

ارزیابی تغییر پذیری‌های بیوشیمیایی و مولکولی شماری از ژنوتیپ‌های لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) در شرایط تنش خشکی

الهام سلطانی^۱، عبدالهادی حسین‌زاده^{۲*} و علی‌رضا عباسی^۳

۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۳)

چکیده

به منظور بررسی تأثیر بیوشیمیایی و مولکولی تحمل به تنش خشکی ژنوتیپ‌های K-S-31167، GE-288 و Naz به دست آمده از غربالگری آزمون جوانه‌زنی در سطوح تنش خشکی ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به همراه شاهد در مرحله گیاهچه‌ای بررسی شد. تنش خشکی پنج هفته پس از کاشت بذر اعمال و ده روز پس از اعمال تنش نمونه‌گیری از سه برگچه دوم انجام شد. نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث تغییر در نشت یونی، پرولین و کربوهیدرات‌های محلول می‌شود. ژنوتیپ متحمل K-S-31167 نسبت به دو ژنوتیپ به نسبت متحمل GE-288 و حساس Naz نشت یونی کمتر داشت که نشان‌دهنده پایداری غشایی بالاتر این ژنوتیپ در شرایط تنش است. محتوای پرولین بیشتر در ژنوتیپ K-S 31167 نشان‌دهنده سامانه پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) قوی‌تر این ژنوتیپ نسبت به دو ژنوتیپ GE-288 و Naz است. نتایج به دست آمده از سنجش کربوهیدرات‌های محلول و بیان ژن‌های اینورتاز و اکونلی و سوکروز سنتاز نیز نشان داد که افزایش و کاهش بیان این ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی به ترتیب باعث افزایش و کاهش فعالیت آنزیم‌های اینورتاز و سوکروز سنتاز و در نهایت افزایش و کاهش غلظت مواد محلول در یاخته‌ها شده و به عنوان یک نشانه سوخت‌وسازی (متابولیک) در پاسخ به تنش عمل می‌کند.

واژه‌های کلیدی: اینورتاز و اکونلی، بیان ژن، تنش خشکی، سوکروز سنتاز، کربوهیدرات‌های محلول، لوبیا.

Biochemical and molecular changes in three genotypes of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under drought stress

Elham Soltani¹, Abdol Hadi Hosseinzadeh^{2*} and Alireza Abbasi³

1, 2, 3. Former M. Sc. Student and Associate Professors, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Dec. 5, 2015 - Accepted: Jun. 24, 2015)

ABSTRACT

Drought stress is one of the major causes of reduction in crop production. Study physiological and biochemical processes related to drought stress can give better insight about mechanism of drought tolerance. To study the physiological and biochemical processes, three genotypes including K-S-31167, GE-288 and Naz were subjected to 3 level of drought stress based on 25, 50 and 100 percent of field capacity using CRD design with three replication using Factorial arrangement, Drought stress was applied five weeks after planting and lasted for 10 days. Second trifoliate were used for sampling. The results indicated significant changes in the electrolyte leakage (EL), prolin content (PC) and carbohydrates content (CC). Tolerant genotype (K-S-31167) had greater PC but lesser EL compare to relatively tolerant genotype (GE-288) and sensitive genotype (Naz). This indicates that tolerant genotype had higher membrane stability during stress. Results from measurement of soluble carbohydrate and expression of *sucrose synthase* and *vacuolar invertase* genes showed increase and decrease in the expression of these genes resulted in increase and decrease in the activity of the invertase and sucrose synthase enzyme which in turn influences the concentration of soluble materials which acts as metabolic signal in response to stress.

Keywords: common bean, drought, expression gene, soluble carbohydrates, *sucrose synthase*, *vacuolar invertase*.

مقدمه

در بین حبوبات، لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) به جهت داشتن بیشترین سطح زیر کشت و تولید اهمیت ویژه‌ای دارد (FAO, 2013). تولید این محصول در بسیاری از نقاط جهان به دلیل تنش خشکی تهدید می‌شود (Singh, 2007).

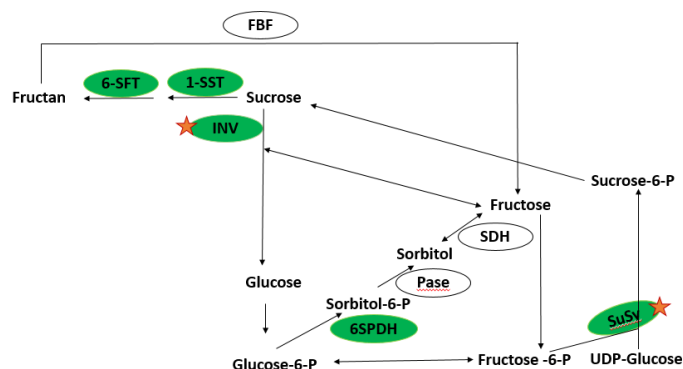
در شرایط تنش‌های محیطی مانند خشکی، نشت یونی غشای یاخته و پرولین که گروه مهمی از تنظیم‌کننده‌های اسمزی است تغییر می‌کند. پلاسما لما از جمله نخستین اندام‌هایی است که در شرایط تنش آسیب می‌بیند (Levitt et al., 1980). در آزمایشی که روی دو رقم حساس و دو رقم متحمل به خشکی لوبیای معمولی انجام گرفت مشاهده شد، با اعمال تنش خشکی، رقم‌های متحمل لوبیا نشت یونی پایین‌تری نسبت به رقم‌های حساس داشتند (Franca et al., 2000). همچنین در آزمایشی که روی یازده رقم نخود در شرایط مطلوب آبیاری و تنش خشکی صورت گرفت مشخص شد، رقم‌های متحمل نخود غلظت پرولین بالا و نشت یونی پایین‌تری نسبت به رقم‌های حساس داشتند و همبستگی مثبتی بین پرولین و نشت یونی وجود داشت و از این معیارها می‌توان در جهت شناسایی رقم‌های متحمل به خشکی نخود استفاده کرد (Gunes et al., 2008). تصور می‌شود پرولین در سازگاری به تنش‌های غیرزنده مانند خشکی و شوری با افزایش پتانسیل اسمزی یاخته‌ها، حفاظت از پروتئین‌ها، غشاها و ساختارهای یاخته‌ای در برابر تنش اکسایشی (اکسیداتیو) یا کم‌آبی نقش دارد (Molinari et al., 2004).

