دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۲، صفحه ۲۶۳- ۲۵۶ (۱۳۹۵)

کاربرد الیسیتورهای نانویی برای تولید آلوئین در سوسپانسیون سلولی گیاه آلوئه‌ورا (*Aloe vera* L.)

منا راعی[۱]، منصور امیدی[۲*]، سپیده ترابی[۳] و مهدیه خدایاری[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

پست الکترونیک: momidi@ut.ac.ir

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۴

چکیده

نانوذرات به علت داشتن ویژگی‌های انحصاری بیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی، ورود گسترده‌ای به دنیای بیولوژی و کشاورزی داشته‌اند. نانوذرات نقره (Nano-Ag) در حال حاضر بالاترین سطح استفاده در نانوتکنولوژی را به خود اختصاص داده‌است. نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم (Nano-TiO_2) به‌عنوان یکی از نانوبلورهای نیمه‌هادی اکسیدفلزی، جایگاه ویژه‌ای در جهان صنعتی امروز یافته است. در این مطالعه از این دو نانوذره ارزشمند در کشت سلولی آلوئه‌ورا استفاده شد. دست‌ورزی محیط‌های کشت سلولی با استفاده از الیسیتورهای غیرزیستی یکی از راهکارهای مهم برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند است. آلوئین به‌عنوان مهمترین متابولیت ثانویه موجود در آلوئه‌ورا یک ترکیب آنتراکینونی بوده که دارای خواص ضدمالاریایی، ضدقارچی، ضدباکتریایی و ضدویروسی می‌باشد. با توجه به کاربردهای فراوان این ماده در صنایع مختلف در این تحقیق از نانوالیسیتورها به‌منظور افزایش آلوئین در کشت سوسپانسیون سلولی آلوئه‌ورا استفاده شد و نتایج آن در پنج بازه زمانی مختلف توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانو نقره طی ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار باعث افزایش آلوئین به میزان ۴۳/۷٪ شده، سپس این میزان تا رسیدن به سطح کنترل کاهش یافت. نانو دی‌اکسیدتیتانیوم نیز در ۴۸ ساعت اولیه موجب افزایش میزان آلوئین به میزان ۱۱/۶٪ شده اما پس از آن میزان تولید آلوئین کاهش یافت، به‌طوری که در ۱۶۸ ساعت پس از اعمال تیمار به میزان ۸/۸٪ نسبت به کنترل کاهش نشان داد. با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت که وجود نانوالیسیتورها می‌تواند بر تنظیم مسیر تولیدی آلوئین در گیاه آلوئه‌ورا مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: کشت سوسپانسیون، آلوئین، نانو نقره، نانو دی‌اکسیدتیتانیوم.

مقدمه

نانوذرات به‌دلیل اثرات خاص و ویژگی منحصر به فردشان ورود گسترده‌ای به دنیای بیولوژی و کشاورزی داشته‌اند (Oberdorster *et al.*, 2005). از نظر مقیاس یک نانومتر یک هزاره میکرومتر و طبیعتاً یک بیلیونیم متر (10^{-9}متر) است. کلیه ذرات نانو با اندازه کوچکتر از ۳۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

