

بیان ژن LEA در ژنوتیپ‌های لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) تحت تنش کمبود آب در مراحل رشد رویشی و زایشی

نرگس قره‌فانی پور^۱، محمود خدام باشی^{۲*}، بهروز شیران^۳، علیرضا مولائی^۴

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران اصلاح نباتات، دانشگاه شهرکرد

۴- پژوهشگر مرکز تحقیقات کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mkhodambashi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) گیاهی است که به تنش خشکی به ویژه در مرحله زایشی حساس می‌باشد. اخیراً یکسری ژن‌های پاسخ به تنش خشکی که میزان رونویسی آن‌ها در طی تنش افزایش یا کاهش می‌یابد شناسایی شده‌اند. از جمله ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش خشکی که در لوبیا شناسایی شده‌اند می‌توان به ژن *LEA* (Late Embryogenesis Abundant) اشاره کرد. مطالعه حاضر با هدف بررسی بیان ژن *LEA* در ۱۱ ژنوتیپ لوبیا تحت شرایط تنش کمبود آب در دو مرحله رشد رویشی و زایشی در دانشگاه شهرکرد انجام شد. تنش در مرحله رویشی با ظهور سومین برگ سه برگچه‌ای و در مرحله زایشی در جوانه‌های گل در حال گذر از میوز اعمال شد. در مرحله رویشی از برگ‌های گیاهان تحت تنش و کنترل و در مرحله زایشی از جوانه‌های گل گیاهان تحت تنش و کنترل نمونه برداری گردید. نتایج نشان داد که بیان ژن *LEA* در پاسخ به تنش کمبود آب در هر دو مرحله رشد رویشی و زایشی افزایش می‌یابد. همچنین افزایش بیان این ژن در برگ‌ها و جوانه‌های گل متفاوت بود بطوری که بر اثر تنش در برگ‌های رقم Goynok98 به ترتیب افزایشی معادل ۷۵ و ۹۵ برابر نسبت به کنترل خود و لاین حساس G-14088 مشاهده شد ولی در جوانه‌های گل لاین KS-21191 مقدار افزایش بیان ژن به ترتیب معادل ۳۶۶ و ۲۵۰ برابر نسبت به کنترل خود و لاین حساس G-14088 بود. الگوی بیان ژن *LEA* در ارقام Kara و Daneshkadeh و همچنین لاین‌های KS-21191 و KS-21189 مشابه بود. با توجه به الگوها و میزان بیان این ژن احتمالاً لاین KS-21191 نسبت به سایر ژنوتیپ‌های بررسی شده دارای مقاومت بیشتری در برابر تنش کمبود آب است.

مقدمه

حبوبات پس از غلات از مهمترین محصولات کشاورزی مورد تغذیه انسان و دام تلقی می‌شود؛ به گونه‌ای که کشت و کار آن‌ها در سرتاسر دنیا گسترش یافته است. در بین حبوبات، لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) به جهت دارا بودن بیشترین سطح زیر کشت و تولید از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Koochki and Banayan Aval 1993; Magnoon Hoseini 2008). لوبیای معمولی گیاهی است یکساله از تیره بقولات که دارای ۲۲=۲n کروموزم می‌باشد (Van Schoonhoven and Voysest 1991). خشکی یک خطر جدی برای تولید محصولات زراعی از جمله لوبیا است (Blum 1988).

واژه‌های کلیدی

الگوی بیان ،
تنش کمبود آب ،
ژن *LEA* ،
لوبیا،
RT-PCR.

