

Optimization of *in vitro* culture and transformation of betaine aldehyde dehydrogenase gene (BADH) into *Solanum lycopersicum* to produce of drought stress tolerant plant

Parisa Jonoubi^{1*} , Tahmineh Lohrasebi², Roya Soltani¹, Diana Daneshian³

1. Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

2. Department of Plant Bioproducts, Institute of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

3. Central Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Correspondence:

Parisa Jonoubi

Email: jonoubi@khu.ac.ir

Received: 2, Sep. 2025

Accepted: 25, May 2026

How to cite:

Jonoubi, P., Lohrasebi, T., Soltani, R., & Daneshian, D. (2026). Optimization of *in vitro* culture and transformation of betaine aldehyde dehydrogenase gene (BADH) into *Solanum lycopersicum* to produce of drought stress tolerant plant. *Crop Biotechnology*, 15 (3), 31-46. (DOI: [10.30473/cb.2026.75643.2015](https://doi.org/10.30473/cb.2026.75643.2015))

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.), a major crop of the *Solanaceae* family, is highly sensitive to environmental stresses, particularly drought and osmotic imbalances. Enhancing stress tolerance through genetic transformation represents a promising approach to ensure sustainable production. In this study, two tomato cultivars, CH and Rio Grande, were investigated for optimization of *in vitro* regeneration conditions and subsequent introduction of the betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) gene from spinach, which is involved in the biosynthesis of glycine betaine, a known osmoprotectant.

To establish reliable *in vitro* protocols, cotyledonary and hypocotyl explants from 10-day-old seedlings were cultured on media supplemented with different concentrations of benzyl adenine (BA) and indole acetic acid (IAA). In cultivar CH, cotyledon explants exhibited the highest regeneration frequency (96.26%) and hypocotyl explants 92.53% when cultured on 3 mg l⁻¹ BA with 0.1 mg l⁻¹ IAA. In Rio Grande, the best regeneration rates were recorded at 73.0% for cotyledon explants on 2.5 mg l⁻¹ BA + 0.1 mg l⁻¹ IAA, and 66.6% for hypocotyl explants on 3 mg l⁻¹ BA. Across all treatments, cotyledons consistently produced more shoots than hypocotyls. For shoot development, regenerated shoots were transferred to media containing different concentrations of gibberellic acid (GA₃) combined with IAA. Increasing GA₃ concentrations enhanced shoot multiplication in both cultivars, with cotyledon-derived shoots significantly outperforming those derived from hypocotyls. The most effective medium contained 3 mg l⁻¹ GA₃ with 0.1 mg l⁻¹ IAA, producing an average of 6.67 shoots per cotyledon explant in CH and 6.33 in Rio Grande. For transformation, *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) carrying the expression vector pRI201-AN harboring the BADH gene was employed. Hypocotyl explants were infected for 30 seconds, followed by co-cultivation in darkness at 28°C for 48 hours in the presence of 40 mg l⁻¹ acetosyringone. The green plants resistant to 15 mg/L kanamycin were regenerated in the shoot induction medium and then subcultured. This condition provided the highest transformation efficiency, whereas deviations resulted in bacterial overgrowth or reduced transformation. To control bacterial proliferation during regeneration, 250 mg l⁻¹ cefotaxime and 250 mg l⁻¹ vancomycin were incorporated, while selection for transgenic tissues was achieved on kanamycin-containing medium (15 mg l⁻¹). Interestingly, in transformed cultures, hypocotyl explants showed higher regeneration rates than cotyledons, a reversal from patterns observed in the non-transformed state. Putative transgenic shoots were confirmed molecularly using PCR, which consistently amplified a 1668 bp product corresponding to the BADH transgene in kanamycin-resistant plants, while absent in non-transformed controls. Functional evaluation of osmotic stress tolerance was conducted using mannitol-induced osmotic stress. Non-transformed controls exhibited chlorosis, dwarfing, and eventual mortality at -6 bar osmotic pressure. By contrast, BADH-expressing plants from both cultivars survived and maintained growth under this condition, confirming enhanced osmotic adjustment. Overall, these results demonstrate that optimization of regeneration protocols and successful transfer of the spinach BADH gene conferred improved tolerance of tomato plants to osmotic stress. This study highlights BADH as a valuable candidate gene for molecular breeding of stress-resilient tomato cultivars.

KEYWORDS

Agrobacterium, glycine betaine, *In vitro* regeneration, Osmotic stress.



«مقاله پژوهشی»

توسعه سامانه کشت در شیشه و بهبود تحمل به خشکی در گوجه فرنگی از طریق انتقال ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز (BADH)

پریسا جنوبی^{۱*}، تهمینه لهراسی^۲، رویا سلطانی^۱، دینا دانشیان^۳

چکیده

گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) از خانواده Solanaceae یکی از محصولات مهم زراعی است که به دلیل حساسیت بالا به تنش های زیستی و غیرزیستی، به ویژه خشکی، نیازمند به کارگیری رویکردهای نوین اصلاحی می باشد. در این پژوهش ژن BADH که درگیر در مسیر سنتز گلايسين بتائين می باشد، از اسفناج جداسازی و به رقم های CH و Rio Grande گوجه فرنگی منتقل شد. به منظور بهینه سازی شاخه زایی، جداکشت های کوتیلدونی و هیپوکوتیل در تیمارهای هورمونی مختلف ارزیابی شدند. بیشترین درصد باززایی در محیط حاوی ۳ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IAA حاصل شد، به طوری که در رقم CH به ترتیب ۹۲/۵۳ درصد و ۹۶/۲۶ درصد و در Rio Grande به ترتیب ۷۰/۳۰ درصد و ۶۶/۶۰ درصد باززایی مشاهده گردید. همچنین بهترین رشد شاخه ها در محیط حاوی ۳ میلی گرم بر لیتر GA₃ همراه با ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IAA بود. برای انجام فرایند تراریختی، هیپوکوتیل ها با *Agrobacterium tumefaciens* حامل وکتور pRI201-AN حاوی ژن BADH و ۴۰ میلی گرم بر لیتر استوسیرینگون، به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی تیمار شدند. گیاهان سبز مقاوم به ۱۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین از محیط باززای انتخاب شدند و توسط PCR ارزیابی شدند. حضور باند ۱۶۶۸ جفت باز مربوط به ژن BADH بیانگر انتقال موفق ژن به گیاهان تراریخت بود. ارزیابی مقاومت گیاهان تراریخت در محیط های با فشار اسمزی مختلف نشان داد این گیاهان در تنش ۶- بار پایدار ماندند، در حالی که گیاهان شاهد از بین رفتند. از این رو انتقال ژن BADH می تواند راهبردی کارآمد در اصلاح مولکولی گوجه فرنگی و افزایش تحمل آن به تنش های اسمزی باشد.

واژه های کلیدی

اگر باکتریوم، باززایی *In vitro*، تنش اسمزی، گلايسين بتائين.

۱. گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
۲. گروه زیست فرآورده های گیاهی، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
۳. گروه علوم همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرکزی تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

پریسا جنوبی

رایانامه: jonoubi@khu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۰۴

استناد به این مقاله:

جنوبی، پریسا؛ لهراسی، تهمینه؛ سلطانی، رویا و دانشیان، دینا (۱۴۰۵). توسعه سامانه کشت در شیشه و بهبود تحمل به خشکی در گوجه فرنگی از طریق انتقال ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز (BADH)، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۳)، ۳۱-۴۶.

(DOI: [10.30473/cb.2026.75643.2015](https://doi.org/10.30473/cb.2026.75643.2015))

مقدمه

رشد و بهره‌وری گیاهان زراعی به میزان زیادی به حساسیت آن‌ها در برابر تنش‌های محیطی وابسته است (Lv *et al.*, 2007). در شرایط طبیعی، گیاهان همواره در معرض تنش‌های غیرزیستی قرار می‌گیرند که موجب تغییرات گسترده در فرایندهای فیزیولوژیک، متابولیک، بیوشیمیایی، مولکولی، سلولی و حتی بیان ژن‌ها می‌گردد (Miri & Zamani Moghadam, 2015). از میان این تنش‌ها، خشکی یکی از مهم‌ترین و پیچیده‌ترین عوامل محدودکننده رشد محسوب می‌شود که علاوه بر کاهش عملکرد گیاهان، هزینه تولید را نیز افزایش داده و در سطح جهانی امنیت غذایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Zangishei & Salari, 2016).

