

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

شکوفه دست نشان^۱، محمدرضا بی همتا^{۲*}، علیرضا عباسی^۳ و منیژه سبکدست^۴

۱، ۲، ۳ و ۴- کارشناس ارشد، استاد، دانشیار و استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۲۶)

چکیده

تنش خشکی، یکی از تنش‌های مهم غیرزیستی برای گیاهان از جمله لوبیا است؛ چراکه رشد، توسعه و عملکرد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد؛ بنابراین شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی، بسیار ضروری است. یکی از راه‌های مؤثر در شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی، بررسی بیوشیمیایی و بیان نسبی ژن‌های دخیل در تنش خشکی است. بدین منظور، پژوهش حاضر بر روی شماری از ژنوتیپ‌های لوبیا شامل خمین، COS-16، D81083 و KS-10012، به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. تنش خشکی در سطوح تنش شدید (۲۵٪ ظرفیت زراعی)، تنش ملایم (۷۵٪ ظرفیت زراعی) و آبیاری نرمال (۱۰۰٪ ظرفیت زراعی) اعمال شد و سپس صفات محتوای نسبی آب برگ، نشت الکترولیت‌ها، پرولین، مالون دی آلدئید و بیان ژن‌های *NAC*، *PIPI*، *CDPK1*، *NCED* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین میزان صفت نشت الکترولیت‌ها، به ترتیب به ژنوتیپ‌های خمین به میزان ۷۷/۶۶٪ و COS-16 به میزان ۲۵٪ تعلق داشت. بیشترین میزان محتوای نسبی آب برگ، در ژنوتیپ COS-16 در تنش ملایم به میزان ۸۰/۶۶٪ و کمترین میزان آن، در ژنوتیپ خمین در تنش شدید به میزان ۴۶/۶۶٪ اندازه‌گیری شد. روند افزایشی میزان پرولین در تمامی ژنوتیپ‌ها، از آبیاری ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی نسبت به تنش ملایم و تنش شدید مشاهده شد. همچنین روند افزایشی میزان مالون‌دی‌آلدئید در تنش شدید نسبت به شاهد مشاهده شد؛ از طرفی، ژنوتیپ خمین با داشتن بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدئید، رتبه a و ژنوتیپ COS-16 با داشتن کمترین میزان مالون‌دی‌آلدئید، رتبه f را با در نظر گرفتن آزمون توکی به خود اختصاص دادند. افزایش نسبی بیان ژن *NCED*، *NAC* و *CDPK1* در تنش شدید نسبت به تنش ملایم و بیان نسبی متفاوت ژن *PIPI* نیز در سطوح مختلف تنش (۷۵٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی) مشاهده شد. به‌طور کلی، از نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری صفات می‌توان چنین استنباط کرد که در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ژنوتیپ COS-16 بیشترین و ژنوتیپ خمین کمترین میزان تحمل نسبت به تنش خشکی را دارا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، پرولین، مالون دی آلدئید، محتوای نسبی آب برگ، نشت الکترولیت‌ها.

Biochemical and molecular evaluation of some beans genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) under drought stress conditions

Shokoufeh Dastneshan¹, Mohammad Reza Bihanta^{2*}, Alireza Abbasi³ and Manijeh Sabokdast⁴

1,2,3,4. Agronomy and Plant Breeding Dept., University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran.

(Received: April 27, 2019 - Accepted: December 17, 2019)

ABSTRACT

Drought stress is one of the important non-biological stresses for plants such as beans because it affects the growth, development and yield of the plant. Therefore, identification of drought tolerant genotypes is very important. One of the effective ways in identifying drought tolerant genotypes is biochemical investigation and relative genes expression involved in drought stress. Therefore, the present study was performed on a number of bean genotypes including Khomein, COS-16, D81083 and KS-10012 as factorial complete randomized block design. Drought stress was applied at the levels of severe stress (25% field capacity), mild stress (75% field capacity) and normal irrigation (100% field capacity) and then the relative water content, electrolyte leakage, proline, malondialdehyde and gene expression (*NCED*, *CDPK1*, *PIPI* and *NAC*) were evaluated. Results showed that the highest and lowest electrolyte leakage traits belonged to Khomein genotypes with 77.66% and COS-16 with 25%, respectively. The highest relative water content of leaf belonged to COS-16 genotype at mild stress of 80.66% and the lowest to khomein genotype at severe stress of 25%. Increasing trend of proline content was observed in all genotypes from 100% of irrigation to mild and severe stresses. Also, increasing trend of malondialdehyde was observed in severe stress compared to control, on the other hand, Khomein genotype with the highest malondialdehyde rank a and COS-16 genotype with the lowest malondialdehyde genotype f were considered with Tukey test. Relative increase of *NCED*, *NAC* and *CDPK1* gene expression was observed in severe stress compared to mild stress. Different relative expression of *PIPI* gene was also observed at different stress levels (75% and 25% of field capacity). In general, it can be concluded that among the genotypes studied, COS-16 had the highest and Khomein genotype had the least tolerance to drought stress.

Keywords: Electrolyte leakage, gene expression, malondialdehyde, proline, relative water content

* Corresponding author E-mail: mrghanad@ut.ac.ir

مقدمه

در بین حبوبات، لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) به جهت داشتن بیشترین سطح زیر کشت و تولید، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (FAO, 2013). لوبیا از محبوب‌ترین بقولات در آمریکا و آفریقای جنوبی و شرقی به حساب می‌آید (Asfaw & Blair, 2012). بزرگ‌ترین تولیدکننده و مصرف‌کننده لوبیا معمولی در آمریکای لاتین، برزیل، مکزیک، منطقه آند، آمریکای مرکزی و کارائیب می‌باشند (Akibode & Maredia, 2011). تنش‌های محیطی همانند خشکی، تهدیدهای جدی برای کشاورزی، تولیدات لوبیا و وضعیت طبیعی محیطی به شمار می‌آیند (Mahajan & Tuteja, 2005; Singh, 2007). پروتئین پروتئینی است که نقش مهمی در سازگاری به تنش‌های محیطی از جمله خشکی را بازی می‌کند. این ترکیب سبب افزایش پتانسیل اسمزی سلول‌ها، حمایت از ساختار سلول و بالاخت غشاء سلولی و سایر پروتئین‌ها در مواجهه به تنش اکسیداتیو و کم‌آبی می‌شود (Bohnert & Jensen, 1996; Verslues *et al.*, 2011; Anjum *et al.*, 2006). کاهش محتوای نسبی آب برگ، نخست باعث بسته شدن روزنه‌ها می‌شود که نتیجه آن، کاهش ورود دی‌اکسیدکربن به یاخته‌های مزوفیل و در نتیجه کاهش سرعت نورساخت برگ است (Lawlor & Cornic, 2002; Baker & Rosenqvist, 2004). در محتوای نسبی آب، به احتمال زیاد مربوط به اختلاف در قابلیت جذب آب از خاک و یا قابلیت کنترل افت آب از طریق روزنه‌ها است (Sinclair & Ludlow, 1985). محققین ثبات غشای سلولی تحت شرایط تنش رطوبتی را به‌عنوان یک جزء اصلی تحمل به خشکی در ژنوتیپ‌های مقاوم مطرح کرده‌اند که خسارت وارده به غشاهای سلولی توسط خشکی، از طریق اندازه‌گیری نشت سلولی قابل ارزیابی است (Spaeth *et al.*, 1984; Raison *et al.*, 1980). پراکسیداسیون لیپیدی، برای ارزیابی میزان رادیکال آزاد مضر تحت شرایط تنش استفاده می‌شود (Mudgal *et al.*, 2010). مالون دی‌آلدئید در اثر پراکسیداسیون غشای سلولی تولید می‌شود (Sairam

