

## Molecular Analysis of Seed Cover Color and Evaluation of Anthocyanin Content in Some Bean Cultivars

Somayeh Vaghari<sup>1</sup>, Arash Fazeli<sup>2\*</sup> and Batool Zarei<sup>3</sup>

1- M.Sc. Graduated, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agricultural, University of Ilam, Ilam, Iran

2- Associate Professor, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agricultural, University of Ilam, Ilam, Iran

3- Ph.D. Graduated, Department of Agriculture and Plant Breeding, Faculty of Agricultural, University of Ilam, Ilam, Iran

\*Corresponding author: a.fazeli@ilam.ac.ir

(Received: 8 April 2020

Revise: 9 August 2020

Accepted: 11 August 2020)

### Extended Abstract

**1. Introduction:** Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are a plant in the legume family (Fabaceae). Beans contain polyphenolic compounds, anthocyanins and flavonoids that are nutritionally and pharmacologically important, have genetic diversity, and are the most valuable and economical part of global biodiversity, which is crucial for future global production. Allelic diversity of MYB genes is important in the control of pigment and anthocyanins. Bean seed dye coating is one of the most important traits in consumer marketing. Recent studies show that bean seeds have a pigmented coating, higher anthocyanins that have anti-cancer and antioxidant properties. Increasing the consumption of legumes in the diet and antioxidants requires the study of the amount and genetics of genes that control bean seed coat.

**2. Materials and Methods:** 12 bean cultivars of different genera were collected from different regions of Ilam province and Ilam University Gene Bank and in 1397 in the greenhouse of Ilam University were planted in a randomized complete block design with 3 replications. Leaf sampling was performed in 2 to 3 leaf stage. Giusti and Wrolstad (2001) methods were used to measure anthocyanins. Mean comparisons were performed using Duncan test at 5% probability level using SAS 1.9 software. Genomic DNA was extracted by Doyle (1987) method. PCR reaction was performed in a volume of 25 µl. BLAST method was used to check the accuracy of the sequences obtained with the samples in NCBI. BioEdit, CLC sequencer Viewwer6, Geneious and MEGA5.2 were also used for other bioinformatics analyzes.

**3. Results and Discussion:** Examination of 12 bean genotypes showed that there was a significant difference between different bean genotypes in terms of anthocyanin trait. In terms of anthocyanin trait, cultivar 6 (black bean) was superior to all cultivars. Examples of common eye beans are 1 and 2. The reason for this difference is that the mutant eyebrow sample has more coverage with black areas. The dark color of the seed coat of this cultivar indicates more anthocyanin than two normal ocular samples. It should be noted that black seed dye is directly related to anthocyanins. Molecular analysis of MYB and AF genes showed that MYB gene was amplified in samples of ordinary ocular beans 1, 2, mutant and bride beans, while AF gene was amplified only in ocular samples 1, 2 and mutant beans. Bioinformatics analyzes showed that the sequences of these two genes are very similar to the samples in NCBI, so that in the AF gene, two new alleles were identified compared to the sequences introduced to control pigment coverage in beans. Also, the phylogenetic diagram of the samples using the UPGMA method showed that the samples could be separated based on the color of the grain coating.

**4. Conclusion:** Seed black color is controlled by anthocyanin biosynthesis by genes related to MYB transcription factor, which in addition to affecting the color of the seed coat, which has a more attractive appearance than ordinary ocular cultivars, also contains more anthocyanin. Therefore, due to the presence of MYB and AF genes that are involved in the synthesis of anthocyanins, has made the bean product more attractive and marketable, which have higher levels of anthocyanins and can be given special attention in the diet. According to the results of this study, it can be said that Mutant ocular cultivar due to more anthocyanins and more attractive appearance compared to other ocular bean cultivars can replace the common cultivars of this type of bean and is a good option for further studies and introduction to farmers in the future.

**Keywords:** Anthocyanin, Bean, MYB and AF genes, Seed cover, Sequencing.

**Citation:** Vaghari, S., Fazeli, A. & Zarei, B. (2021). Molecular analysis of seed cover color and evaluation of anthocyanin content in some Bean cultivars. *Journal of Vegetables Sciences*, 5(1), 139-155. doi: 10.22034/iuvs.2021.132431.1115

### Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).



## آنالیز مولکولی رنگ پوشش بذر و بررسی میزان آنتوسیانین در برخی ارقام لوبیا

سمیه وقاری<sup>۱</sup>، آرش فاضلی<sup>۲\*</sup> و بتول زارعی<sup>۳</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۳- دانش‌آموخته دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

\*نویسنده مسئول: a.fazeli@ilam.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۱

تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۰۵/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۲۰

### چکیده

لوبیا به خاطر داشتن آنتی‌اکسیدان‌ها در پوشش بذر، در تغذیه و سلامت جامعه نقش زیادی دارد. اخیراً ژن‌های خانواده MYB به عنوان ژن‌های کنترل‌کننده رنگ پوشش دانه ارتباط قوی با مقدار آنتوسیانین دارند. تنوع فیزیولوژیکی و مولکولی ژن‌های دخیل در پوشش رنگ بذر ۱۲ رقم لوبیا در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در گلخانه تحقیقاتی علوم باغبانی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه ایلام در سال ۱۳۹۷ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا از نظر میزان آنتوسیانین اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به طوری که بیشترین مقدار آنتوسیانین در لوبیا سیاه مشاهده شد. آنالیز مولکولی ژن‌های MYB و AF نشان داد که این دو ژن در بعضی نمونه‌ها تکثیر شدند که ژن MYB در لوبیای چشم‌بلبلی معمولی ۱، ۲، نمونه موتانت و لوبیای عروس تکثیر شد، در حالی که ژن AF تنها در نمونه‌های لوبیا چشم‌بلبلی ۱، ۲ و نمونه موتانت تکثیر شد. آنالیزهای بیوانفورماتیکی نشان داد که توالی‌های حاصل از این دو ژن تشابه بسیار بالایی را با نمونه‌های موجود در NCBI نشان می‌دهند، به طوری که در ژن AF دو آلل جدید در مقایسه با توالی‌های معرفی شده برای کنترل پوشش رنگ بذر در لوبیا شناسایی شد. همچنین نمودار فیلوژنتیکی نمونه‌ها با استفاده از روش UPGMA نشان داد که می‌توان نمونه‌ها را بر اساس رنگ پوشش بذر از هم تفکیک نمود. نتایج کلی نشان داد که لوبیای چشم‌بلبلی موتانت به دلیل داشتن ژن‌های MYB، AF و همچنین مقدار بالای آنتوسیانین و عملکرد بالا در مقایسه با سایر لوبیاهای چشم‌بلبلی می‌تواند گزینه مناسبی جهت مطالعات بیشتر و معرفی به کشاورزان در آینده باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، پوشش بذر، توالی‌یابی، لوبیا، ژن‌های MYB و AF.

استناد: وقاری، س.، فاضلی، آ. و زارعی، ب. (۱۴۰۰). آنالیز مولکولی رنگ پوشش بذر و بررسی میزان آنتوسیانین در برخی ارقام لوبیا. علوم سبزی‌ها، ۵(۱)، ۱۵۵-۱۳۹.

### حق چاپ:



حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل دسترس است.

## مقدمه

لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) گیاهی از خانواده بقولات (Fabaceae) می‌باشد. لوبیا یکی از ۱۰ محصول مهم جهان به‌شمار می‌رود که در بین بقولات مقام اول را دارد (Emeterio *et al.*, 2004; Stoilova *et al.*, 2005). دانه لوبیا با داشتن ۲۵-۲۰ درصد پروتئین و ۶۰-۵۰ درصد کربوهیدرات، یکی از مهمترین حبوبات مهم دنیا محسوب می‌شود (Graham & ranalli, 1997). از دانه‌ی لوبیا برای پخت‌وپز به‌صورت لوبیای سالم یا آرد استفاده می‌شود؛ در حالی‌که از غلاف‌های نارس و برگ‌ها به‌عنوان سبزیجات سالم استفاده می‌شود (Singh, 2014; Tijjani *et al.*, 2015).

