Saffron Agronomy & Technology
Vol. 4, No. 4, Winter 2016, P. 267-277
DOI: 10.22048/jsat.2016.39230

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵ ص. ۲۷۷-۲۶۷

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی نمونه‌های زعفران ایران با استفاده از مارکر RAPD

فرشته بابایی[۱]، زهرا طهماسبی[۲*]، حسن فیضی[۳] و آرش فاضلی[۲]

تاریخ دریافت: ۱٤ بهمن ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: ۲۹ اردیبهشت ۱۳۹۵

چکیده

ایران به عنوان یکی از مراکز مهم پراکنش گونه‌های دارویی از جمله گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) است. وجود یا عدم وجود تنوع ژنتیکی در ارقام بومی و تجاری رایج زعفران کشور همواره یکی از سؤالات مهم محققین این زمینه بوده است. در مطالعه حاضر، نمونه‌های مختلف زعفران از مناطق مختلف ایران شامل ۱۷ نمونه زراعی از استان‌های خراسان شمالی، خراسان رضوی، خراسان جنوبی، لرستان و ایلام، ۸ نمونه وحشی (*C. haussknechtii*) از استان‌های لرستان، کرمانشاه و ایلام و ۱ نمونه وحشی (*C. cancellatuse*) از استان کرمانشاه جمع‌آوری و سپس تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از مارکر مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۸ آغازگر در مجموع ۱۱۳ قطعه چند شکل با میانگین ۱۴/۱۳ قطعه تکثیر نمودند که بیشترین تعداد آلل مربوط به آغازگر Oligo ۳۴۰ بود. درصد چندشکلی نیز ۷۳/۷۷ محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوریتم UPGMA، نمونه‌ها را به ۴ گروه تقسیم نمود. در این گروه‌بندی کمترین فاصله میان جمعیت‌های زعفران جمع‌آوری شده از استان‌های کرمانشاه و ایلام وجود داشت، به عبارت دیگر این دو جمعیت بیشترین شباهت ژنتیکی را با یکدیگر داشتند. بیشترین شباهت بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از صالح آباد و لومار در استان ایلام و کمترین شباهت بین اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از بیستون در استان کرمانشاه و تربت‌جام در استان خراسان رضوی مشاهده شد. در بیشتر موارد نمونه‌های گونه‌های مختلف در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند که می‌توان گفت این جنس از تنوع بالایی برخوردار است. ولی به دلیل اینکه در مواردی نمونه های یک گونه وحشی (*C. haussknechtii*) با گونه زراعی زعفران در یک گروه قرار گرفتند، نتیجه گیری می‌گردد که هنوز وجوه مشترک زیادی در سطح مولکولی بین این گونه‌ها وجود دارد که حکایت از یک پیشینه ژنتیکی مشترک دارد.

کلمات کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، چند شکلی، زعفران، فاصله ژنتیکی.

مقدمه

زعفران(*Crocus sativus* L.) به عنوان گرانترین محصول کشاورزی و دارویی جهان جایگاه ویژه‌ای در بین محصولات صنعتی و صادراتی ایران دارد. طبق اطلاعات موجود، ایران با سطح کشتی بیش از ۴۱ هزار هکتار و تولید سالیانه ۱۵۰ تا ۱۷۰ تن زعفران، اولین و بزرگترین تولیدکننده زعفران می‌باشد که بیش از ۸۵ درصد تولید جهانی را به خود اختصاص داده است (Sajadi, 2006).

با توجه به اهمیت اقتصادی زعفران و همچنین تنوع ژنتیکی گسترده جنس Crocus در ایران ضرورت بررسی این تنوع و

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام
۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام
۳- استادیار گروه تولیدات گیاهی، پژوهشکده زعفران، دانشگاه تربت حیدریه
(*- نویسنده مسئول: ztahmasebi@ut.ac.ir)

مقایسه میزان شباهت‌ها و تفاوت‌های گونه‌های مختلف این جنس با گونه *C. sativus* و همچنین ژنوتیپ‌های مختلف این گونه جهت شناسایی ژنوتیپ‌های برتر امری ضروری است (Kafi, 2002). وجود تنوع ژنتیکی از عوامل مهم موفقیت به‌نژادگران در برنامه‌های اصلاحی در گیاهان زراعی و خویشاوندان وحشی آنها است (Fakhr Tabatabaii et al., 2009; Schaal et al., 1991).

