Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
PSI
Phycological Society of Iran

Effect of different concentrations of gibberellic acid on physiological traits of *Dunaliella salina* microalgae in Guillard (f/2) medium

Mojtaba Ghasemi[1], Salehe Ganjali[2*], Leila Fahmideh[3*], Mojtaba Keykhasaber[4], Mohammad Modarresi[5]

[1]Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran, Email: mghasemi22@uoz.ac.ir,
[2]Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran, Email: saleheganjali@uoz.ac.ir
[3]Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran; Zabol University, Zabol, Iran, Email: l.fahmideh@gau.ac.ir
[4]Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran, Email: mkeikhasaber@uoz.ac.ir
[5] Department of Plant Genetics and Production Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran, Email: modarresi@pgu.ac.ir

Article type:
Research Full Paper

Article history
Received: 23.06.2021
Revised: 15.08.2021
Accepted: 19.08.2021
Published:24.06.2023

Keywords
Carotenoids
Chlorophyll
Dunaliella salina
Gibberellic acid
Growth
Lipid

Abstract

Dunaliella salina is a carotenoid-producing microalgae that is important for its extraordinary ability to accumulate ß-carotene. Therefore, an experiment was performed to investigate the effect of different concentrations of gibberellic acid on growth, accumulation of chlorophyll pigments, carotenoid content, and dry biomass of *D. salina* in f/2 medium. Experimental treatments included different concentrations of gibberellic acid (GA_3): 0 (control), 0.5, 5, 10, and 20 mg/L. The measured traits in this experiment included growth rate and doubling time, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, total carotenoids, dry biomass, total lipid content, and endogenous gibberellic acid. Analysis of variance showed that the effects of different concentrations of gibberellic acid on all studied traits of *D. salina* were significant ($P\leq 0.05$). Gibberellic acid (10 mg/l) increased growth rate, chlorophyll a and b contents, total chlorophyll content, dry biomass, and total lipid content in the studied microalgae while the highest level of total carotenoid accumulation was recorded with 5 mg/L GA_3 treatment. According to the findings, it is suggested that GA_3 5 mg/L can be effective when the purpose of microalgae cultivation is to produce carotenoids, but if the aim of production is dry biomass and total lipid contents, application of 10 mg/L GA_3 is recommended to stimulate and increase the production of microalgae total lipid and dry biomass.

Cite this article as: Ghasemi, M., Ganjali, S., Fahmideh, L., Keykhasaber, M., Modarresi, M. (2023). Effect of different concentrations of gibberellic acid on physiological traits of *Dunaliella salina* microalgae in Guillard (f/2) medium. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 70(2): 17-39.

©The author(s)
Doi: 10.30495/iper.2022.690247
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch
Dor: 20.1001.1.24237671.1402.18.70.3.3

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

تأثیر غلظت‌های مختلف جیبرلیک‌اسید بر خصوصیات فیزیولوژیک ریزجلبک *Dunaliella salina* در محیط کشت گیلارد

مجتبی قاسمی[۱]، صالحه گنجعلی[۲*]، لیلا فهمیده[۳*]، مجتبی کیخاصابر[٤]، محمد مدرسی[٥]

[۱] گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، رایانامه: mghasemi22@uoz.ac.ir
[۲] گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، رایانامه: saleheganjali@uoz.ac.ir
[۳] گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران؛ دانشگاه زابل، زابل، ایران، رایانامه: l.fahmideh@gau.ac.ir
[٤] گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، رایانامه: mkeikhasaber@uoz.ac.ir
[٥] گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران، رایانامه: modarresi@pgu.ac.ir

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۰٤/۰۲
تاریخ بازنگری: ۱٤۰۰/۰۵/۲٤
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۰۵/۲۸
تاریخ چاپ: ۱٤۰۲/۰٤/۰۳

واژه‌های کلیدی:
دونالیلا سالینا
جیبرلیک اسید
رشد
کاروتنوئید
کلروفیل
لیپید

چکیده

دونالیلا سالینا (*Dunaliella salina*)، یک ریزجلبک تولید کننده کاروتنوئید است که به دلیل توانایی فوق العاده آن در تجمع بتاکاروتن از اهمیت زیادی برخوردار است. از این رو آزمایشی به منظور بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلیک‌اسید بر افزایش میزان رشد، تجمع رنگدانه‌های کلروفیل، محتوای کاروتنوئید، زیست‌توده خشک، لیپید کل و جیبرلیک‌اسید درونی گونه ریزجلبک *D. Salina* در محیط کشت گیلارد انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل غلظت‌های مختلف جیبرلیک‌اسید (GA_3) با سطوح صفر (شاهد)، ۰/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. صفات مورد اندازه‌گیری در این آزمایش شامل نرخ رشد و زمان دو برابر شدن، میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید کل، زیست‌توده خشک، لیپید کل و جیبرلیک‌اسید درونی بود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلیک‌اسید بر تمام صفات مورد مطالعه درریزجلبک *D. Salina* در سطح آماری پنج درصد معنی‌دار شد. جیبرلیک‌اسید با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش نرخ رشد، محتوای کلروفیل a و b، میزان کلروفیل کل، زیست‌توده خشک و لیپید کل در ریزجلبک مورد مطالعه شد. در حالی که بیش‌ترین میزان تجمع کاروتنوئید کل مربوط به تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید بود. با توجه به یافته‌های این پژوهش پیشنهاد می‌گردد که اگر هدف از کشت این گونه ریزجلبک تولید کاروتنوئید باشد، غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید می‌تواند کارایی موثری داشته باشد ولی در صورتی که هدف تولید زیست‌توده خشک و لیپید کل باشد، استفاده از غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید باعث تحریک و افزایش تولید زیست‌توده خشک و لیپید کل ریزجلبک *D. Salina* خواهد شد.

استناد: قاسمی، مجتبی؛ گنجعلی، صالحه؛ فهمیده، لیلا؛ کیخاصابر، مجتبی؛ مدرسی، محمد. (۱٤۰۲). تأثیر غلظت‌های مختلف جیبرلیک اسید بر خصوصیات فیزیولوژیک ریزجلبک *Dunaliella salina* در محیط کشت گیلارد. *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ۷۰ (۲)، ۳۹-۱۷.

Doi: 10.30495/iper.2022.690247
Dor: 20.1001.1.24237671.1402.18.70.3.3

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

اکثر ریزجلبک‌ها موجودات اتوتروفی هستند که قادر به استفاده از انرژی نوری و مواد غذایی معدنی به منظور تولید بیوماس و سنتز ترکیبات ثانویه ارزشمند هستند. ریزجلبک‌ها تحت شرایط تنش غیرزنده متابولیت‌های ثانویه با ارزشی از قبیل لیپیدها، رنگدانه‌ها و ویتامین‌ها را تولید و در سلول های خود انباشته می‌کنند (Ravishankar et al., 2019). ریزجلبک‌ها کاربردهای تجاری بسیاری از جمله تولید سوخت‌های زیستی، استفاده در تغذیه انسان و حیوانات، به عنوان داروها و ترکیبات درمانی، در محصولات مرتبط با زیبایی و همچنین به عنوان کودهای زیستی در بخش کشاورزی دارند (Stirk and Van Staden, 2020).

ریزجلبک *Dunaliella salina* ریزجلبک سبز تک سلولی نمک دوست متعلق به رده Chlorophyceae و خانواده Dunaliellaceae است که در محیط دریاچه‌های نمک و آب شور یافت می‌شود و می‌تواند مقادیر زیادی بتا-کاروتن (تا ۱۰٪ از وزن خشک سلول) را در گلبول‌های چربی واقع در کلروپلاست تولید کند و برخی سویه‌ها بیش از ۱٤٪ از وزن خشک خود را بتاکاروتن ذخیره می‌کنند (Smith et al., 2010; Beheshtifar and Shariati, 2015). این ریزجلبک برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود شناخته می‌شود که به‌خاطر توانایی این گونه در تولید حجم زیادی از کاروتنوئیداست (Sun et al., 2018). ریزجلبک سبز فتوسنتزی *D. salina* می‌تواند انواع لیپیدها، ویتامین‌ها، گلیسرول و مقدار زیادی رنگدانه در شرایط تنش غیرزنده تولید کند، و در حال حاضر یکی از اصلی‌ترین منابع تجاری بتاکاروتن طبیعی است (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009). این گونه ریزجلبک به‌طور گسترده‌ای در استخرهای باز یا راکتورهای زیستی بسته به طور عمده درکشورهای استرالیا، فلسطین اشغالی، چین و اسپانیا کشت شده است. کشت فوتوتروفیک *D. salina* به‌طورکلی به یک مرحله تولید زیست‌توده و یک مرحله القای یا تجمع رنگدانه تقسیم می‌شود. عملکرد زیست‌توده خشک *D. salina* حدود یک گرم در لیتر است (Lv et al., 2019). بیشترین اهمیت *D. salina* به دلیل توانایی آن در انباشت مقادیر بالای بتاکاروتن است (Ravishankar, Ambati, and Paniagua-Michel, 2019). ریزجلبک *D. salina* می‌تواند با قرار گرفتن تحت شرایط تغذیه‌ای و محیطی مختلف بتاکاروتن بیشتری تولید کند (Pourkarimi et al., 2020).

هورمون‌های گیاهی نقش مهم تنظیمی در گیاهان عالی چند سلولی دارند. اگرچه ویژگی‌های خاص متابولیسم هورمون در گروه‌های مختلف جلبک تا حد زیادی ناشناخته مانده است (Kiseleva, Tarachovskaya, and Shishova 2012). جیبرلین‌ها گروهی از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بوده که برای رشد و نمو طبیعی ضروری هستند و در پاسخ گیاهان به تنش نقش بازی می‌کنند. جیبرلیک‌اسید (GA) یک هورمون گیاهی دی‌ترپن است که می تواند پاسخ های مختلف فیزیولوژیکی گیاهان عالی و ریزجلبک‌ها را تنظیم کند (Yamaguchi, 2008). یکی از فعال‌ترین فرم‌های جیبرلیک‌اسید، GA_3 است که می‌تواند به صورت صنعتی از تخمیر قارچ (به طور عمده *Gibberella fujikuroi*) تولید شود (K. Du et al., 2017). جیبرلیک‌اسید دارای چندین کاربرد تجاری مختلف در صنایع کشاورزی مبتنی بر گیاه برای تحریک سرعت رشد، جلوگیری از تجزیه کلروفیل، افزایش اندازه میوه و کاهش سطح اکسیژن فعال است (Sponsel and Hedden, 2010). چندین مطالعه نشان داده است که GA_3 می‌تواند بر رشد و متابولیسم ریزجلبک‌ها با افزایش جذب و استفاده از عناصر

غذایی از محیط رشد تأثیر بگذارد (Sponsel and Hedden, 2010; Falkowska et al., 2011 Pan et al., 2008;). به‌عنوان مثال، کاروتنوئیدها و مونوساکاریدها در ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* (Park et al., 2013)، محتوای لیپید در *Chlorella pyrenoidosa* (K. Du et al., 2017)، لیپیدهای غیراشباع در *Aurantiochytrium* sp. (Yu et al., 2016)، کلروفیل a، فیکوسیانین و پروتئین موجود در *Microcystis aeruginosa* (Pan et al., 2008) با اضافه شدن غلظت مناسب GA_3 به محیط کشت، افزایش پیدا کردند (Madani et al., 2021). Du و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی (شامل ABA، EBR، ETH و GA_3) می‌توانند تولید آستازانتین و کاروتنوئیدها را در *Haematococcus pluvialis* به‌طور قابل توجهی افزایش دهند و بیان mRNA هشت ژن کاروتنوژنیک با پروفایل‌های بیان مختلف را تحریک کنند (Du et al., 2017).

استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در ریزجلبک فرصت‌های جدیدی را در زمینه توسعه لیپیدهای ریزجلبک برای تولید سوخت زیستی و نیز تولید کاروتنوئید به‌عنوان مکمل غذایی ارائه می‌دهد و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و آنالوگ‌های آن‌ها اثرات تحریک‌کننده بر رشد و تولید متابولیت‌های (کاروتنوئید، لیپید و...) ریزجلبک دارند. اگرچه تعدادی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در ریزجلبک‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است، اما تاکنون تاثیر غلظت‌های مختلف جیبرلیک‌اسید در محیط کشت گیلارد بر برخی خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی در گونه *D. salina* مطالعه نشده است. لذا پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تیمارهای جیبرلیک‌اسید بر میزان تغییرات رشد، زیست‌توده خشک، تجمع برخی رنگدانه‌های فتوسنتزی، محتوای کاروتنوئید کل، جیبرلیک‌اسید درونی و لیپید کل ریزجلبک *D. salina* در محیط کشت گیلارد (f/2) انجام شد.

مواد و روش‌ها

گونه و شرایط کشت: ریزجلبک دونالیلا سالینا (*Dunaliella salina* SAG184.80) از کلکسیون کشت و پروش جلبک دانشگاه گوتینگن آلمان[1] (SAG) خریداری و تهیه گردید. برای کشت ریزجلبک، از محیط کشت گیلارد (f/2) تغییر یافته با شوری ۲۵ دسی‌زیمنس بر متر (ds^{-1}) و از آب دریا به عنوان آب پایه در این آزمایش استفاده شد. بدین منظور آب دریای خلیج فارس از ساحل محدوده پارک دانشجو شهر بوشهر و به فاصله یک کیلومتری از ساحل و از عمق حدود یک متری به وسیله سیستم پمپاژ به گلخانه کشت و پرورش جلبک و آرتمیای پژوهشکده خلیج فارس در دانشگاه خلیج فارس بوشهر منتقل و پس از طی نمودن مراحل فیلتراسیون در گالن ۲۰ لیتری تهیه و به آزمایشگاه مرکز توسعه فناوری ریزجلبک خلیج فارس وابسته به پارک علم و فناوری خلیج فارس بوشهر انتقال داده شد. ترکیب محیط کشت گیلارد (f/2) تغییر یافته مورد استفاده در این آزمایش بر طبق پروتکل تهیه محیط کشت f/2 (Guillard, 1975) آماده‌سازی گردید که جزئیات آن در جدول ۱ آورده شده است. محلول‌های ویتامین‌ها، عناصر ریزمغذی کم‌مصرف، نیترات سدیم و مونو سدیم فسفات محیط کشت گیلارد (f/2) در چهار ظرف جداگانه تهیه شده و سپس یک میلی‌لیتر از هر محلول در یک لیتر آب دریا حل گردید.

[1]The Culture Collection of Algae at Goettingen University

جدول ۱: ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت گیلارد (f/2) مورد استفاده در این آزمایش

ترکیبات	محلول استوک اولیه	مقدار	غلظت مولار در محیط کشت نهایی
نیترات سدیم ($NaNO_3$)	۷۵ گرم بر لیتر	۱ میلی‌لیتر	$۸/۸۲\times ۱۰^{-۴}$ مولار
مونو سدیم فسفات (NaH_2PO_4)	۵ گرم بر لیتر	۱ میلی‌لیتر	$۳/۶۲\times ۱۰^{-۵}$ مولار
محلول عناصر ریزمغذی کم‌مصرف f/2			
کلرید آهن ($FeCl_3.6H_2O$)	–	۳/۱۵ گرم	$۱/۱۷\times ۱۰^{-۵}$ مولار
دی‌سدیم اتیلن‌دی‌آمین‌تراستات‌دی‌هیدرات ($Na_2EDTA.2H_2O$)	–	٤/۳٦ گرم	$۱/۱۷\times ۱۰^{-۵}$ مولار
سولفات مس ($CuSO_4.5H2O$)	۹/۸ گرم بر لیتر	۱ میلی‌لیتر	$۳/۹۳\times ۱۰^{-۸}$ مولار
مولیبدات سدیم ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	٦/۳ گرم بر لیتر	۱ میلی‌لیتر	$۲/٦۰\times ۱۰^{-۸}$ مولار
سولفات روی ($ZnSO_4.2H_2O$)	۲۲ گرم بر لیتر	۱ میلی‌لیتر	$۷/٦۵\times ۱۰^{-۸}$ مولار
کلرید کبالت ($CoCl_2.6H_2O$)	۱۰ گرم بر لیتر	۱ میلی‌لیتر	$٤/۲۰\times ۱۰^{-۸}$ مولار
کلرید منگنز ($MnCl_2.4H_2O$)	۱۸۰ گرم بر لیتر	۱ میلی‌لیتر	$۹/۱۰\times ۱۰^{-۷}$ مولار
محلول ویتامین f/2			
تیامین (B1)	–	۲۰۰ میلی‌گرم	$۲/۹٦\times ۱۰^{-۷}$ مولار
بیوتین (B7)	یک گرم بر لیتر	۱ میلی‌لیتر	$۲/۰۵\times ۱۰^{-۹}$ مولار
سیانوکوبالامین (B12)	یک گرم بر لیتر	۱ میلی‌لیتر	$۳/٦۹\times ۱۰^{-۱۰}$ مولار

طرز تهیه محیط کشت و تلقیح ریزجلبک: به منظور تهیه محیط کشت گیلارد (f/2) از مواد شیمیایی ساخت شرکت مِرک (MERCK) آلمان و سامچون (SAMCHUN) کره جنوبی استفاده گردید. سپس آب دریای خلیج فارس با درجه شوری ۳۵ دسی‌زیمنس بر متر در یک ارلن‌مایر شیشه‌ای ۱۰۰۰ میلی‌لیتری با آب مقطر به صورت حجمی مخلوط و رقیق‌سازی شد و با استفاده از دستگاه شوری‌سنج پرتابل چشمی (ATAGO، ساخت ژاپن) درجه شوری محیط کشت روی عدد ۲۵ دسی‌زیمنس بر متر تنظیم گردید.

در مرحله بعد، به ظرف ارلن‌مایر شیشه‌ای حاوی ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب با درجه شوری ۲۵ دسی‌زیمنس بر متر، مقدار یک میلی‌لیتر ویتامین، یک میلی‌لیتر عناصر ریزمغذی کمیاب، یک میلی‌لیتر نیترات سدیم و یک میلی‌لیتر مونوسدیم فسفات طبق پروتکل تهیه محیط کشت f/2 اضافه گردید. سپس میزان pH محیط کشت قبل از اتوکلاو و استریل کردن ۷/۳ اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد مقدار ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت درون هر یک از ظروف ارلن‌مایر شیشه‌ای با حجم ۵۰۰ میلی لیتر ریخته و سپس دهانه هر ظرف ارلن مایر با پنبه کتانی و فویل آلومینیومی به‌طور کامل پوشانده شد. ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت توسط دستگاه اتوکلاو استریل شدند.

برای تلقیح ریزجلبک، مقدار ۳۰ میلی لیتر از ذخیره ریزجلبک با تراکم نوری آغازین ۰/٤۲ (nm λ=۷۵۰) به وسیله پیپت شیشه‌ای استریل در زیر هود لامینار ایرفلو کلاس ۲ (مدل KG-A100، کیمیاژن پژوه پارس، ایران) به هر ظرف حاوی محیط کشت تزریق شد (نسبت محیط کشت ۳۰۰: ریزجلبک ۳۰ (حجمی/حجمی)). در نهایت حجم محیط کشت حاوی ریزجلبک با حجم ۳۳۰ میلی‌لیتر تنظیم گردید. سپس ظروف حاوی محیط کشت تلقیح شده با ریزجلبک، در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد زیر نور لامپ فلورسنت سفید با شدت نوری ٤۵۰۰ لوکس (تولید شده توسط ٦ عدد لامپ فلورسنت سفید اف.پی.ال ۳٦ وات U شکل (FPL36W-6400K-

DL)) تحت چرخه ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در ارلن مایرهای ۵۰۰ میلی‌لیتری قرار داده و کشت برای یک دوره ۲۸ روزه تحت شرایط کنترل شده آزمایشگاهی انجام شد (Salmaninejad, 2015; Zarandi miandoab et al. 2015;). لازم به ذکر است که نمونه‌ی تهیه شده از کلکسیون کشت و پرورش جلبک دانشگاه گوتینگن آلمان قبل از انجام کشت اصلی آزمایش حاضر طی دو دوره کشت در شرایط مذکور سازگار و مشخصه‌یابی[1] شدند. همچنین شایان ذکر است که کشت ریزجلبک در این آزمایش به دلیل جلوگیری از آلودگی قارچی بدون هوادهی و عمل تزریق دی‌اکسیدکربن انجام شد. به‌منظور طبیعی بودن شرایط انجام آزمایش، ارلن مایرهای حاوی محیط کشت روزانه دو بار به‌مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه در زمان معین (ساعت ۱۰ صبح) به‌صورت دستی تکان داده شدند (H. Du et al., 2017; Lin et al., 2018). در طی دوره کشت ریزجلبک‌ها هیچ گونه مواد مغذی مکمل و آب به محیط کشت‌ها اضافه نشد.

تیمارهای هورمونی: تیمارهای آزمایش شامل هورمون جیبرلیک‌اسید (GA_3) با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار در سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه مرکز توسعه فناوری ریزجلبک خلیج فارس وابسته به پارک علم و فناوری خلیج فارس بوشهر انجام شد. هورمون جیبرلیک‌اسید مورد استفاده در این آزمایش به راحتی و بدون نیاز به همزن مغناطیسی در آب دوبار مقطر حل شد. به منظور تهیه استوک هورمون جیبرلیک‌اسید، ابتدا مقدار ۳۰ میلی‌گرم از هورمون جیبرلیک اسید (ساخت شرکت آکروس اُرگانیکز[2]، آمریکا) به وسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ توزین و سپس هورمون جیبرلیک‌اسید در۳۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل گردید و استوک هورمون تهیه شده تا زمان اعمال تیمار بر روی ریزجلبک در یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس از استوک هورمون آماده شده مقدار ۱۵۰ میکرولیتر برای تیمار ۰/۵میلی‌گرم جیبرلیک‌اسید، ۱۵۰۰ میکرولیتر برای تیمار ۵ میلی‌گرم جیبرلیک‌اسید، ۳۰۰۰ میکرولیتر برای تیمار ۱۰ میلی‌گرم جیبرلیک‌اسید و ٦۰۰۰ میکرولیتر برای تیمار ۲۰ میلی‌گرم جیبرلیک‌اسید به ارلن‌های حاوی محیط کشت در فاز رشد نمایی اضافه و هر ارلن به‌طور یکنواخت همزده شد.

