



Investigating the Expression of Some Genes Related to the Production of Apocarotenoids in the Growth Stages of Stigma and Tepal of Cultivated Saffron and Two Wild Species

Mehdi Hassanlou¹, Mohammadreza Azimi Moghaddam^{2*}, Seyed Alireza Salami³, and Ehsan Mohseni Fard⁴

Article type:

Research Article

Article history:

Submitted: 4 March 2023

Revised: 15 May 2023

Accepted: 12 June 2023

Available Online: 12 June 2023

How to cite this article:

Hassanlou, M., Azimi Moghaddam, M., Salami, S.A., and Mohseni Fard, E. 2023. Investigating the Expression of Some Genes Related to the Production of Apocarotenoids in the Growth Stages of Stigma and Tepal of Cultivated Saffron and Two Wild Species. *Saffron Agronomy & Technology*, 11(1): 71-85.

DOI: 10.22048/jsat.2023.387897.1482

Abstract

Saffron (*Crocus sativus* L.) is a highly valued medicinal plant known for its unique characteristics of color, taste, and aroma, attributed to the presence of important compounds such as crocin, picrocrocin, and safranal. In this study, the investigation focused on the *Crocus* genus, particularly the Khazar (*C. caspius*) and Ziba (*C. speciosus*) wild species, as well as the cultivated saffron. The aim of this study was to analyze the expression of six active genes involved in the production pathway of the aforementioned compounds (*ALDH*, *CCD2*, *PSY*, *LYC*, *BCH*, *UGT74*) in two flower tissues (stigma and pistil) at five different stages of the flowering process. Real-time PCR was employed to measure the expression ratios of these genes relative to the first stage (used as a comparison basis) and an internal control gene (*TUB*) using a logarithmic scale (base 2). The results revealed interesting patterns of gene expression. In the stigma of cultivated saffron and the two wild species, *CCD2* expression showed an increasing trend during the later stages of growth. A similar trend was observed in the tepals of the Ziba and Khazar, except for stage 5 where an increase was observed. The *UGT74* gene expression decreased initially in the cultivated stigma but then displayed an overall increasing trend in both wild species, with a similar pattern observed in the tepals. *PSY* gene expression increased in the stigma of both cultivated and wild species, while in the tepals, it increased from the beginning in all species. *LYC* gene expression generally decreased initially but exhibited an increasing trend in both stigma and tepals. The *BCH* gene showed increased expression in stigmas (except in Ziba), decreased expression in cultivated tepals, and increased expression in wild species. The *ALDH* gene displayed a decrease followed by a steady increase in the cultivated stigma, while in Khazar, it increased consistently but did not show a consistent trend in Ziba. These findings suggest the potential presence of valuable active compounds in the studied Iranian wild species. Key words: Crocin, Picrocrocin, Safranal, Khazar Saffron, Ziba saffron.

Key words: Crocin, Picrocrocin, Safranal, Khazar Saffron, Ziba saffron.

1 -Ph.D. Student of Plant Breeding, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

2 -Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

3 -Associate Professor, Department of Plant College of Agriculture and Natural resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

4 -Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

Corresponding author: azimi@znu.ac.ir





مقاله پژوهشی

بررسی بیان برخی ژن‌های مرتبط با ساخت آپوکارتونوئیدها در مراحل رشدی کلاله و تپال در زعفران زراعی و دوگونه وحشی

مهدی حسنلو^۱، محمد رضا عظیمی مقدم^{۲*}، سید علیرضا سلامی^۳ و احسان محسنی فرد^۴

تاریخ دریافت: ۱۳ اسفند ۱۴۰۱

تاریخ بازنگری: ۲۵ اردیبهشت ۱۴۰۲

تاریخ پذیرش: ۲۲ خرداد ۱۴۰۲

حسینلو، م.، عظیمی مقدم، م.ر.، سلامی، س.ع.، محسنی فرد، ا. ۱۴۰۲. بررسی بیان برخی ژن‌های مرتبط با ساخت آپوکارتونوئیدها در مراحل رشدی کلاله و تپال در زعفران زراعی و دوگونه وحشی، زراعت و فناوری زعفران، ۱۱(۱): ۸۵-۷۱.

چکیده

زعفران زراعی *Crocus sativus* L. گیاهی دارویی و پرکاربرد بوده دارای مواد مؤثره مهمی چون کروسین، پیکروکروسین و سافرانال است که ویژگی‌های رنگ، طعم و بو به آن می‌دهند. جستجوی منابع جدید تولیدکننده آپوکارتونوئیدهای مذکور، اهمیت تحقیق روی جنس *Crocus* را آشکار می‌کند. از آنجایی که ایران دارای گونه‌های وحشی دیپلوئید با ویژگی‌هایی نزدیک به گونه زراعی تریپلوئید عقیم است، در تحقیق حاضر گونه‌های زعفران خزر (*C. caspius*) و زیبا (*C. speciosus*)، بررسی و ۶ ژن فعال در مسیر تولید سه ماده مؤثره مذکور (*CCD2*, *ALDH PSY*, *LYC*, *BCH*, *UGT74*) با یک ژن کنترل داخلی (*TUB*) در دو بافت گل، کلاله و تپال و در پنج مرحله از فرایند گلدهی شامل: تشکیل غنچه (غنچه نارس)، غنچه آماده شکفتن، گل تازه باز شده، گل بالغ و گل پیر مورد تحقیق قرار گرفت. با کمک Real Time PCR نسبت بیان ژن‌های مذکور طی چهار مرحله به مرحله اول (مبنای مقایسه) و ژن کنترل داخلی (با الگوریتم برپایه ۲) بررسی و مشاهده شد که بیان *CCD2* بعد از مرحله اول و طی مراحل رشدی بعد در کلاله زعفران زراعی و در دوگونه خزر و زیبا روند افزایشی داشت. همچنین روال تقریباً مشابهی در تپال زیبا، و در خزر جز در مرحله ۵ (افزایش) طی شد. بیان ژن *UGT74* در کلاله زراعی ابتدا کاهش و سپس با روند افزایشی مواجه شد ولی در وحشی‌ها عموماً افزایشی بوده و وضعیت تپال‌ها هم، این چنین بود. بیان *PSY* در بافت کلاله زراعی و وحشی‌ها روند افزایشی داشت. همچنین بیان ژن مذکور در تپال زراعی و وحشی‌ها از ابتدا روند افزایشی داشت. رفتار ژن *LYC* در گونه‌ها عموماً در ابتدا کاهش و با روند افزایشی در کلاله و تپال همراه بود. ژن *BCH* در کلاله‌ها افزایشی (جز در زیبا) و در تپال زراعی کاهش و در گونه‌های وحشی افزایشی بود. بیان ژن *ALDH* در کلاله زراعی ابتدا کاهش و سپس روند افزایشی ثابت رو به پایین و در خزر افزایش ولی در زیبا روند ثابتی نداشت. نتایج حاصل بیانگر احتمال وجود مواد مؤثره گران قیمت در گونه‌های وحشی ایرانی در این مطالعه است.

کلمات کلیدی: پیکروکروسین، زعفران خزر، زعفران زیبا، سافرانال، کروسین.

