Saffron Agronomy & Technology
Vol. 8, No. 4, Winter 2021, P. 598-608

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۸، شماره ۴،زمستان ۱۳۹۹ ص. ۶۰۸- ۵۹۸

مقاله علمی - پژوهشی

شناسایی نشانگرهای ISSR مرتبط با صفات کمی اکوتیپ‌های زعفران زارعی (*Crocus sativus* L.)

سید محمد علوی سینی[۱]*، جلال صبا[۲]، سید سیامک علوی کیا[۳] و محمدرضا عظیمی مقدم[۴]

تاریخ دریافت: ۱۶ خرداد ۱۳۹۸ **تاریخ پذیرش:** ۱ بهمن ۱۳۹۸

علوی سینی، س.م.، صبا، ج.، علوی کیا، س. س.، و عظیمی مقدم، م.ر. ۱۳۹۹. شناسایی نشانگرهای ISSR مرتبط با صفات کمی اکوتیپ‌های زعفران زارعی (*Crocus sativus* L.). زراعت و فناوری زعفران، ۶۰۸-۵۹۸.

چکیده

به منظور بررسی ارتباط صفات کمی و نشانگرهای ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) آزمایشی تحت دو شرایط مزرعه و آزمایشگاه در دانشگاه زنجان انجام شد. در این آزمایش از ۲۰ آغازگر ISSR استفاده شد و صفات زراعی (شامل تعداد گل، وزن تر کلاله، وزن تر گل، وزن خشک کلاله، وزن خشک گل، طول کلاله، عملکرد زعفران، تعداد بنه‌دختری، وزن‌تر بنه، وزن‌خشک بنه، تعداد برگ، طول برگ، عرض برگ، سطح برگ، وزن خشک برگ، زیست‌توده، شاخص برداشت)، صفات فیزیولوژیک (سرعت تعرق، هدایت روزنه‌ای، فتوسنتز) و متابولیت‌های ثانویه (پیکروکروسین، سافرانال و کروسین) در طول فصل رشد اندازه‌گیری شدند. از آغازگرهای مورد استفاده ۳ آغازگر دارای تکثیر نبودند و ۱۷ آغازگر دارای تکثیر، چندشکلی نشان دادند. این آغازگرها در مجموع ۱۳۳ باند را ایجاد نمودند که میانگین تعداد باندها در کل جایگاه‌ها ۷/۸۲ بود. بیشترین تعداد آلل مربوط به آغازگر I-8 (۱۵ آلل) بود. اما بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی و محتوای اطلاعات چندشکلی درجایگاه I-7 مشاهده شد که مقدار آن ۰/۹۳ بود. نتایج تجزیه رگرسیون گام به گام نشان داد آغازگرهای مورد مطالعه (۹ آغازگر) با اکثر صفات به‌جز وزن تر گل، سافرانال، کروسین، تعداد بنه دختری و سرعت تعرق ارتباط معنی‌داری داشتند و بیش‌ترین ضریب تبیین مربوط به صفات عملکرد (۷۹٪)، وزن خشک برگ (۷۶٪)، تعداد گل (۷۳٪) و سطح برگ (۷۰٪) بود. آغازگر I-6 با ۹ صفت کمی در ارتباط بود که بیشترین ارتباط را در میان آغازگرهای مورد مطالعه با صفات کمی داشت. این آغازگر با صفات وزن تر کلاله، وزن خشک کلاله، وزن تر و خشک بنه، تعداد برگ، سطح برگ، وزن خشک برگ، هدایت روزنه‌ای و فتوسنتز ارتباط دارد. آغازگر I-6، ۱۱ مکان ژنی را در جمعیت مورد مطالعه شناسایی کرد با توجه به تعداد مکان‌های ژنی شناسایی شده می‌تواند یکی از آغازگرهای مهم در ارتباط با صفات کمی تلقی گردد. آغازگرهای U808 و U834 به‌ترتیب با ۵ و ۴ صفت در ارتباط بودند که بعد از آغازگر I-6 بیشترین ارتباط با صفات کمی را داشتند. این دو آغازگر بطور مشترک با صفات تعدادگل، شاخص برداشت و عملکرد کلاله در ارتباط بودند. با توجه به ارتباط مشاهده شده احتمال دارد بتوان از این جایگاه‌های نشانگری برای گزینش اکوتیپ‌ها براساس صفات اشاره شده در جمعیت‌های زعفران زراعی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: عملکرد زعفران، رگرسیون گام به گام، هتروزیگوسیتی، محتوای اطلاعات چند شکلی

۱- استادیار پژوهشی بخش تحقیقات زراعی باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، جیرفت، ایران
۲- استاد گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
۳- دانشیار دانشکده کشاورزی، گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه تبریز
٤- دانشیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
(*-نویسنده مسئول: M.alavis@areeo.ac.ir)