نانومتر به راحتی می‌توانند توسط سلول‌ها جذب شده و وارد بافت‌ها شوند (Lu *et al*., 2010). نانوذرات به‌دلیل اندازه بسیار کوچک و در نتیجه سطح تماس زیاد خود دارای کارایی بسیار زیادی از نظر فیزیکوشیمیایی و بیوشیمیایی هستند (Rejeski, 2009). نانو نقره یکی از مهمترین نانوذراتی است که امروزه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این نانوذره به‌دلیل داشتن سطح ویژه بالا و فراکنش زیاد اتم‌های سطحی نسبت به نقره دارای خواص آنتی‌میکروبی بیشتر بوده و بر همین اساس در سال‌های اخیر به موازات رشد و توسعه نانوتکنولوژی، کاربرد نانوذرات نقره در محصولات بهداشتی و در مبارزه بر علیه میکروب‌ها هم گسترش یافته است (Abdi *et al*., 2008؛ Kim *et al*., 2008). نانو نقره دارای خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی می‌باشد، در حالی که نقره به خودی خود دارای خاصیت بسیار کمتر و یا فاقد آن است (Asharani *et al*., 2009). نانو نقره از طریق حمله به دیواره سلولی موجب اختلال در نفوذپذیری دیواره و تنفس سلولی می‌شود، همچنین از طریق نفوذ به داخل سلول، آزاد کردن یون نقره و واکنش با فسفر و سولفور موجود در DNA و پروتئین موجب آسیب رساندن به سلول‌های قارچی و باکتریایی می‌شود. به همین دلیل این ماده در صنایع بهداشتی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد (Elumalai *et al*., 2010). طی مطالعات انجام شده بر روی گیاه *Lolium multiflorum* نشان داده شده که نانو نقره باعث کاهش شدید رشد و وزن کلی گیاه می‌شود که این اثرات به‌طور خاص در بافت ریشه با شدت بیشتری انجام می‌شود. ریشه گیاهان تحت تیمار با نانو نقره علاوه‌بر کاهش رشد، متحمل تغییراتی در مورفولوژی شده و در غلظت‌های خاصی از نانو نقره سلول‌های پوششی ریشه به‌شدت واکوئله شده و از بین رفته‌اند (Yin *et al*., 2011). همچنین در بررسی اثر نانونقره بر تقسیم سلولی و شاخص‌های میتوزی از گیاه *Allium* استفاده کردند. آنان دریافتند که در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۵۰ پی‌پی‌ام (ppm) نانو نقره به‌صورت معنی‌داری شاخص میتوزی کاهش و دگرگونی ساختاری در کروموزوم افزایش یافت (Babu *et al*., 2008؛ Kumari *et al*., 2009). در تحقیقی که بر روی دوام گل‌های رز رقم Movie *Star* که در محلول‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو نقره انجام شده بود، میزان دوام گل به‌دلیل کاهش شکاف روزنه‌ای و کاهش در انتقال آب افزایش یافت (Lu *et al*., 2010). پژوهشگران با آزمایش بر روی گیاه *Cucurbita pepo* به این نتیجه رسیدند که نانو ذرات نقره بیوماس و تعرق را ۸۴٪–۶۶٪ کاهش داده‌است. آنان دریافتند که غلظت یون‌های نقره در حالت نانو ۱۰–۴/۴ برابر بیشتر از محلول ذرات توده‌ای نقره است (Musante & White, 2010).

نانوذره TiO_2 یکی دیگر از نانو الیسیتورهای استفاده شده در این مطالعه می‌باشد. نانوذره Nano-TiO_2 تمام خصوصیات Nano-TiO_2 را داشته و همچنین به‌دلیل کوچکی اندازه ذرات، سطح تماس آن با مواد افزایش یافته و کارایی و اثربخشی بیشتری دارد (Karimi & Mirjalili, 2009). تحقیقات حکایت از گزارش‌هایی در مورد اثرات مثبت، منفی و حساسیت گیاهان به نانوذره Nano-TiO_2 دارد (Klancnik *et al*., 2010). این نانوذره با پر کردن فضای بین میکروفیبریل‌های سلولزی در دیواره سلولی، اثر منفی بر رشد برگ، فعالیت هیدروکسی ریشه و تعرق در گیاهچه ذرت دارد (Asli & Newmann, 2009؛ Feizi *et al*., 2011). در مقایسه غلظت‌های TiO_2 نانویی و غیرنانویی بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه گندم، تأثیر مثبت TiO_2 نانویی را بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه گندم نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای غیرنانویی آن گزارش کردند (Feizi *et al*., 2011). تحقیق دیگری نشان داد که نانوذره TiO_2 پس از جذب توسط سلول‌های گیاه ذرت منجر به کاهش شاخص میتوزی و افزایش تغییرات کروموزومی شده‌است (Castiglione *et al*., 2010).