در مورد گیاه ارزشمند زعفران تاکنون مطالعات زیادی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف انجام گرفته است. بیکی و همکاران (Beiki et al., 2010) با هدف بررسی ساختار تنوع ژنتیکی در سطوح مولکولی ۲۴ نمونه وحشی و ۶ نمونه زعفران زراعی را از ۷ کشور مختلف جمع‌آوری کردند و توسط ۲۶ نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد نژادگان‌های زعفران زراعی همگی در یک زیر شاخه قرار داشته و بیشترین شباهت را با *C. haussknechii* نشان می‌دهند. نماینده و همکاران (Namayandeh et al., 2012) ۱۵ نشانگر ریزماهواره را برای ارزیابی روابط ژنتیکی میان گونه‌های مختلف زعفران ایرانی از ۱۰ منطقه جغرافیایی به کار بردند. در این تحقیق بر اساس فاصله ژنتیکی به نظر می رسید ارقام استهبان از ژنوتیپ‌های فردوس منشأ گرفته‌اند و *C. hausskntchii* نزدیک‌ترین گونه‌ی وحشی به گونه‌های زراعی است. عابدی و همکاران (Aabedi et al., 2012) به بررسی تنوع ژنتیکی روی ۵۶ توده جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی و جنوبی، با استفاده از ۱۸ آغازگر RAPD پرداختند. نتایج داده‌ها حاکی از وجود تنوع مولکولی در بین توده‌های مورد بررسی بود. ارول و همکاران (Erol et al., 2014) تنوع ژنتیکی ۲۶ اکوتیپ زعفران را با استفاده از نشانگر AFLP در مناطق مختلف ترکیه بررسی کردند. در این آزمایش نتایج حاصل از تجزیه کلاستر، اکوتیپ‌ها را بر اساس ۳۶۹ باند تکثیر شده در چهار گروه مجزا قرار داد. جاوید و همکاران (Javid et al., 2015) در یکی از جدیدترین مطالعات در زمینه تنوع ژنتیکی گیاه زعفران، ۳۱ اکوتیپ از این گیاه را با استفاده از سه نشانگر SSR، RAPD و ISSR با هدف بررسی تنوع ژنتیکی مورد آزمایش قرار دادند. نشانگرهای RAPD و ISSR تنوع معنی‌داری را بین اکوتیپ‌های زعفران نشان دادند این در حالی بود که نشانگر SSR نتوانست تنوع معنی‌داری را روی کلون‌های مورد مطالعه نشان دهد. در این آزمایش از ۱۲۸ آغازگر RAPD، ۳۱ جفت آغازگر SSR و ۵۵ آغازگر ISSR استفاده شد. جعفری و نجفی زرینی (Jafari & Najafi Zarini, 2012) به منظور بررسی تنوع و روابط ژنتیکی، الگوی پروتئینی ۱۰ ژنوتیپ جنس زعفران شامل ۶ ژنوتیپ وحشی و ۴ ژنوتیپ زراعی را با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای کورم روی ژل پلی آکریل آمید مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان دهنده وجود پتانسیل بالای تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های زعفران مورد مطالعه بود. مشاهده الگوی باندی متفاوت ژنوتیپ‌های زراعی نشان داد که کلون‌های زعفران زراعی رایج در ایران همگی از یک کلون منشأ نگرفته‌اند

برخی شواهد و مستندات تاریخی موجود دلالت بر آن دارد که رویشگاه اولیه زعفران در ایران زمین بوده و ده گونه مختلف از جنس *Crocus* بومی ایران هستند (Mathew, 1982). با توجه به اینکه جد واقعی این گونه زراعی یکی از معماهایی است که هنوز به طور دقیق حل نشده است و نیز از آنجا که ایران یکی از مراکز مهم پراکنش گیاهی (Beikiet al., 2013). به خصوص جنس *Crocus* می‌باشد، انجام مطالعات تکمیلی‌تر برروی این گونه‌ها با استفاده از نشانگرهای اختصاصی به منظور دست یافتن به اطلاعات دقیق‌تر و کامل‌تر ضروری به نظر می‌رسد.

گونه وحشی زعفران (*Crocus haussknechtii*) با نام

گویشی "جو قاسم" که در منابع لغت فارسی با نام "کرکمیسه" یاد شده است، شباهت‌هایی تام و تمام با گیاه زعفران معمولی دارد (Dalby, 2003). گیاه خوراکی زعفران وحشی با نام محلی پی شوک یکی از گیاهان خوراکی و خودرو در استان‌های غربی (کرمانشاه، ایلام، لرستان و همدان) است که در فصل بهار قابل برداشت می‌باشد. با توجه به اهمیت اقتصادی زعفران و همچنین تنوع ژنتیکی گسترده جنس ضرورت بررسی این تنوع و مقایسه میزان شباهت‌ها و تفاوت‌های گونه‌های مختلف این و همچنین *C. sativus* جنس با گونه ژنوتیپ‌های مختلف این گونه احساس می‌شود (Kafi, 2002) و نظر به اینکه در مورد ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های وحشی زعفران بومی ایران در غرب کشور که رویشگاه اولیه زعفران می‌باشد اطلاعات کافی وجود نداشت، به بررسی و مطالعه تنوع نمونه‌های وحشی *C. haussknechtii* و *C. cancellatuse* در غرب کشور و قرابت ژنتیکی آنها با زعفران اهلی از برخی مناطق کشور جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

بنه‌های ۲۶ نمونه زعفران زراعی و خودروی ایران در زمستان و بهار از شرق ایران و رویشگاه‌های مختلف طبیعی در غرب کشور جمع‌آوری و در بخش صالح آباد شهرستان مهران استان ایلام کاشته شد (جدول ۱). سپس در مرحله ۵ تا ۶ برگی (اوایل آذرماه) نمونه‌های برگی جوان جمع‌آوری و در ازت مایع منجمد و تا پیش از استخراج DNA در فریزر ۸۰ - درجه سانتی گراد نگهداری شد.