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲- دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران،

۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران،

۴- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

*- نویسنده مسئول: azimi@znu.ac.ir

مقدمه

کشت زعفران به بیش از ۲۰۰۰ سال قبل از میلاد برمی گردد و احتمالاً از ایران و یونان منشأ گرفته و از آنجا به هند، مدیترانه و شرق اروپا گسترش یافته است (Namayandeh et al., 2012). زعفران زراعی *Crocus sativus* L. جزو خانواده زنبقیان (Iridaceae) است. این خانواده دارای ۶۰ جنس و ۱۸۰۰ گونه بوده و در این بین، جنس زعفران نیز دارای ۸۰ گونه است. این گیاه، علفی و چند ساله، میوه در گونه دیپلوئید، کپسول و دارای تعدادی دانه با پوشش قهوه‌ای یا قرمز رنگ است (Jain et al., 2016) که در کشورهایی با آب و هوای ملایم و خشک، کشت شده دارای نیاز آبی کمی بوده و کاربردهای مختلفی از جمله به عنوان رنگ پارچه، طعم دهنده غذا، و نیز برای درمان سرفه، ناتوانی های گوارشی، سرطان و غیره استفاده می شود (Baba et al., 2015). بسته به گونه های جنس *Crocus* گل ها در پاییز یا در بهار ظاهر شده و گاهی زمستان-گل هستند. گونه های *C. sativus* و *C. cancellatus*، *C. caspius*، *C. speciosus* پاییز گل می باشند (Khansarinejad et al., 2014). یک گل ممکن است یک یا چندین گلچه داشته باشد. زعفران زراعی (*C. sativus*) گیاهی تک لپه ای، است که به علت بزرگ بودن اندازه ژنوم، و داشتن پیچیدگی ژنوم مثل سایر گیاهان این خانواده، دارای اطلاعات ژنومی اندک است (Baba et al., 2015).

معرفی گونه های جنس *Crocus*

براساس برخی شواهد زعفران زراعی ($2n=3x=24$) یک اتوتریپلوئید (Nemati et al., 2019 ; Golshani et al., 2019) بوده و احتمالاً *C. cartwrightianus* جد گونه زراعی است

(Golshani et al., 2019). در مورد آلپلوئیدی زعفران نیز *C. hadriaticus*، *C. oreocreticus*، *cartwrightianus* به عنوان گونه های اجدادی پیشنهاد شده است (Alsayied et al., 2015). در ایران هشت گونه زعفران وحشی به عنوان گیاهان زینتی می روید (Golshani et al., 2019 ; Peterson et al., 2008) و شامل: *C. pallasii*، *C. cancellatus*، *C. caspius*، *C. bilforus* است (Golshani et al., 2019).

زعفران زیبا *Crocus speciosus*

ارتفاع بوته به طول ۱۲ سانتی متر و رنگ تپال ها^۱ بنفش کم رنگ، میله پرچم کمی کرک دار و زرد رنگ و کلاله ها نارنجی است. بیشترین میانگین طول کروموزوم در گونه را دارند $2n=2x=12$. دارای کمترین قرابت ژنتیکی به زعفران زراعی است (Taheri-Dehkordi et al., 2020). این گونه در ناحیه دریای خزر به سمت شرق گرگان مشاهده می شود (Ebrahimzadeh et al., 1998).

زعفران خزر *C. caspius*

یکساله و پراکندگی محدود در دنیا داشته، در ایران فقط در ناحیه شمالی کشور یافت می شود (Tofighi et al., 2017) $2n=2x=24$. ارتفاع آن ۱۲ سانتیمتر است. این گل در چمنزارها و در حاشیه جنگل های منطقه دریای خزر تا ارتفاع ۱۳۰۰ متری می روید. گل ها سفید یا مایل به صورتی و قاعده گل ها در مرکز زرد رنگ و برگ ها ۲-۶ عدد دارای کلاله سه شاخه است (Mathew et al., 1997) (شکل ۱).

همه متحدین^۲ زعفران در جنس *Crocus*، دیپلوئید بوده و برخلاف زعفران زراعی با دانه تکثیر می شوند.

1 - Tepal (کاسبرگ و گلبرگ)

2 - Allies



شکل ۱- سه گونه مورد تحقیق از راست به چپ: زعفران (الف) زراعی، (ب) خزر (پ) زیبا

Figure 1- Three species investigated from right to left: (a) *Crocus sativus* (b) *C. caspius* (c) *C. speciosus*.

تحقیقات جدید بیوشیمیایی، مولکولی، زیست‌فناوری و بیوانفورماتیکی در این زمینه پیش‌تاز است (Vahedi et al., 2017). کلاله‌های زعفران حاوی ترکیبات فعال غیر فرار متعدد همچون زیزانتین^۲، لیکوپن، آلفا و بتا کاروتن‌ها حاصل از آنتوسیانین و کاروتنوئیدهاست. مهم‌ترین آپوکارتنوئیدها که تا ۸ درصد وزن کلاله خشک بوده و حاصل شکست اکسیداتیو زیزانتین می‌باشد و شامل: کروسین^۳ (مسئول رنگ)، پیکروکروسین^۴ (مسئول مزه تلخ) و سافرانال^۵ (مسئول بوی تند آن) است (Jain et al., 2016). ساخت^۶ و تنظیم آپوکارتنوئیدها^۷ (از جمله کروسین‌های قطبی) فرایند پیچیده‌ای است که در طول رشد کلاله زعفران رخ می‌دهد (Zinati et al., 2016) که همزمان با رشد آن تنظیم گشته (Ahrazem et al., 2020) و همبستگی بالایی با فعالیت رونویسی ژن‌های دخیل در تولید کارتنوئید دارد (Castillo et al., 2005) و بیشترین انباشت آپوکارتنوئیدها هم در مرحله سرخ‌شدگی کلاله‌ها روی می‌دهد (Mir et al., 2012). ترکیبات آپوکارتنوئید با شکست اکسیداتیو

زعفران زراعی به علت ماهیت تریپلوئیدی آن عقیم بوده و به روش غیرجنسی (توسط بنه^۱) تکثیر و در نتیجه ویژگی‌های ژنتیکی آن ثابت مانده و اصلاح به روش سنتی محدود می‌شود (Vahedi et al., 2017; Baba et al., 2015). تفاوت‌های فنوتیپی در داخل زعفران زراعی، تکثیر غیرجنسی آن موجب می‌شود تنوع ژنتیکی در جمعیت محدود و اصلاح ژنتیکی جز با انجام گزینش (تا حدی)، پیشرفت چندانی نداشته و روش اصلاح سنتی نیز راهگشا نبوده است (AlaviSiney et al., 2015). همچنین به دلیل اهمیت حفظ ذخیره ژنتیکی و گونه‌های خویشاوند و غنای آن‌ها در کشور و از طرفی بروز مشکلاتی همچون خشکسالی فزاینده و چرای بیش از حد (Golshani et al., 2019) و همچنین به عنوان منبع احتمالی جایگزین برای آپوکارتنوئیدها و احتمال وجود رهیافت‌های مشترک با گونه زراعی، ارزش مطالعه بر روی گونه‌های وحشی آشکار می‌شود (Taheri-Dehkordi et al., 2020). علی‌رغم تولید بالا و اهمیت زیاد زعفران در کشور، توجه شایسته‌ای در بخش تحقیقاتی به آن نشده درحالی که کشور اسپانیا در انجام