فاکتور رونویسی MYB کلاس متنوعی از ژن‌های متصل به DNA می‌باشند که در تنظیم رونویسی ژن‌های گیاهی دخیل هستند. MYBها در مسیرهای بیوسنتزی ثانویه، میزان آنتوسیانین، کنترل مورفولوژی سلول، تقسیم سلول، مقاومت به بیماری‌ها و پاسخ به تنش‌های محیطی دخالت دارند (Du *et al.*, 2009). C1 اولین ژن MYB شناسایی شده در گیاهان است که در بیوسنتز فلاونوئید در ذرت (*Zea mays* L.) به‌عنوان فعال‌کننده عمل می‌کند (Gonda, 1998). با انتقال یا فعال کردن ژن‌های MYB که در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین نقش دارند، می‌توان رنگ محصول سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) را از زرد به قرمز یا بنفش تغییر داد و مزه بهتری بخشید (Safieh *et al.*, 2015). همچنین ژن R از سویا (*Glycine max* L.) یک عامل رونویسی MYB را رمزگذاری می‌کند که رنگ پوشش دانه را کنترل می‌کند (Yan *et al.*, 2015). رنگ پوشش دانه یکی از ویژگی‌های مهم برای مصرف‌کنندگان لوبیا است. اخیراً تحقیقات نشان داده است که مصرف‌کنندگان در مورد پذیرش کیفیت، طعم و مزه احتمالی یک محصول بسته به ظاهر و رنگ آن تصمیم می‌گیرند (Kostyla *et al.*, 1978; Simonne *et al.*, 2001). کیفیت و اندازه دانه

از مهمترین صفات اقتصادی می‌باشند (Piergiovanni *et al.*, 2000). مصرف‌کنندگان ویژگی‌های خاص پوشش دانه را برای استفاده‌های مختلف ترجیح می‌دهند (Mishili *et al.*, 2009). اگر دانه‌های ارقام تازه توسعه‌یافته بیشتر مشابه با ارقامی که در حال حاضر در بازار موجود است باشند، بسیار راحت‌تر پذیرفته می‌شوند. به این ترتیب تولیدکنندگان باید بدانند اساس ژنتیکی صفات مختلف رنگ پوشش دانه باید مطابق با ذائقه مصرف‌کنندگان در بازارها باشد. ارقام اصلاح شده اغلب باعث افزایش درآمد کشاورزان می‌شوند (Karanja *et al.*, 2011). رنگ در بسیاری از گونه‌های محصول مورد مطالعه قرار گرفته است که اغلب با جایگاه‌های ژنی (loci) که مسیر بیوسنتز آنتوسیانین را کنترل می‌کنند در ارتباط می‌باشد (Herniter, 2018). رنگ دانه تحت کنترل گروهی از ژن‌ها می‌باشد که مسیر سنتز فلاونول و آنتوسیانین را کنترل می‌کنند (McClellan *et al.*, 2002).

لوبیا دارای ترکیبات پلی‌فنلی، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدی است که از لحاظ غذایی و دارویی نقش بسیار مهمی دارند (Aparicio *et al.*, 2005; Beninger & Hosfield, 2003). آنتوسیانین رنگدانه‌های گیاهی هستند که در اندام‌های متعدد گیاهی از جمله گل‌ها، میوه‌ها و دانه‌ها به‌عنوان منبع اصلی رنگ‌آمیزی پوشش دانه شناخته شده که مسئولیت رنگ‌های مختلف را بر عهده دارند (Petroni & Tonelli, 2011). همچنین جزء شناخته‌ترین ترکیباتی هستند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی دارند (Cushnie & Lamb, 2005) و بدن انسان را در برابر بیماری‌های مزمن به‌خصوص سرطان و قلبی عروقی محافظت می‌کنند (Boots *et al.*, 2008). منابع ژنتیکی زیادی برای استفاده در لوبیا توسعه داده شده است. تحقیقات بر نحوه توارث صفات بذری لوبیا چشم‌بلبلی در اوایل قرن بیستم آغاز شد (Fery, 1980; Harland, 1920). فاکتوری به‌نام رنگ سیاه دانه (BI) از طریق مطالعه بر روی جمعیت F2 شناخته شد. همچنین مشخص گردید

پوشش سیاه رنگ می‌باشند، محتوای آنتوسیانین بالاتری دارند که خاصیت ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی دارد. مصرف روز افزون حبوبات در برنامه‌های غذایی و اهمیت آنتی‌اکسیدان نیازمند بررسی میزان و محتوی ژنتیکی ژن‌های کنترل‌کننده پوشش بذر لوبیا می‌باشد. بنابراین، به این منظور در این مطالعه تنوع آلی ژن MYB کنترل‌کننده پوشش بذر لوبیا در ۱۲ نمونه مختلف جهت تعیین ارتباط تنوع آلی این ژن با محتوای آنتوسیانین مورد بررسی قرار گرفته است.

### مواد و روش‌ها

۱۲ رقم لوبیا (جدول ۱)، از جنس‌های مختلف جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان ایلام و بانک ژن دانشگاه ایلام به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار، در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۲۰ و ارتفاع ۲۲ سانتی‌متر در سال ۱۳۹۷ در گلخانه دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام کشت شدند.

که رنگ کاسبرگ و نوک غلاف توسط عوامل ژنتیکی کنترل می‌شوند (Harland, 1920).

حبوبات پس از غلات، دومین منبع غذایی جوامع بشری هستند که منبع خوبی از پروتئین، نشاسته، مواد معدنی و ویتامین‌ها هستند. تنوع ژنتیکی توده با ارزش‌ترین و اقتصادی‌ترین بخش از تنوع زیستی جهانی است که از اهمیت فوق‌العاده‌ای برای تولید جهانی آینده برخوردار است. منابع ژنتیکی گیاهی به‌عنوان منبعی از سازگاری ژنتیکی هستند که همچون سپری در برابر تغییرات محیطی از گیاه محافظت می‌کند. در صورت بهره‌برداری صحیح از منابع تأمین‌کننده مواد خام ژنتیکی یعنی ژن‌ها می‌توان، واریته‌های جدید و مطلوب‌تر گیاهی را تولید کرد که در این میان تنوع آلی ژن‌های MYB در راستای کنترل رنگ و آنتوسیانین دانه حائز اهمیت است. پوشش رنگ دانه لوبیا یکی از مهمترین صفات در بازارپسندی مصرف‌کنندگان است. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که بذر لوبیا که دارای

جدول ۱- ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق

Table 1- Genotypes studied in this study

شماره No.	English name	نام فارسی	نام علمی Scientific name
1	Pinto Bean 1	لوبیا چیتی ۱	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. 1
2	Pinto Bean skunk	لوبیا چیتی رقم skunk	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. skunk
3	Pinto Bean 2	لوبیا چیتی ۲	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. 2
4	Navy Bean	لوبیا سفید	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
5	Kidney Bean	لوبیا قرمز	<i>Phaseolus coccines</i> L.
6	Black Beans	لوبیا سیاه	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. var. black bean
7	Cowpea Mutant	لوبیا چشم‌بلیلی موتانت	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. var. Mutant
8	Cowpea 1	لوبیا چشم‌بلیلی ۱	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. cv. 1
9	Cowpea 2	لوبیا چشم‌بلیلی ۲	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. cv. 2
10	Swedish brown beans	لوبیای قهوه‌ای سوئدی	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. Swedish brown beans
11	Pinto Bean 3	لوبیا چیتی ۳	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv. 3
12	Christmas Lima Bean	لوبیا عروس یا کریسمس	<i>Phaseolus lunatus</i> L.

گیاهچه‌ها به مرحله دو تا سه برگی رسیدند از برگ‌های جوان هر رقم نمونه‌برداری برگی جهت استخراج DNA صورت گرفت. همچنین جهت آنالیز فیزیولوژیکی نمونه‌برداری‌هایی در مراحل مختلف رشدی گیاه (برگ، غلاف سبز و بذر خشک) از ژنوتیپ‌های مختلف

خاک مورد استفاده در این پژوهش دارای ماسه، خاک و کود به نسبت ۱:۲:۱ بود. مراقبت‌های لازم شامل آبیاری، تنک کردن و حذف علف‌های هرز به صورت دستی انجام گرفت.

