Saffron Agronomy & Technology
Vol. 4, No. 4, Winter 2016, P. 257-265
**DOI:** 10.22048/jsat.2016.38672

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵ ص. ۲۶۵-۲۵۷

# بررسی تنوع ژنتیکی برخی نمونه‌های زعفران ایران با استفاده از نشانگرهای ملکولی RAPD و ISSR

**مجید شکرپور[۱*]، زینب عابدی[۲]، سیامک کلانتری[۳] و سید علیرضا سلامی[۱]**

**تاریخ دریافت: ۱۲ آذر ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: ۵ خرداد ۱۳۹۵**

## چکیده

زعفران یکی از با ارزش‌ترین گیاهان دارویی و ادویه‌ای در جهان است. با وجود قدمت کشت طولانی این گیاه در کشور، مطالعات اصلاحی محدودی به واسطه تولیدمثل غیرجنسی این گیاه انجام شده است. به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم زعفران ایران، ۶۵ نمونه مختلف زعفران از نواحی عمده کشت در خراسان شامل تربت‌حیدریه، گناباد، مه ولات، قائنات و فردوس جمع‌آوری و از طریق نشانگرهای مولکولی مورد مطالعه قرار گرفت. آغازگرهای RAPD و ISSR به کار رفته به ترتیب ۴۳ و ۱۲۲ مکان نشانگری و در مجموع ۱۶۵ مکان نشانگری چندشکل با میانگین ۷/۵ نشانگر به ازای هر آغازگر تولید نمودند. شاخص تنوع در دامنه ۰/۷ تا ۰/۳۶ با میانگین ۰/۲۳ به دست آمد. همچنین شاخص نشانگری با میانگین ۰/۱۶ در دامنه ۰/۷ تا ۰/۲۴ متغیر بود. نمونه‌های مربوط به نواحی قائنات و مه ولات به ترتیب دارای بیشترین (۸۳/۰۳ درصد) و کمترین (۵۲/۷۳ درصد) چندشکلی بودند. گروه‌بندی نمونه‌های زعفران مورد مطالعه با استفاده از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که چهار گروه متمایز حاصل با محل‌های جمع‌آوری آن‌ها مطابقت کمی داشتند، درحالی‌که گروه‌بندی مولکولی مناطق کشت زعفران تطابق نسبتاً مناسبی با فواصل جغرافیایی مربوطه داشت. به‌طورکلی، نتایج تجزیه مولکولی در این مطالعه حاکی از وجود تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های زعفران ایران بود. از این‌رو، امید می‌رود از طریق گزینش کلون‌های برتر، پیشرفت‌هایی از نظر بهبود عملکرد کمی و کیفی زعفران حاصل شود.

**کلمات کلیدی:** زعفران، تنوع مولکولی، ژرم پلاسم، ISSR، RAPD.

## مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. گیاهی از تیره زنبق (Iridaceae) است که به واسطه ارزش فراوان دارویی و ادویه‌ای از جایگاه ویژه‌ای در میان گیاهان دارویی برخوردار است. خصوصیات ارزشمند دارویی و ادویه‌ای این گیاه ناشی از متابولیت‌های موجود در کلاله‌های گل است. به علت وضعیت کروموزومی تریپلویید، گل‌های زعفران قادر به تولید بذر نیستند (Gresta et al., 2009). با وجود این که زعفران در کشورهای مختلف دنیا کشت می‌شود اما تولید عمده آن متعلق به ایران است به‌گونه‌ای که با تولید بیش از ۲۰۰ تن زعفران، ۹۰ درصد سطح زیر کشت و ۹۳/۷ درصد تولید جهانی را به خود اختصاص داده است. بر این اساس، ایران بزرگ‌ترین تولیدکننده زعفران از نظر کمی و کیفی در جهان است ( Koochakzadeh &

۱- استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
۳- دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران.
(*- نویسنده مسئول: shokrpour@ut.ac.ir)

Karbasi, 2015). حدود ۱۰ درصد زعفران تولیدی در جهان نیز توسط سایر کشورها از جمله هند، یونان، اسپانیا، مراکش، ایتالیا (Ghorbani, 2006) و اخیراً در افغانستان صورت می‌گیرد. به عنوان یک گیاه باستانی، زعفران از خواص دارویی متعددی از قبیل مقوی قلب، مسکن، محرک، ضد سرطان، ضد جهش، آنتی‌اکسیدان و اثرات سمی برای سلول‌ها برخوردار است (Nair et al., 1991; Abdullaev, 2004; Loscutov et al., 2000; Fatehi et al., 2003; Tamaddonfard & Hamzeh-Gooshchi, 2010; Mousavi et al., 2001). با وجود این، بیشترین شهرت زعفران به واسطه کاربردهای آن به عنوان یک ادویه ارزشمند در فرآورده‌های غذایی مختلف مانند نوشیدنی‌ها، شیرینی‌ها و محصولات لبنی است. کلاله این گیاه حاوی استرهای مشتق از گلیکوزید است که مسئول ویژگی‌های عطر (سافرانال)، طعم (پیکروکروسین) و رنگ (کروسین) آن هستند (Siracusa et al., 2013).

