Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Biosynthesis of iron oxide superparamagnetic nanoparticles and optimization of transient gene transfer to purslane (*Portulaca oleracea* L.) and safflower (*Carthamus tinctorius* L.)

Mahdie Asadi Karam

MSc Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: mahdie.asadi@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

Sara Abedini

PhD, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail address: abedinisara1991@gmail.com

Abstract

Objective

Despite significant advancements in biotechnology and genetic engineering over several decades, the genetic modification of many plant species remains challenging due to the presence of cell walls. Conventional gene transfer methods face various limitations. Recently, the unique properties of nanoparticles have attracted attention for their potential use in biotechnology as nanocarriers of biomolecules, including DNA, RNA, and proteins, due to their ability to penetrate living cells.

Materials and Methods

In this study, SPION nanoparticles were synthesized using a green synthesis method with turmeric rhizome extract. The nanoparticles were functionalized with the cationic polymer polyethyleneimine (PEI), and the plasmid pCAMBIA1304, containing GFP and GUS genes, was

loaded onto the nanocarrier surface. Gene transfer was conducted using two methods: syringe infiltration and vacuum infiltration on safflower and purslane plant leaves. The presence of the mGFP protein fluorescent signal and PCR analysis were employed to evaluate gene transfer and expression.

Results

SPION nanoparticles were successfully synthesized using turmeric rhizome extract as a reducing agent for iron ions. A color change in the solution and subsequent analyses confirmed the successful synthesis of SPION nanoparticles. Additionally, the zeta potential shift from negative to positive indicated successful PEI functionalization on the nanoparticle surface. The presence of the mGFP protein fluorescent signal confirmed the nanocarrier's ability to deliver genes to plant cells.

Conclusions

The findings demonstrated that nanoparticle-mediated gene transfer to plant cells can be achieved efficiently without the use of bacteria and independent of plant species limitations. Given these advantages, optimizing and improving transfer efficiency could establish nanoparticles as a widely utilized carrier in plant gene transfer applications.

Keywords: genetic engineering, gene transfer, nanobiotechnology, nanocarrier, transient gene expression

Paper Type: Research Paper.

Citation: Asadi Karam M, Pourseyedi SH, Zolala J, Abedini S (2024) Biosynthesis of iron oxide superparamagnetic nanoparticles and optimization of transient gene transfer to purslane (*Portulaca oleracea* L.) and safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Agricultural Biotechnology Journal* 17 (1), 161-176.

Agricultural Biotechnology Journal 17 (1), 161-176. DOI: 10.22103/jab.2025.23782.1584

Received: December 9, 2024. Received in revised form: January 29, 2025.

Accepted: January 30, 2025. Published online: January 30, 2025.

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

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بیوسنتز نانوذرات ابرپارامغناطیس اکسید آهن و بهینه‌سازی انتقال ژن موقت به گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) و گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)

مهدیه اسدی کرم

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: mahdie.asadi@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

سارا عابدینی

دانش‌آموخته دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران. رایانامه: abedinisara1991@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۸ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۱

چکیده

هدف: علیرغم چندین دهه پیشرفت در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک، تغییر ژنتیکی اکثر گونه‌های گیاهی به دلیل وجود دیواره سلولی دشوار است. انتقال ژن به واسطه متداول‌ترین روش‌های انتقال ژن نیز با محدودیت‌های مختلفی رو به رو هستند. اخیرا با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات، کاربرد فناوری نانو در زیست فناوری به عنوان نانوحامل ملکول‌های زیستی از جمله DNA، RNA و پروتئین، به دلیل توانایی آن‌ها در ورود به سلول‌های زنده بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش نانوذرات ابرپارامغناطیسی اکسید آهن (SPIONs) به روش سبز سنتز شد. به این منظور از عصاره ریزوم گیاه زردچوبه (*Curcuma longa* L.) استفاده شد. پس از عامل‌دار کردن نانوذرات با پلیمر کاتیونی پلی اتیلن ایمین (PEI)، پلاسمید pCAMBIA1304 حامل ژن *GFP* و *GUS* روی سطح نانوحامل بارگیری شد. سپس با دو روش اینفیلتریشن

توسط سرنگ و وکیوم اینفیلتریشن به برگ گیاه گلرنگ و خرفه انتقال ژن انجام گرفت. با بررسی حضور سیگنال فلورسنت پروتئین mGFP و انجام آنالیز PCR انتقال ژن و بیان آن مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: در این تحقیق نانوذرات ابرپارامغناطیس اکسید آهن (SPIONs) به روش سبز، با استفاده از عصاره ریزوم گیاه زردچوبه به عنوان عامل کاهنده یون‌های آهن سنتز شد. تغییر رنگ محلول و نتایج آنالیزهای انجام شده سنتز نانوذرات SPIONs را تأیید می‌کند. همچنین تغییر پتانسیل زتا از منفی به مثبت، اتصال پلی اتیلن ایمین بر سطح نانوذرات سنتز شده را نشان می‌دهد. حضور سیگنال فلورسنت پروتئین mGFP توانایی نانوحامل pDNA-SPIONs را در انتقال ژن به سلول‌های گیاهی تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد انتقال ژن به واسطه نانوذرات به سلول‌های گیاهی، با حذف باکتری به سهولت و بدون محدودیت گونه گیاهی قابل انجام است. با توجه به مزایای گفته شده انتظار می‌رود در صورت بهینه سازی و بهبود کارایی انتقال، نانوذرات به عنوان یکی از ناقلان پرکاربرد در زمینه انتقال ژن به گیاهان مطرح شوند.

کلیدواژه‌ها: انتقال ژن، بیان ژن موقت، مهندسی ژنتیک، نانو بیوتکنولوژی، نانوحامل

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: اسدی کرم مهدیه، پورسیدی شهرام، ذوالعلی جعفر، عابدینی سارا (۱۴۰۴) بیوسنتز نانوذرات ابرپارامغناطیس اکسید آهن و بهینه‌سازی انتقال ژن موقت به گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) و گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۱)، ۱۶۱-۱۷۶.