گیاهان برای مقابله با خشکی از مکانیسم‌های مختلفی بهره می‌برند. کنترل روزه‌ها و کاهش تعرق برای جلوگیری از هدررفت آب، گسترش سیستم ریشه‌ای برای افزایش جذب آب، فعال‌سازی سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیرآنزیمی) و نیز تنظیم فشار اسمزی از مهم‌ترین این سازوکارها به‌شمار می‌روند (Taghdisi Sayyar *et al.*, 2016). واکنش‌های کلیدی در این شرایط، تجمع اسمولیت‌های سازگار مانند قندها، پروتئین‌ها و ترکیبات نیتروژن‌دار کوچک است که بدون داشتن اثرات سمی، پتانسیل اسمزی سلول را تنظیم می‌کنند (Jarin *et al.*, 2024). گلیسین بتایین (GB) یکی از مهم‌ترین این اسمولیت‌ها است که در سیتوپلاسم گیاهان تحت تنش آبی تجمع می‌یابد (Huang *et al.*, 2000). تجمع این ترکیب می‌تواند سبب کاهش پراکسیداسیون غشا، حفظ پایداری ترمودینامیکی و بازیابی تجمع پروتئین‌ها، حفاظت از ساختار غشای سلولی و همچنین بهبود عملکرد فتوسنتز II شود (Zhao *et al.*, 2020). این اسمولیت می‌تواند مکانیسم‌های تحمل به استرس گیاه را فعال کند، که شامل انتقال سیگنال تنش، فعال‌سازی ژن‌های مقاومت، افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی، حفظ فشار اسمزی سلول، تقویت یکپارچگی غشای سلولی و همچنین حفاظت از دستگاه

فتوسنتزی، به‌ویژه کمپلکس فتوسنتز II (PSII) می‌شود (Niazian *et al.*, 2021).

مسیر بیوسنتز GB در گیاهان عالی شامل اکسیداسیون دو مرحله‌ای کولین از طریق بتائین‌آلدئید است. آنزیم کولین مونواکسیژناز (CMO) واکنش مرحله نخست و آنزیم بتائین‌آلدئید دهیدروژناز (BADH) واکنش مرحله بعدی را کاتالیز می‌کنند (Jin *et al.*, 2024). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که افزایش بیان ژن‌های CMO و BADH در گیاهان زراعی موجب افزایش توانایی سازگاری با تنش‌های اسمزی می‌شود (Huang *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2015; Di *et al.*, 2002).

همچنین بررسی‌ها نشان داده‌اند که مسیر سیگنال‌دهی MAPK در کنار سنتز GB در تحمل به تنش‌ها نقشی اساسی دارد و ورود ژن BADH می‌تواند میزان مقاومت گیاه به تنش‌های غیرزیستی را به شکل چشمگیری افزایش دهد (Golestan Hashemi *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2018).

گوجه‌فرنگی به‌دلیل دارا بودن لیکوپن، ویتامین‌ها، مواد معدنی، کارتنوئیدها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی متنوع (Sandhya *et al.*, 2022)، یکی از محصولات مهم و استراتژیک کشاورزی محسوب می‌شود. با این حال، عملکرد آن به شدت تحت تأثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار دارد. لذا توسعه ابزارهای بیوتکنولوژی از جمله روش‌های باززایی و انتقال ژن به‌منظور بهبود صفات مطلوب آن ضرورت دارد. باززایی مؤثر در گیاهان به عواملی نظیر نوع و سن جداکشت، غلظت و ترکیب هورمون‌ها بستگی دارد (Koul *et al.*, 2014; Gerszberg *et al.*, 2015; Stavridou *et al.*, 2019; Krishna *et al.*, 2021). همچنین کارایی انتقال ژن توسط *Agrobacterium* تحت تأثیر عواملی مانند ژنوتیپ گیاه، نوع جداکشت، ترکیب هورمون‌ها و کاربرد ترکیبات فنلی نظیر استوسیرنگون قرار دارد. همچنین عوامل دیگری همچون pH محیط کشت، تراکم سلول‌های *Agrobacterium* و ساختارهای پلاسمیدی در کارایی تراریختی مؤثر بودند (Senapati *et al.*, 2016; Alatar *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2020; Dulam *et al.*, 2022).

رشد طولی شاخه به محیط MS حاوی هورمون جیبرلیک‌اسید (GA_3) با غلظت‌های مختلف (۱، ۲ و ۳ میلی گرم در لیتر) به همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر ایندول استیک اسید واکنش شدند. از بهترین محیط کشت شاخه‌زایی و رشد طولی شاخه برای مراحل انتقال ژن استفاده گردید.

کلونینگ ژن BADH

برای همسانه‌سازی، cDNA ژن BADH اسفناج با شماره دسترسی U69142.1 که در حامل pUC57 سنتز شده بود به باکتری *E. coli* سویه DH5 α به‌روش شوک حرارتی طبق روش‌های معمول (Sambrook & Russell, 2001) وارد شد. باکتری‌ها بر روی محیط LB آگار حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت شدند، از کلنی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به‌منظور تأیید حضور ژن واکنش هضم آنزیمی و همچنین PCR با پرایمرهای اختصاص ژن (جدول ۱) انجام شد.

همسانه‌سازی ژن BADH سنتزی در حامل دوگانه pRI201-AN انجام شد (شکل ۱-a). برای این منظور هضم آنزیمی حامل pRI201-AN و حامل pUC57 حاوی ژن BADH توسط آنزیم‌های محدودالتر *SalI* و *NdeI* انجام گرفت. هر واکنش به‌صورت شبانه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس DNA برش خورده الکتروفورز شد. قطعات ژن با اندازه ۱۶۶۸ bp و حامل خطی شده پس از برش از روی ژل، با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA، خالص شدند. اتصال آنزیمی ژن BADH در حامل دوگانه pRI201-AN توسط آنزیم T4 لیگاز به‌صورت شبانه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به روش شوک حرارتی، باکتری‌ها ترانسفورم شدند و سپس بر روی پلیت دارای LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک ۱۰ میلی گرم کانامایسین کشت شدند. پس از رشد کلنی‌ها برای تأیید همسانه‌سازی، PCR با آغازگرهای عمومی M13 انجام شد (شکل ۱-b). همچنین حامل پلاسمیدی تخلیص شد و مورد هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های محدودالتر *SalI* و *NdeI* قرار گرفت. از کلون‌های تعیین‌شده استوک حاوی گلیسرول تهیه و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

بنابراین، در پژوهش حاضر با هدف بهبود تحمل به تنش‌های غیرزیستی در گیاه گوجه‌فرنگی، بهینه‌سازی فرایند انتقال ژن BADH از طریق *Agrobacterium* مدنظر قرار گرفت. در این راستا، اثر عواملی نظیر مدت‌زمان آغشتگی جداکشت‌ها به آگروباکتریوم، استفاده از ترکیب استوسیرنگون، انتخاب مناسب‌ترین نوع و غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر متغیرهای مؤثر بر تراریختی بررسی شد تا کارایی انتقال ژن افزایش یافته و اثر آن بر تحمل فشار اسمزی در گیاهان تراریخت گوجه‌فرنگی ارزیابی گردد.

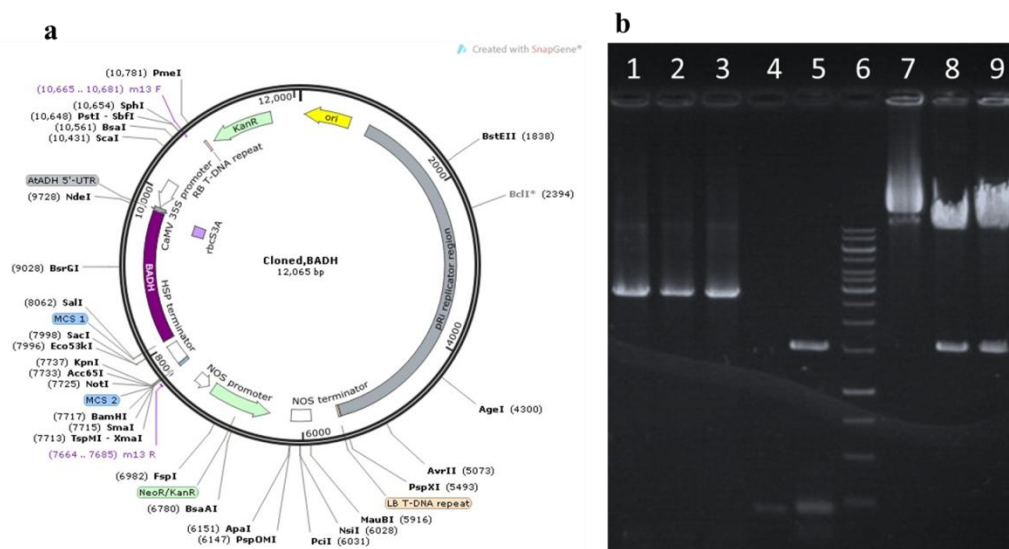
مواد و روش‌ها

بذر دو رقم Rio Grande و CH گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) از مؤسسه اصلاح نهال و بذر کرج و تهیه گردید برای سترون‌سازی بذور ابتدا بذرها در آب مقطر استریل و یک قطره توپین ۲۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند پس از سه بار شست‌وشو با آب مقطر استریل، بذرها در هیپوکلریت سدیم ۱/۲۵ درصد و ۲/۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند و سه بار آبکشی شدند. شست‌وشو با اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه در زیر هود لامینار انجام شد. کشت بذور در محیط MS (Murashige & Skoog, 1962) فاقد هرگونه تنظیم‌کننده رشد برای جوانه‌زنی انجام شد و در اتاق کشت با فتوپریود ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی به‌مدت ۱۰ روز قرار گرفتند.