قندها نیز در شرایط تنش‌های غیرزنده، به‌طور غیرمستقیم و با تنظیم کربوهیدرات‌ها نقش مهمی را در فرآیند رشد و گسترش گیاه بازی می‌کنند. بیان شماری زیادی از ژن‌های پاسخ به تنش، توسط پیام‌رسانی گلوکز گزارش شده است که نشان‌دهنده نقش قندها در پاسخ به شرایط محیطی است (Price et al., 2004). قند ساکارز به‌عنوان یک مولکول دهنده نشانه (سیگنال) بر فعالیت پروتون-ساکارز-سیمپورتر تأثیر می‌گذارد. ناقل ساکارز به‌عنوان حسگر (سنسور)

ساکارز عمل می‌کند و در بارگذاری آوند آبکش درگیر می‌شود (Barker et al., 2000). ساکارز بستره‌ای (سوبسترای) برای ساخت (سنتز) فروکتان در واکوئل است. فروکتان‌ها بسیار (پلیمر)های محلول فروکتوز هستند که در گیاهان، در شرایط تنش خشکی و سرما نقش محافظتی دارند (Valliyodan & Nguyen, 2006). قندها مانند هورمون‌ها می‌توانند به‌عنوان پیام‌بر اولیه عمل کنند و نشانه‌هایی را تنظیم کنند که بیان ژن‌های مختلف درگیر در سوخت‌ساز (متابولیسم) قند را کنترل می‌کنند (Roitsch, 1999). تاکنون یک‌چند ژن‌های پاسخ به تنش خشکی شناسایی شده اند که میزان رونویسی آن‌ها در فرآیند تنش افزایش یا کاهش می‌یابد (Krasensky & Jonak, 2012) (شکل ۱). از جمله ژن‌های درگیر در پاسخ به تنش خشکی که در لوبیا شناسایی شده‌اند می‌توان به ژن اینورتاز واکوئلی (*vinv*)^۱ و سوکروز سنتاز (*susy*)^۲ اشاره کرد. INV و SUSY آنزیم‌های مهم دخیل در سوخت‌وساز ساکارز هستند و ساخت ساکارز با تغییر تند در فعالیت سنتاز فسفات ساکارز (SPS)، SUSY و INV تنظیم می‌شود. SPS، ساکارز فسفات را از یوراسیل دی فسفات-گلوکز (UDP-glucose) و فروکتوز ۶- فسفات کاتالیز می‌کند (شکل ۱) (Krasensky & Jonak, 2012).

اثرگذاری تنش خشکی بر فعالیت SUSY و INV در گیاهان مختلف گزارش شده است (Naya et al., 2007). برخی از محققان دریافتند که کمبود آب منجر به افزایش فعالیت SUSY در غده سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) و برگ سویا (*Glycine max*) (Cheikh & Brenner, 1992; Geigenberger et al., 1997) می‌شود.

این تحقیق با هدف بررسی تغییرپذیری پرولین، کربوهیدرات‌های محلول و بیان ژن‌های *susy* و *vinv* در شرایط تنش خشکی در شماری از ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی انجام پذیرفته است.



شکل ۱. ژن‌های دخیل در مسیر زیست‌ساختی کربوهیدرات‌ها (Krasensky & Jonak, 2012).

* ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق با ستاره مشخص شده است.

● افزایش بیان ژن - اثرگذاری مثبت بر تحمل تنش

Figure 1. Genes involved in the biosynthesis of carbohydrates (Krasensky and Jonak, 2012)

*Genes studied in this study are shown with star.

● Overexpression – positive effect on stress tolerance

1-SST, sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase; 6-SFT, sucrose:fructan 6-fructosyltransferase; FBF, fructan beta-fructosidase; SuSy:sucrose synthase; INV:invertase; 6SPDH, sorbitol-6-phosphate dehydrogenase; SDH, sorbitol dehydrogenase; Pase, unspecific phosphatase.

ظرفیت زراعی خاک آبیاری صورت گرفت و پس از پنج هفته از کشت گیاهان، تیمارهای مختلف آزمایشی اعمال شد. روش اعمال تنش بدین صورت بود که هر روز گلدان‌ها را وزن کرده و بر پایه سطح تنش مربوط به آن‌ها و با توجه به میزان آبی که خاک از دست داده بود آبیاری انجام شد. در نهایت ده روز پس از اعمال تنش برای انجام آزمایش‌ها از سه برگچه دوم گیاهان نمونه برگ‌گی گرفته شد.

اندازه‌گیری نشت یونی (EL)

اندازه‌گیری نشت یونی به روش (Lutts *et al.* (1996) انجام شد و در نهایت نشت یونی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$ELI = (EC_1/EC_2) \times 100$$

EC₁: هدایت الکترولیتی اول

EC₂: هدایت الکترولیتی دوم.