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

© the authors

مقدمه

انتقال ژن در بین گونه‌ها یک فرآیند طبیعی است که باعث ایجاد تنوع در صفات بیولوژیکی می‌شود. این واقعیت زیر بنای همه‌ی تلاش‌ها برای بهبود گونه‌های مهم کشاورزی است. مهندسی ژنتیک و تکنیک‌های ملکولی، ابزارهایی در جهت شناسایی ژن‌ها و سرعت بخشیدن به پروسه طولانی مدت گزینش و انتقال ژن از ژنوتیپ والدی به نتاج هستند. طی چند دهه گذشته، پیشرفت قابل توجهی در مهندسی ژنتیک گیاهی با بهبود ابزارهای ویرایش و توالی یابی ژنوم حاصل شده است (Bentahar et al. 2023). به واسطه بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک، می‌توان از توان ژنتیکی گیاهان برای تولید گیاهان مقاوم به علف کش‌ها، تنش‌های زیستی و غیر زیستی استفاده کرد. همچنین داروها، پروتئین‌های نوترکیب و ترکیبات خاص را توسط گیاهان تولید کرد (zongyou et al. 2020).

علیرغم چندین دهه پیشرفت در بیوتکنولوژی، تغییر ژنتیکی اکثر گونه‌های گیاهی دشوار است. روش‌های مختلفی از جمله انتقال به واسطه آگروباکتریوم، بمباران ذره‌ای، مواد شیمیایی، الکتروپوریشن، ریز تزریقی و غیره برای انتقال ژن به گیاهان وجود دارد. انتقال به واسطه آگروباکتریوم یکی متداول‌ترین روش‌ها برای انتقال ژن به سلول‌های گیاهی، با محدودیت تحویل کارآمد تنها در طیف محدودی از گونه‌های دو لپه و مشکل انتقال به گونه‌های تک لپه، همچنین ادغام غیر قابل اجتناب DNA در ژنوم میزبان مواجه است. انتقال به واسطه بمباران ذره‌ای که می‌تولند بیوملکول‌ها را به طیف وسیع‌تری از گونه‌های گیاهی برساند با محدودیت‌های بیان سطح پایین، سمیت ذرات مورد استفاده، آسیب به بافت و سلول‌های هدف و نیاز به تجهیزات تخصصی روبه‌رو است (Su et al. 2023).

در سال‌های اخیر با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات از جمله نسبت سطح به حجم زیاد، شکل و اندازه همچنین خصوصیات بیولوژیکی و فعالیت ضد میکروبی، کاربرد فناوری نانو در زیست فناوری مورد توجه قرار گرفته است (Joudeh & Linke 2022). نانوذرات مغناطیسی آهن به دلیل ویژگی‌های استثنایی مانند پایداری شیمیایی، زیست سازگاری، مغناطیسی شدن با اشباع زیاد، سمیت کمتر و امکان به کارگیری در سطوح مولکولی و سلولی به عنوان نانو مواد زیست پزشکی محبوبیت زیادی دارند (Sosa-Acosta et al. 2020). تبدیل مبتنی بر نانوذرات مغناطیسی (مگنتوفکشن) برای تحویل دارو در دهه ۱۹۷۰ و برای انتقال به سلول‌های موش در سال ۲۰۰۰ استفاده شد (Dobson, 2006). این روش راه مفیدی برای انتقال ژن‌ها به هسته سلول با اعمال میدان مغناطیسی فراهم می‌کند (Rozita 2020). محققان یک روش ساده و سریع برای تولید دانه‌های تراریخته بدون نیاز به کشت بافت به واسطه نانوذرات مغناطیسی آهن ایجاد کردند. DNA خارجی همراه با نانوذرات مغناطیسی پوشش داده شده با پلی اتیلن ایمین (PEI)[1] توسط یک میدان مغناطیسی به گرده پنبه وارد شدند. DNA خارجی با موفقیت در ژنوم ادغام و به طور موثر بیان شد و پس از گرده افشانی بذرهای تراریخت تولید شدند به طوری که ژن خارجی پایدار در نسل‌های بعد مشاهده شد (Zhao et al. 2017).

روش‌های سنتز رایج نانوذرات، نیاز به استفاده از مواد شیمیایی خطرناک و مصرف انرژی بالا دارند. سنتز سبز جایگزینی پایدار، مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست است. گیاهان حاوی چندین ترکیب از جمله ترپن‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و غیره هستند، که می‌توانند یون‌های فلزی را کاهش داده و نانوذرات حاصل را تثبیت کنند (Chopra et al. 2022). نانوذرات ویژگی‌های قابل توجهی برای نفوذ فعال و غیر فعال به غشاهای مهم بیولوژیکی دارند. به طور کلی جذب سلولی نانوذرات تحت تاثیر خواص فیزیک و شیمیایی مانند ترکیب سطحی، شکل، اندازه، آب گریزی وآبدوستی آن‌ها می‌باشد. هنگامی که نانوذرات با اجزای تشکیل دهنده غشا پلاسمایی تعامل دارند، عمدتا توسط سلول‌ها به‌وسیله اندوسیتوز جذب می‌شوند (Chen et al. 2021).

[1]. Polyethylenimine

بیان موقت ژن‌های خارجی در بافت‌های گیاهی روشی ارزشمند و کاربردی به منظور بررسی عملکرد ژن در مدت زمان کوتاه و صرف هزینه کم‌تر است. از بیان موقت بیشتر برای تایید تراریختی و اثبات تولید پروتئین نوترکیب استفاده می‌شود. در این روش پروتئین در سطح بالا و در کوتاه‌ترین زمان تولید می‌شود. با توجه به این‌که ارزیابی عملکرد گیاهان تراریخته پایدار فرآیندی طولانی می‌باشد، بیان موقت ژن خارجی می‌تواند جایگزین مناسبی به حساب آید (Tyurin et al. 2020). همچنین علرغم پیشرفت در زمینه شیمی مصنوعات، هنوز به منابع بیولوژیکی برای تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله مواد دارویی نیازمندیم. استفاده از تکنیک‌های اصلاحی و بیوتکنولوژی در جهت بهبود کمیت و کیفیت و افزایش ماده موثره گیاهان دارویی و تولید پروتئین‌های نوترکیب امری ضروری است (Nitnaware et al. 2021). در گزارشی سنتز سبز نانوذرات SPIONs با عصاره آبی گیاه پروانش انجام شد، و جهت انتقال ژن موقت به برگ گیاه پروانش مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان دهنده انتقال موفق توسط نانوحامل SPIONs به برگ گیاه پروانش بود (Abedini et al. 2023). هدف از این پژوهش بهینه‌سازی انتقال ژن موقت توسط نانوحامل ابرپارامغناطیس اکسید آهن (SPIONs)[۱] سنتز شده به روش سبز به دو گیاه خرفه و گلرنگ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد ژنتیکی: در این تحقیق به منظور تهیه نانوحامل و بهینه سازی انتقال ژن به گیاه از پلاسمید pCAMBIA 1304 استفاده شد. ناقل pCAMBIA 1304 یک ناقل دوتایی بیانی با طول تقریبی ۱۲Kb که دارای ژن‌های گزارشگر گیاهی *GFP*[۲] و *GUS*[۳] و ژن مقاوت به کانامایسین به عنوان فاکتور انتخابی در باکتری و ژن مقاومت به هیگرومایسین به عنوان فاکتور انتخابی در گیاه است. این ناقل در باکتری *E.coli* سویه DH5α به صورت استوک گلیسرولی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه باهنر کرمان موجود بود و استخراج پلاسمید انجام شد.