et al., 2002). آبسیزیک اسید نقش مهمی در تنظیم وضعیت آب گیاه از طریق سلول‌های نگهبان و رشد دارد و با القای ژن‌هایی که در مسیر سنتز آنزیم‌ها و دیگر پروتئین‌های مربوط به تحمل کم‌آبی هستند، در تحمل گیاه به کم‌آبی بسیار مؤثر است (Luan, 2002; Zhu, 2002). *AAO*، *SDRI*، *NCED*، *ZEP* و ژن‌هایی هستند که در مسیر آنزیم‌های بیوسنتز آبسیزیک اسید نقش اساسی دارند (Audran *et al.*, 1998; Qin & Zeevaart, 1999, 2002; Bitter *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002). *PIP*ها (Plasma membrane intrinsic proteins) به عنوان انتقال دهنده آب، گلیسرول، H_2O_2 ، کربن دی‌اکسید و اوره عمل می‌کنند. آکوپورین‌های *PIP* در پاسخ به تنش‌های غیر زنده موثر می‌باشند؛ اگرچه مطالعات، وجود پاسخ‌های متفاوت *PIP*ها و *TIP*ها (Tonoplast intrinsic proteins) روی تنش‌های شوری، خشکی و سرما را نشان می‌دهد (Forrest & Bhave, 2007). خانواده ژن *NAC* در بسیاری از قسمت‌های گیاه و در پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده (Olsen *et al.*, 2005; Christianson *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2010; Nakashima *et al.*, 2012) دارند. پیش بینی می‌شود که مسیر سنتز *CDPK*، وابسته به افزایش بیان ژن‌هایی باشند که پروتئین‌های *LEA* را سنتز می‌کنند (Serrano *et al.*, 2003). فعالیت ژن‌های *LEA* باعث بازسازی خسارت‌های حاصل از تنش‌ها می‌شود (Xiong & Zhu, 2002). در مطالعه‌ای، نقش ژن *NAC* در تحمل به تنش غیر زنده در گیاه برنج مورد بررسی قرار گرفت و افزایش بیان این ژن در تنش خشکی و شوری بالا و دمای پایین، باعث افزایش تحمل گیاه برنج به این تنش‌های غیر زنده شد (Zheng *et al.*, 2009). بیان ژن *NAC* در تحمل به تنش خشکی در گیاه نخود، باعث افزایش تحمل این گیاه به تنش‌های غیرزنده شد (Peng *et al.*, 2009). مشخص شده است که القای ژن *PIP1;4* در آرابیدوپسیس، منجر به مقاومت به تنش سرما در ریشه‌های آرابیدوپسیس می‌شود (Lee *et al.*, 2012). خشکی، سرما، شوری و هورمون‌ها، همگی می‌توانند تغییرات خاصی را در بیان

به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. بذرهاى چهار ژنوتیپ مختلف لوبیا شامل KS-10012، COS-16، D81083 و خمین در گلدان‌های مشابه و با سه تکرار کاشته شدند و تا مرحله سه تا چهار برگ گیاهچه، به صورت یکسان آبیاری شدند و سپس تنش خشکی در سطوح آبیاری نرمال، ملایم و شدید انجام شد. تمامی ژنوتیپ‌ها از ایستگاه خمین گرفته شدند. مواردی که اسم دارند، رقم هستند و مواردی که توسط شماره مشخص شده‌اند، شماره موجود در بانک بذر و وارداتی از CIAT می‌باشند. نتایج محققین حاکی از آن است که ژنوتیپ COS-16 ژنوتیپی مقاوم و ژنوتیپ خمین، ژنوتیپی حساس به خشکی می‌باشد (Broujerdnia *et al.*, 2016).

ژن‌های *CDPK* در آرابیدوپسیس، برنج، توتون و گندم ایجاد کنند (Yoon *et al.*, 1999; Ma and Wu, 2007; Wan *et al.*, 2007 بیان ژن *NCED* سبب القای پاسخ به تنش خشکی و تنظیم بیوسنتز آبسزیک اسید شد (Nambara and Marion-Poll, 2005; Yang and Guo, 2007) هدف از پژوهش حاضر، بررسی بیوشیمیایی و بیان ژن‌های دخیل در تنش خشکی در شماری از ژنوتیپ‌های لوبیا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران اجرا شد. در ابتدای آزمایش، خاک مورد استفاده در این پژوهش مورد آزمون قرار گرفت (جدول ۱). آزمایش

جدول ۱- نتایج آزمون خاک

Table 1. Soil test results

K(ppm)	P(ppm)	N(%)	C(%)	pH	EC(ds. m ⁻¹)	Soil texture
134	20.6	0.12	1.3	8.5	1.3	Loam

،*NAC* (nitrogen assimilation control)، *NCED* و *PIPI* (plasma membrane intrinsic proteins) با *CDPK1* (calcium-dependent protein kinases) استفاده از داده‌های به دست آمده از پایگاه اینترنتی Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) و NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) طراحی شدند (جدول ۲). آغازگر مربوط به ژن مرجع اکتین (*act*) نیز به عنوان ژن خانه‌دار انتخاب شد.

RNA با روش تریزول استخراج شد. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده، از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و برای تعیین کمیت آن، از دستگاه نانودراپ استفاده شد. ساخت cDNA با توجه به دستورکار شرکت Thermo انجام شد. درستی افزایش قطعه توالی از ژن مورد نظر توسط آغازگر، با استفاده از روش PCR معمولی با دستگاه ترموسایکلر تأیید شد. آن‌گاه، بیان کمی ژن مورد نظر به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (REAL-TIME PCR) در دستگاه icycler شرکت BioRad انجام گرفت. هر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، شامل 10 میکرولیتر 2x (GUASNAR)

سنجش صفت RWC به روش (Martinez *et al.*, 2007) و با رابطه (۱) انجام شد که در این رابطه: W_f وزن تر برگ، W_t وزن تورژسانس برگ و W_d وزن خشک برگ را نشان می‌دهند.

$$\%RWC = [(W_f - W_d) / (W_t - W_d)] \times 100 \quad (1)$$

پیرای اندازه‌گیری نشت یونی از روش (Lutts *et al.*, 1996) و برای محاسبه آن از رابطه ۲ استفاده شد که در آن: EC_1 هدایت الکتریکی اولیه و EC_2 هدایت الکتریکی ثانویه است

$$\%ELI = (EC_1 / EC_2) \times 100 \quad (2)$$

اندازه‌گیری محتوای پرولین بر مبنای روش (Bates *et al.*, 1973) انجام شد و با توجه به منحنی استاندارد پرولین در دستگاه طیف‌سنج نوری (Shimadzu uv-160) در طول موج ۵۲۰ نانومتر، غلظت پرولین تعیین شد. مالون دی‌آلدئید توسط روش (Heath & Packer, 1968) اندازه‌گیری شد و مقدار آن در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu uv-160) خوانده شد.

برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها، آغازگرهای ژن‌های مورد بررسی (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*)

۱۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ثانیه دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به شمار ۳۵ چرخه بود.