5 - Safranal
6 - Biosynthesis
7 - Apocarotenoid

1 - Corm
2 - Zeaxanthin
3 - Crocin
4 - Picrocrocin

MVA^۶ با کمک آنزیم بتا کاروتنوئید هیدروکسیلاز کاتالیز می‌شود که توسط ژن *BCH* کد شده و نهایتاً زیزانتین حاصل می‌شود (Mir et al., 2015; Castillo et al., 2005). PSY آنزیم تنظیمی کلیدی در بیهو سنتز کاروتنوئید است و اولین واکنش مهم تولید فیتون را کاتالیز می‌کند (Ahrazem et al., 2020). علاوه بر *CsPSY2* وجود سه ژن *PSY* دیگر در زعفران نشانگر کارکردهای ویژه در (واکنش‌های) تعادل^۷ کاروتنوئید و آپوکاروتنوئید است (Ahrazem et al., 2020). آهرازم و همکاران (Ahrazem et al., 2020) بیان نمودند که سه ژن مشابه با *PSY* از تپال‌ها و کلاله‌های گونه *C. ancyrensis* با ترانس کریپتوم‌های *C. sieberi* یکسان و تنها یکی از آن‌ها که با یکی از ژن‌های *C. ancyrensis* یکسان بود، افزایش بیان داشت (بیش از ۳/۹ برابر) در مراحل ۶ و ۸ (در بین مراحل رشدی معین غنچه از ۱ تا ۹) افزایش بیان ژن *CaPSY-II* با انباشت کروسین‌ها در گل‌های *C. ancyrensis* ادامه می‌یابد و بیانگر درگیری اختصاصی آن در انباشت کروسین دارد (Ahrazem et al., 2018). بتاکاروتن با دو حلقه از طریق حلقوی شدن لیکوپن با کمک آنزیم لیکوپن-بتا-سیکلاز^۸ (*LYC*) ساخته می‌شود (Ji et al., 2017).

در تحقیق حاضر سعی شد، بیان ژن‌ها در گونه‌های وحشی زعفران ایرانی در مراحل مختلف رشدی و در اندام‌های مختلف کلاله و تپال (کا سبرگ و گلبرگ) بررسی و تفاوت‌های احتمالی بین گونه زعفران زراعی با ارقام وحشی آن (*C. caspius* و *C. speciosus*) در خصوص بیان ژن^۷ (یک ژن خانه دار *TUB*^۹ به عنوان ژن کنترل داخلی)، *ALDH*، *BCH*^{۱۰}، *CCD2*، *LYC*، *PSY*^{۱۱}، *UGT74* دخیل در مسیر ساخت سه ماده مذکور در دو

زیزانتین با کمک آنزیم‌های *CCD*^۱، *ALDH*^۲ و *UGT*^۳‌ها در چند مرحله حاصل می‌شود (Shu et al., Baba et al., 2015b; 2020). سپس پیکروکروسین به سافرانال (از طریق افزایش گرما) و β -GS^۴ (Baba et al., 2015b; Shu et al., 2020) تبدیل می‌شود. در مسیر کروسین، کروسین از شکست اکسیداتیو زیزانتین در موقعیت‌های ۷ و ۷/۸ پریم و ۸ پریم با کمک آنزیم *CCD* حاصل می‌شود (Ji et al., 2017). مشخص شده که چهار ژن (*ALDH*، *UGT*، *CCD* و β -GS) آپوکاروتنوئیدهای مشخصی را بعد از شکست کاروتنوئیدها تولید می‌کنند (Yue et al., 2020). محصول شکست کروسین دالدهید توسط *ALDH* و *UGT*‌ها دئیدروژنه و گلیکوزیله شده تبدیل به کروسین می‌شود (Ji et al., 2017). *ALDH*‌ها می‌توانند تبدیل کروسین دالدهید را به کروسین کاتالیز کنند (Ji et al., 2017). در گونه *C. ancyrensis* بیان^۵ *CaCCD2* با انباشت کروسین همبسته می‌باشد (Ahrazem et al., 2016; Ji et al., 2017).

در کلاله زعفران زراعی مرحله نهایی شامل گلیکوزیلاسیون محصولات شکست زیزانتین با کمک آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز^۲ است که توسط ژن *CsUGT2* در کروموپلاست کلاله‌ها انجام و سپس به داخل واکوئل مرکزی کلاله‌های کاملاً رسیده انتقال می‌یابد (Mir et al., 2015). در زعفران زراعی مشخص شد که کروسین می‌تواند توسط *UGTs2* گلیکوزیله شود (Moraga et al., 2004). باتوجه به همبستگی بین سطوح متابولیت‌های ثانویه و بیان ژن‌های مسیر اختصاصی تصور بر این است که سایر آنزیم‌های *UGT* احتمالاً مسئول بیوسنتز کروسین در گیاه یاسمن (*G. jasminoides*) هستند (Ji et al., 2017). هیدروکسیلاسیون بتاکاروتن در مسیر

7 - Homostasis

8 - lycopene β cyclase

9 - Tubulin

10 - Beta carotene hydroxylase

11 - Phytoene synthase

1 - Carotenoid cleavage dioxygenase

2 - Aldehyde dehydrogenase

3 - Glucosyltransferase

4 - β Glucosidase

5 - carotenoid cleavage dioxygenase

6 - Mevalonic Acid Pathway

مواد و روش‌ها

گیاهان مورد استفاده در این تحقیق شامل یک گونه زراعی *C. sativus* و دو گونه وحشی خزر *C. caspius* و زیبا *C. speciosus* در سال ۱۴۰۰ و از مزرعه تحقیقاتی و باغ بوتانیک دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شد. گل‌ها به صورت کامل از هر بوته و در مراحل مختلف رشدی (۱): ابتدای غنچه‌دهی تا مرحله ۵: پلا سیدگی (شکل ۲) برداشت و در نیتروژن مایع قرار و سپس به فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل و برای زمان استخراج RNA حفظ شدند.



شکل ۲ - پنج مرحله رشدی گل مورد مطالعه در این تحقیق (زعفران خزر)
Figure 2- Five developmental stages used in this study (*C. caspius*).

دنا زیست (DENA ZIST ASIA, IRAN) انجام شد.

تعیین کیفیت RNA استخراج شده

جهت اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، الکتروفورز افقی در بستر ژل آگارز^۱ در صد (۵/۵ گرم آگارز^۲) با ۵۰ میلی لیتر بافر (TBE^۳ 0.5X) استفاده شد. جهت قابلیت مشاهده یک میکرولیتر رنگ^۴ به میزان ۵ میکرولیتر در ۵۰ میلی لیتر ژل مایع استفاده شد. لدر^۵ (100s+3Kb) در انتهای ژل تزریق شد.

