

Optimization of transient gene delivery to *Catharanthus roseus* L. using introduction of green synthesized superparamagnetic iron oxide nanoparticles and carbon nanotubes nanocarrier

Sara Abedini

Ph.D. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: abedinisara@agr.uk.ac.ir

Shahram Pourseyedi 

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: spseyedi@uk.ac.ir

Jafar Zolala 

Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: j.zolala@uk.ac.ir

Roohollah Abdolshahi 

Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: abdosshahi@uk.ac.ir

Abstract

Objective

Conventional gene delivery to plant cells approaches have limitations such as narrow host range in Agrobacterium-mediated gene delivery method, removal of cell wall using polyethylene glycol and electroporation methods, and the higher cell damage in the use of gene gun. Recently, nanotechnology-based gene delivery methods have been developed for plant genetic transformation, and this nanostrategy shown the efficiency of gene transfer and biocompatibility and the target DNA protection.

Materials and methods

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) were fabricated via green route using *Catharanthus roseus* leave aqueous extract. SPIONs nanoparticles and carboxylated single-walled carbon nanotubes (SWCNTs-COOH) were functionalized with polyethyleneimine (PEI). For gene delivery to *Catharanthus roseus* leave, the pDNA@SPIONs and pDNA@SWCNTs nanocarriers were prepared by pDNA loading on the surface of cationic nanoparticles. Two

methods were used to accelerate and increase the pass of the nanocarrier through the plant cells, immersion in nanocarrier suspension and infiltration by syringe. Tracking the mGFP5 protein fluorescent signal and RT-PCR reaction was evaluated to affirm *mgfp5* gene delivery and its expression in plant cells.

Results

The color change of the iron chloride salts solution, the absorption of the synthesized nanoparticles to a magnet, while the iron chloride salts do not have this property, and the results of the performed analysis confirmed the green synthesis of SPIONs nanoparticles. The functionalized nanoparticles with PEI shown good ability to interact with DNA and effectively DNA protection against nuclease enzymes degradation. The mGFP5 protein fluorescent signal confirmed the gene delivery to plant cells ability of pDNA@SPIONs and pDNA@SWCNTs nanocarriers.

Conclusions

So the application of nanobiotechnology and nanocarriers for gene delivery to plant cells can be promising for plant genetic engineering. By nanocarriers, it is possible efficient gene delivery to almost all plant species regardless dicotyledonous or monocotyledonous through a method with features such as simple and low cost, elimination of *Agrobacterium* and its limitations, and without the specialized laboratory equipment.

Keywords: Cationic nanoparticles, Nanobiotechnology, Surface modification of nanoparticles, Plant genetic transformation, Transient gene expression.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Abedini S, Pourseyedi SH, Jafar J, Abdolshahi R (2023) Optimization of transient gene delivery to *Catharanthus roseus* Using introduction of green synthesized superparamagnetic iron oxide nanoparticles and carbon nanotubes nanocarrier. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (1), 61-80.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (1), 61-80.

DOI: 10.22103/jab.2022.20285.1434

Received: November 14, 2022.

Received in revised form: December 19, 2022.

Accepted: December 20, 2022.

Published online: February 18, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.

© the authors

بهینه‌سازی انتقال ژن موقت به گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.) از طریق معرفی نانوحامل نانوذرات ابرپارامغناطیسی اکسید آهن سنتز شده به روش سبز و نانولوله‌های کربنی

سارا عابدینی

دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

abedinisara@agr.uk.ac.ir

شهرام پورسیدی

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

spseyedi@uk.ac.ir

جعفر ذوالعلی

دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

j.zolala@uk.ac.ir

روح الله عبدالشاهی

دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

abdoshahi@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۳ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۹

چکیده

هدف: روش‌های مرسوم انتقال ژن به سلول‌های گیاهی دارای محدودیت‌هایی از جمله محدودیت میزبان در روش انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم، حذف دیواره سلولی در استفاده از پلی اتیلن گلیکول و الکتروپوریشن و آسیب سلولی در هنگام استفاده از تفنگ ژنی هستند. اخیراً روش‌های انتقال ژن مبتنی بر نانو فناوری برای ترنسفرم ژنتیکی گیاهان ایجاد شده است که این نانو استراتژی انتقال ژن کارآمد، زیست سازگاری و حفاظت کافی از DNA هدف را نشان می‌دهد.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر سنتز سبز نانوذرات ابرپارامغناطیسی اکسید آهن (SPIONs) توسط عصاره آبی برگ گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.) انجام شد. در مرحله بعد، سطح نانوذرات SPIONs و نانولوله‌های کربنی تک دیواره

کربوکسیل‌دار (SWCNTs-COOH) توسط پلی‌مرکاتیونی پلی اتیلن ایمین (PEI) عامل‌دار شد. نانوحامل‌های pDNA@SPIONs و pDNA@SWCNTs با بارگذاری DNA پلاسمیدی pBI121 بر سطح نانوذرات کاتیونی تهیه شدند. به منظور انتقال ژن به برگ گیاه پروانش، از دو روش غوطه‌وری و اینفیلتریشن توسط سرنگ استفاده شد. با بررسی حضور سیگنال فلورسنت پروتئین mGFP5 و انجام آنالیز RT-PCR موفقیت انتقال ژن و بیان آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: تغییر رنگ محلول نمک‌های کلرید آهن از قهوه‌ای شفاف به سیاه، جذب نانوذرات سنتز شده به آهن‌ربا در حالیکه نمک‌های کلرید آهن چنین خاصیتی را ندارند و نتایج آنالیزهای انجام شده سنتز نانوذرات SPIONs را تایید می‌کند. تغییر پتانسل زتا منفی اولیه نانوذرات و مثبت شدن آن اتصال PEI بر سطح نانوذرات مورد بررسی را تایید می‌کند. نانوذرات کاتیونی تهیه شده توانایی بالایی در تعامل با DNA دارند و می‌توانند به طور موثری از DNA در برابر تخریب آنزیم‌های اندونوکلاز محافظت کنند. مشاهده سیگنال فلورسنت پروتئین mGFP5 توانایی نانوحامل‌های pDNA@SPIONs و pDNA@SWCNTs را برای انتقال ژن به سلول‌های گیاهی را تایید می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد کاربرد نانوبیوتکنولوژی و استفاده از نانو حامل برای انتقال ژن به سلول‌های گیاهی می‌تواند امید بخش مهندسی ژنتیک گیاهی باشد. با تهیه نانوحامل می‌توان انتقال ژن کارآمد را تقریباً به تمام گونه‌های گیاهی مستقل از دو لپه یا تک لپه بودن از طریق روشی مبتنی بر نانوتکنولوژی با ویژگی‌هایی از جمله ساده و ارزان بودن، حذف آگروباکتريوم و محدودیت‌های استفاده از آن و بدون نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی تخصصی امکان‌پذیر ساخت.

کلیدواژه‌ها: اصلاح سطح نانوذرات، بیان گذرا ژن، انتقال ژن به گیاهان، نانوبیوتکنولوژی، نانوذرات کاتیونی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: عابدینی سارا، پورسیدی شهرام، ذوالعلی جعفر، عبدالشاهی روح الله (۱۴۰۲) بهینه‌سازی انتقال ژن موقت به گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.) از طریق معرفی نانوحامل نانوذرات ابرپارامغناطیسی اکسید آهن سنتز شده به روش سبز و نانولوله‌های کربنی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۱)، ۶۱-۸۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

طی قرن‌ها، جهان با تهدیدات بسیاری برای امنیت غذایی مواجه بوده و تاکنون اصلاح نباتات راهکارهایی برای کشاورزی پایدار فراهم کرده است. اصلاح نباتات از زمان‌های قدیم (حدود ۵۰۰۰ سال پیش) برای اهلی کردن گیاهان، بهبود کیفیت و عملکرد

محصول مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال روش‌های مرسوم و کلاسیک به نژادی گیاهان با محدودیت‌ها و چالش‌هایی روبه رو می‌باشد که مهندسی ژنتیک با کوتاه کردن طول دوره اصلاحی و انتقال هدفمند ژن و ایجاد یک تغییر پایدار یا گذرا در بیان ژن (های) گیاهی می‌تواند بر محدودیت‌های اصلاح کلاسیک فایز آید (Cunningham et al. 2018; Demirer 2020).