استخراج DNA

با توجه به دشواری و بازدهی نامناسب استخراج DNA به روش‌های متداول استخراج DNA، از دو روش جهت استخراج DNA ژنومی استفاده شد. تعدادی از نمونه‌های برگی با روش CTAB بر اساس دستورالعمل دویل و همکاران (Doyle & Doyle, 1987) با اندکی تغییرات و تعدادی دیگر با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA ژنومی[1] (Gene Mark) استخراج گردید. سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی و مطلوب تشخیص داده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و الکتروفورز محصولات PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad (در حجم۲۰ میکرولیتر شامل ۷ µL آب مقطر استریل، ۷ µL مسترمیکس، ۱/۲ µL آغازگر و ۲ µL DNAژنومی) انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه در دماهای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۳۸-۳۲ درجه سانتی‌گراد (بسته به آغازگرهای مختلف) به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه که ۱۰ چرخه اول به صورت تاچ داون[2] برنامه‌ریزی شده بود، بدین صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو پنج درجه سانتی-گراد بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و در هر چرخه دور اول با کاهش نیم درجه دما، به دمای اتصال واقعی رسید.

در ۲۵ چرخه بعد دمای اتصال ثابت (بسته به دمای آغازگر متفاوت بود) بود. در آخر واکنش یک مرحله بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. محصول PCRبا استفاده از ژل آگارز ۱/۷۵ درصد در بافر TAE ۱X به مدت ۳/۵ ساعت و با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز و سپس رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید انجام گرفت و در نور UV از ژل عکس‌برداری شد.

1 -Genomic DNA Purification Kit

2 – Touch down

جدول ۱- نام و محل جمع‌آوری نمونه‌های مورد مطالعه در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌های زعفران (*Crocus* Sp.)

Table 1- Name and location of Saffron (*Crocus* sp.) samples using for evaluation of genetic diversity between and within species

شماره نمونه Sample code	گونه Species	محل جمع آوری Location of collection
1	*C. sativus*	خراسان شمالی- شیروان North Khorasan-Shirvan
2	*C. sativus*	خراسان رضوی- تربت جام- اسد آباد Razavi Khorasan -Torbat-e Heydarieh - Asad abad
3	*C. sativus*	خراسان رضوی- قوچان Razavi Khorasan- Ghochan
4	*C. sativus*	خراسان رضوی- کاشمر Razavi Khorasan- Kashmar
5	*C. sativus*	خراسان رضوی- مشهد Razavi Khorasan- Mashhad
6	*C. sativus*	خراسان رضوی- بردسکن Razavi Khorasan- Bardaskan
7	*C. sativus*	خراسان رضوی- بردسکن Razavi Khorasan- Zaveh
8	*C. sativus*	خراسان رضوی- تربت جام Razavi Khorasan- Torbat-e Jam
9	*C. sativus*	خراسان رضوی- مه ولات- شادمهر Razavi Khorasan- Mahvalat-Shadmehr
10	*C. sativus*	خراسان جنوبی- بیرجند South Khorasan- Birjand
11	*C. sativus*	خراسان جنوبی- قائنات South Khorasan- Ganat
12	*C. sativus*	ایلام - ایلام Ilam-Ilam
13	*C. sativus*	ایلام- ایوان Ilam-Evan
14	*C. haussknechtii*	ایلام- ایلام Ilam- Ilam
15	*C. haussknechtii*	ایلام-مهران- صالح آباد Ilam-Mehran- Salehabad
16	*C. haussknechtii*	ایلام- شیروان- لومار Ilam- Sirvan- Lomar
17	*C. haussknechtii*	ایلام- چرداول- زنجره علیا Ilam- Chardavol- Zanger –e Olia
18	*C. haussknechtii*	کرمانشاه- هرسین Kermanshah- Harsin
19	*C. haussknechtii*	لرستان- خرم آباد- تیرباز Lorestan- Khorramabad- Tirbaz
20	*C. haussknechtii*	ایلام- ایوان- شورآباد Ilam –Evan –Shorabeh
21	*C. sativus*	لرستان- خرم آباد- تیرباز Lorestan- Korramabad –Tirbaz
22	*C. sativus*	لرستان- خرم آباد- کوهدشت Lorestan- Khorramabad- Koohdasht
23	*C. sativus*	لرستان- خرم آباد- الشتر Lorestan- Khorramabad – Aleshtar
24	*C. sativus*	لرستان- خرم آباد- کمالوند Lorestan- Khorramabad- Kamalvand
25	*C. cancellatuse*	کرمانشاه- بیستون Kermanshah- Bisotun
26	*C. haussknechtii*	کرمانشاه- اسلام آباد Kermanshah- Eslamabad

آنالیز داده‌ها

امتیازبندی باندها بر مبنای کد صفر(عدم وجود باند) و یک (وجود باند) صورت گرفت. تجزیه کلاستر به روش‌های اتصال مجاور و UPGMA[1] و ماتریس‌های تشابه دایس و جاکارد و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی[2] (PCoA) با استفاده از نرم افزار NTSYSp 2.2 انجام شد. برای تجزیه واریانس مولکولی[3] (AMOVA)، شاخص تثبیت و ضریب شانون از نرم افزار GenAlExاستفاده شد. میزان اطلاعات چند شکل[4] (PIC) برای هر نشانگر با استفاده از نرم افزار Excel و با فرمول زیر محاسبه شد. میزان شاخص نشانگر (MI) نیز با استفاده از حاصل‌ضرب PIC در تعداد آل‌های چند شکل محاسبه گردید.

$$PIC = \sum_{i=1}^{k}[2Pi(1 - Pi)] \quad (۱)$$

که در آن Pi فراوانی نوار i ام و k تعداد آل‌ها می‌باشد.

