبک تک‌سلولی ریزجلبک *Haematococcus pluvialis* غنی‌ترین منبع تولید آستازانتین شناخته می‌شود که توان تولید و ذخیره آستازانتین حدود ۳-۵ درصد وزن خود را دارد [۹]. تقاضای سالانه برای آستازانتین طبیعی از ریزجلبک *H. pluvialis* در بازار حدود ۲۱۴۵ میلیون دلار می‌باشد [۱۴]. مشکل اصلی در راستای تجاری‌سازی این منبع طبیعی آستازانتین، بازدهی پایین و هزینه بالای کشت ریزجلبک است.

تلاش‌های بسیاری در راستای کاهش هزینه فرایندی با طراحی انواع فتوبیوراکتورهای پیشرفته صورت گرفته است ولی با این حال استفاده از استخرهای باز همچنان به صرفه‌ترین روش کشت ریزجلبک شناخته می‌شود [۱۵]. مشکل اصلی استخرهای باز، آلودگی سامانه کشت به انواع ویروس‌ها، باکتری‌ها، آغازیان و قارچ‌ها است. ریزجلبک *H. pluvialis* نیز مورد حمله پارازیت‌های قارچی و زئوپلانکتونی (آمیپ‌ها، مژک داران و روتیفرها) و همچنین سایر ریزجلبک‌ها و سیانوباکترها قرار می‌گیرد که نتیجه‌ای جز کاهش زیست‌توده و کیفیت محصول و حتی از بین رفتن کل سامانه کشت ندارد [۱۱].

آلوده شدن با قارچ تک‌سلولی متعلق به شاخه کیتریدیومیکوتا به نام *Paraphysoderma sedebokerensis* یکی از چالش‌های اساسی در کشت باز *H. pluvialis* در مقیاس صنعتی است [۱۱]. آلودگی با *P. sedebokerensis* در مدت زمان کوتاهی منجر به مرگ سلول *H. pluvialis* و انهدام کل سامانه کشت می‌شود. کیترید قادر است که پالملوئید^۲ (سلول ریزجلبک فاقد تاژک) و آپلانسپورها^۳ (سلول ریزجلبک با دیواره سلولی ضخیم و ذخیره کننده آستازانتین) را آلوده سازد. این در حالی است که سلول‌های تاژک‌دار متحرک مورد حمله کیترید قرار نمی‌گیرند. طی فرایند آلوده شدن کشت *H. pluvialis* با کیترید، سلول‌های سالم به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آیند و لخته‌های سلولی شامل سلول‌های زنده، باقیمانده‌های سلولی و سایر ترکیب‌های آلی در محیط کشت دیده می‌شود و با تداوم فرایند کل سلول‌ها واپاشیده می‌شوند [۸]. کیتریدها اختصاصاً ریزجلبک

^۲ Palmeloids^۳ Aplanospires^۱ Astaxanthin

استوک سلولی با غلظت $1 \times 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$ از محیط کشت در اواسط فاز نمایی برداشت و برای تیمار در شرایط گوناگون مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲. قارچ *P. sedebokerensis* و شرایط کشت

سلول‌های *H. pluvialis* آلوده به قارچ *P. sedebokerensis* از منطقه‌ای در شهر جیانگ (چین) نمونه‌برداری و قارچ *P. sedebokerensis* متعلق به گروه کیتريدیومیکوتا از این سلول‌ها جداسازی و خالص شد. پس از مطالعه ریخت‌شناسی با استفاده از میکروسکوپ نوری، شناسایی ابتدایی سلول‌های کیتريد و سایر قارچ‌ها انجام شد. برای حذف کامل باکتری‌ها و خالص‌سازی این قارچ از باکتری‌ها، ترکیب آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین^۱، کانامایسین^۲ و جنتامایسین^۳ با نسبت‌های (mg L^{-1} $100:10:5$)^۱ استفاده گردید. پس از حذف باکتری‌ها، برای خالص‌سازی کیتريد از سایر آلودگی‌های قارچی بر اساس پژوهش‌های گاتمن و همکاران [۷] مینی بر بازه‌ی pH مناسب ۶/۹-۹ برای کیتريد، محیط‌های CGM^۴ با ۷-۸ و pH ۹ تهیه شد [۱۱]. سپس آمیزه سلول‌های آلوده به قارچ کیتريد و سایر قارچ‌ها بر روی سطح پلیت پخش گردید. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای 30°C برای مدت ۳ روز نگهداری شد و تک‌کلونی‌های قارچ کیتريد از سایر قارچ‌ها در ۹/۰ pH جداسازی و سپس با استفاده از محیط CGM تکثیر یافت. این کلونی‌ها سپس به محیط کشت مایع انتقال و در دمای بهینه رشد کیتريد (32°C) و نوردهی پیوسته با دانسیته^۵ $15 \text{ s}^{-1} \text{ m}^{-2} \mu\text{mol}$ تکثیر یافت.

^۱ Ampicilin

^۲ Kanamicin

^۳ Gentamicin

^۴ Chytrid Growth Medium

^۵ Photosynthetic photon flux density (PPFD)

H. pluvialis را در هر دو فاز نمایی و سیست آلوده می‌کند [۸]. تاکنون هیچ پژوهش موفقیت آمیزی در راستای جلوگیری از این عامل آلودگی توسعه نیافته است که این امر بر اهمیت مطالعه واکنش ریزجلبک در هنگام رویارویی با کیتريد به‌منظور توسعه یک روش کارا برای حذف این عامل آلاینده می‌افزاید. پژوهش‌های Olive و همکاران [۱۶] نشان داد که آمینواسیدهای تریپتوفان، آسپارژین و آرژنین برای افزایش سیستم دفاعی ریزسازواره‌ها و خشتی‌سازی اثر پاتوژن‌ها ضروری است. اثر برهمکنش گیاه-پاتوژن بر میزان پراکسید سلولی به‌عنوان یک مولکول سیگنال در بیان هورمون‌های دفاعی سلول شناخته شده است [۲۰]. در پژوهش پیش‌رو، اثر آلودگی سلول‌های *H. pluvialis* به کیتريد بر رشد سلول و پاسخ فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آمینواسیدهای آزاد درون-سلولی مطالعه شده است. این مطالعه می‌تواند شناخت بهتری از پاسخ سلول به تنش قارچ بدست دهد و کمک به ارائه راهکاری برای حل این معضل در پژوهش‌های آتی نماید.