خواص دارویی گیاهان به متابولیت‌های ثانویه نسبت داده شده‌است. این مواد که گیاهان در طول حیات خود تولید می‌کنند در رشد و نمو و فعالیت‌های حیاتی آنها نقشی ندارند و عمدتاً به‌منظور دفع آفات، جذب حشرات گرده‌افشان و مبارزه با بیماری‌های میکروبی در گیاه تولید می‌شوند (Rao

Archive of SID

www.SID.ir

& Ravishankar, 2002). گیاه دارویی آلوئه‌ورا دارای متابولیت ثانویه مهم و باارزش آلوئین می‌باشد که برای زخم‌ها و بسیاری از جراحت‌های پوستی مثل سوختگی‌ها و زخم‌های شدید مورد استفاده قرار می‌گیرد. آلوئین دارای خاصیت ضدمیکروبی بوده و از آن برای درمان عفونت‌های میکروبی مجاری معده‌ای و روده‌ای استفاده می‌شود، همچنین این ماده موجب تقویت سیستم ایمنی بدن شده و برای درمان آکنه، آسم، دیابت و التهاب مخاط دهان بکار می‌رود (Himesh *et al.*, 2011). تولید انبوه و سریع این مواد پیچیده در مقیاس زیاد از طریق روشهای شیمیایی عمدتاً مشکل و یا غیرممکن می‌باشد و از سویی محدودیت‌های مختلف مانع تأمین این مواد از طبیعت است. استفاده از راهکارهای فناوری زیستی ازجمله کشت سوسپانسیون سلولی، کشت اندام (کشت ریشه‌های موئین و ساقه) راه حل مناسبی برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (Bourgaud *et al.*, 2002؛ Mulabagal & Tsay, 2004). الیسیتورها مولکول‌هایی هستند که باعث القاء و تحریک سلول‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌ها می‌شوند. این ترکیب‌ها شامل الیسیتورهای زیستی (با منشأ قارچی، باکتریایی و مخمر) و غیرزیستی (پلی‌ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها، آنزیم‌های غیرفعال شده و نمک‌های فلزات سنگین) می‌باشند (Vasconsuelo & Boland, 2007). البته استقرار موفق لاین‌های سلولی که منتهی به تولید درصد بالایی از متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سوسپانسیون سلولی شده به‌وسیله تعداد زیادی از محققان گزارش شده‌است. گزارش شده‌است که اسید سالسیک و محرک قارچی بر روی تولید تاکسول در سوسپانسیون سلولی گیاه *Taxus bacata* مؤثر است، نتایج این تحقیق نشان داده‌است که ترکیب اسید سالیسیک و محرک قارچی در بیوماس سلول تأثیر نداشته، اما موجب تولید بیشترین میزان تاکسول شده است (Yu *et al.*, 2001). $AgNO_3$ و $CdCL_2$ موجب تحریک تولید تروپان آلکالوئیدهای اسکوپولامین و هیوسیامین از راه کشت ریشه‌های موئین *Bragmansia candida* شده و باعث افزایش تولید این آلکالوئید شد (Radman *et al.*, 2003). در آزمایشی از ۴ سطح صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام نیتروژن و بنزیل‌آدنین استفاده و پس از ۱۲ ماه میزان آلوئین موجود در گیاه آلوئه‌ورا مورد بررسی قرار گرفت، به‌طوری که بیشترین میزان غلظت آلوئین را می‌توان در غلظت‌های ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام نیتروژن و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام بنزیل‌آدنین بدست آورد. افزایش همزمان میزان نیتروژن و بنزیل‌آدنین دارای اثر متقابل مثبت بوده و موجب افزایش میزان آلوئین می‌شود (Hazrati *et al.*, 2012).

از آنجایی که گیاه آلوئه‌ورا یکی از مهمترین و پرکاربردترین گیاه دارویی خانواده Liliaceae می‌باشد و به‌دلیل اهمیت دارویی آلوئین و همچنین عدم مطالعات و تحقیقات انجام شده توسط سایر محققان در مورد افزایش میزان آلوئین در کشت سلولی، تلاش برای افزایش آن توسط الیسیتورهای نانویی (نانو نقره، نانوذره TiO_2) در این تحقیق انجام شده‌است.

مواد و روش‌ها

تعدادی گیاه آلوئه‌ورا سالم و عاری از هر گونه بیماری از گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی انتخاب شده و پس از جدا کردن پاجوش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در آب جاری شستشو شدند. سپس ریزنمونه‌هایی از قاعده برگ‌ها به طول ۱۰ میلی‌متر تهیه و به مدت ۲۰ دقیقه در بنومیل ۱٪ و ۱ دقیقه در ساولن ۱٪ همراه با تکان دادن ملایم قارچ‌کشی و ضدعفونی شدند. سپس سه بار با آب مقطر شستشو شدند.