محل گلخانه‌های تحقیقاتی دانشگاه شهرکرد و مرکز تحقیقات کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری به اجرا در آمد. ژنوتیپ‌های مورد بررسی در سه شرایط: ۱) بدون تنش (شاهد)، ۲) تنش کمبود آب در مرحله رویشی و ۳) تنش کمبود آب در مرحله زایشی در گلدان‌های پنج لیتری کشت و مورد ارزیابی قرار گرفتند. محتویات گلدان‌ها را ترکیبی از دو قسمت خاک زراعی، یک قسمت ماسه و یک قسمت کود دامی پوسیده تشکیل داد. در هر گلدان پنج بذر از یک ژنوتیپ کشت گردید ولی نهایتاً سه گیاه در هر گلدان نگهداری شد. برای هر ژنوتیپ در هر یک از شرایط کنترل و تنش در مراحل رویشی و زایشی پنج گلدان در نظر گرفته شد. تنش در مرحله رویشی از ظهور سومین برگ سه برگچه‌ای و در مرحله زایشی در جوانه‌های گل در حال گذر از میوز اعمال شد. معیار اعمال تنش عدم آبیاری گلدان‌ها تا رسیدن محتوای نسبی آب برگ به $2 \pm 66\%$ درصد بود. از لاین G-14088 که با توجه به بررسی‌های قبلی به عنوان ژنوتیپ حساس به تنش کمبود آب شناخته شده است برای مقایسه استفاده شد (Bayat et al. 2010).

از برگ‌ها و جوانه‌های گل گیاهان درحال تنش و شاهد نمونه برداری شد و نمونه‌ها بلافاصله به ازت مایع و سپس به فریزر -80°C درجه سانتی گراد منتقل گردید. استخراج RNA کل با استفاده از لیتیم کلراید به روش چانگ و همکاران (Chang et al. 1993) انجام شد. تعیین کمیت نمونه‌های RNA به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه بیوفتومتر ساخت شرکت اپندورف آلمان انجام شد. کیفیت نمونه‌های RNA از طریق الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و بافر MOPS یک برابر تعیین گردید. نمونه‌های دارای چهار باند مجزا به عنوان نمونه‌های با کیفیت مطلوب در نظر گرفته شد و نمونه‌های بدون باند و یا دارای اسمیر مجدداً استخراج شدند. به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی، RNA استخراج شده با DNaseI تیمار گردید و سپس ۵۰۰ نانوگرم از RNA تیمار شده برای سنتز رشته cDNA بکار برده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت Revertaid first strand cDNA synthesis kit ساخت شرکت فرمتاز (K # 1620) و با توجه به دستورالعمل آن انجام شد. پیش از انجام واکنش RT-PCR نیمه کمی، cDNA با نسبت ۱:۲ با آب استریل

تنش خشکی، خصوصاً در مرحله رشد زایشی، سبب کاهش عملکرد دانه می‌شود (Graham and Ranali 1997). تنش خشکی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گوناگون را در گیاه فعال می‌کند. اخیراً یکسری ژن‌های پاسخ به تنش خشکی شناسایی شده‌اند که سطح رونویسی آن‌ها در طی تنش خشکی افزایش یا کاهش می‌یابد و محصولات این ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی درگیر می‌باشند (Shinozaki and Yamaguchi Shinozaki 1999). از جمله ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش خشکی که در لویا شناسایی شده‌اند می‌توان به *pvp5CS*، *pvpLEA*، *pvpZIP* و *pvoCT1* اشاره کرد. ژن *LEA*، که پروتئین *LEA* (Late Embryogenesis Abundant) را کد می‌کند متعلق به گروه سه از این خانواده ژنی می‌باشد. عملکرد دقیق این پروتئین‌ها برای ۲۰ سال به صورت مبهم باقی ماند اما به تدریج پروتئین *LEA* و پروتئین‌های مشابه *LEA* یا ژن‌های آن‌ها در دانه بسیاری از گیاهان شناسایی و به موازات آن تجمع این پروتئین در اندام‌های رویشی در هنگام وقوع تنش مانند تنش‌های اسمزی گزارش شد (Zhao et al. 2011). پروتئین *LEA* در حفاظت و کمک به پایداری ماکرومولکول‌ها شامل کلروفیل و کمپلکس پروتئین-پپگمان (Liu et al. 2009) نقش دارد و همچنین این پروتئین‌ها به دلیل مولکول‌های آبی که در خود دارند از خشک شدن غشاء و سایر پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند (Maitra and Cushman 1994). در واقع رونویسی ژن *LEA* و تجمع پروتئین این ژن در بافت‌های سبز تعداد زیادی از گیاهان تحت تنش مشاهده شده است (Colmenero-Flores et al. 1997; Kavar et al. 2008). این پروتئین برای اولین بار در دانه کتان و پس از آن در گیاهانی همچون گندم، جو، برنج، ذرت، آفتابگردان، سیب زمینی و لویا شناسایی شده است (Hong-Bo et al. 2005). هدف از این پژوهش، بررسی تغییرات بیان ژن *LEA* در برگ و جوانه گل ژنوتیپ‌های لویا در اثر تنش کمبود آب در مراحل رشد رویشی و زایشی بود.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی مورد استفاده در این تحقیق تعداد ۱۱ ژنوتیپ لویا شامل ۶ رقم و ۵ لاین بود (جدول ۱). آزمایش در سال ۱۳۸۸ در