فنوتیپ گیاه تحت تأثیر زمینه ژنتیکی و شرایط محیطی است. با توجه به تکثیر رویشی زعفران به واسطه تریپلویید، عقیده بر این است که هیچ‌گونه تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های مختلف زعفران وجود ندارد. ازاین‌رو، تنوع فنوتیپی مشاهده شده برای صفات کمی و کیفی در بین نمونه‌های مختلف تنها به واسطه شرایط محیطی است (Gresta et al., 2008; Rubio-Moraga et al., 2009; Siracusa et al., 2010; Maggi et al., 2011). بر این اساس، فقط یک رقم زعفران منحصر به فرد در سراسر دنیا کشت می‌شود. درحالی که تحقیقات اخیر روی نمونه‌های زعفران مربوط به کشورهای مختلف وجود تفاوت بین آن‌ها را در سطح DNA تائید کرده است (Grilli Caiola et al., 2004; Keify & Beiki, 2012; Siracusa et al., 2013)؛ به عبارت دیگر، امکان بهبود زعفران از طریق گزینش کلون‌های برتر وجود دارد. آقایف و همکاران (Aghayev et al., 2009) برای اولین بار، انجام گزینش کلونی در زعفران را گزارش کردند که منجر به دستیابی به بنه‌های با عملکرد بالا و گلدهی بیشتر گردید.

پیش از شروع و طراحی یک برنامه اصلاحی در مورد زعفران، کسب آگاهی در مورد تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم مربوطه ضروری است. ازاین‌رو، برخی از مطالعات در راستای ارزیابی تنوع مورفولوژی، بیوشیمیایی و مولکولی این گیاه صورت گرفته است، اما نتایج این مطالعات بیانگر تناقضات زیادی در زمینه ماهیت و ساختار تنوع ژنتیکی توده‌های زعفران بوده است به‌طوری که تک شکل و یا چندشکل بودن ژرم‌پلاسم زعفران مورد چالش قرار گرفته است (Grilli Ciola et al., 2001; Pardo et al., 2004; Zubor et al., 2004; Soheilivand et al., 2007; Gresta et al., 2008; Rubio-Moraga et al., 2009; Baghalian et al., 2010; Fernandez et al., 2011). با توجه به غنای ذخایر ژنتیکی و قدمت کشت این گیاه در ایران، این مطالعه به منظور بررسی تنوع ژنتیکی برخی از نمونه‌های زعفران به عنوان نماینده ژرم‌پلاسم زعفران کشور صورت گرفت. همچنین، از آنجایی که برآوردهای تنوع ژنتیکی کاملاً مرتبط با مواد گیاهی مورد مطالعه است، تعیین میزان تنوع ژنتیکی موجود در بین نمونه‌های زعفران مورد مطالعه اجتناب ناپذیر است. از طرف دیگر، نگهداری ژرم پلاسم زعفران و محافظت از فرسایش ژنتیکی از طریق جمع‌آوری و استقرار نمونه‌های بومی زعفران امکان‌پذیر خواهد بود. همچنین، توصیف بانک ژن از نظر صرفه‌جویی در هزینه‌های نگهداری و افزایش کارایی گزینش در برنامه‌های اصلاحی نقش به سزایی دارد.

با توجه به پیشینه طولانی کشت زعفران در ایران و وجود تنوع جغرافیایی و اقلیمی در نواحی مورد کشت آن، ارزیابی ژرم پلاسم زعفران ایران همواره مورد توجه است. ازاین‌رو، هدف از این مطالعه، بررسی چندشکلی ژنتیکی بین نمونه‌های مختلف زعفران از طریق نشانگرهای مولکولی می‌باشد که تا حد زیادی معرف ژرم پلاسم زعفران کشور است.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

در این مطالعه ۶۵ نمونه جمع‌آوری شده از مزارع مختلف زعفران از استان‌های خراسان رضوی و جنوبی شامل تربت-حیدریه (۱۲ نمونه)، گناباد (۱۵ نمونه)، مه‌ولات (۵ نمونه)، فردوس (۱۶ نمونه) و قائنات (۱۶ نمونه) مورد بررسی قرار گرفت. بنه‌های جمع‌آوری شده در ایستگاه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی و فضای سبز پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در محمد شهر کرج کشت شدند.

### تجزیه مولکولی

به منظور استخراج DNA، نمونه‌برداری از ۱۰ بوته از هر نمونه انجام شد. استخراج DNA ژنومی از ۰/۵ گرم برگ تازه به روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta et al., 1983) صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از طریق الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و روش اسپکتروفتومتری تائید شد. با توجه به تولیدمثل رویشی زعفران توسط بنه‌ها، فرض بر این است که بنه‌های مربوط به هر محل یا مزرعه از نظر ژنتیکی مشابه هستند. ازاین‌رو، DNA استخراج شده از ۱۰ فرد از هر نمونه از طریق ترکیب مقادیر یکسان DNA با غلظت مشابه مخلوط و نمونه‌های بالک به دست آمد.