استخراج RNA

نمونه‌های منجمد در ۸۰- درجه سانتیگراد، بطور همزمان در دو هاون سرد خشک (یکی برای کلالة‌های بسیار ظریف و نخ‌مانند و یکی برای تپال‌ها) برداشت و در حضور ازت مایع، کوبیده شده و پودر حاصل با استیل‌های سرد استریل در داخل تیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری و مستقر درروی یخ ریخته شده و تیوب به داخل ازت مایع انتقال یافت. ادامه استخراج RNA براساس کیت شرکت دنا زیست ستونی^۱ (کیت استخراج شرکت

4 - safe stain
5 - Ladder

1 - Column RNA Isolation Kit
2 - Agarose
3 - Tris-Borate-EDTA

تعیین کمیّت RNA استخراج شده نانودراپ

۳۰ نمونه RNA حاصل، جهت تعیین کمیّت RNAهای استخراج شده^۱ با دستگاه نانودراپ (Thermo NANODROP 2000c) سنجیده و از طریق گرافهای حاصل قضاوت شدند. RNA بیشترین جذب خود را در ۲۶۰ نانومتر داشته و نسبت جذب در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای بررسی خلوص RNA استفاده می‌شود (۲۸۰ طول موج اختصاصی پروتئین است) (Mir et al., 2015). مقادیر نسبت طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر جذب نور فلئور سنت از ۱/۶۵ تا ۲/۱۴ متغیر بود که برای تهیه cDNA استفاده شد. با توجه به نتایج نانودراپ مقادیر کمی متفاوت غلظت RNA نمونه ها نرمال^۲ شدند.

ساخت cDNA

قبل از تبدیل RNA استخراج شده به cDNA به منظور انجام Real Time PCR، و نیز جهت حذف مقادیر اندک DNA ژنومی باقی مانده در محتوی RNA استخراج شده، یک میکرولیتر آنزیم DNAase I RNAase free شرکت فرمنتاز را با یک میکرولیتر Buffer به یک میکروگرم RNA استخراج شده اضافه و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۰ دقیقه (جهت فعال سازی DNAase) انکوبه شد. سپس یک میکرولیتر EDTA ۵۰ میلی مولار (برای غیرفعال سازی DNAase) افزوده و در دمای ۷۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. تهیه cDNA مطابق با cDNA kit SMOBIO و سنتز cDNA با ۰/۵ میکروگرم انجام و الیگو (18) dT و نیز پرایمرهای تصادفی ۶ نوکلئوتیدی (Random primer) و نیز dNTP استفاده شد. کیت مذکور حاوی آنزیم ExcelRT™ Reverse Transcriptase است.

cDNA حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد جهت مطالعه بیان ژن نگهداری شد (Mir et al., 2012). جهت تعیین دوباره غلظت cDNA و بطور تصادفی از چند نمونه دوباره نانودراپ انجام شد.

طراحی پرایمر

با توجه به اینکه گونه‌های وحشی مورد بررسی در این تحقیق داده‌های کافی در پایگاه بین المللی^۳ NCBI ندارند و توالی یابی^۴ کاملی از آن‌ها نیز تاکنون انجام نشده، آغازگرها براساس نواحی حفاظت شده تمام توالی‌های مربوط به هر ژن موجود در بانک ژن NCBI طراحی و در نرم افزار Vector NTI^۵ و Oligo7 مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). در نهایت آغازگرهای طراحی شده برای ارزیابی اختصاصی بودن در نرم افزار Primer Blast سایت NCBI مورد آزمون قرار گرفتند.

واکنش Real Time PCR^۵

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه واکنش Real Time PCR با استفاده از کیت شرکت Roche صورت گرفت. پلیت‌های ۹۶ چاهکی با دستگاه Light Cycler96 (Roche Diagnostics) استفاده شد و واکنش‌های سه تایی (سه تکرار تکنیکال)، براساس دستورالعمل MIQE^۶ و نظر باستین (Bustin et al., 2009) اقدام و هر تیوب حاوی ۴ میکرولیتر Evagreen Master 5X، ۲ میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای اختصاصی رفت و برگشت (با غلظت یک پیکومول بر میکرولیتر) و ۱۲ میکرولیتر آب DEPC (تهیه شده به نسبت ۱ به ۱ با H₂O)، در حجم کل واکنش به میزان ۲۰ میکرولیتر تهیه و چرخه دمایی استفاده شده شامل، دمای واسرشت سازی و نیز حذف گروه‌های متوقف کننده در

5 - Polymerase chain reaction
6 - Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment
7 - Diethylene Pyro Carbonate

1 - Quality Control
2 - Normalization
3 - National Center for Biotechnology Information
4 - Sequencing

دمای بالا، ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۹۰۰ ثانیه، سپس سه مرحله: ۱- ۹۵ درجه برای ۱۵ ثانیه ۲- ۶۰ درجه برای ۲۰ ثانیه ۳- ۷۲ درجه برای مدت ۲۰ ثانیه که ۴۰ دوره تکرار شد. سپس با یک دوره تفکیک، با دمای ذوب ۹۵ درجه برای ۱۰ ثانیه، ۶۵ درجه برای ۶۰ ثانیه، ۹۷ درجه برای یک ثانیه انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده

Table 1- Sequences of primers were used in this study

ردیف Row	نام آغازگر Primer name	شماره دسترسی Accession number	توالی آغازگر Primer sequence	طول آغازگر Pr. Length	طول ژن Gene length	نام ژن Gene name
1	CCD2-F	MT780568.1	TGGACCTGCCCTTGTATTTC	20	118	Carotenoid cleavage dioxygenase
2	CCD2-R	KJ541749.1	TGCTCGTCTTTTGCATATCG	20		
3	ALDH-F	KU577904.2	CTTCGGAAATTGCACCTGCC	20	88	Aldehyde dehydrogenase
4	ALDH-R	MF596165.1	CCCTCGACAACCTCTTACGCA	20		
5	UGT74-F	KX398933.1	GATGTGTGGAGGAGGTGATG	20	122	Glucosyltransferase
6	UGT74-R	MN688236.1	CTTGATACACTTGTTCAGAACTCC	23		
7	PSY2-F	MH124239.1	AACCGATGAACCTGTGGATGG	21	251	Phytoene synthase
8	PSY2-R	MH124239.1	CATAGTAGCAATACAGATAGAGC	23		
9	BCH-F	AY579207.1	CGACTTGCCCTACTTCCAG	19	141	Beta carotene hydroxylase
10	BCH-R	AY579207.1	ACCTCCTTCTCCAGCTCTT	19		
11	LYC-F	GQ202142.1	TTCCAACCTTCCTCTACGCA	20	152	Chromoplast-specific lycopene beta cyclase
12	LYC-R	GQ202141.1	CACACGCTTCACTTTGATTCC	21		
13	TUB-F	AJ489275.1	CCATAAGTTTGATCTCATGTATGC	24	101	Tubulin
14	TUB-R	AJ489275.1	CAAGGTCCTCACGAGCCT	18		

نتایج و بحث

مشخص شد سطوح بیان، به موازات انباشت ترکیبات آپوکارتونوئید صورت نمی‌گیرد پس مشخص می‌شود که تشکیل این ترکیبات در سطوح مختلف کنترل می‌شود، همچون بیان ژن *CCD2* که ژن کلیدی در این مسیر است (Frusciante et al., 2014; Shu et al., 2020; Mir et al., 2015; Rubio-Moraga et al., 2009). یو و همکاران (Yue et al., 2020) نیز مشخص کردند، ژن *CCD2* در مقادیر بالا در کلالة بیان و در مطالعه پیش‌بینی وجود کروستین، الگویی تقریباً مشابه طی شده و پس از مرحله اول، کاهش بیان مشاهده می‌شود. همچنین در مطالعه میر و همکاران (Mir et al., 2012) مشابه با مطالعه حاضر آن‌ها Real Time PCR با RNA های خالص شده کلالة‌ها در مراحل سه‌گانه را انجام داده و انباشت نسخه‌های RNA مطابق مراحل رشدی کلالة را ثابت کردند. مقدار پیکروکروستین در مرحله رنگ نارنجی کلالة ۲/۵ برابر رنگ زرد و در زمان سرخی ۴ برابر زمان نارنجی افزایش داشته و کروستین ۱۰ و ۳ برابر و نیز