مهندسی ژنتیک گیاهی به دلیل وجود دیواره سلولی چندلایه و سخت سلول‌های گیاهی با چالش‌هایی روبه رو است در حالیکه سلول‌های جانوری فاقد آن می‌باشند. روش‌های مرسوم انتقال ژن، دیواره سلولی را به دو طریق دور می‌زنند: استفاده از روش‌هایی که ژن هدف را قادر می‌سازد از دیواره سلولی عبور کند از جمله انتقال ژن به واسطه آگروباکتریوم و بیولیستیک (تفنگ ژنی یا بمباران ذره‌ای) یا روش‌هایی که شامل حذف دیواره سلولی (الکتروپوریشن و انتقال به واسطه مواد شیمیایی) می‌باشند (Demirer et al. 2019). اگرچه روش‌های مرسوم انتقال ژن به سلول‌های گیاهی دارای موفقیت‌هایی بودند مانند تولید گیاهان مقاوم به کرم غوزه پنبه و کرم ساقه‌خوار ذرت با انتقال ژن *bt*، اما مشکل محدودیت دامنه میزبانی و انتقال ژن به گیاهان تک لپه توسط آگروباکتریوم، مشکل باززایی گیاهان تراریخته از پروتوپلاست در روش انتقال ژن با استفاده از الکتروپوریشن و پلی اتیلن گلیکول، آسیب سلولی و نیاز به تجهیزات تخصصی و هزینه بیشتر در استفاده از تفنگ ژنی از معایب این روش‌ها است. از این رو، عبور مولکول‌های زیستی از دیواره‌های سلولی گیاه یک چالش اساسی برای مهندسی ژنتیک موفق و کارآمد در گیاهان است (Ochoa-Olmos et al. 2016).

در دهه‌های اخیر پیشرفت چشمگیری در زمینه انتقال DNA به واسطه نانومواد به سلول‌های زنده حاصل شده است. نانوذرات به دلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مانند نسبت سطح به حجم زیاد، شکل و اندازه و ساختارهای منحصر به فرد، خواص الکترومغناطیسی، ظرفیت تبادل کاتیون، واکنش پذیری، نسبت جذب یون‌های بزرگ، خاصیت کاتالیزوری و خصوصیات بیولوژیکی تقریباً در هر رشته علمی کاربردهایی پیدا کرده‌اند (Torney et al., 2007). مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های گیاهی می‌توانند نانوذرات را از طریق دیواره سلولی خود جذب کنند. اگرچه استفاده از نانومواد برای انتقال DNA به سلول‌های گیاهی نیز قبلاً مورد بررسی قرار گرفته است، اما پیشرفت‌های چشمگیری در سال‌های اخیر انجام شده و رو به افزایش است (Zhi et al. 2022). به طور کلی، نانوذرات از جمله نانوذرات ابرپارامغناطیسی اکسید آهن^۱ (SPIONs) و نانولوله‌های کربنی^۲ (CNTs) دارای اندازه و ساختارهای مولکولی منحصر به فرد با خواص فیزیکی و شیمیایی خاص از جمله توانایی بالا برای عامل‌دار کردن سطح آنها با انواع مختلف پلی‌مرها هستند که آنها را برای انتقال مولکول‌های زیستی مانند RNA, DNA و پروتئین و همچنین انتقال دارو مورد توجه قرار داده است (Chen et al. 2015; Sosa-Acosta et al. 2020).

روش‌های مختلفی برای سنتز نانوذرات فلزی وجود دارد. بیوسنتز نانوذرات فلزی با استفاده از گیاهان و عصاره‌های گیاهی گزینه جدیدی برای تولید آنها است. سنتز سبز دارای بسیاری از ویژگی‌های مفید برای سنتز نانوذرات مغناطیسی آهن از جمله ساده،

۱. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄)

۲. Carbon nanotubes

مقرون به صرفه، سازگار با محیط زیست و غیر سمی است (Guan et al. 2022). روش هم‌رسوبی^۳ یک روش رایج و مناسب برای سنتز نانوذرات آهن با اندازه کنترل شده و خواص مغناطیسی است. این روش به دلیل سهولت و نیاز کمتر به مواد و روش‌های سخت و سمی، برای کاربردهای زیستی و پزشکی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد (Demirezen et al. 2022). نانوذرات مغناطیسی آهن، زیست‌سازگاری مناسبی را نشان می‌دهند و دارای چندین مزیت مانند محافظت در برابر هضم آنزیمی، افزایش ظرفیت بارگیری اسید نوکلئیک، نفوذ بهتر، کاهش قابل توجه هزینه و توانایی انتقال ملکول‌های زیستی در معرض میدان مغناطیسی خارجی هستند (Farmanbar et al. 2022). نانوذرات مغناطیسی آهن با سطح دارای بار مثبت، پتانسیل زیادی را به عنوان ناقل اسید نوکلئیک به سلول‌های جانوری و همچنین سلول‌های گیاهی نشان داده‌اند. اخیراً، یک ترنسفورم ژنتیکی پایدار موفق از پنبه از طریق نانوذرات مغناطیسی و تولید گیاهان تراریخته گزارش شده است (Zhao et al. 2017).

مطالعات، توانایی CNTs را در نفوذ به دیواره سلولی و همچنین غشای سلولی سلول‌های گیاهی و انتقال DNA یا سایر زیست‌ملکول‌ها را به پروتوپلاست و سلول‌های دیواره‌دار گیاهی نشان داده است (Zhang et al. 2019; Liu et al. 2009). در مطالعات پیشین با بررسی مکانسیم ورود نانوذرات به سلول‌های گیاهی گزارش شده است جذب سلولی نانوذرات می‌تواند از طریق هر دو مسیر وابسته به انرژی (اندوسیتوز) و مستقل از انرژی (نفوذ مستقیم) رخ دهد. بار، اندازه و شکل نانوذرات تا حد زیادی بر این مسیرها تأثیر می‌گذارد (Zhang et al. 2022). همچنین در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶ تأثیر اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات بر نفوذ به غشاهای گیاهی مورد مطالعه قرار گرفت و یک مدل ریاضی تحت عنوان LEEP^۴ ارائه شد. این مدل پیش‌بینی کرد که اندازه نانوذرات بسیار مهم است و نانوذرات با اندازه زیر حد بحرانی حتی در پتانسیل‌های زتا مختلف قادر به نفوذ به غشاء نیستند. آنها نشان دادند ورود منفعل به لیپید دولایه کلروپلاست تحت تأثیر اندازه نانوذرات و پتانسیل زتا آنها قرار گرفت (Wong et al. 2016). اخیراً، در مطالعه‌ای از مدل LEEP برای تنظیم نانومواد برای انتقال منفعل ملکول‌های زیستی به طور انتخابی به اندامک‌های گیاهی خاص استفاده شد (Kwak et al. 2019). استفاده از نانوذرات برای انتقال ژن به سلول‌های گیاهی، به دلیل هزینه کمتر و بدون محدودیت گونه گیاهی، می‌تواند روشی مناسب برای غلبه بر محدودیت دیواره سلولی در انتقال ژن به سلول‌های گیاهی باشد.