نتایج و بحث

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ۸ آغازگر RAPD روی DNA ژنومی ۲۶ نمونه از ۶ جمعیت *Crocus* sp. انجام شد. الگوی تکثیر یک نمونه از آغازگرهای RAPD در شکل ۱ مشاهده می‌شود. در مجموع ۱۱۳ باند در کل جمعیت‌ها تکثیر شد که از این تعداد ۸۵ آلل به عبارت دیگر ۷۳/۷۷ درصد آل‌ها به عنوان آلل چند شکل تشخیص داده شد (جدول ۲). بیکی و همکاران (Beiki et al., 2010) در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۴ نوع وحشی و ۶ نوع زعفران زراعی توسط ۲۶ نشانگر RAPD درصد پلی مورفیسم را ۸۳/۵ درصد محاسبه کردند.

میانگین آل‌های تولید شده ۱۴/۱۳ برای هر آغازگر بود. بیشترین تعداد آلل مربوط به آغازگر Oligo ۳۴۰ (۱۹ آلل) و کم‌ترین تعداد نیز مربوط به آغازگر Oligo ۱۲ (۱۰ آلل) بود (جدول ۲). بیکی و همکاران (Beiki et al., 2013) با استفاده از ۱۴ آغازگر ISSR ۲۰۸ (متوسط ۱۴ قطعه به ازای هر آغازگر) قطعه تشخیص دادند.

بیشترین مقدار PIC مربوط به آغازگر Oligo ۳۴۵ (۰/۲۶) و کم‌ترین میزان در آغازگر Oligo ۱۷ (۰/۱۵) مشاهده گردید. میانگین PIC برای آغازگرها، ۰/۲۰ بود که با نتایج نجفی و همکاران (Najafy et al., 2013) با میانگین مقادیر PIC ۰/۲۲ در ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام گندم توسط نشانگر ISSR مطابقت دارد. بیکی و همکاران (Beiki et al., 2010) در بررسی تنوع ژنتیکی نوع زراعی و وحشی زعفران توسط نشانگر RAPD، مقدار PIC را در دامنه ۰/۷۲-۰/۲۴ برآورد کردند.

میانگین شاخص نشانگر MI ۲/۱۷ محاسبه شد که بیشترین مقادیر آن متعلق به آغازگرهای Oligo ۳۴۵ (۴/۱۶) و Oligo ۳۴۰ (۳/۷۴) که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگرها در مقایسه با سایر آغازگرهاست و کم‌ترین مقدار متعلق به آغازگر Oligo ۴۲ (۰/۹۶) بود.

به منظور پیدا کردن بهترین روش خوشه‌بندی ضریب کوفنتیک بر اساس الگوریتم‌های UPGMA و NJ[5] و دو ضریب تشابه دایس و جاکارد محاسبه شد که بر این اساس، الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با ضریب کوفنتیک ۰/۸۶۶ بهترین روش خوشه‌بندی می‌باشد.

بر اساس ماتریس تشابه جاکارد بیشترین شباهت بین نمونه-های جمع‌آوری شده از صالح آباد و لومار در استان ایلام (۰/۹۵) و کمترین شباهت نیز بین اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از بیستون در استان کرمانشاه و تربت جام در استان خراسان رضوی (۰/۵۲) مشاهده شد (لازم به ذکر است که با توجه بزرگ بودن جدول

1 – Unweight Pair Group Mathematical Average
2– Principal Component Analysis
3– Analysis of molecular variance
4 – polymorphic information content

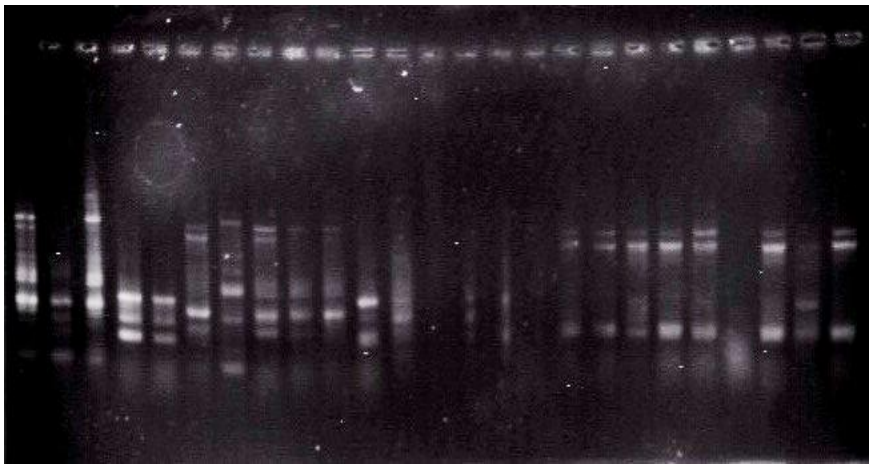
1– Neighbor Joining

مربوط به ضرایب تشابه دو به دو کلیه نمونه‌ها از آوردن این جدول خودداری شد).