DOI: 10.22048/JSAT.2020.189000.1354

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. از خانواده زنبقی-ها (Iridaceae) است که به واسطه ارزش فراوان دارویی و ادویه‌ای از جایگاه ویژه‌ای در میان گیاهان دارویی برخوردار است (Gresta et al., 2009). امروزه زعفران به‌خاطر استفاده‌اش به عنوان رنگ و ادویه طبیعی در غذا توجه زیادی را در علوم صنایع غذایی به خود جلب کرده است که می‌تواند جایگزین رنگ‌های مصنوعی، عطرها و تقویت کننده‌ها شود (Kafi, 2006). کشت زعفران در کشور در حال افزایش است بطوریکه مساحت زعفران‌کاری در ایران در سال ۱۳۹۵ به حدود ۹۳ هزار هکتار رسیده است که ۸۹ هزار هکتار آن (حدود ۹۶٪) در استان های خراسان رضوی و جنوبی و مقدار کل تولید زعفران کشور ۳۵۱ تن می‌باشد (MAJ, 2018). تکثیر زعفران بخاطر تریپلوئید بودن و عدم تولید بذر به‌طریق غیرجنسی صورت می‌گیرد (Grilli-Caiola, 2004). به‌همین خاطر گزینش کلونی نقش مهمی در اصلاح صفات زعفران زراعی ایفا می‌کند. بسیاری از پژوهش‌گران معتقد هستند به‌خاطر اینکه زعفران یک گونه کلون شده می‌باشد، تنوع ژنتیکی کافی برای استفاده در برنامه-های گزینشی را ندارد (Alavi Kia et al., 2008; Rubio-Moraga et al., 2009). به‌همین خاطر گزینش کلونی به-منظور اصلاح عملکرد زعفران خیلی موفق نبوده است. علاوه بر این جهش‌های شناسایی شده حاصل از موتاژن‌های طبیعی یا مصنوعی وراثت‌پذیر نیستند. مشکل عقیمی ناشی از تریپلوئید بودن زعفران از کاربرد برنامه‌های دورگ‌گیری ممانعت به‌عمل می‌آورد. بنابراین روش‌های اصلاح سنتی نیز در برنامه‌های اصلاحی زعفران کارساز نیستند. از این‌رو بایستی از تکنیک‌های آزمایشگاهی و موتاژن‌های مصنوعی برای این امر بهره جست. هرچند که تا به امروز هم موتاژن‌های مصنوعی و هم تکنیک-های دوبرابر کردن کروموزوم‌ها نتایج رضایت‌بخشی فراهم نکرده است (Bagheri & Vessal, 2003; Khan, 2007; Nehvi et al., 2007). بنابراین شناسایی منابع تنوع به لحاظ برخی صفات باارزش از قبیل تنوع در تعداد کلاله، عملکرد و پتانسیل بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه مهم می‌تواند نقش مهمی را در اصلاح زعفران ایفا کند. هرچند بیشتر برنامه‌های اصلاحی بر اساس گزینش فنوتیپی و مورفولوژیکی استوار است اما با توجه به محدود بودن تعداد نشانگرهای مورفولوژیکی و متأثر بودن آن‌ها از عوامل محیطی، کاربرد اینگونه نشانگرها محدود می‌باشد (Zaccardelli et al., 2003; Farshadfar et al., 2008). امروزه برای بررسی تنوع ژنتیکی به صورت بسیار گسترده‌ای از نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود. نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به دلیل سادگی و نیاز به مقادیر کم DNA کاربرد زیادی دارند . انتخاب نوع نشانگرهای مولکولی به تکرارپذیری بالا، سادگی روش و هزینه پایین و قابلیت اعتماد بالای آن بستگی دارد (Han et al., 2007). کیفی و بیکی (Keifi & Beiki, 2012) با استفاده از نشانگرهای RAPD[۱] و SRAP[۲] تنوع قابل ملاحظه‌ای بین اکوتیپ‌های زعفران پیدا کردند و با استفاده از تجزیه کلاستر اکوتیپ‌ها را در ۴ گروه مختلف قرار دادند و عنوان کردند که زعفران یک گونه مونومورف نمی‌باشد و می‌توان از تنوع موجود آن برای اهداف اصلاحی استفاده نمود. امروزه، نشانگرهای مولکولی به‌عنوان ابزاری مفید جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در ژرم پلاسم، تعیین مکان ژن‌های مقاومت به بیماری، تنش‌های محیطی و همچنین رابطه بین اجداد وحشی و رقم‌های اصلاح‌شده در گیاهان به‌کاربرده می‌شوند (Condon et al., 2008). ازاین‌رو، تعیین ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژیکی و

۱- Random Amplification of Polymorphic DNA
۲- Sequence-Related Amplified Polymorphism