در تجزیه RAPD، ۴۵ آغازگر ده نوکلئوتیدی تصادفی (از کمپانیOperon & TIB-MOLBOIL Co., Germany) آزمون شد. واکنش PCR با حجم ۱۵ میکرولیتر حاوی بافر PCR با غلظت یک برابر، کلرید منیزیم ۱/۵ mM، مخلوط نوکلئوتیدی ۰/۲ mM، آغازگر ۰/۵µM، تک پلیمراز ۱U (سیناژن، ایران) و DNA ژنومی ۲۰ نانوگرم بود. واکنش تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ( iCycler, BioRad Co., USA) برنامه‌ریزی و اجرا شد. مراحل واکنش تکثیر شامل مرحله اول ۴ دقیقه در ۹۴ درجه، سپس ۳۵ چرخه متوالی به صورت یک دقیقه در ۹۴ درجه، یک دقیقه در ۳۷ درجه و دو دقیقه در ۷۲ درجه و در مرحله پایانی، بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه بود. در تجزیه ISSR، ۲ آغازگر (سیناژن، ایران) مورد آزمون قرار گرفت. واکنش‌های تکثیر در حجم ۱۵ میکرولیتر و مشابه تجزیه RAPD انجام شد. مراحل واکنش تکثیر در این تجزیه شامل مرحله اول ۴ دقیقه در ۹۴ درجه، سپس ۳۵ چرخه متوالی به صورت ۴۵ ثانیه در ۹۴ درجه، یک دقیقه و ۳ ثانیه در دمای اتصال آغازگر مربوطه و دو دقیقه در ۷۲ درجه و در مرحله پایانی، بسط نهایی به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه بود. محصول تکثیر در هر یک از روش‌های فوق، از طریق الکترفورز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد تفکیک و آشکارسازی قطعات تکثیری توسط اتیدیوم بروماید در دستگاه Gel Doc (UVP, Bio Doc Co., USA) انجام شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

نوارهای نشانگری چندشکل حاصل از تجزیه RAPD و ISSR به صورت صفر (عدم مشاهده نوار) و یک (مشاهده نوار) رتبه دهی شدند. سپس ماتریس داده‌های مولکولی توسط نرم‌افزارهای SPSS v.16، NTSYS pc 2.02 و POPGENE v. 1.31 مورد تجزیه قرار گرفت. تعیین میزان تنوع مولکولی موجود در بین نمونه‌ها، از طریق شاخص‌های تنوع و گروه‌بندی مولکولی نمونه‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای صورت گرفت. همچنین کارایی آغازگرها با بررسی شاخص‌های تنوع شامل شاخص نشانگر، شاخص شانون و همچنین میزان تنوع و تنوع نااریب (Peakall & Smouse, 2006) مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج و بحث

از میان ۴۵ آغازگر RAPD و ۲۰ آغازگر ISSR مورد مطالعه، به ترتیب ۹ و ۱۳ آغازگر با الگوی نواربندی مناسب و

چند شکل برای توصیف مولکولی نمونه‌های زعفران مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). این آغازگرها در مجموع ۱۶۵ نوار چند شکل تولید نمودند. بیشترین تعداد نوار چند شکل در نشانگرهای ISSR و RAPD به ترتیب مربوط به آغازگرهای ISCS1 (۱۳ نوار) و BB8 (۸ نوار) و کمترین تعداد نوار چندشکل نیز به ترتیب در آغازگرهای ISCS32 (۷ نوار)، BB7 و BD13 (۱ نوار) مشاهده شد. بر اساس مقادیر شاخص‌های کارایی آغازگرهای مورد بررسی شامل فراوانی نوار، شاخص نشانگری، شاخص‌های تنوع و شاخص شانون، آغازگرهای ISCS32 و ISCS64 در نشانگر ISSR و آغازگرهای BC1 و BE2 در نشانگر RAPD دارای بیشترین کارایی و تأثیر در توصیف تنوع مولکولی نمونه‌های زعفران مورد مطالعه بودند؛ اما به‌طورکلی مقادیر بیشتر شاخص‌های مذکور در آغازگرهای ISSR در مقایسه با آغازگرهای RAPD حاکی از کارایی بیشتر نشانگرهای ISSR در مطالعه تنوع مولکولی زعفران می‌باشد. کیفی (Keify & Beiki, 2012) بیست و شش آغازگر RAPD و سی آغازگر SRAP را برای ارزیابی تنوع مولکولی در شش نمونه زعفران (*C .sativus*) به کار برد و چندشکلی زیادی از نظر هر دو نشانگر RAPD (۵۶ درصد) و SRAP (۴۳ درصد) مشاهده نمود. همچنین در مطالعه ایزدپناه (Izadpanah et al., 2015) از ۱۰۰ آغازگر RAPD به کار برده شده، ۱۷ آغازگر تکثیر با کیفیت و وضوح مناسب نشان داده و ۱۰۱ نشانگر چندشکل تولید کردند.