اندازه‌گیری محتوای پرولین

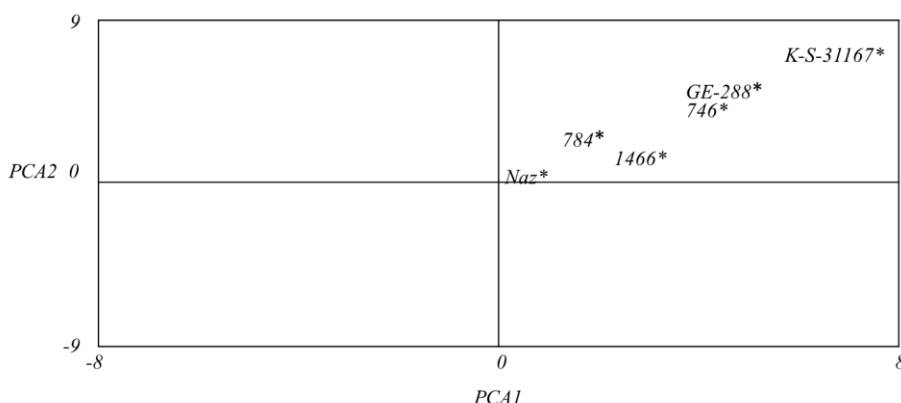
اندازه‌گیری محتوای پرولین بر مبنای روش Bates *et al.* (1973) انجام و با توجه به منحنی استاندارد پرولین در دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفوتومتر Shimadzu uv-160) در طول موج ۵۲۰ نانومتر غلظت

پرولین تعیین شد.

مواد و روش‌ها

آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب کامل تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۲ در گلخانه گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) انجام شد. سطوح آبیاری شامل آبیاری معمولی، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به عنوان عامل اول و ژنوتیپ‌های به دست آمده از غربالگری آزمون جوانه‌زنی (شکل ۲) شامل ژنوتیپ متحمل (K-S-31167)، به نسبت متحمل (GE-288)، حساس (Naz) به عنوان عامل دوم در نظر گرفته شدند. در آغاز خاک موجود در گلخانه به نسبت ۳:۲ با ماسه بادی مخلوط شد ظرفیت زراعی (FC)^۱ خاک نیز با استفاده از دستگاه دیسک صفحه فشاری^۲ اندازه‌گیری شد که میزان آن ۱۸ درصد بود. شمار پنج عدد بذر ضدعفونی شده (با هیپوکلرید ۲ درصد) از هر ژنوتیپ در گلدان‌های سفالی ۲ کیلوگرمی کشت شد. پس از ظهور برگ‌های اصلی، گلدان‌ها با نگر داشت سه بوته در هر گلدان تنک شدند و گیاهان در شرایط نوری شامل ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در آغاز به اندازه

1. Field Capacity
2. Pressure plate



شکل ۲. پراکنش ژنوتیپ‌های لوبیا بر پایه عامل اول و دوم ژنوتیپ‌های لوبیا در شرایط تنش خشکی.

Figure 2. Distribution of bean genotypes on the basis of the first and the second components under drought stress condition.

اندازه‌گیری بیان ژن‌های *susy* و *vinv*

اندازه‌گیری بیان ژن‌های *vinv* و *susy* روی سه ژنوتیپ K-S-31167، GE-288 و Naz در بافت برگ در مرحله رویشی صورت گرفت. به این ترتیب که در آغاز آغازگرهای ژن‌های *vinv* و *susy* به عنوان ژن‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار اینترنتی Primer3 و DNA integrated technology طراحی شدند و از شرکت‌های سازنده ساخت اسیدهای نوکلئیک سفارش خرید صورت پذیرفت. آغازگر مربوط به ژن مرجع اکتین (*act*) نیز بر پایه مقاله Borges *et al.* (2012) انتخاب شد (جدول ۱).

اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول گلوکز، فروکتوز و ساکارز

برای سنجش کربوهیدرات‌های محلول، عصاره به روش Shin *et al.* (2002) استخراج شد و جداسازی قند با استفاده از دستگاه HPLC ساخت انگلستان مدل 200 unickam-crystal مجهز به دتکتور uv-vis spd از نوع photodiode array صورت گرفت سپس با استفاده از نمونه‌های استاندارد نوع و مقدار قندها در نمونه‌های مجهول مشخص شد (Comis *et al.*, 2001).

جدول ۱. آغازگرهای طراحی شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی برای بررسی بیان ژن‌های *vinv* و *susy* و سوکروز سنتاز در ژنوتیپ‌های K-S-31167، GE-288 و Naz در سه سطح تیماری شاهد، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی.

Table 1. primers designed for Real-Time PCR to evaluate the expression of *susy* and *vinv* in genotypes KS-31167, GE-288 and Naz at three levels in the control, 50 and 25% FC.

Access no.	Primer name	Primers sequences (5'-3')	Product size (bp)	Tm (c°)
FJ853595	PvSusy	F: ACCTGACCCTTTCACCCCTTG R: TGTAACAACAACCTTGCCCCACCA	137	59.52 58.97
U92438	PvVinv	F: CGTCCCTCATGATCACGTC R: TGGATGACTTCTCCGACACC	135	59.5 60.5
KF033476	Act	F: AGCCGTTGAGAAGAGCTATGAG R: TGTATGTTGTCTCGTGAATGCC	137	59.9 59

معمولی با دستگاه ترموسایکلر تأیید شد. آنگاه در نهایت بیان کمی ژن مورد نظر به روش بیان واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (REAL-TIME PCR) در دستگاه icycler شرکت BioRad انجام گرفت. هر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۱۰ میکرولیتر 2x SYBR Biopars (GUASNAR)، ۱ میکرولیتر آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو (غلظت ۱۰

RNA با روش بایوزول استخراج شد. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و برای تعیین کمیت از دستگاه نانودراپ استفاده شد. ساخت cDNA با توجه به دستورکار شرکت فرمنتاز انجام شد. در مرحله بعد در آغاز درستی افزایش قطعه توالی از ژن مورد نظر توسط آغازگر (پرایمر) سفارشی با استفاده از روش PCR

داده‌های به‌دست‌آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس نشان داد که نشت یونی، تغییر محتوای پرولین و کربوهیدرات‌های محلول (گلوکز، فروکتوز و ساکارز) تحت تأثیر ژنوتیپ و سطح تنش بوده و تفاوت معناداری در سطح احتمال ۱ درصد بین ژنوتیپ‌ها و سطوح مختلف تنش وجود دارد (جدول ۲).