باند‌های حاصل ۳۰ سیکل مناسب تشخیص داده شد. پس از پایان تکثیر، فرآورده‌های حاصل از تکثیر PCR بروی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE ۰/۵ برابر الکتروفورز گردید. از ژل حاصل زیر نور UV عکسبرداری شد. تصاویر حاصل به نرم افزار Image J (Rasband 2011) منتقل و باندها با این نرم‌افزار کمی گردیدند. این عملیات برای ژن کنترل داخلی (Tores et al. 2006) اکتین نیز انجام شد. اعداد حاصل از ژن *LEA* نسبت به ژن اکتین و سپس نسبت به ژن کنترل رقم حساس G-14088 نسبی شده و هیستوگرام‌های مربوطه رسم شد. آزمایش در دو تکرار بیولوژیکی انجام گردید و به منظور آزمون معنی دار بودن میزان بروز ژن تحت شرایط کنترل و تنش کمبود آب، از آزمون *t* دوتایی در نرم افزار اکسل استفاده شد.

دو بار تقطیر رقیق شد و ۱/۵ میکرولیتر از cDNA رقیق شده برای واکنش PCR استفاده گردید. هر واکنش RT-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که علاوه بر cDNA، شامل ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر رفت و برگشت (جدول ۲)، ۳۰۰ میکرومولار dNTP و ۱/۲۵ واحد آنزیم Dream Taq DNA polymerase تهیه شده از شرکت فرمتاز بود.

برای انجام واکنش از ترموسایکلر اپندورف مدل Mastercycler- gradient استفاده شد. شرایط PCR برای تکثیر قطعه cDNA مورد نظر یک سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ سیکل هر یک شامل ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷ °C به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت یک دقیقه اجرا شد. به منظور تعیین تعداد سیکل مطلوب برای ژن *LEA*، بروی چهار نمونه، RT-PCR با ۲۶ تا ۳۲ سیکل انجام شد و با توجه به

جدول ۱- مشخصات ارقام و لاین‌های لوبیای مورد بررسی

ردیف	ژنوتیپ	منشاء	نوع	فرم بوته*	واکنش به کم آبی
۱	G-14088	CIAT	چیتی	تیپ III	حساس
۲	G-01437	CIAT	چیتی	تیپ III	نا معلوم
۳	KS-21189	CIAT	چیتی	تیپ III	نیمه حساس
۴	KS-21191	CIAT	چیتی	تیپ III	نیمه حساس تا متحمل
۵	KS-21486	CIAT	چیتی	تیپ I	متحمل
۶	Tylore	CIAT	چیتی	تیپ II	متحمل
۷	Khomein	Iran	چیتی	تیپ III	حساس
۸	Daneshkadeh	CIAT	سفید	تیپ III	نیمه حساس تا متحمل
۹	Kara	CIAT	سفید	تیپ IV	نا معلوم
۱۰	Goynok 98	CIAT	سفید	تیپ I	نامعلوم
۱۱	Jules	CIAT	سفید	تیپ III	نیمه حساس تا متحمل

* تیپ I رشد محدود و ایستاده، تیپ II رشد نامحدود و نیمه رونده، تیپ III رشد نامحدود و رونده، تیپ IV

رشد نامحدود و بالا رونده (Majnoon Hoseini 2008)

