بررسی اثر هورمونهای اکسین و سیتوکینین بر رشد و محتوای رنگیزه‌ها و پروتئین جلبک *Chlorella sorokiniana*

آمنه جمشیدی[۱*]، محمدعلی ابراهیمی[۲]، طیبه رجبیان[۳]، غلامرضابخشی خانیکی[۲] و شهلا مظفری[۴]

[۱] **تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی**

[۲] **تهران، دانشگاه پیام نور، گروه کشاورزی**

[۳] **تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی**

[۴] **تهران، دانشگاه پیام نور، گروه شیمی**

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۱۶

چکیده

جلبک‌های کلرلا به‌عنوان دارو، غذای آبزیان و بیوفیلتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این دیدگاه، بالا بردن بیوماس و برخی متابولیت‌های آن حایز اهمیت اقتصادی است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر تحریکی برخی هورمونهای گیاهی بر بیوماس و محتوای متابولیت‌های مهم جلبک *Chlorella sorokiniana* بود. در این پژوهش جلبک در محیط کشت پایه Bold تغییر یافته کشت شد. به محیط‌کشت ۵ گرم در لیتر گلوکزمنو هیدرات و نسبت‌های مختلف هورمون‌های نفتالن استیک اسید (NAA)، بنزیل‌آمینوپورین (BAP)، ایندول استیک اسید (IAA) و ایندول بوتیریک اسید (IBA) افزوده شد. وزن خشک، محتوای رنگیزه‌ها و پروتئین در این تیمارها اندازه‌گیری شد. این صفات رشد، در ۷۵٪ محیط کشت‌های حاوی NAA+BAP افزایش یافت و این افزایش در تیمار با NAA (۱۰ میلی‌گرم در لیتر) +BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) نسبت به شاهد معنی دار بود. در تیمار IAA (۱ میلی‌گرم در لیتر) + BAP (۲ میلی‌گرم در لیتر) وزن خشک و مقدار کلروفیل a بطور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. وزن خشک و محتوای پروتئین و رنگیزه‌ها، در تیمار با غلظت‌های IBA + BAP یا اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان نمی‌داد یا کاهش می‌یافت. بیشترین وزن خشک، تعداد سلول، محتوای رنگیزه‌ها و پروتئین، نسبت به شاهد در تیمارهای NAA+ BAP مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که هورمون‌های BAP، NAA و IAA به‌ترتیب بیشترین اثر افزایشی را بر صفات رشد مورد بررسی داشتند و IBA اثر چندانی بر این صفات نداشت.

واژه‌های کلیدی: *Chlorella sorokiniana*، هورمون‌های گیاهی، پروتئین، رنگیزه‌های فتوسنتزی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۸۸۴۳۰۳۵، پست الکترونیکی: ameneh.jamshidi@gmail.com

مقدمه

جلبک های کلرلا، جلبک های مفیدی هستند که درصنایع غذایی، به عنوان غذای آبزیان و غذای دام و طیور و در صنایع دارویی و همچنین به عنوان بیوفیلتر موارد استفاده متعددی دارند (۳۸). به دلیل کاربرد متعدد این جلبک ها کشت و افزایش بیوماس آنها ارزشمند است. یکی از راه های افزایش رشد، کاربرد هورمونهاست. تغییرغلظت هورمونهای موجود در جلبک ها می تواند سبب تغییر رشد آنها گردد (۳۳،۷). برخی فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول های جلبکی مثل افزایش ابعاد و تعداد سلول، تغییر محتوای قندها، پروتئین، آنزیم ها ورنگیزه ها تحت کنترل چنین هورمون هایی هستند (۳۸). البته مسیر عملکرد فیتوهورمون ها در جلبک ها هنوز

ناشناخته است (۳۷). محققان غلظت جیبرلین و براسینواستروئیدها را در تعدادی از جلبک‌های خانواده کلروفیسه (Chlorophyceae) تعیین کردند (۳۳) و محققانی نیز اثر نور و تاریکی را بر رشد و مقدار هورمون های جلبک *Chlorella minutissima* مورد بررسی قرار دادند. بیشترین مقدار هورمون های ایندولی در تاریکی در محیط کشت حاوی گلوکز گزارش شده بود. درحالی که کشت های جلبکی قرار گرفته درمحیط فاقد گلوکز، با فتوپریود، ۱۶ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی حاوی مقادیر بیشتری سیتوکینین بودند (۳۴). در تحقیقی، اثر اکسین های طبیعی IAA وIBA و اکسین های سنتزی NAA و فنیل استیک اسید (PAA) بر روی متابولیت ها، رشد و پاسخ آنتی اکسیدانی*Chlorella vulgaris* مورد بررسی قرار گرفت.

IAA و IBA در غلظتهای کمتری از NAA و PAA سبب حداکثر افزایش تعداد سلول ها در این جلبک شدند. در این غلظت ها، محتوای رنگیزه های فتوسنتزی وپروتئین های محلول نیز افزایش یافت (۲۶). در برخی مطالعات از دو و یا چند هورمون برای افزایش رشد استفاده شده است. برای مثال در تحقیقی اثرات سازگار اکسین ها و براسینواستروئیدها برروی جلبک *C. vulgaris* بررسی شد. در این بررسی اکسین های IBA و IAA به تنهایی و یا همراه با براسینواستروئیدها مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب اکسین و براسینواستروئید تکثیرسلول ها و انباشت متابولیت ها (کلروفیل کل، پروتئین کل و مونوساکاریدها) را تقریبا ۳ تا ۴ برابر بیشتر از استفاده از یک هورمون تنها، افزایش می داد (۷). درتحقیقی دیگر، اثر برهم‌کنش براسینواستروئیدها وسیتوکینین‌ها (ترانس زآتین، دی فنیل اوره وکینتین) بر روی رشد جلبک *C. vulgaris* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق نشان داد که سلول های جلبکی نسبت به سیتوکینین‌ها با افزایش تعدادسلول‌ها حساسیت نشان می دهند و سیتوکینین‌ها با براسینواستروئیدها بطور سازگار عمل می‌کنند و بیشترین اثر (تقسیم سلول‌ها، انباشت پروتئین، کلروفیل و مونوساکاریدها) در ترکیب براسینولید با ترانس زآتین به دست آمد وکمترین اثر در ترکیب ۲۸ همو کاستاسترول با ۱،۳ دی فنیل اوره بدست آمد. در اثر عملکرد سازگار دو نوع هورمون، تعداد سلول‌ها و محتوای متابولیت‌ها تقریبا به ۲/۵ تا ۳ برابر زمانی رسید که یک هورمون به تنهایی مورد استفاده قرار گرفته بود (۴). درپژوهشی دیگر اثر دو هورمون ۴،۲ دی کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D) و کینتین در غلظت‌های مختلف بر جلبک *Haematococcus pluvialis* بررسی شد. نتایج نشان داد این جلبک در غلظت ۱میلی گرم در لیتر 2,4-D و۱میلی گرم در لیتر کینتین ۲۹۷٪ نسبت به شاهد افزایش رشد (تعداد سلول) نشان داد (۱۶). در پژوهش دیگری اثر تحریک کننده‌های بیوشیمیایی بر بیوماس و محتوای متابولیت‌ها در *C. sorokiniana* آزمایش شد. در این مطالعه از NAA همراه با هورمون‌های دیگر استفاده شد. ترکیب هورمونیNAA همراه با اکسین های دیگر هیچ اثر سازگاری و یا ناسازگاری بر صفات مورد مطالعه نداشت، اما ترکیب آن با زآتین یا ژیبرلین سبب افزایش رشد گردید (۱۴). استفاده از گلوکز در محیط کشت نیزسبب افزایش بیوماس *C. vulgaris* در کشت میکسوتروف (mixotroph) شد (۲۰). با توجه به اهمیت-های متعدد کاربردی *C. sorokiniana* در این تحقیق اثرغلظت‌های برخی هورمون‌های اکسین (طبیعی و مصنوعی) و سیتوکینین بطور ترکیبی برروی رشد،محتوای رنگیزه‌ها و پروتئین این جلبک در کشت میکسوتروف مورد بررسی قرار خواهد گرفت، تا بهترین ترکیب های هورمونی با بیشترین اثر تحریکی بر افزایش صفات مورد مطالعه برای اهداف کاربردی معرفی شوند.