سنتز سبز نانوذرات: به منظور سنتز نانوذرات سوپرپارامغناطیس اکسید آهن به روش سبز از عصاره ریزوم گیاه زردچوبه به عنوان عامل کاهنده و پایدار کننده استفاده شد. در این تحقیق برای سنتز SPIONs به روش هم‌رسوبی ابتدا، محلول حاوی نمک‌های $FeCl_3.6H_2O$ (۰/۴۴۴ گرم) و $FeCl_2.4H_2O$ (۰/۲۱۲ گرم) با نسبت مولی ۱:۲ در حجم ۴۰ میلی لیتر با آب دیونیزه تهیه گردید. محلول حاصل به مدت دو ساعت تحت هیتراستیرر در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد با بالاترین دور هم زده شد. پس از تغییر رنگ محلول از قهوه‌ای شفاف به خردلی، یک میلی لیتر از عصاره گیاهی رقیق شده با آب (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به محلول اضافه شد و پس از ده دقیقه pH محلول به‌وسیله سود (NaOH) یک مولار به ۱۱ رسانده شد. به منظور حذف ناخالصی‌ها،

۱. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
۲. green fluorescent protein
۳. β-glucuronidase

شست‌وشوی نانوذرات سه مرتبه با عمل سانتریفیوژ در دور (rpm) ۹۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. رسوب به دست آمده در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید و سپس توسط هاون چینی استیل پودر شد و در ظرف در بسته نگهداری شد (Rohiwal et al. 2020).

تعیین مشخصات نانوذرات SPIONs سنتز شده: به منظور تعیین ویژگی‌های فیزیک وشیمیایی نانوذرات سنتز شده، آنالیزهای اندازه‌گیری پتانسیل زتا[۱]، پراش اشعه ایکس (XRD)[۲]، تصویر برداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی (FE-SEM)[۳]، مغناطیس سنج نمونه ارتعاشی (VSM)[۴] و آنالیز طیف سنجی مرئی–فرابنفش (Uv-vis)[۵] انجام شد.

آماده سازی و بررسی کمپلکس نانو حامل PEI-SPIONs-pDNA: نانو ذرات سوپرپارامغناطیس اکسیدآهن توسط بخش بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه باهنر با پلیمر کاتیونی پلی اتیلن ایمین عامل‌دار شد و پس از انجام آنالیزهای مربوطه و تایید نانو ذرات، DNA پلاسمیدی روی سطح نانو ذرات بارگیری شد. به منظور بررسی توانایی نانوذرات عامل‌دار شده در بارگیری پلاسمید، پلاسمید و نانوذره در نسبت‌های جرمی مختلف ۰.۵:۱، ۱:۱، ۲:۱، ۳:۱ مخلوط و پس از پیپت کردن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. برای اطمینان از برهم‌کنش الکترواستاتیک بین پلی اتیلن ایمین و پلاسمید و اتصال پلاسمید به سطح نانوذرات، حرکت کمپلکس‌ها روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد (Demirer et al., 2019).

انتقال ژن به برگ گیاه خرفه و گلرنگ: به منظور بررسی امکان انتقال ژن به سلول‌های گیاهی، در این پژوهش انتقال ژن به گیاه خرفه و گلرنگ ، به دو روش اینفیلتریشن با سرنگ به برگ گلدانی و وکیوم اینفیلتریشن به برگ‌های جدا شده از گیاه انجام شد. در روش انتقال ژن با سرنگ، پس از تهیه سوسپانسیون نانوحامل pDNA-SPIONs، سوسپانسیون توسط سرنگ به برگ گیاه رشد یافته در گلدان تزریق شد. پس از تزریق سطح برگ کاملا تمیز شد و به منظور جلوگیری از تجزیه پروتئین GFP در نور شدید، برگ با فویل آلومینیوم پوشانده شد. در روش وکیوم اینفیلتریشن، قطعات برگی پس از استریل سطحی، داخل محلول نانو حامل قرار داده شدند و توسط دستگاه دسیکاتور به مدت ۱۵ دقیقه تحت خلأ قرار گرفتند (شکل ۱). سپس زیر هود لامینار یک بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. به منظور گرفتن رطوبت اضافی روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند، و با پنس استریل در پتری‌های حاوی محیط کشت MS[6] با سه درصد ساکارز و هفت گرم بر لیتر آگار و pH ۵/۷–۵/۸ کشت داده شدند. و در فیتوترون در تاریکی و دمای ۲۶ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

---

۱. Zeta potential
۲. X-Ray diffraction analysis
۳. Field-Emission Scanning Electron Microscopes
۴. Vibriting Sample Magnetometer
۵. Ultraviolet-visible spectroscopy
۱. Murashige and Skoog medium

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

بررسی سیگنال فلورسنت پروتئین GFP: پس از گذشت ۷۲ ساعت از زمان تیمار برگ‌ها، به منظور تأیید انتقال و بیان ژن *GFP* و ردیابی سیگنال فلورسنت تحت عکس‌برداری با دستگاه Documentation Gel با اشعه UV با طول موج ۳۶۵ نانومتر قرار گرفتند. سپس از نمونه‌های برگی که در آن‌ها سیگنال فلورسنت پروتئین GFP مشاهده شده بود به همراه نمونه شاهد، استخراج DNA انجام شد. پس از آن به منظور تأیید بیان ژن *GFP* واکنش PCR توسط پرایمرهای اختصاصی ژن هدف (جدول ۱) صورت گرفت.