جدول ۲- نتایج حاصل از تکثیر قطعات و ایجاد چندشکلی با اعمال آغازگرهای RAPD مورد استفاده

Table 2- The results of amplification and polymorphism created by applying the RAPD primers

نام پرایمر Primer name	تعداد آلل Number of allele	درصد چندشکلی Polymorphism percentage (POL)	تعداد آلل چند شکل Number of polymorphism allele	اندازه قطعه تکثیریافته Size of amplified fragments (bp)
Oligo 345	18	88.9	16	250-3000
Oligo 340	19	89.47	17	300-2400
Oligo 349	15	66.66	10	300-2400
Oligo 211	11	81.81	9	240-1200
Oligo 33	11	72.72	8	250-1600
Oligo 12	10	70	7	150-1300
Oligo 42	12	50	6	150-1400
میانگین Mean	14.13	73.77	10.63	



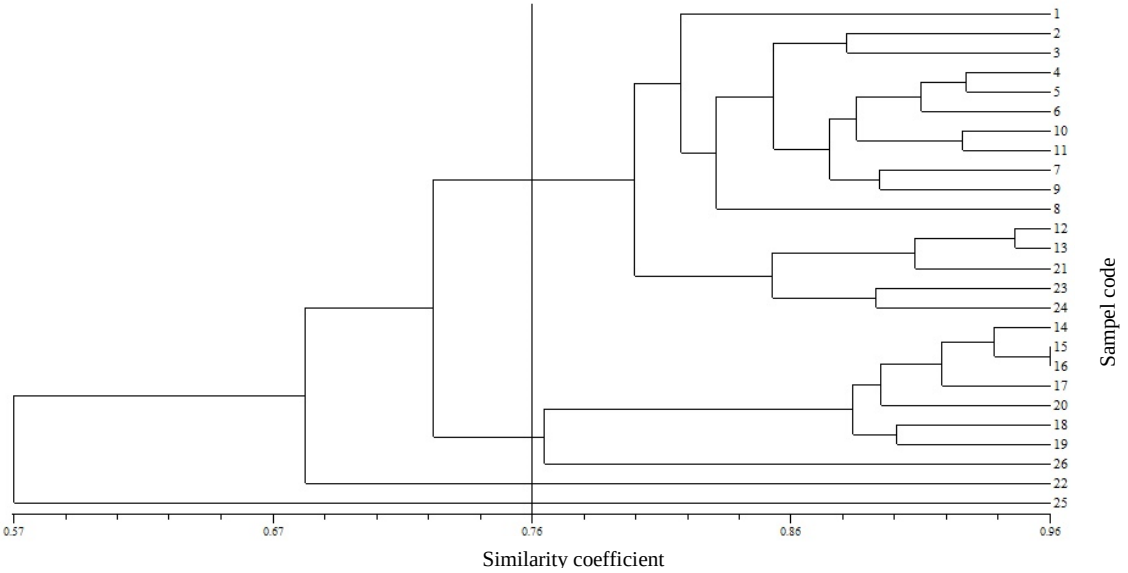
شکل ۱- الگوی باندهی مارکرها در برخی از نمونه‌های مورد بررسی

Figure 1- The band pattern of markers in some genotypes studied.

ارول و همکاران (Erolet al., 2014) در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۶ اکوتیپ زعفران با استفاده از نشانگر AFLP در مناطق مختلف ترکیه، بر اساس ماتریس تشابه جاکارد دامنه تغییراتی در حدود ۰/۲۹ تا ۰/۸۶ بدست آوردند. به دلیل اینکه در هر آزمایشی امکان وجود خطا در نمونه‌گیری، استخراج DNA و سایر مراحل آزمایش وجود دارد، وجود تنوع مشاهده شده در بین نمونه‌های گونه زراعی را به طور قطع نمی‌توان تأیید نمود (Fernandez, 2004) و برای رفع این مشکل بایستی با انجام و مقایسه پژوهش‌های مشابهی با نمونه‌هایی زراعی از سایر نواحی ایران و همچنین بین گونه‌های مورد آزمایش یا سایر گونه‌های دیگر این جنس و نیز با نشانگرهای مولکولی دیگر به نتیجه‌گیری صحیح دست یافت تا بتوان این جنس ارزشمند در کشورمان را بیشتر شناخته و از نتایج حاصل و مقایسه نتایج با هم در بهبود و اصلاح این جنس و بخصوص گونه زراعی استفاده شود (Fluch et al., 2009).

تجزیه خوشه‌ای، جمعیت‌های مورد مطالعه را در ۴ گروه و زیرگروه‌هایی قرار داد (شکل ۲). در گروه اول تمامی گونه‌های *C. sativus* از استان خراسان و دو نمونه مشابه از این گونه