فنوتیپی، می‌تواند گامی مؤثر در استفاده از گزینش جمعیتی باشد (Ahmadi et al., 2017). شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های کنترل کننده‌ی صفات، به‌عنوان روشی بسیارمفید جهت شناسایی ژنوتیپ‌های متفاوت و متمایز تلقی می‌شود. تجزیه ارتباطی روشی است که نه تنها امکان مکان یابی دقیق ژن‌ها را فراهم می‌کند بلکه امکان شناسایی نواحی کروموزومی دیگری که در مطالعات مبتنی بر پیوستگی امکان-پذیر نیستند را نیز میسر می‌سازد. کارایی این روش در انسان نیز برای شناسایی و مکان یابی ژن‌های کنترل کننده صفات مندلی مشخص شده است و در علوم گیاهی نیز رو به گسترش است (Gebhardt et al., 2004؛ Jun et al., 2008). پژوهشگران با استفاده از تجزیه ارتباطی، نشانگرهای ISSR مرتبط با صفات مورفولوژیک در گیاه یونجه را معرفی نمودند (Abdollahi Mandoulakani & Azizi, 2014). این محققین عنوان نمودند اکثر آغازگرهای مورد استفاده روی صفات مورد مطالعه مؤثر بودند، بطوریکه می‌توان از این آغازگرها همراه با اطلاعات صفات مورفولوژیک در اصلاح یونجه زراعی جهت شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیتهای نقشه‌یابی و تولید ارقام هیبرید استفاده کرد. اخیراً نشانگرهای ISSR مرتبط به تحمل به سفیدک پودری در گیاه بالغ جو با استفاده از تجزیه ارتباطی شناسایی شده است (Ahmadi et al., 2017). همچنین با استفاده از روش تجزیه ارتباطی ۵ نشانگر SSR مرتبط با سطح زیر منحنی پیشرفت (AUDPC)، و ۴ نشانگر مرتبط با ضریب آلودگی بیماری نهایی درگندم برای مقاومت به زنگ زرد معرفی شده است (Khodarahmi et al., 2009). ایواندیک و همکاران (Ivandic et al., 2002)، با استفاده از ۳۳ نشانگر SSR و روش تجزیه ارتباطی، نشانگرهای مرتبط با زمان گلدهی تحت رژیم‌های مختلف رشدی را در جو شناسایی کردند. اووسنا و همکاران (Ovesna et al., 2002) با استفاده از ۴۰ آغازگر رپید، ۷۰-۶۰ درصد آغازگرها چند شکل بودند که تنها ۷ آغازگر مرتبط با بیماری بودند. این مطالعه به منظور شناسایی آغازگرهای آگاهی بخش نشانگر ISSR مرتبط و پیوسته با صفات زراعی، فیزیولوژیک و متابولیت‌های ثانویه انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی و صفات فنوتیپی

به منظور بررسی ارتباط بین صفات فنوتیپی (زراعی، فیزیولوژیک و متابولیت‌های ثانویه) زعفران و آغازگرهای مختلف نشانگر ISSR آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در طی دو سال در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انجام شد. ۱۸ اکوتیپ زعفران از مناطقی که بیشترین سابقه کشت زعفران را دارند از سراسر کشور جمع آوری گردید (جدول ۱). صفات زراعی (شامل تعداد گل در متر مربع، وزن تر کلاله، وزن تر گل، وزن خشک کلاله، وزن خشک گل، طول کلاله، عملکرد زعفران، تعداد بنه‌دختری، وزن‌تر بنه، وزن‌خشک بنه، تعداد برگ، طول برگ، عرض برگ، سطح برگ، وزن خشک برگ، زیست‌توده، شاخص برداشت)، صفات فیزیولوژیک (سرعت تعرق، هدایت روزنه‌ای، فتوسنتز) در طی فصل رشد و متابولیت‌های پیکروکروسین، سافرانال و کروسین براساس روش استاندارد ملی ایران (ISIRI, 2006) اندازه‌گیری شدند.

استخراج DNA ژنومی و تکثیر قطعات

در ابتدای فصل رشد از برگ‌های تازه مربوط به هر اکوتیپ ۵ نمونه بطور جداگانه برداشت و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج نگهداری شدند. استخراج DNA از برگ‌های تازه زعفران (۱۵۰ میلی گرم) به روش CTAB با اندکی تغییر انجام شد (Saghai-Maroof et al., 1984). پس از استخراج DNA برای اندازه گیری کمیت از نانودراپ Thermo Scientific و ارزیابی کیفیت آن از الکتروفورز بر روی ژل آگارز

یک درصد با استفاده از رنگ Rebust استفاده شد. در این پژوهش ۲۰ آغازگر ISSR جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زراعی زعفران استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی مناطق منشأ اکوتیپ‌های مختلف زعفران

Table 1- Geographical characteristics of the origin regions of different saffron ecotypes