شرایط و نحوه اعمال تیمارهای هورمونی: تزریق تیمارهای هورمون جیبرلیک‌اسید به‌وسیله میکروپیپت در مرحله فاز رشد نمایی ریزجلبک در دوره ۸ ساعت تاریکی به محیط کشت انجام شد. زیست‌توده ریزجلبک نمونه‌های شاهد و تحت تیمار پس از پایان دوره کشت چهار هفته‌ای (۲۸روزه) جمع‌آوری و سپس به وسیله سانتریفیوژ (مدل K241R، Centurion Scientific، انگلستان) با سرعت ٦۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد برداشت شدند. محیط کشت اضافی دور ریخته شد و رسوب باقیمانده در ته فالکن‌های پلاستیکی۵۰ میلی‌لیتری به منظور حذف کامل عناصر و نمک‌های محیط کشت دو بار با آب مقطر شستشو و سانتریفیوژ شدند. نمونه‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی (مدل FD-8505/FD-5005-BT، دناوکیوم، صنعت‌پرداز دنا، ایران) به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤٤- درجه سانتی‌گراد به طور کامل خشک شدند. نمونه‌های ریزجلبک لیوفیلیزه شده تا زمان انجام آنالیزهای بیش‌تر در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

1. Characterized
2. Acros Organics

محاسبه نرخ رشد و زمان دو برابر شدن: به منظور اندازه‌گیری جذب نوری[1] (OD) روزانه در یک بازه زمانی معین (ساعت ۱۰ صبح الی ۱۲ ظهر) مقدار ۲ میلی‌لیتر ریزجلبک از هر ظرف ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت ریزجلبک به وسیله میکروپیپت برداشته و در کووت دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد. سپس به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های رشدی در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل PD-303UV، APEL، ژاپن) قرائت گردید. (Willette et al., 2018). شاخص‌های نرخ رشد (۱) و زمان دو برابر شدن (۲) بر اساس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری‌های جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر طبق روابط (Widdel, 2010)(Willette et al., 2018) زیر محاسبه شدند:

$$\text{Growth rate } (d^{-1}) = \frac{\ln OD_{14\ d} - \ln OD_{0\ d}}{14\ d} \quad (1)$$

$$\text{Doubling time(d)} = \frac{\ln 2}{\text{Growth rate}} \quad (2)$$

اندازه‌گیری زیست‌توده خشک: ابتدا نمونه‌های ریزجلبک در فاز سکون برداشت شدند و سپس نمونه‌های ریزجلبک با دور ۶۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و در مرحله بعد محیط کشت اضافی روی رسوب بیرون ریخته شد و رسوب باقیمانده را با آب مقطر به منظور حذف عناصر غذایی و نمک‌های اضافی شستشو داده و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از آن توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۴- درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها خشک شدند. سپس نمونه‌های خشک شده توسط ترازوی دیجیتال دقیق توزین و وزن خشک نمونه‌ها یادداشت و ثبت گردید.

استخراج و سنجش محتوی لیپید کل: استخراج لیپید کل بر اساس روش Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959) انجام شد. ابتدا یک گرم ریزجلبک لیوفلیزه شده توزین و سپس مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محلول کلروفرم: متانول (به نسبت ۲:۱) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در دستگاه شیکر (مدل R-430، شرکت پُل ایده‌آل پارس، ساخت ایران) و ۸ دقیقه در دستگاه سونیکاتور (Misonix Sonicator 3000، ساخت آمریکا) قرار داده شدند. تا دیواره ضخیم ریزجلبک‌ها کاملاً شکسته شود. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند تا دو فاز ایجاد شود. فاز آلی حاوی لیپید جدا شد و به باقیمانده ۵ میلی‌لیتر کلروفرم خالص اضافه شد. مانند مرحله قبل مراحل استخراج لیپید تکرار شد. فاز آلی جدا شده در یک میکروتیوب که از قبل وزن شده بود (W_1) ریخته شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در آون (Memmert، ساخت آلمان) قرار داده شد تا حلّال تبخیر شود. پس از آن میکروتیوب‌ها دوباره وزن شدند (W_2) و میزان لیپید کل از اختلاف بین وزن اولیه و ثانویه (W_2–W_1) برحسب درصد وزنی- وزنی محاسبه گردید (Kumari, Reddy, and Jha 2011).

استخراج و سنجش کمّی غلظت جیبرلیک‌اسید درونی توسط دستگاه HPLC: استخراج جیبرلیک‌اسید درونی از مقدار یک گرم ریزجلبک لیوفیلیزه شده طبق روش Liu و همکاران (۲۰۱۳) صورت گرفت (Liu et al. 2013). سپس غلظت جیبرلیک‌اسید درونی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (مدل Infinity LC ۱۲۲۰، شرکت Agilent، ساخت آمریکا) با دتکتور اسپکترومتر جرمی یون ربا (ion trap mass spectrometer) تعیین گردید.

1. Optical density

سنجش رنگدانه‌های کلروفیل a، b و کاروتنوئید و کلروفیل کل: برای سنجش مقدار کلروفیل a و b از روش Lichtenthaler (1988) (Lichtenthaler, 1988) استفاده شد. برای استخراج این رنگدانه‌های فتوسنتزی، ابتدا ۱۰ میلی‌گرم پودر ریزجلبک لیوفیلیزه شده را با دقت به وسیله ترازوی دیجیتال توزین نموده و سپس درون لوله آزمایش شیشه‌ای ریخته و به مقدار ۵ میلی‌لیتر استون ۹۰٪ به لوله های آزمایش اضافه نموده و نمونه‌ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگه‌داری شدند. در مرحله بعد لوله‌های آزمایش حاوی نمونه‌ها به‌مدت ۲ ساعت به‌خوبی به‌وسیله دستگاه شیکر تکان داده شدند و سپس تمام نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد محلول سبز رنگ شفاف رویی را با سمپلر برداشته و به مقدار ۳ میلی‌لیتر درون کووت کوارتزی دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (APEL PD-303UV، ساخت ژاپن) قرار داده شد، و جذب کلروفیل a، bو کاروتنوئید به‌ترتیب در طول موج‌های ٦٦٢، ٦٤٥ و ٤٧٠ نانومتر خوانده شد. جهت صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر از استون ۹۰ درصد به‌عنوان محلول بلانک استفاده شد.برای محاسبه عددی میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید از فرمول‌های زیر استفاده شد و نتایج برحسب میکروگرم بر گرم وزن خشک محاسبه و ارائه گردید:

فرمول‌ها:

$$Chl_a = 11.75A662 - 2.35A64 \quad (۳)$$

$$Chl_b = 18.61A645 - 3.96A662 \quad (٤)$$

$$Carotenoid = \frac{1000A470 - 2.70Chla - 81.4Chlb}{227} \quad (۵)$$

که Chl_a کلروفیل a، Chl_b کلروفیل b و از مجموع مقادیرکلروفیل a و b ($Chl_T = Chl_a + Chl_b$)، مقدار کلروفیل کل (Chl_T) محاسبه گردیده است.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمام آزمون‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. محاسبه داده‌ها و ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Excel، نسخه ۲۰۰۷ و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها شامل تجزیه‌ی واریانس به کمک نرم‌افزارهای آماری MSTAT-C و DSAASTAT، نسخه ۱/۰۲۲پروجیا، ایتالیا ۲۰۱۰ و مقایسه‌ی میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P<۰/۰۵$) انجام گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلیک‌اسید بر تمام صفات مورد مطالعه در ریزجلبک *D. salina* در سطح آماری پنج درصد معنی‌دار است. مقایسه میانگین برای صفات مورد اندازه‌گیری تحت تیمارهای مختلف هورمون جیبرلیک‌اسید انجام و مشخص شد که تفاوت‌های معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف هورمون جیبرلیک‌اسید وجود دارد.

تاثیر غلظت‌های مختلف جیبرلیک‌اسید بر میزان رشد: شکل ۱ اثر تیمارهای مختلف هورمون جیبرلیک‌اسید بر رشد ریزجلبک *D. salina* بر اساس میزان جذب نوری در طی روزهای کشت را نشان می‌دهد. بر طبق شکل ۱، بعد از القا هورمون جیبرلیک‌اسید، منحنی‌های رشد ریزجلبک برای همه‌ی تیمارهای جیبرلیک‌اسید یک پیشرفت مشابهی را نشان داد. نتایج آزمایش نشان داد که غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید موثرترین تیمار روی افزایش میزان رشد ریزجلبک *D. salina* بود.

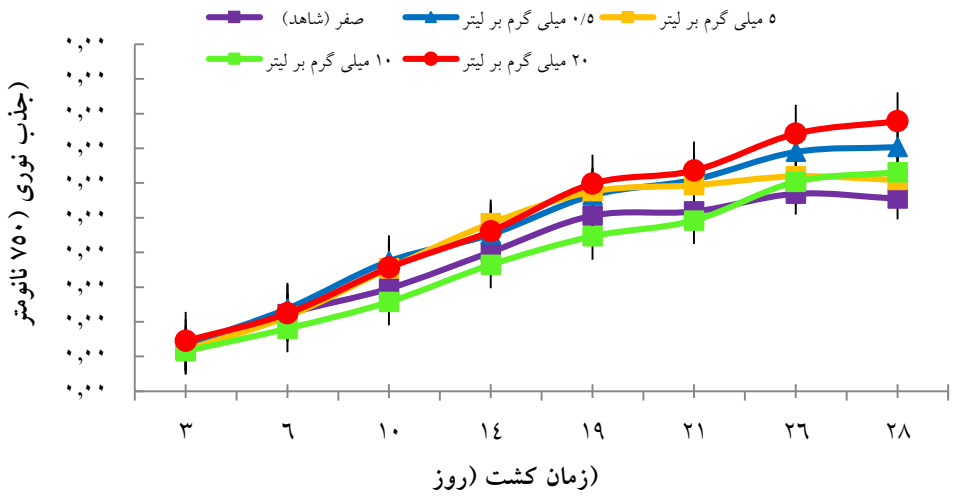
تاثیر تیمارهای جیبرلیک‌اسید بر نرخ رشد وزمان دو برابر شدن: بر اساس داده‌های جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر، بالاترین میزان نرخ رشد و زمان دو برابر شدن به ترتیب با مقادیر ۰/۰٤۳ بر روز و ١٦

روز متعلق به تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر هورمون جیبرلیک‌اسید و کمترین میزان نرخ رشد و زمان دو برابر شدن به ترتیب با مقادیر ۰/۰۲۱ بر روز و ۳۲ روز مربوط به تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر هورمون جیبرلیک‌اسید بود (جدول ۳).

جدول ۲: تجزیه واریانس برای صفات اندازه‌گیری شده در ریزجلبک *Dunaliella salina* تحت تیمارهای مختلف جیبرلیک‌اسید

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (DF)	میانگین مربعات (MS)						
		کلروفیل a (میکروگرم بر گرم وزن خشک)	کلروفیل b (میکروگرم برگرم وزن خشک)	کلروفیل کل (میکروگرم برگرم وزن خشک)	کاروتنوئید کل (میکروگرم برگرم وزن خشک)	زیست‌توده خشک (گرم بر لیتر)	محتوای لیپید کل (درصد وزنی/ وزنی)	جیبرلیک‌اسید درونی (نانوگرم بر میلی‌لیتر)
تیمار	٤	٤/٧١**	١١/٠٤**	٣٠/٠٢**	٠/٢١**	٠/٠٩٢٥**	٠/٤١٨**	٤٠٢/٦٤**
خطا	١٠	٠/٢٠	٠/٣٣	٠/٦٧	٠/٠٣	٠/٠٠٤٩	٠/٠٧٩	١/٩٥
کل	١٤	١/٤٩	٣/٣٩	٩/٠٦	٠/٠٨	٠/٠٢٩٩	٠/١٧٦	١١٦/٤٣
ضریب‌تغییرات (C.V)		١٦/٨	١٤/٢١	١٢/٣١	٨/٩٩	٨/٨٧	١/٦٢	٣/٥٦

*، **: به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد، ns: عدم اختلاف معنی‌دار.

