

Evaluation of Genetic Diversity and Identifying Relationships of Seed Characteristics with SSR and SCoT Markers in Common Bean

Maryam Ghorbani¹, Kianoosh Cheghamirza^{2,*}, Saeed Abbasi³
and Zahra Azizaram⁴

- 1- Ph.D. Student, Production Engineering and Plant Genetics Department, Razi University, Kermanshah, Iran
- 2- Associate Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Razi University, Kermanshah, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Plant Protection, Razi University, Kermanshah, Iran
- 4- Former Ph.D. Student, Production Engineering and Plant Genetics Department, Razi University, Kermanshah, Iran

*Corresponding author ✉: cheghamirza@razi.ac.ir

Citation: Ghorbani, M., Cheghamirza, K., Abbasi, S. and Azizaram, Z. (2023). Evaluation of genetic diversity and identifying relationships of seed characteristics with SSR and SCoT markers in common bean. *Plant Genetic Researches*, **10(1)**: 157-174. <http://dx.doi.org/10.22034/pgr.10.1.10>

(Received: January 2, 2023; Final Revised: July 19, 2023; Accepted: August 1, 2023; Published online: September 21, 2023)

Extended abstract

Introduction

Common bean as the main grain legume is the most important legume produced for direct human consumption, with a commercial value. It is a source of protein for many people, which it can fill the lack of meat in a healthy diet. Common bean is a rich source of minerals such as iron and zinc, therefore, consuming of common bean has related to a decreased risk for a wide variety of diseases such as cancer, diabetes and cardiovascular diseases. Common bean is a diploid plant with the number of 22 chromosomes ($2n = 22$) and genome size of 580 Mbp, which its main origin is Mexico and Central America. This plant due to its environmental compatibility and high nutritional value, it has been increasingly spread around the world. It seems determination of genetic diversity and the nutritional value of common bean cultivars is an important strategy.

Materials and methods

The current research was carried out to evaluate genetic diversity of 18 common bean cultivars and promising lines received from Khomein Bean Research National Station, Markazi province, Iran and to determine SSR and SCoT informative markers associated with 14 seed characteristics including the number of seeds per pod, 100 seed weight, seed length, seed width, the contents of crude protein, total soluble sugar, starch content, crude fat, iron, calcium, magnesium, zinc, uronic acid, and mineral ash. Thirty-one polymorphic microsatellite markers (SSR) with known chromosome location and 19 SCoT primers with unknown chromosome information were used to assess the genetic diversity of common bean genotypes. The presence (1) or absence (0) of amplified products was determined visually using their gel patterns. Genetic diversity was assessed using analysis of molecular variance (AMOVA), principal coordinates analysis (PCoA) and cluster analysis. Cluster analysis used to describe genetic diversity and clustering based on the similar characteristic. Cluster analysis was done by Ward's method with Jaccard's similarity coefficient and using SYSTAT13 software. In order to verify the results of cluster analysis, principal coordinate analysis was performed using NTSYS software and molecular variance analysis was performed with Arlequin v3.5.2.2 software.



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

Results and discussion

Thirty-one SSR primers and 19 SCoT primers were successfully amplified. The polymorphism information content (PIC) values varied from 0.2 to 0.5 with an average of 0.39 for the SSR markers and from 0.19 to 0.42 with an average of 0.34 for the SCoT markers. The total average resolving power of SSR and SCoT markers were 1.54 and 5.34, respectively, indicating higher efficiency of SCoT markers than SSR markers for the diversity analysis. Suitable genetic diversity was detected among the common bean genotypes using two different marker systems. A number of informative SSR and SCoT markers were identified. The common bean studied genotypes were clustered into three distinct groups for both markers based on the Complete Linkage method. Principal coordinate analysis supported classification of the varieties/lines by cluster analysis. Principal coordinate analysis (PCoA) for the SSR markers revealed that the first two principal components justified 59.05% of whole variation. For the SCoT marker, on the other hand, the fraction of variances explained by the first two principal components was equal to 25.43 indicating a better distribution of SCoT markers than SSR markers in the common bean genome. Analysis of molecular variance based on the grouping obtained from cluster analysis showed that the diversity within the group based on SSR and SCoT markers was equal to 89 and 78%, respectively. AMOVA demonstrated that major variation existed within common bean cultivars and promising lines in our study. The results of regression analysis for the studied markers and the common bean seed characteristics showed the existence of a significant relationships between one marker with the several studied traits. This could indicate the association or linkage of the marker locations. Twelve out of 14 of the investigated common bean seed characteristics showed a significant relationship with at least one molecular marker.

Conclusions

Two markers, SSR and SCoT, were to detect variation among the studied common bean genotypes effectively. The genetic diversity estimated could help us to find suitable genetic crosses to achieve a common bean genotype with a high amount of useful nutritious and appropriate seed characteristics with a high amount of nutritional factors. The contribution of all these traits in seed quality would provide valuable information for breeding programs.

Keywords: Marker-trait association, Regression analysis, Seed quality, *Phaseolus vulgaris*



ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارتباط خصوصیات دانه با نشانگرهای SSR و SCoT در لوبیا

مریم قربانی^۱، کیانوش چقامیرزا^{۲*}، سعید عباسی^۳ و زهرا عزیزی آرام^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۲- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۳- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۴- دانش‌آموخته دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۲؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۱۰؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۲/۰۶/۳۰)

چکیده

تحقیق حاضر به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۸ رقم و لاین امیدبخش لوبیا و شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش SSR و SCoT مرتبط با ۱۴ خصوصیت دانه شامل تعداد دانه در غلاف، وزن ۱۰۰ دانه، طول دانه، عرض دانه، پروتئین خام، قند محلول کل، نشاسته، میزان چربی، خاکستر، غلظت آهن، کلسیم، منیزیم، روی و اسید اورونیک انجام شد. میزان محتوای چندشکلی (PIC) برای نشانگر SSR از ۰/۲ تا ۰/۵ با متوسط ۰/۳۹ و برای نشانگر SCoT بین ۰/۱۹ تا ۰/۴۲ با میانگین ۰/۳۴ متغیر بود. میانگین کل قدرت تفکیک نشانگر SSR و SCoT به ترتیب برابر ۱/۵۴ و ۵/۳۴ بود که می‌تواند بیانگر مناسب‌تر بودن نشانگر SCoT نسبت به نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه لوبیا باشد. با دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از هر دو نشانگر، ژنوتیپ‌های لوبیا به سه گروه متفاوت دسته‌بندی شدند. تجزیه به مختصات اصلی برای نشانگر SSR نشان داد که مجموع تغییرات توجیه شده توسط دو مؤلفه اول برابر با ۵۹/۰۵ درصد و برای نشانگر SCoT تنها ۲۵/۴۳ درصد بود که این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده پراکنش بهتر نشانگرهای SCoT نسبت به نشانگرهای SSR در سطح ژنوم لوبیا باشد. تجزیه واریانس مولکولی بر اساس گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که تنوع داخل گروه بر اساس نشانگرهای SSR و SCoT به ترتیب برابر با ۸۹ و ۷۸ درصد بود. نتایج تجزیه رگرسیون بین نشانگرهای مورد بررسی و خصوصیات دانه لوبیا نشان‌دهنده وجود ارتباط معنی‌دار هر نشانگر با چندین صفت مورد بررسی بود که این موضوع می‌تواند بیانگر ارتباط یا پیوستگی مکان‌های نشانگری باشد. دوازده صفت از ۱۴ خصوصیت مورد بررسی دانه لوبیا با حداقل یک نشانگر مولکولی ارتباط معنی‌دار نشان دادند.

واژگان کلیدی: ارتباط نشانگر-صفت، تجزیه رگرسیون، کیفیت دانه، *Phaseolus vulgaris*

لوبیا با نام علمی *Phaseolus vulgaris* L. یکی از انواع بقولات است که سهم بسزایی در تأمین نیازهای غذایی مردم در سراسر جهان دارد. این محصول به علت غنی بودن از پروتئین‌های با کیفیت بالا و دیگر ترکیبات مهم از جمله کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی (مثل آهن و روی)، فیبرهای غذایی، عناصر غذایی گیاهی (فلاونوئیدها، لیگنین‌ها، فیتواسترول‌ها) و آنتی‌اکسیدان‌ها در تغذیه‌ی انسان جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است (Butt and Rizwana, 2010; Joshi and Rao, 2017; Murube et al. 2021).

لوبیا گیاهی دیپلوئید با تعداد ۲۲ کروموزوم ($2n=2x=22$) و اندازه ژنوم ۵۸۰ Mbp که خاستگاه اصلی آن مکزیک و آمریکای مرکزی بوده و به دلیل سازگاری زیست‌محیطی و ارزش غذایی بالای خود به سرعت در سرتاسر جهان گسترش یافت و این عقیده وجود دارد که خزانه‌ی ژنتیکی آندین (Andean) خیلی پیش‌تر از فرآیند اهلی‌شدن، شکل گرفته است (Bitocchi et al., 2012; Desiderio et al., 2013; Bellucci et al., 2017; Bitocchi et al., 2014). بر اساس گزارش فانو در سال ۲۰۲۱، تولید جهانی این محصول بیش از ۲۷ میلیون تن در بیش از ۳۴ میلیون هکتار از اراضی سرتاسر جهان بوده است (FAO, 2021). مطالعات زیادی در زمینه‌های مختلف از جمله تحقیقات مولکولی و به دنبال آن بررسی ژنوم لوبیا صورت گرفته است که می‌تواند به درک بهتر و بیشتر ما از ماهیت و ساختار این گیاه راهبردی کمک کند. نشانگرهای ریزماهوره (Simple-Sequence Repeats: SSR) به دلیل داشتن توالی‌های DNA کوتاه و تکراری به صورت گسترده در تعیین تنوع و ایجاد نقشه‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Müller et al., 2015; Mir Drikvand et al., 2015; Fisseha et al., 2016; Gioia et al., 2019; Carvalho et al., 2021; Savić et al., 2020). مطالعه گیاهان مختلف با ژرم-پلاسم غنی، نیازمند آگاهی دقیق از روابط ژنتیکی مواد گیاهی و تعیین ژنتیکی آنها می‌باشد (Liu et al., 2003; Gioia et al., 2019) که در این میان اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم و ارتباط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Matus and Hayes, 2002). امروزه از نشانگرهایی مانند