بهینه‌سازی محیط کشت القای نوساقه (SIM) و رشد شاخسارها (SMM)

جهت تهیه محیط کشت MS حجم‌های لازم از نمک‌های پر مصرف، نمک‌های کم مصرف، ویتامین‌ها و آهن به‌همراه ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۸ گرم بر لیتر آگار تهیه و pH، ۵/۸ تنظیم شد. به‌منظور باززایی شاخه از دو جداکشت کوتیلدونی و هیپوکوتیلی استفاده شد. محیط کشت القای نوساقه حاوی هورمون بنزیدل آدنین (BA) در غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۵ میلی گرم در لیتر) به‌همراه ۰/۱ میلی گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) به‌کار رفت.

پس از سه هفته گیاهان باززایی شده جدا شدند و برای



شکل ۱. (a) وکتور بیانی pRI201-AN حاوی ژن *BADH* همسانه‌سازی شده برای انتقال به اگروباکتریوم؛ b: تأیید حضور ژن *BADH* سنتزی در حامل pRI201-AN، چاهک‌های ۱ تا ۳: محصول کلنی PCR با آغازگرهای عمومی M13، چاهک ۴: کنترل منفی (محصول PCR فاقد نمونه)، چاهک ۵: کنترل مثبت (محصول PCR حامل pUC57 حاوی ژن *BADH*)، چاهک ۶: نشانگر وزن مولکولی 1kb، چاهک ۷: پلاسمید نوترکیب بدون واکنش هضم آنزیمی، چاهک‌های ۸ و ۹: حامل نوترکیب pRI201-AN برش خورده با آنزیم‌های *SalI* و *NdeI* مشاهده قطعه نشان‌دهنده حضور ژن *BADH* در حامل بیانی است.

Figure 1. (a) Expression vector pRI201-AN containing the cloned *BADH* gene for transformation into *Agrobacterium*. (b) Confirmation of the presence of the synthetic *BADH* gene within the pRI201-AN vector. Lanes 1–3: colony PCR products amplified using universal M13 primers; lane 4: negative control (PCR without template DNA); lane 5: positive control (PCR product from pUC57 plasmid containing *BADH* gene); lane 6: 1 kb DNA molecular weight marker; lane 7: undigested recombinant plasmid; lanes 8 and 9: recombinant pRI201-AN vector digested with *SalI* and *NdeI* restriction enzymes. Detection of a 1668 bp fragment confirms the presence of the *BADH* gene within the expression vector.

برسد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. رسوب باکتری با محلول آغشتگی اگروباکتریوم به صورت سوسپانسیون هم حجم درآمده و (رسوب باکتری: محیط آغشتگی) به نسبت‌های مختلف (۱:۲، ۱:۱، ۲:۱) رقت‌سازی شدند و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط قرار گرفتند.

هم‌کشتی جداکشت‌ها با اگروباکتریوم

به منظور تراریخت کردن جداکشت‌های هیپوکوتیل و برگ لپه‌ای از دانه رست‌های ۱۰ روزه استفاده شد. بدین صورت که جداکشت‌های ۱۰ روزه در مدت زمان‌های متفاوت (۱۵، ۳۰ و ۶۰ ثانیه) به رقت‌های مختلف سوسپانسیون سلول باکتری آغشته گردیدند. جداکشت‌های آلوده شده به سوسپانسیون باکتری بر روی کاغذ صافی استریل شده قرار گرفتند تا باکتری‌های اضافی آن‌ها جذب کاغذ شوند.

انتقال حامل نوترکیب به اگروباکتریوم *تومفاسینس* سویه *LBA 4404* به روش انجماد و ذوب انجام شد (Sambrook & Russell, 2001). به منظور تأیید انتقال وکتور، این باکتری در محیط دارای دو آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۱۰ میلی گرم در لیتر و ریفامپیسین ۰/۶ میلی گرم در لیتر کشت داده شدند. برای حصول اطمینان بیشتر، از روش کلونی PCR استفاده شد.

آغشتگی جداکشت‌ها با اگروباکتریوم

برای کشت شبانه اگروباکتریوم یک کلنی از باکتری، درون محیط مغذی LB Broth از شرکت Q LAB کشت داده شد. جهت انتخاب کلنی‌های ترانسفرم شده از ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین و ۵۰ میلی گرم بر لیتر ریفامپیسین استفاده شد. سپس فالكون مورد نظر یک شب در انکوباتور شیکردار و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا به OD: 1

ارزیابی میزان تحمل گیاهان تراریخت در تنش اسمزی

به‌منظور ارزیابی میزان تحمل تنش‌های اسمزی در گیاهان تراریخت T_0 حاوی ژن *BADH*، تعدادی از شاخه‌های باززایی شده سبز تراریخت‌شده مقاوم به کانامایسین به محیط کشت داری فشار اسمزی واگشت شدند. از آنجایی که قند مانیتول شرایط تنش اسمزی را شبیه‌سازی می‌کند، در محیط کشت مقادیر مختلفی از مانیتول به کار رفت و براساس غلظت‌های ذکر شده در جدول (۲) فشارهای اسمزی متفاوت (صفر، -۱، -۲، -۳، -۴، -۵ و -۶ بار) در شرایط *in vitro* ایجاد گردید و گیاهان شاهد و تراریخت نسل T_0 از هر دو رقم گوجه‌فرنگی در آن‌ها واگشت شدند و پس از یک ماه میزان تحمل آن‌ها بررسی گردید.

جدول ۲. غلظت‌های به کار رفته مانیتول برای ایجاد فشارهای

اسمزی مختلف (Gangopadhyay et al., 1997)

Table 2. Applied mannitol concentrations for the induction of different osmotic potential

غلظت مانیتول (g l ⁻¹)	۷/۳	۱۷	۲۲	۲۹/۴	۳۶/۸۴	۴۴/۸
پتانسیل اسمزی (bar)	-۱	-۲	-۳	-۴	-۵	-۶

نتایج

سترون‌سازی بذور و انتخاب مناسب‌ترین محیط

شاخه‌زایی و رشد شاخساره

مؤثرترین روش برای سترون‌سازی بذرها برای هر دو رقم، استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱/۲۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه، سپس سه بار شست‌وشو با آب مقطر استریل و پس از آن استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سه بار شست‌وشو با آب مقطر استریل بود. بذور بعد از ۱۰ تا ۱۴ روز جوانه‌زنی موفق داشتند.

نتایج نشان داد که در رقم CH بیشترین درصد

باززایی در هر دو جداکشت هیپوکوتیل و کوتیلدونی از به کارگیری ۳ میلی گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی گرم بر

سپس بر روی محیط هم‌کشتی حاوی نمک‌های MS، ویتامین‌ها، آهن، ۵۰ میلی گرم بر لیتر گلوکز و ۴۰ میلی گرم بر لیتر استوسیرینگون قرار گرفتند. برای ایجاد شرایط تاریکی، پلیت‌ها درون فویل آلومینیوم پیچیده شدند و به مدت ۴۸ یا ۷۲ ساعت در اتاق رشد با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

باززایی و انتخاب گیاهان تراریخت شده

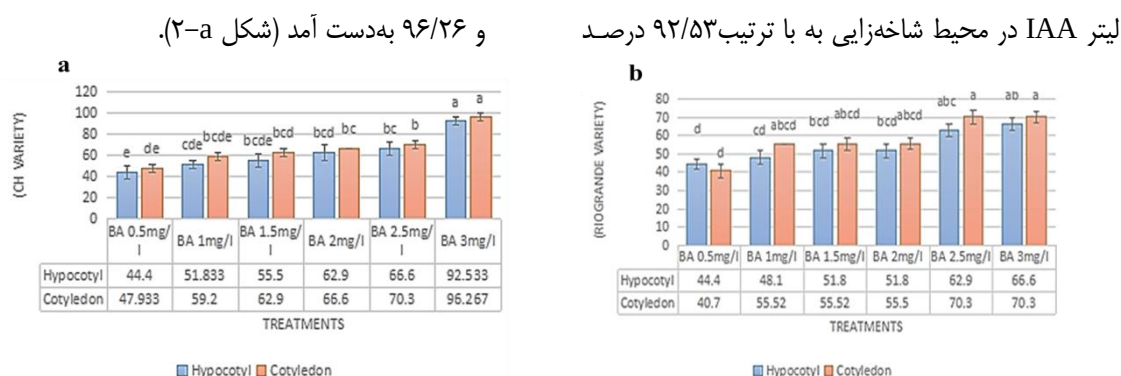
پس از مرحله هم‌کشتی به منظور تولید نوساقه جداکشت‌ها به مدت دو هفته درون محیط القای شاخه (SIM) که بهینه غلظت هورمون‌های ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IAA و ۳ میلی گرم بر لیتر BA را داشتند و با غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیکی (۲۵۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم و ۱۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر ونکومایسین) و (۲۵۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم و ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر ونکومایسین) و (۲۵۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم و ۱۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین) تکمیل شده بودند، قرار گرفتند. ساقه‌های باززایی شده از مرحله پرآوری به مرحله رشد شاخه‌ها با بهترین غلظت هورمونی ۳ میلی گرم بر لیتر GA₃ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر IAA که با ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم و ۵۰ میلی گرم بر لیتر کانامایسین غنی شده بودند، منتقل شدند و هر هفته درون محیط کشت جدید واگشت گردیدند.