SYBR Biopars، یک میکرولیتر آغازگرهای پیشرو و پسر (غلظت ۱۰ پیکومول)، پنج میکرولیتر cDNA و سه میکرولیتر آب مقطر بود. برنامه دستگاه در مرحله اول، ۱۸۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در مرحله دوم،

جدول ۲- آغازگرهای طراحی شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

Table 2. primers designed for Real-Time PCR

Number	Gene	Oligo sequences 5'→3'
1	<i>NCED-F</i>	AACACTCCACTACCCCAAAC
2	<i>NCED-R</i>	TGGGTTTAATCGGAGTTGGG
3	<i>NAC-F</i>	AGCAGTGTGAGAACCCAAC
4	<i>NAC-R</i>	CAGACAAATTTCCGGGCATTTCG
5	<i>PIP1-F</i>	CTCGGAGCTTACTTCATGGTC
6	<i>PIP1-R</i>	CGGTTAAGACGGTGATGTAGAG
7	<i>CDPK1-F</i>	GCCAGAAAAGGGTGATGTTTG
8	<i>CDPK1-R</i>	CTATCCTGAAAGTGCGTACCAG
9	<i>Act-F</i>	GTCGCTGAGATCGGAGATC
10	<i>Act-R</i>	GCAAATCCAGCTTTGACCAT

پرویلین و مالون دی‌آلدئید، با افزایش میزان تنش، این صفات افزایش یافتند.

محتوای نسبی آب برگ

با افزایش میزان تنش نسبت به شاهد، میزان محتوای نسبی آب برگ کاهش یافت (شکل ۱)؛ این کاهش مخصوصاً در تنش ۲۵٪ ظرفیت زراعی بیشتر بود. بیشترین افت محتوای نسبی آب برگ در ژنوتیپ خمین مشاهده شد که در تنش شدید، به ۴۶/۶۶٪ رسید که می‌تواند دلیلی بر حساس بودن این ژنوتیپ نسبت به تنش خشکی مخصوصاً در تنش‌های شدید باشد. همچنین کمترین میزان افت محتوای نسبی آب برگ به ژنوتیپ COS16 تعلق داشت که میزان آن در تنش شدید، به ۶۹/۵۴٪ رسید. روند کاهش محتوای نسبی آب برگ در ژنوتیپ‌های D81083 و KS-10012 نیز مشاهده شد؛ به طوری که درصد محتوای نسبی آب برگ در تنش ملایم (۷۵٪ ظرفیت زراعی) در این دو ژنوتیپ، به ترتیب ۷۲/۴۳ درصد و ۶۶/۲۶ درصد و در تنش شدید (۲۵٪ ظرفیت زراعی)، به ترتیب ۶۱ درصد و ۵۷/۱۵ درصد بود. محققان بیان کردند که کمبود آب به طور آشکاری محتوای نسبی آب را در برگ‌های لوبیا کاهش می‌دهد (Turkan *et al.*, 2005). نتایج تحقیقات، گویای کاهش محتوای نسبی آب در شرایط تنش خشکی است؛ البته این کاهش در رقم حساس نسبت به رقم مقاوم به خشکی بیشتر است

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.2 و مقایسه میانگین بر پایه آزمون توکی صورت پذیرفت. همچنین به منظور رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد. داده‌های به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی، با استفاده از نرم افزار REST 2009 تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، فقدان تفاوت معنی‌دار در بلوک‌ها نشان دهنده یکنواخت بودن شرایط آزمایش بود. تفاوت بسیار معنی‌دار در ژنوتیپ‌ها حاکی از آن است که ژنوتیپ‌های مورد بررسی با یکدیگر تفاوت بسیار معنی‌دار در سطح احتمال آماری یک درصد را دارا بوده‌اند و تفاوت بسیار معنی‌دار در تنش، نشان دهنده آن است که سطوح مختلف تنش در سطح احتمال آماری یک درصد با یکدیگر متفاوت بوده‌اند. همچنین در اثر متقابل ژنوتیپ و تنش نیز تفاوت معنی‌دار برای صفت محتوای نسبی آب برگ و تفاوت بسیار معنی‌دار برای صفات نشت الکترولیت‌ها، میزان مالون دی‌آلدئید و پرویلین مشاهده شد.

نتایج مقایسه میانگین تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر صفات اندازه‌گیری شده در چهار ژنوتیپ مورد بررسی در این پژوهش در جدول ۴ آمده است. با افزایش میزان تنش، کاهش چشمگیر محتوای نسبی آب برگ به ثبت رسید ولی برای صفات نشت الکترولیت‌ها،

(Bayoumi, 2008). نتایج محققین نشان داد که در سطوح بالای تنش، ارقام متحمل COS-16 و Tylor نسبت به ارقام حساس اختر و خمین قادرند محتوای نسبی آب خود را حفظ نمایند و از صدمه کمتری ناشی از پسابدگی و کاهش محتوای آب ببینند که با نتایج به دست آمده از این پژوهش مطابقت دارد (Broujerdnia *et al.*, 2016).

همچنین (Korir *et al.*, 2006; Lizana *et al.*, 2006) در مطالعه‌ای روی اثر کمبود آب بر گیاه عدس، کاهش محتوای نسبی آب برگ تایید شد که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد (Salehpour *et al.*, 2009). در لوبیا، ژنوتیپ‌هایی با محتوای نسبی آب بالا، عملکرد دانه بیشتری دارند و از طریق حفظ توازن آب در برگ‌ها، تنش خشکی را بهتر تحمل می‌کنند.

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد ارزیابی در ژنوتیپ‌های لوبیا تحت سطوح مختلف تنش خشکی.

Table 3. Variance analysis of the effects of different levels of drought stress on traits evaluated in bean genotypes.

ANOVA	Df	MS			
		Relative water content	Electrolyte leakage	Malondialdehyde	Proline
Block	2	3.07	0.34	0.000003	0.00012
Genotype	3	508.56**	809.127**	0.014**	0.013**
Stress	2	664.48**	2919.685**	0.033**	0.040**
Geno*Str	6	20.49*	27.92**	0.011**	0.001**
Error	22	7.24	0.90	0.00005	0.00015
CV%		4.01	2.01	6.70	8.92

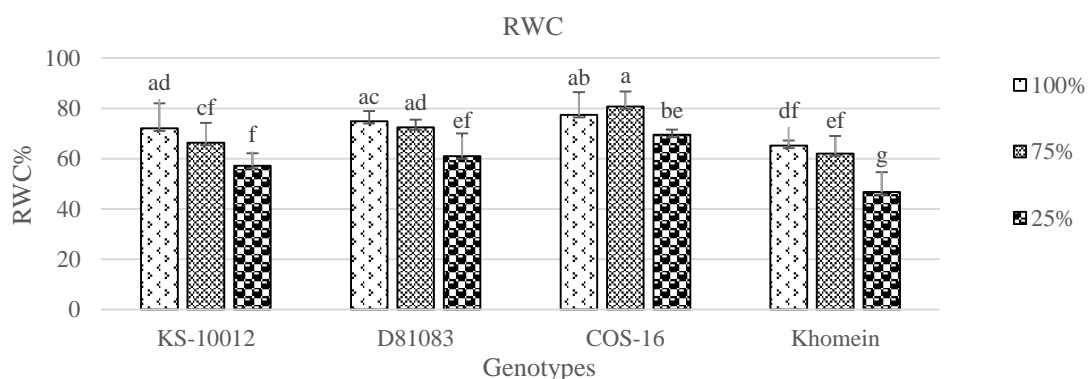
** و * : معنادار در سطح احتمال یک و پنج درصد.

CV, ** and *: Coefficient of Variation Significant at 1% and 5% of probability levels, respectively.

