Saffron Agronomy & Technology
Vol. 7, No. 3, Fall 2019, P. 347-357

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸ ص. ۳۵۷-۳۴۷

بررسی تنوع ژنتیکی در زعفران‌های با بیش از سه کلاله با استفاده از نشانگرمولکولی SSR و ISSR

محمدعلی بهدانی[۱] و علی ایزانلو[۲*]

تاریخ دریافت: ۹ آبان ۱۳۹۶ **تاریخ پذیرش:** ۵ تیر ۱۳۹۷

بهدانی، م.ع.، و ایزانلو، ع. ۱۳۹۸. بررسی تنوع ژنتیکی در زعفران‌های با بیش از سه کلاله با استفاده از نشانگرمولکولی SSR و ISSR. زراعت و فناوری زعفران، ۷(۳): ۳۵۷-۳۴۷.

چکیده

زعفران زراعی به عنوان با ارزش‌ترین ادویه جهان از نظر ژنتیکی کلون مونومورفی بوده، ولی تفاوت‌هایی نیز در فنوتیپ و کیفیت گزارش شده است که مهم‌ترین تنوع فنوتیپی از نظر زراعی و اقتصادی، وجود گل‌های با بیش از سه کلاله است، بنابراین هدف از این تحقیق استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف جهت مطالعه مولکولی زعفران های با بیش از ۳ کلاله در منطقه و اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی بین آن‌ها بود. در این تحقیق، کلون‌های زعفران با بیش از سه کلاله به‌طور کامل همراه با خاک اطراف ریشه از مزارع کشاورزان جمع‌آوری و بطور کامل در جعبه‌های پلاستیکی، جهت حفظ شرایط زیستی، مستقر گردیدند. استخراج DNA به روش CTAB از برگ‌های گل دارای بیش از سه کلاله انجام شد. زعفران‌های با بیش از سه کلاله در مقایسه با حالت معمولی دارای گل‌های بزرگتر و تعداد گلبرگ‌های به نسبت بیشتری بودند. بیشترین فراوانی تعداد کلاله در بین نمونه‌های بیش از سه کلاله مربوط به چهار و پنج کلاله با ۳۸ درصد بود. نمونه-های دارای شش کلاله با فراوانی ۱۴ درصد مشاهده شد. در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده تنها یک نمونه با تعداد کلاله هفت نیز مشاهده گردید. از مجموع ۴۸ آغازگر ISSR آزمون شده روی نمونه DNAی بالک، تنها ۱۶ آغازگر تشکیل نوار دادند. نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگاروز برای آغازگرهای ISSR نشان داد که محدوده نوارهای تشکیل شده در فاصله ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز بود. با بررسی نوارهای تشکیل شده برای آغازگرهای ISSR، چندشکلی قابل ملاحظه‌ای بین کلون‌های مختلف زعفران مورد بررسی مشاهده نشد. لذا، براساس این سیستم نشانگری تنوع ژنتیکی بین کلون‌های با تعداد کلاله متفاوت ملاحظه نشد. از بین نشانگرهای SSR آزمون شده، ۱۰ نشانگر چند شکلی را بین کلون ها نشان دادند. نتایج تجزیه همبستگی براساس ضریب همبستگی اسپیرمن نشان داد که ارتباط معنی‌دار آماری بین هیچ کدام از آلل‌های نشانگر ریزماهواره و تعداد کلاله‌ها مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: اپی ژنتیک، تنوع ژنتیکی، چندشکلی.

۱- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند.
۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند.
(*-نویسنده مسئول: a.izanloo@birjand.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2018.104167.1266

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی چندساله است که از نظر ژنتیکی عقیم بوده و تکثیر آن صرفاً از طریق رویشی و بوسیله بنه‌ها انجام می‌گیرد. امروزه نیاز جهانی به استفاده از زعفران، نه تنها بخاطر تولید و استفاده آن به عنوان ادویه، بلکه برای خصوصیات دارویی متعددش مانند اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی آن، روبه افزایش است (Abdullaev & Espinosa-Aguirre, 2004; Bhandari, 2015; Lim, 2014; Magesh et al., 2006; Samarghandian & Borji, 2014). افزایش تولید زعفران وابسته به برداشت بیشتر محصول در واحد سطح و کیفیت بالای آن است. برای نیل به این اهداف، نیاز به بهبود ژنتیکی گیاه، بهبود وضعیت زراعی، همچنین شرایط کنترل‌شده در طی پاک سازی، ذخیره و بازاریابی محصول است. بهبود ژنتیکی نیازمند وجود تنوع درون گونه‌ای، بین گونه‌ای و همچنین امکان تلاقی بین آن‌ها است.

وجود تنوع ژنتیکی در این گونه موضوع مورد بحث است. روبیو- موراگا و همکاران (Rubio-Moraga et al., 2009) از سه سیستم نشانگر مولکولی مبتنی بر PCR شامل RAPD، ISSR، و SSRها برای بررسی چندشکلی در اکوتیپ های مختلف جمع‌آوری شده از نواحی مختلف استفاده کردند. آن‌ها نتوانستند چندشکلی بین اکوتیپ‌های مختلف پیدا کنند. آن‌ها پیشنهاد کردند که زعفران یک گونه مونومورف یا تک شکل بوده و پیشنهاد نمودند که برای یافتن راهی جهت تشخیص بین ایزوله‌های زعفران زراعی، توالی‌یابی کل ژنوم مورد نیاز است. برخی از مطالعات فیلوژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی روی اکوتیپ‌های مختلف زعفران وجود تنوع ژنتیکی گزارش نشده است (Fluch et al., 2010; Grilli Caiola et al., 2004; Rubio-Moraga et al., 2009). درحالی‌که، تحقیقات اخیر با استفاده از دامنه وسیعی از نشانگرهای DNA، تنوع ژنتیکی اندکی را در گونه زعفران گزارش کرده‌اند (Babaei et al., 2014; Beiki et al., 2010; Mir et al., 2015; Nemati et al., 2012; Nemati et al., 2014; Sik et al., 2008; Siracusa et al., 2013).