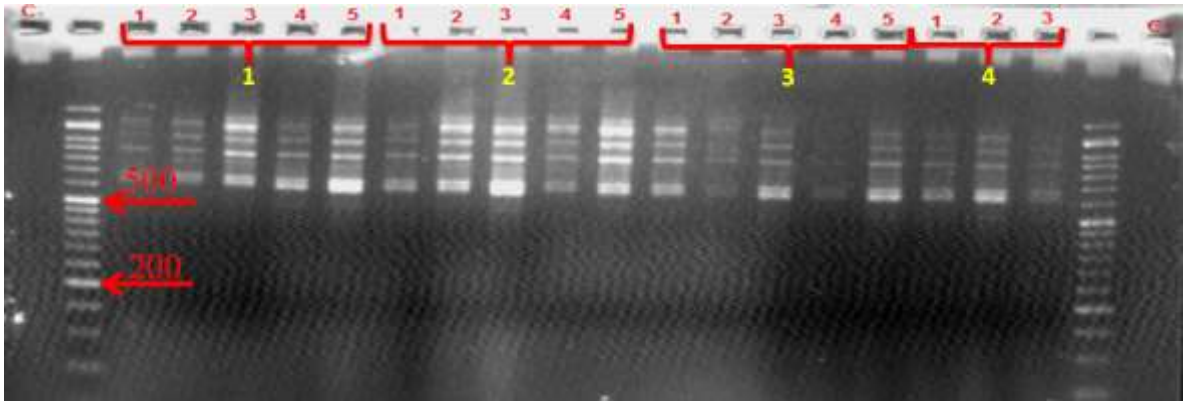
عدد Number	منطقه	Region	استان	Province	ارتفاع از سطح دریا Above sea level	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude
1	بهاباد	Bahabad	یزد	Yazd	1432	56^0 02'	31^0 5'
2	بجستان	Bajestan	خراسان رضوی	Razavi-Khorasan	1250	58^0 19'	34^0 51'
3	بردسکن	Bardeskan	خراسان رضوی	Razavi-Khorasan	1000	57^0 57'	35^0 15'
4	استهبانات	Estahbanat	فارس	Fars	1730	54^0 2'	29^0 7'
5	فیض آباد	Feizabad	خراسان رضوی	Razavi-Khorasan	990	59^0 42'	34^0 56'
6	فردوس	Ferdows	خراسان جنوبی	South-Khorasan	1293	58^0 10'	34^0 10'
7	قاین	Ghaien	خراسان جنوبی	South-Khorasan	1432	59^0 10'	33^0 43'
8	گناباد	Gonabad	خراسان رضوی	Razavi-Khorasan	1056	58^0 41'	34^0 21'
9	گرگان	Azadshahr	گلستان	Golestan	1300	54^0 24'	36^0 54'
10	خلیل‌آباد	Kalilabad	خراسان رضوی	Razavi-Khorasan	985	58^0 17'	34^0 15'
11	کاشمر	Kashmar	خراسان رضوی	Razavi-Khorasan	1109.7	58^0 28'	35^0 12'
12	نطنز	Natanz	اصفهان	Isfahan	1684.9	51^0 54'	33^0 32'
13	نیشابور	Neishabour	خراسان رضوی	Razavi-Khorasan	1213	58^0 48'	36^0 16'
14	رشتخوار	Roshtkhar	خراسان رضوی	Razavi-Khorasan	1141	59^0 37'	34^0 58'
15	تربت-حیدریه	Torbat-Heidarieh	خراسان رضوی	Razavi-Khorasan	1450.8	59^0 13'	35^0 16'
16	تربت‌جام	Torbat-Jam	خراسان رضوی	Razavi-Khorasan	950.4	60^0 35'	35^0 15'
17	زرند	Zarand	کرمان	Kerman	1650	55^0 47'	31^0 28'
18	زاوه	Zaveh	خراسان رضوی	Razavi-Khorasan	1300	59^0 47'	35^0 27'

جدول ۲- نام، دمای اتصال و توالی نوکلئوتیدی ۲۰ آغازگر ISSR

Table 2- Name, annealing temperature and Nucleotide sequence of 20 ISSR primer

ردیف Row	آغازگر Primer	نام خلاصه Abbreviation name	دما (°C) Temprature	توالی Sequence
1	ISSR1	I-1	41.7	$(GA)_8A$
2	ISSR2	I-2	50.5	$(CA)_8AT$
3	ISSR3	I-3	-	$(CA)_8AC$
4	ISSR4	I-4	40.3	$(GA)_8T$
5	ISSR5	I-5	50.1	$(CA)_8GT$
6	ISSR6	I-6	51.3	$(CA)_8GA$
7	ISSR7	I-7	51.0	$(AC)_8G$
8	ISSR8	I-8	50.1	$(AC)_8TG$
9	ISSR9	I-9	57.1	$(AC)_8CG$ '
10	ISSR10	I-10	40.0	$(AG)_8T$
11	ISSR11	I-11	-	$(CT)_8G$
12	ISSR12	I-12	-	$(GA)_8C$
13	ISSR13	I-13	44.0	$(GA)_8TC$
14	ISSR14	I-14	49.0	$(GA)_8CG$
15	UBC808	U808	45.0	$(AG)_8C$
16	UBC834	U834	47.0	$(AG)_8CT$
17	UBC835	U835	51.0	$(AG)_8CC$
18	UBC836	U836	48.8	$(AG)_8CA$
19	UBC841	U841	53.0	$(GA)_8CC$
20	UBC851	U851	54.0	$(GT)_8CG$

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل پرایمر و DNA ژنومی هر کدام به حجم ۱µL با غلظت ۲۰ نانوگرم، مستر میکس (2X) µL ۶/۵، µl ۴ddH2O انجام گرفت. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با برنامه زمانی ۵ دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، و ۳۵ چرخه شامل ۴۵ ثانیه واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دمای توصیه شده برای هر آغازگر به مدت ۴۰ ثانیه (جهت اتصال آغازگرها) و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. تفکیک محصولات حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آگاروز ۳ درصد انجام شد. رنگ‌آمیزی قطعات تکثیر شده با استفاده از رنگ Rebust انجام شد. برای تعیین اندازه باندها از نشانگر با اندازه ۵۰bp (شرکت فرمنتاس) استفاده گردید (شکل ۱).