SSR (Inter Simple Sequence Repeats) (Start)، RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Polymorphic DNA) و SNP (Single-Nucleotide Polymorphism) به طور گسترده‌ای در مطالعات تنوعی گیاهان استفاده می‌شود. این نشانگرها، مکان‌های ژنتیکی قابل ردیابی در یک جمعیت هستند که می‌توانند با یک ژن یا صفت خاصی مرتبط باشند (Collard et al., 2005; Nkongolo et al., 2011; Hayward et al., 2015; Al-Samarai and Al-Kazaz, 2017; Nadeem et al., 2018). در اغلب یوکاریوت‌ها توالی‌های تکراری کوتاه دو تا پنج جفت‌بازی وجود دارد که اصطلاحاً به آنها ریزماهوره یا ردیف‌های تکراری پشت سرهم (SSR) گفته می‌شود (Litt and Luty, 1989). توالی‌های SSR به یکی از نشانگرهای مولکولی کارآمد جهت شناسایی نواحی کروموزومی و ارزیابی تنوع ژنتیکی تبدیل شده‌اند. چندشکلی تولیدشده توسط این نشانگر برای شناسایی تنوع ژرم‌پلاسم و نقشه‌یابی ژنتیکی در گونه‌های مختلف استفاده می‌شود و به دلیل درجه بالای چندشکلی که تولید می‌کند استفاده از آن در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی در بسیاری از مطالعات توصیه می‌شود (Geleta et al., 2006; Ali et al., 2008; Shehzad et al., 2009; Gheitaran et al., 2014; Aziziaran, 2022).

نشانگر دیگری که بر اساس ناحیه‌ی حفاظت‌شده کوتاهی از ژن‌های گیاهی اطراف کدون آغاز ATG تعریف می‌شود SCoT نام دارد (Collard and Mackill, 2009). از آنجایی که در طراحی این نشانگر از توالی اجماع ژن‌های گیاهی استفاده می‌شود، بنابراین ممکن است با ژن‌های عملکردی و صفات متناظرشان در ارتباط باشند (Collard and Mackill, 2009; Bhattacharyya et al., 2014). این نشانگر، به دلیل قابلیت تفکیک بهتر و چندشکلی بالاتر، استفاده آسان، ارزان‌تر و سریع‌تر بودن نسبت به سایر نشانگرهای مولکولی همچون ISSR و RAPD محبوبیت بیشتری دارد (Mulpuri et al., 2013). هرودادووا و همکاران (Hromadová et al., 2022) با استفاده از پنج نشانگر SCoT بر روی ۳۴ ژنوتیپ لوبیا که از کشورهای مختلف جمع‌آوری شده بود، تنوع ژنتیکی را تجزیه نمودند، آن‌ها توانستند ۶۶ قطعه چندشکلی با میانگین ۱۱ قطعه به‌ازای هر آغازگر تکثیر نمایند. گیانگ و همکاران (Gyang et al., 2017)

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۸ رقم و لاین امیدبخش لوبیای دریافت شده از ایستگاه ملی تحقیقات لوبیای خمین (جدول ۱) از ۳۱ جفت آغازگر SSR انتخاب شده بر روی همه کروموزوم‌های لوبیا و ۱۹ آغازگر SCoT استفاده شد (جدول ۲ و ۳). استخراج DNA به روش دلاپورتا، از برگ‌های جوان بوته‌ها در مرحله‌ی دو تا چهار برگی با وزن تقریبی ۰/۱ گرم که در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند، صورت گرفت (Dellaporta *et al.*, 1983). با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و آشکارسازی نتایج توسط اتیدیوم بروماید، کیفیت DNA استخراج‌شده تعیین و کمیت آن نیز توسط نانودراپ مشخص گردید. در هر دو سیستم نشانگری، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction: PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Palm-Cycler، کشور آلمان) و در حجم نهایی ۱۴ میکرولیتر با آغازگر ۱۰ پیکومول، DNA با غلظت ۱۵ نانوگرم، مستر میکس آماده 2X (شرکت سازنده سیناکلون) انجام شد. به‌منظور آشکارسازی محصولات تکثیرشده برای نشانگر SSR از دو نوع الکتروفورز عمودی (ژل اکریل آمید ۶ درصد و ولتاژ ۵۰ به مدت ۵ ساعت) و افقی (ژل آگارز ۲ درصد و ولتاژ ۱۱۰ به مدت سه ساعت) استفاده گردید. همچنین برای نشانگر SCoT با استفاده از الکتروفورز افقی و ژل آگارز ۱/۲ درصد و بافر TAE 1x محصولات تکثیریافته بارگذاری شدند. آشکارسازی هر دو نشانگر توسط اتیدیوم بروماید انجام شد. صفات اندازه‌گیری شده عبارت بودند از خاکستر معدنی به روش A.O.A.C (Gholami and Ansari, Horwitz, 1975)، پروتئین خام به روش Kjeldahl (VELP Scientifica) (2021)، پروتئین (Bradstreet, 1954) (Srl. Italy) درصد قند محلول (MyBioSource، ایالات‌متحده آمریکا) (MacRae and Armstrong, 1968)، درصد نشاسته (MacRae, 1971)، محتویات آهن و روی با تعیین طیف‌سنجی جذب اتمی (Udoh, 2000)، کلسیم و منیزیم با تکنیک کمپلکسومتری تیتراسیون (Isaac and Kerber, 1971) و اسید اوریک توسط کیت سنجش اسید اورونیک (Libios، فرانسه) (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973).

با بررسی تنوع ژنتیکی ۴۰ ژنوتیپ لوبیا با استفاده از نشانگر SSR تنوع ژنتیکی بالایی در داخل جمعیت در مقایسه با تنوع ژنتیکی بین‌جمعیتی مشاهده نمودند. در مطالعه‌ی دیگری، احمد (Ahmad, 2018) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ۲۰ ژنوتیپ لوبیا را گروه‌بندی نمود. ماکونجا و همکاران (Makunja *et al.*, 2020)، با استفاده از آغازگرهای SCoT، تنوع ژنتیکی لوبیاهای جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف کنیا را ارزیابی نمودند. در مطالعه‌ی دیگر یکن و همکاران (Yeken *et al.*, 2022) بر روی نمونه‌های لوبیا با استفاده از نشانگر SCoT، ارقام مورد مطالعه را در دو گروه آندینی و مزوامریکا قرار دادند. با توجه به اهمیت ترکیبات شیمیایی موجود در دانه‌های لوبیا، تاکنون مطالعات زیادی بر روی کمیت و کیفیت آن‌ها توسط محققان مختلف در سرتاسر دنیا صورت گرفته است. در همین راستا، آنینو و همکاران (Anino *et al.*, 2019)، میزان ترکیبات مغذی و غیرمغذی موجود در دانه‌های لوبیا را بر روی سه رقم مختلف آن شامل قرمز، چیتی و زرد بررسی و میزان بالایی از ترکیباتی همچون پروتئین، فیبر، کربوهیدرات و مواد معدنی (P، Fe، Zn و Ca) را مشاهده کردند. عزیزی آرام و همکاران (Aziziaran *et al.*, 2021) تنوع و پیشرفت ژنتیکی ترکیبات شیمیایی و ویژگی‌های ریخت‌شناختی دانه ۲۲ رقم لاین لوبیا را بررسی کردند و تنوع معنی‌داری را بین خصوصیات دانه‌های لوبیای مورد مطالعه به‌دست آوردند. در سال‌های اخیر از تجزیه رگرسیون چندگانه برای یافتن ارتباط بین نشانگرها به‌عنوان متغیر مستقل و صفات کمی به‌عنوان متغیر وابسته در گیاهان استفاده شده است. ارتباط نشانگرهای مولکولی با صفات مهم میوه در ۳۵ ژنوتیپ فندق (Mohammadzedehe *et al.*, 2014) و با خصوصیات میوه ۱۸ رقم زیتون (Ipek *et al.*, 2015) با استفاده از تجزیه رگرسیون چندگانه شناسایی شده است. این روش نه‌تنها مکان‌یابی ژن‌ها را با درجه اطمینان بالایی ممکن می‌سازد، بلکه شناسایی نشانگرهای بیشتری را مقدور می‌سازد. هدف از انجام این مطالعه، برآورد تنوع ژنتیکی ۱۸ رقم و لاین امیدبخش لوبیا با استفاده از نشانگرهای SSR و SCoT و بررسی ارتباط این نشانگرها با خصوصیات دانه لوبیا بود که می‌توان از اطلاعات حاصل در برنامه‌های به‌نژادی از جمله تعیین والدین برای نقشه‌یابی QTL (Quantitative Trait Locus) استفاده نمود.