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

نوع آغازگر	توالی	اندازه	رفرنس
رفت (LEA-F)	CAACAGAGGACAGTCCCTATG	۳۰۰ bp	Gisele et al. (2006)
برگشت (LEA-R)	CCAACATGTCATGATGGAAAAG		

نتایج و بحث

پروتئین LEA از پروتئین‌های درگیر در پاسخ به تنش خشکی می‌باشد که توسط ژن LEA بیان می‌شود. بیان این ژن در گیاهان ترنسژن مختلف از جمله گندم و برنج سبب افزایش کارایی مصرف آب و بیوماس گردیده و تحمل به تنش خشکی را افزایش داده است. در این مطالعه بیان ژن LEA در ۱۱ ژنوتیپ لوبیا تحت تنش کمبود آب بررسی شد. الکتروفورز ژل آگارز فرآورده RT-PCR نشان داد که بیان ژن LEA در تمام ارقام و لاین‌های مورد مطالعه در هر دو شرایط کنترل و تنش قابل آشکارسازی بود (شکل ۱).

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود در بیشتر ژنوتیپ‌ها میزان نسبی بیان ژن LEA تحت تنش کمبود آب در مرحله رشد رویشی افزایش یافت، هرچند این افزایش بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف یکسان نبود. لاین Goynok98 در شرایط تنش در مرحله رشد رویشی دارای بیشترین میزان افزایش بیان ژن LEA (حدود ۹۵ برابر) نسبت به لاین حساس G-14088 در شرایط بدون تنش بود، اما نسبت به کنترل خود ۷۵ برابر افزایش بیان نشان داد. پس از آن لاین‌های KS-21191، KS-21486 و G-14088 بیشترین میزان نسبی بیان ژن LEA را نشان دادند.

افزایش بیان این ژن تحت تنش خشکی در مرحله رشد رویشی در برگ‌های لوبیا در مطالعه (Colmenero-Flores et al. 1997) و (Kavar et al. 2008) نیز گزارش شده است. مطالعه (Kavar et al. 2008) نشان از افزایش بیان نسبی ۱۸۰ برابری ژن LEA نسبت به کنترل در بافت برگ خود دارد. در سایر گیاهان زراعی نیز افزایش بیان ژن LEA تحت تنش خشکی مشاهده شده است (Park et al. 2005). نتایج حاصل از بیان ژن LEA در جوانه‌های