شکل ۱- الگوی قطعات تکثیر شده توسط آغازگر I_2 برای اکوتیپ‌های بهاباد (۱)، بجستان (۲)، بردسکن (۳) و استهبانات (۴)

Figure 1- Pattern of amplified fragments by I_2 primer for ecotypes of Bahabad (1), Bajestan (2), Bardeskan (3) and Estahbanat (4).

تجزیه داده‌ها

پس از امتیاز دهی باندها بصورت ۰ (عدم حضور باند) و ۱ (حضور باند)، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و ضریب تنوع ژنی (H) آغازگرهای تکثیر شده با استفاده از از نرم افزار GeneAlex نسخه 1.31 محاسبه شد. فرمول های محاسبه به شرح ذیل می‌باشد:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^{N} P_i^2$$

P_i فراوانی آلل iام در یک مکان مشخص، N تعداد مکان‌های ژنی می‌باشد (Nei, 1973).

$$PIC = 1 - p^2 - q^2$$

که در آن q=1-p و p نسبت افراد دارای باند موردنظر است (Ghislain et al., 1999).

در نهایت به منظور یافتن ارتباط بین نشانگرهای ISSR و صفات زراعی، فیزیولوژیک و متابولیت‌ها از تجزیه رگرسیون چندگانه به روش گام به گام استفاده شد. در این روش مکان-های نشانگری به‌عنوان متغیرهای مستقل و صفات فنوتیپی اندازه‌گیری شده به‌عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شدند. تجزیه رگرسیون گام به گام با استفاده از نرم افزار SPSS (21) انجام شد.

نتایج و بحث

ISSR نشانگری است که امکان تکثیر قطعاتی از DNA را که بین دو ریزماهواره قرار دارند و به اندازه کافی به‌هم نزدیک هستند را فراهم می‌آورد (Prevost & Wilkinson, 1999). این نشانگر به‌دلیل توزیع گسترده در سرتاسر ژنوم، تکرارپذیری بالا و عدم نیاز به اطلاعات قبلی در مورد توالی ژنوم استفاده گسترده‌ای در میان محققان پیدا کرده است. از بین ۲۰ آغازگر مورد استفاده، ۳ آغازگر دارای تکثیر نبودند و ۱۷ آغازگر دارای تکثیر، چندشکلی نشان دادند. این آغازگرها در مجموع ۱۳۳ باند را ایجاد نمودند که میانگین تعداد باندها در کل جایگاه‌ها ۷/۸۲ بود (جدول ۳). این نتایج نشان دادند که نشانگرهای ISSR قادر هستند چند شکلی بالایی را در زعفران شناسایی نمایند و از این رو برای گروه‌بندی اکوتیپ‌ها و گزینش نشانگری مفید هستند. درحالی‌که روبیو موراگا و همکاران (Rubio-Moraga, 2009) گزارش کردند که نشانگر ISSR قادر به شناسایی تنوع موجود در ژنوم زعفران نیست. جهت ارزیابی دقیق‌تر آغازگرهای ISSR مورد مطالعه، تعداد آلل‌های مشاهده شده محاسبه شد (جدول ۳). نتایج حاصل از تعداد آلل‌های مشاهده شده نشان داد که میانگین این پارامتر در کل آغازگرهای مورد مطالعه ۷/۸۲ بود که آغازگر I-8 با ۱۵ و آغازگرهای I-1، I-10، I-13 و U808 با چهار آلل به‌ترتیب بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده را در بین آغازگرهای مورد مطالعه داشتند. مقدار متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی به ترتیب ۰/۶۹ و ۰/۴۳ محاسبه شد (جدول ۳). بیشترین مقدار ضریب تنوع ژنی درجایگاه I-7 مشاهده شد که مقدار آن ۰/۹۳ بود. در حالیکه جایگاه‌هایU841 و I-4 به‌ترتیب با (۰/۱۷، ۰/۲۶) و (۰/۱۶ و ۰/۲۴) کم‌ترین مقدار ضریب تنوع ژنی و PIC را داشتند. بیکی و همکاران (Beiki et al., 2013) با مطالعه بر روی اکوتیپ‌زراعی و وحشی۱۰۰ درصد هتروزیگوسیتی را برای جایگاه‌های مورد مطالعه گزارش کردند. در این پژوهش ارتباط معنی‌داری بین تعداد آلل در هر جایگاه و میزان PIC در هر جایگاه پیدا نشد (r=۰/۴۵۶ و p=۰/۰۷).