مواد و روش‌ها

۱-۲. ریزجلبک و شرایط کشت

ریزجلبک *H. pluvialis* از بانک جلبکی موسسه آب‌شناسی در آکادمی علوم چین (وو‌هان، چین) تهیه شد. کشت سلول‌ها در محیط کشت BG11 به‌شکل نیمه‌پیوسته در فتوبیوراکتورهای یک لیتری در اتاق رشد با دمای ثابت $25 \pm 2^\circ\text{C}$ انجام گرفت. منبع کربن محیط کشت با هوادهی از کف (CO_2 ۰/۰۴٪) موجو در هوا) تامین شد و نوردهی به سلول‌ها به‌شکل پیوسته با شدت $20 \mu\text{mol photon s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ انجام شد. کشت سلول‌ها برای مدت ۷ روز ادامه یافت. یک

با شرایط دمایی 30°C ، شدت نور $1 \mu\text{mol photon s}^{-1}$ و سرعت 150 rpm کشت شد. نمونه شاهد حاوی 50 mL سلول ریزجلبک بدون هیچ آلودگی قارچی بود.

تیمار دوم شامل کشت ریزجلبک در محیط فیلترشده‌ی سلول‌های ریزجلبک آلوده با قارچ بود. برای آماده‌سازی این محیط سلول‌های ریزجلبکی پس از ۷ روز کشت تحت شرایط مشابه در بخش ۱-۲ با کیتريد آلوده گشت. برای این کار 192 mL ریزجلبک با غلظت سلولی $1 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ برداشت شد و با 8 mL کیتريد (۴٪ حجم کل) با جذب نوری ۰/۱ در طول موج 600 nm آمیخته گشت. این آمیزه سپس در ارلن‌مایر 250 mL روی شیکر انکوباتور با سرعت 150 rpm در دمای 30°C و شدت نوردهی $1 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ برای مدت ۴ روز تا آلودگی کامل سلول‌های ریزجلبکی کشت شد و سپس با کاغذ واتمن ۴ فیلتر و محلول فیلتر شده برای مدت سه ساعت جوشانده شد. سپس $12/5 \text{ mL}$ (۲۵٪ حجم کل) از این عصاره با $37/5 \text{ mL}$ محیط حاوی ریزجلبک با غلظت سلولی $1 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ مخلوط و برای مدت ۲ روز در شیکر انکوباتور با شرایط یکسان کشت شد. نمونه شاهد دوم در شرایط یکسان از محیط ریزجلبکی بدون قارچ تهیه شد.

نرخ آلودگی ریزجلبک با شمارش سلول‌های آلوده و سالم با میکروسکوپ نوری (Olympus BH2, Olympus, Japan) در بزرگنمایی $20\times$ و معادله ۱ برآورد شد که در آن N_i و N_u به ترتیب تعداد سلول‌های آلوده به قارچ و غیر آلوده و P درصد آلودگی را نشان می‌دهد [۷].

$$P = \frac{N_i}{N_i + N_u} \times 100 \quad (1)$$

کشت قارچ‌ها در شیکر انکوباتور با سرعت 150 rpm انجام شد. محیط کشت ویژه کیتريد شامل نمک‌های استفاده شده در محیط کشت BG11 که فاقد منبع کربن و نیتروژن معدنی است، می‌باشد. این محیط کشت همچنین حاوی $0/25 \text{ g L}^{-1}$ عصاره مخمر، $0/25 \text{ g L}^{-1}$ پیتون و $0/25 \text{ g L}^{-1}$ می‌باشد [۱۱].

۳-۲. تیمار ریزجلبک با قارچ

پیش از آغاز تیمار سلول‌های ریز جلیبک و بررسی پاسخ سلولی نیاز به تعیین درصد مناسب استفاده از سلول‌های کیتريد برای کشت همزمان ریزجلبک و قارچ بود. بنابراین از سوسپانسیون حاوی قارچ کیتريد با درصدهای ۳، ۴ و ۶ درصد به سلول‌های ریزجلبک اضافه شد. همچنین با توجه به اینکه این مطالعه بررسی پاسخ‌های اولیه سلول ریزجلبک در مقابل قارچ کیتريد بود نیاز به تعیین زمان مناسب برداشت تیمار بود. به همین سبب نرخ آلودگی سلول‌های ریز جلیبک تا زمانی که آلودگی کامل صورت بگیرد اندازه گیری شد. سلول‌های ریز جلیبک با غلظت سلولی $1 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ طی ۴ روز به طور ۱۰۰٪ با قارچ کیتريد آلوده می‌شدند. با این نتایج، ۴۸ ساعت پس از القای کیتريد به محیط کشت سلول ریزجلبک، نرخ آلودگی ۳۰٪ مشاهده گردید. بنابراین ادامه آزمایش‌ها در طول دو روز و با بازه‌های زمانی ۱۲ ساعته صورت گرفت. پاسخ سلولی ریزجلبک به قارچ کیتريد در محیط کشت با دو نوع تیمار مطالعه شد. تیمار نخست به بررسی کشت همزیست قارچ و ریزجلبک پرداخته است. برای این منظور، 48 mL ریزجلبک با غلظت سلولی $1 \times 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ با 2 mL قارچ کیتريد (۴٪ حجم کل) با جذب نوری ۰/۱ در طول موج 600 nm آمیخته گشت و برای مدت ۲ روز در شیکر انکوباتور

مشخصات برنامه جریان و سیستم گرادیان در جدول ۱ ذکر شده است [۲]. جذب آمینواسیدها در طول موج برانگیختگی^۲ ۲۳۰ nm و طول موج نشر^۳ ۴۶۰ nm و دمای ۴۰ °C بررسی شد. میزان آمینو اسیدها با استفاده از روش محاسبه سطح زیر منحنی کروماتوگرام حاصل از HPLC و با استفاده از منحنی استاندارد آنها برآورد شد.

جدول ۱ مشخصات برنامه گرادیان فاز متحرک HPLC آمینواسیدها

زمان (min)	جریان (mL min ⁻¹)	فاز متحرک (درصد)	
		فاز ۱	فاز ۲
۰	۰/۵	۹۰	۱۰
۰/۶	۰/۵	۹۰	۱۰
۹	۰/۵	۵۰	۵۰
۴۸	۰/۵	۶۰	۴۰
۵۱	۰/۵	۱۰۰	۰
۸۰	۰/۵	۱۰۰	۰
۸۵	۰/۵	۱۰	۹۰
۹۰	۰/۵	۱۰	۹۰

۲-۶. استخراج عصاره سلولی برای سنجش فعالیت‌های آنزیمی

ابتدا ۵۰ mL محلول ریزجلبک با غلظت سلولی 1×10^6 cells mL⁻¹ با سانتریفیوژ در دور $3000 \times g$ برای مدت ۳ دقیقه جمع‌آوری شد. سپس توده سلولی در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان سنجش در فریز ۲۰ °C - نگهداری شد. به این نمونه، ۳ mL بافر فسفات سدیم ۶۰ mM (pH ۷/۱) اضافه شد و با میله شیشه‌ای به شدت همزده شد. عصاره سلولی با سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰۰ rpm و دمای ۴ °C به مدت ۱۰ دقیقه جدا شد.