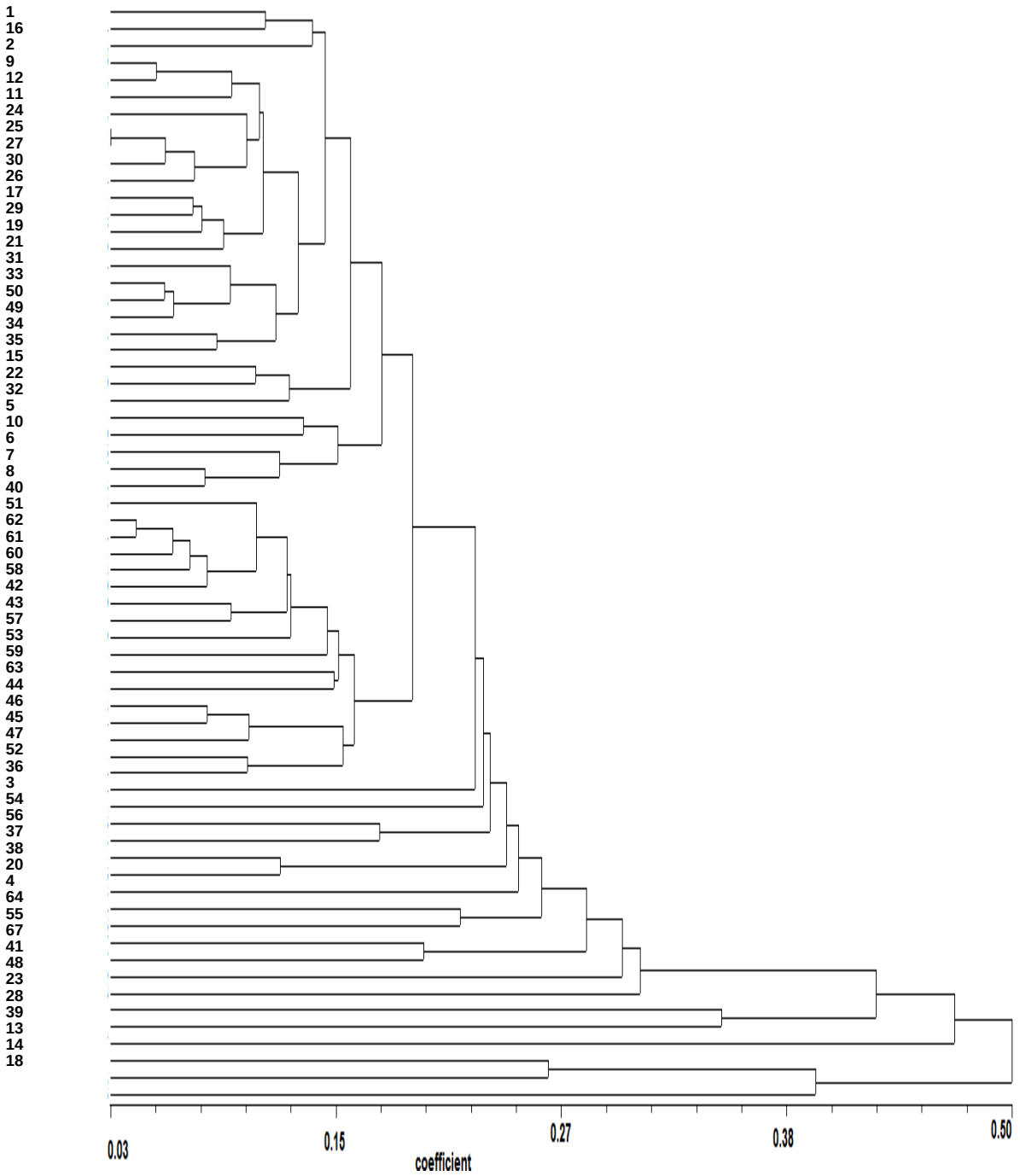
براساس دندروگرام به دست آمده از ماتریس فاصله نی