برای تعیین ارتباط بین صفات کمی مورد مطالعه با مکان-های نشانگری ISSR از روش رگرسیون گام‌به‌گام استفاده گردید. نتایج نشان داد آغازگرهای مورد مطالعه با اکثر صفات به‌جز وزن تر گل، سافرانال، کروسین، تعداد بنه دختری و سرعت تعرق ارتباط معنی‌داری داشتند و بیش‌ترین ضریب تبیین مربوط به صفات عملکرد، وزن خشک برگ، تعداد گل و سطح برگ بود (جدول ۴).

جدول ۳- آماره‌های توصیفی حاصل از ۱۷ آغازگر ISSR در اکوتیپ‌های زعفران

Table 3- Descriptive statistics of 17 ISSR primers in saffron ecotypes

آغازگر Primer	تعداد آلل‌های مشاهده شده Number of observed alells	تنوع ژنی Gene diversity	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC
U851	8	0.77	0.49
U841	8	0.17	0.16
U836	9	0.79	0.49
U835	7	0.83	0.48
U834	5	0.88	0.45
U808	4	0.51	0.42
I-1	4	0.53	0.43
I-2	9	0.81	0.48
I-4	7	0.26	0.24
I-5	12	0.89	0.44
I-6	11	0.73	0.49
I-7	10	0.93	0.39
I-8	15	0.88	0.45
I-9	7	0.75	0.50
I-10	4	0.47	0.40
I-13	4	0.74	0.49
I-14	9	0.81	0.48
Sum جمع	133	11.76	7.35
Average میانگین	7.82	0.69	0.43

جدول ۴- آغازگرهای آگاهی بخش مرتبط با صفات کمی بر اساس نشانگر ISSR

Table 4- Informative primers related with quantitative traits based on ISSR marker

صفات کمی	Quantitative traits	تعداد آغازگر Primer number	مکان ژنی Locus	ضریب تبیین (٪) Coefficient of Determination
تعداد گل	Flower number	3	U808, U834, U836	73
وزن تر کلاله	Stigma fresh weight	2	I-6, I-14	60
وزن تر گل	Flower fresh weight	0	۰	0
وزن خشک کلاله	Stigma dry weight	1	I-6	46
وزن خشک گل	Flower dry weight	1	U-836	36
طول کلاله	Stigma length	1	I-14	24
عملکرد	Yield	3	I-14, U808, U834	79
پیکروکروسین	Picrocrocin	1	I-1	31
سافرانال	Safranal	0	۰	0
کروسین	Crocin	0	۰	0
تعداد بنه	Corm number	0	۰	0
وزن‌تر بنه	Corm fresh weight	1	I-6	29
وزن‌خشک بنه	Corm dry weight	3	I-1, I-6, I-7	63
تعداد برگ	Leaf number	1	I-6	32
طول برگ	Leaf length	1	I-4	25
عرض برگ	Leaf width	1	U834	29
سطح برگ	Leaf area	4	U834, U836, I-4 , I-6	70
وزن خشک برگ	Leaf dry weight	3	I-4, I-5, I-6, U808	76
زیست‌توده	Biomass	0	۰	0
شاخص برداشت	Harvest index	2	U834, U808	63
سرعت تعرق	Transpiration rate	0	۰	0
هدایت روزنه‌ای	Stomatal conductance	2	I-6, I-4	48
فتوسنتز	Phothosynthesis	1	I-6	24

از بین آغازگرهای مورد مطالعه ۹ آغازگر با صفات کمی ارتباط داشتند و بین سایر آغازگرها و صفات کمی ارتباطی مشاهده نشد (جدول ۴). آغازگر I-6 با ۹ صفت کمی در ارتباط بود که بیشترین ارتباط را در میان آغازگرهای مورد مطالعه با صفات کمی داشت. این آغازگر با صفات وزن تر کلاله، وزن خشک کلاله، وزن تر و خشک بنه، تعداد برگ، سطح برگ، وزن خشک برگ، هدایت روزنه‌ای و فتوسنتز ارتباط دارد. آغازگر I-6، ۱۱ آلل را در جمعیت مورد مطالعه نشان داد که می‌تواند یکی از آغازگرهای مهم در ارتباط با صفات فنوتیپی تلقی گردد. آغازگرهای U808 و U834 به‌ترتیب با ۵ و ۴ صفت در ارتباط بودند که بعد از آغازگر I-6 بیشترین ارتباط با صفات کمی را داشتند. این دو آغازگر بطور مشترک با صفات تعدادگل، شاخص برداشت و عملکرد کلاله در ارتباط بودند. ارتباط یک آغازگر با چند صفت در این پژوهش می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی مکان‌های مربوطه باشد (June et al., 2008). از بین صفات مورد مطالعه، صفات سطح برگ و وزن خشک برگ هر کدام با چهار جایگاه نشانگری در ارتباط بودند که دو جایگاه نشانگری I-4 و I-6 در هر دو یکسان بودند. هرچند این دو صفت با چهار جایگاه نشانگری در ارتباط بودند ولی درصد تغییرات تبیین شده آن‌ها (وزن خشک برگ ۷۶٪ و سطح برگ ۷۰٪) نسبت به عملکرد که با سه جایگاه نشانگری در ارتباط است (۷۹ درصد)، کمتر بود. این موضوع نشان دهنده ارتباط بالای جایگاه‌های نشانگری I-14, U808, U834 با عملکرد می‌باشد. ملاحظه دقیق‌تر نتایج نشان می‌دهد صفت تعداد گل که یکی از اجزای اصلی عملکرد زعفران است، با جایگاه‌های نشانگری U836, U808, U834 ارتباط معنی‌دار دارد که در دو جایگاه با عملکرد مشترک هستند. این موضوع نشان دهنده اهمیت این دو جایگاه نشانگری (U808, U834) در تعیین تعداد گل و عملکرد می‌باشد. عباسی و همکاران (Abbasi et al., 2015) نیز از رگرسیون گام به گام برای بررسی ارتباط بین نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR و صفت بیماریزایی در نهال‌های گردو استفاده کردند. عبدالهی مندولکانی و عزیزی (Abdollahi Mandoulakani & Azizi, 2014) گزارش کردند که اکثر آغازگرهای ISSR با صفات مورد مطالعه ارتباط دارند و می‌توان از این آغازگرها در برنامه‌های اصلاحی یونجه برای شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و تولید ارقام هیبرید استفاده کرد. بر اساس نتایج مشخص گردید که تقریباً ۵۰ درصد از آغازگرهای استفاده شده با صفات مورد مطالعه در ارتباط بودند ولی برای اطمینان از ارتباط این جایگاه-های نشانگری با صفات مورد مطالعه لازم است مطالعات دیگری انجام گردد. با توجه به ارتباط مشاهده شده احتمال دارد بتوان از این جایگاه‌های نشانگری برای گزینش اکوتیپ‌ها در جمعیت-های زعفران زراعی استفاده نمود.