با این وجود، تفاوت‌هایی در فنوتیپ و کیفیت نیز در برخی از زعفران‌های زراعی گزارش شده است که ممکن است مربوط به تفاوت در کلون‌ها باشند. مهم‌ترین تنوع فنوتیپی با اهمیت از نظر زراعی و اقتصادی، وجود گل‌های با بیش از سه کلاله می‌باشد، بنابراین توجه ویژه‌ای به تحقیقات دقیق علمی از دیدگاه مولکولی در این زمینه ضروری به‌نظر می‌رسد تا شواهدی دال بر اینکه تنوع مشاهده شده در درون زعفران‌های زراعی ژنتیکی است فراهم گردد. برخی واریانت‌های زعفران با بیش از سه کلاله در مزارع در برخی سال‌ها مشاهده می‌شوند، ولی مشاهده مکرر آن‌ها در سال‌های بعد در همان کلون گزارش نشده است. استیلایی (Estilai, 1978) مطالعه سیتوژنتیکی روی زعفران-های دارای بیش از سه کلاله انجام داد. او تغییر در تعداد کروموزم مشاهده نکرد و پیشنهاد نمود که ممکن است ناشی از موتاسیون‌های تصادفی باشند.

پی بردن به منشاء گونه‌ها و یافتن تنوع ژنتیکی مناسب در بهبود ژنتیکی گیاهان نقش مهمی را ایفا می‌کند. با توجه به اینکه زعفران گیاهی با تکثیر رویشی است، یافتن جهش یافته‌ای که ویژگیهای زراعی مطلوبی داشته باشد کمک شایانی به اقتصاد کشاورزان در زمینه تولید و حتی افزایش سطح صادرات محصول می‌نماید. امروزه تأیید منشاء گونه‌ها و بررسی تنوع ژنتیکی یکی دیگر از زمینه‌های کاربردی تکنیک‌های مولکولی است که توجه ویژه ای را به خود جلب کرده است. تا کنون تجزیه‌های مولکولی تنها بر شناسایی اجداد بالقوه زعفران زراعی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD، AFLP، IRAP و ISSR انجام شده است، بنابراین هدف از این تحقیق استفاده از

سیستم نشانگرهای مولکولی مختلف جهت مطالعه مولکولی زعفران‌های با بیش از سه کلاله در منطقه و بررسی تنوع ژنتیکی بین آن‌ها بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در پاییز ۱۳۹۳، فراخوانی مبنی بر جمع‌آوری کلون‌های زعفران با بیش از سه کلاله بین زعفران‌کاران خراسان جنوبی (شهرستان قاین و سرایان) اعلام گردید. در آبان ماه، کلون‌های زعفران با بیش از سه کلاله بطور کامل همراه با خاک اطراف ریشه از مزارع کشاورزان جمع‌آوری و بطور کامل به جعبه‌های پلاستیکی، جهت حفظ شرایط زیستی، مستقر گردیدند (شکل ۱). پنج نمونه از منطقه قاین و ۴۵ نمونه نیز از منطقه سرایان جمع‌آوری و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند منتقل شدند (جدول ۱). تعداد کلاله در گل‌های با بیش از سه کلاله شمارش گردید. سپس جعبه‌های پلاستیکی حاوی نمونه‌ها در فضای مناسب در محوطه دانشکده کشاورزی در داخل خاک قرار داده شدند. در سال بعد این کلون‌ها نیز برای تعداد کلاله در گل مورد بررسی قرار گرفتند.

شکل ۱- گل‌های زعفران با ٤ و ٥ کلاله جمع‌آوری شده از منطقه سرایان، خراسان جنوبی
Figure 1- Saffron flowers with 4 and 5 stigmas collected from Sarayan area, South Khorasan.

استخراج DNA و آزمون نشانگرها

جهت استخراج DNA، برگ‌های متصل به گل دارای بیش از سه کلاله برداشت و در داخل هاون چینی استریل و در ازت مایع پودر شدند. استخراج DNA به روش CTAB (Doyle & Doyle, 1987) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش طیف‌سنجی نوری با استفاده از اسکتروفتومتر نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. سپس نمونه‌های DNA تقریباً به مقدار ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند.

جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در زعفران از نشانگرهای مولکولی ISSR و SSR استفاده شد. ۴۸ آغازگر ISSR و ۲۷ جفت آغازگر SSR مختص زعفران با سفارش از شرکت سیناکلون تهیه گردیدند (جدول ۲). آغازگرهای مورد استفاده چندشکلی را بین زعفران‌های زراعی و خویشاوندان وحشی در مطالعات گذشته نشان داده بودند (Nemati et al., 2012; Rubio-Moraga et al., 2009).