جهت آنالیز مولکولی ژن‌های MYB و AF وقتی

به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس عصاره به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل Z 300، شرکت HERMLE، آلمان) شدند. برای سنجش غلظت آنتوسیانین از دو بافر کلرید پتاسیم ۰/۲۵ مولار با pH=1 بافر استات سدیم ۰/۴ مولار با pH=4.5 استفاده شد. جذب نمونه‌ها در دو طول موج ۵۳۰ نانومتر برای آنتوسیانین کل و ۷۰۰ نانومتر برای تصحیح خطا و با دستگاه اسپکتروفتومتر (Instrument Ltd T80+UV/VIS PG) خوانده شد. برای تعیین غلظت نهایی آنتوسیانین موجود، عدد حاصل از جذب در روابط ۱ و ۲ قرار گرفت.

$$A: (A530-A700) \text{ pH}1 - (A530-A700) \text{ pH}4$$

$$\text{رابطه (۲)} \quad (A \times 34300 \times 6.6 \times 1000) / 449.2 \times 1$$

به کمک نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد.

DNA ژنومی از برگ‌های تازه و جوان طبق روش Doyle و همکاران (۱۹۸۷) استخراج گردید. برای تعیین کیفیت DNA از ژل آگاروز ۰/۸ درصد و بافر 10XTAE استفاده شد. از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۲) بر اساس مطالعه Herniter و همکاران (۲۰۱۸) برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز استفاده شد.

جمع‌آوری شده و سریعاً در ازت مایع ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد جهت آنالیزهای بعدی قرار داده شدند.

برای اندازه‌گیری آنتوسیانین (برگ سبز، غلاف سبز و بذرخشک) از روش اختلاف جذب در pHهای مختلف استفاده شد که توسط Giusti و Wrolstad (۲۰۰۱) ارائه شده است. حلال مورد نظر برای استخراج بافت مورد نظر (برگ سبز، غلاف نارس و بذرخشک (رسیده)، متانول اسیدی بود. برای این منظور از نسبت یک درصد اسید کلریدریک و ۹۹ درصد متانول استفاده شد. در ادامه ۰/۲ گرم بافت منجمد شده (در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده) توسط نیتروژن مایع آسیاب شد و سپس با استفاده از متانول اسیدی به‌عنوان حلال، حجم عصاره به سه میلی‌لیتر رسانده شد. تمامی نمونه‌ها

رابطه (۱)

رابطه (۲)

که در روابط فوق ۳۴۳۰۰ نشان دهنده‌ی ضریب خاموشی سیانیدین ۳- گلوکوزاید، ۶/۶ فاکتور رفت، ۱۰۰۰ ضریب تبدیل و ۴۴۹/۲ وزن مولکولی سیانیدین ۳-گلوکوزاید می‌باشد.

داده‌های مربوط به آنتوسیانین در آزمایشی به‌صورت طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار تجزیه واریانس شدند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد

جدول ۲- توالی مربوط به آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده

Table 2- Sequence of specific primers used

دمای اتصال Primer annealing temperature	طول قطعه تکثیر (bp) Amplified fragment length (bp)	توالی (۵ به ۳) Sequence (5 to 3)	آغازگر primer
51	276	TCCCTGATTGCAGGAAGACT CCAATTCTCCGACCCTGATA	MYB F MYB R
51	1100	GGTGGTTTTGACGGTAAGCA TGCCAACCTCCACACCTTGA	AF F RF R

سانتی‌گراد به مدت ۲۴۰ ثانیه، ۳۶ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، در دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه) و در نهایت بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام

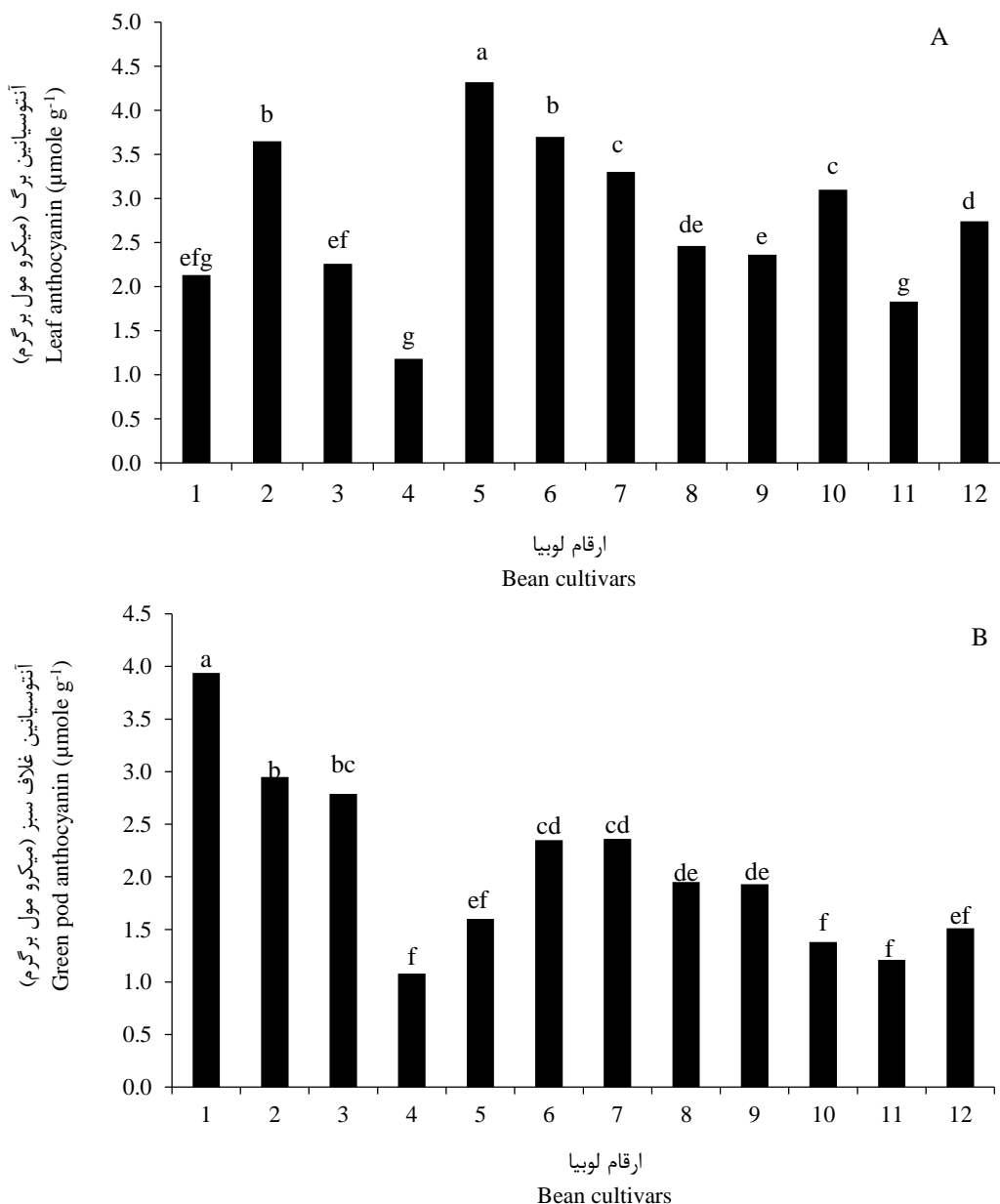
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۲/۵ میکرولیتر (Master mixmm (Mg Cl<sub>2</sub>، سه میکرولیتر DNA ژنومی، از هر پرایمر یک میکرولیتر و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. مراحل PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه

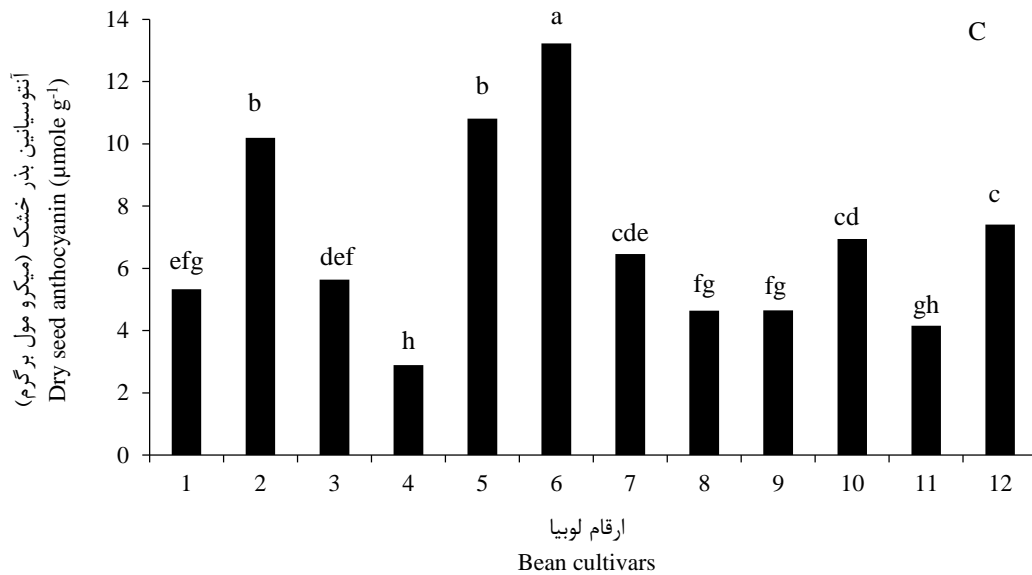
شد. برای تعیین کمیت و کیفیت از ژل آگارز ۱/۵ درصد

محصول PCR استفاده شد. سپس رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام شد. ابتدا جهت بررسی صحت توالی‌های به دست آمده با نمونه‌های موجود در NCBI از نرم‌افزار BLAST به صورت آنلاین جهت بررسی میزان تشابه و همولوژی توالی‌ها با توالی‌ها و نمونه‌های موجود در بانک اطلاعاتی مرکز زیست‌فناوری آمریکا (NCBI) استفاده گردید. جهت هم‌ردیف‌سازی نمونه‌ها از نرم‌افزار BioEdit استفاده شد. همچنین جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی و شناسایی هاپلوتایپ‌ها، شناسایی نواحی حفاظت شده از نرم‌افزارهای CLC sequencer

### نتایج و بحث

نتایج حاصل از مقایسه میانگین برای صفات آنتوسیانین برگ، غلاف سبز و بذر خشک گویای تفاوت میزان آنتوسیانین در ارقام مختلف لوبیا است (شکل‌های ۱ الف، ب و ج). به طوری که بیشترین میزان آنتوسیانین برگ، غلاف سبز و بذر خشک به ترتیب در ژنوتیپ‌های شماره ۵، ژنوتیپ شماره ۱ و ژنوتیپ شماره ۶ به دست آمد. ژنوتیپ شماره ۴ کمترین مقدار آنتوسیانین برگ، غلاف سبز و بذر خشک را به خود اختصاص داد (شکل‌های ۱ الف، ب و ج).





شکل ۲- میزان آنتوسیانین در برگ سبز (الف)، غلاف سبز (ب) و بذر خشک (ج) در بین ژنوتیپ‌های لوبیا  
 Figure 2- Anthocyanin content in green leaf (a), green pod (b) and dry seed (c) among bean genotypes

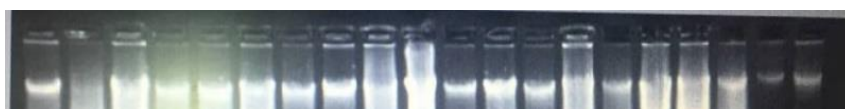
نتایج حاصل از استخراج DNA به روش Doyle و Doyle (۱۹۸۷) در همه نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد که DNA با کیفیت بسیار بالایی استخراج شده است که از این DNA در آنالیزهای بعدی جهت انجام PCR و توالی‌یابی استفاده شد (شکل ۳).

**تکثیر ژن AF و MYB در نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از آغازگر اختصاصی**

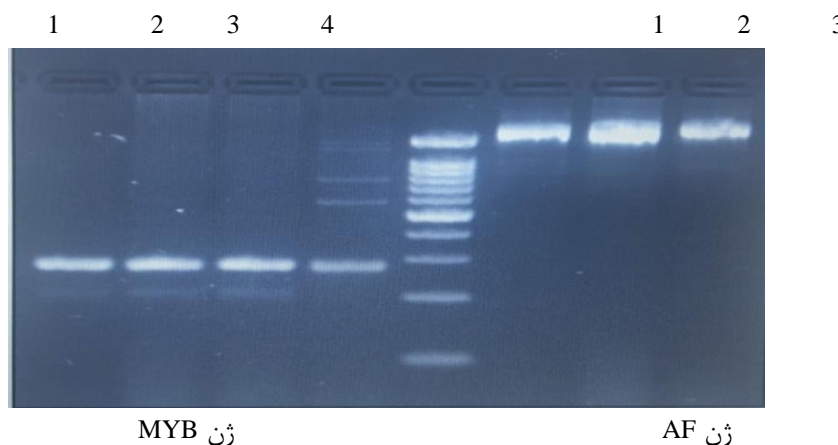
PCR برای هر دو ژن اختصاصی MYB و AF روی همه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه انجام گرفت. نتایج حاصل از تکثیر ژن MYB و AF در نمونه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که ژن MYB در چهار نمونه تکثیر شده است. در حالی که ژن AF در سه نمونه تکثیر شده است. طول قطعات تکثیر شده برای هر دو ژن با اندازه قطعات مورد انتظار مطابقت داشت که هر دو ژن باندهای اختصاصی و منحصر به فرد را در برخی ارقام ایجاد نمودند (شکل ۴).

مقدار آنتوسیانین در بذر خشک که آنتوسیانین کل محسوب می‌شود که در نهایت، آنتوسیانین در بذر تجمع پیدا می‌کند و مهمتر از آنتوسیانین غلاف سبز و برگ می‌باشد؛ به‌عنوان آنتوسیانین اصلی در نظر گرفته می‌شود. با توجه به نتایج به‌دست آمده مقدار آنتوسیانین در ارقامی که پوست دانه تیره‌تری دارند بیشتر از سایر ارقام شد به‌طوری‌که رقم ۶ (لوبیای سیاه) بالاترین مقدار آنتوسیانین را داشته است و رقم ۵ (لوبیا قرمز) در رتبه دوم و رقم ۲ (Skunk) در رتبه سوم قرار گرفته‌اند و کمترین مقدار آنتوسیانین را لوبیای سفید داشته است. در بین ارقام لوبیای چشم‌بلیبی معمولی ۱ و ۲، نمونه موتانت و رقم ۷ (لوبیای چشم‌بلیبی موتانت) آنتوسیانین بیشتری نسبت به ارقام چشم‌بلیبی معمولی ۱ و ۲ (رقم ۸ و ۹) که نواحی تیره بذر آن‌ها کمتر از چشم‌بلیبی موتانت می‌باشد داشت.

**نتایج استخراج DNA**



شکل ۳- نتایج حاصل از استخراج DNA به روش Doyle و Doyle (۱۹۸۷) از برگ‌های تازه لوبیا  
 Figure 3- Results of DNA extraction by Doyle and Doyle (1987) methods from fresh bean leaves



شکل ۴- نتایج تکثیر کیفیت ژن MYB و AF در نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

**Figure 4- Results of AF and MYB gene quality amplification in the studied samples using specific primers**  
 1: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. 1; 2: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. 2; 3: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. var. Mutantand  
 4: *Phaseolus lunatus*L.