شکل ۱. انتقال به دو روش اینفیلتریشن با سرنگ و وکیوم اینفیلتریشن

Figure 1. Transfer to two methods of infiltration with a syringe and vacuum infiltration

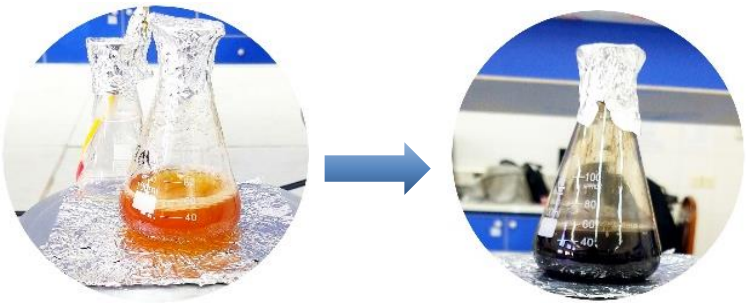
جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

Table 1. The used primers sequence

نام ژن Gene name	توالی آغازگر	Primer sequence	طول قطعه تکثیر شده Amplicon size (bp)
ژن *mgfp5-ER* *mgfp5-ER* gene	آغازگر رفت Forward Primer	gctctagaatgaagactaatctttttctctttctcatcttttcac	754
	آغازگر برگشت Reverse Primer	gcgagctcttaaagctcatcatgtttgtatagttcatccatg	

نتایج و بحث

تعیین مشخصات نانوذرات SPIONs سنتز شده: نانوذرات Fe_3O_4 با روش هم‌رسوبی توسط عصاره گیاهی زردچوبه سنتز شد، و با اضافه کردن NaOH و رساندن pH مخلوط به ۱۱، رنگ مخلوط از قهوه‌ای به سیاه تغییر کرد. (شکل ۲) نشان دهنده تشکیل نانوذرات Fe_3O_4 است.



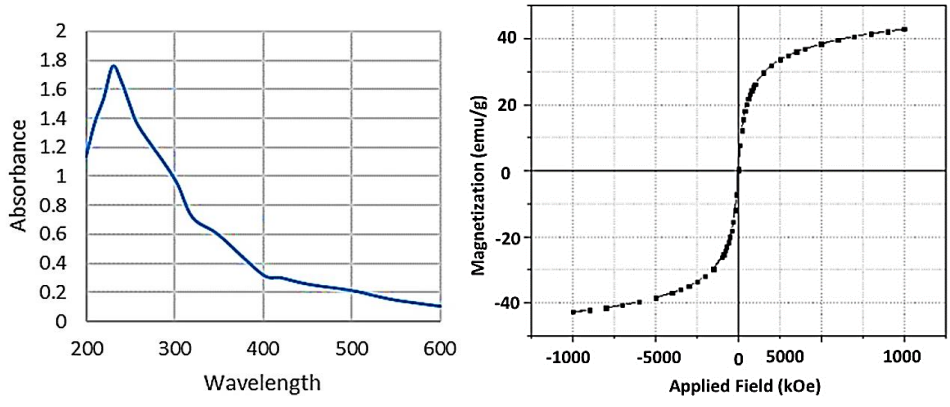
شکل ۲. تشکیل نانوذرات سوپرپارامغناطیس اکسید آهن

Figur 2. Formation of iron superparamagnetic nanoparticles

خواص مغناطیسی نانوذرات Fe_3O_4 توسط مغناطیس سنج نمونه مرتعش (VSM) در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. برای مواد مغناطیسی زمانی که میدان مغناطیسی اعمال شده برداشته می‌شود، آن‌ها هیچ پسماند مغناطیسی و میدان وادارندگی را نشان نمی‌دهند. همانطور که در شکل مشخص است هیچ حلقه هتروزیسی دیده نمی‌شود و میدان وادارندگی (HC) آن صفر است. با توجه به (شکل ۳. الف)، نانوذرات Fe_3O_4 سنتز شده به روش سبز خواص پارامغناطیس از خود نشان داده‌اند. مغناطش اشباع (Ms) این نانوذرات $emu\ g^{-1}$ ۴۲ می‌باشد. مقدار مغناطیسی اشباع حاصل با مقادیر به‌دست آمده نانوذرات مغناطیسی مطابقت دارد (Bassim et al. 2022). طیف جذبی فرابنفش ـ مرئی جهت بررسی تأیید سنتز نانوذرات Fe_3O_4، جذب و انرژی نوری در محدوده ۶۰۰ –۲۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. UV-Vis می‌تواند اطلاعات مفیدی را در خصوص خواص جذب نوری نمونه‌ها فراهم کند. طبق (شکل ۳. ب)، اولین پیک جذبی نانوذرات Fe3O4 سنتز شده با عصاره گیاهی در طول موج ۲۳۰ نانومتر دیده شد که نشان دهنده تشکیل نانوذرات SPIONs است. در گزارشی پیک جذبی نانوذرات اکسید آهن سنتز شده با عصاره گیاهی عدد ۲۹۸ نانومتر را نشان می‌دهد که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش‌های پیشین مطابقت دارد (Karpagavinayagam and Vedhi. 2019).

