

Cloning and *Agrobacterium*-mediated transfer of *SoBADH* gene to *Brassica napus* L. to confer osmotic stress tolerance

Parissa Jonoubi¹ , Tahmineh Lohrasebi², Azadeh Modaresi³, Diana Daneshian⁴

1. Corresponding author, Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: jonoubi@khu.ac.ir
2. Plant Bioproducts Group, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. E-mail: lohrasebi@nigeb.ac.ir
3. Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. E-mail: a.modaresi@yahoo.com
4. Central Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: d.daneshian@gmail.com

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received 16 May 2026

Received in revised form 02 July 2026

Accepted 17 August 2026

Available online 23 August 2026

Keywords:

Betaine aldehyde dehydrogenase
Drought stress,
Glycine betaine,
Polyethylene glycol,
Transgenic plant

ABSTRACT

Objective: Canola (*Brassica napus* L.) is a major source of edible oil, but its production is severely affected by osmotic stresses such as drought and salinity. Glycine betaine (GB) plays a key role in stress tolerance, yet many crops including canola cannot accumulate it. This study aimed to transfer the *SoBADH* gene from spinach into canola to enhance GB biosynthesis and improve osmotic stress tolerance.

Methods: The synthesized *SoBADH* gene was cloned into pUC57, digested with *Sall* and *NdeI*, and ligated into pRI201-AN using T4 ligase. The recombinant vector was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* via freeze-thaw method. Canola cotyledonary explants were inoculated with *Agrobacterium*, and transgenic plants were regenerated on kanamycin-containing medium.

Results: The presence of the *SoBADH* gene was confirmed by PCR analysis, and its expression was verified by RT-PCR. Osmotic stress tolerance was evaluated using 20% PEG6000 (-0.7 MPa). The results showed that transgenic plants exhibited a 60% increase in glycine betaine content compared to control plants and displayed greater leaf development and greener color under osmotic stress.

Conclusion: Transfer of the *SoBADH* gene into canola effectively enhances GB accumulation and osmotic stress tolerance, offering a practical approach for developing drought- and salt-tolerant cultivars for sustainable agriculture.

Cite this article: Jonoubi, P., Lohrasebi, T., Modaresi, A. & Daneshian, D. (2026). Cloning and *Agrobacterium*-mediated transfer of *SoBADH* gene to *Brassica napus* L. to confer osmotic stress tolerance.. *Nova Biologica Reperta*, 13 (2), 1-22. <https://doi.org/10.22034/nbr.2026.132149.0>



© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22034/nbr.2026.132149.0>

Publisher: Kharazmi University.

Introduction

Canola (*Brassica napus* L.) is an allotetraploid species ($2n=38$) originating from interspecific hybridization between *B. oleracea* and *B. campestris*. It is predominantly self-pollinating (over 70%) with approximately 20-30% cross-pollination (Safavi Fard et al., 2020). Canola seed contains 40-45% oil, making it the third most important source of edible vegetable oil worldwide (Jonoubi et al., 2004b; Khalatbari et al., 2021). Drought stress is recognized as the most critical limiting factor for canola production globally (Wang et al., 2026).

Plants are continuously affected by multiple abiotic stresses including drought, salinity, and extreme temperatures. Among adaptive mechanisms, glycine betaine (GB) accumulation has emerged as a key strategy for stress tolerance (Chen et al., 2025; Basit et al., 2025). GB is an osmoprotectant that contributes to cellular homeostasis through osmotic balance regulation, ROS scavenging, antioxidant defense enhancement, and membrane stabilization (Ali et al., 2020). In higher plants, GB biosynthesis primarily occurs via two-step choline oxidation catalyzed by choline monooxygenase and betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) (Chen et al., 2025). GB also protects photosystem II complexes and reduces oxidative damage (Ali et al., 2020; Rosas-Rodríguez & Valenzuela-Soto, 2021).

Despite the crucial role of GB, many crop plants including canola lack the ability to accumulate this compound (Larher et al., 2003; Rosas-Rodríguez & Valenzuela-Soto, 2021). Although canola exhibits trace amounts of GB under normal conditions, it cannot significantly increase GB levels in response to osmotic stress (Selvaraj et al., 1995), making it an ideal model for genetic engineering of the GB biosynthesis pathway (Basit et al., 2025). Recent studies have successfully transferred BADH genes from various sources into different plants, including SgBADH from *Suaeda glauca* to *Arabidopsis* (Jin et al., 2024), HuBADH from *Hylocereus undatus* to *Arabidopsis* (Qu et al., 2023), AhBADH from *Atriplex hortensis* to soybean (Yu et al., 2023), and Fld/BADH co-transformation into walnut (Makari Deligani et al., 2025). Given the increasing global need for enhanced food production (Tiwari et al., 2022), this study aimed to transfer the spinach SoBADH gene into canola using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluate osmotic stress tolerance in transgenic plants.

Method

Gene synthesis and *E. coli* transformation: The spinach SoBADH gene (accession number U69142.1) was synthesized by Shingene (South Korea) and cloned into pUC57. *E. coli* DH5 α competent cells were transformed using the heat shock method (Sambrook & Russell, 2001), and transformants were selected on ampicillin-containing LB medium.

Subcloning into pRI201-AN and *Agrobacterium* transformation: The SoBADH gene was excised from pUC57 using NdeI and SalI and ligated into pRI201-AN using T4 ligase. Recombinant plasmids were transformed into *E. coli* DH5 α and selected on kanamycin. The construct was then transferred into *Agrobacterium tumefaciens* using the freeze-thaw method (Sambrook & Russell, 2001) and selected on kanamycin and rifampicin.

Plant transformation and regeneration: Canola seeds were germinated on hormone-free MS medium (Murashige & Skoog, 1962). Cotyledonary explants from 7-day-old seedlings (73% regeneration frequency) were inoculated with *Agrobacterium* suspension (OD₆₅₀=1.0) at 1:1 dilution for 60 seconds, co-cultivated for 48 hours in darkness, then transferred to shoot induction medium containing 3 mg l⁻¹ benzyladenine, 250 mg l⁻¹ cefotaxime, and 5 mg l⁻¹ kanamycin (Jonoubi et al., 2005). Green kanamycin-resistant shoots were transferred to shoot maturation medium (10 mg l⁻¹ kanamycin) and then to root induction medium (2 mg l⁻¹ IBA, 15 mg l⁻¹ kanamycin).

Molecular confirmation: Genomic DNA was extracted using a DEnAzist DNA Isolation Kit. RNA was extracted using a TOPAZ GENE Mini Kit. PCR and RT-PCR analyses were performed using SoBADH-specific primers. cDNA synthesis was carried out using a YEKTA TAJHIZ AZMA cDNA Synthesis Kit.

Osmotic stress and GB quantification: Osmotic stress was induced using 20% PEG6000 (0.7 MPa) (Michel & Kaufmann, 1973). Glycine betaine content was measured using the periodide method (Grieve & Grattan, 1983). Absorbance was read at 365 nm using a UV-Vis spectrophotometer.

Results

Construction of SoBADH expression vector: Colony PCR and restriction digestion confirmed the presence of the 1668 bp SoBADH fragment in pUC57 (Figure 1). Digestion with NdeI and SalI released the 1668 bp fragment from both pUC57 and pRI201-AN (Figure 2). Colony PCR and restriction digestion of recombinant *E. coli* colonies confirmed successful subcloning (Figure 3). PCR analysis of *Agrobacterium* colonies confirmed successful transfer of the pRI201-AN-SoBADH construct (Figure 4).

Plant transformation and regeneration: Optimal transformation efficiency was achieved using 7-day-old cotyledonary explants with 1:1 bacterial dilution and 60-second inoculation (Figure 5). Transgenic plants remained green on kanamycin-containing medium, while non-transgenic shoots bleached.

Molecular confirmation in transgenic plants: PCR analysis revealed the 1668 bp band in kanamycin-resistant plants, confirming successful gene transfer (Figure 6). RT-PCR analysis confirmed transgene expression at the mRNA level (Figure 7).

Glycine betaine accumulation: Transgenic plants showed a 60% increase in GB content compared to wild-type plants under both normal and osmotic stress conditions. Morphological observations revealed greater leaf development and greener color in transgenic plants under -0.7 MPa PEG6000 stress (Figure 8, Graph 1).

Discussion

Successful construction of the pRI201-AN-SoBADH expression vector and its transfer into canola was molecularly confirmed. Optimal regeneration from 7-day-old cotyledonary explants (73%) corresponds with previous reports demonstrating superior regeneration potential of cotyledon explants (Jonoubi et al., 2005). Optimization of bacterial concentration (1:1) and inoculation time (60 seconds) effectively balanced transformation efficiency and contamination control (Imani & Kogel, 2020).

The presence of the 1668 bp band in PCR and confirmation of expression by RT-PCR demonstrated successful transgene integration and transcription. Effective selection using kanamycin (based on NPTII gene) agrees with previous studies (Jonoubi et al., 2005). Successful BADH expression is the primary prerequisite for enhanced GB biosynthesis (Chen et al., 2025; Basit et al., 2025).

Transgenic plants exhibited a 60% increase in GB content and improved morphology under PEG-induced stress. These findings are consistent with GB's protective mechanisms as a compatible osmolyte that maintains cell turgor, stabilizes PSII complexes, and protects membranes (Ali et al., 2020; Rosas-Rodríguez & Valenzuela-Soto, 2021; Basit et al., 2025). Comparison with similar studies confirmed consistency across different gene sources and target plants, including SgBADH in *Arabidopsis* (Jin et al., 2024), HuBADH in *Arabidopsis* (Qu et al., 2023), AhBADH in soybean (Yu et al., 2023), Fld/BADH in walnut (Makari Deligani et al., 2025), and BvBADH1 in tobacco (Wei et al., 2026).

The greener color and enhanced leaf development under stress indicate GB's protective role on the photosynthetic apparatus. GB stabilizes the oxygen-evolving complex of PSII and facilitates D1 protein repair (Chen et al., 2025; Basit et al., 2025). Studies on tea plants (Zhou et al., 2025) and *Poncirus trifoliata* (Ming et al., 2024) further confirmed that GB accumulation enhances antioxidant enzyme activity and reduces ROS. Degtyarenko et al. (2025) demonstrated that alternative betaines also reduce oxidative stress markers.