NCBI دارد به طوری که از نوکلئوتیدی ۲۶۵ تا ۳۷۷ یک الحاق بزرگ در نمونه‌های مورد بررسی وجود دارد (شکل ۵). همچنین با وجود تنوع تک نوکلئوتیدی (SNP) در برخی نواحی بین نمونه‌ها یک الحاق بزرگ دیگر در فاصله ۵۰۸ تا ۶۸۰ وجود دارد که در این ناحیه ژن A در نمونه‌های لوبیای چشم‌بلبلی و موتانت مورد بررسی تکثیر شده در حالی که در نمونه‌های موجود در NCBI وجود ندارد.

#### انتخاب بهترین مدل برای جایگزینی نوکلئوتیدی توالی‌ها ژن AF

همچنین نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 جهت به دست آوردن بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی با استفاده از روش بیزی نشان داد که مدل T92+G که دارای کمترین مقدار BIC می‌باشد، بهترین مدل جهت جایگزینی نوکلئوتیدی در توالی‌ها می‌باشد (جدول ۳).

#### ساختار نوکلئوتیدی نمونه‌های مورد بررسی ژن AF

با توجه به تغییراتی که در طول قطعه تکثیر شده روی ژل آگارز مشاهده شد، تغییرات چندانی در درصد مولکولی نوکلئوتیدها در نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. بیشترین درصد مولکولی نوکلئوتید A (۳۲/۵۱ درصد) در نمونه NCBI، *V. unguiculata* transcription factor MYB90-like

#### نتایج آنالیز توالی‌ها

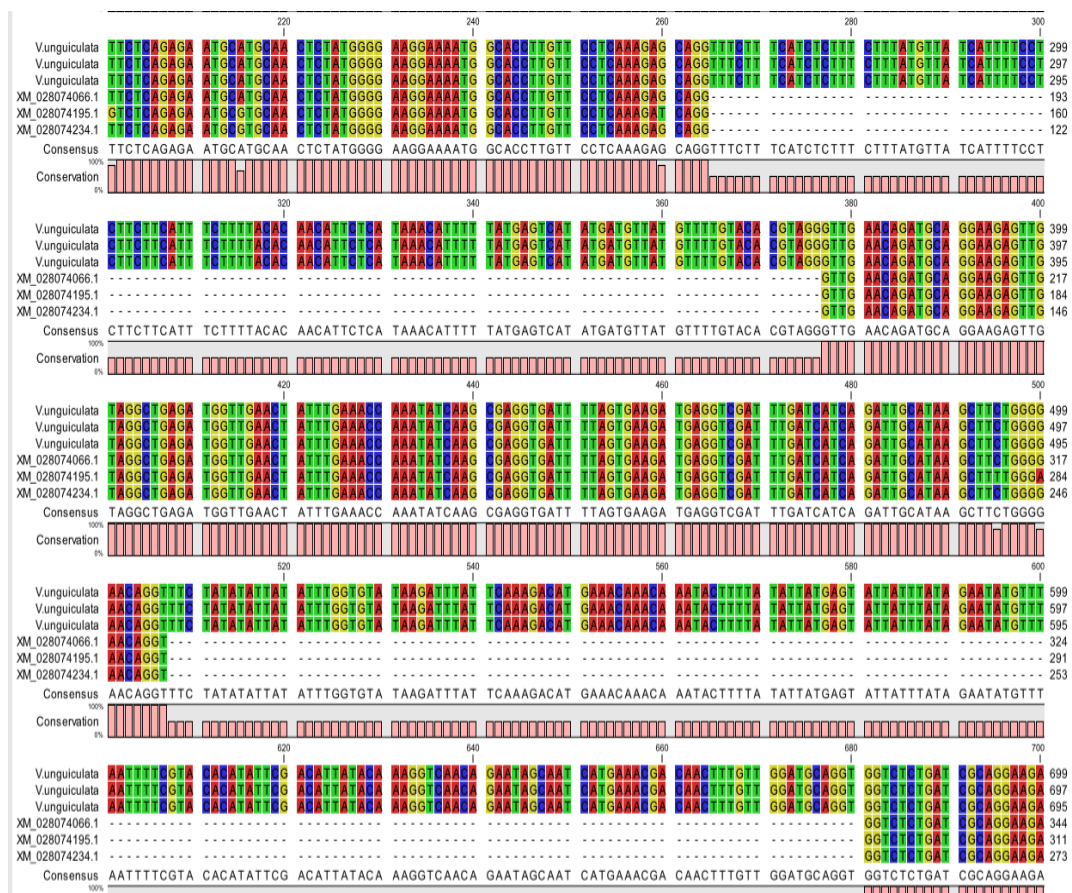
توالی‌های به دست آمده از هر دو ژن MYB و AF در پایگاه اطلاعاتی NCBI بر اساس روش جست‌وجوی نوکلئوتیدی انجام گرفت. نتایج نشان داد که ژن AF فقط با توالی برخی از نمونه‌های لوبیای چشم‌بلبلی (*V. unguiculata* cv. Xiabao) موجود در این پایگاه همولوژی بسیار بالایی (۹۴/۷۵ درصد) را نشان می‌دهد و همچنین ۹۴/۶ درصد با فاکتور رونویسی MYB90 لوبیا چشم‌بلبلی تشابه دارد. علاوه بر این‌ها، نتایج جست‌وجوی ژن MYB در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان می‌دهد که ژن MYB با توالی لوبیا چشم‌بلبلی رقم-*V. unguiculata* cv. Xiabao 2 linkage- group LG10، ۹۸/۳۹ درصد تشابه نشان می‌دهد و همچنین ۹۸/۳۹ درصد با فاکتور رونویسی (MYB90-like LOC114186176) تشابه دارد که بیانگر این است که این ژن مختص لوبیای چشم‌بلبلی است که مسئول ایجاد رنگی‌های رنگی روی پوشش بذر لوبیا می‌باشد.

#### هم‌ردیف‌سازی توالی ژن AF

هم‌ردیف‌سازی توالی‌های به دست آمده از هر دو ژن با استفاده از روش Clustal W در نرم‌افزار BioEdit Sequence Alignment Editor انجام شد. نتایج نشان داد که توالی به دست آمده از نمونه‌های مورد بررسی تفاوت‌های آشکاری با توالی‌های موجود در

*V. unguiculata* به ترتیب ۲۶/۲۶ و ۲۰/۸۹ در نمونه transcription factor MYB114-like *V. unguiculata*. (LOC114186193), mRNA cv. 1 مشاهده شد. مقدار سیتوزین (C) نسبت به بقیه نوکلئوتیدها در همه نمونه‌ها کمتر بود، علاوه بر این‌ها، کمترین مقدار سیتوزین (C) ۱۵/۷۹ در نمونه *V. unguiculata* transcription factor MYB90-like (LOC114186063), mRNA *V. unguiculata* cv. 1 بیشترین مقدار سیتوزین (۱۷/۶۸) در نمونه مشاهده شد.

(LOC114186063), mRNA *V. unguiculata* transcription factor MYB90-like (LOC114186169), mRNA همچنین بیشترین درصد (۳۰/۳۸) مولکولی تیمین (T) در نمونه *V. unguiculata* (L.) Walp. cv. 2 مشاهده شد. در حالی که کمترین مقدار (۲۳/۹۵) در نمونه *V. unguiculata* transcription factor MYB114-like (LOC114186193), mRNA مشاهده شد. بیشترین و کمترین مقدار گوانین (G)



شکل ۵- نتایج هم‌ردیف‌سازی ژن AF با استفاده از نرم‌افزار CLC-sequence viewer  
Figure 5- Results of AF gene sequencing using CLC-sequence viewer software

( $G=22.50\%$ ) است. میزان جانیشینی نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار MEGAX جهت برآورد مقدار جایگزینی نوکلئوتیدی بازهای پورینی و پیریمیدینی انجام شد. نتایج نشان داد که بیشترین جایگزینی از نوع پیریمیدینی (۱۶/۸۹) می‌باشد و کمترین آن از نوع

تخمین جایگزینی نوکلئوتیدی ژن AF با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی الگوی جایگزینی و مقدار تخمین زده شده بر اساس مدل Tamura-Nei (۱۹۹۳) محاسبه شد. فراوانی نوکلئوتید ( $A=33.38\%$ )، ( $T/U =29.03\%$ )، ( $C=17.09\%$ ) و

انتخاب بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی ژن MYB نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 جهت به‌دست آوردن بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی با استفاده از روش بی‌زی نشان می‌دهد که مدل JC که دارای کمترین مقدار BIC می‌باشد بهترین مدل جهت جایگزینی نوکلئوتیدی در توالی‌ها می‌باشد.