مواد و روشها

مواد اولیه و شرایط رشد: جلبک *C. sorokiniana* (IBRC-M 5008) از مرکز ذخایر ژنتیکی و بیولوژیکی ایران خریداری شد. مواد مورد نیاز از شرکت مرک خریداری شد. جلبک ها در محیط کشت پایه

Bold (Bold Basal Medium:BBM) اصلاح شده (۲) با کمی تغییر (با استفاده ۰/۰۷۵ گرم درلیتر KH_2PO_4) کشت شد. به منظور دسترسی به منبع کربن، به محیط های کشت ۵گرم در لیتر گلوکزمنوهیدرات افزوده شد (۱۹). هورمون-های NAA، BAP، IAA و IBA پس از تهیه در غلظت-های مورد نظر به محیط‌های کشت اضافه شد (۲۶،۱۶،۹،۷). pH محیط کشت با سود ۱نرمال به ۶/۸ رسانده شد. محیط کشت ها به فلاسک های ۲۵۰میلی لیتری حاوی ۱۰۰میلی لیتر محیط کشت منتقل شد و به مدت۲۰دقیقه در دمای۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار۱ اتمسفر در دستگاه اتوکلاو سترون شد. برای کشت نمونه-های جلبکی، یک میلی لیتر سلول جلبکی در فاز لگاریتمی به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت تلقیح شد. فلاسک‌ها دراتاق کشت بر روی شیکر انکوباتور (GFL,3031, Germany) با ۱۲۵ دور در دقیقه در دمای ۱±۲۵ درجه سانتیگراد و شرایط نور (لامپ‌های فلوئورسنت، ۵۰ مول بر متر مربع بر ثانیه) و فتوپریود ۱۲ ساعت نور ۱۲ ساعت تاریکی قرارگرفت. فلاسک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در این شرایط نگهداری شد و بعد وزن خشک و تعداد سلول‌ها و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی وپروتئین جلبک پس از ۷۲ ساعت کشت اندازه گیری شد. آزمایش‌ها با روش کاملا تصادفی انجام شد. تیمارها ۴ بارتکرار شد. ترکیبات هورمونی و گلوکز طبق جدول ۱ به محیط های کشت افزوده شد.

جدول۱- محیط کشت ها وغلظت ترکیبات هورمونی وگلوکز استفاده شده در یک لیترBBM

هورمون / محیط	NAA (میلی گرم در لیتر)	IBA (میلی گرم در لیتر)	IAA (میلی گرم در لیتر)	BAP (میلی گرم در لیتر)	گلوکزمنوهیدرات (گرم در لیتر)
A	۵	۰	۰	۱	۵
B	۵	۰	۰	۲	۵
C	۱۰	۰	۰	۱	۵
D	۱۰	۰	۰	۲	۵
E	۰	۵	۰	۱	۵
F	۰	۵	۰	۲	۵
G	۰	۱۰	۰	۱	۵
H	۰	۱۰	۰	۲	۵
I	۰	۰	۱	۱	۵
J	۰	۰	۱	۲	۵
K	۰	۰	۹	۱	۵
L	۰	۰	۹	۲	۵
M (شاهد)	۰	۰	۰	۰	۵

اندازه‌گیری صفات رشدی

۱- تخمین وزن خشک: ۴۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی سلول جلبکی، ۱۰ دقیقه در g ×۴۰۰۰ سانتریفیوژ (Sigma, 2-16pk, Germany) و روشناور دور ریخته شد و رسوب جلبکی با آب مقطر شستشو شد و بلافاصله در g ×۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. قرص جلبکی حاصل، ۷۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و بعد توزین گردید (۳).

۲- شمارش تعداد سلول: شمارش سلول های جلبک توسط لام نئوبار انجام گردید (۷). هر شمارش ۴ بار تکرار شد. ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون جلبک برداشت و رقیق

شد، پس از هم زدن، ۲۰ میکرولیتر از آن روی لام نئوبار قرارگرفت. تعداد سلول جلبک در میلی لیتر طبق معادله زیر تعیین شد (۱).

میانگین عدد شمارش شده در مربع بزرگ (۰/۱ میلی‌متر مکعب) ×ضریب رقت×$۱۰^{۴}$= تعداد سلول جلبک در میلی لیتر

اندازه‌گیری محتوای پروتئین: برای سنجش محتوای پروتئین جلبک خشک شده (۳۰) با هاون پودر شد. به ۵ میلی گرم از ماده خرد شده ۱میلی لیتر سود (۰/۵ مولار) افزوده و به هم زده تا یکنواخت شد. نمونه ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری و گاه‌گاهی به هم زده شد، سپس در دمای آزمایشگاه سرد شد. نمونه در g × ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد و روشناور به لوله دیگری انتقال یافت و برای تعیین پروتئین مورد آزمایش قرار گرفت (۱۹). بدین منظور، ۱/ ۰ میلی لیتراز محلول حاوی پروتئین به ۵ میلی لیتر معرف برادفورد افزوده شد وپس از تکان دادن در ۲دقیقه جذب در۵۹۵ نانومتر با اسپکتروفتومتر (Shimadzu, UV mini 1240, Japan) خوانده شد. منحنی استاندارد، با سرم آلبومین گاوی ترسیم شد (۱۸). غلظت سرم آلبومین طبق معادله y = ۰/۰۰۹۶x محاسبه گردید (x= غلظت سرم آلبومین وy= میزان جذب). سپس درصد پروتئین بر حسب میلی گرم در ۱۰۰میلی گرم وزن خشک محاسبه شد (۱۹،۱۴).