پروانش (*Catharanthus roseus*) یک گیاه دارویی ارزشمند متعلق به خانواده Apocynaceae است که بیش از ۱۳۰ نوع از آلکالوئیدهای ایندول ترینوئیدی^۵ (TIAs) را تولید می‌کند و هیچ گیاه دیگری گزارش نشده است که چنین طیف گسترده‌ای از آلکالوئیدهای با ساختار پیچیده را تولید کند. وینبلاستین^۶ و وینکرسستین^۷ بیس-ایندول آلکالوئیدهای بسیار مهم پروانش هستند که در

۳.Co-precipitation method

۴.Lipid Exchange Envelope and Penetration

۱.Terpenoid indole alkaloids

۲.vincristine

۳.vinblastine

درمان سرطان استفاده می‌شوند. در حالیکه استفاده آنها در مقیاس صنعتی تولید دارو یک چالش مهم را نشان می‌دهد به دلیل اینکه تولید این آلكالوئیدهای ارزشمند از گیاه خیلی پایین است، استخراج آنها یک فرایند بسیار هزینه‌بر می‌باشد، سنتز شیمیایی به دلیل دارا بودن ساختارهای پیچیده غیر عملی است. پیشرفت‌های اخیر مهندسی متابولیک و استراتژی‌های مهندسی ژنتیک یک روش امیدوار کننده برای افزایش تولید ایندول آلكالوئیدها را نشان می‌دهند (Kulkarni et al., 2016). انواع مختلفی از ژن‌های مسیر سنتز TIAs کلون شده‌اند و با انتقال به گیاه، ریشه‌های مویین، سلول‌ها و کالوس پروانش بیان شده‌اند و اثرات متفاوتی بر بیوسنتز TIAs و همچنین در سطح متابولم نشان داده‌اند (Tang & Pan, 2017). به طور مثال بیش بیان ژن $CrOrca3^A$ در ریشه‌های مویین پروانش باعث افزایش سطح بیان چندین ژن دخیل در مسیر بیوسنتز TIAs شد (AS, TDC, DXS, CPR, G10H, SLS, STR, SGD, D4H) و در نتیجه تولید برخی از TIAs افزایش یافت (Wang et al., 2012). ژن کلیدی Dat^9 برای بیوسنتز ویندولین توسط اگروباکتریوم تومه فاشینس به گیاه پروانش انتقال داده شد و منجر به افزایش سطح ویندولین در برگ‌های گیاهان تراریخته شد (Sharma et al., 2018). گیاه پروانش یکی از گیاهان دارویی است که گسترده‌ترین مطالعات در ارتباط با آن صورت گرفته است و با اینکه گیاه مدل نیست به عنوان یک گیاه مدل برای مطالعه متابولیسم آلكالوئیدها در گیاهان در نظر گرفته شده است (Zhou et al., 2012). هدف از این مطالعه سنتز سبز نانوذرات ابر پارامغناطیسی اکسید آهن و تهیه نانوحامل و بررسی قابلیت آنها در انتقال DNA به برگ گیاه دارویی ارزشمند پروانش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سنتز سبز نانوذرات ابر پارامغناطیسی آهن: به منظور تهیه عصاره آبی برگ گیاه پروانش، برگ‌های سالم گیاه پس از شستشو با آب دیونیزه در سایه و دمای اتاق خشک شدند. سپس به منظور عصاره‌گیری به هر یک گرم پودر برگ خشک گیاه ۲۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد و بر روی هیتر استیرر با دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت همزده شد. پس از خنک شدن مخلوط سانتریفیوژ با دور ۹۵۰۰rpm و دمای چهار درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. محلول رویی از کاغذ واتمن (Whatman Cellulose Filter Paper No. 42) عبور داده شد و سانتریفیوژ تا حذف کامل بقایای گیاهی تکرار شد. عصاره حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و در تمام مراحل از وسایل استریل استفاده شد. سنتز نانوذرات SPIONPs طبق روش Lin et al. (2020) با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا نمک‌های کلرید آهن به نسبت ۱:۱/۵ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) و $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ به خوبی حل شدند و سپس بر روی هیتر استیرر قرار گرفت و پس از رسیدن دما به ۸۰ درجه سلسیوس یک میلی‌لیتر عصاره گیاهی اضافه گردید و پس از ده دقیقه توسط سدیم هیدروکسید پنج مولار PH مخلوط واکنش به ۱۱ رسانیده شد. پس

۴.Octadecanoid-responsive Catharanthus AP2/ERF domain

۵.Deacetylvindoline 4-O-acetyl transferase

از خنک شدن مخلوط واکنش با استفاده از سانترفیوژ شستشو نانوذرات انجام شد (۹۵۰۰rpm، ۱۵ دقیقه، دمای چهار درجه سلسیوس). آزمایش حاضر در آزمایشگاه تحقیقاتی بخش ژنتیک و تولیدات گیاهی و بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان در طی سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰ انجام شد.

تعیین مشخصات نانوذرات SPIONPs سنتز شده: به منظور تعیین حداکثر پیک جذبی، ساختار کریستالی، تعیین

اندازه و شکل دقیق، ویژگی‌های مغناطیسی و تعیین بار الکتریکی سطحی نانوذرات SPIONPs سنتز شده آنالیزهای UV-Vis, XRD, VSM, TEM و پتانسیل زتا انجام شد (Tabasi et al., 2022).

کربوکسیله کردن نانولوله‌های کربنی تک جداره: در این پژوهش نانولوله‌های کربنی تک جداره^{۱۰} (SWCNTs)

از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان خریداری شد. مقدار ۱۰۰ میلی گرم از SWCNTs با ۵۰ میلی لیتر اسید فسفوریک و اسید نیتریک (۱:۳) مخلوط شد و به مدت ۶ ساعت در حمام التراسونیک (40 KHz) قرار گرفت. پس از آن، تا حذف کامل اسید و خنثی شدن PH نانولوله‌های کربوکسیله شده با آب دیونیزه شستشو داده شد و در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید و پتانسیل زتا نانوذرات کربوکسیله شده اندازه گیری شد (Zaboli et al. 2021).

تهیه نانوذرات SPIONPs و نانولوله‌های کربنی کاتیونی: پس از سنتز سبز SPIONها و کربوکسیلاسیون

SWCNTs، ۲۰ میلی گرم پودر از نانوذرات به ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد و توسط حمام التراسونیک به خوبی پراکنده شد. پلی‌مرکاتیونی پلی اتیلن ایمین^{۱۱} (PEI) (۰/۱ درصد) در بافر PBS حل شد و به صورت قطره قطره تحت همزن مداوم به نانوذرات اضافه شد. سپس مخلوط به مدت یک شب با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق روی استیرر قرار گرفت. محلول حاصل با آب دیونیزه پنج بار توسط فیلتر شسته شد تا PEI اضافی به طور کامل حذف شود. به منظور تایید اضافه شدن گروه‌های آمین بر سطح نانوذرات آنالیز پتانسیل زتا انجام شد.

بارگیری DNA بر سطح نانوذرات عاملدار شده: ابتدا، DNA پلاسمیدی، pBI121 حاوی ژن گزارشگر *mgfp5*

به عنوان یک ناقل بیانی گیاهی، به نانوذرات پوشش‌دار شده با PEI اضافه شد و پس از ۱۰ بار پیپت کردن، ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جهت تعیین بهترین نسبت نانوذره به DNA پلاسمیدی، نانوذره در نسبت‌های جرمی مختلف به DNA اضافه شد (۰/۵:۱، ۱:۱، ۲:۱، ۳:۱، ۳/۵:۱ و ۴:۱) و نتایج توسط الکتروفورز ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

حفاظت DNA بارگیری شده بر روی سطح نانوذرات در برابر آنزیم DNA نوکلئاز: پس از لود DNA

پلاسمیدی بر روی سطح نانوذرات، نانوحامل توسط آنزیم DNaseI تیمار شد و به منظور فعال شدن آنزیم مخلوط واکنش در دمای

^{۱۰}Single-walled carbon nanotubes

^{۱۱} [Polyethyleneimine](#)

۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد و پس از ۱۲ ساعت با قرار دادن مخلوط واکنش به مدت ده دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس آنزیم غیر فعال شد و الکتروفورز ژل آگارز انجام شد.

انتقال ژن به سلول‌های گیاهی به واسطه نانوحامل: جهت انتقال ژن به برگ گیاه از دو روش غوطه‌وری و اینفیلتریشن

از طریق سرنگ استفاده شد. در روش غوطه‌وری ریزنمونه‌های برگ‌ی به مدت ۲۴ ساعت در سوسپانسیون حاوی نانوحامل pDNA@SWCNTs و pDNA@SPIONs در شرایط تاریکی و دمای ۲۶ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از آن ریزنمونه‌های برگ‌ی یکبار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و سپس بر روی محیط کشت MS قرار داده شدند و در دمای ۲۶ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. در روش اینفیلتریشن به واسطه سرنگ، سوسپانسیون حاوی نانوحامل توسط یک سرنگ انسولین به صورت قطره بر روی برگ گیاه پروانش رشد یافته در گلدان در مرحله گلدهی قرار داده شد و محل قرارگرفتن قطره حاوی نانوحامل با نوک سوزن به صورت کاملاً سطحی و جزیی خراش داده شد.