پورینی (۶/۵۹) می‌باشد. همچنین مقدار جایگزینی باز پریمیدینی T با C (۱۶/۸۹) می‌باشد. در حالی که مقدار جایگزینی C با T (۹/۹۴) محاسبه شد. علاوه بر این بیشترین مقدار جایگزینی باز پورینی G با A (۹/۱۹) بوده در حالی که مقدار جایگزینی A با G (۶/۵۹) بود. G و A بازپورینی، C و U/T باز پریمیدینی هستند؛ (جدول ۴).

جدول ۳- تخمین جایگزینی نوکلئوتیدی با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی

Table 3- Estimation of nucleotide substitution using the maximum likelihood method

	A	T/U	C	G
A	-	8.33	4.90	6.59
T/U	9.00	-	9.94	6.46
C	9.00	16.89	-	6.46
G	9.19	8.33	4.90	-

جایگزینی باز پریمیدینی T با C (۹/۰۵) می‌باشد. در حالی که مقدار جایگزینی C با T (۷/۹۴) محاسبه شد. همچنین مقدار جایگزینی باز پورینی G با A (۱۴/۵۹) بوده در حالی که مقدار جایگزینی A با G (۱۰/۸۲) بود (جدول ۵).

#### ماتریس تشابهات و تفاوت‌های ژن AF

نتایج جدول ۷ درصد تشابهات و تفاوت‌های ژن AF نمونه‌های موجود در جدول ۶ را نشان می‌دهد.

#### تخمین جایگزینی نوکلئوتیدی ژن MYB استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی

الگوی جایگزینی و مقدار تخمین زده شده بر اساس مدل Tamura-Nei (۱۹۹۳) محاسبه شد. فراوانی نوکلئوتید (A=30.60٪)، (T/U =24.88٪)، (C=21.83٪) و (G=22.69٪) است. نتایج نشان داد که بیشترین جایگزینی از نوع پورینی (۱۴/۵۹) می‌باشد و کمترین آن از نوع پریمیدینی (۷/۹۴) می‌باشد. همچنین مقدار

جدول ۴- تخمین جایگزینی نوکلئوتیدی با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی

Table 4- Estimation of nucleotide substitution using the maximum likelihood method

	A	T/U	C	G
A	-	7.16	6.29	10.82
T/U	8.81	-	7.94	6.53
C	8.81	9.05	-	6.53
G	14.59	7.16	6.29	-

جدول ۵- نمونه‌های موجود در ماتریس تشابهات و تفاوت‌ها ژن AF

Table 5- Examples in the matrix of similarities and differences of AF gene

1	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. cv. 1
2	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. cv. 2
3	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. var. Mutant
4	XM028074066.1 PREDICTED: <i>Vigna unguiculata</i> transcription factor MYB 90 like (LOC114186063) mRNA
5	XM028074195.1 PREDICTED: <i>Vigna unguiculata</i> transcription factor MYB 90 like (LOC114186169) mRNA
6	XM028074234.1 PREDICTED: <i>Vigna unguiculata</i> transcription factor MYB 114 like (LOC114186193) mRNA

جدول ۶- ماتریس تشابهات و تفاوت‌های ژن AF

Table 6- Matrix of similarities and differences of AF gene

	درصد تشابه Similarities %							
	1	2	3	4	5	6		
درصد تفاوت Differences %	1	56.6	94.7	55.8	26.4	59.9	1	
	2	3.4	95.7	57.0	62.2	59.5	2	
	3	3.5	1.8	65.5	61.5	60.6	3	
	4	6.8	5.6	4.5	78.0	71.8	4	
	5	12.7	13.4	13.2	13.8	85.5	5	
	6	3.0	3.2	4.0	1.8	2.8	6	
		1	2	3	4	5	6	

فاکتور رونویسی MYB90 و MYB114 در گروه دیگر قرار گرفته‌اند. همچنین لوبیای چشم‌بلیلی دارای فاکتور رونویسی MYB90 در یک گروه جداگانه قرار گرفته است (شکل ۶). نتایج نمودار درختی با ماتریس تشابهات و تفاوت‌ها مطابقت دارد که نمونه‌های ۱، ۲ و ۳ در یک گروه قرار گرفته‌اند و بیشترین میزان تشابه را هم دارند.

### نمودار درختی ژن AF

نمودار نشان می‌دهد که هر سه نمونه مورد بررسی که دارای ژن A بوده‌اند در یک گروه قرار گرفته‌اند. به طوری که نمونه موتانت لوبیای چشم‌بلیلی در حد واسط دو نمونه لوبیای چشم‌بلیلی ۲ جد (نمونه موتانت) و نمونه لوبیای چشم‌بلیلی نوع ۱ قرار گرفته است. علاوه بر این نمونه‌های لوبیای چشم‌بلیلی دارای



شکل ۶- ترسیم درخت فیلوژنتیکی با نرم‌افزار bootst با الگوریتم UPGMA در سطح DNA

Figure 6- Drawing a phylogenetic tree with bootst software with UPGMA algorithm at DNA level

*Vigna angularis* var. *angularis* DNA, chromosome 4, almost complete sequence, cultivar: Shumari و کمترین مقدار (۱۹/۶۸ درصد) در نمونه *V. unguiculata mutant* مشاهده شد. کمترین مقدار سیتوزین (C) در دو نمونه 296-531 XM\_017560892.1: PREDICTED: *Vigna angularis* transcription factor MYB90-like (LOC108327158), mRNA و AP015037.1: 4241108-4241343 *Vigna angularis* var. *angularis* DNA chromosome 4, almost complete sequence, cultivar: Shumari، (۱۷/۸۰) مشاهده شد در حالی که بیشترین مقدار سیتوزین (۲۵/۱۰) در دو نمونه P039354.1: 56671044-56671282 *Vigna unguiculata* cultivar Xiabao 2 linkage-group و P039354.1: 56676056-56676294 و LG1 *Vigna unguiculata* cultivar Xiabao 2 linkage-group مشاهده شد.

#### ماتریس تشابهات و تفاوت‌های ژن MYB

نتایج جدول ۸ درصد تشابهات و تفاوت‌های ژن AF نمونه‌های موجود در جدول ۷ را نشان می‌دهد.

#### نمودار درختی ژن MYB

نمودار درختی ژن M در نمونه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که با ۹۸ درصد تشابه نمونه‌ها به سه گروه تقسیم می‌شوند که گروه اول شامل هفت نمونه از گونه‌های مختلف لوبیا از جمله *V. angularis* و *V. unguiculata* و *P. vulgaris* و همچنین *P. lunatus* است که در یک گروه قرار گرفتند و همچنین نمونه‌های لوبیا چشم‌بلبلی رقم Xiabao به‌تنهایی در یک گروه قرار گرفتند. نمونه لوبیا چشم‌بلبلی نوع ۱ و ۲ به‌همراه نمونه موتانت در یک گروه دیگر قرار گرفتند که نمونه‌ی موتانت هیچ‌گونه تنوع تک نوکلئوتیدی نسبت به جد خود، نوع ۱ نشان نداد (شکل ۷).