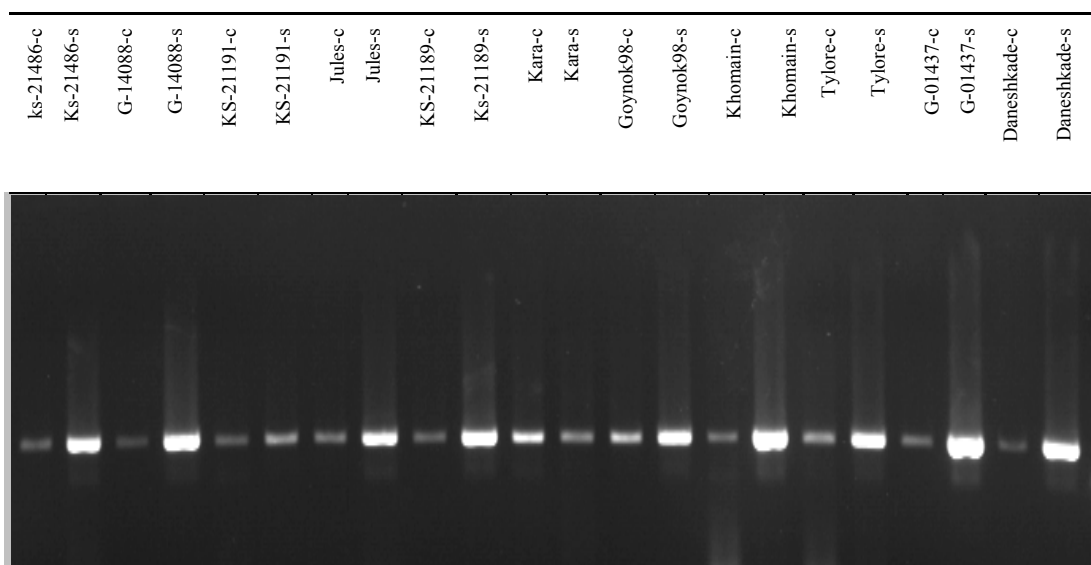
گل در شکل ۳ نشان داده شده است. هرچند همه ارقام و لاین‌های مورد مطالعه نسبت به شاهد افزایش بیان معنی‌داری نشان دادند، اما لاین KS-21191 افزایش بیان بسیار معنی‌دار ۲۵۰ برابری ($P < 0.001$) نسبت به کنترل لاین حساس G-14088 از خود نشان داد. این در حالی است که همین رقم در شرایط تنش نسبت به کنترل خود ۳۶۶ برابر افزایش بیان نشان داد. همچنین بیان این ژن در رقم سفید Jules به ترتیب به میزان ۵۰ و ۱۱۲ برابر نسبت به شرایط کنترل خود و لاین حساس G-14088 افزایش نشان داد که این افزایش بیان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بیان ژن LEA در لاین‌های KS-21189 و Goynok98 نیز بطور معنی‌داری در شرایط تنش افزایش یافت. با توجه به اینکه میزان نسبی بیان در ژنوتیپ‌های نسبتاً مقاوم به تنش خشکی لوبیا بیشتر از ارقام حساس می‌باشد، بیان این ژن و پروتئین حاصل از آن احتمالاً در مقاومت برخی از ژنوتیپ‌های لوبیا به تنش خشکی نقش دارند. بنابراین انتظار می‌رود ژنوتیپ‌هایی که تحت تنش کمبود آب برای این ژن افزایش بیان قابل توجهی نشان داده‌اند، نسبت به سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مقاومت بیشتری به تنش کمبود آب در مرحله زایشی نشان دهند. این امر در مطالعات سایر محققان نیز مشاهده شده است. برنج تراریخت که ژن LEA با نام HVA1 را از جو دریافت نموده یکی از اولین گیاهان تراریخت مقاوم به خشکی بود. این ژن افزایش بیان قابل توجهی را در برنج تراریخت ایجاد نمود و نشان داد که فرآورده این ژن سبب افزایش سرعت رشد، تاخیر در ظهور علائم تنش و بازگشت سریعتر بوته به حالت طبیعی بعد از رفع تنش می‌شود (Babu et al. 2004). (Park et al. 2005) نیز ژن LEA را از *Brasica napus* به *Brasica compestris* منتقل کرده و

بتوان گفت که ممکن است این دو رقم فاقد آلل‌های تولید کننده پروتئین *LEA* باشند. ژنوتیپ‌های Goynok98، KS-14088، KS-21486 و Tylore و Khomein نیز الگوهای بیان مشابهی برای ژن *LEA* نشان دادند (شکل ۴). هرچند میزان بیان این ژن در برگ‌های هر ۵ ژنوتیپ در اثر اعمال تنش در مرحله رویشی افزایش نشان داده است اما میزان این افزایش برای همه آنها یکسان نیست بطوری که میزان افزایش بیان این ژن در شرایط تنش در مرحله رویشی نسبت به کنترل در ژنوتیپ‌های Goynok98، KS-14088 و KS-21486 زیاد (۴۵ تا ۹۵ برابر) و در ارقام Tylore و Khomein کم (۹ تا ۱۱ برابر) است. بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً سه ژنوتیپ اول دارای مقاومت نسبتاً خوب در مقابل تنش کمبود آب در مرحله رشد رویشی هستند. با توجه به الگو و افزایش بیان ۱۱۲ برابری ژن *LEA* در رقم Jules نسبت به شاهد (شکل ۴) به نظر می‌رسد رقم مذکور رقم نسبتاً متحملی در مقابل تنش خشکی باشد. Jules قبلاً نیز در زمره ارقام نسبتاً متحمل به تنش خشکی قرار گرفته است (جدول ۱).