جدول ۴- مقایسه میانگین تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی بر صفات اندازه‌گیری شده در چهار ژنوتیپ مورد بررسی.

Table 4. Mean comparisons of the effects of different levels of drought stress on traits evaluated in bean genotypes.

Malondialdehyde	Proline	Electrolyte leakage	Relative water content	Stress
0.06c	0.09c	33.36c	72.36a	100%FC
0.09b	0.12b	44.25b	70.35a	75%FC
0.16a	0.20a	64.12a	58.59b	25%FC
4.58	4.58	4.58	4.58	CV%



شکل ۱- محتوای نسبی آب برگ در تمامی ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف تنش (۱۰۰٪، ۷۵٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی). حروف متفاوت روی نمودار، بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد تعیین شده‌اند.

Figure 1. The relative water content of leaves in all bean genotypes at different levels of stress (100%, 75% and 25% Field capacity). Different letters are based on the Tukey's test at 1% of probability level.

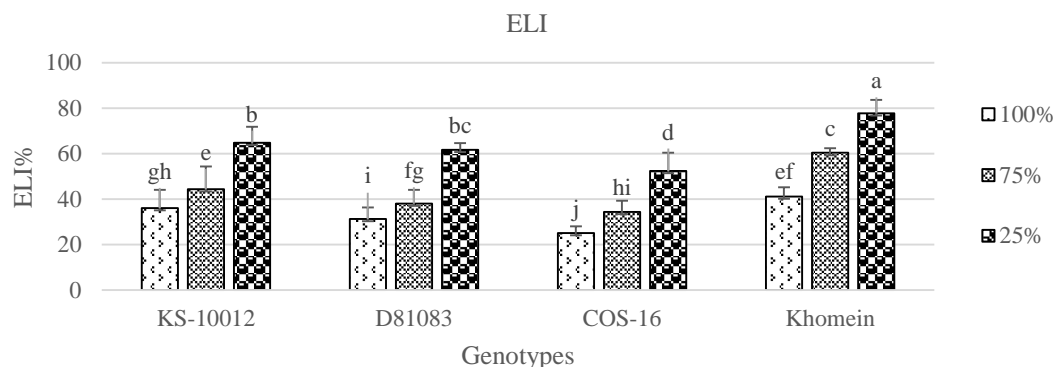
تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این آزمایش، با افزایش میزان تنش نسبت به شاهد، نشت الکترولیت‌ها

نشت الکترولیت‌ها

نتایج نشت الکترولیت‌ها نشان می‌دهد (شکل ۲) که در

COS16 به میزان ۷۷/۶۶ درصد و ۵۲/۴ درصد مشاهده شد که همین میزان در دو ژنوتیپ D81083 و KS-10012، به ترتیب ۶۱/۶۶ درصد و ۶۴/۷۶ درصد بود.

افزایش یافت. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در تنش ۲۵٪ ظرفیت زراعی، بیشترین و کمترین میزان نشت الکترولیت‌ها به ترتیب در ژنوتیپ خمین و



شکل ۲- محتوای نشت الکترولیت‌ها در تمامی ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف تنش (۱۰۰٪، ۷۵٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی). حروف متفاوت روی نمودار بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد تعیین شده‌اند.

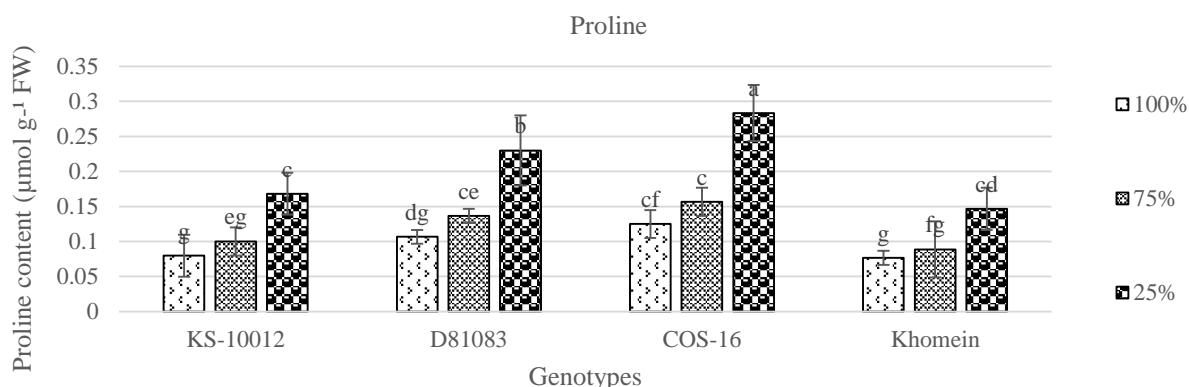
Figure 2. Electrolyte leakage content in all bean genotypes at different levels of stress (100%, 75% and 25% Field capacity). Different letters are based on the Tukey's test at 1% of probability level.

تحمل به پساایدگی است؛ بنابراین در شرایط تنش کم آبی، ارقام COS-16 و Tylor که پایداری غشای بالاتری دارند، نسبت به ارقام خمین و اختر مقاوم‌تر می‌باشند (Broujerdnia *et al.*, 2016).

پرولین

نتایج به دست آمده برای صفت پرولین نشان داد که در تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این آزمایش، با افزایش میزان تنش نسبت به شاهد (۱۰۰٪ ظرفیت زراعی)، محتوای پرولین افزایش یافت (شکل ۳). بیشترین افزایش پرولین در میان ژنوتیپ‌ها، به ژنوتیپ COS16 در تنش ۲۵٪ ظرفیت زراعی به میزان ۰/۲۸ میکرومول بر گرم بافت تر برگی تعلق داشت. در تنش ملایم (۷۵٪ ظرفیت زراعی)، افزایش پرولین در ژنوتیپ‌های مورد بررسی KS-10012، D81083، COS-16 و خمین، به ترتیب ۰/۱، ۰/۱۳، ۰/۱۵ و ۰/۰۸ میکرومول بر گرم بافت تر برگی بود.

تحت شرایط تنش رطوبتی، غشای پلاسمایی یکی از اولین بخش‌های گیاهی است که آسیب می‌بیند (Liang *et al.*, 2003). میزان پایداری غشای سلولی با تحمل سایر فرآیندهای گیاهی به تنش از جمله فتوسنتز مرتبط است و به‌عنوان شاخصی از تحمل به تنش ارائه شده است (Sairam *et al.*, 2002). دیواره سلولی در اثر تنش خشکی تخریب می‌شود و مایع سلولی به فضای بین سلولی تراوش می‌کند و باعث بالا رفتن هدایت الکتریکی محلول می‌شود؛ بدین ترتیب هرچه سلول‌های بیشتری تخریب شده باشد، آن رقم مقاومت کمتری به خشکی دارد (Darvish Balochi *et al.*, 2011). در ارزیابی مقاومت به خشکی ارقام جو، تخریب کمتری در غشاهای سلولی ارقام مقاوم‌تر به خشکی مشاهده شد و محققین بیان کردند که ثبات غشای سلولی در طول دوره تنش خشکی، ممکن است به میزان پرولین آزاد موجود در سلول مرتبط باشد (Kocheva & Georgive, 2003). حفظ تمامیت غشای سلولی در طی تنش خشکی، نشانه‌ای از وجود مکانیزم‌های کنترلی در



شکل ۳- محتوای پرولین در تمامی ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف تنش (۱۰۰٪، ۷۵٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی). حروف متفاوت روی نمودار بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد تعیین شده‌اند.