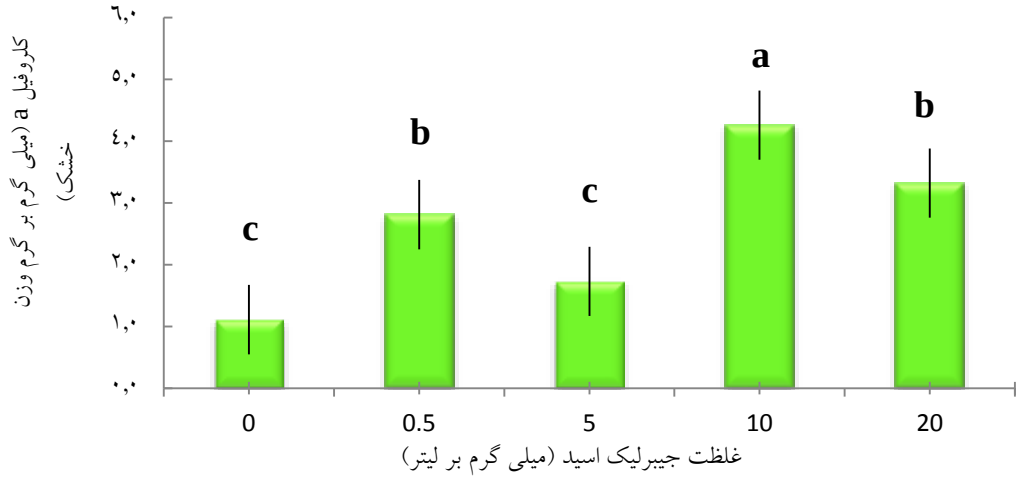


شکل ۱: منحنی رشد ریزجلبک *Dunaliella salina* تحت تیمارهای مختلف جیبرلیک‌اسید

جدول ۳: پارامترهای رشد برای ریزجلبک *Dunaliella salina* تحت تیمارهای مختلف هورمون جیبرلیک‌اسید طی دوره رشد ۲۸ روزه

پارامتر	غلظت هورمون جیبرلیک‌اسید				
	صفر (شاهد)	۰/۵ (میلی‌گرم بر لیتر)	۵ (میلی‌گرم بر لیتر)	۱۰ (میلی‌گرم بر لیتر)	۲۰ (میلی‌گرم بر لیتر)
نرخ رشد (بر روز)	۰/۰۳۱	۰/۰۳۸	۰/۰۲۹	۰/۰۲۱	۰/۰۴۳
زمان دو برابر شدن (روز)	۲۲	۱۸	۲۳	۳۲	۱٦

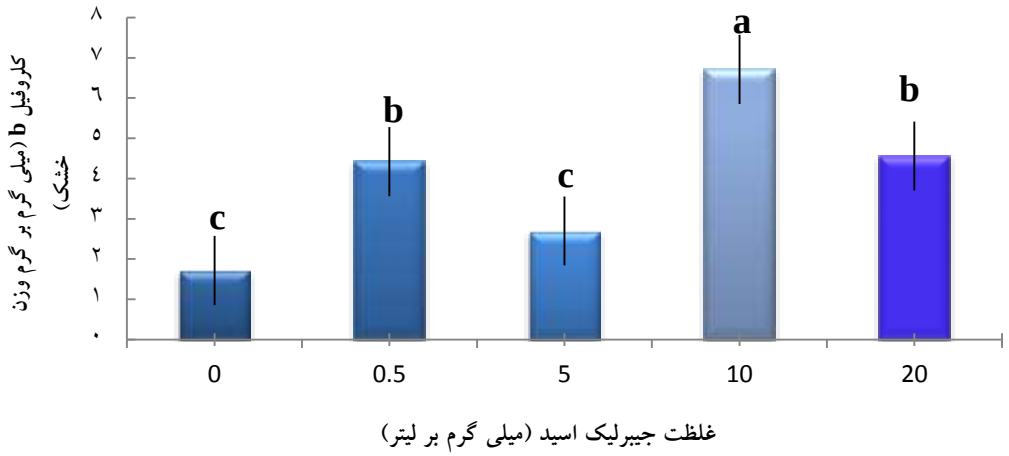
تاثیر تیمار جیبرلیک‌اسید بر مقدار کلروفیل a: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان کلروفیل a در ریزجلبک *D. salina* به‌طور بسیار معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد تحت تاثیر تیمارهای هورمون جیبرلیک‌اسید قرار گرفته است (جدول ۲). مقایسه میانگین برای صفت کلروفیل a بین همه سطوح مختلف هورمون جیبرلیک اسید انجام شد. براساس نتایج حاصله، کاربرد خارجی هورمون جیبرلیک اسید افزایش قابل ملاحظه‌ای را در مقدار کلروفیل a ریزجلبک *D. salina* در مقایسه با نمونه شاهد سبب شد. به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار کلروفیل a با میانگین ٤/٢٦ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک مربوط به تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید بود در حالی که کمترین میزان کلروفیل a با میانگین ۱/۱۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برای این صفت متعلق به نمونه شاهد بود (شکل ۲).



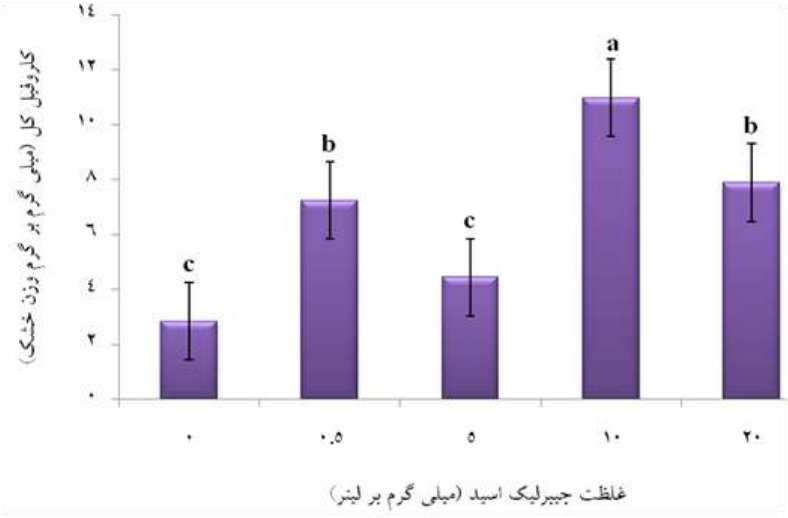
شکل ۲: تاثیر تیمارهای مختلف جیبرلیک اسید بر میزان کلروفیل a در ریزجلبک *Dunaliella salina*

تأثیر تیمار جیبرلیک‌اسید بر مقدارکلروفیل b: تحت تاثیر کاربرد خارجی هورمون جیبرلیک‌اسید افزایش معنی‌داری در مقدار کلروفیل b ریزجلبک *D. salina* در مقایسه با نمونه شاهد مشاهده شد، به طوری که بالاترین مقدار کلروفیل bبا میانگین ٦/٧١ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک مربوط به تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید بود در حالی که پایین‌ترین میزان کلروفیل b با میانگین ۱/۷۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برای این صفت متعلق به نمونه شاهد بود (شکل ۳).

تاثیر تیمار جیبرلیک‌اسید بر تولید کلروفیل کل: هورمون جیبرلیک‌اسید باعث افزایش چشمگیری در میزان تجمع کلروفیل کل ریزجلبک *D. salina* در مقایسه با تیمار شاهد گردید. به طوری که بیش‌ترین مقدار کلروفیل کل با میانگین۱۰/۹۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متعلق به تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید بود در حالی که کم‌ترین میزان کلروفیل کل با میانگین ۲/۸۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برای این صفت متعلق به نمونه شاهد بود (شکل ٤).



شکل ۳: تاثیر تیمارهای مختلف جیبرلیک اسید بر میزان کلروفیل b در ریزجلبک *Dunaliella salina*



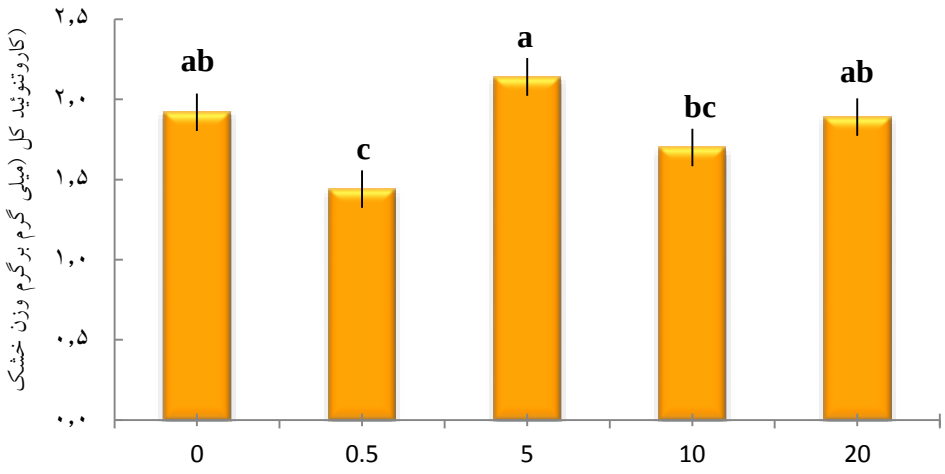
شکل ٤: تاثیر تیمارهای مختلف جیبرلیک اسید بر میزان کلروفیل کل در ریزجلبک *Dunaliella salina*

تاثیر تیمار جیبرلیک‌اسید بر تجمع کاروتنوئید کل:

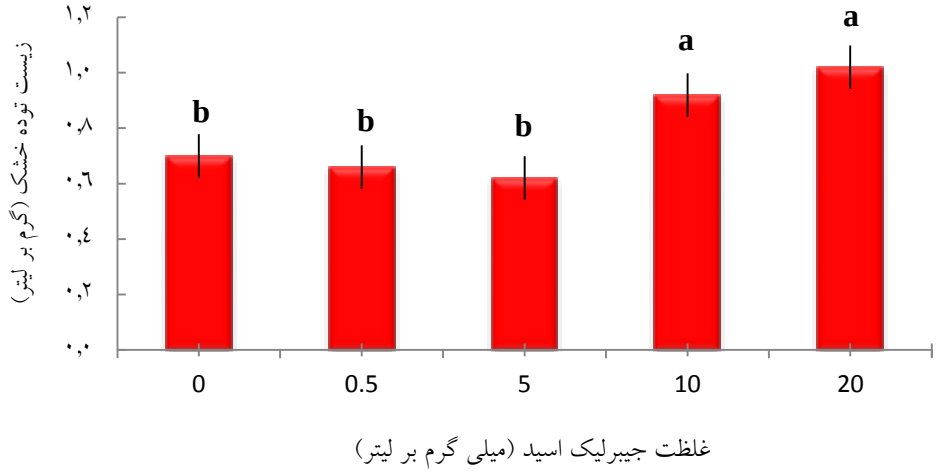
نتایج نشان داد که هورمون جیبرلیک‌اسید باعث افزایش در میزان انباشت کاروتنوئید کل ریزجلبک *D .salina* در مقایسه با تیمار شاهد شد. به طوری که بیش‌ترین میزان کاروتنوئید کل با میانگین ۲/۱٤ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک متعلق به تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید بود در حالی که کم‌ترین مقدارکاروتنوئید کل با میانگین ۱/٤٤ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برای این صفت متعلق به تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید بود (شکل ۵).