مربوط به استان ایلام (جمع‌آوری شده از ایلام و ایوان) و نیز دوگونه مشابه از استان لرستان (جمع‌آوری شده از الشتر و کمالوند) و تنها یک نمونه از گونه *C. haussknechtii* از استان لرستان (تیربازار) جای گرفتند. همگی نمونه‌های قرارگرفته در گروه دوم مربوط به گونه *C. haussknechtii* بودند که پنج نمونه مربوط به استان ایلام (ایلام، صالح آباد، لومار، شورابه و زنجیره علیا)، دو نمونه جمع‌آوری شده از استان کرمانشاه (هرسین و اسلام آباد) و یک نمونه *C. sativus* از استان لرستان (تیرباز) بودند. گروه سوم تنها شامل یک نمونه از گونه‌ی *C. sativus* و جمع‌آوری شده از کوهدشت در استان لرستان و تنها عضو گروه چهارم گونه *C. cancellatuse* جمع‌آوری شده از بیستون بود. نتایج حاصل از این دندروگرام تا حد زیادی ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان می‌دهد، به طوری که نمونه‌هایی جمع‌آوری شده در یک استان یا شهر در بسیاری از موارد در گروه‌ها یا زیرگروه‌های مشابه قرار گرفتند که بیانگر شباهت ژنتیکی بالای این نمونه‌ها می باشد. اما در عین حال تفاوت‌های جالب توجهی نیز در این میان وجود داشت. بعنوان مثال نمونه مربوط به گونه *C. sativus* و جمع‌آوری شده از کوهدشت در استان لرستان در گروه جداگانه از سایر نمونه‌های این گونه قرار گرفت. البته با استفاده از تعداد آغازگر و نمونه بیشتر می توان اظهار نظر قطعی‌تری در این زمینه نمود. جاوید و همکاران (Javid et al., 2015) با کمک نشانگر RAPD، ۳۱ اکوتیپ از این گیاه را در شش گروه با تطابق نسبی جغرافیایی قرار دادند. نتایج بررسی‌های بیکی و همکاران (Beiki et al., 2010) نشان داد نژادگان‌های زعفران زراعی همگی در یک زیر شاخه قرار داشتند و بیشترین شباهت را با *C. haussknechtii* نشان دادند.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از گروه‌بندی نمونه‌های زعفران به روش UPGMA. (شماره و محل جمع‌آوری نمونه‌ها در جدول ۱ قابل مشاهده است.)
Figure 2- Dendrogram grouped wild Saffron samples by UPGMA method. (sample codes and location of collection can be seen in Table 1.)

با توجه به این که ژنوتیپ‌های داخل هر گونه باید شباهت بیشتری بهم داشته باشند قرار گرفتن ژنوتیپ‌های هر گونه در یک گروه طبیعی است ولی در مورد گونه‌ها قرار گرفتن نمونه‌های گونه *C. haussknechtii* در گروه‌های متفاوت حاکی از وجود تنوع بالا در این گونه است و با توجه به وجود زیر گونه‌ها متعدد در این گونه این امر طبیعی است (Beiki et al., 2008;

Alavi-Kia et al., 2010). می‌توان این احتمال را در نظر گرفت که ژنوتیپ‌های یک گونه که در دو گروه متمایز قرار گرفته‌اند در اثر قرارگرفتن و رشد در مناطق مختلف و تأثیر شرایط محیطی متفاوت روی آنها که منجر به طی مسیر تکاملی متفاوت شده است و به ایجاد تنوع در داخل این گونه‌ها گردیده است (Saboora et al., 2003).

بیشترین فاصله شاخص ژنتیکی Nei میان دو جمعیت لرستان و خراسان شمالی (۰/۳۱۲) و کم‌ترین فاصله نیز میان دو جمعیت کرمانشاه و ایلام (۰/۰۳۲) وجود داشت، به عبارت دیگر این دو جمعیت بیشترین شباهت ژنتیکی را با یکدیگر داشتند (جدول ۳). نماینده و همکاران (Namayandeh et al., 2012) با استفاده از ۱۵ نشانگر ریزماهواره کمترین فاصله ژنتیکی را میان دو جمعیت فردوس و گناباد (۰/۰۶) گزارش کردند.

بالاترین تعداد آلل مشاهده شده (۱/۵۴۰)، تعداد آلل مؤثر (۱/۴۳۹)، شاخص تصحیح شده هتروژنی (۰/۲۶۴) و میزان شاخص شانون (۰/۳۴۳) در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده استان لرستان و کم‌ترین تعداد آلل مشاهده شده (۰/۷۶۱)، تعداد آلل مؤثر (۱)، شاخص تصحیح شده هتروژنی (۰) و میزان شاخص شانون (۰) در بین ن‌مونه‌های استان خراسان شمالی بود (جدول ۴). یکی از دلایل احتمالی این نتایج می‌تواند کشت وسیع و در طول سالیان دراز زعفران زراعی در استان خراسان و بنابراین کاهش تنوع و هتروژنی به دلیل واکشت زیاد پیازها در این استان باشد. این در حالی است که نمونه‌های استان لرستان از نوع وحشی بوده و تنوع هتروژنی بالایی نشان داده‌اند. تاکنون ضریب شانون در مطالعات تنوع ژنتیکی زعفران محاسبه نشده است.

نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد (جدول ۵) که اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۰/۰۰۱ بین جمعیت‌ها وجود دارد؛ که طبق این اطلاعات ۷۶ درصد از تنوع کل بین جمعیت‌ها مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها و ۲۴ درصد آن مربوط به تنوع بین جمعیت‌ها است.

جدول ۳- ماتریس فاصله ژنتیکی Nei بین جفت جمعیت‌های *Crocus* sp. براساس نشانگر RAPD

Table 3- Matrix Nei genetic distance between pairs of *Crocus sp.* populations by RAPD markers

استان Province	خراسان شمالی North Khorasan	خراسان رضوی Razavi Khorasan	خراسان جنوبی South Khorasan	ایلام Ilam	کرمانشاه Kermanshah	لرستان Lorrestan
خراسان شمالی North Khorasan	0					
خراسان رضوی Razavi Khorasan	0.101	0				
خراسان جنوبی South Khorasan	0.179	0.060	0			
ایلام Ilam	0.193	0.124	0.145	0		
کرمانشاه Kermanshah	0.207	0.119	0.156	0.032	0	
لرستان Lorrestan	0.312	0.230	0.265	0.20	0.198	0