ردیابی سیگنال فلورسنت پروتئین GFP: برگ‌های تیمار شده پس از ۷۲ ساعت از گیاه جدا شد و به منظور تایید

انتقال و بیان ژن *mgfp5* و ردیابی سیگنال فلورسانس پروتئین mGFP5 نمونه‌ها تحت اشعه UV با طول موج ۳۶۵ نانومتر قرار گرفتند. به منظور تایید و تعیین کمیت بیان ژن *mgfp5* آنالیز RT-PCR انجام گرفت. از برگ‌های ترنسفورم شده گیاه پروانش که در آنها سیگنال فلورسانس GFP مشاهده شده بود و نمونه برگ شاهد استخراج RNA توسط کیت (Total RNA Isolation) شرکت دنایست آسیا (مشهد، ایران) انجام شد. نمونه‌های RNA توسط آنزیم DNase I تیمار شد و سنتز cDNA طبق دستور شرکت سازنده کیت (Easy cDNA Synthesis Kit) شرکت پارس طوس (مشهد، ایران) انجام شد. به منظور تایید سنتز cDNA و بیان ژن هدف واکنش PCR توسط پرایمرهای اختصاصی ژن *mgfp5* انجام شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

Table 1. The used primers sequence

ژن	پرایمرها	طول قطعه تکثیر	دمای اتصال پرایمر
Gene	Primers	شده	Annealing temperature (°C)
		Production size (bp)	
<i>mgfp5</i>	Forward	754	55
	Reverse		

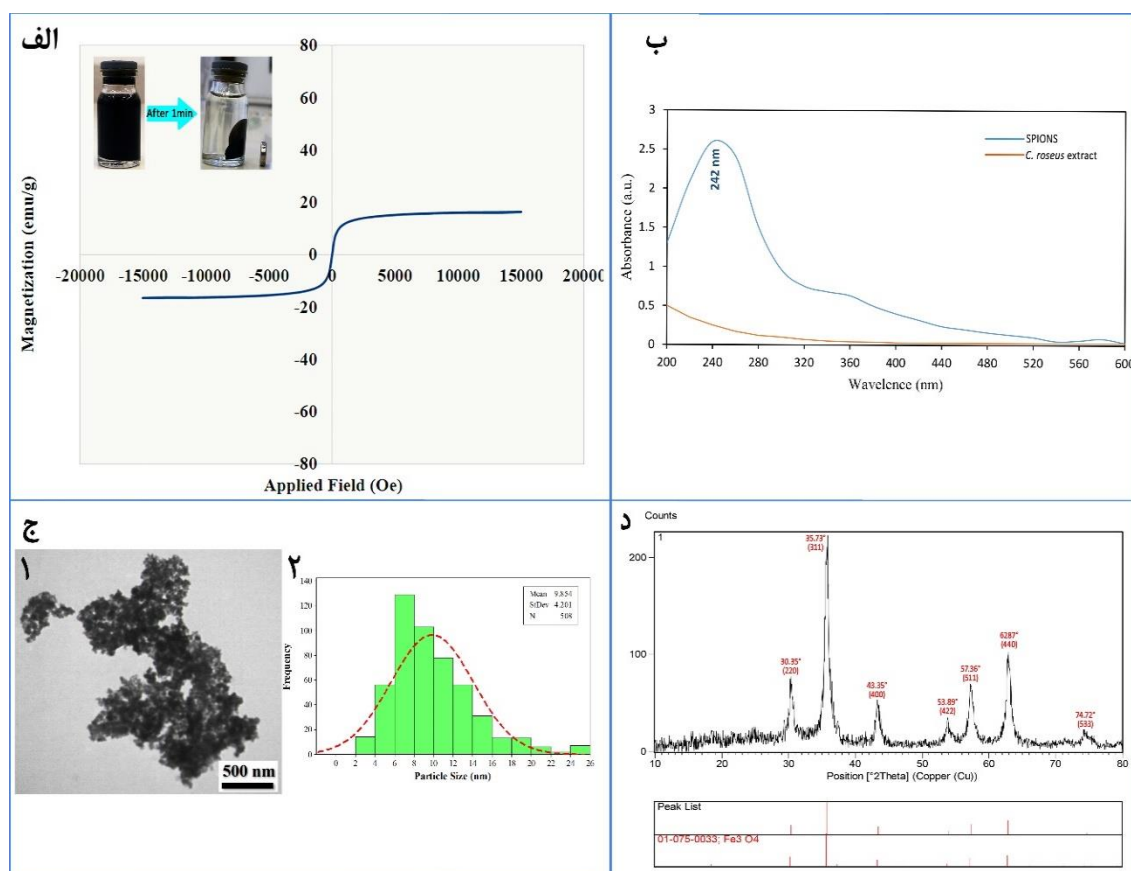
نتایج و بحث

تعیین مشخصات نانوذرات SPIONs سنتز شده: پس از افزودن NaOH رنگ مخلوط واکنش نمک‌های کلرید

آهن و عصاره گیاه پروانش به رنگ سیاه تغییر یافت که نشان دهنده تشکیل نانوذرات Fe_3O_4 می باشد. شکل ۱-الف به وضوح نشان می‌دهد که مغناطش نانوذرات SPIONs سنتز شده به اندازه‌ای قوی است که می‌توان آن‌ها را به راحتی با یک آهنربای کوچک جمع کرد و از محلول جدا کرد که نشان می‌دهد نانوذرات SPIONs سنتز شده دارای خواص مغناطیسی هستند و پس از حذف آهن‌ریا، نانوذرات به راحتی با تکان دادن پراکنده شدند. علاوه بر این، رفتار مغناطیسی نانوذرات SPIONs سنتز شده توسط VSM در دمای اتاق بررسی شد. منحنی مغناطیسی M-H دارای شکل S است، همانطور که در شکل ۱-الف نشان داده شده است هیچ حلقه هتروزیسی وجود ندارد و میدان وادارندگی (Hc) آن نیز صفر می‌باشد که رفتار ابرپارامغناطیسی نانوذرات سنتز شده را تایید می‌کند که از خواص جالب نانوذرات بسیار کوچک می‌باشد و از این جهت نانوذرات سنتز شده را برای هدف تهیه نانوحامل مناسب می‌سازد (Caizer 2016).

مغناطش اشباع (Ms) بسیار پایین‌تر از مغناطش اشباع مگنتیت (92 emu.g^{-1}) است. طبق نظریه سوپرپارامغناطیس فرنکل و دورفمن، مغناطش ذرات در میدان اعمال شده با اندازه آن متقارن است و کاهش مغناطش اشباع به دلیل کاهش اندازه ذرات منجر است و به افزایش نسبت سطح به حجم منجر می‌شود (Khanna et al. 2018). با کاهش مغناطش اشباع، خواص ابرپارامغناطیسی با سایر خواص ذاتی مانند نسبت سطح به حجم بالا، سمیت کم، زیست سازگاری مناسب و امکان جداسازی ساده با آهن ربا موجب شده SPIONs در زمینه‌های مختلف از جمله علوم زیستی، پزشکی و محیطی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. (Khalid et al., 2018). طیف جذبی نانوذرات SPIONs سنتز شده و عصاره آبی برگ گیاه پروانش در شکل ۱-ب نشان داده شده است. نانوذرات SPIONs سنتز شده دارای حداکثر جذب در طول موج‌های ۲۴۲ نانومتر است که نشان‌دهنده تشکیل نانوذرات SPIONs است. درحالی‌که هیچ پیک جذب برای عصاره برگ گیاه پروانش در طیف ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر مشاهده نشد. این نشان دهنده کاهش یون‌های آهن به نانوذرات توسط ملکول‌های زیستی موجود در عصاره برگ گیاه پروانش است (Velsankar et al. 2022). تصویر TEM در شکل ۱-ج به وضوح نشان داد که نانوذرات سنتز شده شکل کروی تقریباً مشابه دارند و هیچ کلوخه شدگی برای نانوذرات SPIONs سنتز شده مشاهده نمی‌شود. منطقه تیره روی سطح SPIONs در تصویر TEM احتمالاً می‌تواند نشان دهنده لایه‌ای از مولکول‌های زیستی در عصاره برگ گیاه پروانش باشد (Goswami et al., 2011). عصاره آبی برگ گیاه پروانش حاوی متابولیت‌های ثانویه از جمله آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و گلوکوزیدها و غیره است که به عنوان کاهنده یون‌های Fe^{2+} و Fe^{+3} پوشش آلی و پایدار کننده نانوذرات عمل می‌کنند (Kotakadi et al. 2013). هیستوگرام توزیع اندازه نانوذرات SPIONs سنتز شده نشان می‌دهد که میانگین اندازه قطر نانوذرات تقریباً ۹ نانومتر است (شکل ۱-د). اثبات تشکیل نانوذرات، نوع ساختار کریستالی

و اندازه تقریبی نانوذرات توسط XRD انجام شد. شکل ۱-د الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات SPIONs سنتز شده را نشان می‌دهد که پیک‌های ثبت شده مطابقت با شاخص‌های میلر نشان می‌دهد.