جدول ۱- نام، شماره، منشأ و تیپ رقم/ لاین‌های لوبیای مورد استفاده

Table 1. Name, code, origin and type of the used common bean variety/lines

شماره Number	رقم/لاین Line	منشأ origin	تیپ Type	شماره Number	رقم/لاین Line	منشأ origin	تیپ Type
1	تلاش Talash	IRAN	Pinto	10	COS16	CIAT	Pinto
2	درخشان Derakhshan	CIAT	Red	11	G14088	CIAT	Pinto
3	دهقان Dehghan	IRAN	White	12	دانشکده Daneshkade	IRAN	White
4	آروکانو Araucano	CIAT	Pinto	13	AND1007	CIAT	Red
5	اختر Akhtar	CIAT	Red	14	G11867	CIAT	White
6	گلی Goli	IRAN	Red	15	Taylor	CIAT	Pinto
7	ناز Naz	IRAN	Red	16	Jules	CIAT	White
8	G169	-	Red	17	G01437	CIAT	Pinto
9	Wa2662	CIAT	White	18	D81083	CIAT	Red

Red: قرمز؛ White: سفید؛ و Pinto: چیتی

جدول ۲- آغازگرهای ریزماهواره (SSR) در مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی ۱۸ رقم/ لاین لوبیا

Table 2. Microsatellite (SSR) primers list used for genetic diversity analysis in 18 common bean varieties/lines

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر (۵' به ۳')		اندازه قطعه (جفت‌باز) Fragment size (bp)	دمای ذوب (سانتی‌گراد) Tm (°C)	شماره کروموزوم Chromosome number
	رفت Forward	برگشت Reverse			
PV-at001	GGGAGGGTAGGGAAGCAGTG	GCGAACCACGTTTCATGAATGA	239	57	4
BMd-7	GGATATGGTGGTGATCAAGGA	CATACCCAATGCCATGTICTC	166	59	2
BMd-12	CATCAACAAGGACAGCCTCA	GCAGCTGGCGGTAACACAG	167	58	6
BMd-15	TTGCCATCGTTGCTTAATTG	TTGGAGGAAGCCATGTATGC	166	56	4
BMd-19	GCCAACCACATCTTCCCTAC	GGAAGCGAGGCAGTTATCTTT	154	56	2
BMd-20	GTTGCCACCGGTGATAATCT	GTGAGGCAAGAAGCCTTCAA	123	58	5
BMd-28	TGCATCAACTTTAGGAGCTTG	TCTTGTCTTATCAGCAGGTGGA	151	57	5
BMd-33	TACGCTGTGATGCATGGTTT	CTGAAAGTGCAGAGTGGTG	110	54	11
BMd-36	CATAACATCGAAGCCTCACAGT	ACGTGCGTACGAATACTCAGTC	164	58	3
BMd-37	GGCAGGAGCAACAATCCTT	CCATCATAGAGGGCAACCAC	134	56	6
BMd-41	CAGTAAATATTGGCGTGGATGA	TGAAAGTGCAGAGTGGTGGGA	250	56	11
BMd-42	TCATAGAAGATTTGTGGAAGCA	TGAGACACGTACGAGGCTGTAT	149	56	10
BMd-45	GGTTGGGAAGCCTCATAACAG	ATCTTCGACCCACCTTGCT	129	58	1
BMd-53	TGCTGACCAAGGAAATTCAG	GGAGGAGGCTTAAGCACAAA	105	53	1
BM114	AGCCTGGTCAAATGCTCATAG	CATGCTTGTTCCTAACTCTCT	234	57	9
BM137	CCGTATCCGAGCAGGCAAC	CGCTTACTCACTGTACGCACG	155	52	6
BM139	TTAGCAATACCGCCATGAGAG	ACTGTAGCTCAAACAGGGCAC	115	56	2
BM146	GAGATGAGTCTTTCCCTACCC	TGCAGACACAATTTATGAAGGC	281	49	1
BM154	TCTTGCGACCGAGCTTCTCC	CTGAATCTGGGAACGATGACCAG	218	63	9
BM157	ACTTAACAAGGAATAGCCACACA	GTTAATGTGTTCCAATATCAACCTG	113	54	10
BM160	CGTGCTTGGCGAATAGCTTTG	CGCGGTTCTGATCGTGACTTC	211	61	7
BM170	AGCCAGGTCAAAGACCTTAG	AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC	179	55	6
BM172	CTGTAGCTCAAACAGGCACT	GCAATACCGCATGAGAGAT	107	60	3
BM175	CAACAGTTAAAGGTCGTCAAATT	CCACTCTTAGCATCAACTGGA	170	58	5
BM181	ATGCTGCGAGTTAATGATCG	TGAGGAGCAAACAGATGAGG	192	54	3
BM184	AGTGCTCTATCAAGATGTGTG	ACATAATCAATGGGTCAGTG	160	53	11
BM188	TCGCCTTGAAACTTCTTGATC	CCCTTCCAGTAAATCAGTCG	177	57	9
BM201	TGGTGCTACAGACTTGATGG	TGTCACCTCTCTCCTCCAAT	102	58	7
BM205a	CTAGACCAGGCAAAGCAAGC	TGAGCTGGGATTTCAATTCTG	137	55	7
BM205b	CTAGACCAGGCAAAGCAAGC	TGAGCTGGGATTTCAATTCTG	137	55	11
BM211	ATACCCACATGCACAAGTTTGG	CCACCATGTGCTCATGAAGAT	186	57	8

جدول ۳- توالی مربوط به آغازگرهای SCoT مورد استفاده در مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۸ رقم/لاین لوبیا

Table 3. Sequences related to SCoT primers used for genetic diversity analysis in 18 common bean varieties/lines

نام آغازگر Primer name	توالی (۵' به ۳') Sequence (5' to 3')	دمای ذوب (سانتی‌گراد) Tm (°C)	نام آغازگر Primer name	توالی (۵' به ۳') Sequence (5' to 3')	دمای ذوب (سانتی‌گراد) Tm (°C)
SCoT1	CAACAATGGCTACCACCA	55	SCoT22	AACCATGGCTACCACCAC	57
SCoT2	CAACAATGGCTACCACCC	52	SCoT25	ACCATGGCTACCACCGGG	48
SCoT6	CAACAATGGCTACCACGC	48	SCoT28	CCATGGCTACCACCGCCA	50
SCoT11	ACGACGTGGCGACCAACG	50	SCoT29	CCATGGCTACCACCGGCC	55
SCoT12	ACGACGTGGCGACCAACG	52	SCoT30	CCATGGCTACCACCGGCG	50
SCoT13	ACGACATGGCGACCATCG	56	SCoT31	CCATGGCTACCACCGCCT	58
SCoT14	ACGACATGGCGACCACGC	52	SCoT33	CCATGGCTACCACCGCAG	50
SCoT16	ACCATGGCTACCACCGAC	48	SCoT35	GCAACAATGGCTACCACC	50
SCoT18	ACCATGGCTACCACCGCC	58	SCoT36	GCAACAATGGCTACCACC	58
SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG	50			

تجزیه خوشه‌ای به روش Ward با ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از نرم‌افزار SYSTAT13 انجام شد. به منظور تأیید نتایج تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی (Principal Component Analysis: PCoA) با استفاده از نرم‌افزار NTSYS و تجزیه واریانس مولکولی با نرم‌افزار Arlequin v3.5.2.2 انجام شد.

به منظور شناسایی روابط معنی‌دار بین نشانگرهای SSR و SCoT به عنوان متغیر مستقل و خصوصیات دانه لوبیا به عنوان متغیر وابسته (اندازه‌گیری شده توسط عزیزی‌آرام و همکاران (Aziziaran et al., 2021)) از تجزیه رگرسیون گام به گام با نرم‌افزار SPSS ver. 16.0 استفاده شد.

نتایج و بحث

در ۱۸ ژنوتیپ مورد بررسی لوبیا با استفاده از ۳۱ جفت آغازگر SSR و ۱۹ آغازگر SCoT، تکثیر قطعات در ژنوم لوبیا انجام شد (شکل ۱). از آغازگرهای SSR مورد استفاده، هشت جفت آغازگر شامل BMd-7، BMd-12، BMd-15، BMd-20، BM205a، BM184، BM205b و BMd-33 چندشکلی نشان ندادند. در مجموع تعداد ۶۱ آلل با میانگین ۲/۶۵ آلل به ازای هر SSR و ۲۳۹ قطعه با میانگین ۱۲/۵۸ قطعه به ازای هر آغازگر SCoT تکثیر شد. کلیدی آغازگرهای SCoT مورد استفاده چندشکلی نشان دادند و آغازگرهای SCoT35 و SCoT6 به ترتیب بیشترین (۱۸ قطعه) و کمترین تعداد قطعه (۷ قطعه) را ایجاد نمودند. بیشترین تعداد آلل برای نشانگر SSR مربوط

تجزیه آماری داده‌های مولکولی برای نشانگر SSR و SCoT بر اساس حضور (۱) یا عدم حضور (۰) نوار انجام شد. میزان محتوای چندشکلی (Polymorphism Information Content: PIC) و شاخص نشانگر (Marker Index: MI) که معیارهایی جهت قدرت تفکیک آغازگرها هستند با استفاده از معادلات ۱ تا ۴ محاسبه شدند (Santhosh et al., 2009) که معادله ۱ برای نشانگرهای غالب و مغلوب و ۲ برای نشانگرهای همباز می‌باشد.

$$\text{PIC} = 1 - [p_i^2 + (1 - p_i)^2] \quad (\text{معادله ۱})$$

$$\text{PIC} = \sum_{i=1}^n p_i^2 \quad (\text{معادله ۲})$$

$$\text{EMR} = \text{NPB} \times \beta \quad (\text{معادله ۳})$$

$$\text{MI} = \text{PIC} \times B \quad (\text{معادله ۴})$$

در این معادله‌ها p_i فراوانی قطعه نام و B تعداد قطعات چندشکلی می‌باشد.

همچنین شاخص نسبت چندگانه مؤثر (Effective multiplex ratio: EMR) از رابطه‌ی (۳) که از درصد چندشکلی (β) در تعداد نوارهای چندشکلی (Resolving Power: NBP) به دست آمد محاسبه گردید (Moura et al., 2005).

قدرت تفکیک نیز (Resolving Power: RP) از رابطه‌ی $RP = \sum IB$ محاسبه گردید (Altintas et al., 2008). در این رابطه P_i نسبت افراد دارای باند و IB با استفاده از رابطه‌ی $IB = 1 - [2 * (0.5 - P_i)]$ به دست می‌آید.

مقدار ۲/۰۲ بیشترین و آغازگر BMD-28 با میزان ۰/۴۴ کمترین قدرت تفکیک را داشتند (جدول ۴).