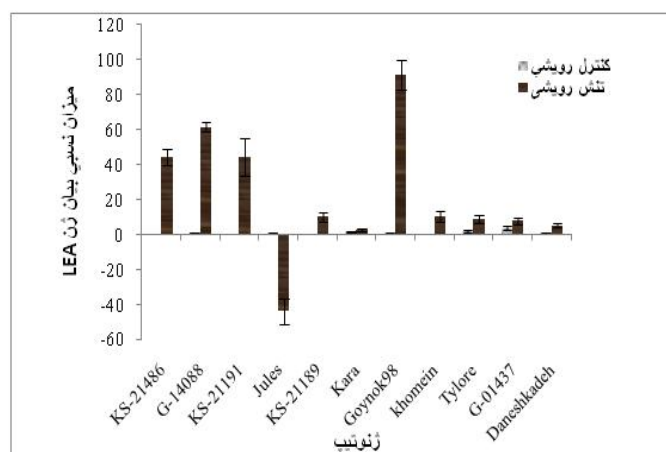
میزان تحمل به شوری و خشکی را بر روی آن آزمون نمودند و مشخص گردید گیاهان غیرتراویخت در مقابل خشکی پژمرده شدند اما گیاهان تراویخت مقاومت خوبی نشان دادند و بطور نسبی پژمردگی برگ کمتری داشتند.

از مقایسه میزان نسبی بیان ژن *LEA* در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شاید بتوان گفت که میزان مقاومت به خشکی در مرحله رشد رویشی به ترتیب در ژنوتیپ‌های Goynok98، KS-21191 و KS-21486 و در مرحله رشد زایشی به ترتیب در ژنوتیپ‌های KS-21191، Jules، KS-21189 و Goynok98 بیشتر باشد. البته برای تایید این مطلب بهتر است ژنوتیپ‌ها در شرایط کنترل و تنش کمبود آب در مزرعه مورد مقایسه قرار گیرند. هرچند که تحمل نسبی برخی از آنها قبلاً مشخص شده است (جدول ۱).

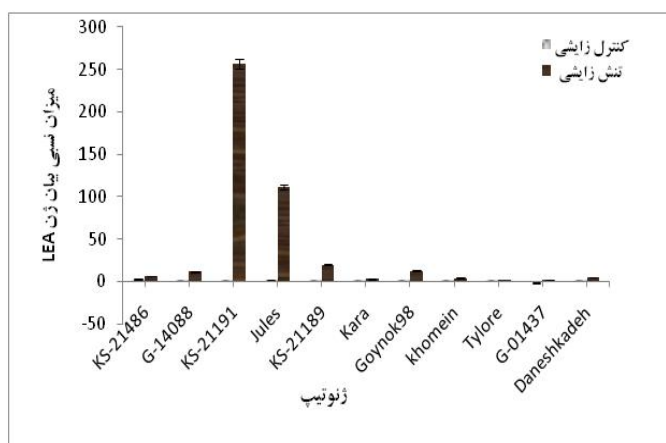
الگوی بیان ژن *LEA* در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در شکل ۴ نشان داده شده است. دقت در الگوهای بیان این ژن نشان می‌دهد که ارقام Kara و Daneshkadeh دارای الگوی مشابهی بوده و ژن *LEA* در برگ و جوانه‌های گل آنها در اثر تنش در هر یک از مراحل رشد رویشی و زایشی به یک اندازه بیان شده است. با توجه به اینکه در این دو رقم افزایش بیان این ژن در اثر تنش نسبت به کنترل قابل توجه نمی‌باشد (حدود ۲/۵ تا ۵ برابر)، شاید



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز فراورده RT-PCR مربوط به بیان ژن *LEA* در برگ‌های ۱۱ ژنوتیپ لوبیا تحت تنش خشکی