اندازه‌گیری محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی: یک میلی لیتر از سوسپانسیون جلبکی در g ×۴۰۰۰سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب جلبکی متانول۹۹/۹٪ (v/v) افزوده شد و در تاریکی نگهداری تا کاملا سفید شد (۱۴)، سپس درg ×۲۰۰۰سانتریفیوژ شد وجذب محلول متانولی با اسپکتروفتومتردر طول موج های۶۶۵/۲ ، ۶۵۲/۴ و۴۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. محتوای کلروفیل a، b و کاروتنویید بر حسب میکرو گرم در میلی لیتر طبق فرمول های زیر محاسبه گردید(۴۰) و محتوای رنگیزه های فتوسنتزی براساس میکروگرم در یک میلی لیتر سوسپانسیون جلبک بیان شد(۱۴).

کلروفیل a =(۱۶/۷۲A ۶۶۵/۲) – (۹/۱۶ A ۶۵۲/۴)

کلروفیل b =(۳۴/۰۹ A ۶۵۲/۴) –(۱۵/۲۸A ۶۶۵/۲)

کاروتنوییدها = [(۱۰۰۰A۴۷۰) –

۲۲۱ ÷ [(۱۰۴/۹۶× کلروفیل b)– (۱/۶۳× کلروفیل a)

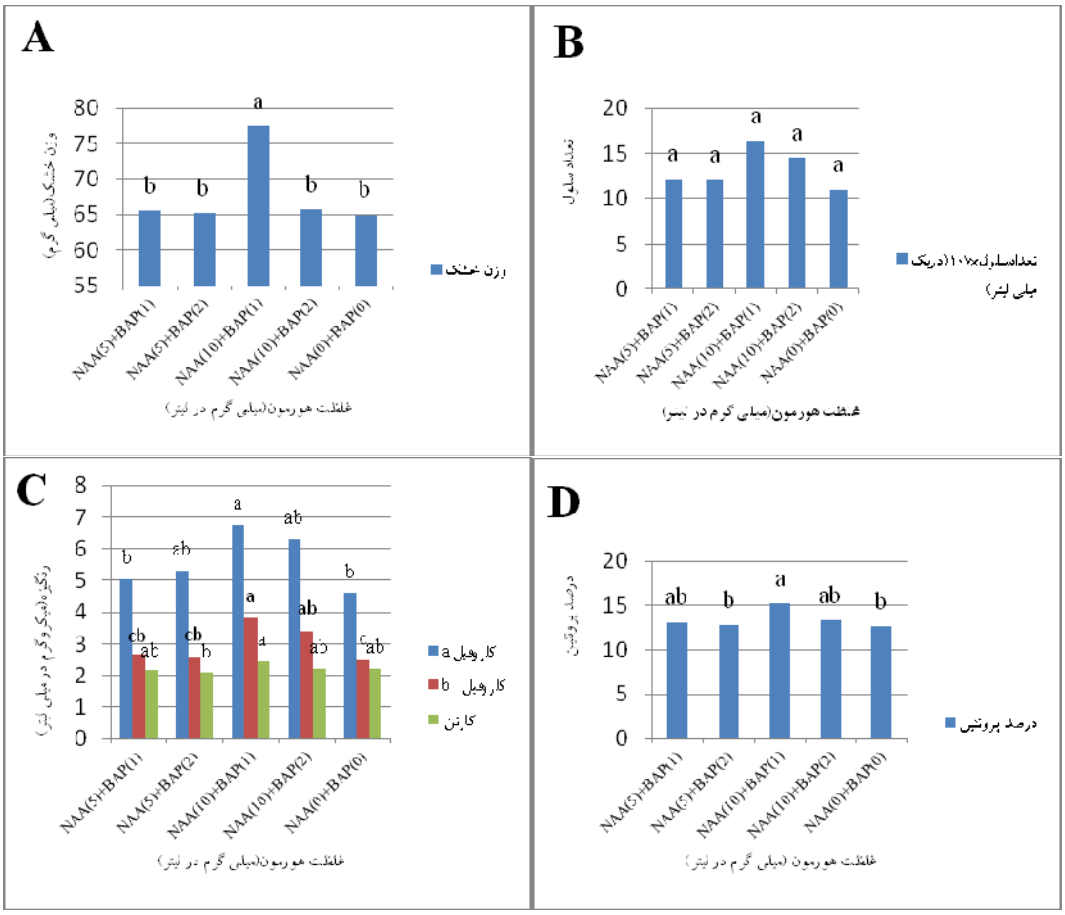
محاسبات آماری: آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS(version13) با تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن و معنی داری در سطح P≤ ۰/۰۵ تعیین شد. شکل ها با نرم افزار Excel رسم شد.

نتایج

بررسی اثر ترکیبی غلظت‌های مختلف NAA+ BAP : وزن خشک، تعداد سلول، مقدار رنگیزه ها و پروتئین در ۷۵٪ از محیط های حاوی NAA+BAP نسبت به شاهد افزایش یافت. اما فقط در تیمار با NAA (۱۰میلی گرم در لیتر)+BAP (۱میلی گرم در لیتر) این افزایش معنی دار بود، که مقادیر آن در تیمار وشاهد به‌ترتیب وزن خشک، ۷۷/۵ و۶۴/۹۵ میلی گرم، محتوای کلروفیلa ، ۶/۷۶و۴/۶ میکرو گرم در میلی لیتر ، کلروفیلb، ۳/۸و۲/۴۷ میکرو گرم در میلی لیتر و پروتئین، ۱۵/۲۷و۱۲/۶۸میلی گرم درصد میلی گرم وزن خشک می باشد (شکل۱: A,C,D). البته تعدادسلول در تیمار وشاهد به‌ترتیب $۱۰^{۷}$× ۱۶/۳۸ و $۱۰^{۷}$× ۹۸/ ۱۰ در میلی لیتر می باشد اما افزایش تعداد سلول، در سطح P≤ ۰/۰۵ معنی دار نبود (شکل۱: B). ولی در سطح بالاتر، P≤ ۰/۱۵ اختلاف معنی داری مشاهده می شد.

بررسی اثر ترکیبی غلظت‌های مختلف IBA+ BAP : در تیمار با IBA (۵ میلی گرم در لیتر)+ BAP (۱میلی گرم درلیتر) وزن خشک و محتوای متابولیت‌ها مشابه شاهد بود، ولی در سایر تیمارهای IBA+ BAP وزن خشک، تعداد