**جدول ۱- نام، توالی و شاخص‌های تنوع آغازگرهای ISSR و RAPD در نمونه‌های زعفران مورد مطالعه**

**Table 1- Names, sequences and diversity indices of RAPD and ISSR primers in the studied saffron accessions**

| نوع نشانگر Marker kind | آغازگر Primer | توالی Sequence 5'-3' | دمای اتصال Annealing temp. | فراوانی نوار Band freq. | شاخص شانون Shannon index | شاخص تنوع نااریب Unbiased diversity index | شاخص نشانگر Marker index | شاخص تنوع Diversity index | تعداد نوار چند شکل No. of polymorph bands |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ISSR | ISCS7 | $(TC)_9$ C | 57.6 | 0.78 | 0.36 | 0.28 | 0.18 | 0.24 | 10 |
| | ISCS1 | $(AC)_8$ C | 54.6 | 0.40 | 0.32 | 0.24 | 0.84 | 0.21 | 13 |
| | ISCS12 | $(TTG)_6$ C | 51.1 | 0.84 | 0.13 | 0.90 | 0.71 | 0.85 | 9 |
| | ISCS17 | DBDB$(CAC)_5$ | 57.6 | 0.88 | 0.22 | 0.16 | 0.12 | 0.14 | 8 |
| | ISCS18 | DBDB$(CCA)_5$ | 57.6 | 0.76 | 0.43 | 0.31 | 0.22 | 0.29 | 8 |
| | 1SCS30 | $(AC)_8$YT | 52.7 | 0.83 | 0.37 | 0.27 | 0.19 | 0.24 | 11 |
| | ISCS32 | $(AC)_9$YG | 55 | 0.50 | 0.53 | 0.40 | 0.18 | 0.36 | 7 |
| | ISCS47 | $(CA)_8$RG | 55 | 0.72 | 0.41 | 0.30 | 0.19 | 0.27 | 9 |
| | ISCS57 | $(GA)_8$YG | 55 | 0.70 | 0.45 | 0.33 | 0.21 | 0.30 | 9 |
| | ISCS64 | $(GA)_8$C | 54.6 | 0.73 | 0.48 | 0.35 | 0.22 | 0.31 | 11 |
| | ISCS65 | $(GA)_8$A | 52.2 | 0.82 | 0.32 | 0.23 | 0.17 | 0.21 | 9 |
| | ISCS77 | $(AC)_8$T | 52.2 | 0.67 | 0.44 | 0.33 | 0.20 | 0.30 | 9 |
| | ISCS87 | $(AG)_7$YA | 52.7 | 0.45 | 0.29 | 0.22 | 0.90 | 0.20 | 9 |
| RAPD | RAPD2 | TGCCGAGCTG | 37 | 0.91 | 0.23 | 0.15 | 0.12 | 0.14 | 6 |
| | RAPD13 | CAGCAVCCAC | 37 | 0.90 | 0.24 | 0.16 | 0.13 | 0.15 | 1 |
| | RAPD27 | GCGACCAAG | 37 | 0.79 | 0.32 | 0.23 | 0.16 | 0.21 | 4 |
| | BB7 | GAAGGCTGGG | 37 | 0.88 | 0.27 | 0.19 | 0.14 | 0.17 | 1 |
| | BB8 | CCACAGCCGA | 37 | 0.80 | 0.37 | 0.27 | 0.19 | 0.24 | 8 |
| | BC1 | CCAGGTGTAG | 37 | 0.62 | 0.52 | 0.40 | 0.22 | 0.36 | 7 |
| | BC16 | CTGGTGCTCA | 37 | 0.95 | 0.13 | 0.86 | 0.66 | 0.70 | 6 |
| | BD19 | GGTTCCTCTC | 37 | 0.83 | 0.27 | 0.20 | 0.14 | 0.18 | 4 |
| | BE2 | ACGCCTGTAG | 37 | 0.70 | 0.51 | 0.39 | 0.24 | 0.35 | 6 |

(Nei, 1972) به روش یو.پی.جی.ام.آ نمونه‌های مورد بررسی به چهار گروه متمایز تقسیم شدند (شکل ۱).




**شکل ۱- گروه‌بندی نمونه‌های مختلف زعفران با استفاده از داده‌های مولکولی و به روش یو.پی.جی.ام.آ**

(شماره های ۱ تا ۱۲ به ترتیب تربت ۱ تا ۱۲، ۱۳ تا ۲۷ به ترتیب گناباد ۱ تا ۱۵، ۲۸ تا ۳۲ به ترتیب مه‌ولات ۱ تا۵، ۳۳ تا۴۸ به ترتیب قائن ۱ تا ۱۶ و ۴۹ تا ۶۵ به ترتیب فردوس ۱ تا۱۷)

**Figure 1- UPGMA clustering the different saffron accessions using molecular data.**
(numbers 1-12: torbat ; 13-27:gonabad ; 28-32: mahvelat ; 33-48:Ghaen ; 49-65:ferdows).

در گروه اول نمونه‌های گناباد ۲، ۶ و ۱ قرار گرفتند. نمونه قائنات ۷ به تنهایی در یک گروه مجزا تفکیک شد. در گروه سوم نمونه‌های مه‌ولات ۱ و گناباد ۱۱ و سایر نمونه‌ها در گروه چهارم طبقه‌بندی شدند. به‌طورکلی نحوه گروه‌بندی نمونه‌های زعفران بر اساس داده‌های مولکولی حاکی از تمایز ژنتیکی بارز آن‌ها بود. از طرف دیگر، این گروه‌بندی تطابق اندکی با نواحی جغرافیایی محل کشت و جمع‌آوری نمونه‌های مورد مطالعه داشت. تفاوت موقعیت‌های ژنومی نشانگرهای مولکولی مورد بررسی و مکان‌های ژنتیکی کنترل کننده خصوصیات متأثر از عوامل محیطی می‌تواند یکی از دلایل این امر باشد. همچنین، تبادل بنه‌های زعفران به عنوان ماده تکثیری این گیاه در بین زارعین مناطق مختلف کشت در خراسان منجر به عدم تطابق کامل گروه‌بندی مولکولی و محیطی نمونه‌های زعفران می‌گردد.

به منظور بررسی میزان تنوع مولکولی در مناطق مختلف کشت زعفران، کلیه نمونه‌های زعفران بر اساس مناطق کشت، گروه‌بندی شدند. میانگین چندشکلی در کلیه نمونه‌های زعفران ۶۹/۴۵ درصد بود. بیشترین چندشکلی در نمونه‌های مربوط به منطقه قائنات (۸۳/۰۳ درصد) و کمترین در مه ولات (۵۲/۷۳ درصد) به دست آمد.