پیکومول)، ۵ میکرولیتر cDNA و ۳ میکرولیتر آب مقطر بود. برنامه دستگاه شامل مرحله اول: ۱۸۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سلسیوس، مرحله دوم: ده ثانیه دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ده ثانیه دمای ۵۹ درجه سلسیوس و سی ثانیه دمای ۷۲ درجه سلسیوس به شمار ۳۵ چرخه بود.

تجزیه واریانس و آزمون مقایسه میانگین صفات به روش دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد با نرم‌افزار SAS انجام شد. برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد. آغازگرهای ژن‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار اینترنتی 3 Primer طراحی و

جدول ۲. تجزیه واریانس نشت یونی، محتوای پرولین و محتوای کربوهیدرات‌های محلول (گلوکز، فروکتوز و ساکارز) ژنوتیپ‌های K-S-31167، GE-288 و Naz لوبیا در سه سطح تیماری شاهد، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی.

Table 2. Analysis of variance for RWC, EL and soluble carbohydrates in bean genotypes K-S-31167, GE-288 and Naz at three levels control, 50 and 25% of field capacity.

ANOVA	df	Mean squares				
		EL	Prolin	Glucose	Faructose	Sucrose
Genotypes	2	0.14**	0.04**	19353.14**	1783.23**	3758.26**
Stress	2	0.41**	0.38**	2619.89**	2003.56**	18854.43**
Genotypes × Stress	4	0.04**	0.01**	605.92**	1506.30**	757.99**
Error	18	0.0005	0.0002	7.65	5.48	8.68
CV		7.75	4.59	2.76	3.21	2.02

** Significant ($P \leq 0.01$).

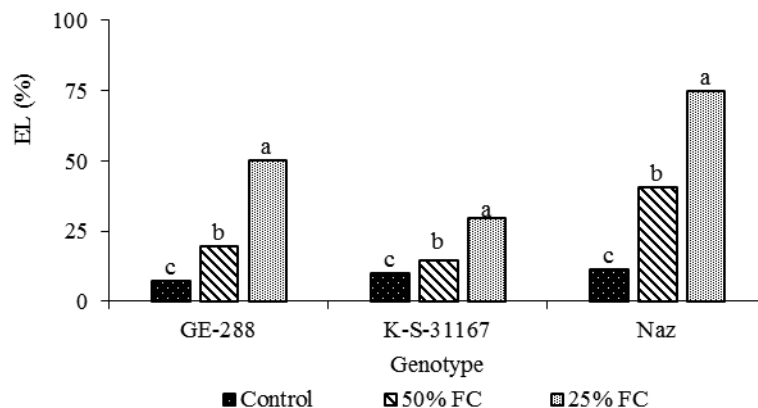
CV: Coefficient of Variation

** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد

به ترتیب ۴ درصد، ۱۳ درصد و ۲۹ درصد در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب ۲۰ درصد، ۴۳ درصد و ۶۴ درصد نشت یونی نسبت به شاهد خود نشان دادند (شکل ۳).

نشت یونی (EL)

با افزایش سطح تنش افزایش شدیدی در نشت یونی رخ داد، به طوری که ژنوتیپ‌های K-S-31167، GE-288 و Naz در سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی



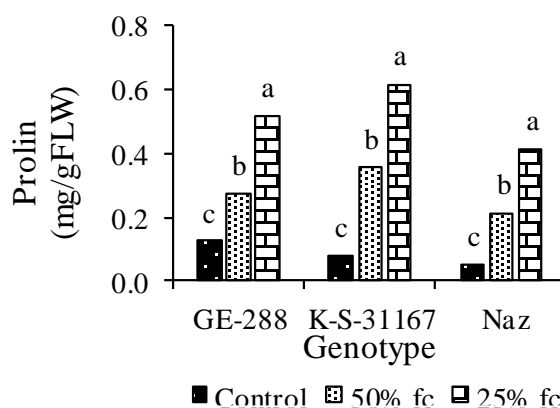
شکل ۳. میزان نشت یونی ژنوتیپ‌های K-S-31167، GE-288 و Naz لوبیا در سه سطح تیماری شاهد، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی (در هر ژنوتیپ ستون‌های دارای حرف‌های متفاوت بر پایه آزمون دانکن در سطح ۱ درصد تفاوت معنادار دارند).

Figure 3. The amount of EL in K-S-31167, GE-288 and Naz bean genotypes at control, 50 and 25% FC. Different letters indicate significant differences according to Duncan's test ($P \leq 0.01$).