شکل ۱. تعیین مشخصات نانوذرات سوپراپارامغناطیسی اکسید آهن (SPIONs) سنتز شده. (الف) آنالیز مغناطیس سنج نمونه ارتعاشی (VSM)، (ب) طیف اسپکتروفوتومتر فرابنفش - مرئی عصاره آبی برگ گیاه پروانش و نانوذرات SPIONs سنتز شده، (ج) (۱) تصویر میکروسکوپ الکترونی، (۲) هیستوگرام توزیع اندازه ذرات، (د) الگوی پراش اشعه X SPIONs نانوذرات

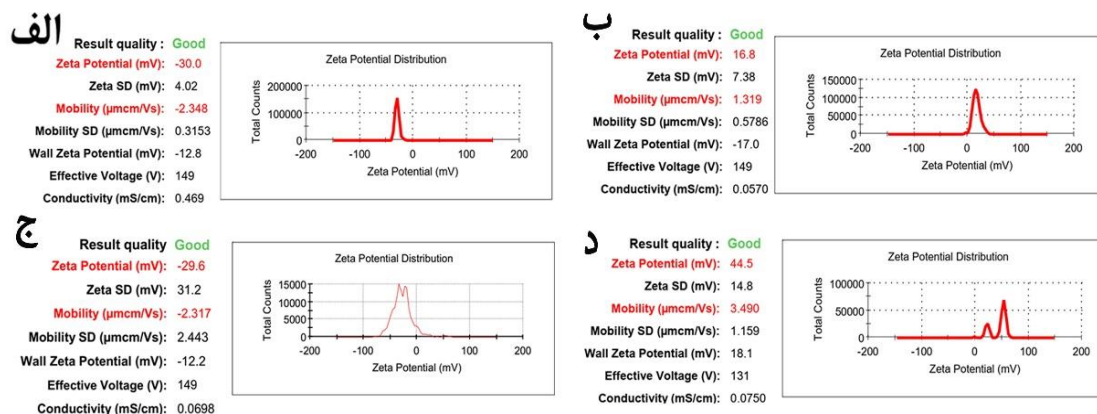
Figure 2. Characterization of synthesized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). (A) Vibrating sample magnetometer (VSM) analysis, (B) UV-Vis spectrophotometer spectrum of *Catharanthus Roseus* leaves aqueous extract and synthesized SPIONs, (C) 1) Electron microscope image (TEM), 2) Particle size distribution histogram, (D) X-ray diffraction pattern (XRD) of nanoparticles

صفحات مربوط به پیک‌های شناسایی شده در مقدار 2θ در شکل نشان داده شده است. متوسط اندازه نانوذرات سنتز شده توسط فرمول شرر ۱۸/۴۹ نانومتر محاسبه شده که با نتایج تصویر TEM مطابقت دارد. نتایج XRD تأیید می‌کند که نانوذرات

SPIONs سنتز شده دارای ماهیت کریستالی با خلوص بالا هستند زیرا هیچ پیک ناخالصی ثبت نشده است. این نتایج با سایر نتایج گزارش شده مطابقت دارند (Rahmani et al. 2020). نتایج پتانسیل زتا (شکل ۲-الف) نشان دهنده وجود بارالکتریکی سطحی منفی قوی برای نانوذرات SPIONs پوشیده شده با ملکولهای زیستی عصاره برگ گیاه پراونش را نشان می‌دهد که بستری مناسب را برای عاملدار کردن نانوذرات و تهیه نانوحامل فراهم می‌کند.

تهیه نانو حامل: به منظور تهیه نانوحامل و مطالعه بیان گذرای ژن *mgfp5* دو نانوذره متفاوت مورد بررسی در این پژوهش یعنی نانوذرات SPIONs سنتز شده به روش سبز و COOH-SWCNTs مورد بررسی قرار گرفت. واکنش کربوکسیلاسیون نانولوله‌های کربنی به منظور ایجاد گروه‌های کربوکسیل اضافی و بهتر دیسپرس شدن در آب در محیط اسیدی توسط حمام التراسونیک انجام شد. جهت تایید ایجاد گروه‌های کربوکسیل بر روی سطح نانولوله‌های کربنی تعیین بارالکتریکی سطحی توسط اندازه‌گیری پتانسیل زتا استفاده شد که نتایج نشان دهنده حضور باند مربوط به گروه کربوکسیل و بار سطحی منفی برای COOH-SWCNTs می‌باشد (شکل ۲-ج).

نانوذرات با بار سطحی مثبت برای بارگیری DNA بر روی نانوذرات و تهیه نانوحامل لازم می‌باشد. عاملدار کردن نانومواد توسط پلی اتیلن ایمین منشعب به عنوان یک پلی مر کاتیونیک مورد توجه و با پایداری زیاد و با قابلیت ایجاد پیوند آیونیک قوی با اسیدهای نوکلئیک انجام شد (Ma et al. 2016). در مطالعات بسیاری جهت عاملدار کردن هم نانومواد فلزی و هم CNTs با هدف کاربردهای زیستی، ژن درمانی، انتقال ژن و دارو مورد استفاده قرار گرفته است. مشاهده است که نانوذرات با بار سطحی مثبت نسبت به نمونه‌های با بار سطحی منفی یا خنثی جذب سلولی بیشتری دارند که بدلیل وجود بارهای منفی بر سطح غشای سلولی است و علاوه بر این سطح با بار مثبت نانوذرات می‌تواند بر القای داخل شدن نانوذرات به واسط مکانیسم‌های مربوط به اندوسیتوز و جذب سلولی سریعتر و انتقال ژن کارآمدتر تاثیرگذار باشد (de Almeida et al. 2021). پیوند PEI بر روی سطح نانوذرات SPIONs و COOH-SWCNTs از طریق اندازه‌گیری پتانسیل زتا (شکل ۲-ب و ۲-د) تأیید شد. پتانسیل زتا اولیه ۳۰- میلی ولت برای SPIONs و ۲۹/۶- میلی ولت برای COOH-SWCNT ثبت شد و پس از واکنش با PEI پتانسیل زتا به ۱۶/۸ و ۴۴/۵ میلی ولت (به ترتیب) افزایش یافت که اتصال کووالانسی PEI را بر سطح نانوذرات SPIONs و COOH-SWCNTs تأیید می‌کند. نانوذرات عامل‌دار شده در نسبت‌های مختلف با pdNA مخلوط شد و از آنجایی که حرکت DNA در ژل آگارز به بارالکتریکی و اندازه آن بستگی دارد بنابراین بارگیری DNA بر سطح نانو مواد مانع حرکت آن در ژل آگارز می‌شود (Kommareddy and Amiji 2007). نتایج ژل آگارز نشان داد که نانو مواد عامل‌دار شده با بار مثبت ظرفیت بالایی در جذب DNA بر روی سطح خود دارند و کارایی جذب DNA ۱۰۰ درصد بود (شکل ۳-الف). بدلیل اینکه PEI منشعب گروه‌های NH^+ زیادی را تامین می‌کند.