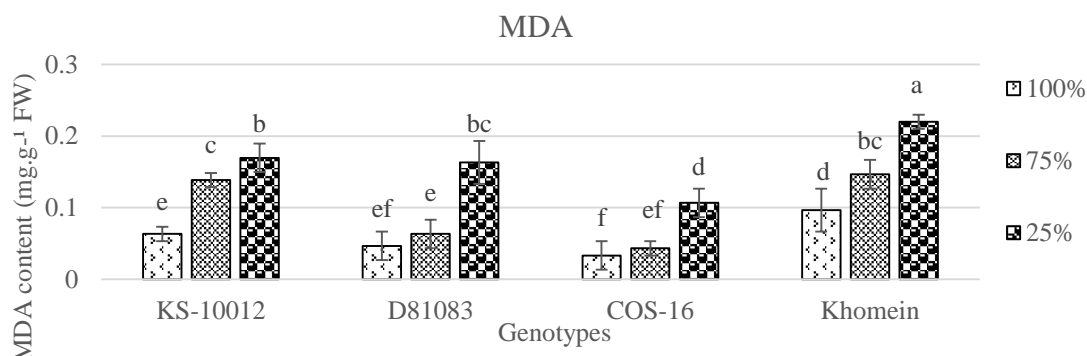
Figure 3. Proline content in all bean genotypes at different levels of stress (100%, 75% and 25% Field capacity). Different letters are based on the Tukey's test at 1% of probability level.

۰/۲۲ میلی‌گرم بر گرم بافت تر برگ مشاهده شد و به‌طور کلی، کمترین میزان آن در آبیاری ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی در ژنوتیپ COS16 به میزان ۰/۰۳ میلی‌گرم بر گرم بافت تر برگ به ثبت رسید. روند متفاوت افزایش مالون دی‌آلدئید در تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تنش ۷۵٪ ظرفیت زراعی، نشان دهنده تفاوت ژنوتیپ‌ها بود که میزان آن برای ژنوتیپ‌های KS-10012، D81083، COS-16 و خمین، به ترتیب ۰/۱۳، ۰/۰۶، ۰/۰۴ و ۰/۱۴ میلی‌گرم بر گرم بافت تر برگ بود. بررسی غلظت مالون دی‌آلدئید بافت گیاهی می‌تواند بیانگر میزان تخریب غشاء سلولی باشد، زیرا این ترکیب، تحت تأثیر تخریب و پراکسیده شدن غشاء سلولی آزاد می‌شود (Bhattacharjee *et al.*, 2002). محققین در نتایج پژوهشی، افزایش غلظت مالون دی‌آلدئید برگ را تحت تأثیر تنش شوری در ذرت گزارش نمودند (Gunes *et al.*, 2007). وجود مقادیر بیشتر مالون دی‌آلدئید در ارقام حساس در مقایسه با ارقام متحمل گزارش شده است (Sairam *et al.*, 2002).

تجمع بیشتر پرولین در گیاه لوبیا تحت تنش خشکی، نوعی سازگاری برای تحمل خشکی بود که به‌نوبه خود، به گیاه برای زنده ماندن و تکثیر در شرایط خشکی کمک کرد (Zadehbagheri *et al.*, 2012). نتایج حاصل از پژوهشی نشان داد که اعمال تنش خشکی، باعث افزایش معنی‌داری در میزان پرولین شد (Gunes *et al.*, 2008). تجمع پرولین، یک پاسخ فیزیولوژیکی بسیار رایج در بسیاری از گیاهان در واکنش به دامنه وسیعی از تنش‌های زیستی و غیر زیستی است (Geravandi *et al.*, 2011). نتایج محققین نشان داد که در تنش ۳۰ درصد ظرفیت زراعی، بیشترین میزان پرولین در ارقام متحمل Tylor و COS-16 و کمترین میزان آن، در ارقام حساس خمین و اختر مشاهده شد که با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد (Broujerdnia *et al.*, 2016).

مالون دی‌آلدئید

با افزایش میزان تنش از آبیاری ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی به آبیاری ۲۵٪ ظرفیت زراعی، میزان مالون دی‌آلدئید افزایش یافت (شکل ۴). بیشترین میزان این صفت در تنش ۲۵٪ ظرفیت زراعی برای ژنوتیپ خمین، به‌میزان



شکل ۴- محتوای مالون دی‌آلدئید در تمامی ژنوتیپ‌ها در سطوح مختلف تنش (۱۰۰٪، ۷۵٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی). حروف متفاوت روی نمودار بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال یک درصد تعیین شده‌اند.

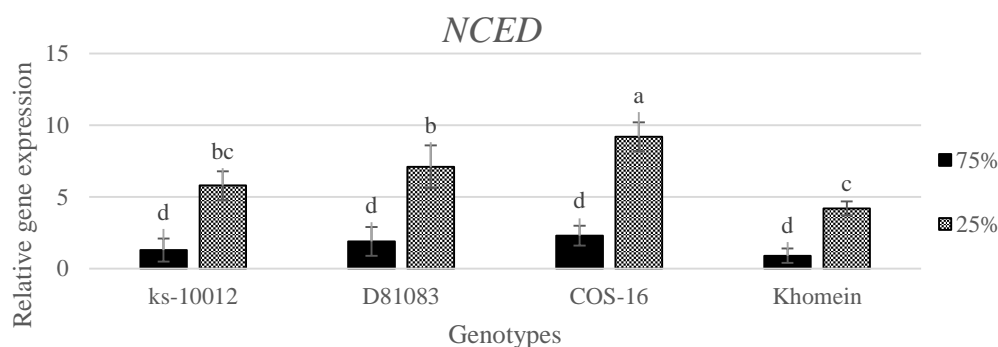
Figure 4. MDA content in all bean genotypes at different levels of stress (100%, 75% and 25% Field capacity). Different letters are based on the Tukey's test at 1% of probability level.

بیان نسبی ژن‌ها

افزایش بیان نسبی ژن *NCED* در تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تنش شدید (۲۵٪ ظرفیت زراعی) نسبت به تنش ملایم (۷۵٪ ظرفیت زراعی) مشاهده شد. کمترین میزان بیان نسبی ژن *NCED* در تنش ۲۵٪ ظرفیت زراعی برای ژنوتیپ خمین به میزان ۰/۹ برابر و بیشترین مقدار آن، در ژنوتیپ COS16 در تنش ۷۵٪ ظرفیت زراعی به میزان ۹/۲ برابر بود (شکل ۵). میزان بیان ژن *NCED* در ژنوتیپ D81083 در تنش ملایم (۷۵٪ ظرفیت زراعی) به میزان ۱/۹ برابر و در تنش شدید (۲۵٪ ظرفیت زراعی) به میزان ۷/۱ برابر ثبت شد.