تاثیر تیمار جیبرلیک‌اسید بر تولید زیست‌توده خشک: تیمار جیبرلیک‌اسید در غلظت‌های بالای ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش در تولید زیست‌توده خشک ریزجلبک *D .salina* در مقایسه با سایر تیمارها گردید. به‌طوری‌که بیشترین مقدار زیست‌توده خشک با میانگین ۱/٤٤ گرم بر لیتر متعلق به تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید بود در حالی که کم‌ترین میزان زیست‌توده خشک با میانگین ۱/۰۲میلی‌گرم بر لیتر برای این صفت مربوط به تیمار

۵ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید بود (شکل ٦). شایان ذکر است که در مقایسه میانگین‌های این صفت، تیمارهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک اسید از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند. از طرفی دیگر سایر تیمارها نیز با گرفتن حرف لاتین مشترک در یک گروه مجزا قرار گرفتند.

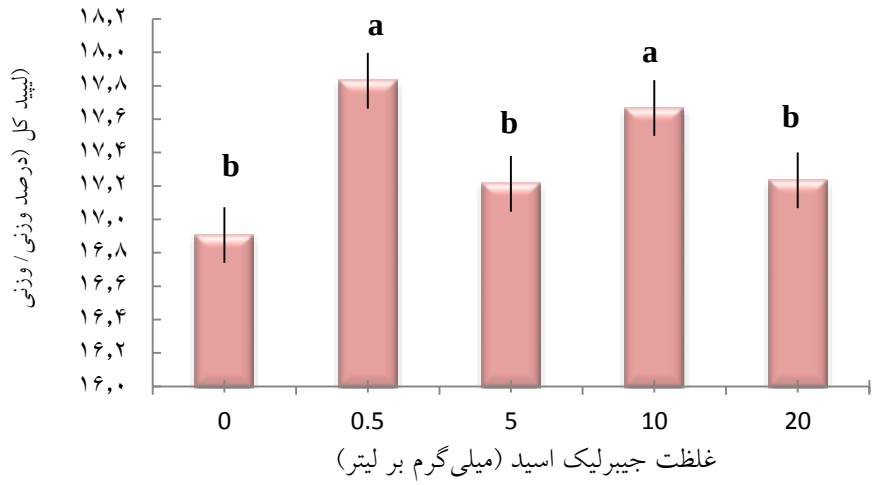


شکل ۵: تاثیر تیمارهای مختلف جیبرلیک اسید بر میزان کاروتنوئید کل در ریزجلبک *Dunaliella salina*



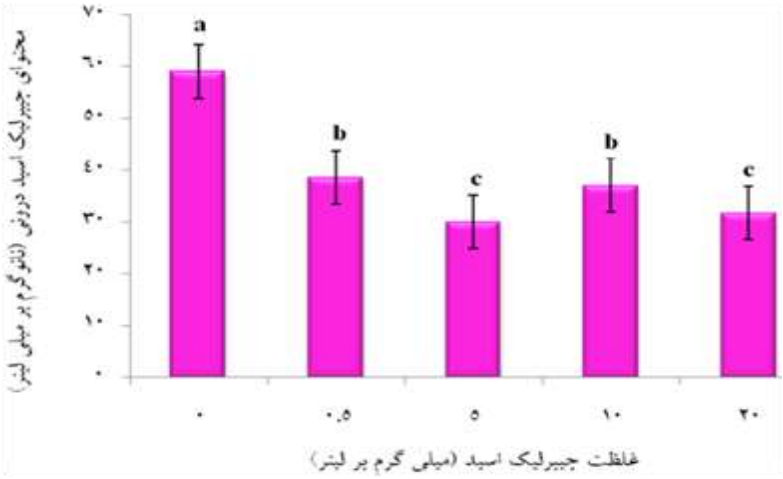
شکل ٦: تاثیر تیمارهای مختلف جیبرلیک اسید بر میزان زیست‌توده خشک در ریزجلبک *Dunaliella salina*

تاثیر تیمار جیبرلیک‌اسید بر محتوای لیپید کل: نتایج این آزمایش نشان داد که اثر تیمار جیبرلیک‌اسید بر محتوای لیپید کل ریزجلبک *D. salina* در غلظت‌های مورد استفاده در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بیش‌ترین مقدار لیپید کل با میانگین ۱۷/۸۳ درصد متعلق به تیمار ۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید بود در حالی که کم‌ترین مقدار لیپید کل با میانگین ۱٦/۹۰ درصد متعلق به تیمار شاهد بود (شکل ۷).

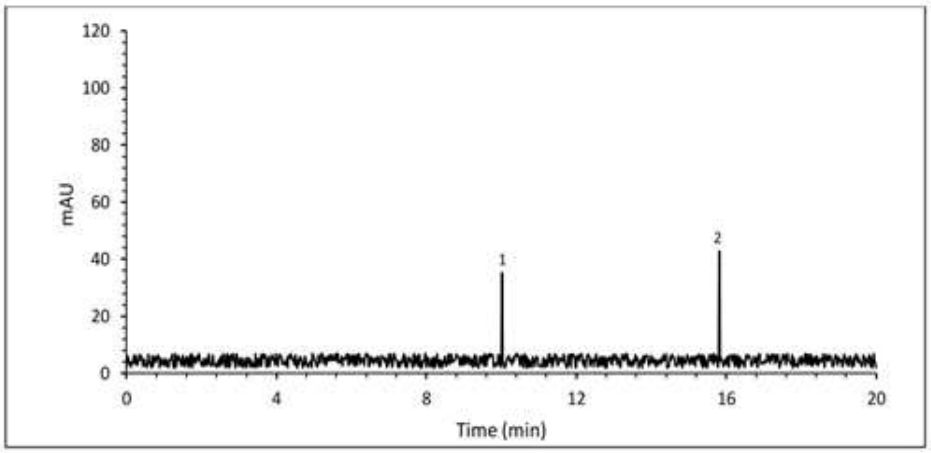


شکل۷: تاثیر تیمارهای مختلف جیبرلیک‌اسید بر محتوای لیپید کل در ریزجلبک *Dunaliella salina*

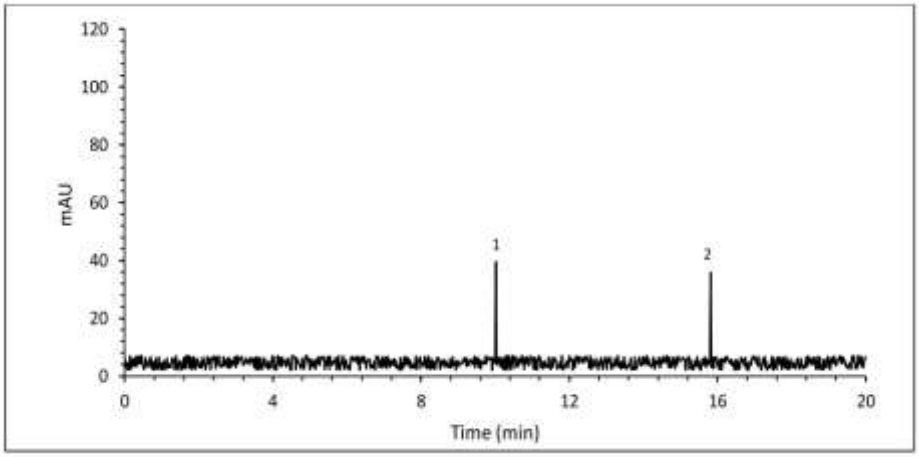
تاثیر تیمار جیبرلیک‌اسید بر محتوای جیبرلیک‌اسید درونی: نتایج نشان داد که تیمارهای جیبرلیک‌اسید باعث افزایش در محتوای جیبرلیک اسید درونی ریزجلبک *D. salina* در مقایسه با تیمار شاهد نگردید. به‌طوری‌که بیش‌ترین غلظت جیبرلیک‌اسید درونی با میانگین ۵۹/۰۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر متعلق به تیمار شاهد بود در حالی که کم‌ترین میزان جیبرلیک‌اسید درونی با میانگین ۳۰/۰۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر متعلق به تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید بود (شکل ۸). در زیر کروماتوگرام‌های HPLC مربوط به هر تیمار برای سنجش سطح جیبرلیک‌اسید درونی در ریزجلبک *D. salina* ارائه شده است (شکل‌های ۹-۱ تا ۹-۵). لازم به ذکر است که در تصاویر کروماتوگرام پیک شماره ۲ مربوط به جیبرلیک‌اسید است.



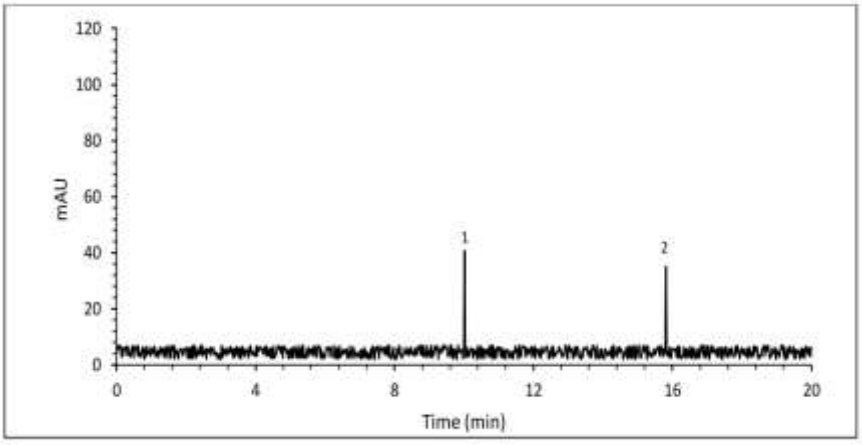
شکل ۸: تاثیر تیمارهای مختلف جیبرلیک‌اسید بر محتوای جیبرلیک‌اسید درونی در ریزجلبک *Dunaliella salina*



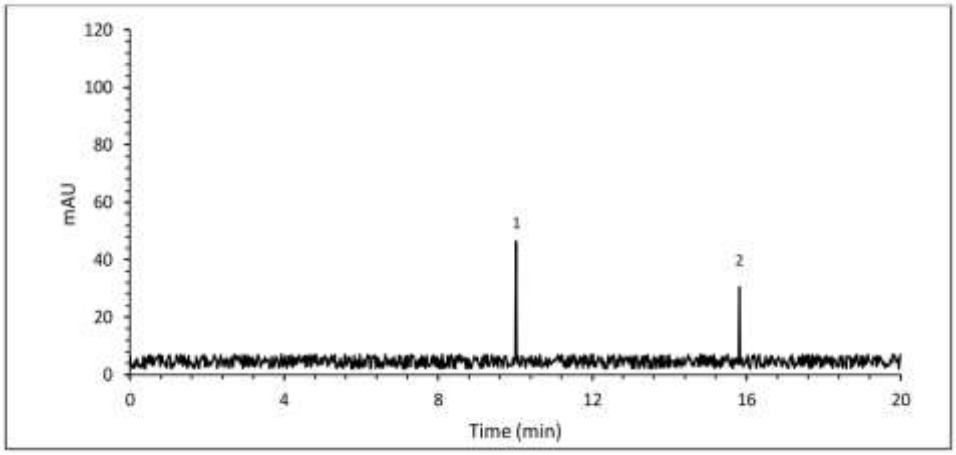
شکل ۹-۱: کروماتوگرام HPLC برای تیمار صفر (شاهد) بر روی صفت جیبرلیک‌اسید درونی در ریزجلبک *D. salina*