نمونه‌ها به‌ترتیب به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰٪ و ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ همراه با دو قطره محلول توییین ۲۰ ضدعفونی شدند و در نهایت سه بار با آب مقطر سترون‌سازی شده شستشو شدند. سپس به‌منظور القای کالوس، نمونه‌ها به محیط کشت MS به همراه شکر به میزان ۳۰ گرم در لیتر و آگار به میزان ۷ گرم در لیتر و نفتالن‌استیک اسید (NAA) ۱ میلی‌لیتر که به‌عنوان محیط کشت پایه انتخاب شد منتقل شدند. pH تمامی محیط‌های کشت بین ۵/۶ تا ۵/۸ تنظیم شد و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند. عمل واکشت نمونه‌ها هر سه هفته یک‌بار به محیط کشت

Archive of SID
www.SID.ir

جدید انجام شد. پس از سه ماه بهترین کالوس‌ها انتخاب و به محیط کشت سوسپانسیون منتقل شدند.

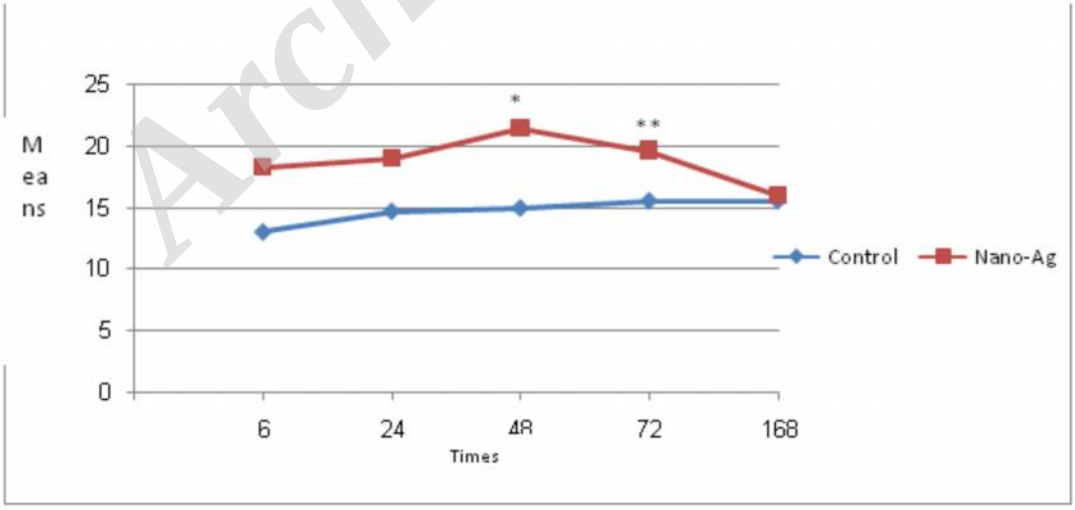
برای محیط کشت سوسپانسیون از محیط کشت ۱/۴ نیترات و ۱/۲ MS بدون آگار استفاده شد (Zarinpanjeh *et al.*, 2012). کالوس‌ها به فلاسک ۱۵۰CC حجم که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع بود انتقال یافت و در انکوباتور شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه (rpm) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به‌منظور افزایش آلوئین ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در لیتر نانو نقره و ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر نانو TiO_2 به محیط سوسپانسیون سلولی اضافه و در طی زمان‌های ۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۱۶۸ ساعت کالوس‌ها جمع‌آوری شدند. کالوس‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۱۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

میزان آلوئین توسط دستگاه HPLC (مدل ۲۴۸۷: آمریکا) که دارای ستون C18 (dp 10µm ۴/۶×۲۵۰mm) و فاز معکوس (phenomene×4/6mm i.d×250mm lenghth) و فاز متحرک (با سرعت ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه) و دتکتور UVs (channel A set at 275nm, channel B set at 365 nm) بود، سنجیده شد.