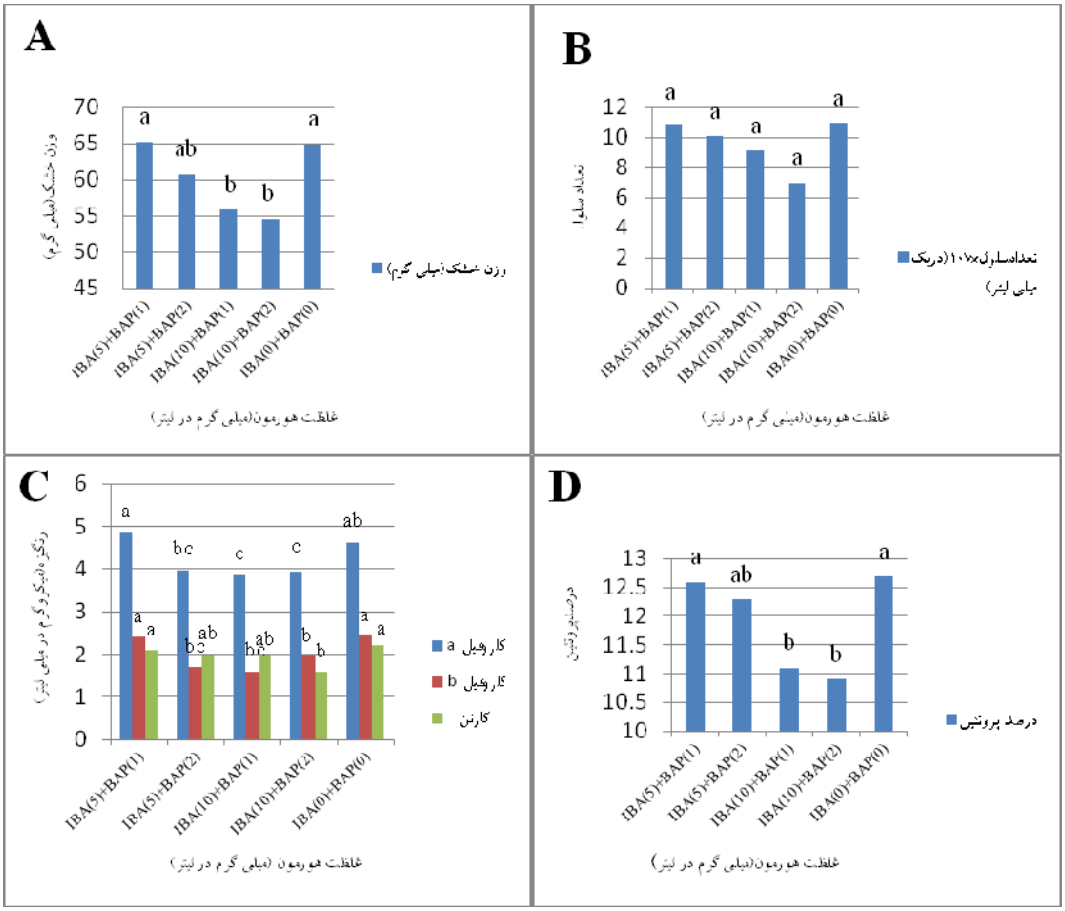
سلولها ومحتوای متابولیت‌ها نسبت به شاهدکاهش یافت. محتوای کلروفیل b، در تیمار با IBA (۵ میلی گرم در لیتر)+ BAP (۲میلی گرم درلیتر) ،۱/۷ میلی گرم درلیتر نسبت به شاهد۲/۴۷ میلی گرم در لیتر کاهش معنی داری نشان می داد. در تیمار با IBA (۱۰میلی گرم در لیتر) + BAP (۱-۲میلی گرم درلیتر) بیشتر صفات رشد بطور معنی داری نسبت به شاهد کاهش یافت، در این تیمارها وشاهد به‌ترتیب وزن خشک، ۵۵/۹، ۵۴/۶ و ۶۴/۹۵ میلی گرم، محتوای کلروفیلa، ۳/۸۶، ۳/۹۵ و۴/۶۲ میکروگرم در میلی لیتر، کلروفیلb، ۱/۶، ۲و ۲/۴۷ میکروگرم در میلی لیتر و درصد پروتئین ۱۱/۱، ۱۰/۹و۱۲/۶۸ میلی گرم در ۱۰۰ میلی گرم وزن خشک بود که در این تیمارها، مقادیر این صفات کاهش معنی داری را نسبت به شاهد نشان می داد (شکل۲: A,C,D).



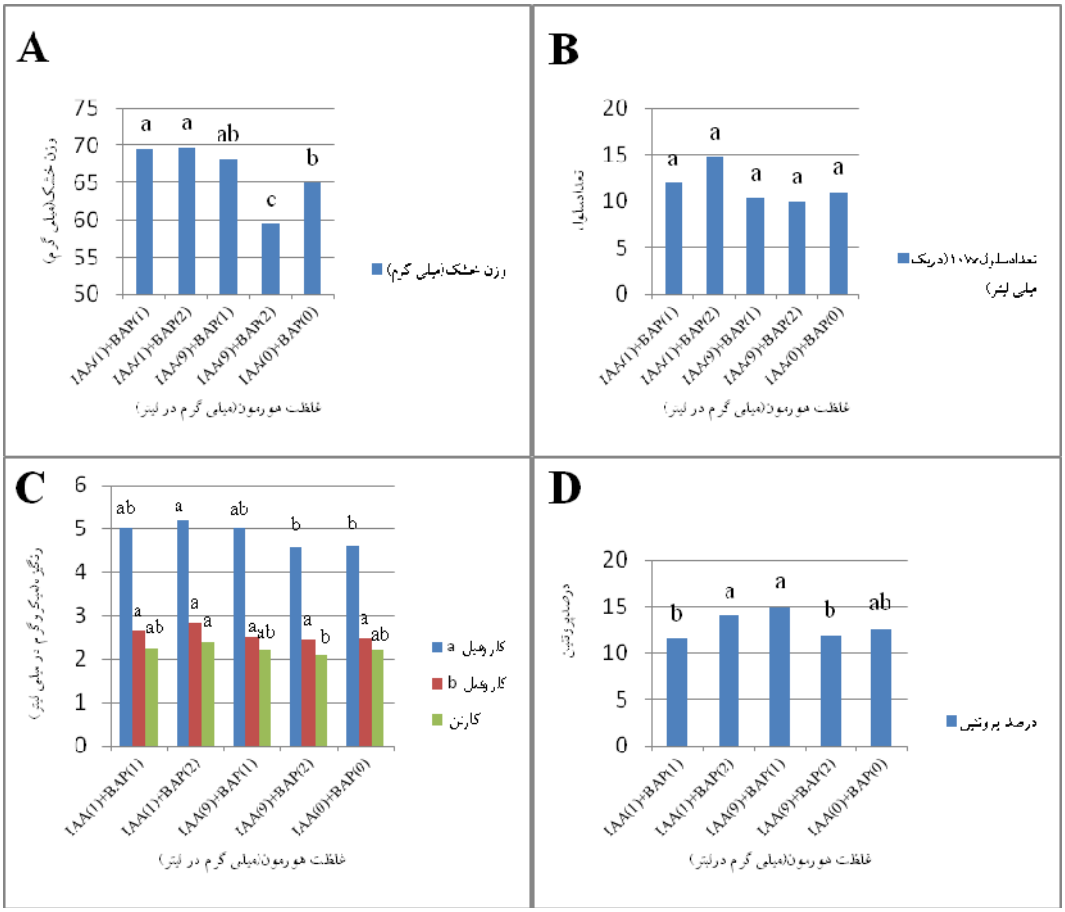
شکل ۱- بررسی اثر غلظت های مختلف NAA + BAP بر برخی صفات رشدی در جلبک *C. sorokiniana* کشت شده درمحیط کشت BBM. (A) وزن خشک، (B) تعداد سلول × ۱۰^۷در یک میلی لیتر، (C) محتوای رنگیزه ها (کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید) میکروگرم در یک میلی لیتر سوسپانسیون جلبک و(D) درصد پروتئین(میلی گرم در ۱۰۰میلی گرم وزن خشک). میانگین‌هایی که برای هر صفت دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون دانکن در سطح P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

از نظر تعداد سلول ها ووجود توده های سلولی نیز تیمار با IBA (۵ میلی گرم در لیتر)+ BAP (۱میلی گرم درلیتر)، ۹×۱۰^{۷}/ ۱۰ در میلی لیتر مشابه شاهد ($۱۰/۹۸\times۱۰^{۷}$ در میلی لیتر) بود(شکل۲: A) ولی در بقیه تیمارهاکاهش غیر معنی داری را در سطح P≤۰/۰۵ نشان می داد.