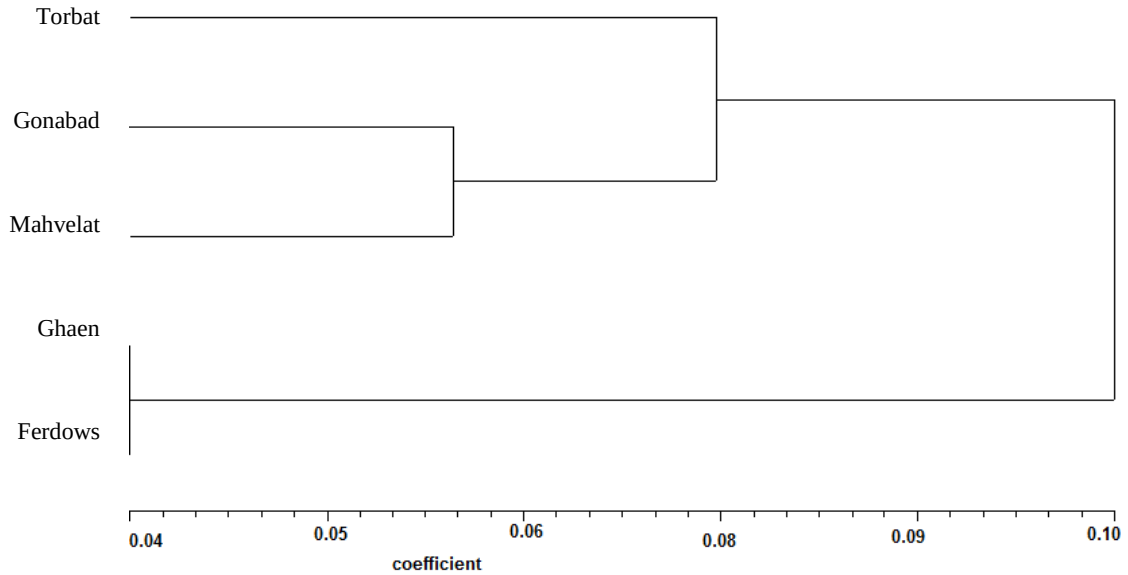
ماتریس فاصله ژنتیکی مناطق کشت زعفران بر اساس معیار فاصله نی (Nei, 1972) در جدول ۲ آمده است. میزان تشابه در بین مناطق مورد بررسی از ۰/۸۹ تا ۰/۹۶ متغیر بود. بیشترین فاصله ژنتیکی بین مناطق فردوس و تربت‌حیدریه (۰/۱۱۷) و کمترین فاصله بین فردوس و قائنات (۰/۰۴۱) بود.

**جدول ۲- میزان فاصله (قسمت بالا و چپ) و تشابه (قسمت پایین و راست) ژنتیکی مناطق کشت زعفران با استفاده از فاصله ژنتیکی نی (Nei, 1972)**

**Table 2- Nei's genetic distances (up and left) and similarities (down and right) of saffron cultivation areas**

| نمونه accession | فردوس Ferdows | قائنات Ghaenat | مه‌ولات Mahvelat | گناباد Gonabad | تربت‌حیدریه Torabt Heidarieh |
|---|---|---|---|---|---|
| تربت‌حیدریه Torbat heidarieh | 0.117 | 0.091 | 0.089 | 0.064 | - |
| گناباد Gonabad | 0.093 | 0.088 | 0.061 | - | 0.93 |
| مه ولات Mahvelat | 0.109 | 0.105 | - | 0.94 | 0.91 |
| قائنات Ghaenat | 0.041 | - | 0.90 | 0.91 | 0.91 |
| فردوس Ferdows | - | 0.96 | 0.89 | 0.91 | 0.89 |

دندروگرام حاصل از گروه‌بندی مناطق کشت بر اساس معیار فاصله نی و روش یو.پی.جی.ام.آ در شکل ۲ آمده است. دو منطقه قائنات و فردوس در یک گروه متمایز قرار گرفتند. منطقه تربت‌حیدریه از مناطق مه‌ولات و گناباد تفکیک و در خوشه جداگانه‌ای قرار گرفت. این گروه‌بندی برخلاف گروه‌بندی نمونه‌های زعفران (بدون طبقه‌بندی قبلی بر اساس نواحی کشت) تا حد زیادی با فواصل جغرافیایی محل کشت آن‌ها تطابق داشت؛ به عبارت دیگر، استفاده از اطلاعات مولکولی کلیه نمونه‌های زعفران موجود در هر منطقه به عنوان نماینده منطقه مورد نظر در مقایسه با کاربرد داده‌های هر نمونه به‌طور مجزا، گروه‌بندی بهتری ارائه نمود که گویای تفاوت ژنتیکی مناطق و تأثیر عوامل محیطی است.




**شکل ۲- گروه‌بندی مناطق کشت زعفران (تربت‌حیدریه، گناباد، مه ولات، قائنات و فردوس) با استفاده از داده‌های مولکولی**

**Figure 2- Grouping the saffron cultivation areas (Torbat heidarieh, Gonabad, Mahvelat, Gaenat and Ferdows) using by molecular data.**

به‌طورکلی ارزیابی ژنتیکی گونه‌های گیاهی از مهم‌ترین اجزای برنامه‌های اصلاحی گیاهان است. افزون بر این، برآورد میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از مؤلفه‌های اساسی در تعیین نحوه نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی است. نتایج این تحقیق بیانگر آن است که با وجود ماهیت تکثیر غیرجنسی زعفران، تنوع ژنتیکی زیادی در میان نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده شد.