جدول ۱- کد و منطقه جمع‌آوری کلون‌های با بیش از سه کلاله

Table 1- Code and the area of collecting clones with more than three stigmas

شماره Number	کد نمونه Sample code	منطقه Area	تعداد کلاله Numbers of stigma	شماره Number	کد نمونه Sample code	منطقه Area	تعداد کلاله Numbers of stigma
1	1-1	قاین Qaen	5	29	24-2	سرایان Sarayan	5
2	2-1	قاین Qaen	6	30	1-3	سرایان Sarayan	4
3	3-1	قاین Qaen	7	31	2-3	سرایان Sarayan	6
4	4-1	قاین Qaen	4	32	3-3	سرایان Sarayan	4
5	5-1	قاین Qaen	5	33	4-3	سرایان Sarayan	4
6	1-2	سرایان Sarayan	5	34	5-3	سرایان Sarayan	5
7	2-2	سرایان Sarayan	4	35	6-3	سرایان Sarayan	5
8	3-2	سرایان Sarayan	5	36	7-3	سرایان Sarayan	4
9	4-2	سرایان Sarayan	6	37	8-3	سرایان Sarayan	4
10	5-2	سرایان Sarayan	4	38	9-3	سرایان Sarayan	5
11	6-2	سرایان Sarayan	4	39	10-3	سرایان Sarayan	5
12	7-2	سرایان Sarayan	6	40	11-3	سرایان Sarayan	4
13	8-2	سرایان Sarayan	5	41	12-3	سرایان Sarayan	6
14	9-2	سرایان Sarayan	5	42	13-3	سرایان Sarayan	5
15	10-2	سرایان Sarayan	5	43	14-3	سرایان Sarayan	4
16	11-2	سرایان Sarayan	4	44	15-3	سرایان Sarayan	4
17	12-2	سرایان Sarayan	4	45	16-3	سرایان Sarayan	5
18	13-2	سرایان Sarayan	4	46	17-3	سرایان Sarayan	5
19	14-2	سرایان Sarayan	5	47	18-3	سرایان Sarayan	4
20	15-2	سرایان Sarayan	4	48	19-3	سرایان Sarayan	6
21	16-2	سرایان Sarayan	5	49	20-3	سرایان Sarayan	4
22	17-2	سرایان Sarayan	5	50	21-3	سرایان Sarayan	6
23	18-2	سرایان Sarayan	4	51	22-3	سرایان Sarayan	5
24	19-2	سرایان Sarayan	5	52	B-1	بیرجند Birjand	3
25	20-2	سرایان Sarayan	6	53	B-2	بیرجند Birjand	3
26	21-2	سرایان Sarayan	4	54	Q-1	قاین Qaen	3
27	22-2	سرایان Sarayan	4	55	Q-2	قاین Qaen	3
28	23-2	سرایان Sarayan	5	56	Q-3	قاین Qaen	3

آزمون آغازگرها برای تکثیر یا عدم تکثیر نوار در زعفران انجام شد. برای این منظور، مخلوطی بصورت بالک از پنج نمونه DNAی تصادفی تهیه شد. آغازگرها بر اساس دمای اتصال آن‌ها گروه‌بندی شدند، سپس مواد لازم PCR بصورت مسترمیکس بدون آغازگر به تیوپ‌های حاوی آغازگرهای ISSR مختلف اضافه گردید و طی برنامه تاچ داون[1] و گرادیان دمایی آزمون گردید. آغازگرهایی که تشکیل نوار دادند و محدوده دمای اتصال آنها تعیین شد، برای انجام ادامه‌ی تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام PCR، میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتر حاوی ۱۵ میکرولیتر مواد واکنش PCR (شامل ۱x مسترمیکس آماده،۵۰ نانوگرم DNA، ۰/۶ پیکوگرم آغازگر) در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، مدل ۲۰۰۰ ساخت آلمان) قرار داده شدند.

برنامه PCR شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، پنج چرخه اول در دمای

1 -Touchdown

۹۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال آغازگر (۵۵–۴۵) به مدت ۳۰ ثانیه، هر سیکل ۰/۵ درجه از دمای اتصال کاسته می‌شد، و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام گرفت، به دنبال آن ۳۵ چرخه در دمای ۹۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، (۵۲–۴۲) درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از اتمام چرخه‌ها، نمونه‌ها از دستگاه خارج شده و تا قبل از الکتروفورز در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

ابتدا جفت آغازگرهای SSR برای تعیین بهترین دمای اتصال از طریق PCR گرادیان دمایی مورد بررسی قرار گرفتند. برنامه‌ی PCR با گرادیان دمایی برای تعیین بهترین دمای اتصال آغازگر برای نشانگرهای SSR نیز روی DNAی بالک انجام شد. براساس نتایج الکتروفورز، بهترین دمای اتصال انتخاب و تمام نمونه‌های زعفران با نشانگرهای SSR، PCR گردیدند. دمای اتصال مطلوب برای جفت آغازگرها از ۴۷ تا ۶۶ درجه سانتی‌گراد متغیر بود.

به منظور مشاهده چگونگی تکثیر مکان‌های چندشکل توسط آغازگرهای مختلف و امکان رتبه‌بندی نوارهای تشکیل شده، محصولات PCR در ژل آگاروز ۲ درصد همراه اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز شدند. قطعات تکثیر یافته DNA توسط ژل‌داک زیر نور UV مشاهده و عکس‌برداری شد. نوارهای تشکیل شده برای کلون‌های مختلف براساس اندازه آن‌ها امتیازبندی شد. برای نوارهای چند شکل، وجود یا عدم وجود نوار به‌ترتیب یک و صفر تعلق گرفت. جهت یافتن همبستگی بین آلل‌ها و تعداد کلاله ضریب همبستگی اسپیرمن توسط نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

زعفران‌های با بیش از سه کلاله در مقایسه با حالت معمولی دارای گل‌های بزرگتر و تعداد گلبرگ‌های به نسبت بیشتری بودند (شکل ۱). بیشترین فراوانی تعداد کلاله در بین نمونه‌های با بیش از سه کلاله مربوط به چهار و پنج کلاله با ۳۸ درصد بود. نمونه‌های دارای شش کلاله با فراوانی ۱۴ درصد مشاهده شد. در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده تنها یک نمونه با تعداد کلاله هفت نیز مشاهده گردید (شکل ۲). اگرچه، فراوانی گل-های زعفران با بیش از سه کلاله در کل مزارع اندک است (Estilai, 1978)، ولی در بین آن‌ها بیشترین فراوانی مربوط به گل‌های دارای چهار و پنج کلاله بود. استیلایی (Estilai, 1978) نیز بیشترین فراوانی مربوط به چهار کلاله را گزارش نمود و بعد از آن گل‌های با پنج کلاله دارای بیشترین فراوانی بودند.