۲۰ میلی‌گرم پودر آلوئه‌ورا در ۲ میلی‌لیتر متانول و آب به نسبت ۱: ۱ حل شده و از ستون C18 عبور داده شد (حجم تزریق دقیقاً ۲۰ میکرومتر بود). سپس داده‌های بدست‌آمده توسط نرم‌افزار SPSS تجزیه و مقایسه میانگین‌ها توسط تحلیل واریانس و با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

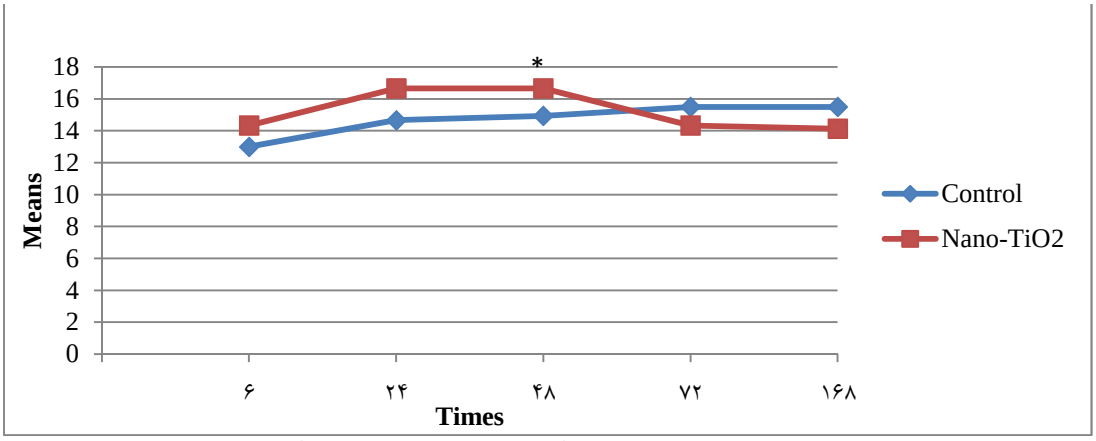
در تیمار سوسپانسیون‌های سلولی با نانو نقره میزان آلوئین تا ۴۸ ساعت بعد از کاربرد آن به‌تدریج افزایش نشان داد که این افزایش به‌طور معنی‌داری در ۴۸ ساعت بعد از اعمال تیمار به میزان ۴۳/۷٪ نسبت به کنترل مشاهده شد. پس از آن این میزان کاهش پیدا کرد و به سطحی مشابه سطح کنترل رسید (شکل ۱). در گیاهان تیمار شده با نانو TiO_2، افزایش غلظت در ساعات اولیه تزریق الیسیتور مشاهده شد، به‌نحوی که این افزایش در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار مشاهده شد و در زمانهای ۷۲ و ۱۶۸ ساعت پس از اعمال تیمار میزان آلوئین نسبت به شاهد کاهش نشان داد. بالاترین میزان آلوئین در گیاهان تیمار شده در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار دیده شد. پس از گذشت ۱۶۸ ساعت از اعمال تیمار، میزان آلوئین به‌طور معنی‌دار و به میزان ۸/۸٪ نسبت به کنترل کاهش نشان داد (شکل ۲).



شکل ۱- اثر نانو نقره بر تولید آلوئین سوسپانسیون سلولی آلوئه‌ورا

داده‌ها نشان‌دهنده میانگین±انحراف معیار هستند. مقادیر معنی‌دار از لحاظ آماری بین ۰/۰۵ تا ۰/۰۱ به‌صورت * و مقادیر بسیار معنی‌دار کمتر از ۰/۰۱ با ** نشان داده شدند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- اثر نانو TiO_2 بر تولید آلوئین سوسپانسیون سلولی آلوئه‌ورا

داده‌ها نشان‌دهنده میانگین±انحراف معیار هستند. مقادیر معنی‌دار از لحاظ آماری بین ۰/۰۵ تا ۰/۰۱ به‌صورت * و مقادیر بسیار معنی‌دار کمتر از ۰/۰۱با ** نشان داده شدند.