بررسی اثر ترکیبی غلظت‌های مختلف IAA+ BAP : در ۷۵٪ از تیمارهای IAA+BAP وزن خشک، تعداد سلول و محتویات رنگیزه ها نسبت به شاهد افزایش یافت. اما فقط در تیمار با IAA (۱میلی گرم در لیتر) +BAP (۱ میلی گرم در لیتر) وزن خشک(۶۹/۵۸ میلی گرم) نسبت به شاهد (۶۴/۹ میلی گرم) معنی دار است ودر تیمار با IAA (۱میلی گرم در لیتر) +BAP (۲ میلی گرم درلیتر) وزن خشک(۶۸/۷۴ میلی گرم) نسبت به شاهد (۶۴/۹ میلی گرم) و محتوای کلروفیلa (۵/۲ میکروگرم در میلی لیتر) نسبت به شاهد (۴/۶۲ میکروگرم در میلی لیتر) بطور معنی داری افزایش یافت (شکل۳: A,C). ازنظردرصدپروتئین، اختلاف معنی داری بین تیمارها وشاهد مشاهده نمی شد (شکل۳: D).



شکل ۲- بررسی اثر غلظت های مختلف IBA + BAP بر برخی صفات رشدی در جلبک *C. sorokiniana* کشت شده درمحیط کشت BBM. (A) وزن خشک، (B) تعداد سلول × $۱۰^{۷}$در یک میلی لیتر، (C)محتوای رنگیزه ها (کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید) میکروگرم در یک میلی لیتر سوسپانسیون جلبک و(D) درصد پروتئین (میلی گرم در ۱۰۰میلی گرم وزن خشک). میانگین‌هایی که برای هر صفت دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون دانکن در سطح P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.



شکل ۳ – بررسی اثر غلظت های مختلف IAA + BAP بر برخی صفات رشدی در جلبک *C. sorokiniana* کشت شده درمحیط کشت BBM. (A) وزن خشک، (B) تعداد سلول × 10^7در یک میلی لیتر، (C) محتوای رنگیزه ها (کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید) میکروگرم در یک میلی لیتر سوسپانسیون جلبک و(D) درصد پروتئین (میلی گرم در ۱۰۰میلی گرم وزن خشک). میانگین‌هایی که برای هر صفت دارای حروف مشابه می‌باشند براساس آزمون دانکن در سطح P≤ ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

بحث

غلظت های متفاوتی برای غلظت بهینه فیتوهورمون ها برای رشد (تعداد سلول) جلبک کلرلا گزارش شده است. غلظت ppm ۵۰ (۲۸۵ میکرومول IAA، ۲۴۶ میکرومول IBA) (۹)، ۵۰ میکرومول (۷) و ۰/۱ میکرومول IAA و IBA (۲۶) و غلظت ۱۰،۱۰۰ ، ۱و۰/۰۱ میکرومول BAP (۳۸) و غلظت ppm ۵۰ (۲۶۸/۵میکرومول) (۹) و ۱ میکرومول NAA (۲۶) که نشان می دهد شرایط متفاوت آزمایشگاه ها از نظر نوع محیط کشت و مواد ضمیمه به آن، هوادهی، منبع کربن(۲۰)، میزان نور(۳۴)، مدت زمان کشت(۱۴)، فتوپریود(۳۴)، میزان رادیکال آزاد اکسیژن در سلول(۲۶)، نوع جلبک، تفاوت محتوای پروتئین های گیرنده اکسین در سلول ها وگونه های مختلف جلبک (۱۴) و بیشتر از همه میزان هورمون های درونی جلبک، باعث تغییر در نتایج تأثیر هورمون ها شده است. در مواردی، اکسین ها با اثر بر دیواره سلولی، فعال سازی پمپ ATPase و طویل شدن سلول بر جلبک ها تأثیر می‌گذارند (۳۴). شواهد بسیاری هم نشان می دهندکه اکسین های طبیعی ومصنوعی تقسیم سلولی را در گیاهان عالی وجلبک ها تحریک می کنند (۴، ۳۲). استفاده از IAA سبب تقسیم سلولی وتشکیل کلنی های چهار سلولی به