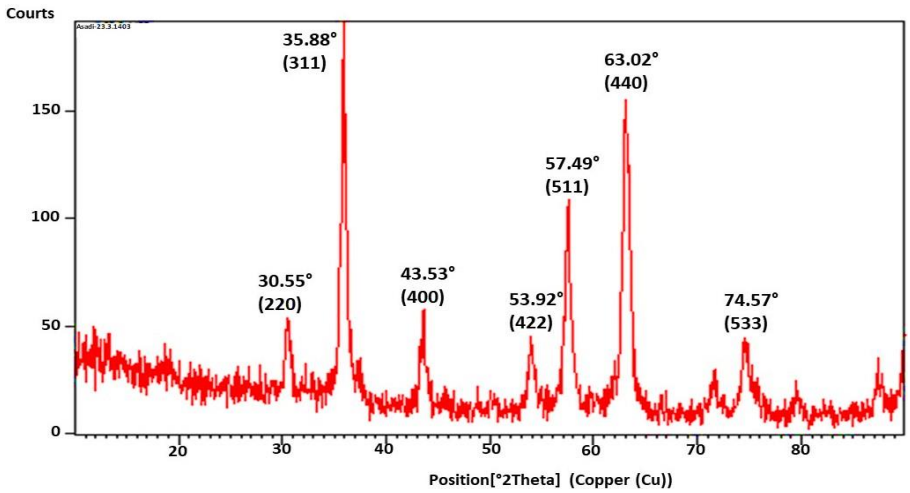
آنالیز XRD جهت اثبات تشکیل نانو کریستال‌های Fe_3O_4 و اندازه تقریبی نانوذرات انجام گرفت. الگوی XRD در (شکل ۴) نشان داده شده‌است. با بررسی پیک‌های مربوطه و مقایسه با طیف مرجع (JCPDS00-003-0863) متوجه تطابق پیک‌ها و عدم وجود هرگونه ناخالصی در نانوذرات Fe3O4 می‌شویم. با استفاده از داده‌های XRD و رابطه دبای –شرر[۱] می‌توان قطر اندازه کریستال ذرات را به دست آورد که اندازه آن تقریبا ۱۷/۶ نانومتر می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از آنالیز XRD با نتایج تصویر میکروسکوپی FE-SEM مطابقت داشت، همچنین با نتایج حاصل از سنتز نانوذرات Fe_3O_4 با عصاره آبی ریشه گیاه شاهدانه نیز مطابقت دارد (Rana et al. 2024).

۱. Debye scherrer



شکل ۳. آنالیز مغناطیس سنج نمونه ارتعاشی (الف)، طیف اسپکتوفتومتر مرئی – فرابنفش نانوذرات SPIONs سنتز شده (ب)

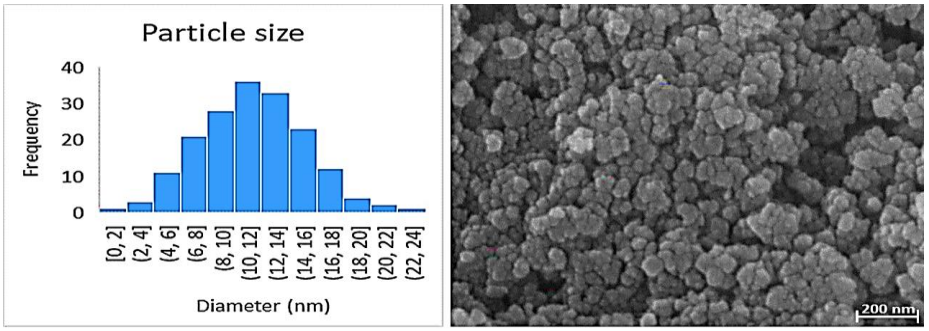
Figure 3. Vibrating sample magnetometer (VSM) analysis (A), Uv-Vis spectrophotometer spectrum of synthesized SPIONs (B)



شکل ٤. الگو پراش اشعه ایکس نانوذرات SPIONs

Figure 4. X-ray diffraction pattern (XRD) of nanoparticles

آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی برای بررسی شکل، اندازه و نحوه‌ی قرار گرفتن ذرات در سطح جسم (مورفولوژی) انجام گرفت. با توجه به تصویر زیر که در بزرگ‌نمایی ۲۰۰ نانومتر می‌باشد (شکل ۵. الف)، میانگین اندازه ذرات SPIONs با استفاده از نرم افزار Image J اندازه‌گیری شد و هیستوگرام توزیع اندازه ذرات رسم شد (شکل ۵. ب). میانگین اندازه نانو ذرات تقریبا ۱۲ نانومتر بوده و ذرات حالت کروی دارند. در مطالعه‌ای سنتز سبز نانوذرات مغناطیسی آهن توسط عصاره گیاه چای سبز (*Camellia sinensis*) انجام شد و گزارش کردند نانوذرات سنتز شده کروی شکل هستند و میانگین سایز ذرات بین ۷/۵–۱۲/۵ می‌باشد (Farooq et al. 2022).

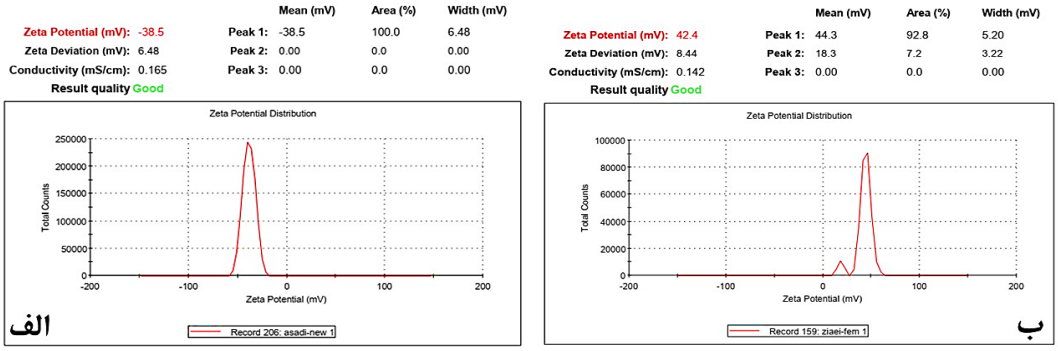


ب (B) الف (A)

شکل ۵. تصویر میکروسکوپی الکترونی روبشی (الف)، هیستوگرام توزیع اندازه ذرات (ب)

Figure 5. Field-Emission Scanning Electron Microscopes (A), Particle size distribution histogram (B)