تنش خشکی در گیاه لوبیا معمولی، بیان ژن *NCED* را به‌طور قابل توجهی افزایش داد (Yang et al., 2012). افزایش بیان ژن *NCED* در گیاه توتون و *Arabidopsis* سبب افزایش میزان آبسازیک اسید شد که در نهایت منجر به تحمل به خشکی در این گیاهان می‌شود (Iuchi et al., 2001; Qin & Zeevaart, 2002). تنش کمبود آب، تجمع میزان آبسازیک اسید در برگ‌ها که رابطه مستقیمی با افزایش بیان ژن *NCED* داشت نمایان شد (Schwartz et al., 2003; Xiong & Zhu, 2003; Nambara & Marion-Poll, 2005; Zhang et al., 2008). در نتایج پژوهشی در ژنوتیپ‌های لوبیا شامل KS-21486، KS-21191 و Goynok98، بیان ژن

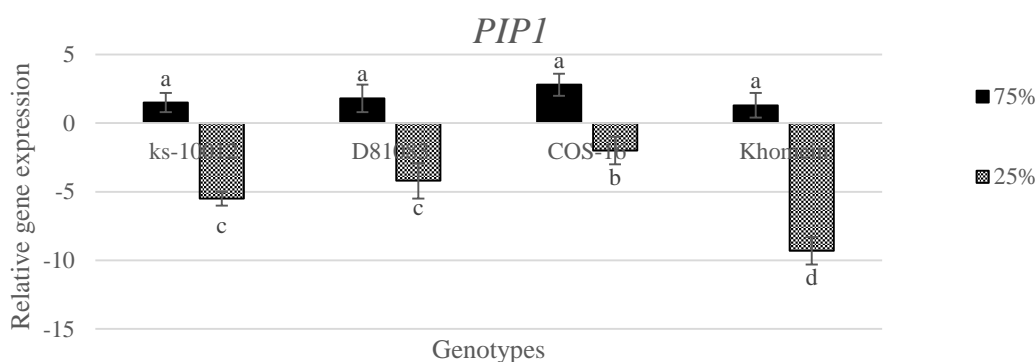
NCED در بافت برگ، به ترتیب ۱۲، ۸ و ۱۷ برابر در مقایسه با گیاهان شاهد بروز یافت (Khodambashi et al., 2013). افزایش بیان ژن‌های *NCED* و *ZEP* و *AAO* با تاثیر از تنش‌های شوری و خشکی توسط محققین گزارش شد (Audran et al., 1998; Xiong et al., 2002; Seo et al., 2000). در مطالعه‌ای روی تاثیر تنش خشکی بر بیان ژن‌ها در ریشه لوبیا، افزایش بیان ژن آکواپورین در ریشه رخ داد که این افزایش بیان، سبب افزایش تراوایی غشای پلاسمایی و غشای واکوئول به آب و بازگشت آماس شده است (Recchia et al., 2013). القای بیان ژن *AtPIP2;3* تحت تنش خشکی، یکی از موارد نخستین از بیان آکواپورین‌ها در تنش خشکی به حساب می‌آیند (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992). همچنین گیاهان متحمل (*M. crystallinum*)، تنظیم کاهش از ژن‌های *PIP* نشان دادند (Yamada et al., 1995). تنش‌های خشکی و آبسازیک اسید در گیاه لوبیا، باعث کاهش تعلق و افزایش بیان ژن‌های *PVPIP2;1* شد (Aroca et al., 2006). افزایش بیان ژن *PIP1* در برنج و توتون، تحمل به خشکی را افزایش داد (Lian et al., 2004; Yu et al., 2005). بیان *PIP1*، تحمل به خشکی آن‌ها را کاهش داد (Aharon et al., 2003).



شکل ۵- میزان نسبی بیان ژن *NCED* در ژنوتیپ‌های لوبیا در دو سطح ۷۵٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی.
 Figure 5. Relative expression of *NCED* gene in bean genotypes in response to drought stress (75% and 25% FC).

های ۲۵٪ و ۷۵٪ ظرفیت زراعی، به ترتیب ۲/۸ و ۲- به دست آمده است (شکل ۶).

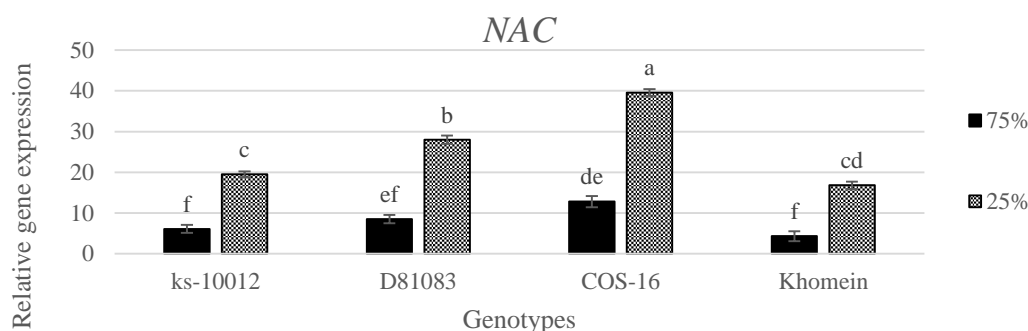
بیان نسبی ژن *PIP1* در ژنوتیپ خمین در تنش های ۲۵٪ و ۷۵٪ ظرفیت زراعی، به ترتیب ۱/۳ و ۹/۳- بود؛ علاوه بر آن، همین میزان در ژنوتیپ COS-16 در تنش



شکل ۶- میزان نسبی بیان ژن *PIP1* در ژنوتیپ‌های لوبیا در دو سطح ۷۵٪ و ۲۵٪ ظرفیت زراعی.
 Figure 6. Relative expression of *PIP1* gene in bean genotypes in response to drought stress (75% and 25% FC).

برگ القا شد (Zheng *et al.*, 2009). ژن *OsNAC6* در گیاهان تراریخته در بسیاری از تنش‌های زنده و غیر زنده بیان می‌شود و تحمل به تنش شوری و کم آبی افزایش می‌دهد (Nakashima *et al.*, 2007). بیان ژن *SNAC1* در گیاهچه‌های برنج تراریخته تحت تنش خشکی و شوری نسبت به گیاهان وحشی، زنده ماندن گیاهان را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (Hu *et al.*, 2006).

کمترین میزان بیان نسبی ژن *NAC* در تنش ۷۵٪ ظرفیت زراعی و برای ژنوتیپ خمین به میزان ۴/۳ و بیشترین میزان آن در ژنوتیپ COS-16 در تنش ۲۵٪ ظرفیت زراعی و به میزان ۳۹/۶ بود (شکل ۷). بیان نسبی ژن *NAC* در ژنوتیپ KS-10012 در تنش ۲۵٪ ظرفیت زراعی، ۱۹/۵ برابر و در تنش ۷۵٪ ظرفیت زراعی، ۶/۱ برابر بود. ژن *ONAC045* در برنج توسط تنش‌های خشکی، شوری، دمای پایین و تیمار آبسزیک اسید در ریشه و

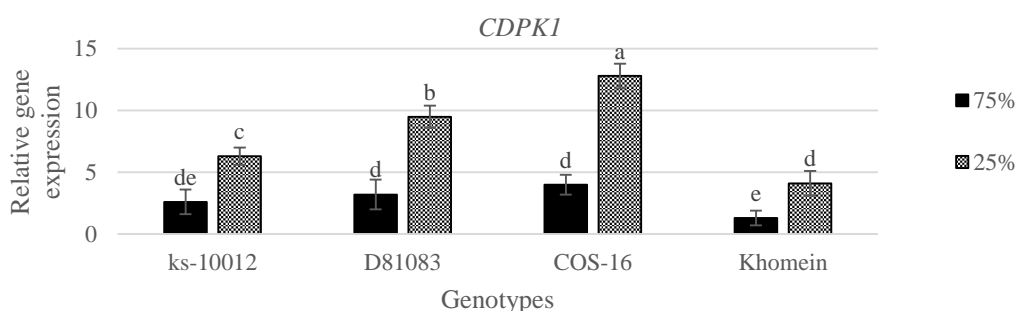


شکل ۷- میزان نسبی بیان ژن *NAC* در ژنوتیپ‌های لوبیا در دو سطح ۲۵٪ و ۷۵٪ ظرفیت زراعی.

