



## Investigating Apocarotenoids and the Structure of Genes Related to their Synthesis in Cultivated and Wild Saffron Species

Mehdi Hassanlou<sup>1</sup>, Mohammadreza Azimi Moghaddam<sup>2\*</sup>, Seyed Alireza Salami<sup>3</sup> and Ehsan Mohseni Fard<sup>4</sup>

### Article type:

Research Article

### Article history:

Submitted: 25 June 2023

Revised: 18 July 2023

Accepted: 30 July 2023

Available Online: 26 August 2023

### How to cite this article:

Hassanlou, M., Azimi Moghaddam, M., Salami, S. A., and Mohseni Fard, E. (2023). Investigating Apocarotenoids and the Structure of Genes Related to their Synthesis in Cultivated and Wild Saffron Species. *Saffron Agronomy & Technology*, 11(2), 183-197.

DOI: 10.22048/jsat.2023.403233.1491

### Abstract

Cultivated saffron (*Crocus sativus* L.) boasts remarkable commercial value due to its possessing three pivotal metabolites: crocin, picrocrocin, and safranal. The significance of obtaining these metabolites, particularly crocin, from sources other than cultivated saffron has grown substantially, primarily driven by native wild saffron species in Iran. In this ongoing study, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) has been harnessed as a potent analytical tool for the identification of these metabolites in two wild saffron species, Khazar (*C. caspius*) and Ziba (*C. speciosus*), alongside the cultivated variety. Furthermore, bioinformatics tools have been employed to extract nucleotide and protein sequences, thereby facilitating the prediction of protein structures for genes integral to the biosynthesis process of these notable apocarotenoids in an in-silico manner. The research findings have showcased the presence of crocin across all analyzed samples, albeit in varying quantities. Specifically, the crocin content in the cultivated saffron, Ziba, and Khazar species accounted for 26.76%, 2.8%, and 0.74% of dry weight matter, respectively. However, the amount of picrocrocin and safranal metabolites in cultivated species was 8.4 and 0.03 percent, respectively, but there were no detectable amounts of these apocarotenoids in the studied wild species. The existence of crocin in wild species has made hope for conducting research and searching in wild species for these effective substances and implementing breeding programs or genetic manipulation for the mentioned species.

**Keywords:** Crocin, Picrocrocin, Safranal

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](mailto:azimi@znu.ac.ir)

© 2022, University of Torbat Heydarieh. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (CC BY NC 4.0) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>).

## مقاله پژوهشی

# بررسی آپوکاروتنوئیدها و ساختار ژن‌های مرتبط با سنتز آن‌ها در گونه‌های زعفران زراعی و وحشی

مهدی حسنلو<sup>۱</sup>، محمد رضا عظیمی مقدم<sup>۲\*</sup>، سید علیرضا سلامی<sup>۳</sup> و احسان محسنی فرد<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۴ تیر ۱۴۰۲

تاریخ بازنگری: ۲۷ تیر ۱۴۰۲

تاریخ پذیرش: ۸ مرداد ۱۴۰۲

حسنلو، م.، عظیمی مقدم، م.، سلامی، س. ع.، محسنی فرد، ا. (۱۴۰۲). بررسی آپوکاروتنوئیدها و ساختار ژن‌های مرتبط با سنتز آن‌ها در گونه‌های زعفران زراعی و وحشی، زراعت و فناوری زعفران، ۱۱(۲)، ۱۸۳-۱۹۷.

## چکیده

زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) به واسطه وجود سه متابولیت کروسین، پیکروکروسین و سافرانال دارای ارزش اقتصادی بالایی است. دستیابی به متابولیت‌های مذکور به ویژه کروسین، در منابعی غیر از زعفران زراعی رویکردی است که با وجود گونه‌های وحشی بومی در ایران اهمیت بسیاری دارد. در تحقیق حاضر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به عنوان ابزار مؤثر در شناخت سه متابولیت مذکور در دو گونه زعفران وحشی خزر (*C. caspius*) و زیبا (*C. speciosus*) در کنار گونه‌ی زراعی بکار گرفته شد. همچنین از ابزار بیوانفورماتیکی برای استخراج توالی نوکلئوتیدی، پروتئینی و پیش‌بینی ساختارهای پروتئینی ژن‌های درگیر در فرایند ساخت آپوکاروتنوئیدهای گفته‌شده به صورت *In silico* استفاده شد. براساس نتایج به دست آمده، وجود کروسین در هر سه نمونه‌ی مورد مطالعه، با مقادیر متفاوت تأیید گردید. مقدار این متابولیت در گونه زراعی ۲۶/۷۶ درصد وزن خشک و در گونه‌های وحشی زیبا و خزر به ترتیب ۲/۸ و ۰/۷۴ درصد تعیین شد. از طرفی میزان پیکروکروسین و سافرانال در گونه‌ی زراعی به ترتیب ۸/۴ و ۰/۰۳ درصد بود، ولی در گونه‌های وحشی مورد مطالعه، مقادیر قابل تشخیصی از آپوکاروتنوئیدهای مذکور حاصل نشد. وجود کروسین در گونه‌های وحشی، امیدواری برای انجام تحقیق و جستجوی بیشتر، برای یافتن مواد مؤثره و نیز اجرای برنامه‌های اصلاحی یا دست‌ورزی ژنتیکی را ایجاد کرده است.