در مطالعه حاضر بیان ژن‌ها در ۵ مرحله رشدی مختلف در دو بافت متفاوت کلالة و تپال و درگونه زعفران زراعی *C. sativus* و دو گونه وحشی زعفران خزر *C. caspius* و زیبا *C. speciosus* به عنوان گونه‌های بومی ایران به طور همزمان بررسی شد. در کلالة زراعی بیان *CCD2* در مرحله دوم (مرحله قرمز خیلی کم‌رنگ) در مقایسه با مرحله اول (مبنای مقایسه) کاهش و طی مراحل رشدی بعدی روند رو به افزایش و در نهایت کاهش را تجربه کرد (هرچند مقدار عددی بیان در روند یادشده نسبت به مرحله مینا کم بوده است). این روند در کلالة خزر (همراه با افزایش مقادیر عددی نسبت به مینا) رعایت ولی در زیبا حالت افت و خیز (کاهش - افزایش) داشت. الگوی انباشت آپوکارتونوئیدهای کروستین، پیکروکروستین و کروستین‌های متفاوت در مراحل مختلف رشدی کلالة‌ها در سال ۲۰۰۵ توسط کاستیلو و همکاران (Castillo et al., 2005) نیز بررسی و

سافرانال ۸ و ۴ برابر به ترتیب از رنگ زرد به نارنجی و از نارنجی به سرخ افزایش نشان داده و مشخص شد که انباشت کارتنوئیدها در طول فرایند مذکور به بیشترین مقدار خود در زمان شکفتن غنچه‌ها می‌رسد همچون بیان ژن‌ها در مطالعه کنونی (همپوشانی حداقل ۲ تا ۳ مرحله از ۵ مرحله). مطابق انتظار بالاترین سطوح ژن مورد مطالعه در مرحله سرخی مشاهده شد مطابق با گونه‌های خزر و زیبا و قبل از مرحله پیری. چنین نتیجه‌ای را قبلاً کا ستیلو و همکاران (Castillo et al., 2005) نیز حاصل کرده بودند و بیانگر افزایش بیان ژن با انباشت آپوکارتنوئیدها به موازات هم است (Bustin, 2000; Mir et al., 2012). در مطالعه با ستین و همکاران (Bustin et al., 2000) افزایش بیان ژن مورد نظر نسبت به ژن توبولین (ژن خانه‌دار^۱) در مرحله زردشدگی، نارنجی و سرخ‌شدگی کلاله به ترتیب ۰/۶۹، ۰/۹۰، و ۲/۶۹ بود. طی Real Time انجام شده بیان ژن مورد نظر ($CsZCD^2$) بطور منظم از مرحله زردی کلاله و تا سرخ‌شدگی از میزان ۸ درصد تا ۳۳ درصد افزایش یافت (Mir et al., 2012). در این مطالعه بیان ژن $CCD2$ در تپال‌های خزر و زیبا پس از مرحله اول تقریباً ثابت ماند (البته با توجه به عدم وجود داده در مرحله اول رشدی تپال زراعی و علی‌رغم وجود بیان ژن مذکور در مراحل رشدی بعدی و بنابر قرار مقایسه با مرحله اول، نمودار مطلوبی حاصل نشد). کروسین‌ها در گل‌های گونه وحشی *C. sieberi* در کلاله‌ها و نیز در تپال زرد انباشته می‌شود که آهرازم و همکاران (Ahrazem et al., 2018) تعیین کردند در کرموپلاست‌های تبدیل یافته از آمیلوپلاست قرار دارد. جهت فهم فرایندهای مرتبط با بیوسنتز کروسین آهرازم و همکاران (Ahrazem et al., 2018) ترانسکریپتوم تپال *C. sieberi* را در دو بخش رنگی متفاوت (سفید و زرد) و در دو مرحله رشدی (۶ و ۸) را با توالی یابی ایلومینا Illumina بررسی و مشخص کردند،

کرموپلاست‌ها حاوی کروسین (به عنوان آپوکارتنوئید) غالب هستند در حالی که کروسین‌ها در واکوئل انباشته می‌شوند (Ahrazem et al., 2018). همچنین تعداد ۹ مرحله مختلف رشدی گل (قبل از شکفتن) در *C. sieberi* بررسی و به منظور درک مکانیزم تنظیم دخیل در رسوب آپوکارتنوئید در تپال‌های گونه *C. sieberi* در مراحل رشدی قبل شکوفه‌دهی (در دو مرحله ۶ و ۸) که تمایز رنگی ایجاد می‌کنند از تحلیل ترانسکریپتوم استفاده و مشخص شد تحلیل‌های ترانسکریپتوم انجام شده در *C. sieberi* مشابه موارد در بافت‌های مختلف زعفران زراعی بوده است (Ahrazem et al., 2018). مشخص شده که بیان $CCD1$ در بین اندام‌های مختلف یاسمن (*Gardenia jasminoides*) تغییر نکرده، در حالی که $CCD4b$ بیشترین بیان را در برگ‌ها داشت و بیانگر این است که $CDD4a$ در بیوسنتز کروسین نقش داشته و مشخص شده که $CCD4a$ از $CsCCD2$ موجود در زعفران متفاوت است (Ji et al., 2017). جالب اینکه تنها همولوگ‌های $CCD1$ در بافت‌های زرد رنگ کاهش بیان داشته و در بافت مرحله ۸ رشد گل (از بین مراحل ۱ تا ۹) افزایش بیان داشتند در حالی که سایر ترانسکریپت‌های $CCDs$ یک القای معناداری در نمونه‌های مرحله ۸ زرد رنگ نشان دادند (Ahrazem et al., 2018). در مطالعه (Ahrazem et al., 2018) قسمت تحتانی تپال با رنگ زرد روشن بیانگر انباشت کروسین است و از آنجایی که در مطالعه حاضر تمام قسمت‌های تپال مورد استفاده قرار گرفت مطابقت با مطالعه یاد شده محتمل است. همچنین در مطالعه شو و همکاران (Shu et al., 2020) ژن $CCD2$ تنها در کلاله بیان شده و در سایر بافت‌های گیاهی (تپال و پرچم) دیده نشد. رویکرد عدم بیان (مقادیر صفر) در مراحل ۲ و ۳ در هر دو گونه وحشی در این مطالعه و کاهش بعدی در خزر و افزایش جزئی، آن هم در مرحله پیری زیبا

می‌تواند با مورد فوق مطابقت یابد.