جدول ٤- شاخص‌های ژنتیکی محاسبه شده بین جمعیت‌های زعفران

Table 4- Genetics parameters calculated between Saffron populations

جمعیت Population	تعداد نمونه Number of sample	تعداد آلل مشاهده شده Na*	تعداد آلل مؤثر Ne*	شاخص اطلاعات شانون I*	شاخص تصحیح شده هتروژنی UHe*
خراسان شمالی North Khorasan	1	0.761± 0.040	1±0	0±0	0±0
خراسان رضوی Razavi Khorasan	8	1.186±0.057	1.203±	0.166±0.026	0.121±0.019
خراسان جنوبی South Khorasan	2	0.867±0.046	1.044±0.016	0.037±0.014	0.034±0.013
ایلام Ilam	7	1.239±0.058	1.258±0.037	0.204±0.208	0.0152±0.021
کرمانشاه Kermanshah	3	1.212±0.055	1.203±0.032	0.172±0.025	0.014±0.021
لرستان Lorrestan	5	1.54±0.053	1.439±0.041	0.343±0.030	0.264±0.023
میانگین Mean		1.134±0.023	1.191±0.013	0.154±0.010	0.119±0.008

I=Shannon's information index UHe * Heterogeneous corrected index Ne* = number of effective Na*=number of observed allele

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت‌ها در کلاسترهای مربوط به خود از افراد متفاوتی تشکیل شده‌اند و در بین جمعیت‌ها نیز تنوع معنی‌داری مشاهده می‌شود اما این تنوع به مراتب کمتر از تنوع مشاهده شده در داخل جمعیت‌ها می‌باشد. نماینده و همکاران (Namayandeh et al., 2012) ۱۵نشانگر ریزماهواره را برای ارزیابی روابط ژنتیکی میان گونه‌های مختلف زعفران ایرانی از ۱۰منطقه جغرافیایی به کار بردند. در این تحقیق تنوع درون جمعیت‌ها، بین جمعیت‌ها و بین جمعیت‌ها و گونه‌ها به ترتیب ۰/۷۵۷، ۰/۱۵۶ و ۰/۰۸۶ گزارش شد.

جدول ٥- جدول تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های *Crocus* sp.

Table 5- ANOVA table for *Crocus* sp. populations

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	واریانس Variance%	آماره سطوح تمایز ژنتیکی PhiPT value	میزان احتمال Probability value%
بین جمعیت‌ها Between pop.	4	92.28	23.07	24%	2.891**	0.001
درون جمعیت‌ها Within pop.	20	187.32	9.366	76%	9.366	
کل Total	24	279.6		100%	12.257	

**: Significant at 0.01

نتیجه‌گیری

به طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که دسته‌بندی نمونه‌های زراعی و وحشی زعفران به میزان زیادی با الگوی اکولوژیکی و جغرافیائی آنها مطابقت داشت، به طوری که نمونه‌های جمع‌آوری شده از مکان‌های جغرافیایی نزدیک بهم

شباهت ژنتیکی بالایی نیز داشتند. در مواردی عدم ارتباط بین پراکنش جغرافیایی با دسته‌بندی‌ها دیده شد (مثلاً تعدادی از نمونه‌های مربوط به ایلام با نمونه‌های مربوط به خراسان در یک گروه قرار گرفتند) که می‌تواند به دلایلی از جمله ناکافی بودن تعداد مکان‌های ژنی مورد مطالعه و جابجایی ژرم‌پلاسم باشد (Ebrahimi et al., 2010).

مشاهده چند شکلی DNA در کلون‌های زراعی رایج استان خراسان می‌تواند بیانگر وجود تنوع کلون‌های زعفران زراعی ایران باشد و این احتمال وجود دارد که همه از یک کلون واحد منشأ نگرفته‌اند و پتانسیل مطالعات بیشتر را دارند.

در بیشتر موارد نمونه‌های گونه‌های مختلف در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند که می‌توان گفت این جنس از تنوع بالایی برخوردار است. ولی به دلیل اینکه در مواردی نمونه‌های یک گونه وحشی (*C. haussknechtii*) با گونه زراعی زعفران در یک گروه قرار گرفتند، نتیجه‌گیری می‌گردد که هنوز وجوه مشترک زیادی در سطح مولکولی بین این گونه‌ها وجود دارد که حکایت از یک پیشینه ژنتیکی مشترک دارد.

منابع

Aabedi, Z., Shekarpoor, M., Kalantari, S., and Salami, A. 2012. Molecular variation in some Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) accessions using RAPD marker. In the Third Iranian Agricultural Biotechnology Conference (Plant, animal and industrial), Mashhad, Iran. 3-5 September 2012, p 91-96. (In Persian).

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.

Beiki, A.H., Abaspoor, N., and Mozafari, J. 2013. Genetic diversity of cultivated and wild *Crocus* genus in Iran with ISSR markers. Journal of Molecular and Cellular (Iranian Journal of Biology) 26 (2): 164-173. (In Persian with English Summary).

Dalby, A. 2003. Food in the Ancient World from A to Z. Routledge Press, London.

Beiki, A.H., Keifi, F., and Mozafari, J. 2010. Genetic Differentiation of *Crocus* Species by Random Amplified Polymorphic DNA. Genetic Engineering and Biotechnology Journal 18: 1-18.

Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.

Ebrahimi, A., Naghavi, M. R., Sabokdast, M., and Mardi, M. 2010. Assessment of genetic diversity in accessions of two barely species (*H. vulgare* L. and *H. spontaneum* L.) using SSR markers. Iranian Journal of Crop Sciences 12 (3): 333-345. (In Persian with English Summary).