منابع

Abdollahi Mandoulakani, B., and Azizi, H. 2014. Identification of ISSR markers associated with morphological traits in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations . Journal of Molecular and Celular Research 7 (2): 260-268.

Ahmadi, M., Fazeli, A., and Arminian, A. 2017. Abbasi, KH., Zafari, D., and Abbasi, S. 2015. Identification of informative markers associated with virulence trait of *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. isolates on walnut seedlings using RAPD and ISSR markers. Modern Genetic Journal 10 (2):167-174.

Identification of informative ISSR marker linked to resistance to powdery mildew in barley (*Hordeum vulgare*) at adult growth stage. Journal of Crop Breeding 9 (22): 31-40.

Alavi-Kia, S.S., Mohammadi, S.A., Aharizad, S., and Moghaddam, M. 2008. Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in Crocus genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism. Biotechnology and Biotechnological Equipment 22 (3): 795-800.

Bagheri, A., and Vessal, S., 2003. Saffron improvement in Iran, breakthroughs and barriers. In, Proc 3rd National Symposium on. Saffron, Mashhad. pp. 1-10.

Beiki, A. H., Abbaspour, N., and Mozaffari, J. 2013. Genetic diversity of cultivated and wild *Crocus* genus in Iran with ISSR markers. Journal of Molecular and Celular Research 26 (2): 164-173.

Condon, F., Gustus, C., Donald, C.R., and Smith, K.P. 2008. Effect of advanced cycle breeding on genetic diversity in barley breeding germplasm. Crop Science 48: 1027-1036.

Farshadfar, M., Fareghi, S.H., Farshadfar, E.A., and Jafari, A.A. 2008. Evaluation of the genetic diversity of alfalfa using morphological and chemical indices. Journal of Rangeland and Forest Research and Genetic Modification of Plants 16: 1-13.

Gebhardt, C., Ballvora, A., Walkemeier, B., Oberhagemann, P., and Schuler, K. 2004. Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. Molecular Breeding 13: 93-102.

Ghislain, M., Zhang, D., Fazardo, D., Huamann, Z., and Hismans, R.H. (1999). Marker-assisted sampling of the cultivated Andean Potato Solanum phureja collection using RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution 46: 547-555.

Gresta, F., Avola, G., Lombardo, G. M., Siracusa, L., and Ruberto, G. 2009. Analysis of flowering, stigmas yield and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.) as affected by environmental conditions. Scientia Horticulturae 119 (3): 320-324.

Grilli-Caiola, M., and Canini, A. 2004. Ultrastructure of chromoplasts and other plastids in *Crocus sativus* L. (Iridiaceae). Plant Biosystems 138: 43-52.

Han, Y. C., Teng, C. Z., and Zhong, S. 2007. Genetic variation and clonal diversity in population of Nelumbo nucifera (*Neloum bonaceae*) in central China detected by ISSR markers. Aguatic Botany 86: 67-75.

ISIRI. 2006. 259-2 Saffron (*Crocus sativus* L.). Iranian Standard and Industrial Research Institute.

Ivandic, V., Hackett, C.A., Nevo, E., Keith, R., Thomas, W.T.B., and Forster, B.P. 2002. Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time. Plant Molecular Biology 48: 511-527.

Jun, T.H., Van, K., Kim, M.Y., Lee, S.H., and Walker, D.R. 2008. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. Euphytica 62: 179-191.