در مطالعه حاضر با توجه به انتظار ثبات بیان ژن *TUB* در همه بافت‌ها، ژن مذکور به عنوان ژن کنترل داخلی^۱ و پایه مقایسات در نظر گرفته شد. در تحقیق میر و همکاران (Mir et al., 2015) نیز بیان ژن‌ها با نسبت (چند برابر^۲) بیان *TUB* مقایسه شد. همچنین در مطالعه (Ji et al., 2017) اکتین (*Actin*) و *GAPDH* به عنوان ژن‌های کنترل داخلی استفاده شدند. در این مطالعه، در کلاله گونه زراعی بیان *ALDH* ابتدا کاهش بعد با روند افزایشی (روند کلی بیان ژن‌ها از ابتدا به انتها) ادامه یافت (با مقادیری کمتر از مبنا) ولی در خزر از ابتدا روند افزایشی مشاهده شده و در زیبا روند کاهشی روی داد. در تپال زراعی تا حدی می‌توان روند افزایشی بعد از افت اولیه زیر مقدار مبنا را ملاحظه نمود. در حالی که در خزر افت قابل ملاحظه اولیه بعداً جبران نشده ولی به سختی روند افزایشی را می‌توان ملاحظه نمود و در زیبا نیز مقادیر بیان بالاتر از مبنا و مثبت بود. در بررسی ترانسکریپتوم *C. sieberi* تعداد ۱۲ ترانسکریپت با ژن *ALDH* یکسانی نشان دادند ولی تنها یکی در نمونه‌های زرد رنگ افزایش بیان نشان داد که بیانگر شمولیت آن در بیوسنتز کروسستین در این نمونه‌هاست. کروسستین بعداً با آنزیم‌های گلوکوزیل ترانسفراز تغییر بیشتتری حاصل می‌کند (Ahrazem et al., 2018) کروسین فرم گلیکوزیده کروسستین است (Fernandez, 2004).

هرچند آنزیم‌های *ALDH* و *UGT* احتمالاً مسئول بیوسنتز کروسین شناخته می‌شوند ژن‌هایی که در زعفران زراعی دقیقاً این آنزیم‌ها را کد می‌کنند به ندرت موضوع آنالیزهای کاربردی قرار می‌گیرند (Ji et al., 2017). در مطالعه حاضر بیان ژن *UGT74* در کلاله زراعی در سه مرحله دوم، سوم و پنجمین مرحله رشد نسبت به مرحله اول (مبنای مقایسه) کاهش بیان و

در چهارم (رسیدگی کامل کلاله) افزایش بیان داشته است. این درحالی است که در کلاله‌های دو گونه وحشی ژن‌ها عموماً در هر چهار مرحله بعد از اولین مرحله نسبت به آن، بیان مثبت داشتند و در هر سه در مرحله پیری بیان به حداقل خود رسیده است. آهرازم و همکاران (Ahrazem et al., 2018) نیز در مطالعه خود روی زعفران زراعی تعیین نمودند که ترانسکریپت *CsUGT2* به ترتیب ۹ و ۱۳ مرتبه افزایش بیان در مراحل رشدی ۶ و ۸ (از بین ۱ تا ۹ مرحله رشدی گل) در ترانسکریپتوم داشتند. انتظار بر این است که محصول بیان ژن *UGT74* مورد استفاده در این تحقیق (از بین سایر ایزوفورم‌های ژن *UGT* در مسیر بیوسنتزی) در مراحل بعدی کلاله ظاهر شود که بنابر داده‌های حاصل در اینجا، تا حدی می‌توان چنین احتمالی را مطرح کرد. در بافت تپال نیز در گونه زراعی برعکس بافت کلاله در مرحله پنجم (پیری) رشدی کلاله، افزایش بیان *UGT74* نسبت به مرحله اول ملاحظه شده و در مراحل اولیه (۲، ۳ و ۴) مثل کلاله کاهش بیان مشاهده شده و در تپال‌های گونه وحشی خزر الگوی مشابه و در زیبا افزایش بیان - جز در ۴ وجود داشت.

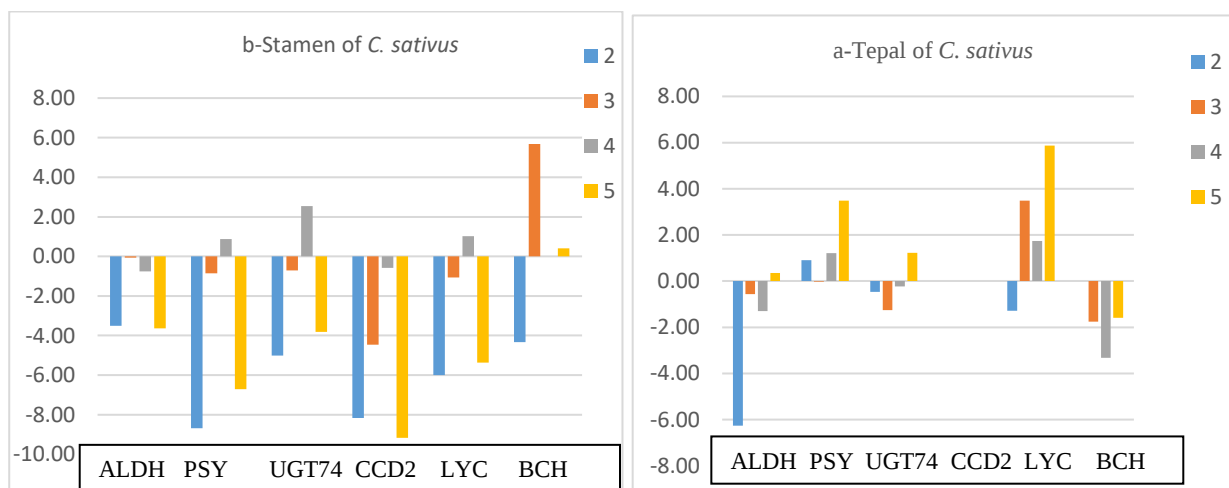
بیان ژن *LYC* در کلاله زراعی بعد از کاهش شدید اولیه (نسبت به مرحله ۱) روند رو به تزاید داشته و در مرحله چهارم مثبت شده ولی مطابق با انتظار کلی، در مرحله پیری کاهش بیان پیدا کرد. سایر گونه‌ها نیز الگویی تقریباً مشابه را پیروی کردند. همین وضعیت برای تپال‌ها نیز رعایت شد. میر و همکاران (Mir et al., 2012; Mir et al., 2015) بیان نسبی ژن‌های *CsLYC* و *TUB* در بین دو گیاه انتخابی زعفران خوراکی در مرحله قرمزی کلاله را بررسی و مشخص کردند ژن *CsLYC* به میزان ۰/۷ و ۰/۳ برابر *CsTUB* در ژنوتیپ‌های مورد نظر بیان داشت. نشان داده شد که تغییر در محتوای آپوکارتونوئید احتمالاً بخاطر سطوح بیان متفاوت ژن *CsLYC* بین ژنوتیپ‌ها بوده است