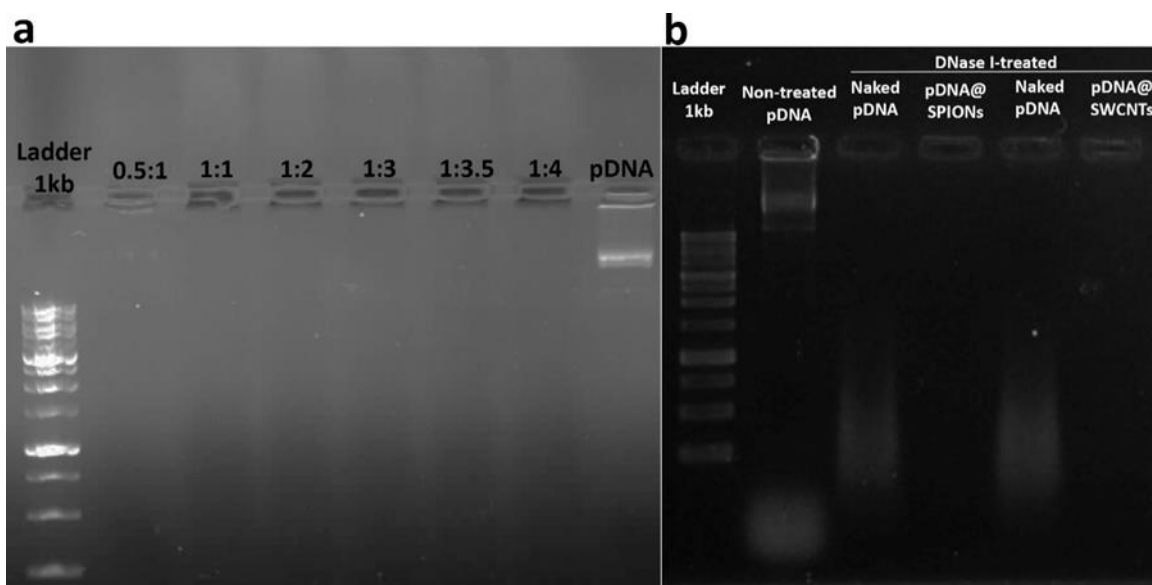


شکل ۲. پتانسیل زتا نانوذرات (الف) نانوذرات SPIONs سنتز شده، (ب) نانوذرات SPIONs عاملدار شده با پلی اتیلن ایمین، (ج) نانولوله‌های کربنی تک جداره کربوکسیله شده، (د) نانولوله‌های کربنی تک جداره عاملدار شده با پلی اتیلن ایمین

Figure 2. Zeta potential of nanoparticles (A) green synthesized SPIONs nanoparticles, (B) functionalized SPIONs with polyethyleneimine, (C) carboxylated single-walled carbon nanotubes, (D) functionalized single-walled carbon nanotubes with polyethyleneimine

بار سطحی کمپلکس $NPs@pDNA$ طبق مدل LEEP بر کارایی داخل شدن حامل به درون سلول گیاهی تاثیر گذار است (Wong et al. 2016). در نسبت‌های نامناسب DNA و نانوذره بدلیل اینکه بار سطحی نانوذرات کمتر می‌شود و نیروی دافعه بین نانوذرات ضعیف می‌شود و منجر به ناپایداری و تجمع آنها می‌شود. بنابراین، نسبت بهینه نانوذره و DNA مورد بررسی قرار گرفت و برای هر دو نانوذره مورد بررسی نسبت ۱:۲ از DNA و نانوذره به عنوان نسبت بهینه استفاده شد. پس از داخل شدن نانوحامل به درون سلول و تا رسیدن DNA به نوکلئوپلاسم حفاظت DNA در برابر آنزیم‌های تخریب‌گر در فضای سلولی بسیار حایز اهمیت است. در مطالعات پیشین حفاظت اسیدهای نوکلئیک بارگیری شده بر سطح نانولوله‌های کربنی یا نانوذرات فلزی دیگر در برابر آنزیم‌های نوکلئاز تایید شده است (He et al. 2003; Pouya et al. 2022). در این پژوهش نیز واکنش هضم توسط آنزیم DNase I انجام شد (شکل ۳-ب). نوع نانوذره بر این موضوع تاثیری نداشت و نتایج حفاظت کامل و پایداری DNA بارگیری شده بر روی نانوذرات عامل‌دار شده را تایید می‌کند. Kwak et al. (۲۰۱۹) انواع مختلفی از SWCNT های عاملدار شده با کیتوزان (CS-SWCNTs) را تهیه کردند. آنها بیان داشتند که نانوحامل CS-SWCNT انتقال دهنده DNA پلاسمیدی حامل ژن گزارشگر (ژن *yfp*) به کلروپلاست و بیان ژن *yfp* بود. این مطالعه نشان داد که کیتوزان از طریق برهم کنش‌های الکترواستاتیک به DNA پلاسمیدی متصل می‌شود و آن را از فعالیت آنزیم‌های نوکلئاز محافظت می‌کند. pH سیستوزول به اتصال DNA پلاسمیدی به CS-SWCNTs کمک می‌کند. اما پیوند الکترواستاتیک ضعیف‌تر و pH اسیدی موجود

در استروما کلروپلاست باعث آزادسازی پلاسمیدی از CS-SWCNTs می‌شود. این مطالعات نشان داد که اندازه، ویژگی‌های سطح و بارالکتریکی نانوذرات موثر بر انتقال DNA به سلول‌های گیاهی می‌باشد.

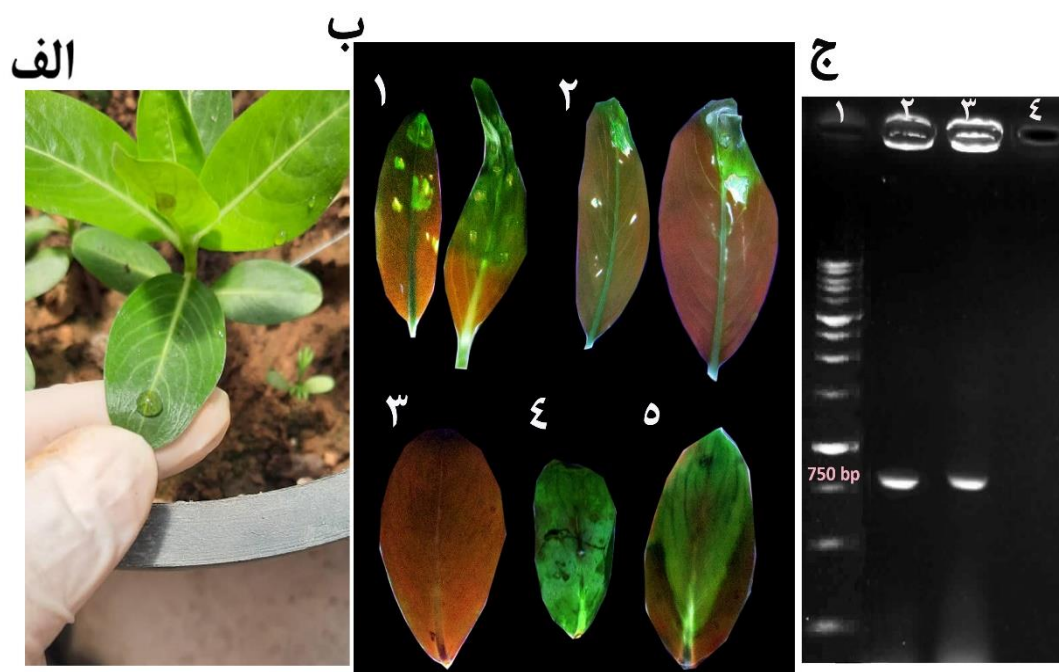


شکل ۳. الکتروفورز ژل آگارز (الف) تعیین نسبت مناسب نانوذره: pDNA (ب) محافظت pDNA بارگیری شده بر سطح نانوذره در برابر آنزیم DNase I (non-treated pDNA: پلاسمید شاهد، Naked pDNA: پلاسمید بارگیری نشده بر سطح نانوذره و تیمار شده با آنزیم و pDNA@SWCNT و pDNA@SPIONs: پلاسمید بارگیری شده بر سطح نانوذره و تیمار شده با آنزیم)

Figure 3. Electrophoresis gel image (a) pDNA:NPs in different ratios (b) pDNA protection from degradation of DNase I (non-treated pDNA: Control, Naked pDNA: DNase-treated pDNA without nanoparticles, pDNA@SWCNT and pDNA@SPIONs: DNase-treated pDNA loaded on nanoparticles surface)