آزمون آغازگرهای ISSR

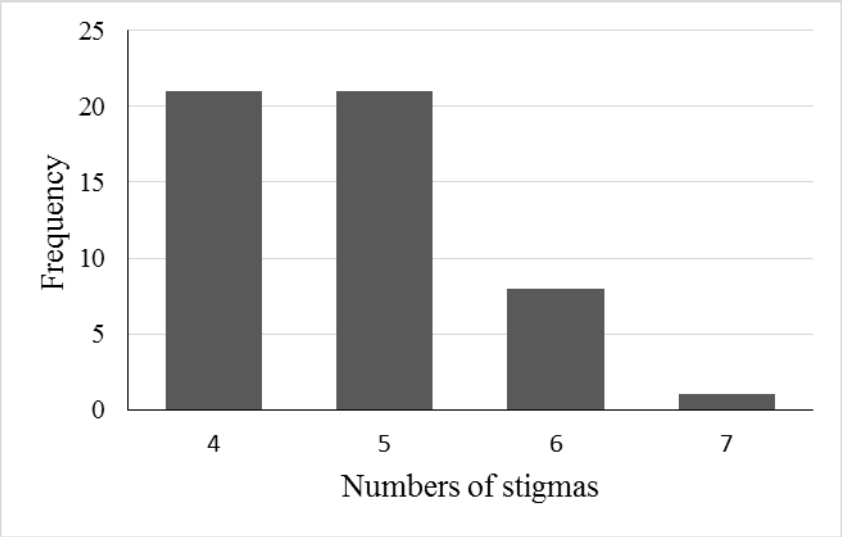
از مجموع ۴۸ آغازگر ISSR آزمون‌شده روی نمونه DNAی بالک، تنها ۱۶ آغازگر (شامل؛ ISCS1, ISCS10, ISCS11, ISCS12, ISCS15, ISCS20, ISCS23, ISCS28, ISCS30, ISCS50, ISCS51, ISCS7, ISCS72, ISCS77, ISCS8, ISCS9) تشکیل نوار دادند. لذا برای انجام PCR تمامی نمونه‌های زعفران جمع‌آوری شده از آغازگرهایی که توسط آن‌ها تکثیر انجام شد، استفاده گردیدند.

نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگاروز برای نشانگرهای ISSR نشان داد که محدوده نوارهای تشکیل شده در فاصله ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز بود. با بررسی نوارهای تشکیل شده برای آغازگرهای ISSR، چندشکلی قابل ملاحظه‌ای بین کلون‌های مختلف زعفران مورد بررسی مشاهده نشد. لذا، براساس این سیستم نشانگری تنوع ژنتیکی بین کلون‌های با تعداد کلاله متفاوت وجود نداشت.

جدول ۲- لیست آغازگرهای ISSR و SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی در زعفران با بیش از سه کلاله

Table 2- List of ISSR and SSR primers for evaluation of genetic variation in saffron with more than three stigmas