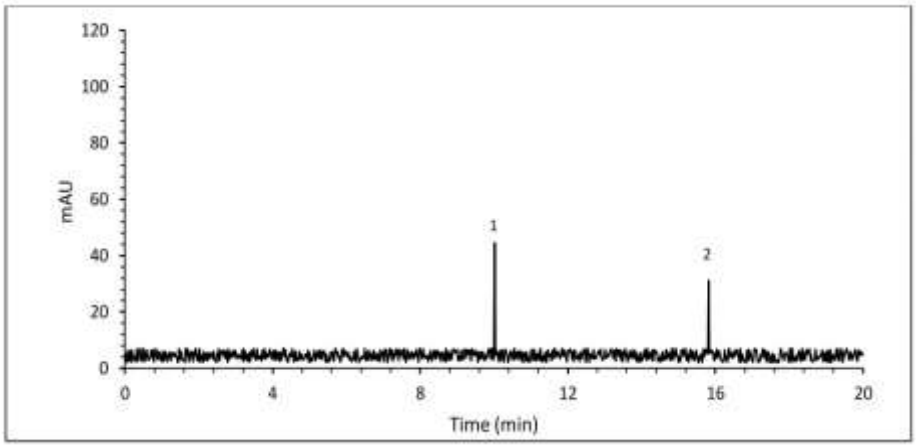
شکل ۹-۲: کروماتوگرام HPLC برای تیمار ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر GA بر روی صفت جیبرلیک‌اسید درونی در ریزجلبک *D. salina*



شکل ۹-۳: کروماتوگرام HPLC برای تیمار ۵ میلی‌گرم بر لیتر GA بر روی صفت جیبرلیک‌اسید درونی در ریزجلبک *D. salina*



شکل ۹-٤: کروماتوگرام HPLC برای تیمار ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر GA بر روی صفت جیبرلیک‌اسید درونی در ریزجلبک *D. salina*



شکل ۹-۵: کروماتوگرام HPLC برای تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر GA بر روی صفت جیبرلیک‌اسید درونی در ریزجلبک *D. salina*

بحث

جیبرلیک‌اسید (GA_3) یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی کلیدی است که روی تعدادی از فعالیت‌ها در ریز جلبک‌ها مانند تقسیم سلولی تأثیر می‌گذارد (Pan et al., 2008; Falkowska et al., 2011). در پژوهش حاضر، صفات رشد، تجمع برخی رنگدانه‌های فتوسنتزی، محتوای کاروتنوئید کل و زیست‌توده خشک در ریزجلبک *D. salina* تحت تیمارهای مختلف هورمون جیبرلیک‌اسید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار جیبرلیک‌اسید توانسته باعث افزایش رشد، میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کاروتنوئید و زیست توده خشک در ریزجلبک *D. salina* شود.

در مطالعه Ak و همکاران (۲۰۰۸) روی میزان رشد *D. viridis* در شدت نور ۵۰ و ۷۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه، حداکثر نرخ رشد و غلظت سلولی در شدت نور ۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه بدست آمد و نتایج نشان داد افزایش شدت نور باعث کاهش در تعداد سلول‌ها شد (AK et al., 2008). در بررسی انجام شده توسط

Tangو همکـاران (۲۰۱۰) بـر روی میـزان رشـد ریزجلبک *D. tertiolecta* بـا سـه منبـع نـور مختلـف (لامپ دو قطبی سفید، لامـپ دو قطبـی قرمـز، لامـپ فلوئورسنت) در شدت نور ۱۰۰ میکرومول فوتون بـر متـرمربـع در ثانیـه، چرخـه نـوری ۱۵: ۹ سـاعت (روشنایی: تاریکی)، غلظت ٤ درصد دی‌اکسید کـربن و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تفـاوتی در میـزان رشـد مشاهده نشد. در مطالعه آنها سه سطح از شـدت نـور (۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول فوتون بـر متـرمربـع در ثانیه) با منبع فلوئورسنت مورد بررسی قـرار گرفـت و بیش‌تـرین میـزان رشـد بـین شـدت نـور۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومـول فوتـون بـر متـرمربـع در ثانیـه ثبـت شـد (Tang et al., 2010). در مطالعـه Trenkenshu و همکاران (۲۰۰۵) نقاط بحرانی شدت نور بـرای رشـد *D. salina*، ۱۰ و ۲۵۰ میکرومول فوتون بـر متـرمربـع در ثانیه و شدت نور بهینه برای رشد ایـن گونـه، ۱۲۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه بیان شـده اسـت (Trenkenshu et al., 2005). در گـزارش ارائـه شـده توسط Ben-Amotz و همکـاران (۲۰۰۲) شـدت نـور ٤۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه باعث افزایش رشد گونه ریزجلبک *D .salina* گردید (Ben-Amotz et al., 2002). نتایج مطالعات مختلف نشـان مـی‌دهـد در شرایط و گونه‌های مختلف محدوده تحمل جلبـک نسـبت بـه شـدت نـور متفـاوت بـوده اسـت (Rivkin, 1989; Richmond, 2004) که نتایج مطالعـه حاضر نیز تأیید کننده نتایج قبلی بوده است.

فاکتور نرخ رشد مهم‌ترین راه بـرای بیـان توانـایی سازگاری یا موفقیت اکولوژیک یک گونـه نسـبت بـه تغییـر شـرایط محـیط طبیعـی یـا آزمایشـگاهی اسـت (Salmaninejad, 2015). در پـژوهش حاضـر، تیمارهای جیبرلیک‌اسید بر روی ریزجلبک *D .salina* نشان داد که نرخ رشد سازگار و همسان با رشد نمایی در ریزجلبک طی دوره کشت ۲۸ روزه است. در ایـن آزمایش داده‌های رشد یک الگویی از افزایش عملکرد و کارایی در کشـت‌هـای تحـت تیمارهـای هورمـونی جیبرلیک‌اسید را آشکار کرد. نتایج آزمـایش نشـان داد که کـاربرد خـارجی هورمـون جیبرلیـک‌اسـید باعـث افزایش نرخ رشد و کوتاه‌تر شدن زمان دو برابر شـدن در ریزجلبک *D .salina* مـی‌گـردد. در مطالعـه Du و همکاران (۲۰۱۷)، هورمون جیبرلیـک‌اسـید مـی‌توانـد رشد سلول‌های سویه ریزجلبک *C. pyrenoidosa* ZF را به میزان قابـل تـوجهی افـزایش دهـد (Du et al., 2017). Chia و همکـاران (۲۰۱۳) رشـد ریزجلبـک *C. vulgaris* را در محیط کشت‌هـای مختلـف شـامل (Chu 10، WC و LC Oligo) در شـرایط نـوری ۱۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه و چرخـه نـوری ۱٦: ۸ ساعت (روشنایی: تاریکی) مـورد مطالعـه قـرار دادند و حداکثر سرعت رشد ۰/۱٤ در روز را گـزارش نمودنـد (Chia et al., 2013). طبـق یافتـه‌هـای اخیـر توسـط Yu و همکـاران (۲۰۱٦)، جیبرلیـک‌اسـید از طریق افزایش جذب نیتروژن و میـزان مصـرف سـایر مواد مغذی مانند کربوهیدرات‌ها، سرعت و نرخ رشـد ریزجلبک‌ها را افزایش می‌دهد (YuPan et al., 2008; Zarandi-Miandoab et al., 2016). و همکـاران (۲۰۱٤) طی پژوهشی اثر جیبرلیـک‌اسـید بـر رشـد و محتـوی رنگدانـه‌ای ریـزجلبـک *D. salina* را تحـت شرایط شدت نور مداوم ۱۰ میکرومول فوتون بر متـر-مربع در ثانیه و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با ۱۱۲ دور در دقیقه در محـیط کشـت A.S.W طی یک دوره ۱۲ روزه مورد بررسی قرار دادند. نتـایج آن‌ها نشان داد که جیبرلیک‌اسـید موجـب افـزایش در جـذب نـوری، تعـداد سـلول، کلروفیـل b و کـل در ریزجلبک *D. salina* شد. احتمـالاً جیبرلیـک‌اسـید بـا افزایش رنگدانه‌های فتوسـنتزی موجـب کـارایی بهتـر فتوسـنتز و در نتیجـه رشـد بیشـتر گردیـده اسـت (Zarandi-Miandoab et al., 2014). Salmaninejad

(۲۰۱۵) با بررسی تاثیر شدت نور بر میزان رشد و کاروتنوئید ریزجلبک *D. salina* دریاچه ارومیه، نتیجه گرفت که شدت نور ۲۰۰ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه باعث افزایش تراکم سلول، نرخ رشد و سنتز کاروتنوئید می‌گردد (Salmaninejad, 2015). در مطالعه‌ای Ghorbani و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی تاثیر تنش‌های نوری ۵۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه بر خصوصیات رشدی و رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید ریزجلبک *D. salina* در دمای ۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با ۱۶۰ دور در دقیقه در محیط کشت جانسون طی یک دوره ۱۴ روزه مورد بررسی قرار دادند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که میزان رشد، کلروفیل a و کاروتنوئید تحت تنش نوری طی دوره کشت دو هفته‌ای افزایش یافت (Ghorbani et al., 2018).

با توجه به نتایج بدست آمده، کاربرد خارجی هورمون جیبرلیک‌اسید باعث تحریک و افزایش محتوای کلروفیل a در ریزجلبک *D. salina* در مقایسه با نمونه شاهد گردید. در جلبک‌های دریایی کلروفیل a به همراه کلروفیل‌های b، c و d از مهمترین و اصلی‌ترین رنگدانه‌های فتوسنتزی هستند که انرژی نورانی را در عمل فتوسنتز جذب می‌کنند (Osório et al., 2020). Pan و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه‌ای گزارش کردند که استفاده از غلظت‌های مناسب جیبرلیک‌اسید در محیط کشت باعث افزایش کلروفیل a در جلبک سبز- آبی (سیانوباکتری) *Microcystis aeruginosa* می‌شود (Madani et Pan et al., 2008; al., 2021). در مطالعه‌ای دیگر Falkowska و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تاثیر جیبرلیک‌اسید بر روی رشد، رنگدانه‌های فتوسنتزی و متابولیسم ریزجلبک *Chlorella vulgaris* نشان دادند که جیبرلیک‌اسید باعث افزایش مقادیر رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شوند (Falkowska et al., 2011). Lin و همکاران (۲۰۱۸) نیز گزارش کردند که جیبرلیک-اسید باعث افزایش محتوای کلروفیل a در ریزجلبک *Chlorella vulgaris* می‌گردد (Lin et al., 2018; Madani et al., 2021).