میزان محتوای چندشکلی برای نشانگر SCoT به طور متوسط ۰/۳۴ به دست آمد که کمترین میزان آن مربوط به آغازگر SCoT2 (۰/۱۹) و بیشترین آن مربوط به آغازگر SCoT28 (۰/۴۲) بود. میانگین شاخص نشانگری ۲/۶۷ بود که بیشترین آن مربوط به آغازگر SCoT29 (۰/۱۶) و کمترین آن با آغازگر SCoT33 (۰/۲۹) به دست آمد. میانگین کل قدرت تفکیک این نشانگر ۰/۳۴ بود که در بین آن‌ها آغازگرهای SCoT35 و SCoT33 با مقادیر ۹/۴۴ و ۱/۲۲ به ترتیب بیشترین و کمترین قدرت تفکیک را نشان دادند (جدول ۵).

اطلاعات مربوط به مکان‌های ژنی SSR و پتانسیل آن‌ها برای تشخیص تفاوت‌های بین گونه‌ها بر اساس روابط ژنتیکی شان توسط میزان محتوای چندشکلی (PIC) تعیین می‌شود (AbdulHusseinAl-Badeiry et al., 2014). در این مطالعه میانگین میزان محتوای چندشکلی برای نشانگرهای SSR و SCoT به ترتیب ۰/۳۹ و ۰/۳۴ به دست آمد. از آنجایی که مقادیر بالاتر از ۰/۵ برای PIC نشان‌دهنده محتوای اطلاعاتی بالا توسط آغازگرها می‌باشد (DeWoody et al., 1995) و میانگین به دست آمده در هر دو نشانگر در این مطالعه از این مقدار کمتر بود، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که آغازگرهای مورد استفاده این دو نشانگر حاوی اطلاعات مفید به نسبت کمی بودند و نتوانستند سطح مورد انتظار محققین را برآورده سازند البته این امر می‌تواند ناشی از نزدیکی ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی نیز باشد (Blair et al., 2011).

با توجه به این که بیشترین قدرت تفکیک برای نشانگرهای SSR و SCoT به ترتیب مقادیر ۲/۰۲ (BMD53) و ۹/۴۴ (SCoT35) به دست آمد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در تحقیق حاضر نشانگر SCoT (خصوصاً آغازگر SCoT35) نسبت به نشانگر SSR از قدرت تفکیک بالاتری برخوردار بود. پس می‌توان از این نشانگر برای مطالعات مربوط به تنوع ژنتیکی در لوبیا استفاده کرد.

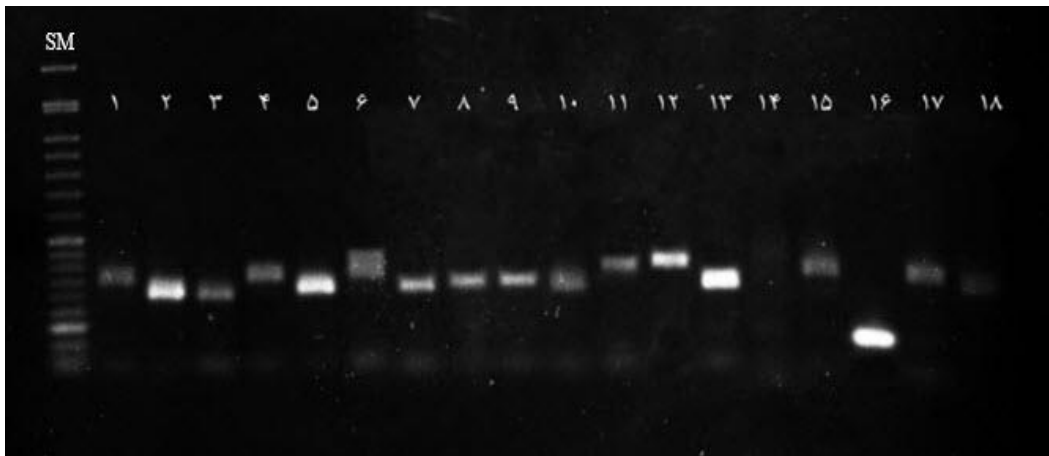
به آغازگرهای BMD-1, BMD-42, BMD-53, BMD-139 و BMD-154 با چهار آلل و کمترین تعداد مربوط به آغازگرهای BMD-19, BMD-28, BMD-36, BMD-37, BMD-41, BMD-45, BM114, BM146, BM157, BM170, BM175, BM188 و BM201 با دو آلل بود. در این مطالعه تعداد آلل به ازای هر آغازگر در مقایسه با گزارش‌های دیگر با استفاده از نشانگر SSR میزان ۴/۵ (Gyang et al., 2017)، ۹/۱ (Maras et al., 2015)، ۱۰ (Asfaw et al., 2009؛ Blair et al., 2011) و نشانگر ISSR با میانگین ۳/۱ (Singh et al., 2013) به ترتیب میزانی کمتر و بیشتر را برای SSR و SCoT ایجاد شد. از طرفی در تحقیقات اکی و همکاران (Okii et al., 2014) با استفاده از نشانگر SSR میانگین تعداد هر آلل در مکان‌های ژنی، ۱۹ آلل را نشان داد که از هر دو نشانگر مورد استفاده در این تحقیق بیشتر بود. در تحقیقات ماتوندو و همکاران (Matondo et al., 2017) بر روی لوبیا، برای نشانگرهای SSR میانگین ۷ آلل در هر مکان ژنی به دست آمد که از مقدار میانگین به دست آمده برای نشانگر SSR در این مطالعه بیشتر بود. همچنین این میزان برای هر دو نشانگر استفاده شده در مطالعه حاضر، از میانگین آلل در هر مکان ژنی نسبت به نشانگرهای AFLP (Liu et al., 2012) و SSAP (۱/۶۸) در مطالعات دیگر بیشتر بود (Liu et al., 2012; Hou, 2010). در مطالعات مختلف تعداد زیادی از متغیرها یا نشانگرها ممکن است توسط به‌زادگران گیاه اندازه‌گیری شوند، اما برخی از آن‌ها به اندازه‌ی کافی برای ارزیابی، شناسایی و مدیریت ژرم‌پلاسم مناسب نیستند (Maji and Shaibu, 2012).

برای نشانگر SSR میانگین میزان محتوای چندشکلی، ۰/۳۹ برآورد شد که کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر BMD-28 با مقدار ۰/۲ و بیشترین آن مربوط به آغازگرهای BMD-36, BMD-45, BM157 و BM201 با میزان ۰/۵ بود. میانگین شاخص نشانگری ۱/۰۱ بود که بیشترین مقدار آن مربوط به آغازگر BM154 (۱/۹۲) و کمترین آن برای آغازگر BMD-28 (۰/۴) بود. میانگین کل قدرت تفکیک این نشانگر ۱/۵۴ بود که در بین آن‌ها آغازگر BMD53 با

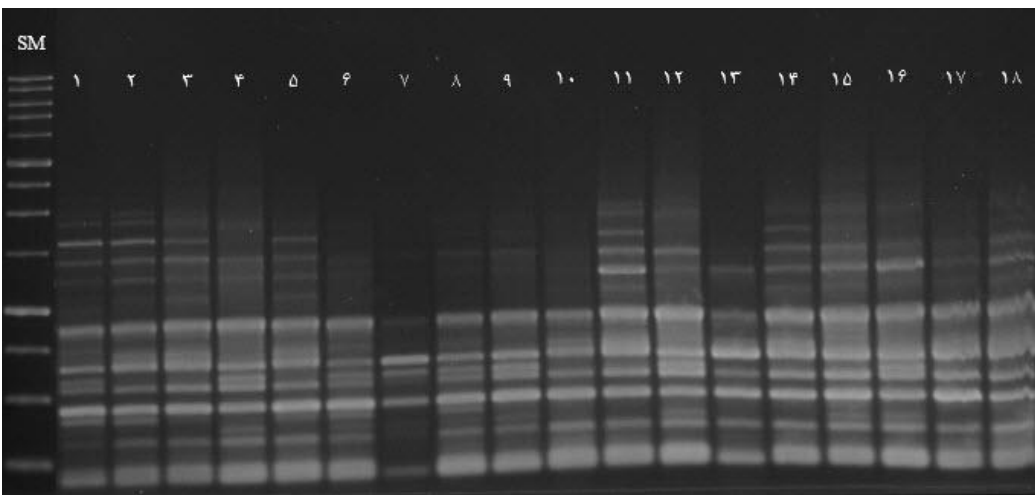
زیادی با هم مطابقت داشت. افرادی از گروه‌های متفاوت حاصل از تجزیه خوشه‌ای که دارای حداکثر فاصله ژنتیکی هستند را می‌توان به‌منظور تولید هیبرید و یا ایجاد جمعیت در حال تفرق انتخاب و تلاقی داد. در این مطالعه با استفاده از الگوی تنوع به‌دست آمده از نشانگرهای مولکولی و همچنین خصوصیات مورد ارزیابی دانه، دو رقم درخشان (شماره ۲) و جولز (شماره ۱۶) با داشتن فاصله و تفاوت ژنتیکی کافی به‌عنوان والد انتخاب و به‌منظور ایجاد جمعیت در حال تفرق و مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده این نوع صفات در تحقیقات آتی با هم تلاقی داده شدند.

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش Complete linkage با ضریب تشابه جاکارد، ۱۸ ژنوتیپ مورد مطالعه لوبیا را بر اساس هر دو نشانگر به سه گروه مجزا تقسیم نمود. این سه گروه برای نشانگر SSR شامل ژنوتیپ‌های شماره ۱، ۴، ۱۲، ۱۵ و ۱۶ (گروه اول)؛ ۶، ۷، ۸ و ۹ (گروه دوم)؛ ۲، ۳، ۵، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۷ و ۱۸ (گروه سوم) بود. برای نشانگر SCoT گروه یک شامل ژنوتیپ شماره ۱، ۴، ۶، ۸، ۹، ۱۲ و ۱۶، گروه دو شامل ژنوتیپ‌های شماره ۲، ۳، ۵، ۱۰، ۱۱، ۱۴ و ۱۵ و گروه سه شامل ژنوتیپ‌های شماره ۷، ۱۳، ۱۷ و ۱۸ بودند (شکل ۲). نتایج گروه‌بندی بر اساس دو سیستم نشانگری تا حدود

(الف_ا)



(ب_ب)



شکل ۱- الگوی بانندی نشانگرهای مولکولی مورد استفاده بر روی رقم/لاین‌های مختلف لوبیا. (الف) SSR با آغازگر BM139؛

Size marker 1Kb:SM؛ SCoT2 (ب) Size marker 50bp:SM

Figure 1. Band pattern of molecular markers used on different common bean varieties/lines. A) SSR with BM139; Size marker 50bp; B) SCoT; Size Marker: 1 kb.