در این مطالعه از دو نانوذره برای تیمار سوسپانسیون‌های سلولی استفاده شد که مشاهده شد هر دو الیسیتور در زمان‌های ابتدایی مطالعه شده باعث افزایش تدریجی محتوی آلوئین در سوسپانسیون‌های تیمار شده نسبت به کنترل شدند که این روند به‌صورت صعودی بوده و در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار با نانو نقره این اختلاف معنی‌دار بود. بالاترین میزان آلوئین در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار با نانو نقره مشاهده شد که به میزان ۴۳/۷٪ افزایش در مقایسه با کنترل را نشان داد اما میزان افزایش آلوئین در تیمار با نانوذره TiO_2 معنی‌دار نبود.

بحث

نانو نقره یکی از مطرح‌ترین نانو ذرات فلزی است که به علت داشتن سطح ویژه بالا و فراکنش زیاد اتم‌های سطحی نسبت به نقره دارای خواص آنتی‌میکروبی بیشتر بوده و در محصولات بهداشتی و در مبارزه بر علیه بیماری‌ها از آن استفاده می‌شود. نانو ذرات نقره به راحتی به سیستم بافت گیاهی نفوذ کرده و در غلظت‌های بالا و حضور طولانی‌مدت در محیط از طریق کاهش شاخص متیوتیک و آزاد کردن یون‌های سمّی باعث ایجاد سمّیت سلولی (cytocyctic) می‌شود. در این مطالعه از این ماده به‌عنوان یکی از نانوالیسیتورها استفاده شد و آنالیزهای انجام‌شده نشان داد که میزان آلوئین در سوسپانسیون‌های تیمار شده با نانو نقره به‌تدریج افزایش می‌یابد، به‌طوری که این افزایش در ۴۸ ساعت پس از اعمال تیمار معنی‌دار بوده و به میزان ۴۳/۷٪ بیش از شاهد می‌رسد. پس از آن با گذشت زمان میزان تولید آلوئین کاهش می‌یابد و به سطحی مشابه با شاهد می‌رسد. نانو نقره طی ۴۸ ساعت اولیه در محیط کشت از طریق فعال کردن ژن‌های مربوط به مکانیسم‌های دفاعی باعث القای تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Esmaeilzadeh & Sharifi, 2013). اما پس از آن پاسخ سلولی نسبت به حضور نانو نقره شامل ناپایدار شدن غشای خارجی، از بین رفتن Proton motive forceها و آزاد کردن انواع اکسیژن‌های فعال همراه است. اکسیژن‌های فعال تولید شده ممکن است جزئی از مکانیسم سمّیت ژنی (Genotoxic) نانو نقره باشد که به‌صورت مستقیم پروتئین‌ها را تخریب کرده و یا آنها را برای تجزیه پروتئولیک حساس می‌کند. نانو نقره از طریق تولید یون نقره و اکسیژن‌های فعال در محیط بر روی DNA اثر مخرب داشته و منجر به کاهش تولید آلوئین می‌گردد (Lok *et al.*, 2007). مشابه این نتیجه در مطالعه اخیر Asghari و همکاران (۲۰۱۲) بر روی گیاه کامل سرخدار برای تولید تاکسول گزارش شده‌است.

نانو TiO_2 یکی دیگر از نانوالیسیتورهای استفاده شده در این مطالعه می‌باشد که به‌عنوان یکی از الیسیتورها در

Archive of SID
www.SID.ir

تحریک مسیر سنتز آلوئین استفاده شد. در بررسی‌های انجام شده نشان داده شد که در ساعات اولیه پس از اعمال تیمار میزان آن افزایش یافته، به‌طوری که بیشترین میزان آن در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار بوده اما به‌تدریج و پس از گذشت زمان میزان آلوئین کاهش یافته، به‌طوری که پس از ۱۶۸ ساعت، مقدار آن به‌طور معنی‌داری و به میزان ۸/۸٪ کمتر از میزان شاهد رسید که این کاهش ممکن است به علت ایجاد سمّیت توسط نانو TiO_2 با گذشت زمان در محیط کشت باشد. همچنین این کاهش می‌تواند به علت اثر بازخوردی افزایش آلوئین بر روی بیان ژن‌های مؤثر در بیوسنتز آن باشد تا از طریق کاهش بیان ژن میزان آلوئین را در سطحی قابل تحمل در گیاه نگه دارد. نتایج تحقیقات نشان داد که نانو TiO_2 توان ایجاد خسارت به مواد ژنتیکی یوکاریوتی را داشته و در استفاده از آن توجه به جنبه‌های ایمنی زیست محیطی آن اهمیت خاصی دارد (Takallu *et al.*, 2012).