. نتایج گزارش‌های (Madani ; Pan et al., 2008 ; Lin et al., ; Falkowska et al., 2011et al., 2021 2018) با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد. از طرفی دیگر، Mansouri and Talebizadeh (۲۰۱۶) گزارش نمودند که میزان کلروفیل و کاروتنوئیدها در جلبک سبز-آبی (*cyanobacterium (Nostoc linckia* تحت تیمار جیبرلیک‌اسید کاهش یافت که با نتایج مطالعه حاضر مشابهت ندارد.

افزایش محتوای کلروفیل کل یکی از عوامل مهم در ظرفیت فتوسنتزی ارگانیسم‌های گیاهی است (Ghasemi et al., 2016). بنابر نتایج بدست آمده از این تحقیق، هورمون جیبرلیک‌اسید همچنین بر میزان تجمع کلروفیل b در ریزجلبک *D. salina* تاثیر می گذارد. القای هورمون جیبرلیک‌اسید به محیط کشت ریزجلبک باعث افزایش معنی‌داری در میزان انباشت کلروفیل کل (a + b) گردید.

کاربرد خارجی جیبرلیک‌اسید همچنین بر روی رابطه منبع-مخزن از جمله پایداری منبع و مخزن در هنگام جذب و تقسیم کربوهیدرات تأثیر می‌گذارد، جیبرلیک‌اسید با بهبود کارایی فتوسنتز، قدرت منبع را افزایش می‌دهد و با توزیع مجدد مواد جذب کننده فتوسنتز، قدرت مخزن را بهبود می‌بخشد (Verma et al., 2019).

کاروتنوئیدها رنگدانه‌های غیرقطبی هستند و با غیرفعال‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) که در هنگام قرار گرفتن در معرض نور تشکیل می‌شوند، در حفاظت نوری[1] نقش کلیدی دارند (Osório et al., 2020). با توجه نتایج حاصله، محتوای کاروتنوئید کل

[1] Photoprotection

ریزجلبک *D. salina* تحت تاثیر تیمار جیبرلیک‌اسید افزایش یافت. Park و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش کردند که اضافه کردن غلظت‌های مناسب جیبرلیک‌اسید در محیط کشت باعث افزایش میزان کاروتنوئیدها در ریزجلبک *Chlamydomonas reinhardtii* می‌شود (Park et al., 2013). Hashemi و همکاران (۲۰۱۹) روند رشد ریزجلبک *D. salina* تحت غلظت‌های نمکی ۰/۵ تا ۳ مولار را در محیط کشت جانسون با شدت نوری ۱۰۰۰۰ لوکس و دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد طی یک دوره کشت ۲٤ روزه مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایش آن‌ها نشان داد که مقدار بهینه غلظت نمکی برای رشد گونه ریزجلبک *D. salina* مورد مطالعه در راستای رشد مناسب‌تر و بالاترین میزان زیست‌توده، شوری یک مولار بود. همچنین بالاترین مقدار کاروتنوئید تولیدی در سلول‌های ریزجلبک *D. salina* در غلظت نمکی ۳/۵ مولار بدست آمد (Hashemi et al., 2019). در مطالعه‌ای Aghaei and Siahbalaei (۲۰۱۲) به بررسی بقاء، رشد و وضعیت رنگیزه‌ای درشرایط تغییرات توام دی‌اکسید کربن و نور بر جلبک سبز *Senedesmus obliquous* در محیط کشت مایع BG-11 تحت تیمارهای نوری (۲، ۳۰، ٦۰ و ۱۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه با تناوب نوری ۲، ٤ و ٦ ساعت تاریکی در شبانه روز) و تیمارهای دی‌اکسید کربن (محدودیت دی‌اکسید کربن (عدم هوادهی)، محدودیت نسبی (هوادهی) و تلقیح دی‌اکسید کربن ۳ درصد) طی دوره کشت ۱۱ روزه پرداختند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که بیش‌ترین میزان رشد در شدت نور ٦۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه همراه با هوادهی بدست آمد. تلقیح دی‌اکسید کربن ۳ درصد در سویه جلبک مورد بررسی باعث افزایش رشد نگردید بلکه در مقایسه با تیمار هوادهی رشد را کاهش داد و باعث افزایش زمان تولید مثل گشت. همچنین محتوای کلروفیل در دوره‌های تاریکی طولانی‌تر افزایش معنی‌داری نشان داد (Aghaei and Siahbalaei, 2012).

در مطالعه‌ای دیگر Lin و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی اثر هورمون‌های جیبرلیک‌اسید، نفتالین استیک‌اسید، سالیسیلیک‌اسید، اسپرمیدین، و اتفون در ریز جلبک *Chlorella vulgaris* گزارش کردند که میزان تولید و تجمع کاروتنوئید در سلول‌های این ریزجلبک تحت تاثیر جیبرلیک‌اسید افزایش می‌یابد (Lin et al., 2018). در گزارشی دیگر Du و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که هورمون جیبرلیک‌اسید باعث افزایش محتوای کاروتنوئید کل در ریزجلبک *Chlorella pyrenoidosa* می‌شود (Du et al., 2017). بیوسنتز بالاتر کاروتنوئیدها معمولاً مربوط به مهار آسیب کلروپلاست در سلول‌های در معرض تنش‌های محیطی می‌باشد (Gao et al., 2012). بیوسنتز بالاتر کاروتنوئیدهای مشاهده شده در مطالعه حاضر نشان دهنده این است که هورمون تنظیم کننده رشد مکانیسم محافظت از سلول‌های *D. salina* را فعال می کند (Gao et al., 2012). به‌طورکلی، تجمع کاروتنوئید ممکن است از تغییر تعادل کربن و نیتروژن در شرایط نامساعد نیز حاصل شود (Zarandi-miandoab et al., 2015).

بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، تولید زیست‌توده خشک ریزجلبک *D. salina* تحت تاثیر تیمار جیبرلیک‌اسید افزایش یافت. به استناد نتایج بدست آمده از تحقیقات Yu و همکاران (۲۰۱٦) نیز جیبرلیک‌اسید باعث افزایش زیست‌توده در جلبک *Aurantiochytrium* sp. می‌گردد (Yu et al., 2016). در یک مطالعه Sivaramakrishnan and Incharoensakdi (۲۰۲۰) گزارش کردند که هورمون‌های جیبرلیک‌اسید، ایندول استیک‌اسید و آبسیزیک‌اسید باعث افزایش تولید زیست‌توده و لیپید

در ریزجلبک گونه *Chlorella* sp. می‌گردد، اگرچه بیش‌ترین میزان تحریک‌شدگی در تولید زیست‌توده و لیپید در تیمار آبسیزیک‌اسید مشاهده شد (Sivaramakrishnan and Incharoensakdi, 2020). در مطالعه‌ای Aftab و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که جیبرلیک‌اسید تحت شرایط محدودیت نیتروژن، همچنین فعالیت آنهیدراز کربنیک، نیتراتردوکتاز و آنزیم‌های کلیدی درگیر در متابولیسم کربن و نیتروژن را تحریک می‌کند (Aftab et al., 2011). بنابراین جیبرلیک‌اسید (GA_3) ازطریق تنظیم مسیرهای متابولیک باعث افزایش زیست‌توده و محصولات زیستی می‌شود (Madani et al., 2021).

بهطورکلی ریزجلبک‌ها در شرایط نامساعد و تنش‌زا، تجمع محتوای لیپید را افزایش می‌دهند. بنابراین مطالعه فرآیندهای القای تولید لیپید به منظور افزایش تولید و تجمع محتوای لیپید با ارزش است (Moradi et al., 2015). بر طبق نتایج حاصل از پژوهش حاضر، تولید محتوای لیپید کل ریزجلبک *D. salina* تحت تاثیر تیمار جیبرلیک‌اسید افزایش پیدا کرد. بر طبق گزارش Yu و همکاران (۲۰۱۶)، جیبرلیک‌اسید باعث افزایش تجمع لیپید در جلبک *Aurantiochytrium* sp. می‌گردد (Yu et al., 2016). در مطالعه‌ای دیگر Sivaramakrishnan and Incharoensakdi (۲۰۲۰)، گزارش نمودند که تیمار جیبرلیک‌اسید منجر به افزایش ۱۲ درصدی محتوای لیپید کل ریزجلبک گونه *Chlorella* sp. شد. لذا نتایج آنها نشان داد که پاسخ سلول‌ها به جیبرلیک‌اسید وابسته به گونه‌های جلبک است (Sivaramakrishnan and Incharoensakdi, 2020). همچنین جیبرلیک‌اسید از طریق تحریک و افزایش قطر سلول باعث تجمع لیپید می‌شود (Trinh et al., 2017).

فیتوهورمون‌ها نیز تأثیرات مهمی در تنظیم رشد و نمو گیاه دارند و هورمون‌های درونی در گیاهان مانند جیبرلیک‌اسید، ایندول‌استیک‌اسید و آبسیزیک‌اسید بر یکدیگر تأثیر می‌گذارند (Wen et al., 2018). با توجه به یافته‌های این آزمایش، کاربرد خارجی هورمون جیبرلیک‌اسید باعث افزایش در میزان جیبرلیک‌اسید درونی در ریزجلبک *D. salina* در مقایسه با تیمار شاهد نگردید. در مطالعه‌ای Stirk و همکاران (۲۰۱۹)، گزارش کردند که استفاده از هورمون جیبرلیک‌اسید (GA_3) تاثیری بر غلظت جیبرلیک‌اسید درونی ریزجلبک *Chlorella minutissima* نداشت. بنابراین، آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که اثرات کاربرد خارجی فیتوهورمون‌ها، ممکن است به دلیل مکانیسم دقیق هموستاز کنترل کننده سطح هورمون‌ها از طریق بیوسنتز، ترکیب و تخریب، ملایم باشد (Stirk et al., 2019). در مطالعه‌ای Do و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش کردند که جیبرلیک‌اسید فیتوهورمونی درون‌زا است که توسط ریزجلبک *C. sorokiniana* TH01 تحت هر دو حالت کشت فوتوتروفیک و میکروتروفی تولید می‌شود و سطح جیبرلیک‌اسید درونی در شرایط رشد فوتوتروفیکی تحت تنش شوری کاهش می‌یابد (Do et al., 2020).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که کاربرد جیبرلیک اسید (GA_3) با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر تاثیر مثبتی بر محتوای کلروفیل a و b، میزان کلروفیل کل، زیست‌توده خشک و محتوای لیپید کل در ریزجلبک *D. salina* دارد. این در حالی بود که بالاترین نرخ رشد در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید (GA_3) بدست آمد. اگرچه بر اساس مقایسه میانگین‌ها، صفت کاروتنوئید کل در غلظت پایین‌تر جیبرلیک‌اسید یعنی ۵ میلی‌گرم بر لیتر بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص داد اما در مجموع ریزجلبک *D. salina* به غلظت‌های بالاتر مورد بررسی، ۱۰ و ۲۰

میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید برای سایر صفات پاسخ بهتری داد. با توجه به یافته‌های این پژوهش پیشنهاد می‌گردد که اگر هدف از کشت این گونه ریزجلبک تولید کاروتنوئید باشد، غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر جیبرلیک‌اسید می تواند کارآیی موثری داشته باشد ولی در صورتی که هدف تولید زیست‌توده خشک و لیپید باشد استفاده از غلظت‌های بالاتر جیبرلیک‌اسید یعنی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث تحریک و افزایش تولید زیست‌توده خشک و لیپید در این ریزجلبک خواهد شد. در مجموع استفاده از جیبرلیک‌اسید (GA_3) می تواند از طریق تنظیم مسیرهای متابولیک برای افزایش ترکیبات زیستی و زیست‌توده جلبک مورد مطالعه مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از مدیریت محترم مرکز رشد علم و فناوری بوشهر و همچنین مدیریت محترم آزمایشگاه مرکز توسعه فناوری ریزجلبک خلیج فارس وابسته به پارک علم و فناوری خلیج فارس بوشهر که در انجام این پروژه همکاری صمیمانه داشته‌اند، تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

References

Aftab, T., Khan, M.M.A., Idrees, M., Naeem, M., and Moinuddin. (2011). Optimizing nitrogen levels combined with gibberellic acid for enhanced yield, photosynthetic attributes, enzyme activities, and artemisinin content of *Artemisia annua*. Frontiers of Agriculture in China. 5(1): 51–59.