شماره Number	نام نشانگر SSR SSR marker name	توالی '۳→'۵ Sequence 5'-3'	دما Ta (°C)	شماره Number	نام آغازگر ISSR primer name	توالی '۳→'۵ Sequence 5'-3'	دما Ta (°C)
1	CSMIC13	F: TGGCATTAGATTACGGGTTTGT R: GAATCACGTTGTTGGGATTGAT	64	28 29	ISCS1 ISCS7	TCCTCCTCCTCCTCCTCCC TCTCTCTCTCTCTCTCTCC	62 47
2	CSMIC14	F: CCTTGTCTTGAACGAATGTCTG R: TTGCAGAATCCTTGGCCTTA	63	30 31	ISCS8 ISCS9	TCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTA ATCATCATCATCATCATCATCATCATC ATCG	56 68
3	CSMIC23	F: GTCACTTACATGTTGGTGT R: AATTCTATTCCAAGGCTCCA	56	32 33	ISCS10 ISCS11	ACACACACACACACACC CTCTCTCTCTCTCTCTT	48 38
4	CSMIC25	F: GTCTCCTTCGCTATCTCCTTGA R: ACCTTCAAGAAGATCAGCAAT	60	34 35	ISCS12 ISCS15	TTGTTGTTGTTGTTGTTGC TATCTATCTATCTATCTATCTATCT	53 41
5	CSMIC36	F: GCTAGCAGAATCACATGATCCA R: AGTGCATTCATCTCACCTCTCA	63	36 37	ISCS17 ISCS18	DBDBCACCACCACCACCAC DBDBCCACCACCACCACCA	52 56
6	CSMIC37	F: GAAGCAACAATGGCGGTGGA R: TCGGAGCGGTGGAGATCGTCT	71	38 39	ISCS19 ISCS20	HVHGTGGTGGTGGTGGTG DHBCGACGACGACGACGA	52 56
7	CSMIC42	F: CAGAATCACTTACCAGGTCAGT R: CGTGGTACAGTGTAGCTACTTA	57	40 41	ISCS21 ISCS22	BDBACAACAACAACAACA HBBGAAGAAGAAGAAGAA	41 37
8	CSMIC44	F: CAGTGCTTCGGCTGAATGTGAA R: ACTGCTGGACGGTGCAACTT	68	42 43	ISCS23 ISCS26	HBDBGACCGACCGACCGACC GTGTGTGTGTGTGTGTYG	60 43
9	CSMIC46	۴F: GTACAGTGCTGAAGAGGAGGA R: TGGATACGCTGCACGTATCTCA	64	44 45	ISCS27 ISCS28	TCTCTCTCTCTCTCTCRA TCTCTCTCTCTCTCTCRT	38 38
10	CSMIC47	F: ACCAGGTCAGTTGATGCCTCAT R: CAGTGTAGCTACTTAGACAGT	58	46 47	ISCS29 ISCS30	TCTCTCTCTCTCTCTCRG ACACACACACACACACYT	38 43
11	CSMIC50	F: TAACCTCGTCGGAGCGGTGGA R: GGAGCAACAATGGCGGTGGAA	73	48 49	ISCS32 ISCS33	ACACACACACACACACYG TGTGTGTGTGTGTGTGRT	43 46
12	CSMIC53	F: GCAGAATCACTGCTGGACGGGT R: CAGTGCTTCGGCTGAATGTGAA	70	50 51	ISCS34 ISCS35	TGTGTGTGTGTGTGTGRC TGTGTGTGTGTGTGTGRA	46 46
13	CSMIC55	F: AGCAACAGAGGCACACATTCA R: AGCTGTCAGTCCAATCATCAAC	64	52 53	ISCS38 ISCS43	GTGTGTGTGTGTGTGTYC GAAGAAGAAGAAGAAGAA	43 43
14	CSMIC59	F: GAATATTGTTGATGAGGCCGGA R: AAGAGAGATATTAAATAAGTCGCA	61	54 55	ISCS46 ISCS47	GTGTGTGTGTGTGTGTYA CACACACACACACACARG	43 46
15	CSMIC62	F: CCAATCTGAGGACGGGCT R: AGAAGCGTGATGAAGTGA	61	56 57	ISCS48 ISCS49	GACAGACAGACAGACA CCCTCCCTCCCTCCCT	40 60
16	ABRII/Cs2	F: ATACGGTAACATCAGGAAG R: AGTAATCCACGCGTCAAGGT	58	58 59	ISCS50 ISCS51	CACACACACACACACARC CACACACACACACACART	46 46
17	ABRII/Cs8	F: GTGTAATGAATGGGATATATGGC R: CCTTCCAACTGTGAAATAATTCC	61	60 61	ISCS54 ISCS55	CTCTCTCTCTCTCTCTRG CTCTCTCTCTCTCTCTRC	38 37
18	ABRII/Cs10	F: GGATGTACTTAGGTTGTG R: GGAAACCCTAACTAGGT	58	62 63	ISCS57 ISCS58	GAGAGAGAGAGAGAGAYG GAGAGAGAGAGAGAGAYC	38 38
19	ABRII/Cs11	F: CCCAACTGACCTTCCAACTG R: GTTGTTATGATGGTCTGGCC	61	64 65	ISCS64 ISCS65	GAGAGAGAGAGAGAGAC GAGAGAGAGAGAGAGAA	38 40
20	ABRII/Cs20	F: CAATCTTTACATAGTGAGGC R: GTATTCTGGTCAGTTCAGTG	49	66 67	ISCS69 ISCS70	CACACACACACACACAA CACACACACACACACAG	47 47
21	ABRII/Cs21	F: TACCCTATAAAGAGTGGACA R: GCTGCCTAGTAATGTGTAAG	63	68 69	ISCS72 ISCS73	GTGTGTGTGTGTGTGTC GTGTGTGTGTGTGTGTT	45 45
22	ABRII/Cs28	F: AACCACTGAGGAAGGAC R: GGTAGAATACCTTATCGGTT	54	70 71	ISCS76 ISCS77	TCTCTCTCTCTCTCTCG ACACACACACACACACT	44 44
23	ABRII/Cs30	F: TCTCTCATGTTACAATCCTC R: CTGTGTTGAAGGGATATCTA	53	72 73	ISCS79 ISCS80	TGTGTGTGTGTGTGTGA TGTGTGTGTGTGTGTGC	48 51
24	ABRII/Cs39	F: CTTTAGCTGTTATGATGGTC R: TCCCGGTATGTAACTATGTA	53	74 75	ISCS81 ISCS87	TGTGTGTGTGTGTGTGG AGAGAGAGAGAGAGAGYA	51 37
25	ABRII/Cs42	F: ATTAACACCGGTCACTAGA R: GAAGGTATCTCTCTTCGTTT	54				
26	ABRII/Cs48	F: TCCCTAAACTTGTACTGAGA R: TCCCGGTATGTAACTATGTA	54				
27	ABRII/Cs56	F: AGAAGAGAGAGACGAGAAAC R: GTACATGAATCCAACTATCC	53				



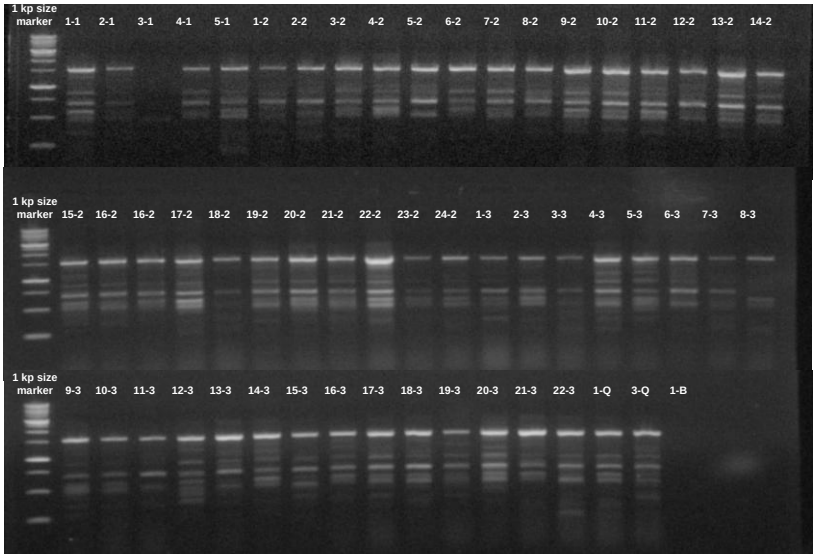
شکل ۲- فراوانی تعداد کلاله های بیش از سه کلاله در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان خراسان جنوبی
Figure 2- Frequency of flowers with more than three stigmas in samples collected from different regions of South Khorasan Province.