پس از پایان تیمارهای فوق نمونه‌ها به کمک سانتریفیوژ جمع‌آوری و با فریز درای خشک گردید.

۲-۴ استخراج و سنجش آمینواسیدهای آزاد سلولی

برای اندازه‌گیری غلظت آمینواسیدهای آزاد درون سلولی، ابتدا ۰/۰۵ گرم وزن خشک سلول با هاون در محلول اتانول ۸۰٪ بر روی یخ ساییده شد و به ویال ۱/۵ mL انتقال یافت. ویال‌های حاوی نمونه به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۸۰ °C قرار گرفت. این آمیزه سلولی پس از هم‌دم شدن با محیط در ۱۳۰۰۰ rpm برای مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد. محلول رو شناور به ویال ۲ mL منتقل شد تا در هوای آزاد خشک شود. پس از خشک شدن، یک میلی‌لیتر آب دیونیزه به هر یک از ویال‌ها افزوده و به کمک صافی ۰/۴۵ μm خالص گردید. از هر نمونه صاف شده به مقدار ۲۵ μL با ۲۰ μL بافر بورات و در نهایت ۱۰ μL محلول ارتوفتال‌الدهید مخلوط گشت. پس از گذشت زمان ۲ دقیقه، ۵ μL کلریدریک اسید ۰/۵ M به هر یک از ویال‌ها اضافه و برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا^۱ آماده شد [۱۸].

سنجش آمینواسیدها با دستگاه HPLC (Agilent 1200 Infinity series, Agilent Technologies Co., USA) انجام شد. برای این کار، ستون Zorbax Eclipse AAA با طول ۱۵۰ mm و قطر ۴/۶ mm مجهز به سیستم تشخیص FLD استفاده شد. فاز متحرک از دو محلول ۱ شامل بافر سدیم فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH ۷/۲ و تتراهیدورفوران به نسبت ۹۵ به ۵ و محلول ۲ شامل بافر سدیم فسفات ۲۵ میلی‌مولار، متانول و استونیتریل به ترتیب به نسبت ۵۰ به ۳۵ به ۱۵ و ۲ تشکیل شده بود.

^۲ Excitation

^۳ Emission

^۱ HPLC

۲-۷. سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (PO)

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با اختلاط عصاره سلولی با بافر سدیم فسفات ۶۰ mM (pH ۶/۱)، گایاکول ۲۸ mM و هیدروژن پراکسید ۵ mM انجام شد [۱۰]. جذب نوری این آمیزه در طول موج ۴۲۰ nm پس از یک دقیقه خوانده شد. فعالیت آنزیم به صورت پراکسیداسیون μM ۱ از گایاکول در دقیقه (یک واحد، U) بر تعداد سلول بیان گردید. غلظت پروتئین نمونه‌ها به روش برادفورد تعیین شد. برای این کار، از هر عصاره سلولی به مقدار $100 \mu\text{L}$ در لوله آزمایش ریخته شد و با ۱ mL محلول برادفورد مخلوط گشت و پس از ورتکس کردن لوله‌ها و گذشت حداقل ۵ دقیقه در دمای اتاق، مقدار جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ nm توسط دستگاه طیف‌سنج UV/vis (Cintra 6, GBS, Australia) خوانده شد و با استفاده از منحنی تنظیم تعیین مقدار گردید.

۲-۸. سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

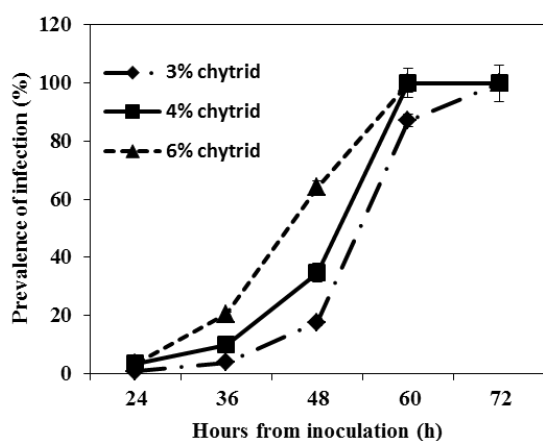
مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۵ mM (pH ۶/۸)، H_2O_2 ۱۰ mM و عصاره آنزیمی تهیه و برای سنجش فعالیت کاتالاز با توجه به روند تجزیه H_2O_2 مورد استفاده قرار گرفت [۱۹]. کاهش جذب نوری نمونه در طول موج ۲۴۰ nm در طول یک دقیقه خوانده شد و فعالیت آنزیمی بر حسب میلی‌گرم پروتئین موجود در عصاره سلولی برآورد شد. یک واحد آنزیمی معادل مقدار آنزیم لازم برای تخریب یک میکرومول هیدروژن پراکسید در نظر گرفته شده است [۱۲].

۲-۹. سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

بافر ۵۰ mM HEPES-KOH (pH ۷/۸) حاوی ۱ mM EDTA ۰/۱، ۵۰ mM Na_2CO_3 (pH ۱۰/۲)، L-Nitro Blue Tetrazolium ۱۲ mM methionine، ۰/۷۵ mM Chloride (NBT) و ۱ μM riboflavin با عصاره آنزیمی آمیخته و جذب نوری محلول در طول موج ۵۶۰ nm خوانده شد. و نتایج بر حسب فعالیت آنزیمی بیان گردید [۱۰]. هر واحد فعالیت آنزیمی به مهار ۵۰ درصدی NBT در طول موج ۵۶۰ nm اشاره دارد.

۲-۱۰. تهیه تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از سلول برای تهیه تصویر میکروسکوپ الکترونی ریزجلبک *H. pluvialis* آلوده به قارچ، ابتدا سلول‌ها با سرعت $3000 \times \text{g}$ برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس با بافر PBS (۰/۱ M و pH ۷/۰) دو بار شسته شد. پس از آن به سلول‌ها بافر تثبیت‌کننده حاوی PBS و گلو تارآلدهاید ۲/۵٪ اضافه گشت و تا پیش از ادامه کار در یخچال نگهداری شد. این نمونه‌ها سپس برای سه بار با بافر PBS برای ۱۵ دقیقه شستشو شد تا باقیمانده‌های سلولی از نمونه‌ها پاک شود و سپس به نمونه‌ها اسمیوم تتراکسید ۱٪ در بافر PBS افزوده شد و برای ۳-۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. آبگیری با الکل به ترتیب با درصدهای ۰، ۵، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰٪ برای ۲۰ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها در انتها برای مدت ۱۵ دقیقه در استون ۱۰۰٪ قرار گرفتند. این نمونه‌ها در رزین اپوکسی Epon812 برای ۴۸ ساعت در دمای 60°C گذاشته و با دستگاه اولترامیکروتوم (Leica Ultracut-R microtome) به قطعاتی با قطر ۷۰ نانومتر بریده شد. رنگ‌آمیزی این نمونه‌ها سپس با اورانیل استات ۲٪ و سرب سیترات ۲۸٪ انجام گرفت. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی با میکروسکوپ

