ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحه ۲۴۰- ۲۳۳

Downloaded from mg.genetics.ir at 12:33 +0330 on Wednesday September 22nd 2021

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

نرگس قره‌قانی پور[۱]، محمود خدام باشی[۲*]، بهروز شیران[۳]، علیرضا مولائی[۴]

۱،۲و۳- 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. اخیرا 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 احتمالا لاین KS-21191 نسبت به سایر ژنوتیپ‌های بررسی شده دارای مقاومت بیشتری در برابر تنش کمبود آب است.

واژه‌های کلیدی

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

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 ۲n=۲۲ کروموزم می باشد (Van Schoonhoven and Voysest 1991). خشکی یک خطر جدی برای تولید محصولات زراعی از جمله لوبیا است (Blum 1988).

Downloaded from mg.genetics.ir at 12:33 +0330 on Wednesday September 22nd 2021

تنش خشکی، خصوصا 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 لوبیا شناسایی شده‌اند می‌توان به pvP5CS، pvLEA، pvbZIP و pvOCT1 اشاره کرد. ژن *LEA*، که پروتئین LEA (LateEmbryogenesis 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-پیگمان (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 Cuhman 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 لوبیا شناسایی شده است (Hong-Bo et al. 2005). هدف از این پژوهش، بررسی تغییرات بیان ژن *LEA* در برگ و جوانه گل ژنوتیپ‌های لوبیا 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 لوبیا شامل ۶ رقم و ۵ لاین بود (جدول ۱). آزمایش در سال ۱۳۸۸ در 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 نهایتا سه گیاه در هر گلدان نگهداری شد. برای هر ژنوتیپ در هریک 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 گلدان ها تا رسیدن محتوای نسبی آب برگ به ۲ ± ۶۶ 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 ۸۰- 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 اگارز ۱/۵درصد و بافر MOPS یک برابر تعیین گردید. نمونه های دارای چهار باند مجزا به عنوان نمونه های با کیفیت مطلوب در نظر گرفته شد و نمونه های بدون باند و یا دارای اسمیر مجددا استخراج شدند. به منظور حذف آلودگی DNAی ژنومی، RNAی 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 فرمنتاز (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

Downloaded from mg.genetics.ir at 12:33 +0330 on Wednesday September 22nd 2021

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 (جدول۲)، ۳۰۰ میکرومولار dNTP و ۱/۲۵ واحد آنزیم Dream *Taq* DNA polymerase تهیه شده از شرکت فرمنتاز بود.

برای انجام واکنش از ترموسایکلر اپندورف مدل Mastercycler-gradiant 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 $^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷$^{\circ}C$ به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲$^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه اجرا شد. به منظور تعیین تعداد سیکل مطلوب برای ژن *LEA* ، برروی چهار نمونه، RT-PCR با ۲۶ تا ۳۲ سیکل انجام شد و با توجه به باندهای حاصل ۳۰ سیکل مناسب تشخیص داده شد. پس از پایان تکثیر، فرآورده‌های حاصل از تکثیر PCR بروی ژل آگارز ۱/۵درصد 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.

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)

Downloaded from mg.genetics.ir at 12:33 +0330 on Wednesday September 22nd 2021

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

پروتئینLEA 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.

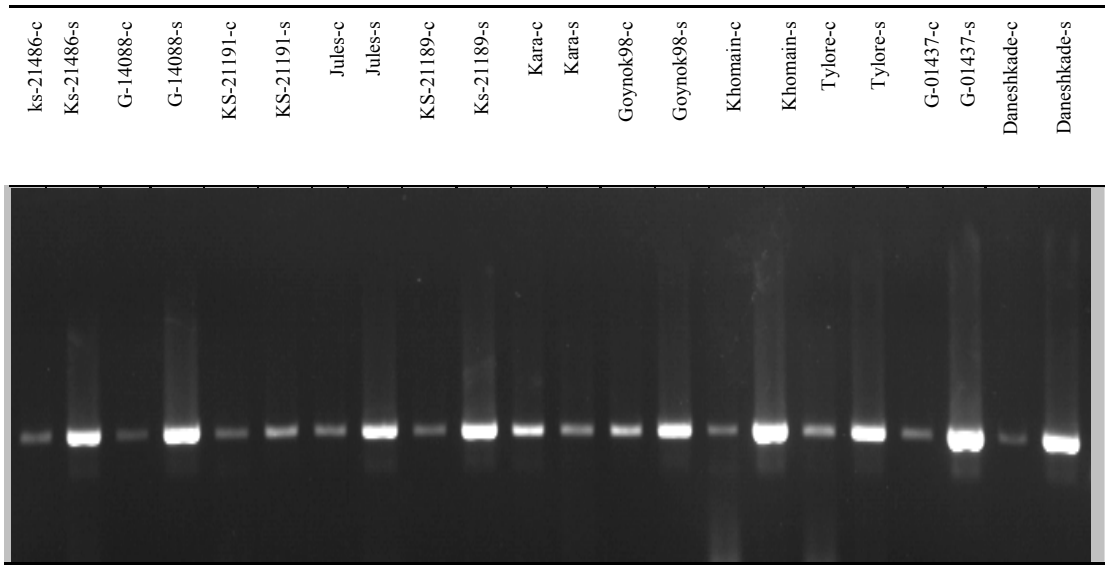
افزایش بیان این ژن تحت تنش خشکی در مرحله رشد رویشی در برگ‌های لوبیا در مطالعه (Colmenero-Flores et al. 1997) و (Kavar et al. 2008) نیز گزارش شده است. مطالعه (Kavar et al. 2008) نشان از افزایش بیان نسبی ۱۸۰ برابری ژن *LEA* نسبت به کنترل در بافت برگی خود دارد. در سایر گیاهان زراعی نیز افزایش بیان ژن *LEA* تحت تنش خشکی مشاهده شده است (Park et al. 2005). نتایج حاصل از بیان ژن *LEA* در جوانه های 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 معنی دار 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 معنی داری در شرایط تنش افزایش یافت. با توجه به اینکه میزان نسبی بیان در ژنوتیپ‌های نسبتا 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