Conclusions

This study successfully constructed the pRI201-AN expression vector containing the spinach SoBADH gene and transferred it into canola via *Agrobacterium tumefaciens*. Transgene integration and expression were confirmed by PCR and RT-PCR. Transgenic plants exhibited a 60% increase in GB content. These findings correspond with previous reports demonstrating that BADH overexpression consistently enhances GB accumulation regardless of gene source or target plant species. Future perspectives include field performance evaluation, investigation of stable transgene inheritance, and co-transformation with complementary genes. This approach represents an effective step toward developing canola cultivars with improved drought and salinity tolerance.

Author Contributions

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Vice-Chancellor of Research and Technology of Kharazmi University and Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for providing facilities and equipment in this research.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

همسانه‌سازی ژن *SoBADH* و انتقال آن به کلزا (*Brassica napus* L.) از طریق

اگر باکتریوم در راستای ایجاد تحمل به تنش اسمزی

پریسا جنوبی^۱، ته‌مین‌ه لهراسبی^۲، آزاده مدرسی^۳ و دیانا دانشیان^۴

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: jonoubi@khu.ac.ir
۲. گروه زیست فرآورده‌های گیاهی، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران. رایانامه: lohasebi@nigeb.ac.ir
۳. گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. رایانامه: a.modaresi@yahoo.com
۴. گروه علوم همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرکزی تهران، ایران. رایانامه: d.daneshiian@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	مقدمه: کلزا (<i>Brassica napus</i> L.) یکی از مهم‌ترین منابع روغن خوراکی جهان است، اما تولید آن به شدت تحت تأثیر تنش‌های اسمزی مانند خشکی و شوری قرار می‌گیرد. گلیسین‌بتائین به عنوان یک اسمولیت سازگار نقش کلیدی در تحمل به تنش دارد، اما بسیاری از گیاهان زراعی از جمله کلزا قادر به تجمع آن نیستند. هدف این پژوهش، انتقال ژن بتائین آلدئید دهیدروژناز (<i>SoBADH</i>) اسفناج (<i>Spinacia oleracea</i>) به کلزا برای افزایش سنتز گلیسین‌بتائین و بهبود تحمل به تنش اسمزی بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۲۶	روش‌ها: ژن <i>SoBADH</i> سنتز شده توسط شرکت Shingene در ناقل pUC57 قرار گرفت. هضم آنزیمی با <i>Sall</i> و <i>NdeI</i> روی ناقل pRI201-AN و pUC57 انجام شد. واکنش اتصال ژن به ناقل بیانی با T4 لیگاز صورت گرفت. ناقل نو ترکیب با روش انجماد و ذوب به <i>Agrobacterium tumefaciens</i> منتقل شد. برگ‌های لپه‌ای کلزا با سوسپانسیون باکتری آغشته شده و گیاهان سبز تراریخت در محیط حاوی کانامایسین باززایی شدند.
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۴/۱۱	نتایج: حضور ژن <i>SoBADH</i> با آزمون PCR و بیان آن با RT-PCR تأیید گردید. ارزیابی تحمل به تنش اسمزی با استفاده از غلظت ۲۰ درصد PEG6000 فشار اسمزی ۰/۷- مگاپاسکال انجام شد. نتایج نشان داد که گیاهان تراریخت افزایش ۶۰ درصدی محتوای گلیسین‌بتائین را در مقایسه با گیاهان شاهد نشان داده و تحت تنش اسمزی، توسعه برگ‌ها بیشتر و رنگ سبزتری داشتند.
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۲۶	جمع‌بندی: انتقال ژن <i>SoBADH</i> به کلزا راهبردی مؤثر برای افزایش گلیسین‌بتائین و بهبود تحمل به تنش اسمزی است و گامی عملی در جهت توسعه ارقام متحمل به خشکی و شوری برای کشاورزی پایدار محسوب می‌شود.
تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۶/۳۱	
کلیدواژه‌ها: بتائین آلدئید دهیدروژناز، پلی اتیلن گلیکول، تنش خشکی، گلیسین‌بتائین، گیاه تراریخت	

استناد: جنوبی، پریسا؛ لهراسبی، ته‌مین‌ه؛ مدرسی، آزاده و دانشیان، دیانا (۱۴۰۵). همسانه‌سازی ژن *SoBADH* و انتقال آن به کلزا (*Brassica napus* L.) از طریق اگر باکتریوم در راستای ایجاد تحمل به تنش اسمزی. یافته‌های نوین در علوم زیستی، ۱۳ (۲)، ۱-۲۲.

<https://doi.org/10.22034/nbr.2026.132149.0>



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه خوارزمی.

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) گیاهی آلوتتراپلوئید ($2n=38$) و حاصل از تلاقی بین گونه‌ای *Brassica oleracea* و *Brassica campestris* است. این گیاه عمدتاً خودگشن (بیش از ۷۰٪) و تا ۳۰٪ دگرگشن می‌باشد (Safavi Fard et al., 2020). میوه آن خورجین و حاوی ۱۵ تا ۴۰ دانه است. دانه کلزا به طور معمول حاوی ۴۰ تا ۴۵ درصد روغن است که این درصد تحت تأثیر عوامل ژنتیکی، شرایط محیطی و تنش خشکی قرار می‌گیرد. روغن کلزا به ویژه در ارقام فاقد اروسیک اسید که تا ۶۱٪ اولئیک اسید دارند، به عنوان سومین منبع مهم روغن خوراکی جهان شناخته می‌شود (Jonoubi et al., 2004b; Khalatbari et al., 2021). تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید کلزا در سراسر جهان محسوب می‌شود و دستیابی به ژنوتیپ‌های متحمل همراه با مکانیسم‌های مرتبط با تحمل به خشکی از اولویت‌های اصلی برنامه‌های به‌نژادی این محصول در نظر گرفته می‌شود (Wang et al., 2026).

گیاهان به طور مداوم تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی متعددی از جمله خشکی، شوری و دمای افراطی قرار دارند که رشد و بهره‌وری آن‌ها را محدود می‌کند. در میان مکانیسم‌های سازگاری، تجمع گلیسین‌بتائین به عنوان یک استراتژی کلیدی برای تحمل به تنش شناخته شده است (Chen et al., 2025; Basit et al., 2025). گلیسین‌بتائین (N,N,N-تری‌متیل گلیسین) یک ترکیب آمفوتری و دوقطبی است که به طور طبیعی در بسیاری از موجودات زنده یافت می‌شود (Chen et al., 2025). در گیاهان عالی، بیوسنتز گلیسین‌بتائین عمدتاً از طریق اکسیداسیون دو مرحله‌ای کولین توسط آنزیم‌های کولین مونواکسیژناز (CMO) و بتائین آلدئید دهیدروژناز (BADH) انجام می‌شود (Chen et al., 2025). آنزیم بتائین آلدئید دهیدروژناز (BADH) مسئول واکنش اکسیداسیون دوم در مسیر سنتز این ترکیب است. ژن *BADH* می‌تواند از طریق عناصر تنظیمی سیس- مؤثر (*CREs*) خود در تنظیم رونویسی فرآیندهای مختلف زیستی، مانند پاسخ‌های استرس و هورمونی، نقش داشته باشد (Ozturk et al., 2021). گلیسین بتائین نقش مهمی در تنظیم بیان ژن بویژه آنزیم‌های پاک‌کننده *ROS* و فاکتورهای رونویسی القا شده توسط گلیسین بتائین دارد. *BADH* از طریق مسیر سیگنالینگ *MAPK* و سنتز متابولیکی *GB* در تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی نقش دارد (Golestan Hashemi et al., 2018). این ترکیب از طریق تعدیل تعادل اسمزی، حذف گونه‌های فعال اکسیژن، تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و تثبیت پروتئین‌ها و غشاها، به حفظ هموستاز سلولی کمک می‌کند (Ali et al., 2020). گلیسین‌بتائین علاوه بر تنظیم اسمزی، با برهم‌کنش با فیتوهورمون‌ها و مسیرهای سیگنالینگ سلولی، رشد و تحمل به تنش را بهبود می‌بخشد (Basit et al., 2025). همچنین با حفظ ساختار کمپلکس فتوسیستم II و حفاظت از غشاها، آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش را کاهش می‌دهد (Ali et al., 2020).

ژن *BADH* متعلق به خانواده ژنی *ALDH* است که در گونه‌های گیاهی مختلف از جمله کلزا وجود دارد. نتایج بررسی خانواده *ALDH* نشان داده است که کلزا دارای ۴۵ عضو از این خانواده است که روی تمامی کروموزوم‌ها به استثنای کروموزوم A02 و A04 توزیع شده‌اند (Jin et al., 2025). بررسی فیلوژنی ژن‌های این خانواده نشان داده است که این خانواده در گیاه کلزا به ۹ زیر خانواده تقسیم می‌شود. کلزا یک خانواده ژنی بنام *ALDH10* دارد که *BADH* در این گروه قرار داشته و این ژن روی کروموزوم A10 قرار دارد (Jia et al., 2024). از این گیاه به عنوان یک مدل برای مهندسی ژنتیک مسیر بیوسنتز گلیسین‌بتائین استفاده شده است (Rosas- Basit et al., 2025). اما این گیاه مقادیر بسیار ناچیزی از گلیسین‌بتائین را سنتز می‌کند (Selvaraj et al., 1995) و توانایی افزایش معنی‌دار این ترکیب در پاسخ به تنش‌های اسمزی را همچون اسفناج که یک تجمع‌کننده خوب گلیسین بتائین می‌باشد، ندارد. پروتئین رمز شونده توسط ژن *BADH* اسفناج دارای فعالیت آنزیمی بالاتری بوده و یکی از فعال‌ترین‌ها در بین *BADH* های موجودات دیگر است.

در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه انتقال ژن‌های مسیر بیوسنتز گلیسین‌بتائین به گیاهان زراعی حاصل شده است. ژن *BADH* به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی در مرحله نهایی بیوسنتز گلیسین‌بتائین، به طور گسترده در مطالعات تراریختی مورد استفاده قرار گرفته است. ژن *BADH* را می‌توان از گیاهان عالی و سایر انواع موجودات زنده همسانه سازی کرد.