پرولین

نتایج نشان داد که در هر سه ژنوتیپ GE-288، K-S-31167 و Naz با افزایش تنش خشکی محتوای پرولین به صورت پیوسته افزایش یافته و در نتیجه بیشترین میزان پرولین در هر ژنوتیپ در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی بود (شکل ۴). به طوری که میزان پرولین در ژنوتیپ‌های GE-288، K-S-31167 و Naz در سطح تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب ۱۵ درصد و ۱۶ درصد و در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب ۵۳ درصد، ۳۹ درصد و ۳۶ درصد نسبت به شاهد خود افزایش یافت (شکل ۴). در این دو سطح تنش ژنوتیپ متحمل K-S-31167 بیشترین محتوای پرولین و ژنوتیپ حساس Naz کمترین محتوای پرولین را داشتند (شکل ۴). آزمایش گیاهان مختلف در شرایط تنش خشکی نیز این واقعیت را اثبات می‌کند و با نتایج این تحقیق همخوانی دارد (Movahedie Dehnavi *et al.*, 2004). از جمله عملکردهای مهم پرولین در شرایط تنش توانایی استفاده از عامل‌های احیاکننده در فرآیند زیست‌ساخت (بیوسنتز) خود و مشارکت در ساخت پروتئین‌های ماتریکس دیوارهٔ یاخته‌ای است. پس به نظر می‌رسد تجمع بالای پرولین در گیاهان متحمل به تنش اسمزی از سازوکارهای کارای حفاظت آن‌ها در برابر انرژی رادیکالی تولیدشده در شرایط تنش و نقش حمایتی تأمین منبع انرژی در مرحله بازیابی پس از تنش است (Nanjo *et al.*, 1999).

میزان شاخص آسیب ۵۰ درصد بافت گیاهی به‌عنوان مرگ گیاه در اثر عامل تنش در نظر گرفته می‌شود (Sukumaran & Weiser, 1972). ژنوتیپ Naz در سطوح ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی بیشترین میزان نشت یونی را داشت، بنابراین بسیار حساس به شرایط تنش بوده و می‌توان گفت که این ژنوتیپ در اثر تنش شدید دچار مرگ یاخته‌ای شده است. کمترین میزان نشت یونی در سطوح ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی مربوط به ژنوتیپ K-S-31167 بود (شکل ۳). که می‌تواند نشان‌دهندهٔ پایداری بیشتر غشای یاخته‌ای آن باشد. پایداری غشای یاخته‌ای در شرایط تنش خشکی یکی از سازوکارهای اصلی مقاومت است (Bajji *et al.*, 2002). به نظر می‌رسد که پایداری غشای یاخته‌ای در تنش‌ها با ساخت پروتئین‌های تکانه (شوگ) گرمایی و ویژگی‌های سامانهٔ نورساختی (فتوسنتزی)، از جمله آنزیم‌های کلیدی و غشاهای تیلوکوئیدی مرتبط است (Bewley & Larsen, 1982). همچنین تنش باعث ایجاد اختلال در فعالیت‌های زیستی (بیولوژیک) غشاهای یاخته‌ای، کاهش سیالیت آن‌ها و بدون فعال‌سازی یا کاهش سرعت پمپ شدن یون‌های غشایی نیز می‌شود (Demin *et al.*, 2008). افزایش نشت یونی در شرایط تنش خشکی توسط دیگر محققان نیز گزارش شده است که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد (Demin *et al.*, 2008).



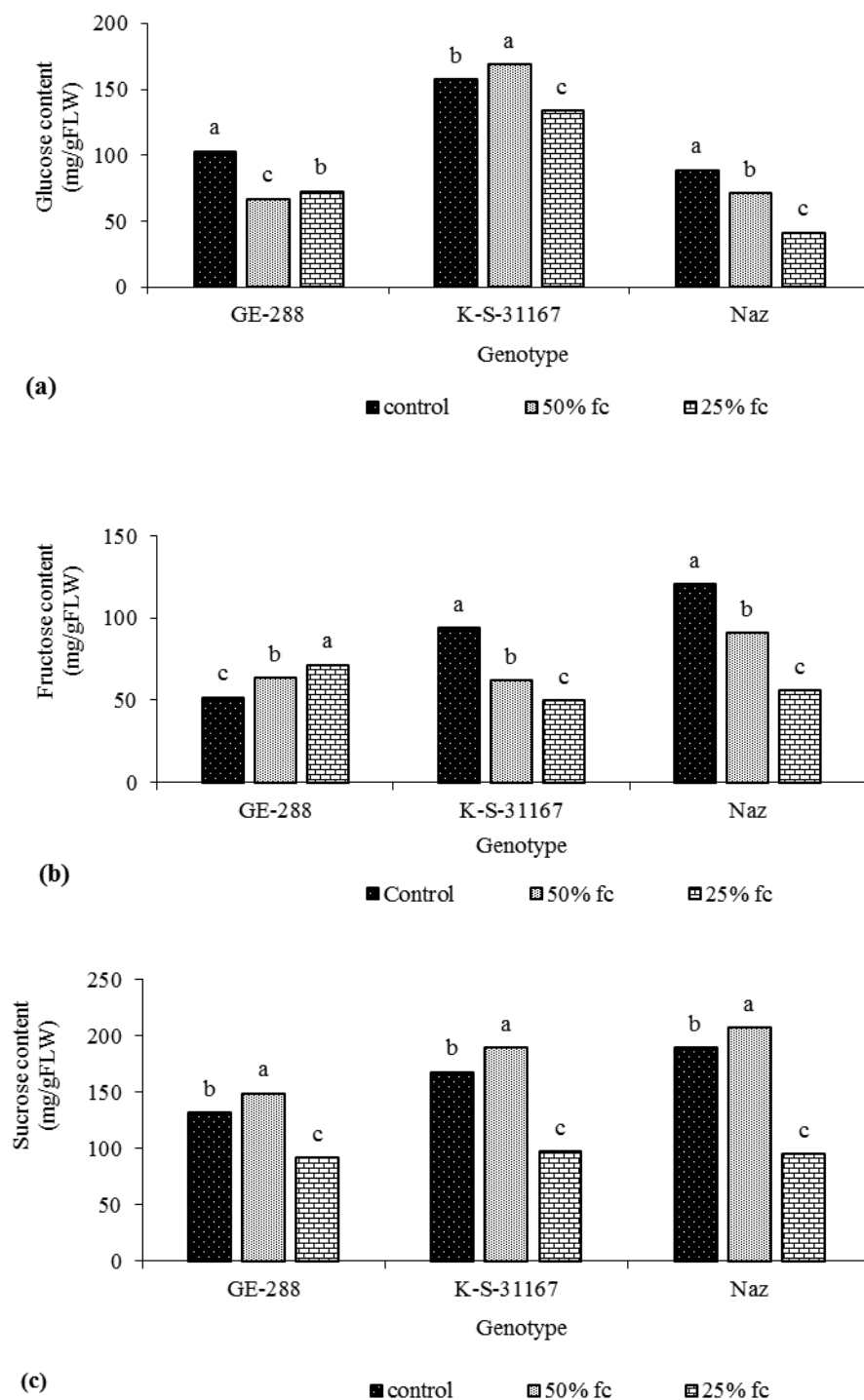
شکل ۴. تغییرپذیری محتوای پرولین ژنوتیپ‌های GE-288، K-S-31167 و Naz لوبیا در سه سطح تیماری شاهد، ۲۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (در هر ژنوتیپ ستون‌های دارای حرف‌های متفاوت بر پایهٔ آزمون دانکن در سطح ۱ درصد تفاوت معنادار دارند). Figure 4. Change in the content of prolin in K-S-31167, GE-288 and Naz bean genotypes at control, 50 and 25% FC levels. Different letters indicate significant differences according to Duncan's test ($P \leq 0.01$).