تأیید مولکولی انتقال ژن در گیاهان تراریخت

برای اطمینان از ورود ژن خارجی *BADH*، از گیاهان سبز تراریخت مقاوم به کانامایسین و شاهد، به روش CTAB استخراج DNA صورت گرفت و با پرایمرهای اختصاصی ژن (جدول ۱) واکنش PCR انجام شد و الکتروفورز بر روی ژل اگارز انجام گرفت.

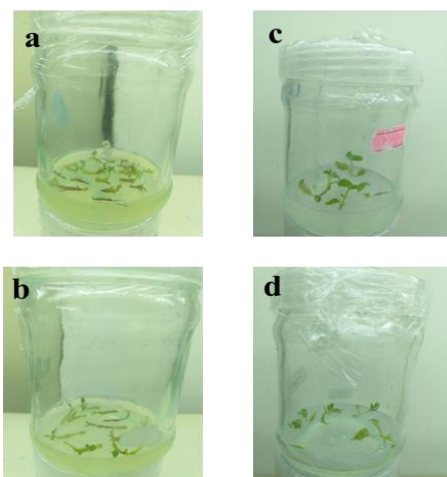
جدول ۱. توالی پرایمرهای اختصاصی ژن *BADH*

Table 1. Specific primer sequences of the <i>BADH</i> gene		
Primer Name	Primer sequence	TM
F-BADH	5'-GCGTTCCCAATTCTGCTC-3'	53.2° C
R-BADH	5'-TCAAGGAGACTTGTACCATCCCC-3'	54.8° C



شکل ۲. درصد باززایی جداگشت‌های کوتیلدونی و هیپوکوتیل در ارقام گوجه‌فرنگی در محیط شاخه‌زایی. a: رقم CH؛ b: رقم Rio Grande. **Figure 2.** Percentage of regeneration in cotyledon and hypocotyl explants of tomato cultivars under shoot induction medium. a: Cultivar CH; b: Cultivar Rio Grande.

تفاوت‌های آشکاری در میزان باززایی ایجاد کند.



شکل ۳. مقایسه شاخسارهای باززایی‌شده گوجه‌فرنگی در محیط القای شاخه (SIM) حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA. a: هیپوکوتیل CH، b: هیپوکوتیل Rio Grande، c: کوتیلدون Rio Grande، d: کوتیلدون CH.

Figure 3. Comparison of shoots regenerated in tomato on shoot induction medium (SIM) containing 3 mg l⁻¹ BA and 0.1 mg l⁻¹ IAA. a: CH hypocotyl, b: Rio Grande hypocotyl, c: CH cotyledon, d: Rio Grande cotyledon.

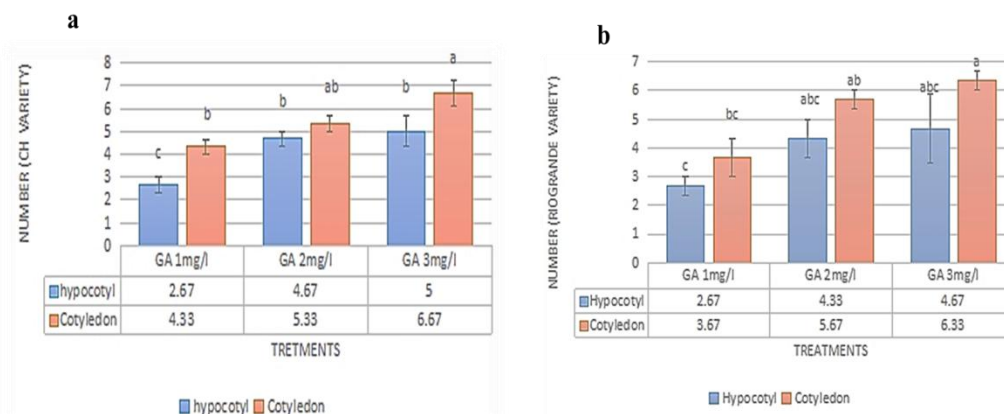
شاخه‌های باززایی‌شده به‌منظور رشد طولی و توسعه اندام‌های هوایی به محیط رشد شاخساره (SMM) حاوی غلظت‌های مختلف GA₃ منتقل شدند. تعداد شاخه‌ها با افزایش غلظت هورمون جیبرلیک‌اسید در هر دو رقم افزایش معنی‌داری نشان داد. در هر دو رقم CH و ریوگرانده جداگشت کوتیلدونی نسبت به جداگشت هیپوکوتیلی با افزایش غلظت GA₃ تعداد شاخه بیشتری را نشان

در رقم ریوگرانده برای جداگشت کوتیلدونی بیشترین درصد باززایی در محیط شاخه‌زایی از تیمار ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA ۷۰/۳ درصد حاصل شد. در حالیکه برای جداگشت هیپوکوتیلی به‌کارگیری ۳ میلی‌گرم در لیتر BA با ۶۶/۶ درصد بیشترین درصد باززایی مشاهده شد. در کلیه تیمارها با افزایش غلظت BA درصد باززایی شاخه در هر دو جداگشت افزایش نشان داد ولی تفاوت معنی‌داری بین به‌کارگیری ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده نشد (شکل ۲-ب). جداگشت کوتیلدونی نسبت به هیپوکوتیلی در هر دو رقم CH و ریوگرانده عملکرد مطلوب تری در باززایی شاخه داشت (شکل ۳).

الگوی باززایی به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که نوع رقم و منشاء بافتی تأثیر قابل‌توجهی بر ظرفیت باززایی گیاه دارد. جداگشت‌های کوتیلدونی در هر دو رقم از کارایی بالاتری در القای شاخه نسبت به جداگشت‌های هیپوکوتیلی برخوردار بودند که احتمالاً به تفاوت در میزان تمایزپذیری و محتوای ذاتی تنظیم‌کننده‌های رشد در بافت‌های مختلف مربوط است. همچنین افزایش غلظت سیتوکینین موجب تحریک فرایند باززایی شد، اما در غلظت‌های بالاتر، پاسخ باززایی به حالت اشباع رسیده و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. این روند بیانگر آن است که تعادل غلظت بین سیتوکینین و اکسین نقش تعیین‌کننده‌ای در تنظیم مسیر مورفوژن داشته و اثر متقابل این تنظیم‌کننده‌ها بسته به ژنوتیپ می‌تواند

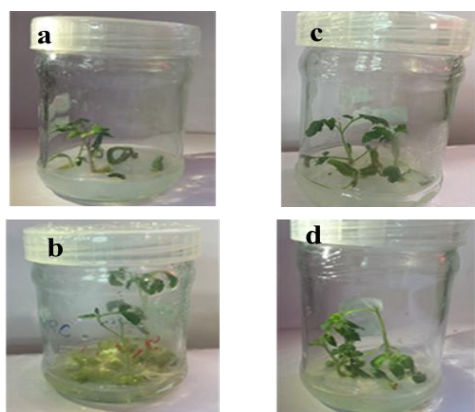
هیپوکوتیلی نشان داد. در رقم روگرانده نیز جداکشت‌های کوتیلدون با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بیشترین تعداد شاخه را با ۶/۳۳ شاخه تولید کردند که تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها نشان داد (شکل ۴-b).

داد (شکل ۴-a). به‌طوری‌که بیشترین تعداد شاخه از به‌کارگیری ۳ میلی‌گرم در لیتر GA_3 در رقم CH از جداکشت کوتیلدون به میزان ۶/۶۷ شاخه حاصل شد که تفاوت معنی‌داری با تعداد شاخه‌های حاصل از جداکشت‌های



شکل ۴. رشد شاخساره‌های حاصل از جداکشت‌های برگ‌های و هیپوکوتیل در ارقام گوجه‌فرنگی. a: رقم CH، b: رقم Rio Grande. **Figure 4.** Growth of shoots derived from cotyledon leaf and hypocotyl explants in tomato cultivars. a: Cultivar CH; b: Cultivar Rio Grande.

رشد و تمایز شاخساره‌ها فراهم کرده و می‌تواند برای مراحل بعدی باززایی و تراریختی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۵. مقایسه شاخساره‌های حاصل از دو جداکشت کوتیلدون و هیپوکوتیلی در ارقام CH و ریوگرانده گوجه‌فرنگی در محیط رشد شاخساره (SMM) حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر GA_3 و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA. a: هیپوکوتیل CH، b: هیپوکوتیل Rio Grande، c: کوتیلدون CH، d: کوتیلدون Rio Grande

Figure 5. Comparison of shoots produced tomato cultured on shoot maturation medium (SMM) containing $3 \text{ mg l}^{-1} GA_3$ and $0.1 \text{ mg l}^{-1} IAA$. a: CH hypocotyls, b: Rio Grande hypocotyls c: CH cotyledons, d: Rio Grande cotyledons

در کل مؤثرترین رشد شاخساره برای هر دو رقم گیاه گوجه‌فرنگی زمانی بود که آن‌ها در محیط ۳ میلی‌گرم بر لیتر GA_3 و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA قرار می‌گرفتند و بین دو رقم CH و ریوگرانده، جداکشت کوتیلدون نسبت به هیپوکوتیلی در محیط SMM عملکرد مطلوب‌تری داشتند (شکل ۵)، از اینرو از این محیط کشت برای مراحل تراریختی استفاده شد.