Erol, O., Kaya, H.B., Sik, L., Tuna, M., Can, L., and Tanyolac, M.B. 2014. The genus *Crocus*, series *Crocus* (Iridaceae) in Turkey and East Aegean islands: a genetic approach. Turkish Journal of Biology 38:48-62.

Fakhr tabatabaii, M., Maleki, M., Rahimi nezhad, M., Atri, M., Naghavi, M., Mardi, M., Pirseiedi, S.M., Mir masoomi, M., and Novjavan, M. 2009. Efficiency of floristic, phytochemical and molecular markers to determine diversity in Iranian populations of *Triticum boeoticum*. Iranian Journal of Biology 21(5): 806-816. (In Persian with English Summary).

Fernandez, J.A. 2004. Biology, biotechnology and

biomedicine of saffron. Plant Science 2: 127-159.

Fluch, S., Hohl, K., Stierschneider, M., Kopecky, D., and Kaar, B. 2009. *Crocus sativus* L-
and Economics 20: 41-46.

Jafari, H., and Najafi zarini, H. 2012. Evaluation of phylogenetic relationships of *Crocus* species using protein profiles. Journal of Crop Breeding 5 (11): 25-33. (In Persian with English Summary).

Javid, I.M., Nazeer, A., Mudasir, H., Taseem, A.M., Sajad, H., Shoiab, B., Asif, A., and Raies, A. 2015. Molecular characterization of saffron-potential candidates for crop improvement. Notulae Scientia Biologicae 7 (1): 81-89.

Kafi, M. 2002. Saffron Production and Processing. Ferdowsi University Press, Iran. (In Persian).

Mathew, B. 1982. The Crocus: a Revision of the Genus *Crocus* (Iridaceae). Batsford, B. T. Ltd., London.

Najafy, A., Ashrafi Parchin, R., and Farshadfar, E. 2011. Evaluation of genetic diversity in wheat cultivars and breeding lines using Inter Simple Sequence Repeat markers. Biotechnol and Biotechnol 25 (4): 2634-2638.

Namayandeh, A., Nemati, Z., Kamelmanesh, M.M., Mokhtari, M., and Mardi, M. 2012. molecular evidence on its clonal origin. ISHS Acta Horticulturae 850: III International Symposium on Saffron: Forthcoming Challenges in Cultivation. Research Genetic relationships among species of Iranian Crocus (*Crocus* spp.). Crop Breeding Journal 3 (1): 61-67.

Saboora, A., Rajabian, T., Abrishamchi, P., and Ebrahimzadeh, H. 2003. Phonetic studies by SDS-PAGE and PAGE analysis of corn proteins in Iranian *Crocus* species and populations. In 1st International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology, Albacete, Spanish, 22-25 October 2003, p. 51-55.

Sajadi, S.M. 2006. Study of problems of production and export of saffron and solutions. Journal of Student's 9: 55-64. (In Persian).

Schaal, B.A., Leverich, W.J., and Rogstad, S.H. 1991. Comparison of Methods for Assessing Genetic Variation in Plant Conservation Biology. In: Falk, D.A. and Holsinger, K.E. (Eds), Genetics and Conservation of Rare plant. Oxford University Press, New York. p.123-134.

The Evaluation of Genetic Diversity in Some Saffron (*Crocus sativus* L.) Samples of Iran Using RAPD Marker

Fereshteh Babaee[1*], Zahra Tahmasebi[2], Hasan Feyzi[3] and Arash Fazeli[2]

Received: 3 February, 2016 Accepted: 18 May, 2016

DOI: 10.22048/jsat.2016.39230

Abstract

Iran is one of the important distribution centers of medicinal species, including plant saffron (*Crocus sativus* L.). The presence or absence of genetic diversity in common native and commercial cultivars of saffron of the country has always been one of the important questions for researchers of this filed. In the present study, various saffron samples from different regions of Iran, including seventeen cultivated samples from North Khorasan, Khorasan Razavi, South Khorasan, Lorestan and Ilam, eight wild types (*C. haussknechtii*) from Lorestan, Kermanshah and Ilam and one wild type (*C. cancellatuse*) from Kermanshah were collected and then their genetic diversity was obtained using random amplified polymorphism DNA (RAPD) marker. A total number of 161 DNA bands were produced by eight primers with an average of 14.3 bands; the primer Oligo 340 produced the most number of bands. The polymorphism percentage mean was 73.77%. Cluster analysis using UPGMA method divided the samples into four groups. In this grouping, there was a minimum distance between saffron populations collected from Kermanshah and Ilam. In other words, these two populations had the maximum genetic similarity with each other. The maximum similarity was observed between the samples collected from Saleh-Abad and Lomar in Ilam and the minimum similarity was observed between ecotypes collected from Bisotoon in Kermanshah and Torbat-jam in the Khorasan Razavi province. In most cases, samples of different species were divided into different groups such that it can be said that this Genus has a great diversity. Although there are some samples of wild species (*C. haussknechtii*) that were with saffron crop species in a group in which there exists many molecular Genetics similarities between these species that is indicative of a common genetic background.

Keywords: Saffron, Polymorphism, Cluster analysis, Genetic diversity.

1- M.Sc. student of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University
2- Assistant Professor of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University
3- Assistant Professor of Plant Production Department, Saffron Institute, Torbat Heydarieh University
(*- Corresponding Author E-mail: nilofar.babaee@yahoo.com)