آزمون آغازگرهای SSR

از بین نشانگرهای SSR آزمون شده، ۱۰ جفت نشانگر چند شکلی را بین کلون ها نشان دادند (جدول ۳). اندازه تقریبی نوارهای تشکیل شده بین ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز بودند. تعداد نوارهای تشکیل شده از یک تا ۵ نوار برای هر جفت آغازگر متفاوت بود (جدول ۳). بیشترین تعداد نوار تشکیل شده مربوط به آغازگرهای CSMIC59 و CSMIC62 با پنج نوار چندشکل بود (شکل ۳ و ۴).

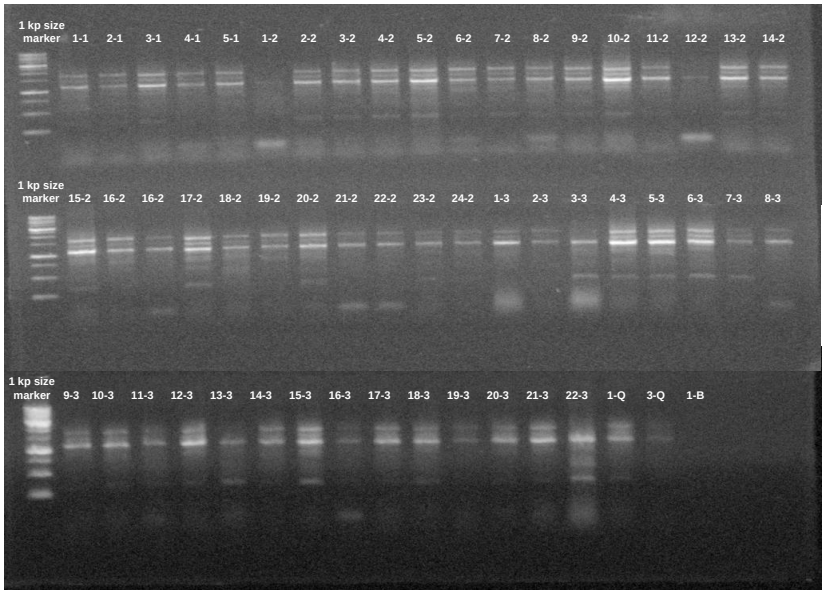
جدول ۳- آغازگرهای دارای نوارهای چندشکل و اندازه تقریبی نوارها
Table 3- Primers with polymorphic bands and their approximate sizes

نام نشانگر Marker name	کل نوارهای تشکیل شده Total bands	نوار چند شکل Polymorphic band	اندازه تقریبی نوارها Approximate size band (bp)
ABRIICs20	2	1	100-250
ABRIICs21	1	1	150
CSMIC25	2	1	90-110
CSMIC37	2	1	230
CSMIC44	1	1	200
CSMIC46	1	1	240
CSMIC50	3	3	250-1000
CSMIC53	3	2	200
CSMIC59	5	5	500-1500
CSMIC62	5	5	300-1700



شکل ۳- نوارهای تشکیل شده برای نشانگر CSMIC59 در ٥٤ کلون مختلف زعفران

Figure 3- Amplified bands for CSMIC59 markers in 54 different saffron clones.



شکل ٤- نوارهای تشکیل شده برای نشانگر CSMIC62 در ٥٤ کلون مختلف زعفران

Figure 4- Amplified bands for CSMIC62 markers in 54 different saffron clones.

ارتباط بین نشانگر و تعداد کلاله

نتایج تجزیه همبستگی براساس ضریب همبستگی اسپیرمن نشان داد که ارتباط معنی دار آماری بین هیچ کدام از آللهای نشانگر ریزماهواره و تعداد کلالهها وجود نداشت. به عبارتی، بین چندشکلی مشاهده شده برای نشانگرها و تنوع در تعداد کلاله ارتباط معنیداری مشاهده نشد (جدول ۴).

استیلایی (Estilai, 1978) تنوع در تعداد کلاله بیش از سه کلاله را ناشی از نمو غیر نرمال گلآذین، تنوع کروموزمی یا جهش ژنی نادر فرض نمود. ولی برای بررسی جهش ژنی مطالعه ای انجام نشد. غفاری و باقری (Ghaffari & Bagheri, 2009) براساس مطالعات سیتوژنتیکی و مورفولوژیکی، چنین بیان کردند که این ویژگی ناپایدار بوده و از طریق ژنتیکی کنترل

نمی‌شود. آن‌ها با مطالعه نمو گل آذین و فرآیند گل‌دهی در زعفران نشان دادند که گل‌های با بیش از سه کلاله از طریق امتزاج دو گل یا بیشتر از یک بنه رخ می‌دهد. آن‌ها نشان داد که این صفت در اثر همجواری و ادغام جوانه‌های گل‌دهنده بر روی یک بنه صورت می‌گیرد که در سال‌های بعد برای همان گیاهان تکرارشدنی نیست و ارزش ژنتیکی ندارد (Ghaffari & Bagheri, 2009). مطالعه کروموزم‌ها در سلول‌های مریستمی انتهای ریشه بنه‌های دارای گل‌های نادر و تهیه کاریوتیپ آن‌ها نیز نشان داد که مجموعه کروموزمی آن‌ها مشابه گیاهان طبیعی و شامل ۲۴ بود که وقوع پلی‌پلوئیدی را در این نوع بنه‌ها منتفی می‌سازد.

مشاهده کلون‌های زعفران دارای گل‌های غیر نرمال (بیش از سه کلاله) در یک سال، منتج به تولید گل‌های غیر نرمال در سال‌های بعد نمی‌شود. علاوه براین بر روی بنه‌هایی که دارای گل‌های غیر نرمال هستند گل‌های نرمال دارای سه کلاله وجود دارند. در این مطالعه نیز کلون‌های زعفران با گل‌های غیر نرمال در سال بعد گل‌های نرمال تولید کردند. نتایج این تحقیق نیز بر غیر ژنتیکی بودن تنوع در تعداد کلاله در گل‌های زعفران دلالت می‌نماید.