اسفناج (*Spinacia oleracea*)، چغندر قند (*Beta vulgaris*)، جو (*Hordeum vulgare*)، کینوا (*Chenopodium quinoa*) و برنج منابع اصلی همسازسازی ژن *BADH* هستند (Yamada et al. 2015; Jiang et al. 2016). افزایش بیان این ژن ها در سیستم های هترولوگ گیاهی منجر به افزایش سنتز گلیسین بتائین و تحمل به انواع تنش های غیر زنده شده است (Niazian et al., 2019; Zhang et al., 2020).

با جداسازی ژن *SgBADH* از گیاه شورپسند *Suaeda glauca* و انتقال آن به *Arabidopsis thaliana*، افزایش معنی داری در محتوای گلیسین بتائین و کاهش میزان مالون دی آلدئید در شرایط تنش کم آبی گزارش شده است (Jin et al., 2024). انتقال ژن *HuBADH* از گیاه خشکی پسند *Hylocereus undatus* به *Arabidopsis thaliana* نشان داد که گیاهان تراریخت افزایش حدود ۸۰ درصدی گلیسین بتائین را تحت تنش شوری تجربه کرده اند (Qu et al., 2023).

انتقال ژن *AhBADH* از *Atriplex hortensis* به سویا و انجام آزمایشات مزرعه ای، افزایش معنی دار تحمل به شوری تا ۳۰۰ میلی مولار NaCl و وراثت پایدار تراژن در نسل های بعدی به اثبات رسیده است (Yu et al., 2023). تراریختی مضاعف گردوی ایرانی با ژن های *Fld* و *BADH* نشان دادند که گیاهان تراریخت سطوح بالاتری از تجمع گلیسین بتائین و پرولین را در شرایط تنش اسمزی ناشی از پلی اتیلن گلیکول (PEG) نشان می دهند (Makari Deligani et al., 2025). انتقال ژن *BvBADH1* از چغندر قند به توتون، افزایش گلیسین بتائین و تجمع پرولین را نشان داده است (Wei et al., 2026).

با توجه به موارد فوق و با عنایت به نیاز روزافزون جهان به افزایش تولیدات غذایی تا سال ۲۰۵۰ (Tiwari et al., 2022)، هدف از پژوهش حاضر، انتقال ژن *SoBADH* استخراج شده از اسفناج (*Spinacia oleracea*) به گیاه کلزا با استفاده از ناقل بیانی *pRI201-AN* و *Agrobacterium tumefaciens* و ارزیابی تحمل به تنش اسمزی در گیاهان تراریخت حاصل در شرایط *in vitro* و توسعه کشاورزی پایدار بود.

مواد و روش ها

سنتز ژن *SoBADH* و تراریختی سلول های *E. coli* مستعد شده با ناقل *pUC57* نو ترکیب

سنتز ژن *SoBADH* اسفناج با شماره دسترسی U69142.1 توسط شرکت Shingene (کره جنوبی) انجام شد و در ناقل کلونینگ *pUC* قرار گرفت. طراحی توالی پرایمرها توسط نرم افزار Snapgene انجام شد. توالی پرایمر اختصاصی ژن *SoBADH* در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی ژن *SoBADH*

Table 1. Sequences of specific primers for the *SoBADH* gene.

Primer Name	Primer sequence	TM
F-BADH	5'-GCGTTCCTCAATTCCTGCTC-3'	53.2° C
R-BADH	5'-TCAAGGAGACTTGTACCATCCC-3'	54.8° C

کشت شبانه باکتری حاوی ناقل انجام شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶ درجه سانتی گراد با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (Biofuge Stratos Heraeus) شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت Plasmid DNA extraction mini kit شرکت FAVORGEN (No: FAPDE050) انجام گرفت و نمونه ها در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

به منظور انتقال پلاسمید، سلول های باکتری مستعد شدند. برای این کار، از کشت شبانه باکتری *E. coli* سویه DH5α در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، یک میلی لیتر برداشت و به ۱۰۰ میلی لیتر محیط تازه Lysogeny Broth (LB) منتقل گردید (Bertani, 1951). زمانی که OD در ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۳ رسید، سوسپانسیون سلولی به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. سپس

رسوب باکتری توسط سانتریفیوژ در ۳۳۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تهیه شد. برای حل کردن رسوب باکتری از ۲۰ میلی‌لیتر محلول استریل Tris-Borate-EDTA (TBE) سرد استفاده شد. محلول تهیه شده برای مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد و سپس در اندازه‌های ۱۰۰ میکرولیتری توزیع، و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

برای انتقال ناقل نوترکیب به درون باکتری از روش تراریختی شوک حرارتی استفاده شد (Sambrook and Russel, 2001). بدین صورت که باکتری مستعد شده از فریزر خارج و روی یخ قرار گرفت تا به آرامی ذوب شود. سپس ۱۰ میکرولیتر از ناقل pUC57 حاوی ژن *SoBADH* به باکتری *E. coli* سویه DH5 α مستعد شده اضافه شد و نمونه برای مدت ۲۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. پس از آن، نمونه در حمام آب گرم ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه قرار داده شد و بلافاصله به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس ۹۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع به لوله اضافه شد و لوله در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یکساعت قرار داده شد. سپس، سوسپانسیون سلولی حاصل بر روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک انتخابی (آمپی‌سیلین) کشت شد. از واکنش کلنی PCR با آغازگر فوروارد ویژه ژن *SoBADH* و ریورس ویژه ناقل (M13 rev) استفاده شد که قطعه‌ی ۱۶۶۸ جفت بازی را تکثیر می‌کرد. برای تأیید حضور پلاسمید حاوی ژن *SoBADH* در باکتری نوترکیب، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *SalI* (موقعیت ۱۸۴۸ ناقل) و *NdeI* (موقعیت ۱۸۴ ناقل) انجام شد.

همسانه‌سازی ژن *SoBADH* در ناقل بیانی pRI201-AN و نوترکیبی آگروباکتریوم

از باکتری‌های نوترکیب واجد پلاسمید pUC حاوی ژن *SoBADH* استخراج پلاسمید انجام شد. به منظور همسانه‌سازی ژن *SoBADH* در ناقل بیانی، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های محدودالثر *SalI* و *NdeI* بر روی هر دو ناقل pRI201-AN (تهیه شده از شرکت Takara Bio) و pUC57 (تهیه شده از شرکت Shingene) حاوی ژن *SoBADH* انجام گرفت. واکنش‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به صورت شبانه انجام شدند. DNA برش خورده الکتروفورز شد و با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA Column Extraction شرکت YEKTA TAJHIZ AZMA، قطعات ژن *SoBADH* و ناقل خطی شده pRI201-AN از روی ژل خالص شدند. واکنش اتصال آنزیمی ژن *SoBADH* به درون ناقل بیانی pRI201-AN توسط آنزیم T4 لیگاز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به صورت شبانه انجام شد.

با استفاده از روش شوک حرارتی، عمل ترانسفورماسیون به باکتری *E. coli* مستعد شده انجام شد. نمونه‌ها روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت شدند. برای تأیید همسانه‌سازی بعد از رشد باکتری، کلونی PCR با آغازگرهای ویژه ناقل (M13) انجام شد. قطعه مورد نظر حدود ۳ Kb بود. تخلیص پلاسمید و تأیید توسط هضم آنزیمی انجام گرفت. نمونه‌های تأیید شده به صورت استوک حاوی گلیسرول در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای تراریختی *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 با ناقل pRI201-AN از محلول کلسیم کلرید ۲۰ میلی‌مولار و روش استاندارد انجماد و ذوب استفاده شد (Sambrook and Russel, 2001). از آنجایی که این ناقل حاوی ژن مقاومت به کانامایسین می‌باشد و سویه LBA4404 آگروباکتریوم مقاومت به آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین را دارد برای انتخاب آگروباکتریوم‌های تراریخت در محیط کشت، از این دو آنتی‌بیوتیک استفاده شد. کلنی‌های تشکیل شده نشان‌دهنده انتقال موفق ناقل به درون آگروباکتریوم بودند. برای تأیید نهایی تراریختی آگروباکتریوم نوترکیب، کلونی PCR نیز صورت گرفت. از این باکتری‌ها برای تراریختی گیاهان کلزا استفاده شد.

تراریختی جداکشت‌های برگ لپه‌ای کلزا با آگروباکتریوم

برای کشت‌شبانه *Agrobacterium tumefaciens* دارای ناقل pRI201-AN از محیط LB مایع استفاده شد. آنتی‌بیوتیک کانامایسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین به میزان ۳۴ میلی‌گرم در لیتر به محیط اضافه شد. فلاسک بر روی شیکر ۱۸۰ rpm در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. زمانی که OD₆₅₀ محلول مساوی با یک شد، تعداد سلول‌های باکتری در هر میلی‌لیتر محیط کشت حدود 1×10^9 عدد سلول بود (Jonoubi et al., 2005). سوسپانسیون سلولی

حاصل از کشت شبانه به مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، محیط LB دور ریخته شد و رسوب باکتری توسط محیط آغشتگی شامل: محیط MS (Murashige and Skoog, 1962) همراه با ۵٪ گلوکز و ۵/۶ pH، به نسبت‌های ۱:۲، ۱:۱، ۲:۱ حل شد. سوسپانسیون سلولی قبل از استفاده به مدت یک ساعت در دمای محیط قرار داده شد.