انتقال ژن توسط نانو حامل به سلول‌های گیاهی و بیان گذاری ژن *mgfp5*: بررسی امکان انتقال و بیان ژن *mgfp5* توسط نانوحامل‌های pDNA@SWCNT و pDNA@SPIONs به برگ گیاه پروانش توسط دو روش غوطه‌وری و اینفیلتریشن توسط سرنگ صورت گرفت. بررسی بیان ژن *mgfp5* و تولید پروتئین mGFP5 نمونه‌های ترنسفورم شده پس از ۷۲ ساعت با تاباندن اشعه نورفرابنفش، انتقال ژن موفق برای هر دو نانوحامل pDNA@SWCNT و pDNA@SPIONs مشاهده شد (شکل ۴-ب). به طور کلی با توجه به نتایج به دست آمده روش غوطه‌وری نسبت به اینفیلتریشن توسط سرنگ مراحل بیشتری دارد و زمان بر هست و مستلزم مراحل کشت بافت می‌باشد و احتمال آلودگی و از بین رفتن نمونه‌ها نیز وجود دارد و هم درصد انتقال ژن و هم شدت سیگنال فلورسانس پروتئین mGFP5 در این روش به نسبت کمتر بود. به هر حال در انتقال ژن با هدف بیان موقت

اینفیلتریشن توسط سرنگ روش مناسب‌تری به نظر می‌رسد اما روش غوطه‌وری نیز برای اهداف دیگر می‌تواند کارآمد باشد. در مطالعات پیشین، یک روش انتقال ژن موفق به دانه گرده گیاه پنبه را توسط نانوذرات مغناطیسی آهن اصلاح شده با پلی اتیلن ایمین (MNs-DNA) گزارش شد. در این مطالعه جهت انتقال DNA توسط نانوذرات روش مگنتوفکشن^{۱۲} به کار رفته است که در این روش از نیروی میدان مغناطیسی جهت تسریع انتقال DNA خارجی استفاده می‌شود (Zhao et al. 2019). با توجه به روش اجرایی مگنتوفکشن این روش تنها برای سوسپانسیون سلولی و پروتوپلاست سلول‌های گیاهی قابل استفاده است و همچنین نیازمند تجهیزات خاصی جهت کشت سلول‌ها و انجام مگنتوفکشن می‌باشد. در مطالعه‌ای دیگر از پتیده‌های شیمریک مهندسی شده و SWCNT‌های اصلاح شده توسط آرژنین (ARG-SWCNTs) برای انتقال DNA به سلول‌های ریشه توتون استفاده شد. این مطالعه نشان داد که Arg-SWCNT که DNA پلاسمیدی بر سطح نانوذره بارگیری شده است و به دلیل شکل استوانه‌ای که دارد می‌تواند از سدهای سلولی عبور کند و به درون سلول انتقال یابد و انتقال ژن صورت گیرد. انتقال DNA به واسطه Arg-SWCNT در سلول‌های ریشه تنباکو از طریق بیان ژن *mgfp5* توسط میکروسکوپ فلورسانس و همچنین وسترن بلات تایید شد. آنها به این نتیجه رسیدند که افزایش میزان Arg-SWCNTs می‌تواند منجر به تجمع CNT شود و راندمان انتقال ژن را به میزان قابل توجهی کاهش دهد. از این رو، آنها بیان داشتند که صرف نظر از اندازه، شیمی سطح نانوذرات، SWCNT نسبت به MWCNTs برای انتقال DNA به سلول‌های گیاهی کارآمد هستند و از DNA در برابر تخریب اندونوکلازها محافظت می‌کند و می‌تواند برای انتقال ژن پایدار یا گذرای گیاه استفاده شود. علاوه بر این، استفاده از آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی، پتیده‌های نافذ سلول یا پتیده‌های اکسپسین می‌تواند در بهبود راندمان انتقال ژن امری مفید باشد (Schwartz et al. 2020). در پژوهشی دیگر، استفاده از CNTs برای انتقال ژن به سلول‌های سوسپانسیون سلولی گیاه بابونه آلمانی گزارش شد. در این پژوهش، سطح CNTs با استفاده از PEI اصلاح شد و ssDNA-FITC (فلورسئین ایزوتیوسیانات) با پیوند الکترواستاتیک به سطح CNTs متصل شد. سپس، جهت تسهیل و افزایش راندمان انتقال نانوحامل از امواج التراسونیک استفاده شد (Safdar et al. 2022). به هر حال کاربرد آنزیم‌ها و یا روش التراسونیک مستلزم صرف هزینه می‌باشد و امواج التراسونیک ضمن نیاز به دستگاه تامین کننده این امواج می‌تواند به بافت و سلول‌های گیاهی آسیب وارد کند و از این جهت سبب کاهش راندمان انتقال ژن شوند. همچنین استفاده از سوسپانسیون سلولی در پژوهش‌های پیشین وابسته به تهیه پروتکل بهینه شده و صرف زمان جهت رسیدن به نمونه مناسب برای انتقال ژن می‌باشد بنابراین، استفاده از اینفیلتریشن به واسطه سرنگ و یا وکیوم اینفیلتریشن جهت تسهیل و تسریع انتقال نانو حامل به فضای بین سلولی و درون سلولی راهکاری ساده و کم هزینه و در دسترس به نظر می‌رسد.



شکل ۴. الف) اینفیلتریشن توسط سرنگ، ب) سیگنال فلورسنت پروتئین mGFP5 تحت تابش اشعه فرابنفش (۱ و ۲) برگ ترنسفورم شده با روش اینفیلتریشن توسط سرنگ (۳) نمونه شاهد (۴ و ۵) برگ ترنسفورم شده با روش غوطه‌وری، ج) نتایج RT-PCR (۱) نشانگر ۱kb، (۲ و ۳) باند اختصاصی ژن *mgfp5* نمونه برگ ترنسفورم شده با روش اینفیلتریشن توسط سرنگ، غوطه‌وری (۴) نمونه برگ شاهد

Figure 4. (A) Infiltration by syringe, (B) The Fluorescent signal of GFP protein exposed to UV light (1,2) Transformed leaf via infiltration by syringe method, (3) Control, (4,5) Transformed leaf via immersion method (C) RT-PCR results (1) 1kb DNA ladder, (2,3) transformed leaves with mGFP5 signal (4) Control

نتیجه‌گیری: مهندسی ژنتیک گیاهان ممکن است چالش تامین غذای کافی، تولید متابولیت‌های ارزشمند دارویی و انرژی زیستی را برای جمعیت جهانی رو به افزایش و ضمن شرایط آب و هوایی در حال تغییر را برطرف کند. همچنین، علی‌رغم پیشرفت‌های مهندسی ژنتیک در بسیاری از گونه‌های بیولوژیکی، انتقال مولکول‌های زیستی به سلول‌های گیاهی یکی از محدودیت‌های اصلی برای مهندسی ژنتیک سریع، در مقیاس بالا و با کارایی بالا برای بافت‌ها و اندام‌های گیاهی وجود دارد. امروزه انتقال ژن مبتنی بر نانومواد نوید بخش امکان انتقال DNA و همچنین RNA و پروتئین هم در گیاهان مدل و هم در گیاهان زراعی صرف نظر از دو لپه یا تک لپه بودن با راندمان بالا و بدون سمیت یا آسیب بافتی و عدم نیاز به تجهیزات تخصصی است. در این پژوهش، سنتز سبز نانوذرات SPIONs توسط عصاره آبی برگ گیاه پروانش و سپس عامل‌دار کردن نانوذرات SPIONs و SWCNTs و تهیه نانوحامل

انجام شد. نتایج نشان دهنده انتقال ژن موفق توسط نانوحامل‌های pDNA@SWCNTs و pDNA@SPIONs به برگ گیاه پروانش بود. روش معرفی شده در این مطالعه برای کاربردهای مهندسی ژنتیک گیاهی در بسیار از موارد از جمله ژنومیکس کارکردی، بررسی عملکرد ژن‌ها و تولید پروتئین‌های نوترکیب ارزشمند توسط گیاهان و امکان مطالعات بنیادی و شناسایی مسیرهای بیوستیزی و ایجاد فنوتیپ‌های مطلوب در گیاهانی که در حال حاضر متکی بر انتقال ژن توسط روش‌های مرسوم می‌باشند و یا امکان انتقال ژن به آنها با روش‌های موجود سخت یا امکان‌پذیر نمی‌باشد مفید و کاربردی به نظر می‌رسد. انتقال ژن به واسطه روش پیشنهاد شده و مبتنی بر نانوتکنولوژی بدلیل سنتز سبز نانوذرات، آسان، ارزان، زیست سازگار و سریع، مستقل از گونه گیاهی و عدم نیاز به تجهیزات خاص آزمایشگاهی و مقیاس پذیر بودن می‌تواند یک روش مناسب و کارآمد برای انتقال ژن به گیاهان و بیان گذرای ژن باشد.