بسیار نزدیکی دارد. افزایش غلظت این ترکیب‌ها در شرایط تنش با کاهش پتانسیل اسمزی، امکان جذب آب و به دنبال آن حفظ فشار آماس یاخته را فراهم می‌کند. از سوی دیگر قندهای محلول از راه تشکیل پیوند هیدروژنی با دنباله‌های قطبی پلی‌پپتیدها، گروه‌های فسفات فسفولیپید، از پروتئین‌ها و غشاهای یاخته‌ای حفاظت می‌کنند (Crowe *et al.*, 1992). علت کاهش غلظت ساکارز می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت اینورتاز، کاهش فعالیت سوکروز سنتاز، شکسته شدن ساکارز به قندهای گلوکز و فروکتوز، تبدیل به دیگر مشتقات قندی مثل فروکتان (شکل ۱) (Krasensky & Jonak, 2012) و یا کاهش بیان ژن *susy* (شکل ۶) باشد و علت کاهش غلظت گلوکز و فروکتوز می‌تواند به دلیل کاهش بیان ژن *vinv* (شکل ۶)، تبدیل آن‌ها به دیگر مشتقات قندی یا اثر بازدارندگی اتیلن باشد (Ashraf & Foolad, 2007). گزارش شده است که در شرایط تنش خشکی فروکتوز به فروکتان (پلیمر فروکتوز) تبدیل می‌شود (Krasensky & Jonak, 2012). *I-sst* و *6-sft* از جمله ژن‌های موجود در مسیر زیست‌ساختی فروکتان‌ها هستند که در تحمل تنش خشکی نقش دارند. فروکتان‌ها بسپارهای محلول فروکتوز هستند که در واکنش توسط فروکتوزیل ترانسفرازهایی شامل *I-SST* و *6-SFT* فروکتوز را از ساکارز به درون زنجیره فروکتان انتقال می‌دهند (شکل ۱) (Krasensky & Jonak, 2012). سازوکار مولکولی فروکتان‌ها که چگونه در برابر تنش‌های غیرزنده نقش حفاظتی دارند نامشخص است. با این حال، بر پایه برخی از آزمایش‌ها پیشنهاد شد که ممکن است به دلیل تعامل فروکتان‌ها با فسفولیپیدها و حلالیت بالای فروکتان‌ها در آب، آن‌ها نقش حفاظتی و مهمی را در سازگاری به تنش اسمزی بازی کنند (Gupta & Kaur, 2005) قندها در فرآیند مراحل مختلف رشد روی بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های سوخت‌وساز ساکارز، هگزوزها و انتقال‌دهنده‌های ساکارز نقش دارند. با این حال قندها باید هماهنگ با دیگر عامل‌ها و هورمون‌های گیاهی عمل کنند. هگزوکیناز می‌تواند جریان ورود هگزوزها به مسیر گلیکولیز را تعیین کند. درحالی‌که