برای تراریختی از برگ‌های لپه‌ای استفاده شد. برگ‌های لپه‌ای از دانه‌رست‌های ۵، ۷ و ۱۵ روزه جدا شده و مورد استفاده قرار گرفتند (Jonoubi et al., 2004a). جداکشت‌ها با زمان‌های مختلف (۳۰، ۶۰ و ۹۰ ثانیه) و رقت‌های متفاوت سوسپانسیون باکتری (۱:۲، ۱:۱، ۲:۱) آغشته شدند. در تمامی مراحل، انتهای دمبرگ به سوسپانسیون آغشته شد و از آلودگی پهنک جلوگیری گردید. پس از آن، برگ‌ها بر روی کاغذ خشک‌کن استریل قرار داده شدند. دمبرگ‌ها پس از فرایند آغشتگی در محیط هم‌کشتی شامل محیط MS با ۵/۶ pH، بدون هورمون، قرار داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از طی این مدت، نمونه‌ها به محیط القای شاخه شامل محیط MS تکمیل شده با ۳ میلی گرم در لیتر هورمون بنزیل آدنین و آنتی‌بیوتیک‌های سفوتاکسیم ۲۵۰ میلی گرم در لیتر برای کنترل رشد آگروباکتریوم و کانامایسین ۵ میلی گرم در لیتر برای انتخاب گیاهان سبز تراریخت، منتقل شدند (Jonoubi et al., 2005). نمونه‌ها هر دو هفته یک بار در همین محیط واکشت شدند. شاخه‌های باززایی شده سبز مقاوم به کانامایسین به محیط بلوغ شاخه شامل محیط MS بدون هورمون تکمیل شده با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم ۲۰۰ میلی گرم در لیتر و آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۱۰ میلی گرم در لیتر منتقل شدند. شاخه‌های سبز مقاوم به کانامایسین پس از یک ماه به محیط القای ریشه حاوی ۲ میلی گرم در لیتر هورمون IBA تکمیل شده با ۲۰۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم و ۱۵ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین منتقل شدند (Jonoubi et al., 2008). از گیاهان سبز مقاوم به کانامایسین برای تأیید حضور ژن *SoBADH* استفاده شد.

تأیید تراریختی گیاهان با استفاده از PCR و RT-PCR

برای استخراج DNA از کیت DNA Isolation Kits (Cat. No: S-1030-50) شرکت DENAZIST استفاده شد. به این منظور، ۱۰۰ میلی گرم از برگ گیاهان سبز مقاوم به کانامایسین در نیتروژن مایع قرار گرفته و همراه با هم‌زدن به پودر تبدیل شد. سپس پودر در یک میکروتیوب ریخته و به آن ۴۰۰ میکرولیتر از Lysis Buffer اضافه شد. ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از لیز شدن بافت‌های گیاهی، ۴۰۰ میکرولیتر Binding Buffer اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. DNA های استخراج شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای استخراج RNA از بافت‌های گیاهی از مینی کیت (Cat. No.: TGK2004) شرکت TOPAZ GENE استفاده شد. از بافت‌های گیاهی، total RNA استخراج گردید. برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ انجام شد. به منظور بررسی بیان ژن *SoBADH* در گیاهان تراریخت شده، واکنش RT-PCR انجام شد. از اینرو لازم بود سنتز cDNA با آنزیم Reverse Transcriptase و توسط کیت cDNA synthesis Kit (Cat. No: YT4500) شرکت YEKTA انجام شود. پس از اضافه نمودن مواد داخل کیت، نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس برای غیرفعال کردن آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. Total RNA استخراج شده تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه شرایط *in vitro* تحت تنش اسمزی

به منظور ارزیابی میزان تحمل شرایط تنش اسمزی در گیاهان تراریخت شده با ژن *SoBADH* آزمایشی در شرایط *in vitro* انجام شد. برای ایجاد فشار اسمزی پایین از پلی اتیلن گلیکول (۶۰۰۰ PEG6000) استفاده گردید (Michel and Kaufmann, 1973). مقادیر ۰ و ۲۰ درصد PEG در این آزمایش به کار رفت. پودر توزین شده PEG در نیم لیتر آب مقطر اضافه شد، برای

حل شدن آن نیاز به حرارت دادن و همزدن مداوم بود. سپس محلول حاصل با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرون استریل شد و با نیم لیتر محیط MS استریل، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط گردید و در ظروف کشت تقسیم شدند.

با استفاده از رابطه زیر، پتانسیل اسمزی غلظت ۲۰ درصد PEG6000 معادل ۰/۷ مگاپاسکال محاسبه شد:

$$\Psi\pi = -MIRT \text{ (پتانسیل اسمزی بر حسب مگاپاسکال)}$$

دما بر حسب درجه کلوین = T، ثابت گازها = R، ضریب اشتقاق معادل I=۱، مولاریته محلول = M

گیاهان تراریخت و غیرتراریخت (شاهد) حاصل از کشت بافت در ۳ تکرار و در شرایط استریل، زیر هود لامینار در محیط‌های آماده شده کشت شدند. نمونه‌ها به مدت ۳ هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری میزان گلیسین‌بتائین

میزان گلیسین‌بتائین با استفاده از روش Grieve و Grattan (1983) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۲ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر به ۲۵ میلی‌گرم پودر خشک شده گیاه در هاون چینی اضافه شد. نمونه‌ها ساییده شدند و در دمای اتاق برای ۲۴ ساعت نگهداری شدند. با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار، نمونه‌ها برای ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. ۲۵۰ میکرولیتر محلول اسید سولفوریک یک مولار به ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ۲۰۰ میکرولیتر معرف KI-I₂ (Iodine-Potassium Iodide) به نمونه‌ها اضافه شد و ورتکس گردیدند، سپس نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در یخچال نگهداری شدند. پس از آن، نمونه‌ها در ۱۰۰۰ rpm با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوبات در ۴ میلی‌لیتر محلول ۲و۱ دی‌کلرواتان حل شده و ورتکس شدند. نمونه‌ها برای ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. با استفاده از اسپکتروفتومتر UV visible در طول موج ۳۶۵ نانومتر، جذب نمونه‌ها خوانده شد (Grieve and Grattan, 1983).

برای رسم منحنی استاندارد گلیسین‌بتائین، محلول‌هایی از گلیسین‌بتائین در محلول اسید سولفوریک ۲ نرمال با غلظت‌های ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. طبق روش انجام شده برای نمونه‌های گیاهی با آن‌ها رفتار شد و منحنی جذب بر حسب غلظت آن‌ها طبق فرمول زیر رسم گردید:

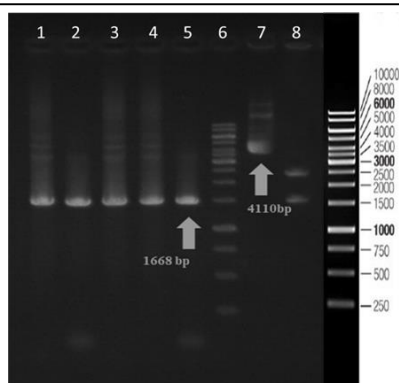
$$Y = 0.0148X + 0.1026$$

غلظت گلیسین‌بتائین بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر = X، جذب خوانده شده = Y

نتایج

ساخت سازه ژنی *SoBADH* و تایید نو ترکیبی *E. coli*

برای همسانه‌سازی، cDNA ژن *SoBADH* که در ناقل pUC57 سنتز شده بود، به باکتری *E. coli* سویه DH5α با روش شوک حرارتی منتقل شد. به منظور تأیید ورود پلاسمید حاوی ژن *SoBADH* در باکتری، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مربوطه، از باکتری‌های نو ترکیب مقاوم به آنتی‌بیوتیک انتخابی آمپی‌سیلین، کلونی PCR انجام شد (شکل ۱، چاهک‌های ۱ تا ۵). برای حصول اطمینان از صحت جهت‌یابی و استقرار ژن *SoBADH* در ناقل، از کلنی‌هایی که PCR آن‌ها مثبت بود، پلاسمید استخراج شد و با استفاده از آنزیم‌های برشی *NdeI* و *SalI* هضم آنزیمی انجام گرفت. محصول به دست آمده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. حضور قطعه ۱۶۶۸ bp نشان‌دهنده حضور و صحت جهت‌یابی قطعه در ناقل نو ترکیب بود (شکل ۱، چاهک ۸).

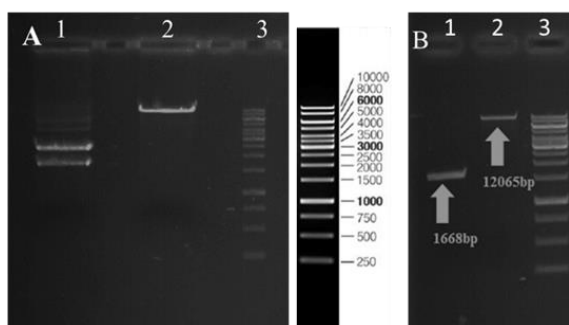


شکل ۱- تأیید ژن *SoBADH* درون ناقل pUC57 از طریق واکنش PCR و هضم آنزیمی؛ چاهک‌های ۱ تا ۵: قطعه ۱۶۶۸ bp نشان‌دهنده حضور ژن *SoBADH* در ناقل pUC57، چاهک ۶: نشانگر وزن مولکولی ۱ kb، چاهک ۷: پلاسمید نو ترکیب بدون واکنش هضم آنزیمی با اندازه ۴۱۱۰ bp، چاهک ۸: واکنش هضم آنزیمی ناقل pUC57 با آنزیم‌های *NdeI* و *SalI* و خروج قطعه ژن *SoBADH*

Figure 1. Confirmation of the *SoBADH* gene within the pUC57 vector by colony PCR and enzymatic digestion. Lanes 1 to 5: 1668 bp fragment indicating the presence of the *SoBADH* gene in the pUC57 vector; Lane 6: 1 kb DNA ladder; Lane 7: Recombinant plasmid without enzymatic digestion showing 4110 bp; Lane 8: Enzymatic digestion of pUC57 vector with *NdeI* and *SalI* restriction enzymes releasing the *SoBADH* gene fragment.

همسانه‌سازی ژن *SoBADH* در حامل بیانی pRI201-AN

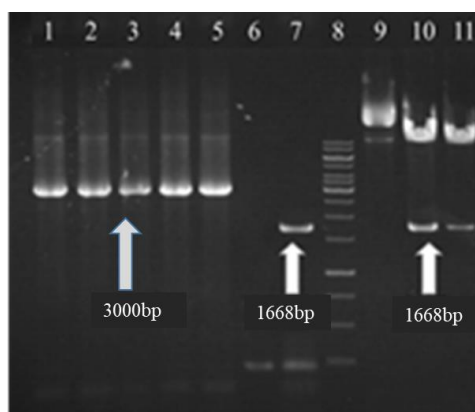
به منظور انتقال قطعه ژنی *SoBADH* از ناقل کلونینگ pUC57 به ناقل دوگانه pRI201-AN، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *NdeI* و *SalI* انجام شد. خروج قطعه ۱۶۶۸ bp ژن *SoBADH* نشان‌دهنده صحت واکنش آنزیمی بود (شکل ۲A). سپس با استفاده از کیت Gel recovery، قطعه ژن *SoBADH* و ناقل دوگانه pRI201-AN از روی ژل آگارز ۱٪ تخلیص شدند (شکل ۲B) تا در واکنش اتصال مورد استفاده قرار گیرند.