جدول ۴- پارامترهای تنوع برای مکان‌های ژنی SSR استفاده شده در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی لوبیا

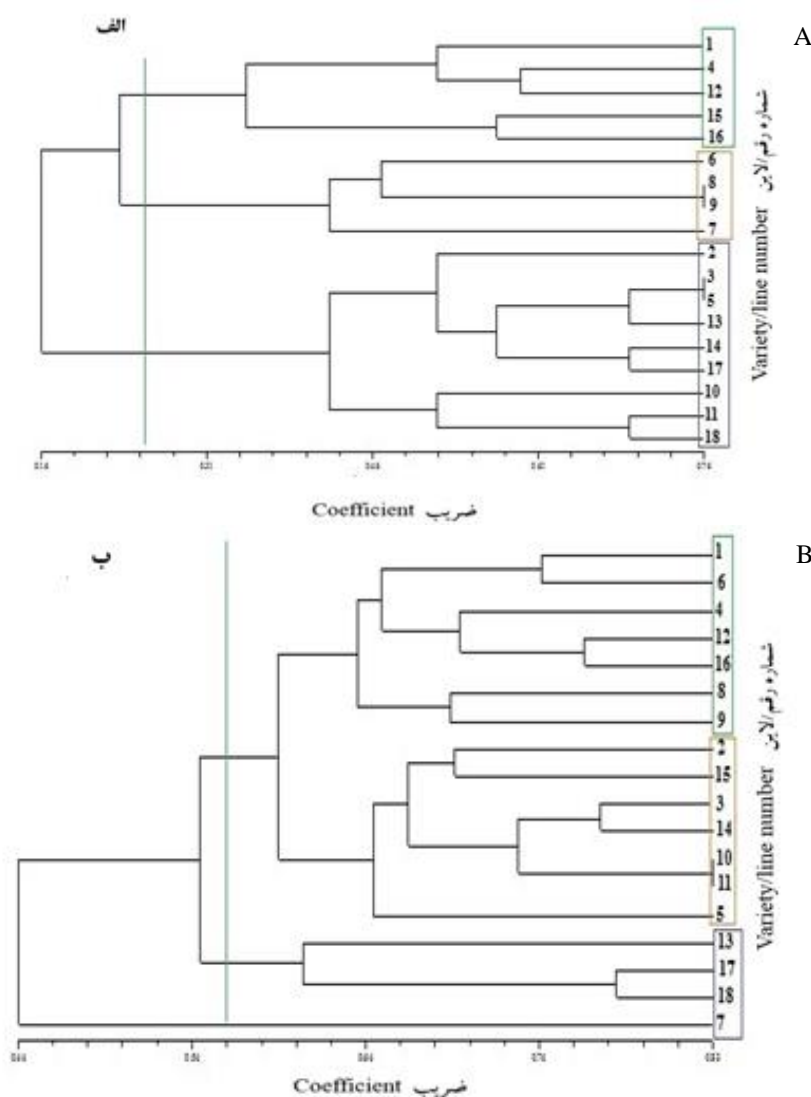
Table 4. Diversity parameters for SSR loci used in common bean genetic diversity analysis

اسم نشانگر Marker name	تعداد کل قطعات تکثیر شده Total number of amplified fragments	تعداد قطعات چندشکل The number of polymorphic fragments	درصد چندشکلی Polymorphism percentage	نسبت چندشکلی مؤثر EMR Effective multiplex ratio	میزان محتوای چندشکلی PIC Polymorphic information content	شاخص نشانگری MI Marker index	قدرت تفکیک Rp Resolving power
PV-at001	4	4	100	4	0.28	1.12	1.56
BMd-19	2	2	100	2	0.49	0.98	1.76
BMd-28	2	2	100	2	0.20	0.40	0.44
BMd-36	2	2	100	2	0.50	1.00	2.00
BMd-37	2	2	100	2	0.49	0.98	1.76
BMd-41	2	2	100	2	0.40	0.80	1.11
BMd-42	4	4	100	4	0.38	1.52	2.00
BMd-45	2	2	100	2	0.50	1.00	2.00
BMd-53	4	4	100	4	0.32	1.28	2.02
BMd-114	2	2	100	2	0.40	0.80	1.11
BMd-137	3	3	100	3	0.36	1.08	1.79
BMd-139	4	4	100	4	0.34	1.36	2.00
BMd-146	2	2	100	2	0.34	0.68	0.89
BMd-154	4	4	100	4	0.48	1.92	1.56
BMd-157	2	2	100	2	0.50	1.00	2.00
BMd-160	3	3	100	3	0.39	1.17	1.78
BMd-170	2	2	100	2	0.49	0.98	1.76
BMd-172	3	3	100	3	0.36	1.08	1.78
BMd-175	2	2	100	2	0.40	0.80	1.11
BMd-181	3	3	100	3	0.29	0.87	1.12
BMd-188	2	2	100	2	0.34	0.68	0.90
BMd-201	2	2	100	2	0.50	1.00	2.00
BMd-211	3	3	100	3	0.25	0.75	0.90
تعداد کل Total	61	61	100	-	-	-	-
میانگین Average	-	2.65	100	2.65	0.39	1.01	1.54

جدول ۵- پارامترهای تنوع برای مکان‌های ژنی SCoT استفاده شده در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی لوبیا

Table 5. Diversity parameters for SCoT loci used in common bean genetic diversity analysis

اسم نشانگر Marker name	تعداد کل قطعات تکثیر شده Total number of amplified fragments	تعداد قطعات چندشکل The number of polymorphic fragments	درصد چندشکلی Polymorphism percentage	نسبت چندشکلی مؤثر EMR Effective multiplex ratio	میزان محتوای چندشکلی PIC Polymorphic information content	شاخص نشانگری MI Marker index	قدرت تفکیک Rp Resolving power
SCoT 1	11	9	81.82	7.36	0.37	2.72	6.00
SCoT 2	13	5	36.46	1.92	0.19	0.36	2.78
SCoT 6	7	6	85.71	5.14	0.30	1.54	2.78
SCoT 11	9	7	77.78	5.44	0.37	2.01	5.11
SCoT 12	13	11	84.62	9.31	0.31	2.89	4.44
SCoT 13	14	13	92.86	12.07	0.33	3.98	5.78
SCoT 14	9	9	100.00	9.00	0.38	3.42	5.22
SCoT 16	11	9	81.82	7.36	0.37	2.72	5.33
SCoT 18	11	9	81.82	7.36	0.38	2.80	5.11
SCoT 20	8	7	87.50	6.13	0.36	2.21	4.22
SCoT 22	16	10	62.50	6.25	0.26	1.63	3.67
SCoT 25	17	11	64.71	7.12	0.29	2.06	7.00
SCoT 28	15	13	86.67	11.27	0.42	4.73	8.67
SCoT 29	17	15	88.24	13.24	0.39	5.16	8.67
SCoT 30	13	12	92.31	11.08	0.35	3.88	6.78
SCoT 31	16	10	62.50	6.25	0.37	2.31	6.33
SCoT 33	10	3	30.00	0.90	0.32	0.29	1.22
SCoT 35	18	15	83.33	12.50	0.39	4.88	9.44
SCoT 36	11	6	54.54	3.27	0.33	1.08	2.89
تعداد کل Total	239	-	-	-	-	-	-
میانگین Average	-	9.47	75.64	7.52	0.34	2.67	5.34



شکل ۲- دندروگرام ۱۸ رقم/لاین لوبیا با استفاده از روش Complete linkage و بر اساس ضریب تشابه جاکارد مربوط به داده‌های حاصل از نشانگرهای: الف) SSR؛ ب) SCoT

Figure 2. Dendrogram of 18 common bean varieties/lines using the complete linkage method and based on the Jaccard similarity coefficient related to the data obtained from the markers: A) SSR; B) SCoT

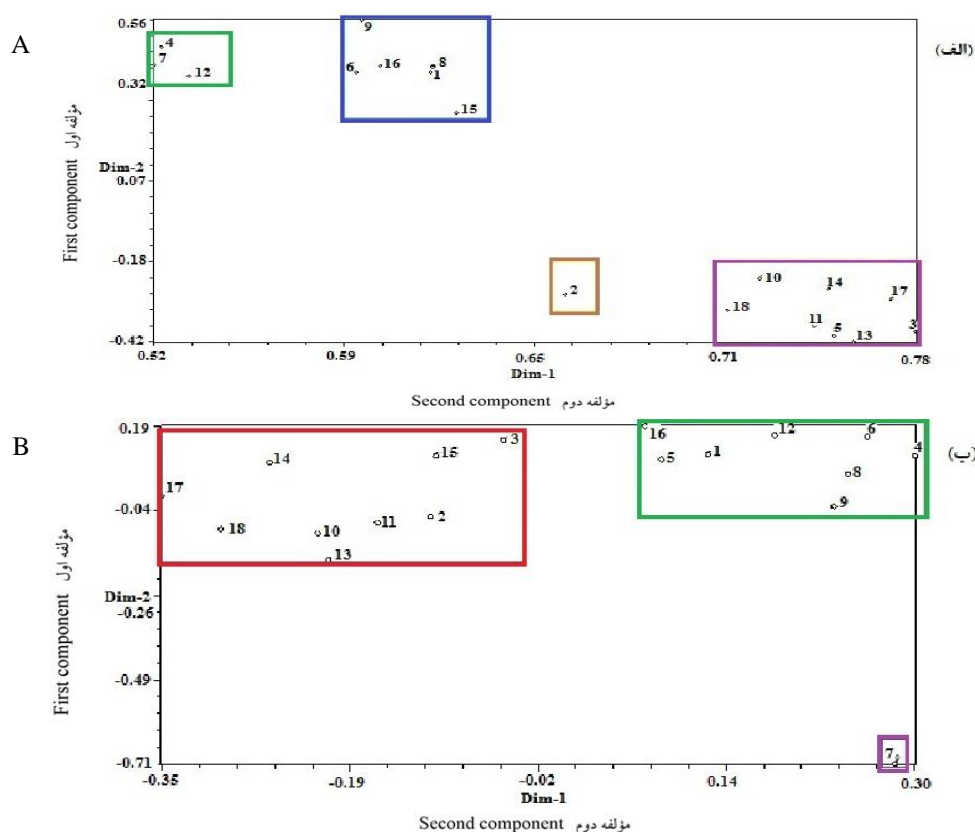
مطالعه، برای هر دو نشانگر از تجزیه به مختصات اصلی به‌منظور تأیید روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های لوبیا استفاده گردید که تنها نشانگر SSR به کمک دو مؤلفه اول توانست نیمی از تغییرات را توجیه کند و نتایج مربوط به نشانگرهای SCoT نیز بیانگر پراکنش مناسب این نشانگرها در ژنوم لوبیا بود.