Downloaded from mg.genetics.ir at 12:33 +0330 on Wednesday September 22nd 2021

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

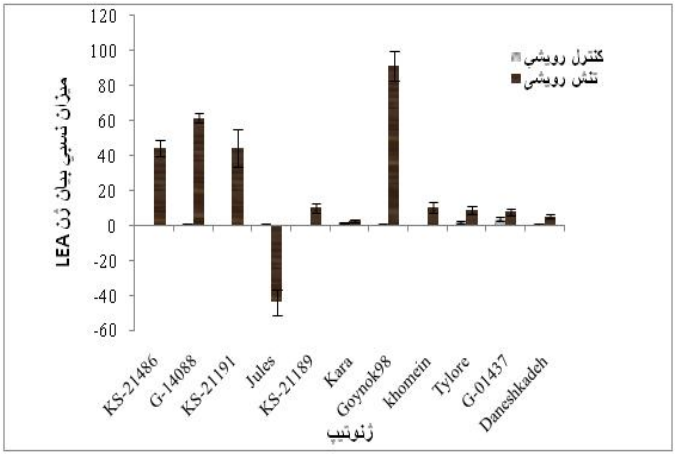
از مقایسه میزان نسبی بیان ژن *LEA* در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شاید بتوان گفت که میزان مقاومت به خشکی در مرحله رشد رویشی به ترتیب در ژنوتیپ‌های Goynok98، KS-21191 و KS-21486 و در مرحله رشد زایشی به ترتیب در ژنوتیپ‌های KS-21191، Jules، KS-21189 وGoynok98 بیشتر باشد.. البته برای تایید این مطلب بهتر است ژنوتیپ‌ها در شرایط کنترل و تنش کمبود آب در مزرعه مورد مقایسه قرار گیرند. هرچند که تحمل نسبی برخی از آن‌ها قبلا 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 بتوان گفت که ممکن است این دو رقم فاقد آلل‌های تولید کننده پروتئین LEA باشند. ژنوتیپ‌های Goynok98، G-14088، KS-21486، 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، G-14088 و KS-21486 زیاد (۴۵ تا ۹۵ برابر) و در ارقام Tylore و Khomein کم (۹ تا ۱۱ برابر) است. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که احتمالا سه ژنوتیپ اول دارای مقاومت نسبتا 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 نسبتا متحملی در مقابل تنش خشکی باشد. رقم Jules قبلا نیز در زمره ارقام نسبتا متحمل به تنش خشکی قرار گرفته است (جدول ۱).

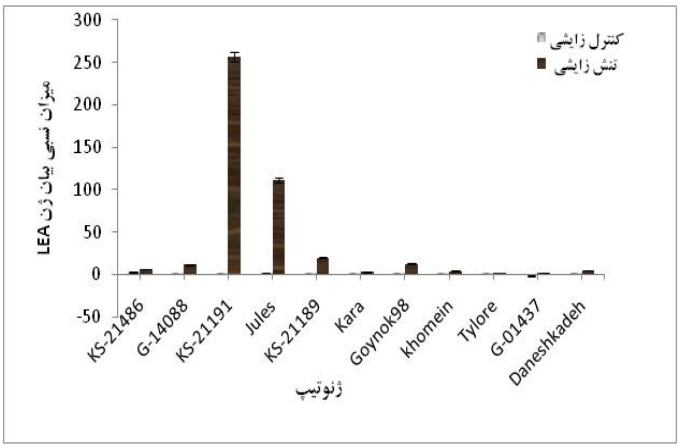


شکل۱- الکتروفورز ژل آگارز فرآورده RT-PCR مربوط به بیان ژن *LEA* در برگ‌های ۱۱ ژنوتیپ لوبیا تحت تنش خشکی