سپاسگزاری: از بخش بیوتکنولوژی و بخش تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان به خاطر همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

- Caizer C (2016) Nanoparticle size effect on some magnetic properties. Handbook of Nanoparticles 475.
- Chen G, Qiu J, Liu Y, et al. (2015) Carbon nanotubes act as contaminant carriers and translocate within plants. Sci Rep 5,1–9.
- Cunningham FJ, Goh NS, Demirer GS, et al. (2018) Nanoparticle-mediated delivery towards advancing plant genetic engineering. Trends Biotechnol 36,882–897.
- de Almeida MS, Susnik E, Drasler B, et al. (2021) Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine. Chem Soc Rev 50,5397–5434.
- Demirer G, Zhang H, Goh N, et al. (2019) Nanotubes effectively deliver siRNA to intact plant cells and protect siRNA against nuclease degradation. Available SSRN 3352632.
- Demirezen DA, Yılmaz Ş, Yılmaz DD, Yıldız YŞ (2022) Green synthesis of iron oxide nanoparticles using *Ceratonia siliqua* L. aqueous extract: improvement of colloidal stability by optimizing synthesis parameters, and evaluation of antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Int J Mater Res.
- Farmanbar N, Mohseni S, Darroudi M (2022) Green synthesis of chitosan-coated magnetic nanoparticles for drug delivery of oxaliplatin and irinotecan against colorectal cancer cells. Polym Bull 1–19.
- Goswami N, Saha R, Pal SK (2011) Protein-assisted synthesis route of metal nanoparticles: exploration of key chemistry of the biomolecule. J Nanoparticle Res 13,5485–5495.
- Guan Z, Ying S, Ofogbu PC, et al. (2022) Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. Environ Technol Innov 102336.

- He X, Wang K, Tan W, et al. (2003) Bioconjugated nanoparticles for DNA protection from cleavage. *J Am Chem Soc* 125,7168–7169.
- Khalid MK, Asad M, Henrich-Noack P, et al. (2018) Evaluation of toxicity and neural uptake in vitro and in vivo of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Mol Sci* 19,2613.
- Khanna L, Verma NK, Tripathi SK (2018) Burgeoning tool of biomedical applications- Superparamagnetic nanoparticles. *J Alloys Compd* 752,332–353.
- Kommareddy S, Amiji M (2007) Poly (ethylene glycol)-modified thiolated gelatin nanoparticles for glutathione-responsive intracellular DNA delivery. *MBN J* 3,32–42.
- Kotakadi VS, Rao YS, Gaddam SA, et al. (2013) Simple and rapid biosynthesis of stable silver nanoparticles using dried leaves of *Catharanthus roseus*. *Linn. G. Donn and its anti microbial activity. Colloids Surfaces B Biointerfaces* 105,194–198.
- Kulkarn R N, Baskaran K, & Jhang T (2016) Breeding medicinal plant, periwinkle [*Catharanthus roseus* (L) G. Don]: a review. *Plant Genet. Res.* 14, 283–302.
- Kwak S-Y, Lew TTS, Sweeney CJ, et al. (2019) Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers. *Nat Nanotechnol* 14,447–455.
- Lin Z, Weng X, Owens G, Chen Z (2020) Simultaneous removal of Pb (II) and rifampicin from wastewater by iron nanoparticles synthesized by a tea extract. *J Clean Prod* 242,118476.
- Liu Q, Chen B, Wang Q, et al. (2009) Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano Lett* 9,1007–1010.
- Ma L, Zhuang HL, Wei S, et al. (2016) Enhanced Li-S batteries using amine-functionalized carbon nanotubes in the cathode. *ACS Nano* 10,1050–1059.
- Ochoa-Olmos OE, León-Domínguez JA, Contreras-Torres FF, et al. (2016) Transformation of plant cell suspension cultures with amine-functionalized multi-walled carbon nanotubes. *J Nanosci Nanotechnol* 16,7461–7471.
- Pouya S, Kazemi M, Pouya S, et al. (2022) Evaluation of CTAB-coated gold nanoparticles as a potential carrier for gene delivery. *Trends Pharm Sci* 8,3.
- Rahmani R, Gharanfoli M, Gholamin M, et al. (2020) Plant-mediated synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) using aloe vera and flaxseed extracts and evaluation of their cellular toxicities. *Ceram Int* 46,3051–3058.
- Safdar M, Kim W, Park S, et al. (2022) Engineering plants with carbon nanotubes: a sustainable agriculture approach. *J Nanobiotechnology* 20,1–30.
- Schwartz SH, Hendrix B, Hoffer P, et al. (2020) Carbon dots for efficient small interfering RNA delivery and gene silencing in plants. *Plant Physiol* 184,647–657.

- Sharma A, Verma P, Mathur A, & Mathur A K (2018) Genetic engineering approach using early Vinca alkaloid biosynthesis genes led to increased tryptamine and terpenoid indole alkaloids biosynthesis in differentiating cultures of *Catharanthus roseus*. *Protoplasma* 255, 425–435.
- Sosa-Acosta JR, Iriarte-Mesa C, Ortega GA, Díaz-García AM (2020) DNA-iron oxide nanoparticles conjugates: Functional magnetic nanoplatforms in biomedical applications. *Surface-modified Nanobiomaterials Electrochem Biomed Appl* 19–47.
- Tang K, & Pan Q (2017) Strategies for enhancing alkaloids yield in *Catharanthus roseus* via metabolic engineering approaches. In *Catharanthus roseus* 1–16 Springer.
- Tabasi H, Mosavian M T H, Darroudi M, et al. (2022). Synthesis and characterization of amine-functionalized Fe₃O₄/Mesoporous Silica Nanoparticles (MSNs) as potential nanocarriers in drug delivery systems. *J Porous Mater*, 1–12.
- Torney F, Trewyn BG, Lin VS-Y, Wang K (2007) Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nat Nanotechnol* 2,295–300.
- Velsankar K, Parvathy G, Mohandoss S, et al. (2022) *Celosia argentea* leaf extract-mediated green synthesized iron oxide nanoparticles for bio-applications. *J Nanostructure Chem* 12,625–640.
- Wang Q, Xing S, Pan Q, et al. (2012) Development of efficient *Catharanthus roseus* regeneration and transformation system using *Agrobacterium tumefaciens* and hypocotyls as explants. *BMC Biotechnol.* 12, 1–12.
- Wong MH, Misra RP, Giraldo JP, et al. (2016) Lipid exchange envelope penetration (LEEP) of nanoparticles for plant engineering: a universal localization mechanism. *Nano Lett* 16,1161–1172.
- Zaboli M, Saeidnia F, Zaboli M, Torkzadeh-Mahani M (2021) Stabilization of recombinant d-Lactate dehydrogenase enzyme with trehalose: Response surface methodology and molecular dynamics simulation study. *Process Biochem* 101,26–35.
- Zhang H, Demirer G S, Zhang H, et al. (2019) DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants. *PNAS* 116,15:7543-7548.
- Zhang H, Goh NS, Wang JW, et al. (2022) Nanoparticle cellular internalization is not required for RNA delivery to mature plant leaves. *Nat Nanotechnol* 17,197–205. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-01018-8>
- Zhao X, Meng Z, Wang Y, et al. (2017) Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nat plants* 3,956–964.
- Zhi H, Zhou S, Pan W, Shang Y, Zeng Z, & Zhang H (2022) The Promising Nanovectors for Gene Delivery in Plant Genome Engineering. *Int J Mol Sci* 23,15:8501.

Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, et al. (2012). An protocol for genetic transformation of *Catharanthus roseus* by *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 1674–1684.