شکل ۲- الگوی الکتروفورز محصول هضم آنزیمی pUC57 حاوی ژن *SoBADH* و حامل pRI201-AN با دو آنزیم *NdeI* و *SalI*. A: چاهک ۱: ناقل pUC57 برش خورده و قطعه ژن *SoBADH*، چاهک ۲: ناقل pRI201-AN برش خورده، چاهک ۳: نشانگر وزن مولکولی ۱۰ kb. B: محصول Gel recovery، چاهک ۱: قطعه ژن *SoBADH*، چاهک ۲: ناقل pRI201-AN برش خورده با دو آنزیم *NdeI* و *SalI*.

Figure 2. Electrophoresis pattern of enzymatic digestion products of pUC57 containing the *SoBADH* gene and pRI201-AN vector with *NdeI* and *SalI* restriction enzymes. **A:** Lane 1: Digested pUC57 vector and *SoBADH* gene fragment; Lane 2: Digested pRI201-AN vector; Lane 3: 10 kb DNA ladder. **B:** Gel recovery products; Lane 1: *SoBADH* gene fragment; Lane 2: pRI201-AN vector digested with *NdeI* and *SalI*.

پس از واکنش اتصال قطعه ژن *SoBADH* با ناقل دوگانه pRI201-AN برش خورده، توسط آنزیم T4 Ligase، ناقل‌های نوترکیب به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* منتقل شدند. برای حصول اطمینان از همسانه‌سازی موفق، واکنش کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای ویژه ناقل (M13) انجام شد. مشاهده قطعه حدود ۳Kb نشان‌دهنده حضور ناقل نوترکیب درون باکتری بود (شکل ۳، چاهک‌های ۱ تا ۵). از کلنی‌هایی که PCR آن‌ها مثبت بود، استخراج پلاسمید انجام شد. سپس هضم آنزیمی نمونه‌ها با آنزیم‌های برشی *SalI* و *NdeI* انجام شد (شکل ۳، چاهک‌های ۱۰ و ۱۱). خروج قطعه ۱۶۶۸bp نشان‌دهنده موفقیت در نوترکیبی باکتری با ناقل دوگانه حاوی ژن *SoBADH* بود.

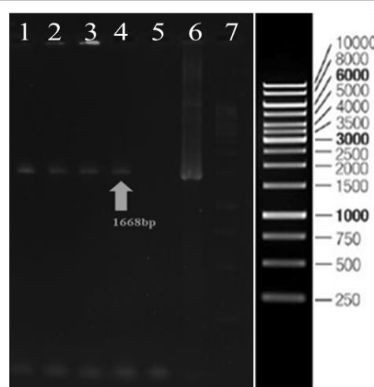


شکل ۳- تأیید حضور ژن *SoBADH* در ناقل pRI201-AN توسط کلونی PCR و هضم آنزیمی در باکتری نوترکیب *E. coli*. چاهک‌های ۱ تا ۵: کلونی PCR از باکتری *E. coli* با آغازگرهای ناقل M13 مشاهده باند حدود ۳Kb تأیید نوترکیبی باکتری بود. چاهک ۶: کنترل منفی (محصول PCR فاقد نمونه)، چاهک ۷: کنترل مثبت (محصول PCR ناقل pUC57 حاوی ژن *SoBADH*)، چاهک ۸: نشانگر وزن مولکولی 10kb، چاهک ۹: ناقل pRI201-AN نوترکیب بدون واکنش هضم آنزیمی، چاهک‌های ۱۰ و ۱۱: ناقل نوترکیب pRI201-AN برش خورده با آنزیم‌های *SalI* و *NdeI* و حضور قطعه ۱۶۶۸ bp ژن *SoBADH*.

Figure 3. Confirmation of the presence of the *SoBADH* gene in the pRI201-AN vector by colony PCR and enzymatic digestion in recombinant *E. coli*. Lanes 1 to 5: Colony PCR from *E. coli* with M13 vector primers. Observation of a band of approximately 3 Kb confirmed bacterial recombination. ; Lane 6: Negative control (PCR product without template); Lane 7: Positive control (PCR product of pUC57 vector containing the *SoBADH* gene); Lane 8: 10 kb DNA ladder; Lane 9: Recombinant pRI201-AN vector without enzymatic digestion; Lanes 10 and 11: Recombinant pRI201-AN vector digested with *SalI* and *NdeI* restriction enzymes showing the presence of the *SoBADH* gene fragment.

انتقال ناقل pRI-*SoBADH* به *Agrobacterium tumefaciens*

بعد از آماده شدن ناقل pRI201-AN دارای ژن *SoBADH*، با استفاده از روش انجماد و ذوب، ناقل نوترکیب به *Agrobacterium tumefaciens* مستعد شده انتقال داده شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *SoBADH*، واکنش کلونی PCR انجام شد (شکل ۴). حضور قطعه ۱۶۶۸ bp نشان‌دهنده نوترکیب بودن آگروباکتریوم‌ها بود که از این باکتری‌ها برای تراریختی گیاهان استفاده شد.



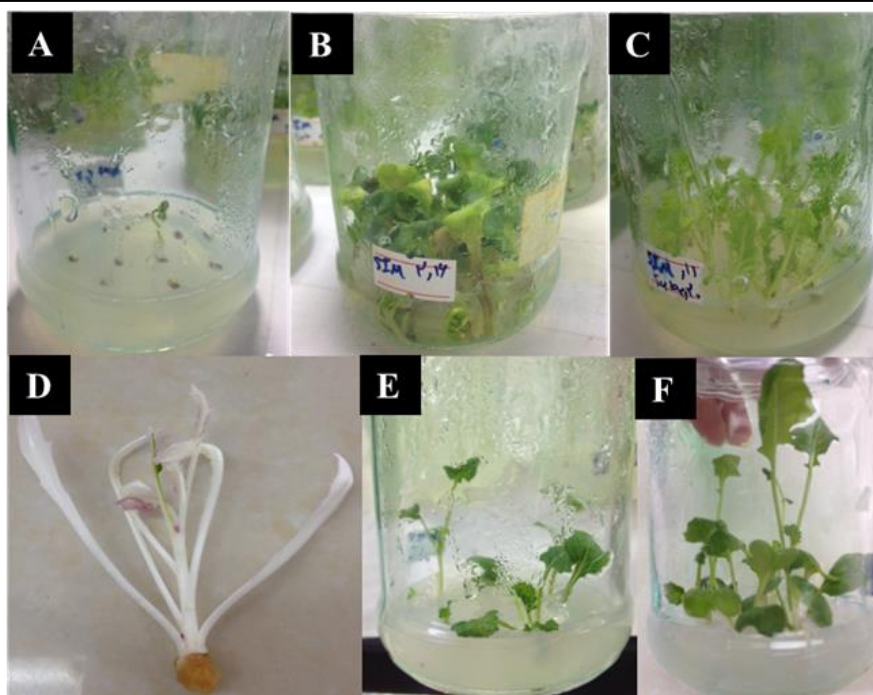
شکل ۴- تأیید حضور ناقل pRI201-AN حاوی ژن *SoBADH* در آگروباکتریوم تومفاشینس. چاهک‌های ۱ تا ۴: آگروباکتریوم دارای پلاسمید *pRI-SoBADH*، چاهک ۵: کنترل منفی (آگروباکتریوم تومفاشینس فاقد ناقل نوترکیب)، چاهک ۶: کنترل مثبت (ناقل *pUC57* دارای ژن *SoBADH*)، چاهک ۷: نشانگر مولکولی ۱۰ kb.

Figure 4. Confirmation of pRI201-AN-*SoBADH* in *Agrobacterium tumefaciens*. Lanes 1-4: *Agrobacterium* harboring pRI-*SoBADH*; Lane 5: Negative control (*A. tumefaciens* without vector); Lane 6: Positive control (pUC57-*SoBADH*); Lane 7: 10 kb marker.

تراریزش و انتخاب گیاهان تراریخت شده

بذرهای سترون شده کلزا (*Brassica napus* L.) در محیط جوانه‌زنی حاوی محیط پایه MS بدون هورمون به مدت یک هفته کشت داده شدند (شکل ۵A). از بین جداکشت‌های برگ لپه‌ای حاصل از گیاهچه‌های ۵، ۷ و ۱۵ روزه، بهترین درصد باززایی از جداکشت‌های ۷ روزه با ۷۳٪ تولید شاخه باززایی شده به دست آمد. از اینرو، از برگ‌های لپه‌ای یک هفته‌ای جهت تلقیح با *Agrobacterium tumefaciens* دارای پلاسمید *pRI-SoBADH* استفاده شد (شکل ۵B). بعد از آغشتگی انتهای دمبرگ با سوسپانسیون سلولی آگروباکتریوم با رقت‌های مختلف، مشخص گردید رقت‌های ۱:۲ میزان انتقال ژن ضعیف بوده و غلظت ۲:۱ میزان آلودگی محیط با آگروباکتریوم بسیار زیاد بوده و با غلظت‌های معمول آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم قابل کنترل نبوده و باعث حذف جداکشت‌های آلوده می‌شدند. از اینرو، از سوسپانسیون سلولی با نسبت ۱:۱ محیط آغشتگی به جای محیط LB به مدت ۶۰ ثانیه تلقیح، استفاده شد. جداکشت‌های آغشته شده با آگروباکتریوم به مدت ۴۸ ساعت در محیط هم‌کشتی جامد در تاریکی قرار گرفتند. پس از طی زمان لازم، نمونه‌ها به محیط القای شاخه دارای سفوتاکسیم و کانامایسین انتقال داده شدند (شکل ۵C). گیاهان باززایی شده تراریخت با دریافت ساختار ژنی حاوی ژن *NPTII* توانستند نسبت به عامل انتخاب کانامایسین مقاومت نشان داده و سبز رنگ باقی بمانند، در حالی که شاخه‌های غیرتراریخت به دلیل عدم تحمل نسبت به کانامایسین، کلروپلاست‌های خود را از دست داده به رنگ سفید یا ارغوانی درآمده و پس از مدتی حذف شدند (شکل ۵D).