آزمون مانتل با استفاده از ضریب تشابه جاکارد همبستگی معنی‌داری (۰/۴۵) بین دو الگوی تنوع به‌دست آمده با استفاده از دو سیستم نشانگری SSR و SCoT را نشان داد.

به‌منظور برآورد روابط ژنتیکی ۱۸ ژنوتیپ مورد مطالعه لوبیا، از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز استفاده گردید (شکل ۳). برای نشانگر SSR مجموع دو مؤلفه اول ۵۹/۰۵ درصد (به‌ترتیب شامل مقادیر ۴۴/۱۵ و ۱۴/۹۰ درصد) بود که بیش از نیمی از تغییرات را توجیه نمود. مجموع دو مؤلفه اول برای نشانگرهای SCoT برابر با ۲۵/۴۳ درصد بود (به‌ترتیب شامل ۱۳/۶۹ و ۱۱/۷۴ درصد) که به‌نظر می‌رسد نشانگرهای SCoT نسبت به نشانگرهای SSR از پوشش ژنومی مناسب‌تری برخوردار باشند. در این

به منظور تخمین توزیع واریانس ژنتیکی در بین و درون گروه‌ها از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. این نتایج حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بالا در داخل گروه نسبت به بین گروه‌ها بود. برای نشانگر SSR تنوع داخل گروه ۸۹ درصد و بین گروه ۱۱ درصد (جدول ۶) و برای نشانگر SCoT این تنوع در داخل گروه حدود ۷۸ درصد و بین آن‌ها حدود ۲۲ درصد از تنوع کل را شامل گردید (جدول ۷).

نتایج تجزیه خوشه‌ای هم تا حدود زیادی تطابق الگوهای تنوع به دست آمده از دو نوع سیستم نشانگری را تأیید می‌نماید. همبستگی معنی‌دار بین دو الگوی تنوع به دست آمده در دو سیستم نشانگری SSR و SCoT با استفاده از آزمون مانتل، می‌تواند بیانگر تطابق الگوهای تنوع به دست آمده از دو نوع سیستم نشانگری باشد. این الگوهای تنوع تا حدود زیادی با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت نشان دادند.



شکل ۳- نمودار دوبعدی برای ۱۸ رقم/لاین لوبیا بر اساس تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) و با استفاده از نشانگرهای مولکولی. الف) SSR؛ ب) SCoT.

Figure 3. Two-dimensional plot for 18 common bean varieties/lines based on principal coordinate analysis (PCoA) and using molecular markers. A) SSR; B) SCoT.

جدول ۶- نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر SSR

Table 6. Results of molecular variance analysis using SSR markers

منبع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Degrees of freedom	مجموع مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Mean of squares	درصد واریانس Percentage of variance
بین گروه Between the group	2	36.778	18.389*	11
داخل گروه Within the group	15	166.556	11.104*	89
کل Total	17	203.333	12.428	

*معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد (*Significant at the 5% probability level)

جدول ۷- نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر SCoT

Table 7. Results of molecular variance analysis using SCoT markers

منبع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Degrees of freedom	مجموع مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Mean of squares	درصد واریانس Percentage of variance
بین گروه Between groups	2	100.919	5.99970*	21.85
داخل گروه Within groups	15	321.914	21.46095*	78.15
کل Total	17	422.833	27.46066	

*معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد (*Significant at the 5% probability level)

بودند. این اشتراکات می‌تواند نشان‌دهنده پیوستگی ژن‌های کنترل‌کننده این صفات یا اثرات پلیوتروپیک باشد (Kumar *et al.*, 2023). در تحقیق حاضر نشانگر BM188 بر روی کروموزوم شماره ۹ لوییا ارتباط معنی‌داری با صفت کلسیم نشان داد که این با نتایج عزیزی‌آرام و همکاران (Aziziaran *et al.*, 2021) مطابقت داشت.

از نشانگرهای آگاهی‌بخش مرتبط با صفات مهم زراعی می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی استفاده کرد و بدین طریق صفات مورد علاقه را از طریق تلاقی منتقل نمود. از آنجایی که برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط و همبستگی معنی‌داری را نشان دادند می‌توان علت این امر را وجود پیوستگی بالا با یکدیگر و همچنین وجود اثرات پلیوتروپی مکان‌های کروموزومی یا ژن‌های کنترل‌کننده صفات دانست (Kumar *et al.*, 2023). در مطالعه‌ای که به‌همین منظور توسط شفیع خورشیدی و همکاران (Shafii Khorshidi *et al.*, 2012) بر روی ۴۶ ژنوتیپ لوییا با استفاده از ۲۱ جفت آغازگر SSR صورت گرفت آن‌ها توانستند با استفاده از رگرسیون گام به گام نشان دهند که ارتباط حداقل یکی از ۱۴ صفت مورد بررسی با نشانگرهای مورد مطالعه معنی‌دار بوده و چنین اظهار داشتند که می‌توان از این نتایج در برنامه اصلاحی لوییا استفاده نمود. با توجه به ارتباط نشانگرهای SSR و SCoT با خصوصیات کیفی مطالعه شده دانه لوییا، می‌توان نتیجه گرفت که این نشانگرها به‌عنوان نشانگرهای آگاهی‌بخش، می‌توانند ظرفیت بالایی در گزینش ژنومی و غربالگری سریع ژنوتیپ‌های لوییا داشته باشند.

نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون گام به گام جهت شناسایی نشانگرهای آگاهی‌بخش SSR و SCoT مرتبط با ۱۴ خصوصیت دانه شامل تعداد دانه در غلاف، وزن ۱۰۰ دانه، طول دانه، عرض دانه، پروتئین خام، قند محلول کل، نشاسته، میزان چربی، خاکستر، غلظت آهن، کلسیم، منیزیم، روی و اسید اورونیک در جدول‌های ۸ و ۹ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود هر نشانگر دارای ارتباط معنی‌دار با هر یک از خصوصیات دانه، درصدی از تنوع کل آن صفت خاص را توجیه می‌نماید. به‌عنوان مثال ارتباط معنی‌دار نشانگر BM137a₂ بر روی کروموزوم شماره ۶ لوییا با درصد اسید اورونیک، ۱۹/۹ درصد از تغییرات کل اسید اورونیک دانه را توجیه می‌کند (جدول ۸). از ۱۴ صفت مورد مطالعه، ۱۲ صفت حداقل با یک یا چند نشانگر دارای رابطه معنی‌دار بودند و برای دو صفت طول دانه و میزان چربی دانه هیچ نوع نشانگری با ارتباط معنی‌دار یافت نشد.

نتایج نشان داد که نشانگر BM137a₂ بر روی کروموزوم شماره ۶ لوییا برای خصوصیات اسید اورونیک، کلسیم و نشاسته، نشانگر BM211a₂ بر روی کروموزوم شماره ۸ لوییا برای صفات کلسیم، نشاسته، قند محلول، عرض و وزن دانه، نشانگر BM201a₁ بر روی کروموزوم شماره ۷ لوییا برای صفات نشاسته و روی، نشانگر BM154a₄ بر روی کروموزوم شماره ۹ لوییا برای صفات خاکستر و روی، نشانگر BM181a₂ بر روی کروموزوم شماره ۳ لوییا برای صفات پروتئین خام و تعداد دانه در غلاف، نشانگر Bmd-1a₃ بر روی کروموزوم شماره ۳ لوییا برای صفات وزن دانه و خاکستر، نشانگر SCoT12a₁₁ برای صفات آهن، عرض و وزن دانه مشترک

جدول ۸- ارتباط نشانگرهای SSR با خصوصیات اندازه‌گیری شده دانه ۱۸ رقم/لاین لوبیا

Table 8. Significant correlation of SSR markers with the measured seed characteristics of 18 common bean varieties/lines