توکسین‌ها به محیط کشت توسط کیت‌رید روند مرگ سلول‌های ریزجلبک طی کشت در محیط فیلترشده‌ی ریزجلبک‌های آلوده به قارچ مطالعه شد ولی کاهش زنده‌مانی سلولی مشاهده نشد. اما استفاده از محیط کشت فیلتر شده سبب افزایش حساسیت ریزجلبک به قارچ کیت‌رید شد (شکل ۲). لذا انتظار می‌رود ترشح توکسین‌ها یک عامل کمکی برای نفوذ بهتر کیت‌رید به درون سلول‌های ریزجلبک (شکل ۲ و) از طریق قندهای واسطه‌ی سطح سلولی باشد. شکل ۲ الف و ب تصاویر میکروسکوپی سلول‌های ریزجلبکی آلوده به قارچ را طی کشت در محیط فیلترشده‌ی سلول‌های آلوده و شکل ۲ ج و د تصویر ریزجلبک را طی کشت در محیط سالم نشان می‌دهد (در این تصاویر تنها روز دوم پس از القای قارچ کیت‌رید منتشر شده است و از ارائه سایر تصاویر خودداری گردیده است). شکل ۲ ه تصویر بزرگنمایی شده از نفوذ کیت‌رید به درون ریزجلبک را نشان می‌دهد.



شکل ۱ درصد آلودگی ریزجلبک *H. pluvialis* طی چهار روز کشت با غلظت‌های ۳، ۴ و ۶٪ قارچ کیت‌رید

الکترونی (Hitachi-7700, Hitachi Co., Germany) با ولتاژ ۱۲۰ kV عکس برداری شد.

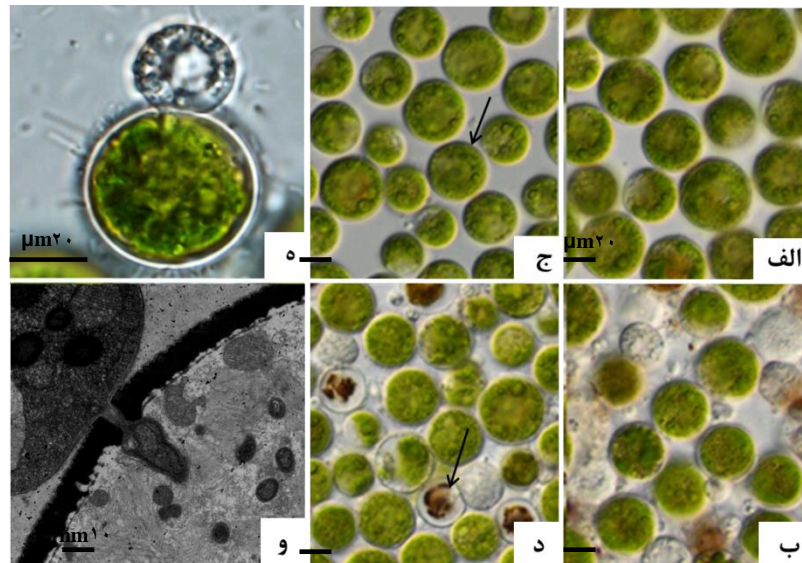
۱۱-۲. تحلیل آماری

آنالیز آماری داده‌های آزمایش با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام گرفت. برای این کار، همگی آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شد و مقدار میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون t-Test تحلیل شد. روند تغییرات غلظت آمینواسیدهای سلولی پس از تیمارهای گوناگون با نرم‌افزار Metaboanalyst برای تهیه نمودار نقشه حرارتی^۱ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

۱-۳. رشد ریزجلبک *H. pluvialis* در حضور قارچ کیت‌رید ریزجلبک *H. pluvialis* پس از هفت روز برداشت و با غلظت‌های ۳، ۴ و ۶ درصد کیت‌رید برای چهار روز کشت شد. بررسی میزان آلودگی ریزجلبک در هر سه محیط پس از چهار روز با میکروسکوپ مشاهده گشت و درصد آلودگی با رابطه‌ی (۱) برآورد شد. نمودار الف نشان از افزایش درصد آلودگی با افزایش غلظت کیت‌رید دارد ولی روند تغییرات در غلظت بالای ۶٪ به شکل سیگموئیدی است ولی در دو غلظت دیگر با شیب ملایم‌تر افزایش می‌یابد. بهمین منظور غلظت ۴٪ کیت‌رید برای مطالعه اثر دفاعی ریزجلبک به کیت‌رید گزینش شد تا امکان مطالعه پاسخ سلولی در سطح مولکولی با امکانات موجود فراهم شود. سازوکار مرگ سلول‌های ریزجلبک طی کارهای گاتمن و همکاران [۷] حاکی از اتصال کیت‌رید از طریق قندهای سطح سلولی (لکتین) و نفوذ به درون سلول گزارش شده بود. برای بررسی احتمال مرگ ریزجلبک طی ترشح

^۱ Heat map



شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ نوری و الکترونی سلول‌های ریزجلبک طی آلودگی به قارچ کیتريد. ریزجلبک کشت شده در محیط فیلتر شده سلول‌های آلوده به قارچ (الف) و پس از دو روز آلودگی به غلظت ۰.۴٪ قارچ کیتريد (ب)؛ ریزجلبک کشت شده در محیط سالم (ج) و پس از سه روز کشت با ۰.۴٪ قارچ کیتريد (د)، تصویر میکروسکوپ نوری از قارچ متصل به سطح ریزجلبک (ه)، همان تصویر با میکروسکوپ الکترونی

پراکسید هیدروژن را در محیط برون سلولی بالا ببرند. محیط آلوده با قارچ به‌طور میانگین ۰.۵۷٪ تا ۰.۷۱٪ پراکسید هیدروژن کمتری نسبت به نمونه‌ها در محیط فیلتر شده با سلول‌های آلوده دارد که این می‌تواند به دلیل خنثی‌سازی پراکسید هیدروژن توسط قارچ باشد. افزایش سطح پراکسید هیدروژن در محیط آلوده به قارچ با گذر زمان از ۱/۳ به ۱/۸ میکرومولار می‌تواند دلیلی بر تحریک ریزجلبک و تولید پراکسید هیدروژن باشد. با تکثیر قارچ در محیط، سطح پراکسید هیدروژن ترش‌حی بالا می‌رود ولی به‌خاطر فعالیت آنتی‌اکسیدانی قارچ در سطح شاهد باقی می‌ماند.