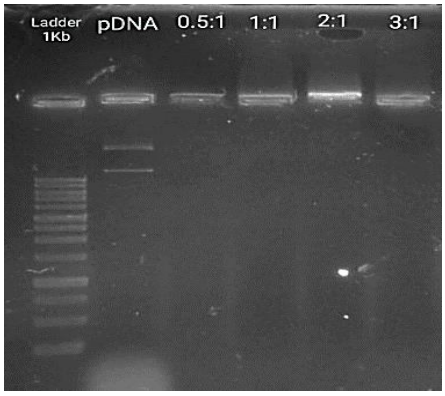
بررسی توانایی نانوذرات آهن در پذیرش DNA پلاسمیدی: پلیمر کاتیونی PEI، به واسطه داشتن تعداد زیاد بار مثبت به عنوان جاذب قدرتمندی عمل می‌کند که از طریق برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک با اهداف دارای بار منفی مانند DNA، سبب سهولت انتقال و درونی شدن ژن توسط سلول از طریق اندوسیتوز می‌شود. وجود گروه‌های آمین در ساختار PEI با افزایش pH و بار مثبت، باعث اختلال در اندوزوم و آزاد شدن کمپلکس در سیتوپلاسم می‌گردد، همچنین با تشکیل کمپلکس پایدار PEI/DNA، پلی اتیلن ایمین در محافظت DNA در برابر تخریب نوکلئازی بهتر عمل می‌کند (Chen et al., 2020). اتصال پلی اتیلن ایمین بر روی سطح نانوذرات SPIONs از طریق اندازه‌گیری پتانسیل زتا مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج ، پتانسیل زتا اولیه ۳۸/۵- میلی ولت، و پس از عاملدار شدن با PEI به ۴۲/۴ افزایش یافت.، که اتصال PEI را بر روی سطح نانوذرات تأیید می‌کند (شکل ۶).



شکل ٦. پتانسیل زتا نانوذرات SPIONs سنتز شده (الف)، پتانسیل زتا نانوذرات SPIONs عاملدار شده با پلی اتیلن ایمین (ب)

Figure 6. Zeta potential of nanoparticles synthesized SPIONs nanoparticles (A), Zeta potential of functionalized SPIONs with polyethyleneimine (B)

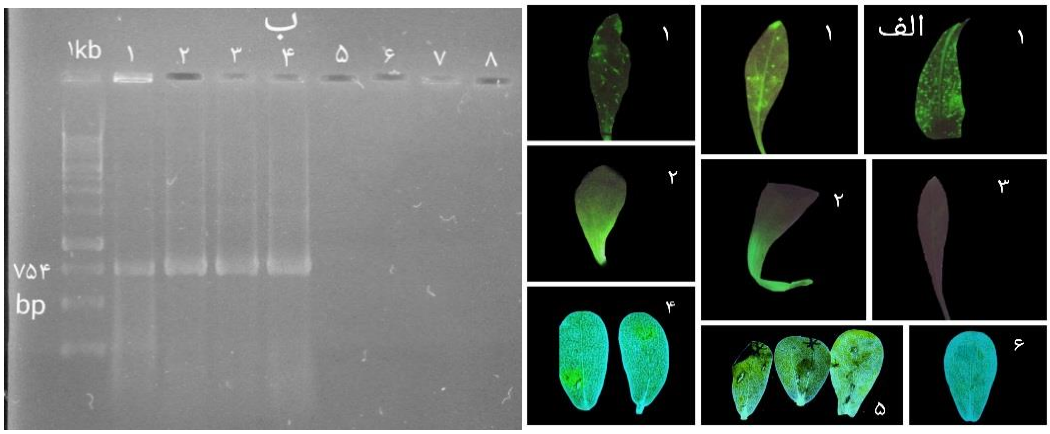
برای بررسی توانایی نانوذرات عامل‌دار شده در اتصال به پلاسمید، از تکنیک ژل آگارز استفاده شد. بر اساس اصول الکتروفورز، حرکت مولکول‌ها روی ژل بر اساس اندازه، وزن و بار الکتریکی می‌باشد. و با هر تغییری در ویژگی‌های فیزیکی، حرکت ذرات روی ژل تغییر خواهد کرد. کمپلکس PEI-SPIONPs-pDNA روی ژل آگارز یک درصد نشان داده شده‌است (شکل ۷). بر اساس نتایج، نانوذرات عامل‌دار شده با پلی اتیلن ایمین به دلیل داشتن بار مثبت، DNA پلاسمیدی را به خوبی روی سطح خود جذب کرده و مانع از حرکت آن روی ژل آگارز شده و هیچ گونه باندی در نسبت‌های مختلف مشاهده نشده است (Demirer et al. 2019).



شکل ۷. توانایی نانوذرات در بارگیری پلاسمید در الکتروفورز ژل آگارز (چاهک اول مارکر ۱kb، چاهک دوم پلاسمید pCAMBIA1304 بدون نانوذره، چاهک‌های ٦-۳ نسبت‌های پلاسمید و نانوذره)

Figure 7. Ability of nanoparticles to load plasmid in agarose gel electrophoresis

بررسی انتقال ژن به برگ گیاه خرفه و گلرنگ توسط نانوحامل Fe_3O_4 : انتقال پلاسمید حاوی ژن کد کننده پروتئین *GFP* به واسطه نانوذرات سوپرپارامغناطیس اکسید آهن به گیاه خرفه و گلرنگ از روش اینفیلتریشن با سرنگ و وکیوم اینفیلتریشن به سلول‌های برگی انجام شد. به منظور بررسی و ارزیابی انتقال پلاسمید متصل به نانوذرات، به گیاهان مورد نظر بعد از گذشت ۷۲ ساعت پس از تیمار برگ‌ها، ردیابی سیگنال فلورسنت پروتئین GFP توسط دستگاه Gel Documentation تحت اشعه UV با طول موج ۳۶۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس تصاویر به دست آمده، موفقیت نانوحامل SPIONPs@pCAMBIA1304 حاوی ژن مورد نظر به واسطه لکه‌های نوری سبز رنگ در برگ‌های گیاه خرفه و گلرنگ به خوبی تأیید شد. همچنین استخراج DNA از نمونه‌های تیمار شده انجام شد. نتایج PCR دلالت بر وجود ژن *GFP* و بیان آن در گیاهان مورد آزمایش بوده‌است (شکل ۸). پلاسمید pCAMBIA1304 با وجود چندین جایگاه ژنی مانند *GFP*، *GUS*، ژن مقاومت به هیگرومایسین و ژن مقاومت به کانامایسین در ناقل، همچنین وجود جایگاه‌های مختلف آنزیم‌های برشی، به ناقلی مناسب جهت کلون کردن قطعات ژنی مورد نظر و ساخت پلاسمید نوترکیب تبدیل شده‌است (Dehghani et al. 2017).