Figure 7. Relative expression of *NAC* gene in bean genotypes in response to drought stress (75 and 25 % FC).

ژنوتیپ COS16 در تنش ۲۵٪ ظرفیت زراعی به میزان ۱۲/۸ برابر می‌باشد (شکل ۸). میزان بیان ژن *CDPK1* در ژنوتیپ D81083 در تنش ۷۵٪ ظرفیت زراعی، ۳/۲ برابر و در تنش ۲۵٪ ظرفیت زراعی، ۹/۵ برابر بود.

افزایش بیان نسبی ژن *CDPK1* در تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در تنش شدید نسبت به تنش ملایم مشاهده شد. کمترین میزان بیان ژن *CDPK1* نسبت به ژن شاهد در تنش ۷۵٪ ظرفیت زراعی برای ژنوتیپ خمین به میزان ۴/۱ برابر و بیشترین میزان آن، در



شکل ۸- میزان نسبی بیان ژن *CDPK1* در ژنوتیپ‌های لوبیا در دو سطح ۲۵٪ و ۷۵٪ ظرفیت زراعی.

Figure 8. Relative expression of *CDPK1* gene in bean genotypes in response to drought stress (75 and 25 % FC).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که با افزایش شدت تنش، میزان محتوای پرولین، مالون دی آلدئید و نشت الکترولیت‌ها افزایش یافت. از طرف دیگر، بیان نسبی ژن‌های *PIP1*، *NAC*، *NCED* و *CDPK1* مخصوصاً در تنش ۲۵٪ ظرفیت زراعی نسبت به ۷۵٪ ظرفیت زراعی، افزایش چشمگیری داشت و کاهش محتوای نسبی آب برگ نیز در تنش شدید مشاهده شد. همچنین ژنوتیپ COS16، دارای بیشترین سطح تحمل و ژنوتیپ خمین، دارای تحمل کمتری نسبت به تنش خشکی بود.

در نتایج تحقیقی، بیان ژن *ZoCDPK1* در گیاهان توتون تراریخته در حالت تنش بیش، از حالت نرمال گزارش شد؛ بنابراین تحمل بیشتر گیاهان تراریخته تحت تنش‌های شوری و خشکی، ناشی از این امر می‌باشد (Vivek et al., 2013). از خانواده CDPK رونویسی ژن *VfCPK1* توسط تنش‌های خشکی، آبسازیک اسید و $CaCl_2$ در گیاهان لوبیا کنترل شد (Liu et al., 2006). افزایش بیان ژن *CDPKs*، تحمل به تنش‌های سرما، شوری و خشکی را در برنج افزایش داد (Saijo et al., 2000).

REFERENCES

- Aharon, R., Shahak, Y., Wininger, S., Bendov, R., Kapulnik, Y. & Galili, G. (2003). Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell*, 15, 439–447.
- Akibode, S. & Maredia, M. (2011). Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops. Department of Agricultural, Food and Resource Economics, Michigan State University, 87p.
- Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M. F., Man, C. & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal Agriculture Research*, 6, 2026-2032.
- Aroca, R., Ferrante, A., Vernieri, P. & Vernieri, P. (2006). Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* Plants. *Annals of Botany*, 98, 1301–1310.
- Asfaw, A. & Blair, M. W. (2012). Quantitative trait loci for rooting pattern traits of common beans grown under drought stress versus non-stress conditions. *Molecular Breed*, 30, 681-695.
- Audran, C., Borel, C., Frey, A., Sotta, B., Meyer, C., Simonneau, T. & Marion- Poll, A. (1998). Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiology*, 118, 1021–1028.
- Baker, N. R. & Rosenqvist, E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 55, 1607-1621.
- 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.
- Bayoumi, T. Y., Manal, H. & Metwali, E. (2008). Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *African Journal Biotechnol*, 14, 2341-2352.
- Bhattacharjee, S. & Mukherjee, A. K. (2002). Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. *Seed Science and Technology*, 30, 279-287.
- Bohnert, H. J. & Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology*, 14, 89–97.
- Bitter, F., Oreb, M. & Mendel, R. R. (2001). ABA3 is a molybdenum cofactor sulfuryase required for activation of aldehyde oxidase and xanthin dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Journal Biology Chemistry*, 276, 40381–40384.
- Broujerdnia, M., Bihamta, M. R., Alamisaeid, K. & Abdusi, V. (2016). Effect of drought stress on proline content, soluble carbohydrates, electrolyte leakage and relative water content of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Physiology Islamic Azad University of Ahvaz*, 29, 23-41. (In Persian)
- Cheng, W. H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H. C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiha, T. & Sheen, J. (2002). A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell*, 14, 2723–2743.
- Christianson, J. A., Dennis, E. S., Llewellyn, D. J. & Wilson, I. W. (2010). ATAF NAC transcription factors: regulators of plants tressignaling. *Plant Signal Behavior*. 5,428–432.
- Darvish balochi, M., Paknejad, F. & Ardekani, M. (2011). Effect of drought stress and some micronutrients, foliar nutrition on chlorophyll fluorescence parameters, relative water content, membrane stability and grain yield. *Journal of Field Crop Science*, 41, 531-543. (In Persian)
- FAO Statistical Yearbook. (2013). World Food and Agriculture.
- Forrest, K. L. & Bhave, M. (2007). Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: A complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Function Integration Genomics*, 7, 263–289.
- Geravandi, M., Farshadfar, E. & Kahrizi, D. (2011). Evaluation of some physiological traits as indicators of drought tolerance in bread wheat genotypes. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(1), 69-75.
- Gunes, A., Inal, A., Alpuslan, M., Fraslan, F., Guneri, E. & Cicek, N. (2007). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, 164, 728-736.
- 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.
- Heath, R. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys*, 125, 189-198.

23. Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q. & Xiong, L. (2006). Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (*NAC*) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 12987-12992.
24. Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 27, 325-333.
25. Khodambashi, M., Shiran, B. & Gharaghanipour, N. (2013). Differential expression of *CA7* and *NCED* Genes in common bean genotypes under drought stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15, 1491-1499.
26. Kocheva, K. & Georgiev, G. (2003). Evaluation of the reaction of two contrasting Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars in response to osmotic stress with Peg 6000. *Journal Plant Physiology*, 3, 290-294.
27. Korir, P. C., Nyabundi, J. O. & Kimurto, P. K. (2006). Genotypic responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to moisture stress conditions in Kenya. *Asian Journal of Plant Science*, 5, 24-32.
28. Lawlor, D. W. & Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment*, 25, 275-294.
29. Lee, S. H., Chung, G. C., Jang, J. Y., Ahn, S. J. & Zwiazek, J. J. (2012) Overexpression of PIP2; 5 aquaporin alleviates effects of low root temperature on cell hydraulic conductivity and growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 159:479-488.
30. Lian, H. L., Yu, X., Ye, Q., Ding, X. S., Kitagawa, Y. & Kwak, S. S. (2004). The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant and Cell Physiology*, 45, 481-489.
31. Liang, Y., Q. Chen, W. Liu, Z. Zhang & Ding, R. (2003). Exogenous silicone (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid per oxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum Vulgare* L.). *Journal Plant Physiology*, 99, 872-878.
32. Liu, G., Chen, J. & Wang, X. (2006). *VfCPK1*, a gene encoding calcium-dependent protein kinase from *Vicia faba*, is induced by drought and abscisic acid. *Plant Cell Environ*, 29, 2091-2099.
33. Lizana, C., Wentworth, M., Martinez, J. P., Villegas, D., Meneses, R., Murchie, E. H., Pastenes, C., Lercari, B., Vernieri, P., Horton, P. & Pinto, M. (2006). Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress. I. Effect of drought on yield and photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 57, 685-697.
34. Luan, S. (2002). Signalling drought in guard cells. *Plant Cell Environ*, 25, 229-237.
35. Ma, S. Y. & Wu, W. H. (2007). AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses. *Plant Molecular Biology*, 65: 511-518.
36. Mahajan, S. & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archive Biochem Biophys*, 444, 139-158.
37. Martinez, J. P., Silva, H., Ledent, J. F. & Pinto, M. (2007). Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Europ Journal Agronomy*, 26, 30-38.
38. Mudgal, V., Madaan, N. & Mudgal, A. (2010). Biochemical mechanisms of salt tolerance in plants: A review. *International Journal of Botany*, 6, 136-143.
39. Nakashima, K., Tran, L-SP., Nguyen, D. V., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D., Ito, Y., Hayashi, N., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *The Plant Journal*, 51, 617-630.
40. Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochim Biophys Acta*, 1819, 97-103.
41. Nambara, E. & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annals Review of Plant Biology*, 56, 165-185.
42. Olsen, A. N., Ernst, H. A., Leggio, L. L. & Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Science*, 10, 79-87.
43. Peng, H., Cheng, H.Y., Chen, C., Yu, W., Yang, N., Gao, W. & Ma, H., 2009. A NAC transcription factor gene of chickpea (*Cicer arietinum* L.), CarNAC3, is involved in drought stress response and various developmental processes. *Journal of plant Physiology*, 166(17), 1934-1945.
44. Qin, X. Q. & Zeevaart, J. A. D. (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water stressed bean. *Proc. Natl. Acad. Science U.S.A*, 96, 15354-15361.
45. Qin, X. & Zeevaart, J. A. (2002). Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana glauca* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiology*, 128, 544-551.

46. Raison, J. K., Berry, G. A., Armond, R. A. & Pike, C. K. (1980). Membrane properties in relation to the adaptation of plants to temperature stress. In: Turner, N.C. and P.J. and Kramer. Adaptation of plants to water and high temperature stress. *John Wirly and Sons*, 261-273.
47. Recchia, H. G., Caldas, D. G. G., Beraldo, A. L. A., Silva, M. J. d. & Tsai, S. M. (2013). Transcriptional analysis of drought-induced genes in the roots of a tolerant genotype of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 7155-7179.
48. Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K. & Izui, K. (2000). Overexpression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant Journal*, 23, 319-327.
49. Sairam, R. K., Rao, K. V. & Srivastava, G. C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163, 1037-1046.
50. Salehpour, M., Ebadi, A., Izadi, M. & Jamaati-e-Somarin, Sh. (2009). Evaluation of water stress and nitrogen fertilizer effects on relative water content, membrane stability index, chlorophyll and some other traits of lentils (*Lens culinaris* L.) under hydroponics conditions. *Research Journal of Environmental Sciences*, 3, 103-109.
51. Schwartz, S. H., Qin, X. & Zeevaart, J. A. D. (2003). Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiology*, 131, 1591-1601.
52. Seo, M., Peeters, A. J. M., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J. A. D., Koornneef, M., Kamiya, Y. & Koshiba, T. (2000). The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Search Results Proceedings of The National Academy of Sciences, U.S.A.*, 97, 12908-12913.
53. Serrano, R., Gaxiola, R., Ríos, G., Forment, J., Vicente, O. & Ros, R. (2003). Salt stress proteins identified by a functional approach in yeast. *Monatshefte für Chemie*, 134, 1445-1464.
54. Sinclair, T. & Ludlow, M. (1985). Who taught plants thermodynamics? The unfulfilled potential of plant water potential. *Australian Journal of Plant Physiology*, 12, 213-217.
55. Singh, S. P. (2007). Drought resistant in race Durango dry bean landraces and cultivars. *Journal of Agronomy*, 99, 1219-1225.
56. Singh, B. R. & Singh, B. P. (1995). Agronomic and physiological responses of sorghum, maize and pearl millet to irrigation. *Field Crop Research*, 42, 57-67.
57. Spaeth, S. C., Randau, H. C. Sinclair, T. R. & Vendeland, J. S. (1984). Stability of soybean harvest index. *Agronomy Journal*, 76, 482-486.
58. Tran, L. S., Nishiyama, R., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2010). Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. *GM Crops*, 1, 32-39.
59. Turkan, I., Melike, B., Ozdemir, F. & Koca, H. (2005). Differential response of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168, 223-231.
60. Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. H. & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, 45, 523-539.
61. Vivek, P. J., Tuteja, N. & Soniya, E. V. (2013). CDPK1 from ginger promotes salinity and drought stress tolerance without yield penalty by improving growth and photosynthesis in *Nicotiana glauca*. *PLoS ONE*, 8(10), e76392.
62. Wan, B., Lin, Y. & Mou, T. (2007). Expression of rice Ca²⁺-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. *FEBS Letters*, 581, 1179-1189.
63. Xiong, L., Schumaker, K. S. & Zhu, J. K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 165-183.
64. Xiong, L. & Zhu, J. K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ*, 25, 131-139.
65. Xiong, L. & Zhu, J. (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 133, 29-36.
66. Yamada, S., Katsuhara, M., Kelly, W. B., Michalowski, C. B. & Bohnert, H. J. (1995). A family of transcripts encoding water channel proteins: Tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell*, 7, 1129-1142.
67. Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S. & Shinozaki, K. (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: Sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiology*, 33, 217-224.

68. Yang, Z-B., Eticha, D., Albacete, A., Rao, M. I., Roitsch, T. & Horst, W. J. (2012). Physiological and molecular analysis of the interaction between aluminium toxicity and drought stress in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Experimental Botany*, 63, 3109–3125.
69. Yang, J. & Guo, Z. (2007). Cloning of a 9- cis-epoxycarotenoid Dioxygenase Gene (SgNCED1) from *Stylosanthes guianensis* and Its Expression in Response to Abiotic Stresses. *Plant Cell Reports*, 26, 1383–1390.
70. Yoon, G. M., Cho, H. S., Ha, H. J., Liu, J. R. & Lee, H. S. (1999). Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein. *Plant Molecular Biology*, 39, 991-1001.
71. Yu, Q., Hu, Y., Li, J., Wu, Q. & Lin, Z. (2005). Sense and antisense expression of plasma membrane aquaporin from *Brassica napus* in tobacco and its effects on plant drought resistance. *Plant Science*, 169, 647–656.
72. Zadehbagheri, M., Kamelmanesh, M. M., Javanmardi, S. & Sharafzadeh, S. (2012). Effect of drought stress on yield and yield components, relative leaf water content, proline and potassium ion accumulation in different white bean (*Phaseolus vulgaris* L) genotypes. *African Journal of Agricultural Research*, 7(4), 5661-5670.
73. Zhang, Y., Yang, J., Lu, S., Cai, J. & Guo, Z. (2008). Overexpressing *SgNCED1* in Tobacco Increases ABA Level, Antioxidant Enzyme Activities and Stress Tolerance. *Plant Growth Regulators*, 27, 151–158.
74. Zheng, X., Chen, B., Lu, G. & Han, B. (2009). Overexpression of a *NAC* transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379, 985-989.
75. Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 53, 247–273.