کربوهیدرات‌های محلول (گلوکز، فروکتوز و ساکارز) و بیان ژن‌های *susy* و *vinv*

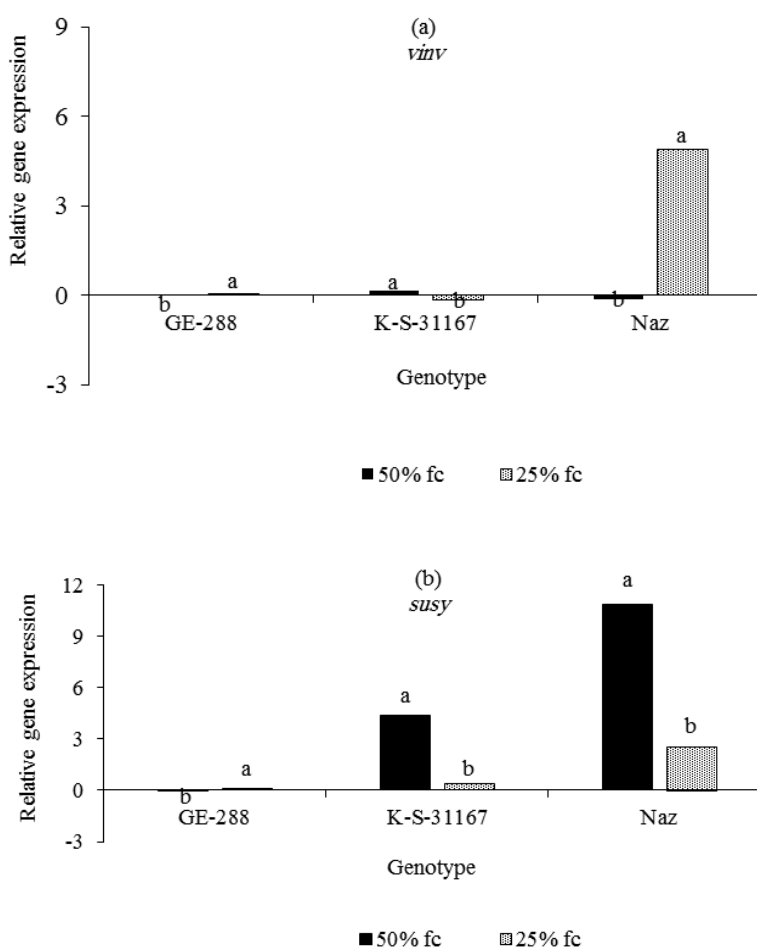
نتایج به‌دست‌آمده از سنجش بیان ژن‌های *vinv* و *susy* نشان داد که در ژنوتیپ GE-288 در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی میزان بیان ژن‌های *vinv* و *susy* نسبت به شاهد تفاوت معناداری نداشته ولی نسبت به سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش بیان در هر دو ژن مشاهده شد (شکل ۶). همچنین در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی غلظت قندهای گلوکز و فروکتوز نسبت به سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش یافته ولی غلظت ساکارز نسبت به سطح ۵۰ درصد کاهش یافته است (شکل ۵). در ژنوتیپ K-S-31167 در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی میزان بیان ژن *vinv* (شکل ۶) همچنین غلظت قندهای گلوکز، فروکتوز و ساکارز نسبت به سطوح شاهد و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی کاهش یافته است (شکل ۵) در ژنوتیپ Naz در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی میزان بیان ژن *vinv* نسبت به سطوح شاهد و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش یافته (شکل ۶)، غلظت قندهای گلوکز، فروکتوز و ساکارز نیز نسبت به سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی کاهش یافته است (شکل). در ژنوتیپ Naz در سطح ۲۵ درصد ظرفیت زراعی ژن *susy* نسبت به سطوح شاهد و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب افزایش و کاهش بیان نشان داده (شکل ۶)، غلظت گلوکز، فروکتوز و ساکارز نیز نسبت به سطح ۵۰ درصد ظرفیت زراعی کاهش یافته است (شکل ۵). ارتباط بین افزایش غلظت قندهای محلول و نقش آن در کاهش پتانسیل اسمزی شیره یاخته‌ای در شرایط تنش خشکی توسط محققان زیادی مطرح شده است که با این نتایج همخوانی دارد (Kameli & Losel, 1996; Krasensky & Jonak, 2012). دلیل افزایش غلظت گلوکز و فروکتوز می‌تواند افزایش بیان ژن *vinv*، آبکافت (هیدرولیز) ساکارز به گلوکز و فروکتوز، بسته شدن روزنه‌ها، فعالیت آبسزیک اسید، کاهش انتقال از برگ، کاربرد کمتر این ترکیب‌ها و یا هیدرولیز نشاسته باشد (Kameli & Losel, 1996; Krasensky & Jonak, 2012). تجمع قندهای محلول مانند گلوکز، فروکتوز و ساکارز با تحمل خشکی در گیاهان ارتباط

انتقال‌دهنده‌های ساکارز به‌عنوان حسگرهای آپوپلاستی را حس کند و باعث جریان قند از غشاء دی‌ساکارید عمل می‌کنند و ممکن است غلظت قند پلاسمایی شوند (Lalonda *et al.*, 1999).



شکل ۵. تغییرپذیری محتوای گلوکز (a)، فروکتوز (b) و ساکارز (c) در ژنوتیپ‌های K-S-31167، GE-288 و Naz لوبیا در سه سطح تیماری شاهد، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی. (در هر ژنوتیپ ستون‌های دارای حرف‌های متفاوت بر پایه آزمون دانکن در سطح ۱ درصد تفاوت معنادار دارند).

Figure 5. Change in the content of glucose (a), fructose (b), and sucrose (c) in K-S-31167, GE-288 and Naz bean genotypes at control, 50 and 25% FC levels. Different letters indicate significant differences according to Duncan's test ($P \leq 0.01$).



شکل ۶. میزان نسبی بیان ژن *vinv* (a) و *susy* (b) در ژنوتیپ‌های GE-288، K-S-31167 و Naz لوبیا در سطح ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی.

Figure 6. Relative expression of *vinv* (a) and *susy* (b) genes in KS-31167, GE-288 and Naz bean genotypes in response to drought stress (50 and 25 % FC).

اینورتاز واکوئلی و سوکروز سنتاز نیز نشان داد که افزایش و کاهش بیان این ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی به ترتیب باعث افزایش و کاهش فعالیت آنزیم‌های اینورتاز و سوکروز سنتاز و در نهایت افزایش و کاهش غلظت مواد محلول در یاخته‌ها شده است که این به‌عنوان یک نشانه سوخت‌وسازی در پاسخ به تنش عمل می‌کند.