Downloaded from mg.genetics.ir at 12:33 +0330 on Wednesday September 22nd 2021



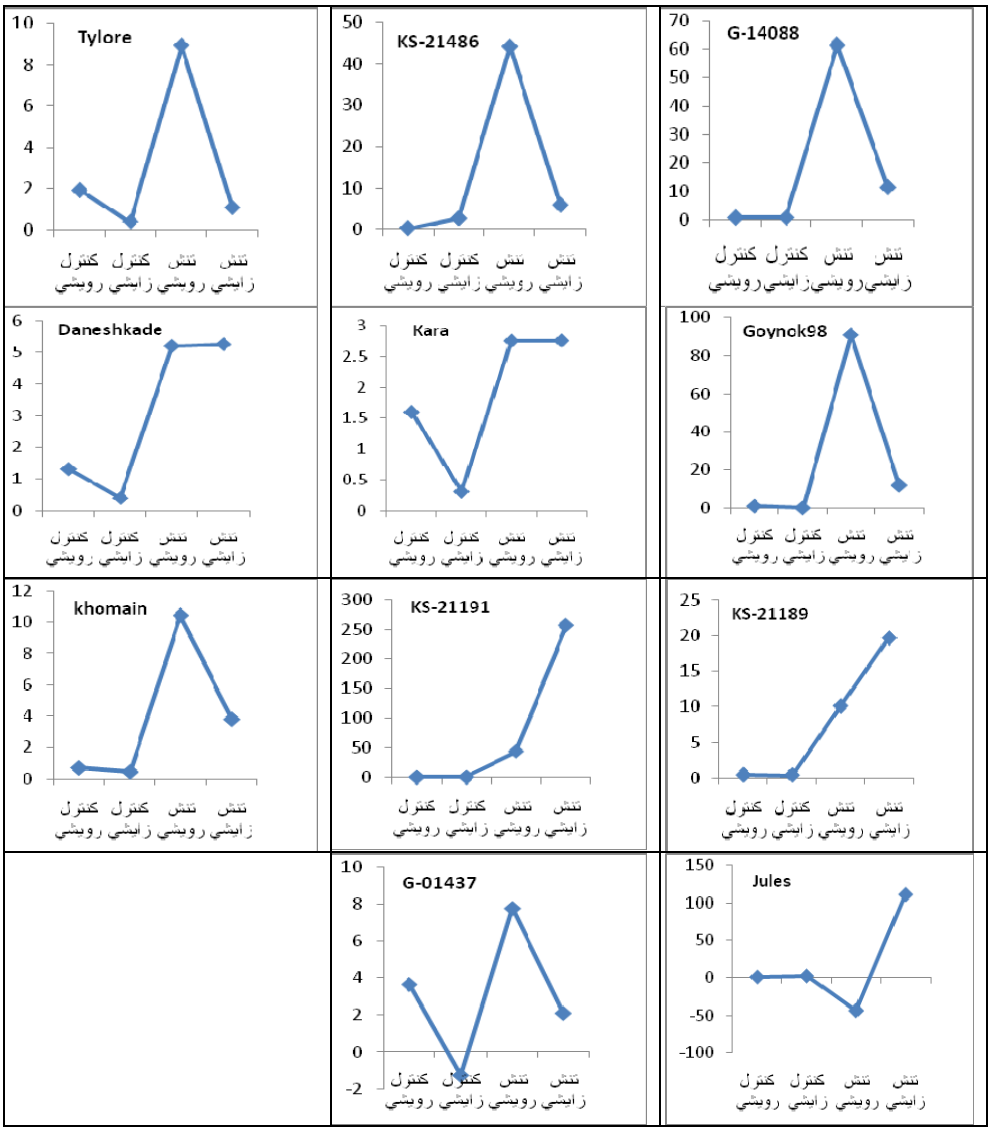
شکل۲- نمودار میزان بیان ژن *LEA* در ژنوتیپ‌های لوبیا تحت تنش خشکی در مرحله رویشی



شکل۳- نمودار میزان نسبی بیان ژن *LEA* در ژنوتیپ‌های لوبیا تحت تنش خشکی در مرحله زایشی

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 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. مچنین با استخراج پروتئین LEA می‌توان همبستگی آن را با میزان بیان ژن بررسی نمود.

Downloaded from mg.genetics.ir at 12:33 +0330 on Wednesday September 22nd 2021



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, Cuhman 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.

Downloaded from mg.genetics.ir at 12:33 +0330 on Wednesday September 22nd 2021