جای سه سلولی در *Scenedesmus obliquus* و *Scenedesmus armatus* شد (۲۴). Kawano (۲۰۰۳) پیشنهاد کرد که اکسین ممکن است رشد سلول را از طریق مهار رادیکال آزاد اکسیژن انجام دهد. در طی سست شدن دیواره سلولی توسط اکسین، ممکن است رادیکال آزاد اکسیژن ماده اصلی مکانیزم بیوشیمیایی باشد (۱۷). گزارش‌ها نشان داده که پاسخ سلول های جلبک به اکسین های خارجی توسط تغییرات سطح اکسیداتیو دنبال می شود. اکسین خارجی سبب افزایش سطح فعالیت آنزیم های مهار کننده رادیکال آزاد اکسیژن می شود و اثر اکسین توسط این آنزیم ها میانجی‌گری می شود (۲۶). اکسین های طبیعی(IAA) ومصنوعی(2,4,D) می توانند فعالیت آنزیم هایی مثل کاتالاز وپراکسیداز راتحریک کنند که منجر به نوپدیدی جوانه در کشت بافت گندم می شود(۳۶). برای رسیدن به حد بهینه تقسیم سلولی وتولید متابولیت در جلبک، کنترل دقیق مقادیرH_2O_2 ضروریست. مکانیزم اثر اکسین در سلول های جلبک به استرس اکسیداتیو وابسته است که استرس اکسیداتیو نیز تحت کنترل ماشین آنتی اکسیدانی سلولی است. اکسین های طبیعی ومصنوعی تجمع رادیکال آزاد اکسیژن را ظرف۴۸ ساعت کاهش می دهند. کاهش رادیکال آزاد اکسیژن سبب پیشرفت چرخه سلولی وتمایز دیواره ثانویه سلول می شود. به این شکل اکسین اکسیداسیون واحیا سلولی را تنظیم می کند (۲۶) و ازتجزیه اکسیداتیو رنگیزه های فتوسنتزی وپروتئین ها جلوگیری می کند(۲۶،۹). اکسین ها اثرات تحریک کننده روی اتصال CO_2 با ریبولوزبیس فسفات و فسفریلاسیون فتوسنتزی دارند (۲۷)، بنابراین، با افزایش فتوسنتز سبب افزایش رشد می شوند. اثر سیتوکینین تحریک تقسیم سلول، موجب فعال سازی رشد و تولید پروتئین و تشدید برخی فرایندهای فتوسنتزی جلبک می‌شود (۱۸،۴). در این پژوهش نیز در مواردی که در اثرکاربرد غلظت های ترکیبی مناسب اکسین وسیتوکینین، رشد افزایش یافته، علت افزایش رشد، افزایش تقسیم سلولی وافزایش تعداد سلول ها و تشکیل بیشتر توده های سلولی بود، افزایش معنی دار محتوای رنگیزه ها وپروتئین نیز در این تیمارها هم به دلیل افزایش تعداد سلول و هم جلوگیری از تخریب کلروفیل و پروتئین، در اثر مسیرهای عملکرد این هورمون ها بود (۲۶،۹). این افزایش، در ترکیبNAA وIAA باBAP مشاهده گردید. در تیماربا NAA (۱۰میلی گرم در لیتر) +BAP (۱میلی گرم در لیتر) بیوماس وسایرصفات رشد، به شکل معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت، که این نتیجه مطابق گزارش محققان (۹) است که حداکثر رشد (وزن خشک) جلبک *Chlorella pyrenoidosa* را در غلظت۵۰ میکرومول (۹/۳ میلی گرم در لیتر) به دست آوردند و مشابه گزارش هایی (۱۵،۱۴) در مورد جلبک *C. sorokiniana* می باشد که از ترکیب NAA (۵ میلی گرم در لیتر)+ زاتین (۱میلی گرم در لیتر) و NAA (۵ میلی گرم در لیتر)+ اتانول (۰/۵میلی لیتر در لیتر) استفاده گردید، که این تیمارها، به ترتیب سبب ۱۳۶٪ و ۱۲۰٪ افزایش رشد (بیوماس) جلبک شد. در تیمار های IAA (۱میلی گرم در لیتر معادل ۵/۷ میکرومول) + BAP (۱میلی گرم در لیتر معادل ۴/۴ میکرومول) وزن خشک و در تیمار با IAA (۱میلی گرم در لیتر) + BAP (۲میلی گرم درلیتر) وزن خشک و محتوای کلروفیل a نیز بطور معنی داری نسبت به شاهد افزایش یافت که نتیجه کنونی، نزدیک به گزارش محققان است که حداکثر رشد (تعداد سلول) جلبک *C. vulgaris* را در غلظت ۰/۱ میکرو مول IAA به دست آوردند (۲۶). در تیمار با IAA (۹میلی گرم در لیتر معادل ۵۱/۳ میکرومول) + BAP (۱میلی گرم در لیتر) نیز افزایش وزن خشک و محتوای رنگیزه ها و پروتئین مشاهده شد ولی افزایش معنی دار نبود که با گزارش محققان (۷) که حداکثر رشد (تعدادسلول) *C. vulgaris* را در ۵۰ میکرومول IAA به تنهایی وهمراه با براسینواستروئید به دست آورده بودند نزدیک است، ولی مطابقت ندارد. علت این اختلاف احتمالا بدین سبب است که در پژوهش کنونی وجود گلوکز درمحیط کشت سبب افزایش درون زای

اکسین شده(۳۴)، درنتیجه حداکثر رشد، با افزودن اکسین کمتر (۵/۷ میکرومول) نسبت به گزارش محققان (۵۰ میکرومول) به دست آمد. در این پژوهش، علی رغم افزایش معنی دار وزن خشک در سطح P≤ ۰/۰۵ ، افزایش تعداد سلول اختلاف معنی داری را نشان نمی داد [شکل های ۱و۳ (A و B)]. این نتایج مشابه گزارشی است که تیمار جلبک *C.sorokiniana* با هورمون ها انجام داد و در تیمار با کینتین، علی رغم معنی داربودن افزایش بیوماس، تعداد سلول ها اختلاف معنی داری را با شاهد نشان نداد (۲۴). در مواردی با کاربرد اکسین وسیتوکینین تغییر معنی داری در رشد مشاهده نمی شود که احتمالا به این علت است که اکسین برای حفظ ثبات غلظت اکسین درونی تخریب یا غیرفعال (اتصال اکسین)شده (۱۰،۵)، یا از جلبک به خارج دفع شده است. ژنهای مسئول بیوسنتز ومتابولیسم اکسین در گروهی ازگونه های کلروفیسه شناسایی شده اند(۱۰). طبق گزارش هایی سلول های *C. pyrenoidosa*، IAA را ازمحیط جذب می کنند وبه شکل غیر فعال در می آورند(۱۱). *C. pyrenoidosa* اکسین را سنتز می کند وبه محیط کشت رها می سازد (۲۴) و *C.vulgaris* احتمالاسطوح اکسین آزاد خودرا ازطریق بیوسنتز مولکول های جدیداکسین و تجزیه موادی مانند IAA PAA, IBA و NAA موجود متعادل نگه می دارد(۲۶). این عدم تغییر معنی دار در ترکیبIBA باBAP مشاهده گردید. دراین پژوهش تیمار IBA (۵ میلی گرم در لیتر معادل ۲۴/۶۳ میکرومول) + BAP (۱میلی گرم درلیتر) افزایش غیر معنی داری با شاهد نشان می داد، که مشابه گزارش محققان است که تیمار IBA (۱۰میلی گرم در لیتر) در طی ۵ روز سبب اندکی افزایش رشد (بیوماس) شد (۱۴). در این پژوهش، در مواردی که رشد جلبک کاهش یافته، به علت کاربرد غلظت مفرط دو هورمون اکسین وسیتوکینین بوده است. هورمون اکسین محرک تقسیم و رشد سلولی است ولی در غلظت های بالاتر اثر بازدارنده بر رشد دارد (۳۱). IAA درغلظت های بالا بطور معنی داری تقسیم سلولی در *C.vulgaris* را کاهش می دهد (۳۹). آزمایشهای با *Chlorella fusca* نشان داد که رشد جلبک در غلظت های بالاتراز ۶۰ میکرومول IAAممانعت می شود (۲۳). IBA در غلظت بالا مانع از رشد می شود (۸). در تیمار با IBA (۱۰۰میکرومول) رشد (تعدادسلول) جلبک *C.vulgaris* کاهش می یابد (۲۶) . محققان گزارش کردند که اکسین های طبیعی و مصنوعی ایجاد فیتوهورمون اتیلن را القا می کنند که آن نیز سبب تولید اسید آبسیزیک می شود(۱۲). اکسین ها در غلظت های بالا فعالیت ۱-امینوسیکلوپروپان۱-کربوکسیلیک اسیدسینتاز را افزایش می دهندکه آنزیم کلیدی بیوسنتز اتیلن است. تولید مقادیر قابل توجه اتیلن ممکن است سبب تخریب رنگیزه های فتوسنتزی شود(۳۵). از طرفی محیط کنونی حاوی سیتوکینین است. سیتوکینین ها در غلظت های ۰/۰۱ تا ۵۰ میکرومول بطور فزاینده ای بیوسنتز اتیلن راپیش می برند(۱۳) در این پژوهش، کاهش معنی دار رشد(وزن خشک)، محتوای کلروفیل هایa، b و پروتئین در تیمارهای IBA (۱۰میلی گرم در لیتر معادل ۴۹/۲۶ میکرومول) + BAP (۱-۲میلی گرم در لیتر معادل ۴/۴-۸/۸ میکرومول) مشاهده شد. محققان نیز گزارش کردند که IBA (۱۵میلی گرم در لیتر) سبب کاهش غیر معنی دار کلروفیل در جلبک *C.sorokiniana* گردید(۲۵). محققان دیگری حداکثر رشد جلبک *C.vulgaris* را در غلظت ۰/۱میکرومول IBA به دست آوردند (۲۶). علت دیگر کاهش رشد، احتمالا به این دلیل است که درpH اسیدی IBA به شکل غیر یونیزه در می آید ومی تواند به سلول وارد شود و سلول سعی می کند pH داخلی خود را با خنثی سازی یا خروج پروتون حفظ کند، چون انرژی به جای رشد، صرف این کار می شود و رشد کاهش می یابد (۲۸). به علاوه اثر IBA از دو هورمون IAA وNAA کمتر بود. احتمالا علت این است که فعالیت اکسین ها توسط موقعیت گروه کربوکسیل و زنجیره آلیفاتیک تحت تأثیر قرار می گیرد. این زنجیره بار منفی قوی ومرکز حلقه