انتقال شاخه‌های باززایی‌شده به محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف جیبرلیک‌اسید نشان داد که این هورمون نقش مؤثری در تحریک رشد طولی و افزایش تعداد شاخه‌ها دارد. با افزایش غلظت جیبرلیک‌اسید، رشد شاخساره در هر دو رقم به‌طور معنی‌داری بهبود یافت و جداکشت‌های کوتیلدون پاسخ رشدی قوی‌تری نسبت به جداکشت‌های هیپوکوتیلی نشان دادند. این امر بیانگر حساسیت بالاتر بافت‌های کوتیلدون به جیبرلیک‌اسید و کارایی بیشتر آن‌ها در مسیر توسعه اندام‌های هوایی است. در مجموع، به‌نظر می‌رسد ترکیب بهینه جیبرلیک‌اسید و اکسین در محیط رشد، شرایط فیزیولوژیکی مطلوبی برای

لیتر سفوتاکسیم به‌همراه ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر ونکومایسین بود. برای انتخاب گیاهان تراریخت‌شده در محیط انتخاب از ۱۵ میلی گرم بر لیتر کانامایسین استفاده شد. جداکشت‌ها هر دو هفته به محیط مشابه واگشت می‌شدند.

پس از باززایی شاخه‌های سبز مقاوم به کانامایسین به‌منظور رشد شاخسارها، گیاهان به محیط رشد شاخه (SMM) حاوی ۳ میلی گرم درلیتر GA_3 و IAA ۰/۱ تکمیل شده با ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر سفوتاکسیم به‌همراه ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر ونکومایسین منتقل گردیدند.

برخلاف نتایج حاصل از مراحل کشت بافت که در محیط شاخه‌زایی درصد باززایی جداکشت‌های کوتیلدون نسبت به هیپوکوتیلی بیشتر بود، مشاهده شد که درصد باززایی گیاهان تراریخته سبز مقاوم به کانامایسین حاصل از جداکشت هیپوکوتیل نسبت به کوتیلدون در هر دو رقم CH و ریوگرانده افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۶).

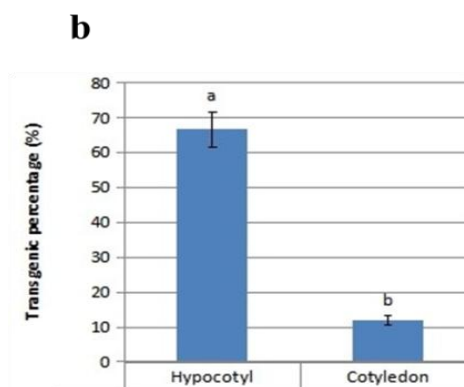
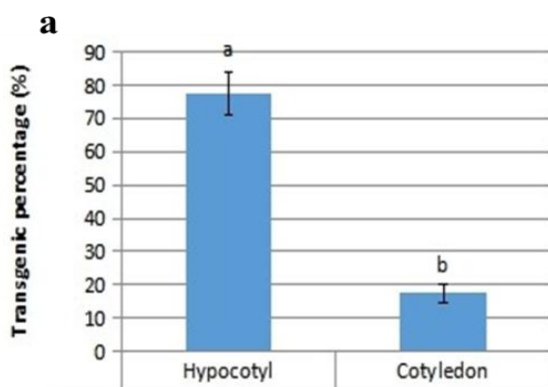
به‌طور کلی، بهینه‌سازی شرایط آغشتگی و هم‌کشتی نقش تعیین‌کننده‌ای در موفقیت فرایند تراریختی دارد، به‌گونه‌ای که تعادل میان میزان تماس با آگروباکتریوم و کنترل آلودگی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. استفاده از ترکیب مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها موجب مهار رشد باکتری بدون آسیب به بافت‌های گیاهی شد و امکان باززایی مؤثر شاخساره‌های مقاوم را فراهم کرد. برخلاف روند مشاهده‌شده در باززایی غیرتراریخت، در گیاهان تراریخت جداکشت‌های هیپوکوتیلی کارایی بالاتری در باززایی نشان دادند که احتمالاً ناشی از تفاوت‌های فیزیولوژیکی در پاسخ به فرایند آلوده‌سازی و انتخاب است.

تراریختی جداکشت‌های هیپوکوتیلی و کوتیلدونی

یکی از عمده مشکلات کار با آگروباکتریوم رشد بی‌رویه باکتری در محیط کشت باززایی گیاه می‌باشد که باعث ازدست‌رفتن جداکشت‌ها می‌گردد، یکی از راه‌های مهار رشد بی‌رویه آگروباکتریوم، تعیین حداقل زمان مؤثر آغشتگی جداکشت‌ها با آگروباکتریوم می‌باشد. کاهش زمان آغشتگی و میزان تراکم پایین باکتری باعث ایجاد اثر نامطلوب و کاهش تراریختی می‌شود از طرف دیگر با افزایش زمان آغشتگی شانس آلودگی و تهاجم بیش از حد آگروباکتریوم بالا رفته و باعث از بین رفتن جداکشت‌ها و عدم دسترسی به گیاهان تراریخت می‌گردید. نتایج نشان داد که زمان آغشتگی ۳۰ ثانیه با نسبت ۱:۱ سوسپانسیون سلولی بیشترین درصد تراریختی را ایجاد کرد.

از سوی دیگر، در دوران هم‌کشتی آگروباکتریوم با جداکشت‌ها دمای محیط و مدت زمان هم‌کشتی نیز بر میزان تراریختی تأثیر مستقیم دارد. بهترین زمان و دما در محیط هم‌کشتی، ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی به‌دست آمد. چرا که دمای بالاتر سرعت رشد باکتری را افزایش می‌داد و گیاهان از بین می‌رفتند و تراریختی صورت نمی‌گرفت. زمانهای بیشتر از دو روز نیز آلودگی را به شدت افزایش می‌داد و زمان ۲۴ ساعت میزان تراریختی را کاهش می‌داد.

یکی از راه‌های مؤثر در کنترل رشد آگروباکتریوم استفاده هم‌زمان از دو نوع آنتی‌بیوتیک ونکومایسین و سفوتاکسیم در محیط باززایی شاخه (SIM) حاوی ۳ میلی گرم بر لیتر BA بود. مناسب‌ترین غلظت‌های آنتی‌بیوتیکی در این محیط به‌کارگیری ۲۵۰ میلی گرم بر



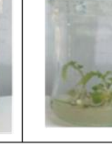
شکل ۶. درصد گیاهان سبز تراریخت حاصل از دو جداکشت هیپوکوتیل و کوتیلدون برگ‌های explant در ارقام گوجه‌فرنگی. a: رقم CH، b: رقم ریوگرانده.

Figure 6. Percentage of transgenic green plants obtained from two hypocotyl and cotyledon leaf explants in tomato cultivars. a: CH, b: Rio Grande cultivar.

ارزیابی آستانه تحمل تنش اسمزی در گیاهان

تراریخت

به منظور بررسی میزان تحمل گیاهان تراریخت شده با ژن *BADH*، گیاهان تراریخت به محیط‌های کشت با پتانسیل اسمزی متفاوت که توسط غلظت‌های مختلف قند مانیتول در محیط SMM ایجاد شده بودند، واکشت شدند. تغییرات ریخت‌شناسی و میزان تحمل گیاهان تراریخته در هر دو رقم نسبت به شاهد و در مقایسه با فشارهای اسمزی بالا مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهان گوجه‌فرنگی تا فشار ۴- بار را تحمل کردند، اما در فشارهای اسمزی بیشتر رنگ گیاهان به زردی تمایل پیدا کرد، اندازه برگ‌ها کوچک‌تر شد تا در نهایت در فشار اسمز ۶- بار تقریباً تمام گیاهان شاهد به دلیل حساسیت به تنس اسمزی بالا از بین رفتند. در مقابل گیاهان تراریخت هر دو رقم CH و ریوگرانده حاوی ژن *BADH* توانستند فشار اسمزی بالا را تحمل کرده و زنده بمانند که این امر نشان‌دهنده عملکرد ژن *BADH* و افزایش سنتز گلايسين بتائين در گیاهان تراریخت بوده که منجر به افزایش تحمل تنش‌های اسمزی گردیده است (شکل ۸).

رقم	گیاه شاهد در محیط MS فاقد مانیتول	گیاه شاهد در ۶ بار	گیاه تراریخت در ۶ بار
CH			
ریوگرانده			

شکل ۸. گیاهان باززایی‌شده دو رقم CH و ریوگرانده گوجه‌فرنگی در شرایط محیط کشت بدون مانیتول و فشار اسمزی، در مقایسه با گیاهان شاهد و تراریخت حاوی ژن *BADH* در فشار اسمزی ۶- بار.

Figure 8. Regenerated plants of two tomato cultivars, CH and Rio Grande, under culture conditions without mannitol and osmotic pressure, compared to control

آنالیز مولکولی گیاهان تراریخته

به منظور تأیید حضور ژن خارجی *BADH* در گیاهان سبز تراریخت شده مقاوم به کانامایسین، DNA ژنومی از گیاهان تراریخت هر دو رقم CH و ریوگرانده استخراج گردید و با پرایمرهای اختصاصی ژن *BADH* واکنش PCR انجام شد. همانگونه که در شکل ۷ مشاهده می‌گردد، حضور باند ۱۶۶۸ bp نشان‌دهنده حضور ژن خارجی *BADH* در گیاهان تراریخت بود، در حالیکه در گیاهان شاهد در هر دو رقم این باند مشاهده نشد.