شاخه‌های سبز مقاوم به کانامایسین به محیط بلوغ شاخه با غلظت بیشتر کانامایسین منتقل شدند تا در صورت فرار شاخه‌های غیرتراریخت در این مرحله حذف گردند (شکل ۵E). پس از رشد و توسعه شاخه‌ها، نمونه‌ها به محیط القای ریشه غنی شده با سفوتاکسیم و کانامایسین واکشت شدند. در محیط ریشه‌زایی حاوی کانامایسین، فقط شاخه‌هایی قادر به تولید ریشه بودند که دارای ژن مقاومت به کانامایسین باشند و در این مرحله نیز نوعی انتخاب برای دستیابی به گیاهان تراریخت صورت گرفت و گیاهان تراریخت شده توانستند تولید ریشه نمایند (شکل ۵F).

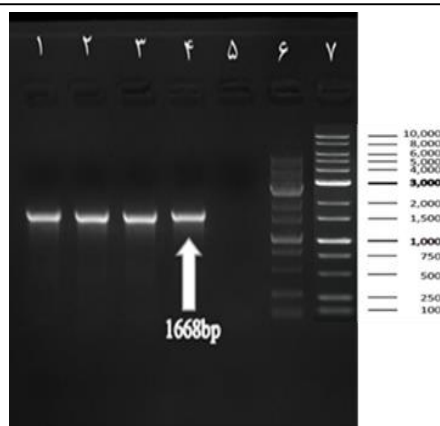


شکل ۵- مراحل تشکیل گیاه تراریخت. (A) بذره‌های کشت شده در محیط جوانه‌زنی، (B) جداکشت‌های برگ لپه‌ای هفت روزه تلقیح شده با سوسپانسیون آگروباکتریوم در محیط القای شاخه، (C) شاخه‌های سبز مقاوم به کانامایسین واکشت شده به محیط القای شاخه انتخابی، (D) شاخه‌های غیرتراریخت سفید شده در حضور کانامایسین، (E) شاخه‌های سبز مقاوم به کانامایسین در محیط بلوغ شاخه، (F) گیاهان سبز باززایی شده مقاوم به کانامایسین در محیط ریشه‌زایی

Figure 5. Transgenic plant growth stages. **A)** Seeds on germination medium; **B)** 7-day-old cotyledon explants inoculated with *Agrobacterium* on shoot induction medium; **C)** Green kanamycin-resistant shoots on selective shoot induction medium; **D)** Bleached non-transgenic shoots under kanamycin selection; **E)** Green kanamycin-resistant shoots on shoot maturation medium; **F)** Green regenerated kanamycin-resistant plants on root induction medium.

تأیید حضور ژن *SoBADH* در گیاهان تراریخت

استخراج DNA ژنومی از گیاهان سبز مقاوم به کانامایسین در محیط انتخابگر انجام شد. برای تأیید انتقال موفق ژن *SoBADH* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این ژن، واکنش PCR انجام شد. حضور باند ۱۶۶۸ bp در ژنوم گیاهان سبز مقاوم به کانامایسین نشان‌دهنده موفقیت در انتقال ژن *SoBADH* در گیاهان تراریخت شده بود (شکل ۶).

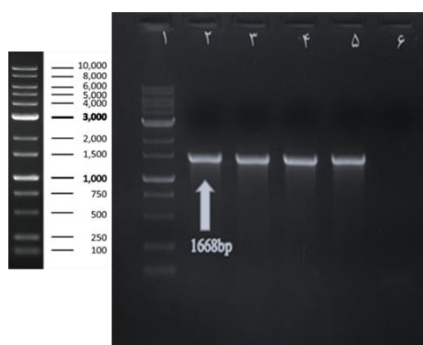


شکل ۶ - تأیید انتقال ژن *SoBADH* در گیاهان تراریخت شده توسط واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *SoBADH*. چاهک‌های ۱ تا ۳: حضور قطعه ژن ۱۶۶۸ bp نشان‌دهنده تراریخت بودن گیاهان سبز مقاوم به کانامایسین است. چاهک ۴: کنترل مثبت (ناقل pUC حاوی ژن *SoBADH*), چاهک ۵: کنترل منفی (گیاه کلزای غیرتراریخت), چاهک ۶: نشانگر وزن مولکولی ۱۰ kb.

Figure 6. Confirmation of *SoBADH* gene transfer in transgenic plants by PCR using *SoBADH*-specific primers. Lanes 1–3: amplification of the expected 1668 bp fragment, indicating the transgenic nature of the kanamycin-resistant green plants. Lane 4: positive control (pUC vector containing the *SoBADH* gene). Lane 5: negative control (non-transgenic *Brassica napus* plant). Lane 6: 10 kb molecular weight marker.

بررسی بیان ژن در گیاهان تراریخت

به منظور حصول اطمینان از بیان موفق ژن *SoBADH* در گیاهان تراریخت سبز مقاوم به کانامایسین، واکنش RT-PCR انجام شد. برای این کار، ابتدا استخراج RNA از گیاهان تراریخت شده انجام شد، سپس با استفاده از آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، رونویسی معکوس RNA با oligo dT و پرایمر اختصاصی ژن *SoBADH* انجام شد. cDNA آماده شده رقیق‌سازی شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. واکنش PCR با cDNA ساخته شده، برای بررسی وجود ژن *SoBADH* انجام شد (شکل ۷). ظهور باند ۱۶۶۸ bp بیانگر وجود mRNA ژن *SoBADH* در گیاهان تراریخت بود که نشان‌دهنده بیان موفق تراژن در این گیاهان می‌باشد.

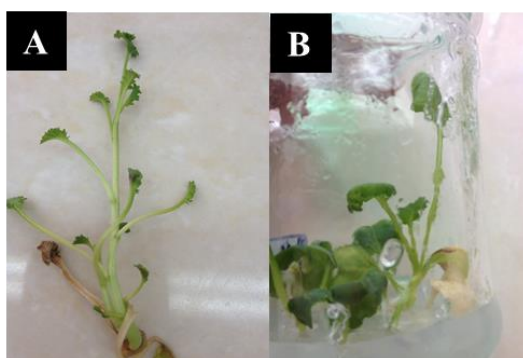


شکل ۷ - بررسی بیان ژن *SoBADH* با استفاده از تکنیک RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *SoBADH*. چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱۰ kb، چاهک ۲: کنترل مثبت (ناقل pUC حاوی ژن)، چاهک‌های ۳، ۴ و ۵: حضور باند ۱۶۶۸ bp در گیاهان سبز مقاوم نشان‌دهنده بیان ژن *SoBADH* در گیاهان تراریخت شده می‌باشد. چاهک ۶: کنترل منفی (گیاه کلزای شاهد غیرتراریخت).

Figure 7. Analysis of *SoBADH* expression by RT-PCR with specific primers. Lane 1: 10 kb marker; Lane 2: Positive control (pUC-*SoBADH*); Lanes 3-5: 1668 bp band in green resistant plants confirming *SoBADH* expression in transgenics; Lane 6: Negative control (non-transgenic canola).

سنجش میزان گلیسین‌بتائین در گیاه تراریخت تحت تنش اسمزی

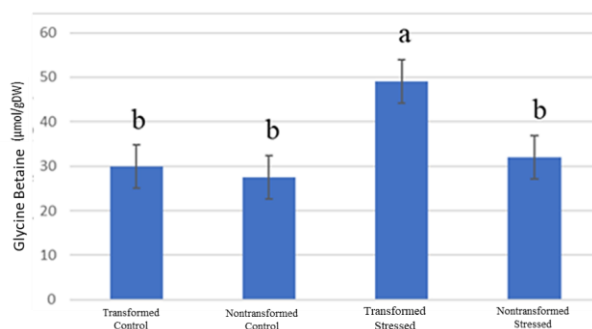
از آنجایی که هدف از انتقال ژن *SoBADH* به گیاه کلزا، ایجاد تحمل به تنش‌های اسمزی بود، اقدام به ارزیابی گیاهان تراریخت در شرایط تنش اسمزی در شرایط *in vitro* گردید. برای این منظور، از پلی‌آنیون پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) در محیط کشت بازاریابی شاخه استفاده شد. شاخه‌هایی از هر دو گیاه تیپ وحشی غیرتراریخت و تراریخت شده با ژن *SoBADH* برداشت شدند و در دو محیط فاقد PEG به عنوان شاهد و غلظت ۲۰ درصد PEG6000 که باعث ایجاد فشار اسمزی ۰/۷ مگاپاسکال می‌گردید، به عنوان محیط تنش اسمزی کشت شدند. پس از ۲۱ روز، میزان گلیسین‌بتائین در هر چهار گروه مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۸- مقایسه گیاهان کلزا در شرایط تنش اسمزی ۰/۷ مگاپاسکال. (A) شاخه تیپ وحشی غیرتراریخت، (B) شاخه تراریخت شده با ژن *SoBADH* که با توسعه برگ‌های بیشتر و رنگ سبزتر، تحمل بیشتری به شرایط تنش اسمزی نشان داده است.

Figure 8. Comparison of canola plants under osmotic stress conditions of -0.7 MPa. **A)** Non-transgenic wild-type shoot; **B)** Transgenic shoot harboring the *SoBADH* gene showing greater leaf development and greener color, indicating enhanced tolerance to osmotic stress conditions.

نتایج حاکی از تحمل بیشتر گیاهان تراریخت شده با ژن *SoBADH* با توسعه برگ‌های بیشتر و رنگ سبزتر بود (شکل ۸). در این گیاهان، افزایش ۶۰ درصدی میزان گلیسین‌بتائین نسبت به گیاهان شاهد در شرایط عادی و تحت تنش اسمزی مشاهده شد (نمودار ۱) که نشانگر بیان موفق تراژن *SoBADH* و افزایش سطح گلیسین‌بتائین در گیاهان تراریخت شده بود.



نمودار ۱- بررسی میزان گلیسین‌بتائین در گیاهان کلزای تیپ وحشی غیرتراریخت و تراریخت شده با ژن *SoBADH* در شرایط شاهد و تنش اسمزی ۰/۷ مگاپاسکال.

Graph 1. Analysis of glycine betaine content in non-transgenic wild-type canola plants and transgenic canola plants harboring the *SoBADH* gene under control conditions and osmotic stress of -0.7 MPa.