نشانگرهای مولکولی مورد استفاده در این مطالعه، به خوبی قادر به تفکیک نمونه‌های مختلف بودند. در طول دهه‌ی گذشته، نشانگرهای مولکولی مختلف برای بررسی تفاوت در بین نمونه-های مختلف زعفران به کار رفته است. گریلی کایولا و همکاران (Grilli Caiola et al., 2004) جهت بررسی میزان تنوع ژنتیکی ۲۴ گونه وحشی و ۶ گونه زراعی زعفران جمع‌آوری شده از ۷ منطقه از نشانگرهای RAPD استفاده کردند. در گونه‌های زراعی ۲۳۳ نوار به دست آمد که ۱۴ نوار آن چندشکلی نشان داد. در گونه‌های وحشی از ۲۲۷ نوار تکثیر شده، ۵۳ نوار چندشکل به دست آمد.

ایزدپناه (Izadpanah et al., 2015) بیان کرد که در میان ۳۶ نمونه زعفران زراعی جمع‌آوری شده از دو استان خراسان رضوی و جنوبی از نظر صفات مورفولوژی و مولکولی تفاوت‌های زیادی وجود دارد. همچنین با بررسی دندروگرام های به دست آمده از دو بخش مشاهده شد که نمونه‌ها ارتباطی با مناطق جغرافیایی محل کشت آن‌ها نداشتند.

کیفی و بیکی (Keifi & Beiki, 2011) از ۲۶ آغازگر RAPD برای مطالعه تنوع مولکولی زعفران استفاده کردند. نتایج نشان داد که کلون‌های زراعی رایج در ایران همه از یک کلون منشأ نگرفته‌اند بلکه فنوتیپ های متفاوت بوده و دارای تنوع ژنتیکی می‌باشند. بنابراین تنوع زیادی در جنس زعفران در ایران وجود دارد. بررسی تک‌شکل بودن کلون‌های مختلف زعفران با استفاده از نشانگرهای RAPD، ISSR و SSR صورت گرفت (Rubio-Moraga et al., 2009). بررسی ۴۳ نمونه زعفران زراعی از ۱۱ کشور مختلف نشان داد که هیچ نوار چندشکلی در سه روش نشانگری مذکور مشاهده نشد؛ بنابراین

پیشنهاد شد که *Crocus sativus* یک گونه‌ی تک‌شکل است. به‌طورکلی با توجه به گزارش‌های متناقض در زمینه وجود و عدم وجود تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم زعفران (Gresta et al., 2008; Rubio-Moraga et al., 2009; Siracusa et al., 2010; Maggi et al., 2011; Keifi & Beiki, 2011)، این مطالعه وجود تنوع ژنتیکی در نمونه‌های مختلف زعفران ایران را مورد تأکید قرار داد.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدین‌وسیله مراتب تشکر و قدردانی خویش را از مساعدت‌های آقایان مهندس مهرداد میرحسینی، مهندس مسعود وجدانی و مهندس فریدونی اعلام می‌دارند.

## منابع

Abdullaev, F.I. 2004. Antitumor effect of saffron (*Crocus sativus* L.). Overview and perspectives. Acta Horticulturae 650: 491-499.

Aghayev, Y.M., Fernandez, J., and Zarifi, E. 2009. Clonal selection of saffron (*Crocus sativus* L.): the first optimistic experimental results. Euphytica 169 (1): 81-99.

Baghalian, K., Shabani sheshtamand, M., and Jamshidi, A.H. 2010. Genetic variation and heritability of agromorphological and phytochemical traits in Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) population. Industrial Crops and Products 31: 401-406.

Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation version II. the journal of Plant Molecular Biology 1: 19-21.

Fatehi, M., Rashidabady, T., and Fatehi-Hassanabad, Z. 2003. Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on response induced by electrical field stimulation in rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. Journal of Ethnopharmacology 84 (2-3): 199-203.

Fernandez, J.A., Santana, O., Guardiola, J.L., Molina, R.V., Heslop-harison, P., Borbely, G., Branca, F., Argenyto, S. Maloupa, E., Talou, T., Thiercelin, J.M., Gasimov, K., Vurdu, H., Roldán, M., Santaella, M., Sanchí, E., García-luis, A., Suranyi, G., Molnár, A., Sramko, G., Gulyas, G., Balaz, E., Horvat, L., Rudríguez, O., Snchez-vioque, M.R., Escolano, M.Á., Krigas, N., Pastor, T., Renau-morata, B., Raynaud, IBADLI, O., Polissiou, M., Tsimidou, Z.M., Tsaftaris, A., Sharaf-Eldin, M., Medina, J., Constantinidis, T., Karamplianis, T., and de Los Mozos Pascula, M. 2011. The world saffron and crocus collection: strategies for establishment, management, characterisation and utilisation. Genetic Resources and Crop Evolution 58: 125-137.

Ghorbani, R. 2006. The economics of saffron in Iran proceedings of the 2th International Symposium on Saffron Biology and Technology Mashhad, Iran, 28-30 October 2006, p. 14

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: 320-324.

Gresta, F., Lombardo, G.M., Siracusa, L., and Ruberto, G. 2008. Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. Agronomy for Sustainable Development 28 (1): 95-112.

Grilli Caiola, M., Caputo, P., and Zanier, R. 2004. RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. The Journal of Plant Biology 48: 375-380.

Grilli Caiola, M., Di Somma, D., and Lauretti, P. 2001. Comparative study of pollen and pistil of *Crocus sativus* L. (Iridaceae) and its allied species. Annals of Botany 1 (2): 73-82.