Kafi, M. 2006. Saffron Ecophysiology. In: Kafi, M., Koocheki, A., Rashed, M.H., Nassiri, M. (Eds.), Saffron (*Crocus* sativus L.) Production and Processing. Science Publishers, Enfield. pp. 39-58.

Keifi, F., and Beiki, A.H. 2012. Exploitation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for genetic diversity of saffron collection. Journal of Medicinal Plants Research 6 (14): 2761-2768.

Khan, I. A. 2007. Development of high yielding saffron mutant. Acta Horticulturae 739: 255-

257.

Khodarahmi, M., Mohammadi, S.A., and Jalalkamali, M.R. 2009. Identification of informative marker for yellow rust resistant related cultivars. The 6th National Biotechnology Congress of Iran. 13-15 Aug, Milad Tower Conference Hall, Tehran, Iran.

Ministry of Agriculture- Jihad (MAJ). 2018. Information technology and statistical center. Available in website. http://amar.maj.ir/Portal/Home/Default.aspx?CategoryID=117564e0-507c-4565-9659-fbabfb4acb9b

Nehvi, F.A., Wani, S.A., Dar, S.A., Makhdoomi, M.I., Allie, B.A., and Mir, Z.A. 2007. New emerging trends on production technology of saffron. Acta Horticulture 739: 375-383.

Nei, M. (1973). Analysis of genetic diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences. 70:3321-3323.

Ovesna, J., Kucera, L. Bockova R., and Holubec, V. 2002. Characterization of powdery mildew resistance donors within *Triticum boeoticum* accessions using RAPDs. Plant Breeding 38: 117-124.

Prevost, A., and Wilkinson, M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical and Applied Genetics 98: 107-112.

Rubio-Moraga, A., Castillo-López, R., Gómez-Gómez, L., and Ahrazem, O. 2009. Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. BMC Research Notes 2: 189-193.

Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., and Allard, R.W. 1984. Ribosomal DNAsepacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences 81: 8014-8019.

Zaccardelli, M., Gnocchi, S., Carelli, M., and Scotti, C. 2003. Variation among and within Italian alfalfa ecotypes by means of bioagronomic characters and amplified fragment length polymorphism analyses. Plant Breeding 122: 61-65.

Identification of ISSR Markers Related to Quantitative Traits of *Crocus sativus* L. Ecotypes

Seid Mohammad Alavi-siney[1], Jalal Saba[2], Seyyed Siamak Alavikia[3] and Mohammad Reza Azimi-Moghaddam[4]

Submitted: 6 June 2019 **Accepted:** 21 January 2020

Alavi-siney, S.M. Saba, J., Alavikia, S.S., and Azimi-Moghaddam, M.R. 2021. Identification of ISSR Markers Related to Quantitative Traits of *Crocus sativus* L. Ecotypes. Saffron Agronomy & Technology, 8(4): 598-608.

Abstract

In order to investigate the relationship between quantitative traits and ISSR markers, an experiment was carried out under farm and laboratory conditions at the Zanjan University. In this experiment, 20 primers of ISSR marker were used, and the agronomic traits (including flower number, fresh weight of Stigma, fresh weight of flower, dry weight of Stigma, dry weight of flower, stigma length, saffron yield, corm number, fresh and dry weight of corm, number of leaves, leaf length, leaf width, leaf area, dry leaf weight, biomass, harvest index), physiological traits (transpiration rate, stomatal conductance, photosynthesis) and secondary metabolites (Picocrocin, Safranal, and Crocin) were measured during the growing season. Three primers of the total did not amplify. 17 ISSR primers amplified 133 loci among 20 saffron ecotypes, with an average of 7.82 loci per primer. The highest number of alleles were for the I-8 primer (15 alleles). However, the highest amount of heterozygosity and polymorphism information content was found at the I-7 locus, which was 0.93. The results of stepwise regression analysis showed that the primers studied (i.e., nine primers) had a significant relationship with most traits except the fresh weight of flower, saffranal, crocin, corm number, and transpiration rate. The highest coefficient of determination was related to yield traits (79%), dry leaf weight (76%), flower number (73%), and leaf area (70%), respectively. I-6 locus was associated with nine quantitative traits, which had the highest relationship among studied primers with quantitative traits. This primer was associated with the fresh weight of stigma, dry weight of stigma, fresh and dry weight of corm, leaf number, leaf area, dry leaf weight, stomatal conductance, and photosynthesis. This primer (I-6), showed 11 alleles in the studied population, which can be considered as important primers in relation to quantitative traits. U808 and U834 primers were associated with 5 and 4 traits, respectively, which had the highest association with quantitative traits after the I-6 primer. These primers were associated with the number of flowers, harvest index, and yield. Considering the observed relationship, it is possible to use these markers loci to select ecotypes based on the related traits in saffron populations.

Keywords: Saffron yield, Stepwise regression, Heterozygosity, Polymorphism information content.

1- Assistant professor, Crop and Horticultural Science Research Department, Southern Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Jiroft, Iran.
2- Professor of Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
3- Assosciate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.
4- Associate Professor of Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran
(*- Corresponding author Email: M.alavis@areeo.ac.ir)
DOI: 10.22048/JSAT.2020.189000.1354