برای اطمینان از تولید پراکسید هیدروژن توسط ریزجلبک طی اعمال تنش، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در دو روز کشت سنجیده شد. فعالیت آنزیم SOD در سلول‌های شاهد بیش از دو آنزیم CAT و PO است. میانگین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز در سلول‌های شاهد 6.28×10^{-7} ، 29.75×10^{-6} U cell⁻¹ U cell⁻¹

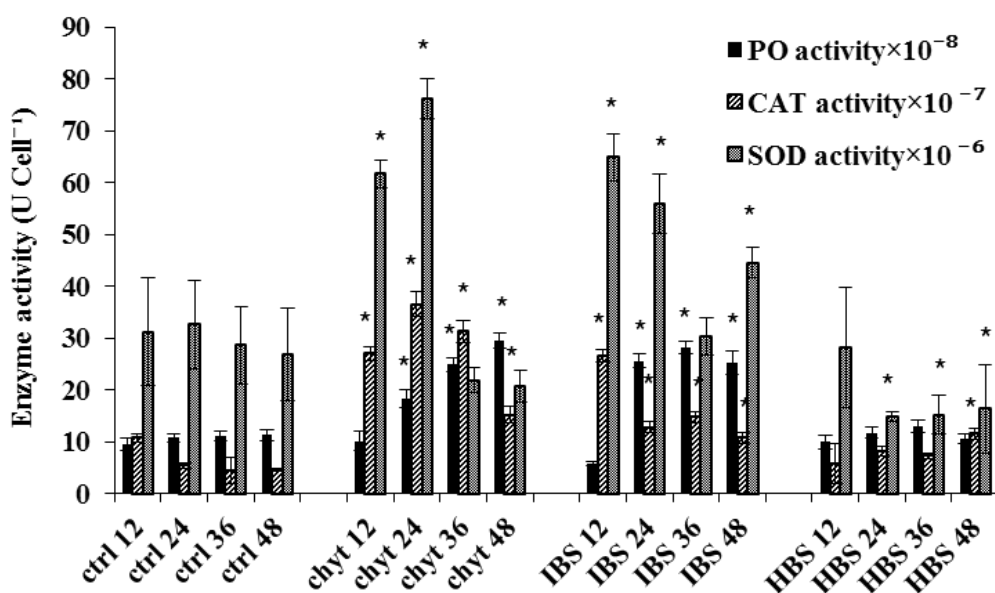
۲-۳. تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سلول سازوکار دفاع ریزجلبک طی آلودگی به قارچ کیتريد با مطالعه سطح برون‌سلولی مولکول سیگنال پراکسید هیدروژن و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بررسی شد. اعمال تنش محیطی می‌تواند بر غلظت مولکولی پراکسید هیدروژن در محیط تاثیر بگذارد. جدول ۲ غلظت پراکسید هیدروژن برون سلولی را پس از اعمال تنش‌های گوناگون طی ۴۸ ساعت نشان می‌دهد. کشت ریزجلبک در محیط فیلتر شده سلول‌های آلوده سبب ترشح پراکسید هیدروژن به محیط برون سلولی شد. این در حالی است که کشت ریزجلبک در محیط آلوده به قارچ کیتريد از سطح پایین‌تر پراکسید هیدروژن برخوردار است. پژوهش‌های کارنی و سورنسن [۴] نشان داد که استفاده از پراکسید هیدروژن در محیط کشت ریزجلبک *H. pluvialis* می‌تواند از آلودگی به کیتريد جلوگیری کند. لذا انتظار می‌رود سلول‌های ریزجلبک با شناسایی توکسین‌های تولید شده توسط قارچ میزان

آنتی‌اکسیدانی همراه است. این یافته‌ها سازگار با نتایج گزارش شده است [۱۲]. این پژوهشگران نشان دادند که گذر سلول‌های *H. pluvialis* از فاز رویشی به فاز سیست تقریباً با ۲ تا ۳ برابر کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همراه است و SOD به‌عنوان نخستین آنزیم آنتی‌اکسیدانی طی این گذر یک روند کاهشی از خود نشان می‌دهد. این کاهش به‌دلیل فعال شدن ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی همانند آستازانتین و غیره با نقش حفاظتی به مراتب بیشتر است.

و $10^{-8} \times 10/62$ است (شکل ۳). سلول‌های تیمار شده با محیط کشت ریزجلبکی سالم در ابتدا دارای فعالیت طبیعی (همانند سلول‌های شاهد) بودند ولی پس از ۲۴ ساعت فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در آنها ۴۵٪ کاهش یافت. این کاهش می‌تواند به‌دلیل کاهش غلظت مواد مغذی در محیط طی رقیق شدن با محیط کشت استفاده شده باشد. کاهش غلظت مواد مغذی سبب تسریع در گذر سلول‌ها از فاز رویشی به فاز قهوه‌ای می‌شود که این با کاهش فعالیت آنزیم‌های

جدول ۲ غلظت پراکسید برون سلولی طی ۴۸ ساعت کشت ریزجلبک در محیط‌های گوناگون

زمان تیمار (ساعت)				نمونه
۴۸	۳۶	۲۴	۱۲	
$1/53 \pm 0/13^a$	$1/57 \pm 0/06^a$	$1/41 \pm 0/2^a$	$1/26 \pm 0/2^a$	شاهد
$1/77 \pm 0/12^a$	$1/82 \pm 0/05^b$	$1/64 \pm 0/24^b$	$1/5 \pm 0/24^b$	ریزجلبک تیمار شده با ۴٪ قارچ
$4/10 \pm 0/81^b$	$4/65 \pm 0/14^c$	$4/85 \pm 0/25^c$	$4/35 \pm 0/09^c$	ریزجلبک تیمار شده با محیط فیلتر شده سلول‌های ریزجلبکی آلوده
$1/81 \pm 0/28^c$	$1/97 \pm 0/06^d$	$1/76 \pm 0/3^d$	$1/58 \pm 0/33^d$	ریزجلبک تیمار شده با محیط فیلتر شده سلول‌های ریزجلبکی سالم



شکل ۳ فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز ریزجلبک تیمار شده با ۴٪ قارچ (chyt)، ۲۵٪ محیط فیلترشده سلول‌های ریزجلبکی آلوده (IBS) و سالم (HBS) و نمونه شاهد بدون هیچ تیماری (ctrl) طی ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت کشت

توسط قارچ و سپس نفوذ به درون سلول‌های ریزجلبکی باشد و کمتر بودن فعالیت آنزیمی ممکن است به دلیل تولید بیشتر توکسین توسط قارچ نسبت به یک مقدار توکسین ثابت در محیط کشت فیلتر شده باشد.