سپاسگزاری

از مسئولان قطب محترم حیوانات که در اجرای هرچه بهتر این پژوهش نهایت همکاری و کمک را به عمل آوردند و بخشی از هزینه آن را تقبل کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث تغییرپذیری‌هایی در نشت یونی، پرولین و کربوهیدرات می‌شود. ژنوتیپ متحمل K-S-31167 نسبت به دو ژنوتیپ به نسبت متحمل GE-288 و Naz دارای نشت یونی کمتر و محتوای پرولین بیشتر بود. دلیل پایین بودن میزان نشت یونی در ژنوتیپ K-S-31167 نشان‌دهنده پایداری غشایی بالاتر این ژنوتیپ در شرایط تنش است و محتوای پرولین بیشتر در ژنوتیپ K-S 31167 نشان‌دهنده حفظ تعادل اسمزی و سامانه پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی) قوی‌تر این ژنوتیپ نسبت به دو ژنوتیپ GE-288 و Naz است. نتایج به‌دست‌آمده از سنجش کربوهیدرات‌های محلول و بیان ژن‌های

REFERENCES

1. Ashraf, M. & Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Journal of Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216.
2. Bajji, M., Kinet, J. M. & Lutts, S. (2002). The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(1), 61-70.
3. Barker, L., Kuhn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., Hellman, H., Schulze, W., Ward, J. M. & Frommer, W. B. (2000). SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Journal of Plant Cell*, 12, 1153-1164.
4. Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, L. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Journal of Plant and Soil*, 39, 205-208.
5. Bewley, J. D. & Larsen, K. M. (1982). Differences in the responses to water stress of growing and non-growing regions of maize mesocotyls: Protein synthesis on total, free and membrane-bound polyribosome fractions. *Journal of Experimental Botany*, 33(134), 406-415.
6. Borges, A., Tsai, S. M., Gregorio, D. & Caldas, D.G. (2012). Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Journal of Plant Cell Reports*, 31(5), 827-838.
7. Cheikh, N. & Brenner, M. L. (1992). Regulation of key enzymes of sucrose biosynthesis in soybean leaves: Effect of dark and light conditions and role of gibberellins and abscisic acid. *Journal of Plant Physiology*, 100, 1230-1237.
8. Comis, D. B., Tamayo, D. M. & Alonso, J. M. (2001). Determination of monosaccharids in cider by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry Acta*, 436, 173-180.
9. Crow, J. H., Hoekstra, F. A. & Crow, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review plant physiology*, 54, 579-599.
10. Demin, I. N., Deryabin, A. N., Sinkevich, M. S. & Trunova, T. I. (2008). Insertion of Cyanobacterial desA Gene Coding for $\Delta 12$ Acyl Lipid Desaturase Increases Potato Plant Resistance to Oxidative Stress Induced by Hypothermia. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55, 639-648.
11. *FAO Statistical Yearbook*. (2013). World Food and Agriculture.
12. Franca, M. G. C., Thi, A. T. P., Pimentel, C., Rossiello, R. O. P., Zuily-Fodil, Y. & Laffray, D. (2000). Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Journal of Environmental and Experimental Botany*, 43(3), 227-237.
13. Geigenberger, P., Reimholz, R., Geiger, M., Merlo, L., Canale, V. & Stitt, M. (1997). Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Journal of Planta*, 201, 502-518.
14. Gunes, A., Inal, A., Adak, M. S., Bagci, E. G., Cicek, N. & Eraslan, F. (2008). Effect of drought stress implemented at pre-or post-anthesis stage on some physiological parameters as screening criteria in chickpea cultivars. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(1), 59-67.
15. Gupta, A. k. & Kaur, N. (2005). Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of Biosciences*, 30(5), 101-112.
16. Kameli, A. & Losel, D. M. (1996). Growth and sugar accumulation in durum Wheat plants under water stress. *Journal of New Phytologist*, 132, 57-62.
17. Krasensky, J. & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 10(1093), 1-16.
18. Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J. W., Frommer, W. B. & Wood, J. M. (1999). The dual action of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Journal of Plant Cell*, 11, 707-726.
19. Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stress: *Water, radiation, salt and other stresses*, (2nd ed.). Academic Press, New York, PP: 3-211.
20. Lutts, S., Kinet, J. M. & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Journal Annals of Botany*, 78, 389-398.
21. Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Bepalhok, J. C., Kobayashi, A. K., Pileggi, M., Pereira, F. P. P. & Vieira, L. G. E. (2004). Osmotic adjustment in transgenic Citrus rootstocks (Carrizo citrange) overproducing proline. *Journal of Plant Science*, 167, 1375-1381.
22. Movahedie Dehnavi, M., Modarese Sanavi, S. A. M., Sorushzadeh, A. & Jalali, M. (2004). Changes of proline, total soluble sugar, chlorophyll (spad) and chlorophyll fluorescence in varieties of autumn Carthamus in effect of drought stress and spray of Zn and Mn. *Desert Journal*, 9, 93-110. (in Persian with English Summary).

23. Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1999). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *Febs Letters*, 461(3), 205-210.
24. Naya, L., Ladrera, R., Ramos, J., Gonzalez, E. M., Arrese-Igor, C., Minchin, F. R. & Becana, M. (2007). The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of *alfalfa* nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants. *Journal of Plant Physiology*, 144, 1104-1114.
25. Price, J., Laxmi, A., Martin, S. K. & Jang, J. C. (2004). Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *arabidopsis*. *Journal of plant Cell*, 16, 2128-2150.
26. Roitsch, T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Journal of Current Opinion in Plant Biology*, 2, 198-206.
27. Shin, K. S., Chakrabarty, D. & Paek, K. Y. (2002). Sprouting rate, change of carbohydrate contents and related enzymes during cold treatment of lily bulblets regenerated in vitro. *Scientia Horticulturae*, 96(1), 195-204.
28. Singh, S. P. (2007). Drought resistant in race Durango dry bean landraces and cultivars. *Journal of agronomy*, 99, 1219-1225.
29. Sukumaran, N. P. & Weiser, C. J. (1972). An excised leaflet test for evaluating potato frost tolerance. *Hortscience*, 7, 467-468.
30. Valliyodan, B. & Nguyen, H. T. (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Journal of Current Opinion in Plant Biology*, 9, 189-195.