شکل ۷. بررسی بیان ژن *BADH* در گیاهان تراریخت شده گوجه‌فرنگی. چاهک ۲: گیاه تراریخت رقم Rio Grande؛ چاهک ۳: گیاه شاهد رقم Rio Grande؛ چاهک ۴: گیاه تراریخت رقم CH؛ چاهک ۵: گیاه شاهد رقم CH؛ چاهک‌های ۱ و ۶: نشانگر SMOBIO 1Kb plus. مشاهده قطعه ۱۶۶۸ bp نشان‌دهنده حضور ژن خارجی *BADH* در گیاهان تراریخت هر دو رقم می‌باشد.

Figure 7. Analysis of *BADH* gene expression in transgenic tomato plants. Well 2: transgenic plant of Rio Grande cultivar; Well 3: control plant of Rio Grande cultivar; Well 4: transgenic plant of CH cultivar; Well 5: control plant of CH cultivar; Wells 1 and 6: SMOBIO 1Kb plus marker. The presence of a 1668 bp band indicates the presence of the foreign *BADH* gene in transgenic plants of both cultivars.

اکسین‌ها سبب تحریک شاخه‌زایی می‌شود. با این حال، نسبت این دو دسته هورمونی تعیین‌کننده نوع پاسخ گیاه است و نمی‌توان اثرات مشاهده‌شده را تنها به یک هورمون خاص نسبت داد. تغییرات در مقدار و نوع تنظیم‌کننده‌ها بر تعداد شاخساره‌های تولیدی اثر مستقیم دارد. علاوه بر این، تفاوت‌های ژنتیکی میان ارقام و جداکشت‌ها نیز در نتایج باززایی مؤثر هستند که می‌توانند تحت کنترل هر دو نوع ژن‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی باشند (Otroshy et al., 2013). به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب بهینه BA و IAA در ارقام آزمایشی نقش اساسی در بهبود باززایی دارد و همراهی آن با ویژگی‌های ژنتیکی و شرایط فیزیولوژیک جداکشت می‌تواند پاسخی کارآمد برای توسعه روش‌های مؤثر کشت بافت و مهندسی ژنتیک در گوجه‌فرنگی فراهم کند.

گیاهان تراریخت مقاوم به تنش‌های غیر زیستی
یکی از راهبردهای اساسی در افزایش تحمل گیاهان به تنش خشکی، بهره‌گیری از پتانسیل ژنتیکی ارقام و اصلاح ژنتیکی آن‌ها است. از آنجا که اصول به‌نژادی مبتنی بر شناخت پارامترهای ژنتیکی و نقش ژن‌ها در کنترل صفات است، درک نحوه عملکرد ژن‌ها، پیش‌شرط موفقیت در برنامه‌های اصلاحی محسوب می‌شود (Maioli et al., 2024). خشکی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان شناخته می‌شود، به‌گونه‌ای که کمبود آب در گیاه موجب اختلال در متابولیسم، از هم‌گسیختگی ساختار سلولی، کاهش فعالیت آنزیم‌ها، کاهش جذب عناصر غذایی و درنهایت توقف رشد و حتی مرگ گیاه می‌گردد (Miri & Zamani Moghadam, 2015). در چنین شرایطی، گیاهان با به‌کارگیری پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، مکانیسم‌های دفاعی خود را فعال می‌کنند. در این میان، پروتئین‌ها و ترکیبات اسمولیتی همچون گلیسین بتائین (GB) نقشی کلیدی در حفاظت سلولی ایفا می‌کنند. این ترکیب با ایجاد حفاظت اسمزی از اجزای سلولی در برابر تنش‌های

and transgenic plants containing the *BADH* gene under an osmotic pressure of 6 bar.

بحث و نتیجه‌گیری

بهینه‌سازی نوع و غلظت هورمون‌ها برای القای باززایی و شاخه‌زایی در گوجه‌فرنگی وابستگی زیادی به ژنوتیپ دارد. مطالعات نشان داده‌اند که طیف گسترده‌ای از تنظیم‌کننده‌های رشد در غلظت‌های مختلف برای ارقام متفاوت این گیاه استفاده می‌شوند و هر دسته از هورمون‌ها بر فرایندهای متعددی از رشد و نمو اثرگذارند. از آنجا که بسیاری از این فرایندها تحت کنترل بیش از یک نوع تنظیم‌کننده هستند، این تعامل احتمالاً از طریق مسیرهای سیگنالینگ وابسته به ژن‌های *ARR* و *IAA* انجام می‌شود (Bhatia et al., 2004).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بهترین ترکیب هورمونی برای باززایی مستقیم از جداکشت‌های هیپوکوتیل و کوتیلدون ارقام CH و ریوگرانده، استفاده از ۳ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IAA بود. این یافته‌ها با گزارش Otroshy و همکاران (2013) بر روی واریته سرازیزوفورم مشابهت دارد. به علاوه، پاسخ ژنوتیپ‌ها به غلظت‌های متفاوت، متغیر بود؛ به‌طوری که در تحقیقات قبلی، باززایی ۹۵ درصدی در جداکشت لپه‌ای با ۲ میلی‌گرم BA و ۰/۵ میلی‌گرم IAA و باززایی ۷۷ درصدی در جداکشت هیپوکوتیل با ۳ میلی‌گرم BA گزارش شد که همسو با نتایج حاضر است (Otroshy et al., 2013). عوامل متعدد دیگری همچون ژنوتیپ، سن و اندازه جداکشت نیز در باززایی گیاهان نقش تعیین‌کننده‌ای دارند. برای نمونه، Ajenifujah Solebo و همکاران (۲۰۱۴) طی پژوهشی بر گوجه‌فرنگی نشان دادند که محیط حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BA و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA بالاترین میزان باززایی را در جداکشت‌های کوتیلدون به‌همراه داشت. این نتایج با یافته‌های حاصل از تحقیق فعلی در ارقام CH و ریوگرانده تطابق دارد.

از نظر فیزیولوژیک، حضور هورمون‌های سیتوکینینی برای تقسیم سلولی ضروری بوده و ترکیب آن‌ها با

خشکی محافظت می‌کند. در مسیر بیوسنتز GB، آنزیم بتائین‌آلدهید دهیدروژناز (BADH) نقشی محوری دارد، به‌طوری‌که کمبود آب سبب افزایش بیان ژن BADH و تجمع GB در برگ و ریشه می‌شود (Jarín et al., 2024). آنزیم بتائین‌آلدهید دهیدروژناز، بتائین‌آلدهید را به گلیسین‌بتائین اکسید می‌کند. این واکنش، آخرین و برگشت‌ناپذیر مرحله بیوسنتز گلیسین‌بتائین از کولین است و مستقیماً سطح این اسمولیت حفاظتی را در سلول افزایش می‌دهد (Munoz-Clares et al., 2010). در پژوهش حاضر نیز با انتقال ژن خارجی BADH و استفاده از پروموتور CaMV35S بیش‌فعال، بیان این ژن و در نتیجه ظرفیت اسمولیتی گیاه افزایش یافته است.

برای انتقال ژن به سلول‌های گیاهی روش‌های متنوعی وجود دارد، اما استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* خلع‌سلاح‌شده یکی از پرکاربردترین و ساده‌ترین رویکردها است. این روش بدون نیاز به تجهیزات پیچیده، امکان انتقال پایدار ژن به ژنوم گیاهان زراعی را فراهم می‌سازد و احتمال خاموشی ژن در آن اندک است. تاکنون این فناوری به‌طور موفقیت‌آمیز در گیاهانی همچون کاهو و گوجه‌فرنگی به کار گرفته شده است و از قابلیت بالایی برای تولید گیاهان تراریخت پایدار برخوردار است (Purly & Agrawal., 2006; Chetty et al., 2013).

در این پژوهش از سویه LBA4404 آگروباکتریوم حامل پلاسمید نوترکیب pRI121-AN حاوی ژن BADH استفاده شد. در میان انواع جداکشت‌ها، هیپوکوتیل به‌عنوان بهترین ریزنمونه برای تراریختی هر دو رقم گوجه‌فرنگی انتخاب گردید. این نتیجه با برخی گزارش‌ها که جداکشت کوتیلدونی را موفق‌تر معرفی کرده‌اند متفاوت است (Goedeke et al., 2007). درحالی‌که با گزارش Sun و همکاران (۲۰۱۴) مبنی بر نتایج مناسب‌تر حاصل از به‌کارگیری هیپوکوتیل همخوانی دارد. بافت هیپوکوتیل معمولاً کم‌تمایزتر و جوان‌تر از کوتیلدون است و سلول‌های آن ظرفیت تقسیم و تمایزدایی بیشتری برای ورود به مسیر کالوس‌زایی و شاخساره‌زایی پس از عفونت با آگروباکتریوم دارند (Manamohan et al., 2011). سطح مقطع هیپوکوتیل

و بافت پارانشیمی آن امکان نفوذ بهتر آگروباکتریوم و استقرار پایدارتر سلول‌های آلوده را فراهم می‌کند، در نتیجه احتمال ادغام T-DNA در سلول‌های واقعاً باززایا بیشتر است (Sivankalyani et al., 2014).