۳-۴. تغییر در میزان آمینواسیدهای درون سلولی

با رسم نقشه گرمایی^۱ براساس تغییرات متابولیت‌ها/دسته بندی نمونه‌ها، می‌توان تغییرات نسبی متابولیت‌ها در طی تیمارها را مشخص نمود (شکل ۴). در نمودار شاخه‌ای^۲ بالای نقشه گرمایی می‌توان گروه بندی نمونه‌ها و در نمودار شاخه‌ای سمت چپ می‌توان دسته بندی متابولیت‌ها را مشاهده کرد.

روند تغییرات آمینواسیدهای درون سلولی ریزجلبک طی تیمار با قارچ کیتريد و نمونه شاهد و همچنین با محلول فیلتر شده سلول‌های آلوده و سالم در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند، بیشترین غلظت آمینواسیدی مربوط به هیستیدین و آلانین پس از تیمارهای گوناگون است و کمترین تغییرات غلظتی این دو آمینواسید در سلول‌های شاهد پس از ۱۲، ۳۶ و ۴۸ ساعت کشت و همچنین در سلول‌های تیمار شده با محیط کشت فیلتر شده پس از ۱۲ ساعت است. این افزایش غلظت هیستیدین می‌تواند به کارکرد آنتی‌اکسیدانی این آمینواسید ارتباط داشته باشد [۲۲]. کمترین غلظت آمینواسیدی مربوط به تریپتوفان و فنیل آلانین بود که می‌تواند به مصرف بالای سلولی این دو آمینواسید ارتباط یابد. از آنجایی که تریپتوفان پیش ساز هورمون اکسین است، کاهش چشمگیر آن می‌تواند به دلیل

تیمار ریزجلبک با قارچ کیتريد سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی با گذر زمان شد. آنزیم SOD به‌عنوان نخستین خط دفاعی سلول تا ۲۴ ساعت به‌شدت فعال بود و سپس با افزایش فعالیت آنزیم CAT به سطح طبیعی باز گشت. بیشترین افزایش فعالیت CAT در ۲۴ ساعت بود و فعالیت آن پس از ۳۶ ساعت با شروع فعالیت PO کاهش یافت. بیشینه فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و PO حدود $29/5 \times 10^{-8}$ و $36/5 \times 10^{-7}$ ، $76/1 \times 10^{-6}$ U cell⁻¹ به ترتیب در زمان‌های ۲۴، ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد. کاهش فعالیت این آنزیم‌ها پس از ۴۸ ساعت به دلیل مرگ سلولی طی نفوذ کیتريد و فعال شدن مسیر سنتزی ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی همانند آستازانتین است.

تیمار ریزجلبک با محیط کشت فیلتر شده سلول‌های آلوده روند مشابه با سلول‌های کشت شده با کیتريد نشان داد با این تفاوت که آنزیم‌های SOD، CAT و PO دارای بیشینه فعالیت $26/6 \times 10^{-7}$ ، $64/8 \times 10^{-6}$ و $28/2 \times 10^{-8}$ U cell⁻¹ ترتیب در زمان‌های ۱۲، ۱۲ و ۳۶ ساعت بودند. فعال شدن سریع تر سیستم دفاعی ریزجلبک طی تیمار با محیط کشت فیلتر شده می‌تواند به حضور توکسین‌ها در محیط باشد. این ترکیب‌های شیمیایی به سرعت توسط سلول‌های ریزجلبکی تشخیص و فعالیت آنزیم‌ها را تحریک می‌کند ولی کشت ریزجلبک با قارچ پس از یک تاخیر ۱۲ ساعته به بیشینه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خود رسید. همچنین میزان فعالیت این آنزیم‌ها طی تیمار با قارچ حدود ۱۷، ۳۵ و ۵٪ بیشتر از میزان فعالیت این آنزیم‌ها طی تیمار با محیط کشت فیلتر شده بود. این تاخیر در پاسخ دفاعی سلول می‌تواند به دلیل زمان لازم برای تولید توکسین

¹ Heatmap

² Cluster

با بالا رفتن شدت تنش و افزایش تنفس سلولی برای ثابت نگهداشتن نسبت کربن و نیتروژن در چرخه کربس مصرف می‌شود. این دو مسیر متفاوت کاتابولیسمی و آنابولیسمی می‌تواند دلیلی بر میزان غلظت این دسته از آمینو اسیدها در سطح متوسط باشد [۲۴]. بالاترین میزان تغییرات در مورد تیمارهای به کار گرفته شده مربوط به دو آمینو اسید سرین و تایروزین است.

بحث

آلودگی سلول‌های ریزجلبک *H. pluvialis* به قارچ کیتريد سبب مرگ سریع و واپاشی کامل سلول‌ها پس از چهار روز می‌شود. بر هم کنش هماتوکوکوس و کیتريد منجر به ایجاد پاسخ‌های سلولی از هماتوکوکوس می‌شود تا بتواند در مقابل کیتريد از خود محافظت کرده و از نفوذ کیتريد جلوگیری کند. نخستین فرضیه‌ای که برای شناسایی کیتريد و هماتوکوکوس بیان شده بود، شناسایی قندهای آمینی سطح هماتوکوکوس توسط پروتئین‌های لکتین سطح کیتريد بود. به نظر می‌رسد که قارچ کیتريد ابتدا با ترشح توکسین‌ها به محیط برون سلولی و سپس با اتصال به سطح سلول و نفوذ به درون آن منجر به مرگ و واپاشی سلول‌های ریزجلبکی می‌شود. سیگنال‌های تولیدی در اثر حمله کیتريد منجر به افزایش سطح پراکسید سلولی در هماتوکوکوس می‌شود تا با آزاد کردن آن به محیط بیرون، سلول کیتريد را از بین ببرد. اما افزایش سطح پراکسید برای سلول در سطح داخل سلول نیز بازخوردهایی در پی دارد. سلول‌های ریزجلبک نیز برای حفظ تمامیت خود بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز، پراکسیداز و کاتالاز سلولی می‌افزاید. این