B **A**

شکل ۸. (الف) سیگنال فلورسنت پروتئین GFP، (۱.گلرنگ و٤. خرفه) برگ‌های ترنسفورم شده توسط اینفیلتریشن با سرنگ، (۲. گلرنگ و ۵. خرفه) برگ‌های ترنسفورم شده توسط وکیوم اینفیلتریشن، (۳. گلرنگ و ٦. خرفه) برگ‌های شاهد، (ب) نتایج PCR، نشانگر 1Kb، (٤-۱) باند اختصاصی ژن *GFP* نمونه برگ‌های ترنسفورم شده گلرنگ و خرفه، (۵-۸) نمونه برگ‌های شاهد گلرنگ و خرفه

Figure 8. (A) The Fluorescent signal of GFP protein, (1,4) Transformed leaf via infiltration by syringe, (2,5) Transformed leaf via vacuum infiltration, (3,6) Control, (B) PCR Results, Ladder 1Kb, (1-4) Transformed leaves with *GFP* signal, (5-8) Control

یکی از نگرانی‌های مطرح شده در بحث انتقال ژن در مهندسی ژنتیک، استفاده از باکتری‌ها و ورود تصادفی ساختارهای ژنی غیر هدف به داخل ژنوم سلول‌های موجودات است که این خود منتج به اثرات سوء می‌گردد (Su et al. 2023). در این پژوهش با حذف باکتری از سامانه انتقال ژن و استفاده از نانوذرات به عنوان روشی ایمن و کارا، از انتقال ژن‌های غیر هدف جلوگیری شده‌است. گزارشی در سال ۲۰۰۹ توانایی نانولوله‌های کربنی را در نفوذ به دیواره و غشاء سلول‌های تنباکو به اثبات رساند. تصاویر میکروسکوپ فلورسنس کانفوکال بیانگر جذب SWNT-DNA به درون سلول بود. علاوه بر این، نتایج نشان داد که SWNTs می‌توانند DNA را به داخل اندامک‌های مختلف سلول گیاهی نیز انتقال دهد (Liu et al., 2009). در زمینه انتقال ژن به گیاهان با استفاده از نانوذرات مزوپور سیلیکا مطالعاتی انجام شده است. چنگ و همکاران موفق به ساخت نانوذراتی به قطر ۵۰ نانومتر شدند که توانستند به راحتی پلاسمید را به داخل سلول‌های گیاه منتقل کنند (Chang et al., 2013). همچنین در تحقیقی DNA پلاسمیدی حاوی ژن *GUS* و ژن *cry1Ab* را بر روی نانوذرات مزوپورسیلیکا بارگزاری کردند و به دو صورت تزریق و اسپری به برگ گیاه گوجه فرنگی منتقل کردند، و بیان ژن گذرا از طریق RT-PCR و تست هیستوشیمیایی GUS تایید شد (Hajiahmadi et al., 2019). در گزارش دیگری، با استفاده از نانوذرات هیدروکسی آپاتیت پوشش‌دار شده با آرژنین به عنوان نانوحامل، DNA پلاسمیدی حاوی ژن‌های گزارشگر *GUS* و *GFP* را به طور موفقیت آمیز به برگ گیاهان آرابیدوپسیس،

تنباکو، گل یخ و بذور گیاهان آرابیدوپسیس، خردل و گندم به روش اینفیلتریشن با سرنگ و وکیوم اینفیلتریشن منتقل کردند، و بیان ژن به صورت گذرا را نشان دادند (Izuegbunam et al., 2021). در گزارشی، از نانولوله‌های کربنی تک دیواره برای انتقال ژن به صـــورت موقت به برگ گیاهان پنبه، آرگولا، گندم و توتون اســـتفاده کردند. آن‌ها ابتدا نانولوله‌های کربنی تک دیواره را با پلیمر کاتیونی پلی اتیلن ایمین (PEI) عامل‌دار و DNA پلاســمیدی حاوی ژن *GFP* را توســط ســرنگ به برگ گیاهان منتقل کردند. تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ کانفوکال انتقال ژن گذرا را تایید کردند (Demirer., 2019). نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 و Fe_2O_3 به دلیل مســاحت ســطح بزرگ، اندازه کوچک، نرخ ته نشــینی کم، پایداری حرارتی بالا، ســمیت کم مواد ایده آلی برای کاربردهای میدانی مختلف و تحقیقات بنیادی هســتند (Adabavazeh et al. 2022). در پژوهشــی از نانوذرات مغناطیســی آهن سبز سنتز شده با عصاره گیاه چای سبز با ایجاد میدان مغناطیسی برای انتقال ژن به جنین‌های گیاه بامیه استفاده کردند. انتقال ژن با مشاهده بیان ژن *GFP* از طریق میکروسکوپ کانفوکال و واکنش PCR در گیاه بامیه تایید شد (Farooq et al., 2022). تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه در مقیاس بالا با استفاده از روش‌های شیمیایی مشکل و غیر ممکن است. مهندسی ژنتیک و کشت بافت گیاهی، با انتقال ژن‌های مربوط به مسیر تولید یک متابولیت به یک گیاه یا یک ریزنمونه خاص راه حلی مناسب برای تولید آسان و انبوه متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. همچنین می‌توان یک ماده جدید و خاص را که به صورت طبیعی در گیاهان وجود ندارد، تولید کرد. با اســتفاده از روش انتقال ژن موقت بواســطه نانوذرات به عنوان ایده‌ای جدید برای تبدیل ژنتیک گیاهی، می‌توان ترکیبات مهم و با ارزش دارویی و پروتئین‌های نوترکیب را در گیاهان به عنوان بیوراکتورهای زنده در شرایط آزمایشگاهی و سپس در سطح صنعتی تولید کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به پیشرفت علم، محققین به دنبال روش‌های جدید انتقال ژن به گیاهان هستند. استفاده از نانوذرات برای انتقال ژن به محققان این اجازه را می‌دهد که بر سد دیواره سلولی غلبه و به غشا سلولی گیاهان نفوذ کنند. نداشتن محدودیت در نوع گیاه میزبان اعم از تک لپه و دولپه و بافت گیاهی، همچنین مشکلات تهیه و نگهداری باکتری نوترکیب را نداشته و در مدت زمان بسیار کوتاه‌تری اجرا شدنی است. این تکنیک در مقایسه با روش بایولیستیک بسیار کم هزینه و مقرون به صرفه است و نیاز به تجهیزات تخصصی ندارد. از دیگر مزایای آن می‌توان به عدم نیاز به هضم سلولی، نیروی خارجی و یا تیمار شیمیایی برای نفوذ به دیواره ســـلولی، انتقال DNA به تمام بافت‌های گیاهی و مقدار کم DNA مورد نیاز اشـــاره کرد. در این پژوهش، از نانوذرات سوپرپارامغناطیس اکسید آهن سنتز شده با عصاره گیاه زردچوبه و عامل‌دار شده با پلیمر کاتیونی پلی اتیلن ایمین به عنوان نانوحامل اســتفاده شــد. نتایج امکان انتقال ژن به‌وســیله نانوحامل را به برگ گیاه خرفه و گلرنگ، به‌طور موفق نشــان داد. با توجه به مزایای گفته شده انتظار می‌رود در صورت بهینه سازی و بهبود کارایی انتقال، در آینده نانوذرات به عنوان یکی از ناقلان پرکاربرد در زمینه انتقال ژن به گیاهان مطرح شوند.