جدول ٤- ضریب همبستگی اسپیرمن بین تعداد کلاله و داده‌های ژنوتیپی حاصل از نشانگرهای SSR

Table 4- Spearman correlation coefficient between number of stigmas and genotypic data from SSR markers

آلل Allele	ضریب همبستگی r	سطح معنی‌داری P-Value
CSMIC25	0.057	0.680
CSMIC46	0.127	0.361
CSMIC37	-0.127	0.361
CSMIC44	0.127	0.361
ABRIICs20	-0.058	0.677
CSMIC59	-0.249	0.069
ABRIICs21	0.181	0.190
CSMIC53	-0.164	0.236
CSMIC62	0.256	0.062
CSMIC50	0.087	0.534

در سال‌های اخیر، مطالعات زیادی نشان داده‌اند که برخی از تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌توانند به‌صورت پایدار و یا ناپایدار باعث تغییرات فنوتیپی در گیاهان شوند. در مزارع زعفران نیز تنوع فنوتیپی مکرراً مشاهده می‌شود، که چنین تنوع‌هایی همانند تعداد کلاله بیشتر از سه، معمولاً ناپایدار بوده و می‌تواند از یک فصل رشد به فصلی دیگر تغییر کند. با درنظر گرفتن اینکه بیان ژن می‌تواند تحت تأثیر تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی قرار گیرد (Busconi et al., 2015)، تغییرات اپی‌ژنتیکی می‌تواند دلیل احتمالی فنوتیپ‌های متفاوت مشاهده شده در زعفران زراعی باشد.

اندازه ژنوم زعفران بیش از ۱۰ گیگاباز برآورد شده است (Brandizzi & Grilli Caiola, 1998). زعفران نیز همانند سایر ژنوم‌های بزرگ گیاهی حاوی توالی‌های تکراری DNA مانند رتروترنسپوزون‌ها و DNAی ماهواره‌ای هستند. فرض می‌شود که تفاوت‌های اپی‌ژنتیکی که هنوز در زعفران یافت می‌شوند، علی‌رغم سال‌ها کشت و کار در بانک ژرم‌پلاسم، ناشی از علائم اپی‌ژنتیکی پایدار دخیل در خاموشی و کنترل عناصر متحرک باشند، در حالی‌که نشانه های اپی‌ژنتیکی برگشت‌پذیر ممکن است تاکنون در نتیجه شرایط اقلیمی جدید تغییر کرده باشند (Busconi et al., 2015). براساس نتایج تجزیه MS-AFLP، تنوع ژنتیکی اندک (۴/۲۳ درصد) و تنوع اپی‌ژنتیکی بالایی (۳۳/۵۷ درصد) را در درون ژرم‌پلاسم زعفران گزارش شد

(Busconi et al., 2015). آن‌ها فرض کردند که نتایج خوب بدست آمده بوسیله گزینش کلونی زعفران توسط آقایف و همکاران (Agayev et al., 2009) نیز براساس علائم اپی-ژنتیکی پایدار منتقل شده به نتاج از طریق عناصر متحرک باشد. تنوع ژنتیکی در زعفران به احتمال زیاد نتیجه جهش‌های خودبه خودی است و تمام توده ها محتوی ژنتیکی مشابهی را دارند. این امر، فرصت‌های جدیدی را برای تحقیقات بنیادین فراهم می‌نماید و ممکن است زعفران گیاه زراعی انتخابی برای مطالعات اپی ژنتیکی باشد. تغییرات اپی‌ژنتیکی تنها راهی است که گیاه زعفران اتخاذ کرده تا به محیط‌های خیلی متفاوتی سازگار شود، که کشت آن در طول تاریخ گسترش یافته است. از آنجایی که زعفران زراعی عقیم بوده و تنها از طریق تشکیل میتوزی بنه‌ها تکثیر می‌یابند، وضعیت اپی ژنتیکی می‌تواند خیلی پایدار بوده و به گیاهان جدید منتقل شوند. درحالیکه، برخی از تغییرات اپی‌ژنتیکی به محض استقرار می‌تواند در طی زمان پایدار مانده، اما برخی تغییرات دیگر ممکن است موقتی باشند.

ناپایداری مشاهده شده در برخی فنوتیپ‌های متفاوت در زعفران می‌تواند با درنظر گرفتن اساس اپی‌ژنتیکی برگشت‌پذیر توجیه شود. مطالعات بعدی برای مقایسه تنوع اپی‌ژنتیکی که در یک نمونه در سال‌های مختلف رخ می‌دهند مورد نیاز است. تعیین کمی پروفایل تغییرات کروماتینی رهیافت آزمایشی مهمی برای مطالعه اپی‌ژنتیک و مکانیزم‌های نسخه‌برداری است. با روش‌های نوین توالی‌یابی، امکان تجزیه تطبیقی داده های RNA-Seq و ChIP-Seq[1] برای تعیین اثرات تغییرات کروماتین بر بیان ژن غیر افزایشی در هیبریدها و آلوپلوپلوئیدها را فراهم می‌نماید (Ng et al., 2014).

منابع

Abdullaev, F.I., and Espinosa-Aguirre, J.J. 2004. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. Cancer Detection and Prevention 28 (6): 426-432.

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

Babaei, S., Talebi, M., Bahar, M., and Zeinali, H., 2014. Analysis of genetic diversity among saffron (*Crocus sativus*) accessions from different regions of Iran as revealed by SRAP markers. Scientia Horticulturae 171 (0): 27-31.

Beiki, A.H., Keifi, F., and Mozafari, J. 2010. Genetic Differentiation of *Crucus* Species by Random Amplified Polymorphic DNA. Genetic Engineering and Biotechnology Journal 18: 1-10.