سنتز هورمون اکسین باشد. اکسین در سلول‌های آلوده با پیش بردن آنزیم‌های تغییر دهنده دیواره منجر به شل شدن دیواره سلولی و افزایش حساسیت سلولی می‌شود [۱۳]. افزایش غلظت آمینواسیدهای متیونین، گلیسین و ترئونین ممکن است در ارتباط با خاصیت الکترون‌دهندگی و پذیرندگی این دو آمینواسید در شرایط خنثی از لحاظ pH باشد. لازم به ذکر است که بالاتر بودن سطح متیونین در نمونه‌های آلوده به قارچ پس از ۳۶ و ۴۸ ساعت می‌تواند به دلیل نقش این آمینواسید در القای بیان ژن‌های دفاعی سلول همانند ژن‌های کدکننده‌ی کتیناز و گلوکاتیون s- ترانسفراز در مقابل حمله‌ی پارازیت‌های قارچی باشد [۳]. سازگار با گزارش شکل ۳ مربوط به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های آلوده به قارچ، بیشترین مقدار این سه آمینواسید در نمونه‌های آلوده با قارچ کیتريد پس از ۲۴ و ۳۶ ساعت مشاهده شد که این می‌تواند به غلظت بالای پراکسید در محیط ارتباط داشته باشد. افزایش غلظت آلانین به کارکرد این آمینواسید در خنثی‌سازی تنش از طریق حفظ درهم تنیدگی پروتئین‌ها می‌تواند مرتبط باشد [۱]. آمینواسید گاما-آمینوبوتریک اسید^۱ دارای دو کارکرد حفظ تمامیت سلول از طریق فراهم کردن پیش ماده‌های چرخه کربس و نیز فراهم کردن پیش‌ساز تولید آمینواسیدهای ضروری گلوتامات، گلیسین و آلانین است [۲۱]. کاهش نسبی گابا می‌تواند به این دو کارکرد در مقابله با تنش‌های محیطی برای حفاظت از سلول مرتبط باشد. آمینواسیدهای آسپاراژین، آسپارتیک اسید، گلوتامین و سرین از یک سو به دلیل خاصیت ردوکسی و نقش ویژه در خنثی‌سازی پراکسیدها در محیط افزایش می‌یابند و از سوی دیگر

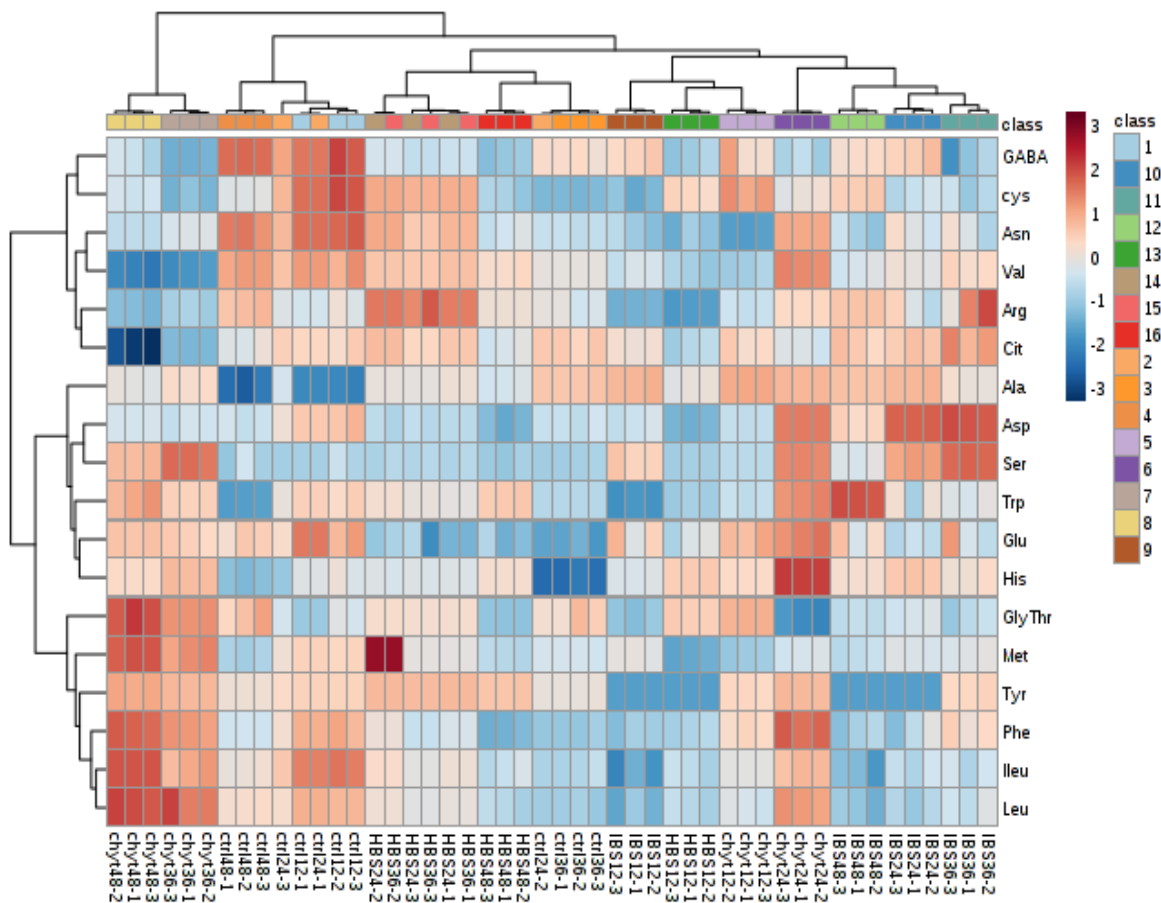
^۱ GABA

روند آلوده‌سازی و خشتی‌کردن پاسخ دفاعی ریزجلبک *h. pluvialis* و استفاده از آن به عنوان منبع غذایی برای رشد و ادامه حیات خود باشد.

تشکر و قدردانی

از راهنمایی سرکار خانم دکتر دانشیان هان و موسسه هیدروبیولوژی آکادمی علوم چین نهایت تشکر و قدردانی را داریم. همچنین از حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس در اجرای این پروژه سپاسگزاریم.

افزایش پراکسید هیدروژن با افزایش فعالیت مسیرهای سوخت و سازی آمینواسیدهایی همانند هیستیدین، متیونین و آلانین همراه است که به ترتیب نقش مقابله با تنش پراکسید، الفاکننده‌ی بیان ژن‌های دفاعی همانند کیتیناز و حفظ فعالیت پروتئین‌های کاتالیتیک در مقابل تنش اکسیداتیو را دارند. این در حالی است که بیوستز سرین و ذخیره آن منبعی را برای تولید اسیدآمینه تربیتوفان ایجاد می‌کند که پیش ساز هورمون اکسین است و باعث شل شدن دیواره سلولی و افزایش حساسیت سلول ریز جلبک نسبت به کیتريد می شود. و این نتیجه احتمالا می تواند عامل موفقیت کیتريد در



شکل ۴ روند تغییرات آمینواسیدهای درون سلولی *H. pluvialis* طی تیمار با ۴٪ قارچ (chyt)، ۲۵٪ محیط فیلترشده‌ی سلول‌های ریزجلبکی آلوده (IBS) و سالم (HBS) و نمونه شاهد بدون هیچ تیمار (ctrl) طی ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت کشت