صفت Trait	نشانگر Marker	اندازه قطعه Fragment size (bp)	جایگاه کروموزومی Chromosomal location	ضریب رگرسیون Regression coefficient (B)	SE	آماره t t statistic	سطح معنی‌داری Significance level	R ²	R ² adjusted	R ² change
UA	BM137 _b	155	6	0.188	0.082	2.28	**	24.6	19.9	24.6
Mg	BM211 _a	186	8	-26.143	8.920	-2.931	**	34.9	30.9	34.9
Ca	BM211 _b	190	8	79.442	8.733	9.097	**	89.3	86	64.4
	BM137 _b	155	6	24.082	6.625	3.365	**			14.3
	BM175 _a	170	5	27.116	7.888	3.438	**			6.7
	BM188 _b	177	9	16.978	7.811	2.174	*			3.9
Zn	BM188 _a	180	9	0.618	0.070	8.875	**	93.8	89.5	24.00
	BM201 _a	102	7	-0.355	0.067	-5.331	**			27.4
	BM137 _c	168	6	0.680	0.137	4.951	**			16.1
	BMd-1 _b	165	3	0.277	0.101	-2.755	*			10.2
	BMd-1 _d	168	3	0.430	0.137	3.131	*			7.3
	BM154 _d	225	9	0.385	0.136	2.833	*			5.5
	BMd-53 _c	110	1	-0.198	0.086	-2.297	*			3.3
	BM211 _b	190	8	2.342	0.468	5.00	**			45
Starch	BM137 _b	155	6	1.777	0.362	4.905	**	82.6	77.3	21.8
	BM201 _a	102	7	0.970	0.355	2.733	*			9.5
	BM146 _b	284	1	0.918	0.421	2.181	*			6.4
TSS	BM211 _b	190	8	0.986	0.313	3.147	**	38.2	34.4	38.2
CPR	BM181 _b	195	3	-3.137	1.157	-2.712	*	31.5	27.2	31.5
Ash	BMd-19 _b	151	2	0.017	0.004	4.526	**	79.9	73.8	29.3
	BM154 _d	225	9	0.030	0.008	3.973	**			30.9
	BMd53 _a	108	1	-0.025	0.008	-3.380	**			11.5
	BMd-1 _c	171	3	0.019	0.008	2.316	*			8.3
SWTH	BM139 _a	115	2	-1.153	0.290	-3.982	**	70.7	64.4	25.8
	BM211 _b	190	8	-1.373	0.363	-3.781	**			25.2
	BMd-42 _d	151	10	-1.840	0.600	-3.070	**			19.8
SW	BM211 _b	190	8	-26.533	6.220	-4.266	**	71.2	65.1	26.9
	BMd-1 _c	171	3	-29.810	6.524	-4.570	**			24.9
	BM201 _b	100	7	16.384	5.327	3.067	**			19.4
SNPP	BM181 _b	195	3	0.820	0.196	4.186	**	68.5	61.7	24.9
	BM211 _c	195	8	1.407	0.358	3.931	**			26.1
	BM172 _b	110	3	0.470	0.169	2.786	*			17.5

اختصارات: SNPP: تعداد دانه در غلاف؛ SW: وزن صد دانه (گرم)؛ SWTH: عرض دانه (میلی‌متر)؛ CPR: پروتئین خام (%). TSS: قند محلول کل (%). Ca: غلظت کلسیم (mg/100g)؛ Mg: غلظت منیزیم (mg/100g)؛ UA: اسید اورونیک (%). Zn: غلظت روی (mg/100g)؛ Starch: نشاسته (%). و Ash: خاکستر (%).

Abbreviations: SNPP: Number of seeds in a pod; SW: Weight of one hundred seeds (grams); SWTH: grain width (mm); CPR: crude protein (%); TSS: Total soluble sugar (%); Ca: Calcium concentration (mg/100g); Mg: Magnesium concentration (mg/100g); UA: Uronic Acid (%); Zn: Zinc concentration (mg/100g); Starch: starch (%); Ash: Ash (%).

** و *: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

** and *: Significant at 1 and 5% probability levels, respectively

جدول ۹- ارتباط معنی‌دار نشانگرهای SCoT با خصوصیات اندازه‌گیری شده دانه ۱۸ رقم‌لاین لوبیا

Table 9. Significant correlation of SCoT markers with the measured seed characteristics of 18 common bean varieties/lines

صفت Trait	نشانگر Marker	اندازه قطعه Fragment size (bp)	ضریب رگرسیون Regression coefficient (B)	SE	آماره t t statistic	سطح معنی‌داری Significance level	R ²	R ² adjusted	R ² change
Fe	SCoT12 ₁₃	1500	2.713	0.051	53.225	**	99.9	99.8	68.9
	SCoT36 ₂	300	-1.513	0.051	-29.868	**			24
	SCoT30 ₃	350	-0.445	0.064	-6.901	**			4.5
	SCoT16 ₄	870	0.388	0.044	8.833	**			2.2
	SCoT29 ₇	750	-0.208	0.051	-4.087	*			0.4
SWTH	SCoT12 ₁₃	1500	-2.550	0.000	-6.16E+7	**	100	100	70.7
	SCoT18 ₁₀	1300	-1.250	0.000	-5.48E+7	**			24.6
	SCoT14 ₆	600	0.450	0.000	1.32E+7	**			3.5
	SCoT25 ₁₅	1500	0.300	0.000	1.01E+7	**			1.1
	SCoT30 ₄	700	-0.050	0.000	-2.19E+6	**			0.1
	SCoT25 ₁₇	1850	0.050	0.000	1395324	**			00
SW	SCoT12 ₁₃	1500	-39.546	0.744	-53.175	**	99.9	99.9	67.3
	SCoT35 ₁₈	1750	-34.996	1.096	-31.939	**			23.4
	SCoT16 ₆	800	-13.658	0.667	-20.471	**			6.4
	SCoT29 ₆	600	-7.824	0.697	-11.227	**			2.6
	SCoT14 ₁₇	850	2.132	0.667	3-195	*			0.2

اختصارات: SW: وزن صد دانه (گرم); SWTH: عرض دانه (میلی‌متر); Fe: غلظت آهن (mg/100g)

Abbreviations: SW: Weight of one hundred seeds (grams); SWTH: grain width (mm); Fe: Iron concentration (mg/100g)

** و *: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

** and *: Significant at 1 and 5% probability levels, respectively

شناسایی ژنوتیپ‌های برتر و با ارزش باشند. همچنین، این نشانگرها می‌توانند در انتخاب والدین مناسب برای تولید جمعیت‌های در حال تفرق به کار گرفته شوند به گونه‌ای که تأثیر قابل‌توجهی در افزایش دقت، راندمان و پیشرفت برنامه‌های به‌نژادی داشته و نیاز است که استفاده از آنها به صورت مستمر و هدفمند در برنامه‌های آتی مورد توجه محققین قرار گیرد.

استفاده از روش‌های نوین زیست‌فناوری نقش بسزایی در تهیه اطلاعات مفید در رابطه با به‌نژادی و به‌ویژه خصوصیات کیفی در گیاهان داشته است. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و وقت‌گیر و هزینه‌بر بودن برنامه‌های به‌نژادی انتخاب ژنوتیپ‌های با کیفیت بالا، می‌توان نتیجه گرفت که نشانگرهای آگاهی‌بخش شناسایی شده وابسته به خصوصیات دانه در لوبیا می‌توانند راهنمای خوبی برای

References

- AbdulHusseinAl-Badeiry, N., Al-Saadi, A.H. and Merza, T.K. (2014). Analysis of genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) varieties using simple sequence repeat (SSR) markers. *Journal of Babylon University*, **22(6)**: 1768-1774.
- Ahmad, K.M.S. (2018). Genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars from different origins revealed by microsatellite markers. *Journal of Advances in Biology and Biotechnology*, **17(4)**: 1-9.
- Ali, M.L., Rajewski, J.F., Baenziger, P.S., Gill, K.S., Eskridge, K.M. and Dweikat, I. (2008). Assessment of genetic diversity and relationship among a collection of US sweet sorghum germplasm by SSR markers. *Molecular Breeding*, **21(4)**: 497-509.
- Al-Samarai, F.R. and Al-Kazaz, A.A. (2015). Molecular markers: an introduction and applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, **9(3)**: 118-130.
- Altuntas, S., Toklu, F., Kafkas, S., Kilian, B., Brandolini, A. and H. Zkan, O. (2008). Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and sampl markers. *Plant Breeding*, **127(1)**: 9-14.

- Anino, C., Onyango, A.N., Imathiu, S., Maina, J. and Onyangore, F.** (2019). Chemical composition of the seed and 'milk' of three common bean (*Phaseolus vulgaris* L) varieties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **13(2)**: 1242-1249.
- Asfaw, A., Blair, M.W. and Almekinders, C.** (2009). Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the East African highlands. *Theoretical and Applied Genetics*, **120(1)**: 1-12.
- Aziziar, Z.** (2022). Identification of grain chemical content QTLs in common bean. Ph.D. Thesis, Razi University, Kermanshah, Iran (In Persian).
- Aziziar, Z., Cheghamirza, K., Zarei, L. and Beheshti-Alagha, A.** (2021). Chemical and morphological characteristics of common bean seed and evaluating genetic advance in commercial classes. *Cellular and Molecular Biology*, **67(6)**: 89-99.
- Bellucci, E., Bitocchi, E., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., Giardini, A., Attene, G., Nanni, L. and Papa, R.** (2014). Genomics of origin, domestication and evolution of *Phaseolus vulgaris*. *Genomics of Plant Genetic Resources*, **1**: 483-507.
- Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Diengdoh, R. and Tandon, P.** (2014). Genetic stability and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl. an endangered medicinal orchid. *Meta Gene*, **2**: 489-504.
- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P.S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G. and Papa, R.** (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109(14)**: 788-796.
- Bitocchi, E., Rau, D., Bellucci, E., Rodriguez, M., Murgia, M.L., Gioia, T., Santo, D., Nanni, L., Attene, G. and Papa, R.** (2017). Beans (*Phaseolus ssp.*) as a model for understanding crop evolution. *Frontiers in Plant Science*, **8**: 722.
- Blair, M.W., Hurtado, N., Chavarro, C.M., Muñoz-Torres, M.C., Giraldo, M.C., Pedraza, F. and Wing, R.** (2011). Gene-based SSR markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) derived from root and leaf tissue ESTs: an integration of the BMC series. *BMC Plant Biology*, **11**: 1-10.
- Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G.** (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, **54(2)**: 484-489.
- Bradstreet, R.B.** (1954). Kjeldahl method for organic nitrogen. *Analytical Chemistry*, **26(1)**: 185-187.
- Butt, M.S. and Rizwana, B.** (2010). Nutritional and functional properties of some promising legumes protein isolates. *Pakistan Journal of Nutrition*, **9(4)**: 373-379.
- Carvalho, M.S., de Oliveira Moulin Carias, C.M., Silva, M.A., da Silva Ferreira, M.F., de Souza, T.L.P.O., Posse, S.C.P. and Ferreira, A.** (2020). Genetic diversity and structure of landrace accessions, elite lineages and cultivars of common bean estimated with SSR and SNP markers. *Molecular Biology Reports*, **47**: 6705-6715.
- Collard, B.C. and Mackill, D.J.** (2009). Start Codon Targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, **27(1)**: 86-93.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J. and Bandpang, E.C.K.** (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concept. *Euphytica*, **142(1)**: 169-196.
- Dellaporta, S., Wood, L. and Hicks, J.B.** (1983). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1(14)**: 19-21.
- Desiderio, F., Bitocchi, E., Bellucci, E., Rau, D., Rodriguez, M., Attene, G., Papa, R. and Nanni, L.** (2013). Chloroplast microsatellite diversity in *Phaseolus vulgaris*. *Frontiers in Plant Science*, **3**: 312.
- DeWoody, J.A., Honeycutt, R.L. and Skow, L.C.** (1995). Microsatellite markers in white-tailed deer. *The Journal of Heredity*, **86(4)**: 317-319.
- FAO.** (2021). FAOSTAT. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Available at <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. FAO. Rome, Italy.
- Fisseha, Z., Tesfaye, K., Dagne, K., Blair, M. W., Harvey, J., Kyallo, M. and Gepts, P.** (2016). Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L) germplasm of Ethiopia as revealed by microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, **15(52)**: 2824-2847.