بحث

همسانه سازی ژن *SoBADH* و تراریختی گیاهان

در این تحقیق، ژن *SoBADH* استخراج شده از اسفناج با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* حاوی ناقل بیانی pRI201-AN به گیاه کلزا منتقل شد. نتایج نشان داد که استفاده از ریزنمونه‌های کوتیلدونی (برگ‌لپه‌ای) ۷ روزه با ۷۳ درصد باززایی، بالاترین کارایی را داشت. این یافته با گزارش‌های پیشین همخوانی دارد که نشان داده‌اند ریزنمونه‌های کوتیلدونی کلزا به دلیل وجود سلول‌های مریستمی در ناحیه دم‌برگ، پتانسیل باززایی بالاتری نسبت به ریزنمونه‌های هیپوکوتیل دارند (Jonoubi et al., 2005).

بهینه‌سازی غلظت باکتری (نسبت ۱:۱) و زمان آغشتگی (۶۰ ثانیه) در این پژوهش، تعادل مناسبی بین کارایی تراریختی و کنترل آلودگی ایجاد کرد. غلظت‌های بالای باکتری (نسبت ۲:۱) علی‌رغم افزایش احتمال تراریختی، کنترل آلودگی را با غلظت‌های معمول آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم غیرممکن می‌کرد. این مشاهدات با اصول شناخته شده در تراریختی به واسطه اگروباکتريوم مطابقت دارد (Imani and Kogel, 2020).

حضور باند ۱۶۶۸ bp در آزمون PCR ژنومی و همچنین ظهور همین باند در آزمون RT-PCR، به ترتیب نشان‌دهنده تلفیق موفق ژن *SoBADH* در ژنوم گیاه کلزا و بیان موفق آن در سطح RNA بود. گیاهان تراریخت توانستند در حضور آنتی‌بیوتیک کانامایسین (عامل انتخابگر مبتنی بر ژن *NPTII*) سبز باقی بمانند، در حالی که شاخه‌های غیرتراریخت سفید یا ارغوانی شده و حذف شدند. این الگوی گزینش نشان‌دهنده کارایی بالای نشانگر انتخابی در جداسازی رویدادهای تراریختی واقعی بود (Jonoubi et al., 2005).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بیان موفق ژن *BADH* در گیاهان تراریخت، پیش‌نیاز اصلی برای افزایش سطح گلیسین‌بتائین و متعاقباً بهبود تحمل به تنش است (Chen et al., 2025; Basit et al., 2025). یافته‌های ما در سطح RNA تأیید کرد که سازه ژنی به کار رفته، عملکرد مناسبی در سیستم بیانی گیاه کلزا داشته است.

افزایش تحمل به تنش اسمزی و تجمع گلیسین‌بتائین

ارزیابی گیاهان تراریخت در شرایط تنش اسمزی القا شده توسط PEG6000 با فشار اسمزی ۰/۷ مگاپاسکال نشان داد که گیاهان کلزای تراریخت حاوی ژن *SoBADH* در مقایسه با گیاهان تیپ وحشی، توسعه برگ‌ی بیشتر، رنگ سبزتر و میزان تحمل بالاتری از خود نشان دادند. سنجش کمی گلیسین‌بتائین حاکی از افزایش ۶۰ درصدی این متابولیت در گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان شاهد، هم در شرایط عادی و هم در شرایط تنش بود. این نتایج با مکانیسم‌های شناخته شده حفاظتی گلیسین‌بتائین همسو است. گلیسین‌بتائین به عنوان یک اسمولیت سازگار، با حفظ فشار تورژسانس سلول‌ها، تثبیت کمپلکس فتوسیستم II و حفاظت از غشاها و آنزیم‌های کلیدی مانند روبیسکو، از سلول در برابر آسیب‌های ناشی از تنش اسمزی محافظت می‌کند (Ali et al., 2020; Rosas-Rodríguez and Valenzuela-Soto, 2021; Basit et al., 2025).

در گزارش Jin و همکاران (۲۰۲۴) با جداسازی ژن *SgBADH* از گیاه شورپسند *Suaeda glauca* و انتقال آن به گیاه *Arabidopsis thaliana* نشان داده شده است که گیاهان تراریخت افزایش معنی‌داری در تجمع گلیسین‌بتائین و کاهش مالون‌دی‌آلدئید تحت تنش خشکی داشتند. این یافته با نتایج ما همخوانی دارد، اگرچه منبع ژنی (اسفناج در مقابل *S. glauca*) و گیاه هدف (کلزا در مقابل آرابیدوپسیس) متفاوت بود. همچنین Qu و همکاران (۲۰۲۳) با انتقال ژن *HuBADH* از کاکتوس میوه‌ای (*Hylocereus undatus*) به *Arabidopsis thaliana* گزارش کردند که گیاهان تراریخت افزایش ۳۶-۳۲ درصدی گلیسین‌بتائین در شرایط عادی و افزایش ۸۰-۷۰ درصدی تحت تنش شوری نشان دادند. افزایش ۶۰ درصدی مشاهده شده در مطالعه ما در محدوده این یافته‌ها قرار دارد. در گزارش Yu و همکاران در سال (۲۰۲۳) با انتقال ژن *AhBADH* از *Atriplex*

hortensis به سویا و انجام آزمایشات مزرعه‌ای، افزایش معنی‌دار تحمل به شوری (تا ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl) و وراثت پایدار تراژن در نسل‌های بعدی به اثبات رسیده است. این مطالعه ارزش کاربردی تراریختی با ژن‌های *BADH* در شرایط مزرعه را تأیید کرده است. Makari Deligani و همکاران (۲۰۲۵) در مطالعه هم‌تراریختی گردوی ایرانی با ژن‌های *Fld* و *BADH* نشان دادند که گیاهان تراریخت سطوح بالاتری از گلیسین‌بتائین و پرولین را در شرایط تنش اسمزی ناشی از PEG انباشته کردند. این یافته مستقیماً با نتایج ما قابل مقایسه است و نشان می‌دهد که افزایش گلیسین‌بتائین یک پاسخ مشترک در گونه‌های مختلف گیاهی به تنش اسمزی است. همچنین Wei و همکاران (۲۰۲۶) با انتقال ژن *BvBADH1* از چغندر قند به توتون، افزایش گلیسین‌بتائین و تجمع پرولین را گزارش کردند که با یافته‌های ما همسو است.

مشاهده توسعه برگی بیشتر و حفظ رنگ سبز در گیاهان تراریخت کلزا تحت تنش اسمزی، نشان‌دهنده نقش حفاظتی گلیسین‌بتائین بر دستگاه فتوسنتزی است. مرور جامع Chen و همکاران (۲۰۲۵) و Basit و همکاران (۲۰۲۵) نشان می‌دهند که گلیسین‌بتائین با تثبیت کمپلکس فتواکسیداسیون آب که منجر به جداسازی اکسیژن می‌گردد و همچنین تسهیل در ترمیم پروتئین D1، از تخریب فتوسنتز در شرایط تنش‌های اسمزی جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، گلیسین‌بتائین با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، گونه‌های فعال اکسیژن را خنثی کرده و از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی جلوگیری می‌نماید (Chen et al., 2025; Basit et al., 2025). مطالعه Zhou و همکاران (۲۰۲۵) نشان داد که افزایش بیان ژن *CsBADH* در گیاه چای (*Camellia sinensis*) منجر به افزایش ۱/۵ تا ۲/۴ برابری گلیسین‌بتائین و افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) در شرایط تنش سرما شد. این یافته نشان می‌دهد که نقش حفاظتی گلیسین‌بتائین محدود به تنش اسمزی نبوده و در تنش‌های دمایی نیز عمل می‌کند. Ming و همکاران (۲۰۲۴) با شناسایی فاکتور رونویسی *PtrPAT1* در *Poncirus trifoliata* نشان دادند که این فاکتور با تنظیم بیان ژن شبه *BADH*، محتوای گلیسین‌بتائین را تعدیل می‌کند. گیاهان تراریخت دارای افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (POD و SOD) و کاهش ROS بودند. این یافته نشان داد که افزایش گلیسین‌بتائین نه تنها از طریق انتقال مستقیم ژن *BADH*، بلکه از طریق تنظیم رونویسی نیز قابل دستیابی است. همچنین Degtyarenko و همکاران (۲۰۲۵) نشان دادند که تجمع- β آلانین بتائین در گیاهان تراریخت توتون، سطوح مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن را کاهش و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را افزایش می‌دهد. این یافته‌ها تأیید می‌کند که بتائین‌ها از طریق مکانیسم‌های حفاظتی چندگانه، به ویژه کاهش استرس اکسیداتیو، از سلول گیاهی محافظت می‌کنند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، سازه ژنی حاوی ژن *SoBADH* اسفناج با موفقیت در ناقل بیانی pRI201-AN ساخته شد و از طریق *Agrobacterium tumefaciens* به گیاه کلزا منتقل گردید. حضور و بیان تراژن در گیاهان تراریخت به ترتیب با آزمون‌های PCR و RT-PCR تأیید شد. گیاهان تراریخت حاصل، افزایش ۶۰ درصدی در سطح گلیسین‌بتائین در مقایسه با گیاهان شاهد نشان دادند. این یافته‌ها با مجموعه وسیعی از گزارش‌های پیشین همسو است که نشان می‌دهند صرف نظر از منبع ژنی (*SoBADH* یا *HuBADH*، *AhBADH*، *SgBADH*) و گیاه هدف (کلزا، سویا، آرابیدوپسیس، گردو یا توتون)، افزایش بیان *BADH* منجر به افزایش تجمع گلیسین‌بتائین می‌شود. این امر نشان‌دهنده قابلیت اطمینان بالای این استراتژی مهندسی ژنتیک است. با توجه به نیاز روزافزون به تولید مواد غذایی برای جمعیت رو به افزایش، دورنمای آینده شامل ارزیابی عملکرد لاین‌های تراریخت در شرایط مزرعه، بررسی وراثت پایدار تراژن در نسل‌های بعدی و هم‌تراریختی با ژن‌های مکمل دیگر می‌باشد. رویکرد ارائه شده در این پژوهش می‌تواند گامی مؤثر در جهت توسعه ارقام کلزا با تحمل بهبود یافته به تنش‌های خشکی و شوری و کاهش خسارات ناشی از تغییر اقلیم محسوب شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی و نوآوری دانشگاه خوارزمی و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ایران انجام پذیرفته است که بدین وسیله از آنها قدردانی می‌گردد. از *Perplexity AI* برای اصلاح خلاصه انگلیسی و منابع استفاده شده است.