به‌طور کلی می‌توان گفت دو نانوذره مورد استفاده برای تیمار سوسپانسیون‌های سلولی، هر دو در ابتدا باعث افزایش تدریجی محتوای آلوئین شده که در نانو نقره پس از ۴۸ ساعت این تفاوت معنی‌دار بود و میزان آلوئین ۴۳/۷٪ افزایش یافت، اما در نانو TiO_2 افزایش میزان آلوئین در ۲۴ و ۴۸ ساعت معنی‌دار نبود. بنابراین با توجه به نتایج حاصل شده می‌توان نانو الیسیتورها را یکی از مؤثرترین راه‌های افزایش میزان آلوئین در آلوئه‌ورا دانست. با توجه به عدم مطالعه کافی در زمینه تأثیر الیسیتورهای نانویی بر میزان متابولیت‌های ثانویه در کشت‌های سلولی آلوئه‌ورا می‌توان از این نتیجه در تحقیقات آینده در زمان‌های متفاوت استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

- Abdi, G., Salehi, H. and Khosh-Khui, M., 2008. Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. Acta Physiologiae Plantarum, 30(5): 709-714.
- Asghari, Gh., Mostajeran, A., Sadeghi, H. and Nakhaei, A., 2012. Effect of salicylic acid and silver nitrate on taxol production in *Taxus baccata*. Journal of Medicinal Plant, 11(8): 74-82.
- Asharani, P.V., PrakashHande, M. and Valiyaveettil, S., 2009. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. BMC Cell Biology, 10(65): 1-14.
- Asli, S. and Neumann, P.M., 2009. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. Plant, Cell Environment, 32(5): 577-584.
- Babu, K., Deepa, M.A., Shankar, S.G. and Rai, S., 2008. Effect of nano-silver on cell division and mitotic chromosomes: a prefatory siren. Internet Journal of Nanotechnology, 2(2).
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Goniter, E., 2002. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161: 839-851.
- Castiglione, M.R., Giorgetti, L., Geri, C. and Cremonini, R., 2010. The effects of nano TiO_2 on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. Journal of Nanoparticle Research, 13(6): 2443-2449.
- Elumalai, E.K., Parasad, T.N., Kambala, V., Nagajyothi, P.C. and David, E., 2010. Green synthesis of silver nanoparticle using *Euphoriba hirta* L. and their antifungal activitites. Applied Scince Research, 2(6): 76-81.
- Esmaeilzadeh, S. and Sharifi, M., 2013. Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. Journal of Cell &Tissue, 4(2): 119-128.
- Feizi, H., Rezvani Moghadam, P., Fotovat, A. and Shah Tahmasbi, N., 2011. Reaction of wheat seed to different concentrations of titanium dioxide nanoparticles in comparison with non-nano-particles. Proceeding of 2th Congress on Science and Technology Seed, Mashhad, Iran, 4-5 November: 565-569p.
- Hazrati, S., Tahmasebi, Z. and Babaei, A., 2012. Enhancing yield and aloin concentration of *Aloe vera* plants by stimutaneous application of N and benzyladenine. Journal of Medicinal Plant Research, 6(10): 1834-1841.
- Himesh, S., Sarvesh, S., Kaushelendra, M., Singhai, A.K. and Neelesh, Ch., 2011. Qualitative and quantitative profile of aloin isolated from *Aloe vera*. Inernationl Research Journal of Pharmacy, 2(9): 121-122.
- Karimi, M. and Mirjalili, M., 2009. Titanium dioxide. Journal of Nanotechnology, 8: 23-25.