Izadpanah, F., Kalantari, S., Hassani, ME., Naghavi, M.R., and Shokrpour, M. 2015. Molecular and morphological variation in some iranian saffron (*Crocus sativus* L.) Accessions. Genetika 47 (2): 711-722.

Keify, 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.

Koochakzadeh, S., and Karbasi, A. 2015. Study of the effective factors on the commerce of Iranian Saffron. Journal of Saffron agronomy and Technology 3 (3): 217-227. (In Persian with English Summary).

Loscutov, A.V., Beninger, C.W. Hosfield, G.L., and Sink, K.C. 2000. Development of an improved procedure for extraction and quantitation of safranal in stigmas of *Crocus sativus* L. using high performance liquified chromotography. Food Chemistry 69: 87-95.

Maggi, L., Sánchez, A.M., Carmona, M., Kanakis, C.D., Anastasaki, E., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G., and Alonso, G. 2011. Rapid determination of safranal in the quality control of saffron spice (*Crocus sativus* L.). Food Chemistry 127: 369-373.

Mousavi, S.H., Tayarami, N.Z., and Parsaee, H. 2001. Protective effect of saffron extract and crocin on reactive oxygen speciesmediated high glucose-induced toxicity in PC12 cells. Cellular and Molecular Neurobiology 30: 185-191.

Nair, S.C., Pannikar, B., and Panikkar, K.R. 1991. Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). Cancer Letters 57 (2): 109-114.

Pardo, J., Fernández, J.A., and Gómez, L.G. 2004. Development of molecular markers for origin determination in saffron. Acta Horticulturae 650: 95-98.

Peakall, R., and Smouse, P.E. 2006. Genalex 6. Genetic analysis in Excel. Population genetic for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 228-295.

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

Rubio Moraga, A., Traper-Mozos, A., Gomez-Gomez, L., and Ahrazen, O. 2010. Intersimple sequence repeat markers for molecular characterization of *Crocus cartwrightianus* cv. albus. Industrial Crops and Products 32: 147-151.

Siracusa, L., Gresta, F., Avola, G., Albertini, E., Raggi, L., Marconi, G., Lombardo, G.M., and Ruberto, G. 2013. Agronomic, chemical and genetic variability of saffron (*Crocus sativus* L.) of different origin by LC-UV–vis-DAD and AFLP analyses. Genetic Resources and Crop Evolution 60 (2): 711-721.

Siracusa, L., Gresta, F., Avola, G., Lombardo, G.M., and Ruberto, G. 2010. Influence of environmental factors and corms provenience on yield and apocarotenoid profiles of saffron (*Crocus sativus* L.). Journal of Food Composition and Analysis 23: 394-400.

Soheilivand, S., Agayev, Y.M., Shakib, A.M., and Fathi, M. 2007. Comparison of diversity in flowering rate of two Saffron (*Crocus sativus* L.) popultion of Iran. Acta Horticulturae 650: 317-320.

Tamaddonfard, E., and Hamzeh-Gooshchi, N. 2010. Effect of crocin on the morphine-induced antinociception in the formalin test in rats. Phytotherapy Research 24: 410-413.

Zubor, A.A., Suranyi, G., Gyori, Z., Borbely, G., and Prokisch, J. 2004. Molecular biological approach of the systematics of *Crocus sativus* L. and its allies. In F. Abdullaev (ed). First international symposium on saffron biology and biotechnology. pp, 85-93.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. The American Naturalist 106: 283-292.

# Study of genetic variation in some Iranian saffron accessions using molecular markers of RAPD and ISSR

*Majid Shokrpour[1]*, Zeinab Abedi[2], Siamak Kalantari[3] and Seyed Alireza Salami[1]*

**Received:** 3 December, 2015 **Accepted:** 25 May, 2016

**DOI:** 10.22048/jsat.2016.38672

## Abstract

Saffron (*Crocus sativus* L.) is one of the most valuable medicinal and spice herbs in the world. In spite of the ancient cultivation history in Iran, there are limited breeding studies on the plant due to its vegetative reproduction. In order to evaluation genetic diversity of Iranian saffron germplasm, sixty-five different saffron accessions from the main cultivation areas in Khorasan including Torbat heidarieh, Gonabad, Mahvelat, Ghaenat and Ferdows were collected and were studied by molecular markers. The used RAPD and ISSR primers produced 43 and 122 polymorphic markers loci, respectively, and totally 165 markers with average of 7.5 markers by each primer, totally. Diversity index ranged from 0.36 to 0.7 with average of 0.23. Also, marker index with the average of 0.16 varied in the range of 0.2 to 0.7. The accessions from Ghaenat and Mahvelat had the maximum (83.03%) and the minimum (52.73%) polymorphism, respectively. Grouping the studied saffron accessions using cluster analysis displayed four distinct groups which had little correspondence to their collection areas, while clustering for the main cultivation areas had relatively good correspondence to their geographical distances. So, it is expected to have nearly approaching improvements of qualitative and quantitative yields via the selection of superior clones of saffron.

**Keywords:** Saffron, Molecular variation, Germplasm, RAPD, ISSR.

1- Assistant professor, University College of Agriculture and Natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2- Former MSc. Student, University College of Agriculture and Natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3- Associate professor, University College of Agriculture and Natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(*Corresponding author Email: shokrpour@ut.ac.ir)