Aghaei, P. and Siahbalaei, R. (2012). Evaluation of survival, growth and pigment status under conditions of combined changes in carbon dioxide and light of the green alga Senedesmus obliquous. Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research. 7(26):18-26.

AK, I., Cirik, S. and Goksan, T., (2008). Effect of light intensity, salinity and temperature on growth in Camalti starin of Dunaliella viridis Teodoresco from Turkey. Journal of Biological Sciences. 8: 1356-1359.

Beheshtifar, S. and Shariati, M. (2015). Effect of Titanium on growth and synthesis of photosynthetic pigments in unicellular green alga *Dunaliella salina*. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology). 28(1): 42–52.

Ben-Amotz, A., Shaish, A., and Avron M. (1989). Mode of action of the massively accumulated beta-carotene of Dunaliella bardawil in protecting the alga against damage by excess irradiation. Journal of the Plant Physiology. 91(3): 1040–1043.

Bligh, E.G. and Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 37(8): 911-917.

Chia, M. A., Lombardi, A. T., and Melão, M. da G. G. (2013). Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. Anais Da Academia Brasileira de Ciencias. 85(4): 1427–1438.

Do, T.C.V., Tran, D.T., Le, T.G., and Nguyen Q.T. (2020). Characterization of endogenous auxins and gibberellins produced by *Chlorella sorokiniana* TH01 under phototrophic and mixtrophic cultivation modes toward applications in microalgal biorefinery and crop research. Journal of Chemistry.vol 2020: pp 1-11

Du, H., Ahmed, F., Lin, B., Li, Z., Huang, Y., Sun, G., … and Gao, Z. (2017). The effects of plant growth regulators on cell growth, protein, carotenoid, PUFAs and lipid production of *Chlorella pyrenoidosa* ZF strain. Energies. 10(11): 1696-1719.

Du, K., Tao, H., Wen, X., Geng, Y., and Li, Y. (2015). *Chlorella pyrenoidosa* by plant growth regulator GA_3. Fresenius Environmental Bulletin. 24: 3414-3419.

Falkowska, M., Pietryczuk, A., Piotrowska, A., Bajguz, A., Grygoruk, A., and Czerpak, R. (2011). The effect of gibberellic acid (GA_3) on growth, metal biosorption and metabolism of

the green algae *chlorella vulgaris* (chlorophyceae) beijerinck exposed to cadmium and lead stress. Polish Journal of Environmental Studies.20(1): 53–59.

Gao, Z., Meng, C., Zhang, X., Xu, D., Miao, X., Wang, Y., …and Ye, N. (2012). Induction of salicylic acid (SA) on transcriptional expression of eight carotenoid genes and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. Enzyme and Microbial Technology. 51(4): 225–230.

Ghasemi, M., Modarresi, M., Babaeian Jelodar, N., Bagheri, N., and Jamali, A. (2016). The Evaluation of Exogenous Application of Salicylic Acid on Physiological Characteristics, Proline and Essential Oil Content of Chamomile *(Matricaria chamomila* L.*)* under Normal and Heat Stress Conditions. Agriculture. 6(3): 1-31.

Ghorbani, A., Hosseini, M., and Ebrahimi, S., (2018). Investigation of light stress effect on Beta-carotene storage in pure and mixed cultures of microalgae. Nashrieh Shimi Va Mohandesi Shimi Iran. 37(2): 221-228. (in Persian)

Guillard, R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Culture of Marine Invertebrate Animals. pp 29–60.

Hashemi, S., Pajoum Shariati, F., Delavari Amrei, H., and Heydarinasab, A., (2019). Growth pattern and β-carotene production of *Dunaliella salina* cells in different salinities. Journal of Food Technology and Nutrition.16(4 (64)): 45-50.

Hosseini Tafreshi, A., and Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. Journal of Applied Microbiology. 107(1): 14–35.

Kiseleva, A. A., Tarachovskaya, E. R., and Shishova, M. F. (2012). Biosynthesis of phytohormones in algae. Russian Journal of Plant Physiology. 59(5): 595–610.

Lichtenthaler, H. K. (1988). In Vivo Chlorophyll Fluorescence as a Tool for Stress Detection in Plants. In Applications of Chlorophyll Fluorescence in Photosynthesis Research, Stress Physiology, Hydrobiology and Remote Sensing (pp. 129–142).

Lin, B., Ahmed, F., Du, H., Li, Z., Yan, Y., Huang, Y., and Gao, Z. (2018). Plant growth regulators promote lipid and carotenoid accumulation in *Chlorella vulgaris*. Journal of Applied Phycology. 30(3): 1549–1561.

Liu, Sh., Chen W., Qu L., Gai Y., and Jiang X. (2013). "Simultaneous determination of 24 or more acidic and alkaline phytohormones in femtomole quantities of plant tissues by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry." Analytical and Bioanalytical Chemistry. 405 (4): 1257–66.

Lv, H., Wang, Q. e., Wang, S., Qi, B., He, J., and Jia, S. (2019). Enhancing biomass production of *Dunaliella salina* via optimized combinational application of phytohormones. Aquaculture. 503: 146–155.

Madani, N. S. H., Shamsaie Mehrgan, M., Hosseini Shekarabi, S. P., and Pourang, N. (2021). Regulatory effect of gibberellic acid (GA_3) on the biomass productivity and some metabolites of a marine microalga, *Isochrysis galbana*. Journal of Applied Phycology. 33(1): 255–262.

Moradi, F., Sarmad, J., Ghafoori, H., and Sadat Naeemi, A. (2015). Total lipids content in the green microalgae of *Chlorella sp.* under nitrogen starvation stress. Aquatic Physiology and Biotechnology. 3(1):1–13.

Mansouri, H., and Talebizadeh, B. (2016). Effect of gibberellic acid on the *cyanobacterium nostoc linckia*. Journal of Applied Phycology. 28(4): 2187–2193.

Osório, C., Machado, S., Peixoto, J., Bessada, S., Pimentel, F. B., Alves, R. C., and Oliveira, M. B. P. P. (2020). Pigments content (Chlorophylls, fucoxanthin and phycobiliproteins) of different commercial dried algae. Separations. 7(2): 1–14.

Pan, X., Chang, F., Kang, L., Liu, Y., Li, G., and Li, D. (2008). Effects of gibberellin GA_3 on growth and microcystin production in *Microcystis aeruginosa* (cyanophyta). Journal of Plant Physiology. 165(16): 1691–1697.

Park, W. K., Yoo, G., Moon, M., Kim, C. W., Choi, Y. E., and Yang, J. W. (2013). Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production. Applied Biochemistry and Biotechnology.

171(5): 1128–1142.
Pourkarimi, S., Hallajisani, A., Nouralishahi, A., Alizadehdakhel, A., and Golzary, A. (2020). Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 29 (July):(101771):1-14.
Ravishankar, G. A., Ambati, R. R., and Paniagua-Michel, J. (2019). *Dunaliella salina*. Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals. pp 139–147.
Richmond A., (2004). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Publishing Company, pp 566.
Rivkin R.B., (1989). Influence of irradiance and specteral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. I. Photosynthesis, chemical composition and growth. Journal of Marine Ecology Progress Series. 5: 291-304.
Salmaninejad M. (2015). Effect of culture mediums and light intensity on growth and carotenoides of *Dunaliella salina* in Urmia lake. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology). 28(4): 771 – 783.(In Persian)
Sivaramakrishnan, R., and Incharoensakdi, A. (2020). Plant hormone induced enrichment of *Chlorella* sp. omega-3 fatty acids. Biotechnology for Biofuels. 13(1): 1–14.
Smith, D. R., Lee, R. W., Cushman, J. C., Magnuson, J. K., Tran, D., and Polle, J. E. W. (2010). The *Dunaliella salina* organelle genomes: Large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA. BMC Plant Biology. 10(83): 1-14.
Sponsel, V. M., and Hedden, P. (2010). Gibberellin biosynthesis and inactivation. Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!, 63–94.
Stirk, W. A., and van Staden, J. (2020). Potential of phytohormones as a strategy to improve microalgae productivity for biotechnological applications. Biotechnology Advances. 44(May): 107612.
Stirk WA, Tarkowská D, Gruz J, Strnad M, Ördög V., and van Staden J. (2019). Effect of gibberellins on growth and biochemical constituents in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). South African Journal of Botany. 126: 92–98.
Sun, X. M., Ren, L. J., Zhao, Q. Y., Ji, X. J., and Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. Biotechnology for Biofuels, 11(1): 1–16.
Tang, H., Abunasser N., Garcia, M.E.D., Chen, M., Simon, N.K.Y. and Salley, S. O., (2010). Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. Journal Applied Energy. 9(5):1-7.
Trenkenshu, R.P., Gevorgiz, R.G. and Borovkov, A.B., (2005). The experience of industrial cultivation *Dunaliella salina*. Sevastopol. 90-97.
Trinh, C. T., H. T. Thanh, and T. V. Bui. (2017). "Effects of plant growth regulators on the growth and lipid accumulation of *Nannochloropsis oculata* (droop) hibberd." AIP conference proceedings. 1878.
Verma, I., Roopendra, K., Sharma, A., Chandra, A., and Kamal, A. (2019). Expression analysis of genes associated with sucrose accumulation and its effect on source–sink relationship in high sucrose accumulating early maturing sugarcane variety. Physiology and Molecular Biology of Plants. 25(1): 207–220.
Widdel, F. (2010). Theory and Measurement of Bacterial Growth, 1–11.
Willette, S., Gill, S. S., Dungan, B., Schaub, T. M., Jarvis, J. M., St. Hilaire, R., and Holguin, F. O. (2018). Alterations in lipidome and metabolome profiles of *Nannochloropsis salina* in response to reduced culture temperature during sinusoidal temperature and light. Algal Research. 32(February 2017): 79–92.
Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. Annual Review of Plant Biology. 59: 225–251.
Yu, X. J., Sun, J., Sun, Y. Q., Zheng, J. Y., and Wang, Z. (2016). Metabolomics analysis of phytohormone gibberellin improving lipid and DHA accumulation in *Aurantiochytrium* sp. Biochemical Engineering Journal. 112: 258–268.
Zarandi-miandoab, L., Hejazi, M. and Nasiri, M. (2014). Effect of the hormone gyaahi

gibberellic acid and the content of the piegments *Dunaliella salina*. The 4th Iranian National Conference of Plant Physiology. Tehran, Iran (In Persian).

Zarandi-miandoab, L., and Hejazi, M. (2015). Light intensity effects on some molecular and biochemical characteristics of *Dunaliella salina*. Iranian Journal of Plant Physiology. 5 (2): 1311–1322.