آروماتیک بار مثبت قوی دارد (۲۱). بلند بودن زنجیره آلیفاتیک متصل به حلقه ایندولی سبب کاهش فعالیت متابولیسمی می شود. بنابراین IAA از IBA فعالتر است. چون IBA در زنجیره آلیفاتیک متصل به حلقه ایندول دوکربن بیشتر دارد (۷). به همین دلیل، NAA هم از IBA قوی تر است. به علاوه IBA وزن مولکولی (۲۰۳/۲۴ گرم) بیشتری از IAA (۱۷۵/۱۸گرم) وNAA (۱۸۶/۲۱ گرم) دارد، که سبب می شود که دیرتر از عرض غشا عبور کند و وارد سلول شود (۲۸)، در نتیجه اثر کمتری داشته باشد. در این پژوهش در تمام تیمارهایی که رشد جلبک سریعتر شده بود پروتئین هم افزایش یافته بود که مشابه گزارش های محققان است (۲۹،۳۰). فقط در مواردی که پروتئین به خارج دفع شده بود (تیمارهای BAP + IAA) برخلاف افزایش معنی دار رشد، پروتئین افزایش معنی داری نسبت به شاهد نشان نمی داد. این امر احتمالا، به علت سست شدن دیواره توسط اکسین است، که باعث نشت پروتئین به محیط کشت شده است. محققان نیز گزارش کرده اند، IAA سبب افزایش معنی دار کلروفیل و رشد جلبک *Chlorella* sp. شد، اما مانع از تجمع پروتئین های محلول درسلول های جلبک گردید (۲۲) و بر خلاف افزایش وزن خشک جلبک *C.sorokiniana* تیمار شده با IAA (۱۰–۱۵ میلی گرم در لیتر) محتوای پروتئین اختلاف معنی داری با شاهد نداشت (۲۵) که مشابه نتایج پژوهش کنونی است.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، وزن خشک ، تعداد سلول، محتوای کلروفیل a،کلروفیلb ، کاروتنوئید و پروتئین جلبک در غلظت بهینه NAA+ BAP ، NAA (۱۰میلی گرم در لیتر) +BAP(۱میلی گرم در لیتر) به ترتیب ۱/۱۹، ۱/۵، ۱/۴۷،۱/۱،۱/۱و۱/۲ برابر شاهد بود و در غلظت بهینه IAA+BAP ، IAA (۱میلی گرم در لیتر) +BAP (۲ میلی گرم درلیتر) به‌ترتیب۱/۰۷،۱/۳۴، ۱/۱۳، ۱/۱۵، ۱/۰۸ و۱/۱ برابر شاهد بود، که نشان دهنده اثر افزایشی مثبت این ترکیبات هورمونی بر روی جلبک*Chlorella sorokiniana* است و نشان می دهد که در غلظت های مورد آزمایش، ترکیبات NAA+ BAP سبب افزایش رشد بیشتری از ترکیباتIAA+BAP می شوند وترکیبات IBA+ BAP نیز در این غلظت ها اثر مثبت معنی داری بر رشد ندارد وبرای استفاده ازاین ترکیبات نیز باید غلظت های دیگری مورد آزمایش قرار گیرد.

منابع

۱-رنجبر اقدم م.،حجازی م.، آیین فر س.،حسین زاده ن.، بررسی تاثیر چهار آنتی بیوتیک در رشد وکارایی آن ها در عاری سازی آلودگی محیط کشت جلبک تک سلولی *Dunaliella sp.* اولین کنفرانس ملی جلبک شناسی ایران، سال نهم ، بهار ۹۱

2-Andersen, R. A. (2005) Algal Culturing Techniques, Elsevier Inc,pp.589.

3-Agrawal S.S. and Paridhavi M. (2007) Herbal DrugTechnology.Hydrabad,Universiti es Press.

4- Bajguz, A.(2000) Effect of Brassinosteroids on Nucleic Acids and Protein Content in Cultured of *Chlorella vulgaris*, Plant Physiology and Biochemistry, 38: 209–215.

5-Bajguz A, Piotrowska A. (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. Phytochemistry, 70:957-969.

6-Bajguz A.(2014) Interactive effect of brassinosteroids and cytokinins on growth, chlorophyll, mono- saccharide, and protein content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry, 80:176-83.

7-Bajguz A. and Piotrowska-Niczyporuk A.(2013) Synergistic effect of auxins and brassinosteroi ds on the growth and regulation of metabolite content in the green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). Plant Physiology and Biochemistry, 71:290-297.

8-Bertoni G. (2011) Indolebutyric acid–derived auxin and plant development. The Plant Cell, 23: 845.

9-Czerpak, R., Bajguz, A., Białecka, Ba., Wierzchołowska, L. E., Wolańska , M. M. (1994) Effect of auxin precursors and chemical analogues on the growth and chemical

composition in , Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 63(3-4):279-286.

10-De Smet I., VoB U., Lau S., Wilson M., Shao N., Timme R.E., Swarup R., Kerr I., Hodgman C., Bock R., Bennett M., Ju ¨rgens G., Tom Beeckman T. (2011) Unraveling the evolution of auxin signaling. Plant Physiology, 155:209.

11-Dibb-Fuller J.E., Morris D.A. (1992) Studies on the evolution of auxin carriers and phytotro- pin receptors: transmembrane auxin transport in unicellular and multicellularChlorophyta. Pl-anta, 186:219–226.

12-Grossmann K. (2000) Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. Trends in Plant Science, 5:506–508.

13-Hansen M., Chae H. S. and Kieber J. J. (2009) Regulation of ACS protein stability by cytokinin and brassinosteroid. The Plant Journal, 57, 606–614.