#### ساختار نوکلئوتیدی نمونه‌های مورد بررسی ژن

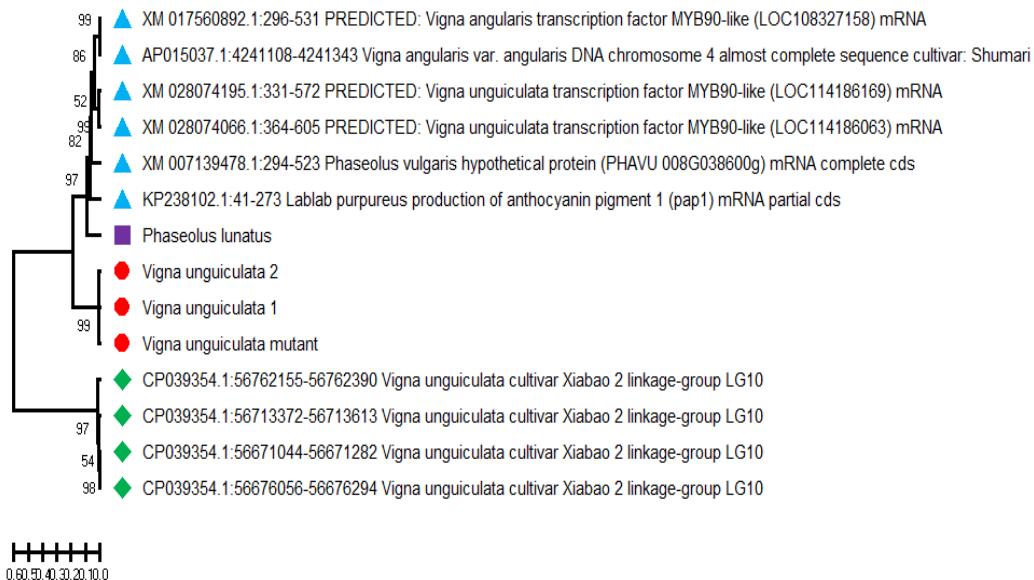
##### MYB

نتایج آنالیز تعداد و درصد نوکلئوتیدی در نمونه‌های مورد بررسی در مقایسه با نمونه موجود در NCBI نشان داد که با توجه به این که تغییرات قابل مشاهده‌ای در طول قطعه تکثیر شده روی ژل آگارز مشاهده نمی‌شود، اما تغییرات جزئی در درصد مولکولی نوکلئوتیدها در نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده می‌شود. بیشترین درصد مولکولی نوکلئوتید A (۳۵/۵۹ درصد) در دو نمونه 296-531 XM\_017560892.1: NCBI PREDICTED: *V. angularis* transcription factor MYB90-like (LOC108327158), mRNA و AP015037.1: 4241108-4241343 *Vigna angularis* var. *angularis* DNA, chromosome 4, almost complete sequence, cultivar: Shumari کمترین مقدار (۱۹/۰۱ درصد) در نمونه P039354.1: 56713372-56713613 *Vigna unguiculata* group LG10 cultivar Xiabao 2 linkage-group مشاهده شد. همچنین بیشترین درصد (۳۵/۵۴) مولکولی تیمین (T) در نمونه P039354.1: 56713372-56713613 *Vigna unguiculata* cultivar Xiabao 2 linkage-group LG10 مشاهده شد در حالی که کمترین مقدار (۱۹/۰۱) در دو نمونه 331-572 M\_028074195.1: PREDICTED: *Vigna unguiculata* transcription factor MYB90-like (LOC114186169), mRNA و XM\_028074066.1: 364-605 PREDICTED: *Vigna unguiculata* transcription factor MYB90-like (LOC114186063), mRNA مشاهده شد. بیشترین مقدار گوانین (G) (۲۷/۱۲) در دو نمونه 296-531 XM\_017560892.1: PREDICTED: *Vigna angularis* transcription factor MYB90-like (LOC108327158), mRNA و AP015037.1: 4241108-4241343

## جدول ۷- نمونه‌های ماتریس تشابهات و تفاوت‌ها

Table 7- Examples of matrices of similarities and differences

1	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. cv. 1
2	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. cv. 2
3	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. var. Mutant
4	<i>Phaseolus lunatus</i> L.
5	XM 007139478.1: 294-523 <i>Phaseolus vulgaris</i> hypothetical protein (PHAVU_008G038600g) mRNA, complete cds.
6	KP238102.1: 41-273 Lablab purpureus p XM_007139478.1: 294-523roduction of anthocyanin pigment 1 (pap1) mRNA, partial cds
7	XM 017560892.1: 296-531 PREDICTED: <i>Vigna angularis</i> transcription factor MYB90-like (LOC108327158), mRNA
8	AP015037.1: 4241108-4241343 <i>Vigna angularis</i> var. <i>angularis</i> DNA, chromosome 4, almost complete sequence, cultivar: Shumari
9	CP039354.1: 56671044-56671282 <i>Vigna unguiculata</i> cultivar Xiabao 2 linkage-group LG10
10	CP039354.1: 56676056-56676294 <i>Vigna unguiculata</i> cultivar Xiabao 2 linkage-group LG10
11	CP039354.1: 56762155-56762390 <i>Vigna unguiculata</i> cultivar Xiabao 2 linkage-group LG10
12	CP039354.1: 56713372-56713613 <i>Vigna unguiculata</i> cultivar Xiabao 2 linkage-group LG10
13	XM 028074195.1: 331-572 PREDICTED: <i>Vigna unguiculata</i> transcription factor MYB90-like (LOC114186169), mRNA
14	XM 028074066.1: 364-605 PREDICTED: <i>Vigna unguiculata</i> transcription factor MYB90-like (LOC114186063), mRNA



شکل ۷- ترسیم درخت فیلوژنتیکی با نرم‌افزار bootst با الگوریتم UPGMA در سطح DNA

Figure 7- Drawing a phylogenetic tree with bootst software with UPGMA algorithm at DNA level



## نتیجه‌گیری کلی

از نظر صفت آنتوسیانین رقم ۶ (لوبیا سیاه) بر تمامی ارقام برتری داشت و در بین ارقام لوبیای چشم‌بلبلی نمونه موتانت (رقم ۷) دارای آنتوسیانین بیشتری نسبت به دو نمونه لوبیای چشم‌بلبلی معمولی ۱ و ۲ می‌باشد. دلیل این اختلاف این است که نمونه چشم‌بلبلی موتانت دارای پوششی با نواحی سیاه بیشتر می‌باشد. رنگ تیره پوشش بذر این رقم نسبت به دو نمونه چشم‌بلبلی معمولی حاکی از آن است که آنتوسیانین بیشتری دارد. لازم به ذکر است که رنگ سیاه دانه با آنتوسیانین در ارتباط مستقیم است. همچنین بررسی ۱۲ ژنوتیپ لوبیا نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا از نظر صفت آنتوسیانین اختلاف معنی‌داری وجود دارد و آنتوسیانین کل در دانه‌هایی که رنگ پوسته تیره‌تری دارند نسبت به لوبیای سفید بیشتر است (Jamal Omid & )

(Setodi, 2018). میزان آنتوسیانین کل در ژنوتیپ‌های سیاه رنگ لوبیا بیشتر از سایر الگوی رنگی لوبیا می‌باشد (Balasubramanian *et al.*, 2004). همان‌طور که جدول ۹ نشان می‌دهد ژن AF تنها در نمونه‌های لوبیای چشم‌بلبلی ۱، ۲ و لوبیا چشم‌بلبلی موتانت تکثیر شده است و در سایر نمونه‌ها این ژن تکثیر نشده است در حالی که ژن MYB علاوه بر لوبیای چشم‌بلبلی ۱، ۲ و لوبیای چشم‌بلبلی موتانت در لوبیای عروس نیز تکثیر شده است در حالی که در سایر نمونه‌ها تکثیر نشده است. نتایج نشان داد در نمونه‌هایی که فاکتور رونویسی MYB یعنی نمونه (چشم‌بلبلی موتانت، چشم‌بلبلی معمولی ۱، ۲ و لوبیای عروس یا کریسمس) و AF (چشم‌بلبلی موتانت، چشم‌بلبلی معمولی ۱ و ۲) تکثیر شدند دارای مقادیر آنتوسیانین بالایی نیز بودند.