Bhandari, P.R. 2015. *Crocus sativus* L. (saffron) for cancer chemoprevention: A mini review. Journal of Traditional and Complementary Medicine 5 (2): 81-87.

Brandizzi, F., and Grilli Caiola, M. 1998. Flow cytometric analysis of nuclear DNA in *Crocus sativus* and allies (Iridaceae). Plant Systematics and Evolution 211 (3-4): 149-154.

Busconi, M., Colli, L., Sánchez, R. A., Santaella, M., De-Los-Mozos Pascual, M., Santana, O., Roldán, M., and Fernández, J.A. 2015. AFLP and MS-AFLP analysis of the variation within saffron Crocus (*Crocus sativus* L.) Germplasm. PLoS ONE 10 (4): e0123434.

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.

1 chromatin immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing (ChIP-seq)

Estilai, A. 1978. Variability in saffron (*Crocus sativus* L.). Experientia 34: 725.

Fluch, S., Hohl, K., Stierschneider, M., Kopecky, D., and Kaar, B. 2010. *Crocus sativus* L.-Molecular Evidence on Its Clonal Origin. Acta Horticulturae 850: 41-46.

Ghaffari, S.M., and Bagheri, A. 2009. Stigma variability in saffron (*Crocus sativus* L.). African Journal of Biotechnology 8 (4): 601-604.

Grilli Caiola, M., Caputo, P., and Zanier, R. 2004. RAPD Analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. Biologia Plantarum 48 (3): 375-380.

Lim, T.K. 2014. *Crocus sativus*. Edible Medicinal and Non Medicinal Plants: Volume 8, Flowers. Springer Netherlands, Dordrecht, p. 77-136.

Magesh, V., Singh, J., Selvendiran, K., Ekambaram, G., and Sakthisekaran, D. 2006. Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and histopathological studies. Molecular and Cellular Biochemistry 287 (1-2): 127-135.

Mir, J.I., Ahmed, N., Khan, M.H., Mokhdomi, T.A., Wani, S.H., Bukhari, S., Amin, A., and Qadri, R.A. 2015. Molecular characterization of saffron-potential candidates for crop improvement. Notulae Scientia Biologicae 7 (1): 81-89.

Nemati, Z., Zeinalabedini, M., Mardi, M., Pirseyediand, S., Marashi, S., and Nekoui, S. 2012. Isolation and characterization of a first set of polymorphic microsatellite markers in saffron, *Crocus sativus* (Iridaceae). American Journal of Botany 99: e340–e343.

Nemati, Z., Mardi, M., Majidian, P., Zeinalabedini, M., Pirseyedi, S.M., and Bahadori, M. 2014. Saffron (*Crocus sativus* L.), a monomorphic or polymorphic species?. Spanish Journal of Agricultural Research 12 (3): 753-762.

Ng, D. W.K., Shi, X., Nah, G., and Chen, Z.J. 2014. High-throughput RNA-Seq for allelic or Locus-specific expression analysis in Arabidopsis -related species, hybrids, and allotetraploids. In: Spillane, C., McKeown, P. C., Eds.), Plant Epigenetics and Epigenomics: Methods and Protocols, Vol. 1112. Springer New York. pp. 33-48.

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 (1): 1-5.

Samarghandian, S., and Borji, A., 2014. Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients. Pharmacognosy Research 6 (2): 99-107.

Sik, L., Candan, F., Soya, S., Karamenderes, C., Kesercioglu, T., and Tanyyolc, B. 2008. Genetic variation among *Crocus sativus* L. species from western Turkey as revealed by RAPD and ISSR marker. Journal of Applied Biological Science 2 (2): 73-78.

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.

Evaluation of genetic variations in saffron with more than three stigmas using SSR and ISSR molecular markers

*Mohammad Ali Behdani[1] and Ali Izanloo[2]**

Submitted: 31 October 2017 **Accepted:** 26 June 2018

Behdani, M.A., and Izanloo, A. 2019. Evaluation of genetic variations in saffron with more than three stigmas using SSR and ISSR molecular markers. Saffron Agronomy & Technology 7(3): 347-357.

Abstract

Saffron is the most valuable spice in the world. It is genetically a monomorphic clone. However, differences in phenotype and quality have been reported. The most important agro-economically phenotypic variation is the appearance of flowers with more than three stigmas. The main objective of this study was to study the genetic variability of saffron clones with more than 3 stigmas using SSR and ISSR molecular markers. In this research, saffron clones with more than three stigmas were collected along with the corm and the root from Saffron fields of Qaen and Sarayan, South Khorassan province, then transferred as a whole to the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agriculture, the University of Birjand. The number of stigmas in each flower was counted. Genomic DNA was extracted according to the CTAB method from leaves of the flower with more than three stigmas. Flower with more than three stigmas was larger and had more petals than ordinary ones. The most frequent number of flowers with more than three stigmas was related to four and five stigmas with 38%. Six-spike samples with a frequency of 14% were observed. Among the collected samples, only one specimen with seven stigmas was observed. Of the 48 tested ISSR primers on the bulk of DNA, only 16 primers had amplified bands and selected. The results of agarose gel electrophoresis for ISSR primers amplified the bands ranged from 100 to 1000 bp. By examining the bands formed for ISSR primers, no significant polymorphism was observed between different clones of saffron. Therefore, based on this marker system, no sign of genetic diversity was observed between clones with different number of stigmas. Among the tested SSR markers, 10 primer pairs showed amplified band among the clones. The results of correlation analysis based on Spearman correlation coefficient showed that there was no statistically significant correlation between microsatellite marker alleles and number of stigmas.

Keywords: Epigenetics, Genetic diversity, Polymorphism

1 - Professor, Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand.
2 - Assistant professor, Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand.
(*- Corresponding author. Email: a.izanloo@birjand.ac.ir)
DOI: 10.22048/jsat.2018.104167.1266