14-Hunt R. W. , Chinnasamy S. , Bhatnagar A. and Das K. C. (2010) Effect of biochemical stimulants on biomass productivity and metabolite content of the microalga, *Chlorella sorokiniana* . Applied Biochemistry and Biotechnology. 162(8): 2400-2414.

15-Hunt R.W. , Chinnasamy S. and Das K. C.(2011)The Effect of Naphthalene-Acetic Acid on biomass productivity and chlorophyll content of green algae, Coccolithophore, Diatom, and Cyanobacterium cultures, Applied Biochemistry and Biotechnology , 164:1350–1365.

16-Jesus Rososo M.,F.,Morais R.M.S.C.(2013) Influence of the growth regulators Kinetine and 2,4,D on the growth of two chlorophyte, microalgae, *Haematococcus pluviallis* and *Dunaliella salina*, Journal of Basic&Applied Scinces,9: 302-308.

17-Kawano T. (2003) Roles of reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. Plant Cell Reports, 9:829–837.

18-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.

19-Kobayashi N., Noel E., Barnes A., Watson A., Rosenberg J., Erickson G. and Oyler G.(2013) Characterization on three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. Bioresource Technology, 150: 377–386.

20-Kong W.B., Yang H., Cao Y.T., Song H., Hua S.F. and Xia C.G.(2013) Effect of Glycerol and Glucose on the Enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. Food Technology and Biotechnology, 51 (1): 62-69.

21-Lau S., Shao N., Bock R., Ju ¨rgens G., De Smet I. (2009) Auxin signaling in algal lineages: fact or myth?. Trends Plant Science, 14:182–188.

22-Li, T., Wang, C., & Miao, J. (2007) Identification and quantification of indole-3-acetic acid in the kelp *Laminaria japonica* Areschoug and its effect on growth of marine microalgae. Journal of Applied Phycology, 1, 479–484.

23-Lien T., Pettersen R., Knutsen G. (1971) Effects of indole-3-acetic acid and gibberelin on synchronous cultures of *Chlorella fusca*. Physiologia Plantarum, 24:185–190.

24-Mazur H., Knop A., Synak R. (2001) Indole-3-acetic amid in the culture medium of two axenic green microalgae. Journal of Applied Phycology, 13:35–42.

25-Ozioko,F.U.,Chiejina,N.V., Ogbonna,J.C.(2015) Effect of some phytohormones on growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* IAM-C212 under photoautotrophic conditions, African Journal of Biotechnology, 14(30): 2367-237.

26- Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A.(2014) The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophycea), Plant Growth Regulation , 73:57–66.

27-Piotrowska, A., Czerpak, R., Pietryczuk, A., Olesiewicz, A., & Wedolowska, M. (2008) The effect of indomethacin on the growth and metabolism of green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck. Plant Growth Regulation, 55, 125–136.

28-Rayle D.L., Cleland R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. Plant Physiology, 17: 439-58.

29-Sayegh F.A.Q., Montagenes D.J.S.(2011) Temperature shifts in use intraspecific variation in microalgae production and biochemical composition. Bioresource Technology, 102:3007-3013.

30-Sharma R., Singh G.P., Sharma V.K. (2012) Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of *Chlorella vulgaris*. Journal of Plant Pathology and Microbiology, 3 (5) 1000131.

31-Srivasatava, L. M.(2002) Plant Growth and Development: hormones and environment. San Diego (CA), USA, Academic Press, pp.772.

32- Stirk W.A., Van Staden J. (1997) Comparison of cytokinin- and auxinlike activity in some commercially used seaweed extracts. Journal of Applied Phycology, 8:503–508.

33-Stirk W.A., Bálint P., Tarkowská D., Novák O., Strnad M., Ördög V., van Staden J.(2013) Hormone profiles in microalgae: gibberellins and brasinosteroids. Plant Physiology and Biochemistry, 70:348-53.

34-Stirk W. A., Bálint P.,Tarkowská D., Novák O., Maróti G., Ljung K., Turečková V.,StrandM.,Ordög V. and Staden J. (2014) Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae).Plant Physiology and Biochemistry;79: 66-76.

35-Sunohara Y., Matsumoto H. (1997) Comparative physiological effects of quinclorac and auxins, and light involvement in quinclorac-induced chlorosis in corn leaves. Pesticide Biochemistry and Physiology, 58, 125–132.

36-Szechyn ´ska-Hebda M., Skrzypek E., Da browska G., Biesaga-Kos ´cielniak J., Filek M., Wedzony M. (2007) The role of oxidative stress induced by growth regulators in the regeneration process of wheat. Acta Physiologia Plantarum, 29:327–337.

37- Tarakhovskaya E.R.,. Maslov Y.I, and Shishova M.(2007) Phytohormones in algae, Russian Journal of Plant Physiology, 54(2):163-170·

38-Tate J.J, Gutierrez-Wing M. T., Rusch K. A., Ben M. G. (2013) The Effects of Plant Growth Substances and Mixed Cultures on Growth and Metabolite Production of Green Algae *Chlorella* sp .: A Review, Journal of Plant Growth Regulation, 32:417–428.

39-Vance B.D. (1987) Phytohormone effects on cell division in *Chlorella pyrenoidosa* Chick (TX-7-11-05) (Chlorellaceae). Journal of Plant Growth Regulation, 5:169–173.

40-Wellburn A.R. (1994) The spectral determination chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. Journal of Plant Physiology, 144: 307-313.

Study the effects of auxins and cytokinins on growth , pigments and protein contents of *Chlorella sorokiniana*

Jamshidi A.[1], Ebrahimi M.A.[2], Rajabian T.[3], Bakhshikhaniki Gh.R.[2], Mozaffari Sh.[4]

[1] **Biology Dept., Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Agriculture Dept., Payame Noor University,Tehran, I.R. of Iran**

[3] **Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, I.R. of Iran**

[4] **Chemistry Dept., Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Chlorella are used as medicine, aquatic foods and biofilter. For this reason increases of its biomass and some of metabolites have economic value. The aim of this research was study of stimulating effect of some phytohormones on biomass and important metabolites contents of *Chlorella sorokiniana.* In this study *C. sorokiniana* was cultured at modified Bold Basal Medium. Glucose monohydrate ($5gl^{-1}$) and different proportions of plant hormones naphthalene acetic acid (NAA), benzylaminopurin (BAP), indolebutyric acid (IBA) and indoleacetic acid (IAA) were added to medium. Dry weight, pigments and protein contents were measured. At 75% of NAA+BAP treatments, these growth parameters increased. At treatment with NAA ($10mgl^{-1}$) +BAP ($1mgl^{-1}$), these parameters significantly enhanced compared to control. At treatment with IAA ($1mgl^{-1}$) +BAP ($2mgl^{-1}$), dry weight and content of chlorophyll a, significantly increased compared to control. At treatment with IBA+BAP, dry weight and metabolites had not significant difference or reduced compared to control. The highest proportion of dry weight, cell numbers and pigments and protein contents were observed at NAA+BAP treatment. Results showed BAP, NAA and IAA had the greatest additive effects on growth traits respectively, but IBA had little effect on these traits.

Key words: *Chlorella sorokiniana,* plant hormones, protein, Photosynthetic pigments.