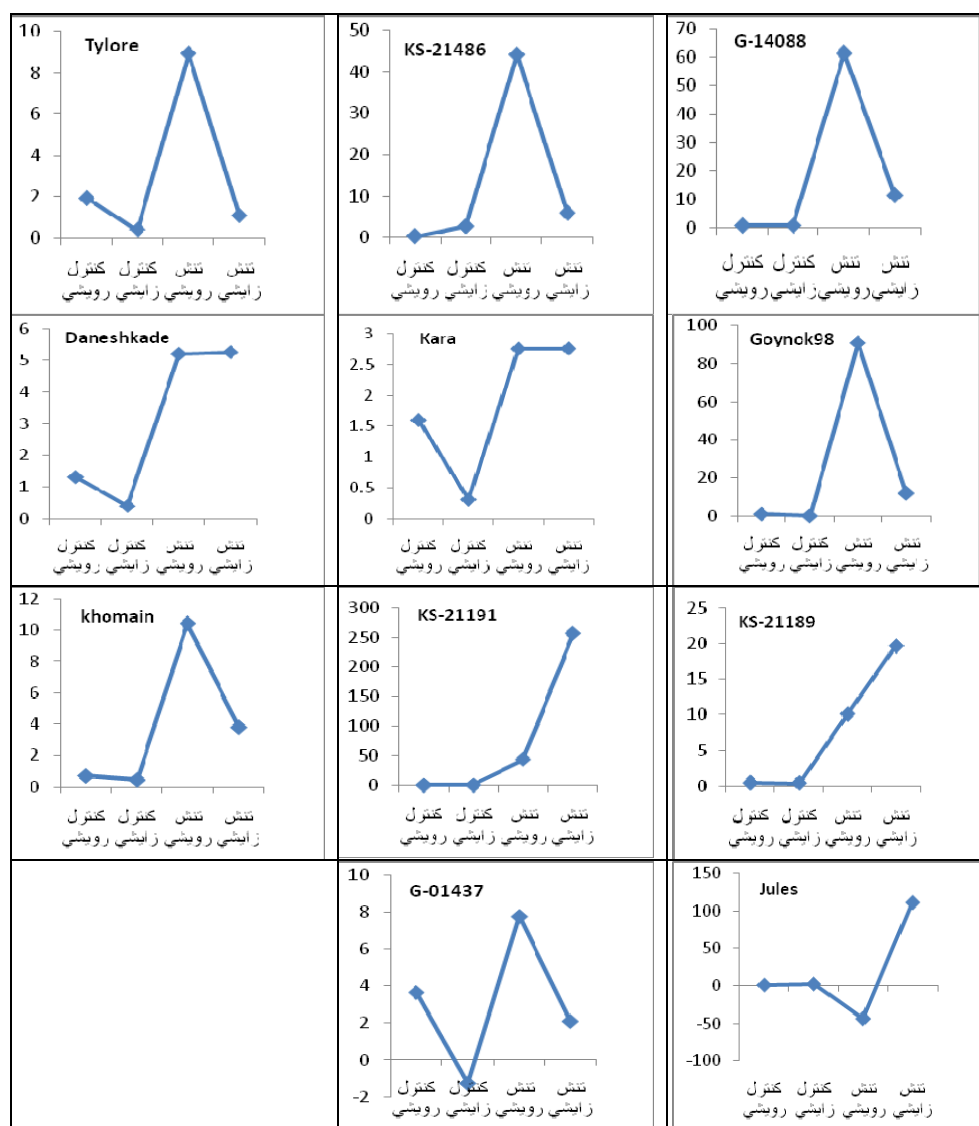
شکل ۲- نمودار میزان بیان ژن LEA در ژنوتیپ‌های لوبیا تحت تنش خشکی در مرحله رویشی



شکل ۳- نمودار میزان نسبی بیان ژن LEA در ژنوتیپ‌های لوبیا تحت تنش خشکی در مرحله زایشی

می‌شود ژنوتیپ‌های مورد بررسی در مزرعه و در هر دو شرایط بدون تنش و تنش کمبود آب از نظر عملکرد دانه و سایر خصوصیات مرتبط با آن مورد ارزیابی قرار گیرند و نتایج حاصل از هر دو آزمایش مزرعه‌ای و مولکولی با همدیگر مقایسه شوند. همچنین پیشنهاد می‌شود در یک آزمایش مشابه نمونه برداری در زمان‌های مختلف پس از وقوع تنش انجام شود تا بتوان روند تغییرات بیان ژن LEA در زمان‌های مختلف پس از وقوع تنش را بررسی کرد. همچنین با استخراج پروتئین LEA می‌توان همبستگی آن را با میزان بیان ژن بررسی نمود.