ملاحظات اخلاقی

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول: استاد راهنمای رساله، طراحی پژوهش، نظارت بر مراحل انجام پژوهش، بررسی و کنترل نتایج، اصلاح، تهیه پیشنویس مقاله، بازبینی و نهایی‌سازی مقاله
نویسنده دوم: استاد مشاور رساله، مشارکت در طراحی پژوهش، نظارت بر پژوهش، مطالعه و بازبینی مقاله
نویسنده سوم: دانشجوی دکتری، تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها، انجام آزمایش و گردآوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، تحلیل و تفسیر اطلاعات و نتایج
نویسنده چهارم: کارشناس بیوتکنولوژی، مشارکت در تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها و انجام آزمایش

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

حامی مالی

حمایت مالی از این پژوهش از طرف دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی در قالب پژوهانه رساله دکتری دانشجویی نویسنده سوم و همچنین پژوهانه سایر نویسندگان انجام شده است.

منابع

- AbuQamar SF, El-Saadony MT, Saad AM, Desoky ES, Elrys AS, Abd El-Mageed TA, Semida WM, Abdelkhalik A, Mosa WF, Al Kafaas SS, Naser S. Halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria improve soil fertility and plant salinity tolerance for sustainable agriculture—A review. *Plant Stress*. 2024;12:100482. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100482>
- Ali S, Abbas Z, Seleiman MF, Rizwan M, Yavaş İ, Alhammad BA, Shami A, Hasanuzzaman M, Kalderis D. Glycine betaine accumulation, significance and interests for heavy metal tolerance in plants. *Plants*. 2020;9:896. <https://doi.org/10.3390/plants9070896>
- Basit F, Alyafei M, Hayat F, Al-Zayadneh W, El-Keblawy A, Sulieman S, Sheteiwy MS. Deciphering the role of glycine betaine in enhancing plant performance and defense mechanisms against environmental stresses. *Frontiers in Plant Science*, 2025;16:1582332. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1582332>
- Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1951; 62 (3):293–300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
- Chen J, Zhang J, Liu Y, Zhang K, Zhu F, Xie Y. Advances in the biosynthetic regulation and functional mechanisms of glycine betaine for enhancing plant stress resilience. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26(16):7971. <https://doi.org/10.3390/ijms26167971>
- Degtyarenko A, Grigorchuk V, Sorokina M, Yugay Y, Fialko A, Grishchenko O, Vasyutkina E, Kudinova O, Tsydeneshieva Z, Bulgakov V, Shkryl Y. Expression of the *LIBANMT* gene from sea lavender leads to the accumulation of β -alanine betaine and enhanced stress resilience in transgenic tobacco

- plants. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2025;44:2073-92. <https://doi.org/10.1007/s00344-024-11526-1>
- Golestan Hashemi FS, Ismail MR, Rafii MY, Aslani F. Critical multifunctional role of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2018;32, 815–829. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1478748>
- Grieve CM, Grattan SR. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*. 1983;70(2):303-7 <https://doi.org/10.1007/BF02374789>
- Imani J, Kogel KH. Plant transformation techniques: *Agrobacterium*- and microparticle-mediated gene transfer in cereal plants. In: *Biolistic DNA delivery in plants*. Springer; 2020; 281-94. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_15
- Jia R, Yu L, Chen J, Hu L, Cao S, Ma Q, Shen X, Wang Y. Comprehensive analysis of *Brassica napus* aldehyde dehydrogenase superfamily genes and demonstration of BnALDH7B2 in clubroot resistance. *Industrial Crops and Products*. 2024; 213, 118431. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118431>
- Jiang Y, Zhu S, Yuan J, Chen G, Lu G. A betaine aldehyde dehydrogenase gene in quinoa (*Chenopodium quinoa*): structure, phylogeny, and expression pattern. *Genes Genom*. 2016; 38, 1013–1020. <https://doi.org/10.1007/s13258-016-0445-z>
- Jin H, Tang M, Zhu L, Yu X, Yang Q, Fu X. Characterization of a drought-induced betaine aldehyde dehydrogenase gene *SgBADH* from *Suaeda glauca*. *Plants*. 2024;13(19):2716. <https://doi.org/10.3390/plants13192716>
- Jin T, Wu C, Huang Z, Zhang X, Li S, Ding C, Long W. The Aldehyde Dehydrogenase Superfamily in *Brassica napus* L.: Genome-Wide Identification and Expression Analysis Under Low-Temperature Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025;6;26(5):2373. <https://doi.org/10.3390/ijms26052373>
- Jonoubi P, Majd A, Mousavi A, Daneshian J. Regeneration of thidiazuron-induced shoots and gene transformation of rapeseed by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Basic Sciences Kharazmi University*. 2004a;3(1-2):37-48. (In Persian)
- Jonoubi P, Mousavi A, Majd A, Daneshian J. Improved *Brassica napus* L. regeneration from hypocotyls using thidiazuron and benzyladenine as cytokinin sources. *Pakistan Journal of Botany*. 2004b;36(20):321-9.
- Jonoubi P, Mousavi A, Sheikhan R, Salmanian AH. Transformation of rapeseed (*Brassica napus*) by 5-enol pyruvyl shikimate-3-phosphate synthase (*EPSPS*) with *Arabidopsis* origin for production of glyphosate resistance plants. *Journal of Plant Biological Sciences*. 2007;35(6). (In Persian)
- Jonoubi P, Mousavi A, Majd A, Jalali Javaran M, Daneshian J. Efficient regeneration of *Brassica napus* L. hypocotyls and genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biologia Plantarum*. 2005;49(2):308-20.
- Khalatbari A, Shirani Rad A, Valadabady SA, Sayfzadeh S, Zakerin H. Yield components and fatty acids variation of canola cultivars under different irrigation regimes and planting dates. *Gesunde Pflanzen*. 2021;73(1):17-27. <https://doi.org/10.1007/s10343-021-00585-z>
- Makari Deligani Z, Tohidfar M, Arab MM, Makari Deligani M, Vahdati K. Co-transformation of Persian walnut somatic embryos with *Fld* and *BADH* genes for enhanced drought and salinity tolerance. *Plant Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2025;162:24. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-6474181/v1>

- Ming R, Fang T, Ling W, Geng J, Qu J, Zhang Y, Chen J, Yao S, Li L, Huang D, Liu JH. The GRAS transcription factor PtrPAT1 of *Poncirus trifoliata* functions in cold tolerance and modulates glycine betaine content by regulating the *BADH*-like gene. *Horticulture Research*. 2024;12(1):uhae296. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae296>
- Michel BE, Kaufmann MR. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*. 1973;51(5):914-6. <https://doi.org/10.1104/pp.51.5.914>
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15:473-97. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Niazian M, Sadat-Noori SA, Tohidfar M, Galuszka P, Mortazavian SM. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of ajowan (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague): an important industrial medicinal plant. *Industrial Crops and Products*. 2019;132, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.005>
- Ozturk M, Turkyilmaz Unal B, García-Caparrós P, Khursheed A, Gul A, Hasanuzzaman M. Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia Plantarum*. 2021; 172(2):1321-1335. <https://doi.org/10.1111/ppl.13297>
- Qu Y, Bian Z, Teixeira da Silva JA, Nong Q, Qu W, Ma G. A cloned gene HuBADH from *Hylocereus undatus* enhanced salt stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Frontiers in Bioscience* (Landmark Ed). 2023;28(4):78. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2804078>
- Rosas-Rodríguez JA, Valenzuela-Soto EM. The glycine betaine role in neurodegenerative, cardiovascular, hepatic, and renal diseases: Insights into disease and dysfunction networks. *Life Sciences*. 2021;119943. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119943>
- Safavi Fard N, Shirani Rad AH, Daneshian J, Shahsavari N, Ghaffari M. Response of canola cultivars and hybrids to winter cultivation under late season drought stress. *Journal of Agricultural Sciences and Sustainable Production*. 2020;30:185-98. (In Persian)
- Sambrook J, Russell D. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 2001.
- Selvaraj G, Jain RK, Olson DJ, Hirji R, Jana S, Hogge LR. Glycinebetaine in oilseed rape and flax leaves: Detection by liquid chromatography/continuous flow secondary ion-mass spectrometry. *Phytochemistry*. 1995;38(5):1143-6. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00758-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00758-L)
- Tiwari M, Gautam N, Indoliya Y, Kidwai M, Mishra AK, Chakrabarty D. A tau class GST, OsGSTU5, interacts with VirE2 and modulates the *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Plant Cell Reports*. 2022;1-19. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02824-z>
- Wei M, Chen XY, Li ML, et al. Expression of Beta vulgaris betaine aldehyde dehydrogenase 1 (BvBADH1) confers salt tolerance in tobacco (*Nicotiana benthamiana*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2026;32(1):1-12. <https://doi.org/10.1007/s12298-025-01691-2>
- Yamada N, Takahashi H, Kitou K, Sahashi K, Tamagake H, Tanaka Y, Takabe T. Suppressed expression of choline monooxygenase in sugar beet on the accumulation of glycine betaine. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2015; 96,217-221. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.06.014>
- Yu Z, Niu L, Cai Q, Wei J, Shang L, Yang X, Ma R. Improved salt-tolerance of transgenic soybean by stable over-expression of *AhBADH* gene from *Atriplex hortensis*. *Plant Cell Reports*. 2023;42(8):1291-310. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-03031-8>
- Zhang T, Li Z, Li D, Li C, Wei D, Li S. Comparative effects of glycinebetaine on the thermotolerance in codA-and BADH-transgenic tomato plants under high temperature stress. *Plant Cell Report*. 2020;39, 1525–1538. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02581-5>

Zhou Y, Guo L, Chen Z, Wang P, Zhang X, Zhao L. Enhancement of cold tolerance in tea plants (*Camellia sinensis*) by glycine betaine accumulation through *CsBADH* overexpression. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2025;219:109454. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.109454>