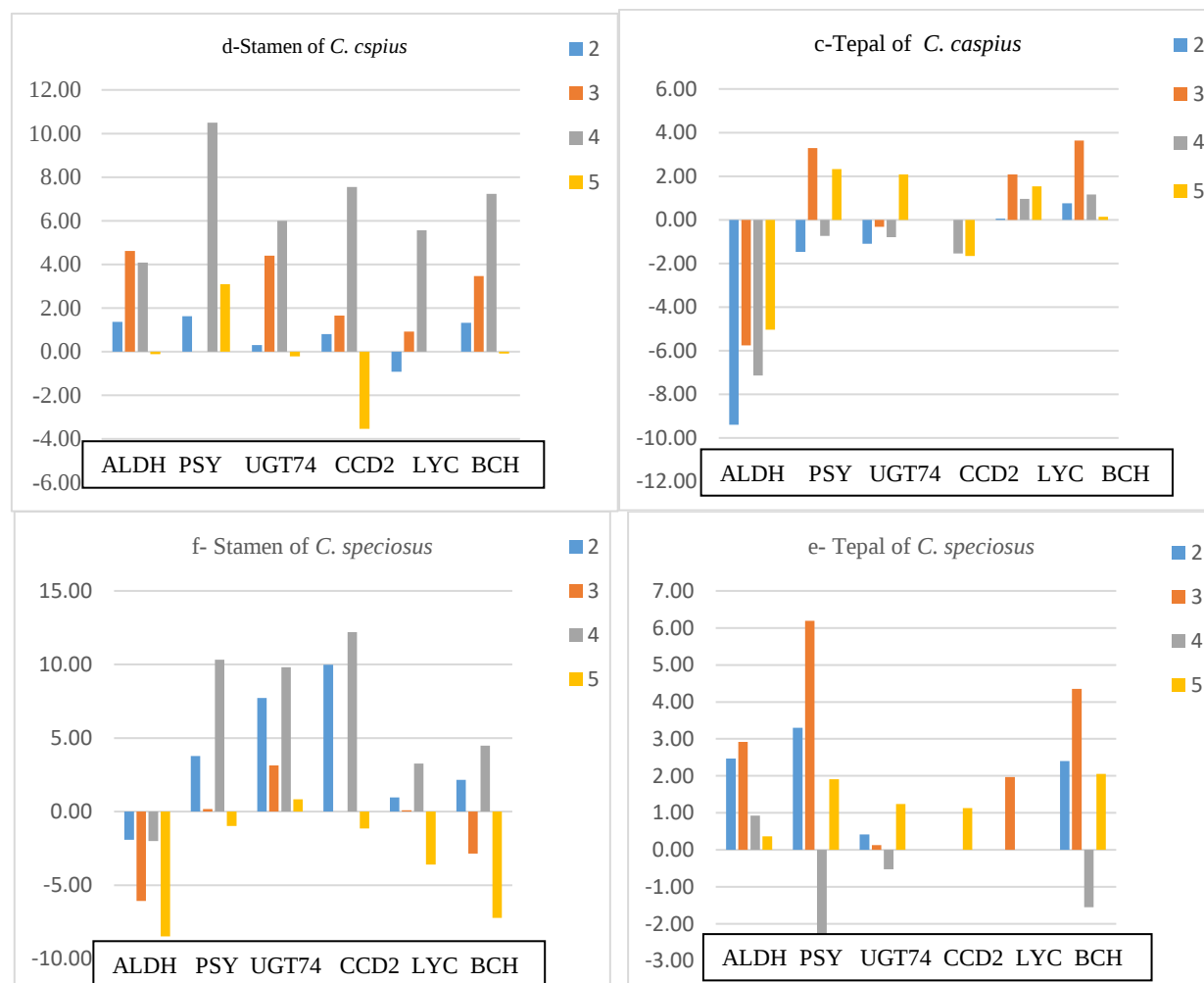
شامل مسیر بیوسنتز کارتوئید ویژه کرمپلاست است جایی که آنزیم *CsPSY2* مرحله اول کاتالیز در ساخت کارتوئید را انجام و به همراه آنزیم های *CsBCH2.CsLYC-B2* و *CCD2* ساخت آپو کارتوئید های رنگی را انجام می دهند (Ahrazem et al., 2020).

الگوی بیان ژن *BCH* در گونه زراعی و در مرحله دوم رشدی کاهش و در دو مرحله بعدی افزایش یافت. این در حالی است که در گونه خزر در تمام مراحل افزایشی و در گونه زیبا در مراحل ۲ و ۴ افزایش و در مراحل ۳ و ۵ کاهش یافت. در بافت تپال گونه زراعی مدل همواره کاهش یافته بوده ولی در خزر افزایش و در زیبا جز در مرحله ۴ بقیه مراحل مثل گونه خزر افزایش داشته و تقریباً الگوی یکسانی بین دو گونه وحشی شاهد هستیم.

(Mir et al., 2015). لیکوپن بتا سیکلاز که محصول ژن *CsLYC* است حلقوی سازی لیکوپن را به بتاکارتن کاتالیز می کند. بتا کارتن و زیزانتین پیش ماده های مهم آپو کارتوئید زعفران در مسیر MVA هستند (Mir et al., 2015).

در مطالعه کنونی میزان بیان *PSY* در بافت کلاله نسبت به اولین مرحله (سرخی بسیار اندک) در سه مرحله کاهش و فقط در مرحله (۴) مثبت بود (روند افزایش از منفی به سمت مثبت) در حالی که در هر دو گونه وحشی هم مقدار بیشتر (مثبت) و هم روند افزایشی داشته است (جز مرحله پیری (۵) در گونه زیبا). در تپال های زراعی و خزر *PSY* افزایش بیان و در زیبا روند قابل دسته بندی مشخصی مشاهده نشده و روندی از افزایش و کاهش بیان ملاحظه می گردد (شکل ۳). بیوسنتز کروسین ها در زعفران





شکل ۳- نمودارهای بیان ۶ ژن مورد مطالعه (*CCD2*, *ALDH*, *PSY*, *LYC*, *BCH*, *UGT74*) در دو بافت تپال و کلاله در پنج مرحله رشدی گل (غنچه اولیه: ۱، غنچه آماده برای شکفتن: ۲، گل تازه باز شده: ۳، گل کامل: ۴، گل پیر: ۵) - نسبت بیان چهار مرحله به مرحله اول رشدی گل

سنجیده و در لگاریتم پایه ۲ محاسبه و ترسیم شده است. در سه گونه زعفران مورد مطالعه زراعی *C. sativus*، خزر *C. caspius* و زیبا *C. speciosus*

(a) تپال زراعی *C. sativus* (b) کلاله زراعی *C. sativus* (c) تپال خزر *C. caspius* (d) کلاله خزر *C. caspius* (e) تپال زیبا *C. speciosus* (f) کلاله زیبا *C. speciosus*

Figure 3- Diagrams of 6 genes were used in this study (*CCD2*, *ALDH*, *PSY*, *LYC*, *BCH*, *UGT74*) in two tepal and stamen tissues and 5 developmental stages (budding-pre-anthesis, anthesis, adult flower, and old flower) - 4 stages expression ratio to first growth stage calculated in 2 base logarithm and has been drowned: Stages 2,3,4 and 5 in three species *C. sativus*, *C. caspius*, *C. speciosus* (a) Tepal of *C. sativus* (b) Stamen of *C. sativus* (c) Tepal of Khazar *C. caspius* (d) Stamen of Khazar *C. caspius* (e) Tepal of Ziba *C. speciosus* (f) Stamen of Ziba *C. speciosus*.

نتیجه گیری

نمی‌رود که الگوی مشابه در همه ژن‌ها و در تمام مراحل بطور هماهنگ با نوع زراعی دیده شود. موضوع فوق زمینه مطالعاتی جدید برای جستجوی مواد مؤثره گران قیمت خصوصاً کرو سین در گونه‌های بومی ایران زمین بوده توانایی معرفی منابع جدید با قابلیت دست‌ورزی ژنتیکی را فراهم می‌نماید.