یکی از مراحل مهم در فرایند تراریختی، تعیین زمان آغستگی جداکشت‌ها با آگروباکتریوم است. زمان طولانی سبب تکثیر بیش از حد باکتری و بروز آلودگی شدید و مرگ بافت‌ها می‌شود، درحالی‌که زمان کوتاه، احتمال انتقال ژن را کاهش می‌دهد. نتایج حاضر نشان داد که زمان ۳۰ ثانیه بهترین پاسخ را ایجاد کرد که با گزارش Liu و همکاران (۲۰۲۲) که زمان ۱۵ دقیقه را به‌کار گرفتند تفاوت دارد. از دیگر عوامل کلیدی در تراریختی، انتخاب غلظت مناسب آنتی‌بیوتیک گزینشگر است. در این مطالعه، کانامایسین با غلظت ۱۵ میکروگرم به‌عنوان بهترین سطح گزینش مورد شناسایی قرار گرفت و نتایج مطلوبی در غربال‌گری ریزنمونه‌های تراریخت نشان داد.

در پژوهش حاضر با استفاده از غلظت‌های مختلف مانیتول در محیط کشت شرایط تنش اسمزی ۶- بار اعمال شد. درحالی‌که گیاهان شاهد (وحشی) در این شرایط دچار زردی برگ، کاهش شدید سطح برگ و درنهایت مرگ شدند، گیاهان تراریخت حاوی ژن BADH توانستند این فشار اسمزی را تحمل کرده و زنده بمانند. نتایج به‌دست‌آمده مشابه گزارش Vitová و همکاران (۲۰۲۲) است که نشان دادند القای تنش اسمزی با مانیتول در گیاه *Apium graveolens* تغییرات ریختی شدید و کاهش رشد را به دنبال داشت.

بررسی‌های بسیاری در سایر گونه‌های گیاهی مؤید نقش ژن BADH در افزایش تحمل به تنش‌های غیرزیستی است. به‌عنوان نمونه، Tian و همکاران (۲۰۱۷) با انتقال ژن BADH از *Atriplex micrantha* به ذرت تحت کنترل پروموتور یوبی‌کوتین، افزایش بیان گلیسین‌بتائین و رشد بالاتر گیاهان تراریخت تحت تنش شوری را گزارش کردند. همچنین، در سویه تراریختی با ژن BADH استخراج‌شده از *Atriplex canescens* موجب افزایش شاخص جوانه‌زنی، محتوای پرولین، فعالیت POX و اجزای

همین راستا قرار دارد، به‌طوری‌که انتقال ژن *BADH* از اسفناج به گوجه‌فرنگی، موجب افزایش تحمل گیاهان تراریخت به تنش اسمزی گردید. بنابراین، این پژوهش نخستین گزارش موفق از انتقال ژن *BADH* در گوجه‌فرنگی در ایران است و می‌تواند مبنایی برای توسعه لاین‌های تراریخت مقاوم به تنش‌های غیرزیستی در برنامه‌های اصلاحی آینده باشد.

در این پژوهش، غلظت‌های بهینه هورمون‌های BA، IAA و GA_3 برای باززایی و رشد شاخه‌های گوجه‌فرنگی شناسایی شدند. انتقال موفقیت‌آمیز ژن *BADH* به هر دو رقم گوجه‌فرنگی تأیید شده و باعث افزایش تجمع گلیسین بتائین و بهبود تحمل فشار اسمزی تا حدود ۶- بار گردید. نتایج نشان می‌دهد که این رویکرد نه‌تنها عملکرد فتوسنتزی و رشد گیاه را تحت تنش‌های غیرزیستی بهبود می‌بخشد بلکه می‌تواند به‌عنوان راه‌کار مؤثری برای مقابله با خشکسالی و اثرات تغییر اقلیم در کشاورزی آینده به‌کار گرفته شود. توسعه و بهینه‌سازی روش‌های باززایی و تراریختی، فرصت ورود سایر ژن‌های مقاوم به تنش‌ها در گیاهان را فراهم ساخته و پتانسیل افزایش پایداری تولید محصولات کشاورزی را ارتقا می‌دهد. در چشم‌انداز آینده، ترکیب مهندسی ژنتیک با روش‌های نوین کشاورزی می‌تواند به حفظ امنیت غذایی جهانی و کاهش اثرات زیست‌محیطی کمک کند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی و نوآوری دانشگاه خوارزمی و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری انجام پذیرفته است که بدین وسیله از آن‌ها قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

Ajenifujah Solebo, Sh., Ingelbrecht, I.L., Nnennaya, I.R., & Olorode, O. (2014).

عملکرد در گیاهان تراریخت نسبت به شاهد گردید (Qin et al., 2017). به‌طور مشابه، تراریختی گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) با ژن *BADH* منجر به افزایش تحمل به تنش‌های اسمزی (PEG) و شوری (NaCl) شد (Rezaei Qusheh Bolagh et al., 2020). در مدل گیاهی آراییدوپسس، انتقال ژن‌های *BADH* و *FLD* منجر به بالاتر رفتن میزان گلیسین بتائین و پرولین، افزایش نسبت آب نسبی و کاهش نشت الکترولیت و مالون‌دی‌آلدئید (MDA) شد که به افزایش مقاومت گیاهان در برابر خشکی و شوری انجامید (Yu et al., 2017). در غلات نیز نتایج مشابهی گزارش شده است. Li و همکاران (۲۰۱۹) ژن *HvBADH1* را از جو به گندم نان (*Triticum aestivum*) منتقل کردند و نشان دادند که لاین‌های تراریخت دارای نسبت بالاتر K^+/Na^+ ، تجمع بیشتر گلیسین بتائین و نرخ بقای بالاتر در تنش NaCl بودند. به همین ترتیب، Zhao و همکاران (۲۰۲۰) در ذرت نشان دادند که ژن *BADH* موجب بهبود جوانه‌زنی، صفات مورفولوژیک، فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی (CAT، POX و SOD) و کاهش محتوای MDA گردید. علاوه بر این، در سیب‌زمینی، انتقال ژن *BADH* استخراج‌شده از *Atriplex canescens* موجب افزایش پرولین و کلروفیل، همراه با کاهش H_2O_2 و MDA در شرایط شوری شد (Ali et al., 2020). همچنین، در گندم حاوی ژن *BADH* با منشأ *Atriplex hortensis* افزایش محتوای کلروفیل، کاروتنوئیدها، فعالیت‌های بالاتر واکنش هیل و فعالیت بالاتر Ca^{2+} -ATPase و فعالیت‌های فتوسنتزی در غشای تیلاکوئید مشاهده شد و تجمع گلیسین بتائین منجر به حفاظت از کمپلکس فتوسنتزی و عملکرد غشاهای تیلاکوئید گردید (Tian et al., 2017).

در زمینه گیاه گوجه‌فرنگی، Jia و همکاران (۲۰۰۲) با انتقال ژن *BADH* از *Atriplex hortensis* به این گیاه توانستند میزان گلیسین بتائین را افزایش داده و مقاومت به شوری را تقویت کنند. یافته‌های پژوهش حاضر نیز در