جدول ۹- مقدار آنتوسیانین و تکثیر ژن MYB و AF

Table 9- Anthocyanin content and MYB and AF gene amplification

English name	نام فارسی	AF	MYB	آنتوسیانین بذر Seed anthocyanin content
Pinto Bean 1	لوبیا چیتی ۱			5.33
Pinto Bean skunk	لوبیا چیتی رقم skunk			10.19
Pinto Bean 2	لوبیا چیتی ۲			5.64
Navy Bean	لوبیا سفید			2.89
Kidney Bean	لوبیا قرمز			10.81
Black Beans	لوبیا سیاه			13.23
Cowpea Mutant	لوبیا چشم بلبلی موتانت	✓	✓	6.46
Cowpea 1	لوبیا چشم‌بلبلی معمولی ۱	✓	✓	4.64
Cowpea 2	لوبیا چشم‌بلبلی معمولی ۲	✓	✓	4.64
Swedish brown beans	لوبیا قهوه‌ای سوئدی			6.94
Pinto Bean 3	لوبیا چیتی ۳			4.16
Christmas Lima Bean	لوبیا عروس		✓	7.41

مربوط به فاکتور رونویسی MYB کنترل می‌شوند که علاوه بر تأثیر در رنگ پوشش دانه که ظاهری جذاب‌تر نسبت به ارقام چشم‌بلبلی معمولی دارد حاوی

این ژن‌ها با تأثیر در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین باعث افزایش رنگ سیاه لوبیای چشم‌بلبلی موتانت شدند. رنگ سیاه بذر از طریق بیوسنتز آنتوسیانین توسط ژن‌های

مناسبی برای کشت و معرفی به کشاورزان باشد یا نه؟ نتایج توالی‌یابی نشان داد که در ژن AF در رقم لوبیای چشم‌بلبلی موتانت دو الحاق بزرگ با استفاده از جست‌وجوی اطلاعاتی در NCBI شناسایی گردید که در مقایسه با سایر محققین که با استفاده از تکنیک RNA-seq روی ارقام مشابه لوبیا چشم‌بلبلی کار کرده بودند شناسایی شد. بنابراین با توجه به این که رقم لوبیای چشم‌بلبلی موتانت توسط مؤلف تولید و معرفی شده است و همچنین مقدار بالای عملکرد و آنتوسیانین و حضور ژن‌های AF و MYB می‌تواند گزینه مناسبی جهت بررسی بعدی و جداسازی کامل این ژن باشد تا از این طریق بتوان میزان بیان دقیق آن را بررسی نمود.

آنتوسیانین بیشتری نیز می‌باشد. بنابراین، با توجه به حضور ژن‌های MYB و AF که در سنتز آنتوسیانین‌ها نقش دارند، باعث جذابیت و بازاریابی محصول لوبیا شده که میزان آنتوسیانین بالاتری دارند و می‌توان در برنامه‌های غذایی مورد توجه ویژه قرار گیرند. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت رقم چشم‌بلبلی موتانت به دلیل آنتوسیانین بیشتر و ظاهری جذاب‌تر در مقایسه با سایر ارقام لوبیای چشم‌بلبلی می‌تواند جایگزین ارقام معمولی این نوع لوبیا شود. البته بایستی مطالعات بیشتری در خصوص تأثیر حضور این ژن‌ها بر خصوصیات کیفیت و کمیت لوبیا چشم‌بلبلی مورد بررسی قرار گیرد تا مشخص شود که آیا می‌تواند گزینه

## References

- Aparicio-Fernandez, X., Manzo-Bonilla, L. & Loarca-Pina, G. F. (2005). Comparison of antimutagenic activity of phenolic compounds in newly harvested and stored common beans *Phaseolus vulgaris* against aflatoxin B1. *Journal of Food Science*, 70(1), S73-S78.
- Balasubramanian, P., Oomah, B. D. & Kiehn, F. (2004). Phenolic compounds in dry bean seed. *Pulse Beat*, 44, 27-28
- Beninger, C. W. & Hosfield, G. L. (2003). Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions, and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. seed coat color genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7879-7883.
- Boots, A. W., Haenen, G.R. & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2), 325-337.
- Cushnie, T. T. & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull*, 19, 11-15.
- Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X. F., Yang, W. J., Wu, Y. M. & Tang, Y. X. (2009). Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry*, 74(1), 1-11.
- Emeterio Payro, D. L. C., Gepts, P., Garciamarin, P. C. & Villareal, D. Z. (2004). Spatial distribution of genetic diversity in the wild population of from Guanajuato and Michoacan. *Mexico Genetic Crop Research*, 9, 1-11.
- Fery, R. L. (1980). Genetics of Vigna. *In Horticultural Reviews*, 2, 311-94.
- Giusti, M. M. & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: R. E. Wrolstad (Ed.), *In current protocols in food analytical chemistry*. (pp. 1-13). John Wiley & Sons, New York.
- Gonda, T. J. (1998). The c-Myb oncoprotein. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(5), 547-551.
- Graham, P. H. & Ranalli, P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research*, 53, 131-146.
- Harland, S. C. (1920). Inheritance of certain characters in the cowpea (*Vigna sinensis*). II. *Journal of Genetics*, 10(3),

- 193-205.
- Herniter, I. A., Munoz-Amatriain, M., Lo, S., Guo, Y. N. & Close, T. J. (2018). Identification of candidate genes controlling black seed coat and pod tip color in cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp). *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(10), 3347-3355.
  - Jamal-omidi, M. & Padash-Setodi, M. (2018). Biochemical and physiological affinities of some bean (*Phaseolus vulgaris* L) cultivars. *Third National Conference on Biology*. Payame Noor University of Mazandaran Province. (In Farsi)
  - Karanja, N. K., Kimenju, J. M., Esilaba, A. O. Jefwa, J. & Ayuke, F. (2011). The Multiple Roles of Legumes in Integrated Soil Fertility Management. In: A. Bationo, B. Waswa, J. M. Okeyo, F. Maina, J. Kihara. & U. Mokuwonye. (Eds.), *Fighting poverty in sub-Saharan Africa*. (pp. 67-83). Springer Science & Business Media.
  - Kostyla, A. S., Clydesdale, F. M. & McDaniel, M. R. (1978). The psychophysical relationships between color and flavor. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 10(3), 303-321.
  - McClean, P. E., Lee, R. K., Otto, C., Gepts, P. & Bassett, M. J. (2002). Molecular and phenotypic mapping of genes controlling seed coat pattern and color in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Heredity*, 93(2), 148-152.
  - Mishili, F. J., Fulton, J., Shehu, M., Kushwaha, S., Marfo, K., Jamal, M. & Lowenberg- DeBoer, J. (2009). Consumer preferences for quality characteristics along the cowpea value chain in Nigeria, Ghana, and Mali. *Agribusiness: An International Journal*, 25(1), 16-35.
  - Petroni, K. & Tonelli, C. (2011). Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. *Plant Science*, 181(3), 219-229.
  - Piergiovanni, A. R., Cerbino, D. & Gatta, C. D. (2000). Diversity in seed quality traits of common bean populations from Basilicata (Southern Italy). *Plant Breeding*, 119(6), 513-516.
  - Sheikh, S., Yamchi, A., Navabpor, S., Pahlavani, M. H. & Abaseian, M. (2015). Gene status check D, transcription factor coding MYB, In some Potato cultivars cultivated in Iran by PCR-RELP, *Second Conference on new Findings in the Environment and Agricultural Ecosystems*. Tehran University. Institute of new Energy and Environment. (In Farsi)
  - Simonne, A. H., Weaver, D. B. & Wei, C. I. (2000). Immature soybean seeds as a vegetable or snack food: acceptability by American consumers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(4), 289-296.
  - Singh, B. B. (2014). Cowpea: The Food Legume of the 21st Century. *Crop Science Society of America, Inc.* 2014. <https://doi.org/doi:10.2135/2014>.
  - Stoilova, T., Pereira, G., de Sousa, M. M. & Carnide, V. (2005). Diversity in common bean landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) from Bulgaria and Portugal. *Journal of Central European Agriculture*, 6(4), 443-448.
  - Tijjani, A. R., Nabinta, R. T. & Muntaka, M. (2015). Adoption of innovative cowpea production practices in a rural area of Katsina State, Nigeria. *Journal of Agricultural and Crop Research*, 3(4), 53-58.
  - Yan, F., Di, S. & Takahashi, R. (2015). CACTA-superfamily transposable element is inserted in MYB transcription factor gene of soybean line producing variegated seeds. *Genome*, 58(8), 365-374.