آپوکارتونوئید کروستین و مشتقات گلیکوزیده زرد رنگ آن (کروسین‌ها) تقریباً در کلاله گل‌های همه انواع زعفران زراعی وجود دارند. بنابراین حصول بیان ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی آپوکارتونوئیدها در گونه‌های وحشی ایرانی در این مطالعه، مؤید موضوع فوق در گونه‌های مذکور بوده هرچند انتظار

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از رئیس محترم آزمایشگاه مرکزی

دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و بخش ژنومیکس تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

- Ahrazem, O., Argandona, J., Fiore, A., Aguado, C., Lujan, R., Rubio-Moraga, A., Marro, M., Araujo-Andrade, C., Loza-Alvarez, P., Diretto, G., and Gomez-Gomez L. 2018. Transcriptome analysis in tissue sectors with contrasting crocins accumulation provides novel insights into apocarotenoid biosynthesis and regulation during chromoplast biogenesis. *Scientific Reports* 8 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21225-z>.
- Ahrazem, O., Argandona, J., Fiore, A., Rujas, A., Rubio-Moraga, A., Castillo, R., and Gomez-Gomez L. 2019. Multi-species transcriptome analyses for the regulation of crocins biosynthesis in *Crocus* 20 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5666-5>.
- Ahrazem, O., Lopez, A.J., Argandona, J., Castillo, R., Rubio-Moraga, A., and Gomez-Gomez, L. 2020. Differential interaction of proteins with the PSY enzymes in saffron. *Scientific Reports* 10 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57480-2>.
- Alsayied, N.F., Fernandez, J.A., Schwarzacher, T., and Heslop-Harrison, J.S. 2015. Diversity and relationships of *Crocus sativus* and its relatives analysed by inter-retroelement amplified polymorphism (IRAP). *Annals of Botany* 116: 359-368. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv 103>.
- AlaviSiney, S.M. 2015. Evaluation of saffron (*Crocus sativus*) ecotypes diversity in Zanjan conditions. PhD Dissertation, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran. (In Persian with English Summary).
- Baba, S.A., Mohiuddin, T., Basu, S., Swarnkar, M.K., Malik, A.H., Wani, Z.A., Abbas, N., Singh, A.K., and Ashraf, N. 2015. Comprehensive transcriptome analysis of *Crocus sativus* for discovery and expression of genes involved in apocarotenoid biosynthesis. *BMC Genomics* 16: 698-712. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1894-5>.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pifaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., and Wittwer, C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55 (4): 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Castillo, R., Fernandez, J.A., and Gomez-Gomez L. 2005. Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives. *Plant Physiology* 139: 674-689. [Www. Plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.105.067827](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.105.067827)
- Ebrahimzadeh, H., Saboora, A., Noori-Dalooii, M.R., and Ghaffari, S.M. 1998. Chromosomal studies on four Iranian crocus species (Iridaceae). *Iran Journal Botany* 7 (2): 179-192.
- Fernandez, J.A. 2004. Biology, biotechnology, and biomedicine of saffron. *Recent Research Development Plant Science* 127-159.
- Ghaffari, S.M., and Djavadi, S.B. 2007. Chromosome study on *Crocus cancellatus* subsp. *Damascenus* from Iran. *Iranian Journal Botany* 13 (1): 1-3.
- Golshani, F., Fakheri B.A., Solouki, M., Mahdinezhad, N., and Kiani Feriz, M.R. 2019. Study of phylogenetic relationships of some wild and crop species of Iranian *Crocus* by ITS nuclear loci. *BIOCELL* 43 (3): 225-232.

- Ji, A., Jia, J., Xu, Z., Li, Y., Bi, W., Ren, F., He C., Liu, J., Hu, K., and Song, J. 2017. Transcriptome-Guided Mining of Genes Involved in Crocin Biosynthesis. *Frontiers in Plant Science* 8 (518): 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00518>.
- Jain, M., Srivastava, P.L., Verma, M., Ghangal, R., and Garg, R. 2016. De novo transcriptome assembly and comprehensive expression profiling in *Crocus sativus* to gain insights into apocarotenoid biosynthesis. *Scientific Reports* 6: 22456-22468. <https://doi.org/10.1038/srep22456>.
- Khansarinejad, B., Hasandokht, M.R., and Nazeri, V. 2014. Genetic study of two wild species of saffron using morphological traits and RAPD molecular markers. *Breeding of Agronomic and Horticultural Crop* 2 (1): 105-118.
- Mathew, B., and Brighton, C.A. 1977. Four central Asian *Crocus* species (Liliaceae). *Iran Journal Botany* 1 (2): 123-135.
- Mir, J.I., Ahmed, N., Khan, M.H., and Mokhdomi, T.A. 2015. Apocarotenoid gene expression in saffron (*Crocus sativus* L.). *Scientific Research and Essays* 10 (15): 482-488. <https://doi.org/10.5897/SRE2015.6277>.
- Mir, J.I., Ahmed, N., Wafai, A.H., and Qadri, R.A. 2012. Relative expression of CsZCD gene and apocarotenoid biosynthesis during stigma development in *Crocus sativus* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 18 (4): 371-375. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0131-9>.
- Namayandeh, A., Nemati, Z., Kamelmanesh, M.M., Mokhtari, M., and Mardi. 2012. Genetic relationships among species of Iranian crocus (*Crocus* spp.). *Crop Breeding Journal* 3 (1): 61-67.
- Rubio-Moraga, A., Rambla, J.L., Ahrazem, O., Granell, A., and Gomez-Gomez L. 2009. Metabolite and target transcript analyses during *Crocus sativus* stigma development. *Phytochemistry* 70: 1009-1016.
- Shu, H.M., GUO, S.Q., and NI, W.C. 2020. Comprehensive transcriptome analysis of different *Crocus* flower tissues uncovers genes involved in crocin biosynthesis. *Biologica Plantarum* 64: 504-511. <https://doi.org/10.32615/bp.2020.068>.
- Taheri-Dehkordi, A., Naderi, R., Martinelli, F., and Salami, S.A. 2020. A robust workflow for indirect somatic embryogenesis and cormlet production in saffron (*Crocus sativus* L.) and its wild allies; *C. caspius* and *C. speciosus*. *Heliyon* 6: e05841. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.05841>.
- Tofighi, Z., Mohamadi, H., Shokrzadeh, M., Ghahremani, M.H., Noori, S., and Habibi E. 2017. Cytotoxic effect of hydro-alcoholic extract of *Crocus caspius* on breast cancer cell lines 27 (151): 32-40.
- Vahedi, M., Salami, S.A., Shokrpour, M., and Rezadoost, H. 2019. Comparative performance of transcriptome assembly programs for saffron (*Crocus sativus* L.). *Saffron Agronomy and Technology* 7 (1): 69-80. <https://doi.org/10.220480/jsat.2017.87859.1235>. (In Persian with English Summary).
- Yue, J., Wang, R., Ma, X., Liu, J., Lu, X., Balaso, Thakar, S.B., An, N., Liu, J., Xia, E., and Liu, Y. 2020. Full-length transcriptome sequencing provides insights into the evolution of apocarotenoid biosynthesis in *Crocus sativus*. *Elsevier* 18: 774-783. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.022>.
- Zinati, Z., Shamloo-Dashtpajardi, R., and Behpouri A. 2016. In silico identification of miRNAs and their target genes and analysis of gene co-expression network in saffron (*Crocus sativus* L.) stigma. *Molecular Biology Research Communications* 5 (4): 233-246.