Agrobacterium-mediated Transformation of Nigerian Cultivars of Tomato (*Solanum*

- lycopersicum* L.). *American Journal of Experimental Agriculture*, 4(7), 797-808. <https://doi.org/10.9734/AJEA/2014/5927>
- Alatar, A.A., Faisal, M., Abdel-Salam, E.M., Canto, T., Saquib, Q., Javed, S.B., & Al-Khedhairi, A.A. (2017). Efficient and reproducible *in vitro* regeneration of *Solanum lycopersicum* and assessment genetic uniformity using flow cytometry and SPAR methods. *Saudi Journal of Biology Science*, 24 (6), 1430-1436. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.03.008>
- Ali, A., Ali, Q., Iqbal, M. S., Nasir, I. A., and Wang, X. (2020). Salt tolerance of potato genetically engineered with the *Atriplex canescens* BADH gene. *Biol. Plant* 64, 271-279. <https://doi.org/10.32615/bp.2019.080>
- Bhatia, P., Ashwath, N., Senaratna, T., & Midmore, D. (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon Esculentum* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 78(1), 1-21. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000020430.08558.6e>
- Chetty, V.J., Ceballos, N., Garcia, D., Narvaez-Vasquez, N., Lopez, W., & Orozco-Cardenas, M.L. (2013). Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Reports*, 32, 239-247.
- Di, H., Tian, Y., Zu, H., Meng, X., Zeng, X., & Wang, Z. (2015). Enhanced salinity tolerance in transgenic maize plants expressing a BADH gene from *Atriplex micrantha*. *Euphytica*, 206(3). <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1515-z>
- Dulam, S., Jogam, P., Venkatapuram, A., Savitikadi, P., Peddaboina, V., Allini, V., & Abbagani, S. (2022). Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration system for genome engineering in tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(6), 103292. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103292>
- Gangopadhyay, G., Basu, S., Gupta, S. (1997). *In vitro* selection and physiological characterization of NaCl- and mannitol-adapted callus lines in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 50: 161-169. <https://doi.org/10.1023/A:1005929316777>
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. 2015. Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 120, 881-902. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0664-4>
- Goedeke, S., Hensel, G., Kapusi, E., & Kumehn, J. (2007). Transgenic barley in fundamental research and biotechnology. *Transgenic Plant Journal*, 104-117
- Golestan Hashemi, F. S., Ismail, M. R., Rafii, M. Y., Aslani, F., Miah, G., & Muharam, F. M. (2018). Critical multifunctional role of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipments*, 32, 815-829. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1478748>
- Huang, J., Hirji, R. Adam, L., Rozwadowski, K., Hammerlindi, J., Keller, W., & Selvaraj, G. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: Metabolic Limitations. *Plant Physiology*, 122(3), 747-56. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.747>
- Jarin, Af., Ghosh, U.K., Hossain, S., Apple, M., & Khan. A.R. (2024). Glycine betaine in plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Discover Agriculture*. 2(1). <https://doi.org/10.1007/s44279-024-00152-w>
- Jia, G., Zho, Z., Chang, F., & Li, Y. (2002). Transformation of tomato with the BADH gene from *Atriplex* improve salt tolerance. *Plant Cell Reports*, 21(2), 141-146. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0489-1>
- Jin, H., Tang, M., Zhu, L., Yu, X., Yang, Q., & Fu, X. (2024). Characterization of a Drought-Induced Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene *SgBADH* from *Suaeda glauca*. *Plants*, 13(19), 2716. <https://doi.org/10.3390/plants13192716>
- Koul, B., Srivastava, S., Amla, D., & Sanyal, I. (2014). Establishment and optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Biosciences*, 10(4), 2220-6655. <https://doi.org/10.4220-6655>
- Krishna, R., Ansari, W.A., Jaiswal, D.K., Singh, A.K., Verma, J.P., & Singh, M., (2021). Cooverexpression of *AtDREB1A* and *BcZAT12* increases drought tolerance and fruit production in double transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Plant Cell Reports*, 40(11), 2173-2190. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02725-1>
- Kumar, S., Jindal, S., Sarao, N., & Dhaliwal, M. (2018). Development of an efficient *in vitro* regeneration protocol in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Agricultural Research Journal*, 54(4), 475. <https://doi.org/10.5958/2395-146X.2017.00091.6>
- Lee, M., Lee, J., Jie, E., Choie, S., Jiang, L., Ahn, W., Kim, C., & Kim, S. (2020). Temporal and spatial expression analysis of shoot-regeneration

- regulatory genes during the adventitious shoot formation in hypocotyl and cotyledon explants of tomato (CV. Micro-Tom). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5309. <https://doi.org/10.3390/ijms21155309>
- Li, P., Cai, J., Luo, X., Chang, T., Li, J., & Zhao, Y. (2019). Transformation of wheat *Triticum aestivum* with the *HvBADH1* transgene from hulless barley improves salinity-stress tolerance. *Acta Physiologia Plantarum*, 41, 155. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2940-8>
- Liu, X., Li, A., Wang, S., Lan, Ch., Wang, Y., & Zhu, J. (2022). Overexpression of *Pyrus sinkiangensis* HAT5 enhances drought tolerance in transgenic tomato by modulating proline metabolism and oxidative stress. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1036254. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1036254>
- Lv, S., Yang, A., Zhang, K., Wang, L., & Zhang, J. (2007). Increase of glycinebetaine synthesis improves drought tolerance in cotton. *Molecular Breeding*, 20, 233-48. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9086-x>
- Maioli, A., De Marchi, F., Valentino, D., Gianoglio, S., Patono, D., Miloro, F., & Moglia, A. (2024). Knock-out of *SIDMR6-1* in Tomato Promotes Drought Tolerance. *Plant Stress*, 13(1), 100541. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100541>
- Manamohan, M., Prakash, M.N., Sharath Chandra, G., Asokan, R. and Nagesha, S.N. (2011). An improved protocol for rapid and efficient *Agrobacterium* mediated transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Applied Horticulture*, 13(1), 3-7
- Miri, H.R., & Zamani Moghadam, A. (2015). External application of glycine betaine to reduce the effects of drought stress in corn (*Zea mays* L.). *Iranian Journal of Field Crops Research*, 12(2), 704-717. (in Persian)
- Muñoz-Clares, R.A., Díaz-Sánchez, A.G., González-Segura, L., & Montiel, C. (2010). Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: mechanistic and regulatory implications. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 493(1), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.09.006>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-97. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Niazian, M., Sadat-Noori, S.A., Tohidfar, M., Mortazavian, S.M.M., & Sabbatini, P. (2021). Betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) vs. Flavodoxin (*Fld*), Two important genes for enhancing plants stress tolerance and productivity. *Frontiers in Plant Science*, 12: 650215. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.650215>
- Otroshy, M., Khalili, Z., Ebrahimi, M., Khayam Nekouie, M., & Moradi, K. (2013). Effect of growth regulators and explant on plant regeneration of *Solanum lycopersicum* L. var. cerasiforme. *Russian Agricultural Sciences*, 39(3), 226-235. <https://doi.org/10.3103/s1068367413030178>
- Purly, R., & Agrawal, V. (2006). Promoterless *gus* gene shows leaky β -glucuronidase activity during transformation of tomato with *bspA* gene for drought tolerance. *Biologia Plantarum*, 50(3), 352-358. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0049-6>
- Qin, D., Zhao, C. L., Liu, X. Y., & Wang, P. W. (2017). Transgenic soybeans expressing betaine aldehyde dehydrogenase from *Atriplex canescens* show increased drought tolerance. *Plant Breeding*, 136, 699-709. <https://doi.org/10.1111/pbr.12518>
- Rezaei Qusheh Bolagh, F., Solouki, A., Tohidfar, M., Zare Mehrjerdi, M., Izadi-Darbandi, A., & Vahdati, K. (2020). *Agrobacterium*-mediated transformation of Persian walnut using *BADH* gene for salt and drought tolerance. *Journal of Horticulture Science and Biotechnology*, 96, 162-171. <https://doi.org/10.1080/14620316.2020.1812446> (in Persian)
- Sandhya, D., Jogam, P., Venkatapuram, A.K., Savitikadi, P., Peddaboina, V., Allini, V.R., & Abbagani, S. (2022). Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration system for genome engineering in tomato. *Saudian Journal of Biological Sciences*, 29(6), 103292. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103292>
- Senapati, K. (2016). A review on research progress on *in vitro* regeneration and transformation of tomato. *Annual Research & Review in Biology*, 9(6), 1-9. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2016/22300>
- Sambrook, J., & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sivankalyani, V., Takumi, S., Thangasamy, S., Ashakiran, K., & Girija, S. (2014). Punctured-hypocotyl method for high-efficient transformation and adventitious shoot regeneration of tomato. *Scientia Horticulturae*, 165, 357-364. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.034>
- Sun, S., Kang, X. P., Xing, X. J., Xu, X. Y., Cheng, J., Zheng, S. W., & Xing, G.M. (2015). *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hezuo

- 908) with improved efficiency. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(5), 861-868. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1056753>
- Stavridou, E., Tzioutziou, N.A., Madesis, P., Labrou, N.E., & Nianiou-Obeidat, I., (2019). Effect of different factors on regeneration and transformation efficiency of tomato (*Lycopersicum esculentum*) hybrids. *Czech Journal of Genetic Plant Breeding*, 55(3), 1-8. <https://doi.org/10.17221/61/2018-CJGPB>
- Taghdisi Sayyar, M., Enteshari, Sh., & Daneshmand, F. (2016). The interaction of exogenous glycine betaine and water deficit on some physiologic characteristic of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) plants. *Journal of Plant Process and Function*, 5(17), 109-121, DOR: [20.1001.1.23222727.1395.5.17.3.0](https://doi.org/10.23222727.1395.5.17.3.0). (in Persian)
- Tian, F., Wang, W., Liang, C., Wang, X., Wang, G., & Wang, W. (2017). Overaccumulation of glycine betaine makes the function of the thylakoid membrane better in wheat under salt stress. *Crop Journal*, 5, 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.05.008>
- Vítová, L., Stodůlková, E., Bartoníčková, A., & Lipavská, H. (2002). Mannitol utilisation by celery (*Apium graveolens*) plants grown under different conditions in vitro. *Plant Science*, 163(4), 907-916. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00240-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00240-6)
- Yu, H.Q., Zhou, X.Y., Wang, Y.G., Zhou, S.F., Fu, F.L., & Li, W.C. (2017). A betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Ammopiptanthus nanus* enhances tolerance of *Arabidopsis* to high salt and drought stresses. *Plant Growth Regul*, 83, 265-276. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0245-0>
- Zangishei, Z., Salari, H. (2016). Monitoring the expression pattern of genes coding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) enzymes in *Arabidopsis* under drought stress, *Modern Genetics Journal*, 11(3), 349-357. (in Persian)
- Zhao, H., Zhang, Q., Zhang, M., Jin, Y. K., Jiang, Z. Z., Jiang, N., et al. (2020). Drought tolerance in high-generation transgenic maize inbred lines overexpressing the betaine aldehyde dehydrogenase gene. *Cereal Research Communication*, 49, 183-192. <https://doi.org/10.1007/s42976-020-00093-2>