بطور کلی بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان اظهار داشت که تنش کمبود آب در هر یک از مراحل رشد رویشی و زایشی باعث افزایش بیان ژن LEA در لوبیا می‌شود، اما این افزایش بیان در جوانه‌های گل نسبت به بافت برگ بیشتر است. الگوهای بیان این ژن نیز در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بوده و لاین KS-21191 در شرایط تنش خشکی نسبت به شاهد افزایش بیان ۲۵۰ برابری نشان داده است. لذا با توجه به اینکه افزایش قابل توجه بیان ژن LEA یکی از نشانه‌های مقاومت به خشکی است، شاید بتوان گفت که لاین مذکور نسبت به سایر ژنوتیپ‌های مطالعه شده در این آزمایش از پتانسیل مقاومت به خشکی بیشتری برخوردار می‌باشد. برای تایید این مطلب پیشنهاد



شکل ۴- الگوی بیان ژن *LEA* در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تحت شرایط تنش در مراحل رویشی و زایشی

منابع

Babu RC, Zhang J, Blum A, David-Ho TH, Wu R, Nguyen HT (2004) HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science* 166: 855-862.

Bayat AA, Sepehri A, Ahmadvand G, Dorri HR (2010) Effect of water deficit stress on yield and yield components of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Iranian Journal of Crop Sciences* 12 (1):42- 54. (In Farsi).

Blum A (1988) Plant breeding for stress environments. CRC Press, USA 222: 46-55.

Chang S, Puryear L, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine tree. *Plant Molecular Biology Reporter* 11(2): 113-116.

Colmenero-Flores JM, Campos F, Garciarrubio A and Covarrubias AA (1997) Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Molecular Biology* 35: 393-405.

Graham PH, Ranalli P (1997) Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research* 53: 131-146.

- Hong-Bo S, Zong-Suo L, Ming-An S (2005) LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces Biointerfaces* 45: 131–135.
- Kavar T, Maras M, Kidric M, Sustar-Vozic J, Meglic V (2008) Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding* 21: 159–172.
- Koocheki A, Banayan Aval M (1993) Pulses production. University Jihad Press, Mashhad. (In Farsi).
- Liu X, Wang Z, Wang L, Wu R, Phillips J, Deng X (2009) LEA 4 group genes from the resurrection plant *Boea hygrometrica* confer dehydration tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science* 176: 90-98.
- Maitra N, Cushman JC (1994) Isolation and characterization of a drought-induced soybean cDNA encoding a D95 family late-embryogenesis-abundant protein. *Plant Physiology* 106: 805-806.
- Majnoun Hoseini N, (2008) Grain legume production, 4th edn. University Jihad Press, Tehran. (In Farsi).
- Park BJ, Liu Z, Kanno A, Kameya T (2005) Genetic improvement of Chinese cabbage for salt and drought tolerance by constitutive expression of a *B. napus* LEA gene. *Plant Science* 169: 553–558.
- Rasband WS (2011) Image J. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1999) Molecular responses to cold, drought, heat, and salt stress in higher plant. R. G. Landes Company.
- Torres GMA, Pflieger S, Corre-Menguy F, Mazubert C, Hartmann C, Lelandais-Briere C (2006) Identification of novel drought-related mRNAs in common bean roots by differential display RT-PCR. *Plant Science* 171: 300-307.
- Van Schoonhoven A, Voysest O (1991) Common Beans: Research for Crop Improvement. Wallingford: CAB International, in association with CIAT, pp. 980.
- Zhao PS, Liu F, Zheng G, Liu H (2011) Group 3 late embryogenesis abundant protein in Arabidopsis: structure, regulation, and function. *Acta Physiologia Plantarum* 33: 1063-1073.