Archive of SID
www.SID.ir

Biotechnology and Applied Biochemistry, 37: 91-102.
- Rao, S.R. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20(2): 101-153.
- Rejeski, D., 2009. Nanotechnology and consumer products. http://www.nanotechproject.org/publications/archive/nanotechnology_consumer_products/. Accessed 22 February 2010.
- Takallu, S., Davodi, D., Omidi, M., Ebrahimi, M.A., Ruzbeh, F. and Raosulnia, A.R., 2012. The effect of titanium dioxide nanoparticles on barley cytogenetical index. Journal of Agriculture Biotechnology, 5(1): 13-21.
- Vasconsuelo, A. and Boland, R., 2007. Molecular aspect of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. Plant Science, 172(5): 861-875.
- Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B.P., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J. and Bernhardt, E.S., 2011. More than the Irons: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. Environmental Science & Technology, 45(6): 2360-2367.
- Yu, L.J., Lan, W.Z., Qin, W.M. and Xu, H.B., 2001. Effects of Salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus* Chinensis. Journal Process Biochemistry, 37: 477-482.
- Zarinpanjeh, N., Oladzad Abbass Abadi, A. and Omidi, M., 2012. Effects of plant growth regulators and vitamin combinations on callus induction, somatic embryogenesis and plantlet production of *Aloe vera* L. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20(2): 181-191.
- Kim, H., Kang, H., Chu, G. and Byun, H., 2008. Antifungal effectiveness of nanosilver colloid against rose powdery mildew in greenhouses. Solid State Phenomena, 135: 15-18.
- Klancnik, K., Drobne, D., Valant, J. and Koce, J.D., 2011. Use of a modified Allium test with nano TiO_2. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74: 85-92.
- Kumari, M., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N., 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. Science of The Total Environment, 407(19): 5243-5246.
- Lok, C.N., Ho, C., Chen, R., He, Q.Y., Yu, W.Y., Sun, H., Tam, P.K., Chiu, J.F. and Che, C.M., 2007. Proteomics analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. Journal Proteome Research, 5(4): 916-924.
- Lu, P., Cao, J., He, S., Liu, J., Li, H., Cheng, G., Ding, Y. and Joyce, D.C., 2010. Nano-silver pulse treatments improve water relations of cut rose CV. Movie Star flower, Postharvest Biology and Technology, 57(3): 192-202.
- Mulabaghal, V. and Tsay, H.S., 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering, 2: 29-48.
- Musante, C. and White, J., 2010. Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: differential effects of nano and bulk-size particles. Environmental Toxicology, 27(9): 510-517.
- Oberdorster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W. and Lai, D., 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Particle and FibreToxicology, 2: 8.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C. and Keshavarz, T., 2003. Elicitation of plant and microbial systems.

Archive of SID
www.SID.ir

Application of nano-elicitors to produce aloin in cell suspension of *Aloe vera* L.

M. Raee[1], M. Omidi[2*], S. Torabi[3] and M. Khidayari[4]

1- MSc. Student, Biotechnology Group, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
2*- Corresponding author, Department of Agriculture and Plant Breeding, University of Tehran, Karaj, Iran
E-mail: momidi@ut.ac.ir
3- Biotechnology Group, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
4- Ph.D. Student, Department of Agriculture and Plant Breeding, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: Jun 2014 Revised: July 2015 Accepted: July 2015

Abstract

Due to the exclusively biological and physicochemical characteristics of nanoparticles, they are widely used in biology and agriculture. Currently, silver nanoparticles (Nano-Ag) have wide application in nanotechnology. Nano-TiO2 as a semiconductor metal oxide nanocrystal has a special position in industrial world. The mentioned nanoparticles were used in cell culture of Aloe vera. In this study, the effects of nano-elicitors including Nano-Ag and Nano-TiO2 were investigated on cell suspension culture of Aloe vera. Manipulation of cell culture media by abiotic elicitors is an important way for inducing production of valuable metabolites. Aloin is the major anthraquinone compound found in Aloe vera. It has antimalarial, antifungal, antibacterial, and antiviral properties. The induced callus by elicitors was collected in five periods and analyzed by HPLC (High-performance liquid chromatograghy). Results showed that Nano-Ag caused to increased content of aloin to 43.7% within 48 hours and then this amount was reduced to the control level. Nano-Tio2 caused to increased content of aloin to 11.6% in 48 hours after elicitation; however, 168 h after treatment, it was reduced to 8.8% as compared to the control. Results suggest that nanoelicitors can regulate the production of Aloin in Aloe vera.

Keywords: Suspension culture, aloin, nano-Ag, nano-TiO_2.

Archive of SID

www.SID.ir