- Geleta, N., Labuschagne, M.T. and Viljoen, C.D.** (2006). Genetic diversity analysis in sorghum germplasm as estimated by AFLP, SSR and morpho-agronomical markers. *Biodiversity and Conservation*, **15(10)**: 3251-3265.
- Gheitaran, P.S., Mohammadi, A.S. and Sadeghzadeh, B.** (2014). Identification of genomic regions controlling iron concentration and content in shoot of barley in A × B doubled haploid mapping population. *Plant Genetic Researches*, **1(1)**: 1-12 (In Persian).
- Gholami, Z. and Ansari, S.** (2021). Effects of roasting conditions on physicochemical properties of the watermelon seed. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, **40(2)**: 615-626.
- Gioia, T., Logozzo, G., Marzario, S., Spagnoletti Zeuli, P. and Gepts, P.** (2019). Evolution of SSR diversity from wild types to US advanced cultivars in the Andean and Mesoamerican domestications of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *PLoS ONE*, **14(1)**: e0211342.
- Gyang, P.J., Nyaboga, E.N. and Muge, E.K.** (2017). Molecular characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes using microsatellite markers. *Journal of Advances in Biology and Biotechnology*, **13(2)**: 1-15.
- Hayward, A.C., Tollenaere, R., Dalton-Morgan, J. and Batley, J.** (2015). Molecular marker applications in plants. *Plant Genotyping*, **1245**: 13-27.
- Horwitz, W.** (1975). Official methods of analysis, vol: 222. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Hromadová, Z., Mikolášová, L., Balážová, Ž., Vivodík, M., Chňapek, M. and Gálová, Z.** (2022). Genetic diversity analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes using scot polymorphism. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **12(1)**: e5919-e5919.
- Ipek, M., Seker, M., Ipek, A. and Gul, M.K.** (2015). Identification of molecular markers associated with fruit traits in olive and assessment of olive core collection with AFLP markers and fruit traits. *Genetics Molecular Research*, **14(1)**: 2762-2774.
- Isaac, R.A. and Kerber, J.D.** (1971). Atomic absorption and flame photometry: techniques and uses in soil, plant, and water analysis. *Instrumental Methods for Analysis of Soils and Plant Tissue*, **1**: 17-37.
- Joshi, P.K. and Rao, P.P.** (2017). Global pulses scenario: status and outlook. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1392(1)**: 6-17.
- Kumar, N., Boatwright, J.L., Brenton, Z.W., Sapkota, S., Ballén-Taborda, C., Myers, M.T., Cox, W.A., Jordan, K.E., Kresovich, S. and Boyles, R.E.** (2023). Development and characterization of a sorghum multiparent advanced generation intercross (MAGIC) population for capturing diversity among seed parent gene pool. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, **13(4)**: jkad037.
- Litt, M. and Luty J.A.** (1989). A hyper variable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *The American Journal of Human Genetics*, **44(3)**: 397-401.
- Liu, K., Goodman, M., Muse, S., Smith, J.S., Buckler, E. and Doebley, J.** (2003). Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, **165(4)**: 2117-2128.
- Liu, Y. and Hou, W.** (2010). Genetic diversity of faba bean germplasms in Qinghai and core germplasm identified based on AFLP analysis. *Legume Genomics and Genetics*, **1(1)**: 1-6.
- MacRae, J.C.** (1971). Quantitative measurement of starch in very small amounts of leaf tissue. *Planta*, **96(2)**: 101-108.
- MacRae, J.C. and Armstrong, D.G.** (1968). Enzyme method for determination of α -linked glucose polymers in biological materials. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **19(10)**: 578-581.
- Maji, A.T. and Shaibu, A.A.** (2012). Application of principal component analysis for rice germplasm characterization and evaluation. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, **4(6)**: 87-93.
- Makunja, R.N.** (2020). Characterization of Kenyan common bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) accessions for resistance to common bacterial blight using start codon targeted (SCoT) polymorphism markers. Ph.D. Thesis, University of Nairobi, Kenya.
- Maras, M., Pipan, B., Šuštar-Vozlič, J., Todorović, V., Đurić, G., Vasić, M. and Meglič, V.** (2015). Examination of genetic diversity of common bean from the Western Balkans. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **140(4)**: 308-316.
- Matondo, N.K., Yao, K.N., Kyalo, M., Skilton, R., Nkongolo, K.K., Mumba, D., Tshilenge, D.K. and Lubobo, A.K.** (2017). Assessment of the genetic diversity and the relationship among common

- bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions from DR-Congo germplasm using SSR molecular markers. *International Journal of Current Research*, **9(3)**: 47814-47821.
- Matus, I.A. and Hayes, P.M.** (2002). Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genom*, **45(6)**: 1095-1106.
- Mir Drikvand, R., Najafian, G., Bihamta, M.R. and Ebrahimi, A.** (2015). Detection of QTLs associated to some grain traits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), using association mapping. *Plant Genetic Researches*, **1(2)**: 43-54 (In Persian).
- Mohammadzede, M., Fattahi, M.R., Zamani, Z. and Khadivi-Khub, A.** (2014). Study of association between molecular markers and fruit characters in hazelnut using multiple regression analysis. *Journal of Cell & Tissue (JCT)*, **5(3)**: 289-299.
- Moura, L.S., Carvalho, J., Stetanini, M.B., Ming, L.C. and Meireles, M.A.A.** (2005) Supercritical fluid extraction from fennel (*Foeniculum Vulgare*) global yield. composition and kinetic data. *The Journal of supercritical Fluids*, **35(3)**: 212-219.
- Müller, B.S., Pappas, G.J., Valdisser, P.A., Coelho, G.R., de Menezes, I.P., Abreu, A.G., Borba, T.C., Sakamoto, T., Brondani, C. and Barros, E.G.** (2015). An operational SNP panel integrated to SSR marker for the assessment of genetic diversity and population structure of the common bean. *Plant Molecular Biology Reporter*, **33**: 1697-1711.
- Mulpuri, S., Muddanuru, T. and Francis, G.** (2013). Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker. *Plant Science*, **207**: 117-127.
- Murube, E., Beleggia, R., Pacetti, D., Nartea, A., Frascarelli, G., Lanzavecchia, G., Bellucci, E., Nanni, L., Gioia, T., Marciello, U. and Esposito, S.** (2021). Characterization of nutritional quality traits of a common bean germplasm collection. *Foods*. **10(7)**: 1572.
- Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N. and Özkan, H.** (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, **32(2)**: 261-285.
- Nkongolo, K.K., Mbuya, K., Mehes-Smith, M. and Kalonji-Mbuyi, A.** (2011). Molecular analysis of quality protein (QPM) and normal maize varieties from the DR-Congo breeding program. *African Journal of Biotechnology*, **10(65)**: 14293-14301.
- Okii, D., Tukamuhabwa, P., Odong, T., Namayanja, A., Mukabaranga, J., Paparu, P. and Gepts, P.** (2014). Morphological diversity of tropical common bean germplasm. *African Crop Science Journal*, **22(1)**: 59-68.
- Ouji, A., El Bok, S., Syed, N.H., Abdellaoui, R., Rouaissi, M., Flavell, A.J. and El Gazzah, M.** (2012). Genetic diversity of faba bean (*Vicia faba* L.) populations revealed by sequence specific amplified polymorphism (SSAP) markers. *African Journal of Biotechnology*, **11(9)**: 2162-2168.
- Santhosh, W.G., Shobha, D. and Melwyn, G.S.** (2009). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, **120(3)**: 411-417.
- Savić, A., Pipan, B., Vasić, M. and Meglič, V.** (2021). Genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Serbia, as revealed by single sequence repeats (SSR). *Scientia Horticulturae*, **15(288)**: 110405.
- Shafii Khorshidi, M., Bihamta, M.R., Khialparast, F. and Naghavi, M.** (2012) Identify informative markers Microsatellite in beans (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *12th Iranian Genetic Congress*, Tehran, Iran (In Persian).
- Shehzad, T., Okuizumi, H., Kawase, M. and Okuno, K.** (2009). Development of SSR-based sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) diversity research set of germplasm and its evaluation by morphological traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **56(6)**: 809-827.
- Singh, R., van Heusden, A.W. and Yadav, R.C.** (2013). A comparative genetic diversity analysis in mungbean (*Vigna radiata* L.) using inter-simple sequence repeat (ISSR) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). *African Journal of Biotechnology*, **12(47)**: 6574-6582.
- Udoh, A.P.** (2000). Atomic absorption spectrometric determination of calcium and other metallic elements in some animal protein sources. *Talanta*, **52(4)**: 749-754.
- Yeken, M.Z., Emiralioğlu, O., Çiftçi, V., Bayraktar, H., Palacioğlu, G. and Özer, G.** (2022). Analysis of genetic diversity among common bean germplasm by start codon targeted (SCoT) markers. *Molecular Biology Reports*, **49(5)**: 3839-3847.