- of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) to photooxidative stress. *Journal of Phycology*, 48: 693-705.
- [11]. Hoffman, Y.A.C., Zarka, A., Gutman, J., James, T. Y., Boussiba, S. 2008, Isolation and characterization of a novel chytrid species (phylum blastocladiomycota), parasitic on the green alga *Haematococcus*. *Mycology Research*, 112: 70-81.
- [12]. Jianguo, L., Xiaoli, Z., Yanhong, S., Wei, L. 2010, Antioxidative capacity and enzyme activity in *Haematococcus pluvialis* cells exposed to superoxide free radicals. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 28(1): 1-9.
- [13]. Kazan, K., Manners, J. M. 2009, Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Cell press*, 14(7): 373-382.
- [14]. Kim, D.-Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J.-I., Lee, K., Park, J.-Y., Chang, W.-S., Lee, J.-S., Oh, Y.-K. 2016, Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresource Technology*, 199: 300-310.
- [15]. Kumar, K., Mishra, S. K., Shrivastav, A., Park, M. S., Yang, J.-W. 2015, Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51: 875-885
- [16]. Olive, A.J., Sassetti, C. M. 2016, Metabolic crosstalk between host and pathogen: Sensing, adapting and competing. *Nature Reviews: Microbiology*, 14: 221-234.
- [17]. Panis, G., Carreon, J. R. 2016, Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*, 18: 175-190.
- [18]. Sadeghnezhad, E., Sharifi, M., Zare-Maivan, H. 2016, Profiling of acidic (amino and phenolic acids) and phenylpropanoids production in response to methyl jasmonate-induced oxidative stress in *Scrophularia striata* suspension cells. *Planta*, 244 (1): 75-82.
- [19]. Sahebamei, H., Abdolmaleki, P., Ghanati, F. 2007, Effects of magnetic field on the antioxidant enzymes activities of
- منابع
- [1]. Arakawa, T., Timasheff, S. N. 1985, The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal*, 47(3): 411-414.
- [2]. Biermann, M., Bardl, B., Volstadt, S., Linnemann, J., Knupfer, U., Seidel, G., Horn, U. 2013, Simultaneous analysis of the non-canonical amino acids norleucin and norvaline in biopharmaceutical-related fermentation processes by a new ultra-high performance liquid chromatography approach. *Amino Acids*, 44(4): 1225-1231.
- [3]. Boubakri, H., Wahab, M. A., Chong, J., Gertz, C., Gandoura, S., Mliki, A., Bertsch, C., Soustre-Gacougnolle, I. 2013, Methionine elicits H₂O₂ generation and defense gene expression in grapevine and reduces *Plasmopara viticola* infection. *Journal of Plant Physiology*, 170: 1561-1568.
- [4]. Carney, L.T., Sorensen, K. 2015, Methods for treating a culture of *Haematococcus pluvialis* for contamination using hydrogen peroxide, U.P. Office, Editor, Heliae Development LLC: USA.
- [5]. Fassett, R.G., Coombes, J. S. 2009, Astaxanthin, oxidative stress, inflammation, and cardiovascular disease. *Future Cardiology*, 5: 333-342.
- [6]. Guerin, M., Huntley, M. E., Olaizola, M. 2003, *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5): 210-216.
- [7]. Gutman, J., Zarka, A., Boussiba, S. 2011, Evidence for the involvement of surface carbohydrates in the recognition of *Haematococcus pluvialis* by the parasitic blastoclad *Paraphysoderma sedebokerensis*. *Fungal Biology*, 115(8): 803-811.
- [8]. Gutman, J., Zarka, A., Boussiba, S. 2009, The host-range of *Paraphysoderma sedebokerensis*, a chytrid that infects *Haematococcus pluvialis*. *European Journal of Phycology*, 44(4): 509-514.
- [9]. Han, D., Li, Y., Hu, Q. 2013, Astaxanthin in microalgae: Pathways, functions, and biotechnological implications. *Algae*, 28(2): 131-147.
- [10]. Han, D., Wang, J., Sammerfeld, M., Hu, Q. 2012, Susceptibility and protective mechanism of motile and non motile cells

- suspension cultured tobacco cells. *Bioelectromagnetics*, 28(1): 42-47.
- [20]. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. 2012, Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defence mechanism in plant under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012: 1-27.
- [21]. Takayama, M., Ezura, H. 2015, How and why does tomato accumulate a large amount of GABA in the fruit? *Frontiers in Plant Science*, 6: 1-7
- [22]. Udenigwe, C.C., Aluko, R. E. 2011, Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 3148-316
- [23]. Xi, T., Kim, D. G., Roh, S. W., Choi, J.-S., Choi, Y.-E. 2016, Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 6231-6238.
- [24]. Zeier, J. 2013, New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant, Cell, and Environment*, 36: 2085-2103.

Study of defense mechanism of microalgae *Haematococcus pluvialis* infected by *Paraphysoderma sedebokerensis*

Nahidian B.¹, Ghanati F.^{1*}, Shahbazi M.², Soltani N.³, Gholami M.⁴

¹ Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

³ Department of Petroleum Microbiology, Research Institute of Applied Science, ACECR, Tehran, Iran.

⁴ Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Golestan University, Golestan, Iran.

* Email: ghangia@modares.ac.ir

Received: 07 07 January 2018

Accepted: 22 February 2018

Abstract

In the present study, the first early physiological responses of the green micro algae *Haematococcus pluvialis* during infection by chytrid *Paraphysoderma sedebokerensis* was studied. To this end, the palmeloid form of *Haematococcus pluvialis* was cultivated for two days in three media including the medium infected with chytrid (chyt) and the culture of chytrid infected (IBS) and uncontaminated (HBS) cells. Then, the activity of antioxidant enzymes, extracellular peroxide, and free intracellular enzymes were determined by UV/Vis spectrophotometry and HPLC techniques. The activity of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in the chytrid infected cells after 24, 24, and 48 h was 2.3, 6.7, and 2.6 times higher those of control. These values for the cells cultivated with the infected media after 12, 12, and 36 h was found to be 2.1, 2.5, and 2.6 times higher than control. The extracellular peroxide content in the algae cultivated with the contaminated media was nearly constant and about 4 fold of the other specimens; while those of chytrid infected cells was slightly increased from 1.3 to 1.8 μM during 48 h cultivation. Amino acids histidine, alanine, asparagine, aspartic acid, arginine, and methionine were of the highest and the phenylalanine and tryptophan were of the lowest content. These results can be attributed to the cells defense response to chytrid infection through enhancement of peroxide content and activation of antioxidative pathways.

Keywords: Antioxidant activity, Chytrid, Free intracellular amino acids, *Haematococcus pluvialis*, hydrogen peroxide