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

منابع

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)، ۸۰-۶۱.

References

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. Agric Biotechnol J 15(1), 61-80 (In Persian)

Adabavazeh F, Pourseyedi SH, Nadernejad N, et al. (2022) Evaluation of synthesized magnetic nanoparticles and salicylic acid effects on improvement of antioxidant properties and essential oils of Calotropis procera hairy roots and seedlings. Plant Cell Tiss Organ Cult 151, 133-148.

Bassim S, Mageed AK, AbdulRazak AA, Majdi HS (2022) Green synthesis of Fe3O4 nanoparticles and its applications in wastewater treatment. Inorganics 10(12), e260.

Bentahar S, Abada R, Ykhlef N (2023) Biotechnology: definitions, types and main applications. Ymer 22(4), 563-575.

Cardoso VF, Francesko A, Ribeiro C, et al. (2018) Advances in magnetic nanoparticles for biomedical applications. Adv Healthc Mater 7, e1700845.

Chang FP, Kuang LY, Huang CA, et al. (2013) A simple plant gene delivery system using mesoporous silica nanoparticles as carriers. J Mater Chem B 1(39), 5279-5287.

Chen F, Wang C, Yue L, et al. (2021) Cell walls are remodeled to alleviate nY2O3 cytotoxicity by elaborate regulation of de novo synthesis and vesicular transport. ACS Nano 15, 13166-13177.

Chen Z, Lv Z, Sun Y, et al. (2020) Recent advancements in polyethyleneimine-based materials and their biomedical, biotechnology, and biomaterial applications. J Mater Chem B 8, 2951-2973.

Chopra H, Bibi S, Singh I, et al. (2022) Green metallic nanoparticles: Biosynthesis to applications. Front Bioeng Biotechnol 10, e874742.

Dehghani J, Movafeghi A, Barzegari A, Barar J (2017) Efficient and stable transformation of Dunaliella pseudosalina by 3 strains of Agrobacterium tumefaciens. Bioimpacts 7(4), 247-254.

Demirer GS, Zhang H, Matos JL, et al. (2019) Carbon nanotube–mediated DNA delivery without transgene integration in intact plants. Nat Protoc 14, 456-464.

Dobson J (2006) Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery. Gene Ther 13(4), 283-287.

Farooq N, Ather L, Shafiq M, et al. (2022) Magnetofection approach for the transformation of okra using green iron nanoparticles. Sci Rep 12, e16568

Hajiahmadi Z, Shirzadian-Khorramabad R, Kazemzad M, Sohani MM (2019) Enhancement of tomato resistance to Tuta absoluta using a new efficient mesoporous silica nanoparticle-mediated plant transient gene expression approach. Scientia Horticulturae 243, 367-375

Izuegbunam CL, Wijewantha N, Wone B, et al. (2021) A nano-biomimetic transformation system enables in planta expression of a reporter gene in mature plants and seeds. Nanoscale Adv 3(11), 3240-3250.

Joudeh J, Linke D (2022) Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications. J Nanobiotechnol 20, e262.

Karpagavinayagam P, Vedhi C (2019) Green synthesis of iron oxide nanoparticles using Avicennia marina flower extract. Vacuum 160, 286–292.

Liu Q, Chen B, Wang Q, Shi X, et al. (2009) Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. Nano Lett 9(3), 1007-1010.

Lv Z, Jiang R, Chen J, Chen W (2020) Nanoparticle-mediated gene transformation strategies for plant genetic engineering. Plant J 104, 880-891.

Nitnaware KM, Naikawadi VB, Chavan SS, et al. (2021) Genetic Engineering in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.): Retrospect and Prospect. In: Kavi Kishor, P.B., Rajam, M.V., Pullaiah, T. (eds) Genetically Modified Crops. Springer, Singapore. pp. 201-226.

Rana G, Dhiman P, Kumar A, et al. (2024) Phytomediated synthesis of Fe3O4 nanoparticles using Cannabis sativa root extract: photocatalytic activity and antibacterial efficacy. Biomass Conv Bioref 5785, 1-18.

Rohiwal SS, Dvorakova N, Klima J, et al. (2020) Polyethylenimine based magnetic nanoparticles mediated non-viral CRISPR/Cas9 system for genome editing. Sci Rep 10(1), e4619.

Rozita NASD (2020) Papain grafted into the silica coated iron-based magnetic nanoparticles "IONPs@SiO2–PPN" as a new delivery vehicle to the HeLa cells. J Nanotechnol 31, e195603.

Sosa-Acosta JR, Iriarte-Mesa C, Ortega GA, Díaz-García AM (2020) DNA-iron oxide nanoparticles conjugates: Functional magnetic nanoplatforms in biomedical applications. Top Curr Chem 378, e13.

Su W, Xu M, Radani Y, Yang L (2023) Technological Development and Application of Plant Genetic Transformation. Int J Mol Sci 24, 10646.

Tyurin AA, Suhorukova AV, Kabardaeva KV, Goldenkova IV (2020) Transient Gene Expression is an Effective Experimental Tool for the Research into the Fine Mechanisms of Plant Gene Function: Advantages, Limitations, and Solutions. Plants 9, e1187.

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.