**کلمات کلیدی:** کروسین، پیکروکروسین، سافرانال.

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، دانشکده 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](mailto:azimi@znu.ac.ir)

## مقدمه

جنس زعفران *Crocus* جزو خانواده زنبقیان<sup>۱</sup> و شامل ۸۵ گونه است (Baba et al., 2015). زعفران زراعی (*Crocus sativus* L. تک‌لپه‌ای است که به دلیل بزرگ بودن اندازه ژنوم و پیچیدگی آن و وجود توالی‌های تکرارشونده زیاد، دارای اطلاعات ژنومی اندکی است. علاوه بر گونه زراعی، هشت گونه زعفران وحشی نیز در ایران وجود دارد که بیشتر به عنوان گیاهان زینتی استفاده می‌شوند (Golshani et al., 2019; Alsayied et al., 2015; شامل: *Crocus pallasii*, *C. cancellatus*, *C. caspius*, *C. speciosus*, *gilanicus*, *C. bilforus* و *C. almehensi*, *C. michelsoni*, *C. Khansarinejhad et al., 2014; Golshani et al., 2019; Ebrahimzadeh et al., 1998*; و البته همه گونه‌های زعفران غیر از گونه اهلی آن که تری‌پلوئید ( $2n=3x=24$ ) است، دیپلوئید هستند و با بذر تکثیر می‌شوند (Namayandeh et al., 2012). گونه‌های اجدادی (برخلاف گونه زراعی موجود) منبع عمده‌ای از تنوع ژنتیکی بوده و صفات مطلوب ممکن است به عنوان قطعات کروموزومی از طریق تلاقی مستقیم یا از طریق تکنیک‌های دست‌ورزی در برنامه‌های اصلاحی محصول معرفی شود (Alsayied et al., 2015; Heslop-Harrison & Schwarzacher, 2012). از طرفی زعفران یک گیاه نازا است (تری‌پلوئید) و بطور رویشی از طریق بنه<sup>۲</sup> تکثیر شده که ویژگی‌های ژنتیکی گیاه را ثابت، و اصلاح ژنتیکی را محدود کرده است (Namayandeh et al., 2012; Baba et al., 2015).

زعفران زیبا *C. speciosus*، ( $2n=2x=12$ ) به ارتفاع ۱۲

سانتی‌متر و رنگ تپال‌ها<sup>۳</sup> بنفش کم‌رنگ، میله پرچم کرک‌دار و زرد و کلاله‌ها، نارنجی بوده و در پاییز گل می‌دهد. در ناحیه دریای خزر به سمت شرق گرگان مشاهده می‌شود (Ebrahimzadeh et al., 1998). این گونه وحشی کمترین قرابت ژنتیکی را به زعفران زراعی دارد (Taheri-Dehkordi et al., 2020). زعفران خزر *C. caspius* ( $2n=2x=24$ ) یکساله، پراکندگی محدود در دنیا داشته و در ایران فقط در ناحیه شمالی کشور (در حاشیه جنگل‌های دریای خزر) یافت می‌شود و گل-دهی آن در پاییز گل می‌دهد (Tofighi et al., 2017). ارتفاع آن ۱۲ سانتیمتر، گل‌ها سفید یا مایل به صورتی و قاعده آن‌ها در مرکز زرد رنگ و دارای کلاله سه‌شاخه است (Mathew et al., 1997) (شکل ۱).

با توجه به وجود پتانسیل رویش برخی ارقام وحشی زعفران در مناطق مختلف ایران (از جمله گونه‌های مذکور)، جستجوی مواد مؤثره مشترک در گونه‌های وحشی با رقم زراعی ضروری است. ارزش بالای زعفران خوراکی آن را مستعد تقلب ساخته پس نیازمند مطالعات زیست‌شناختی، دارویی و بررسی‌های شیمیایی است (Fernandez, 2004). روغن استحصالی از عصاره کلاله‌ها حاوی مواد فرار و ترکیبات آروماتیک متعلق به ترپنوئیدها و فلاونوئیدها و ترکیبات غیر فرار: زیزانتین، لیکوپن و نیز موادی همچون پروتئین‌ها، قندها و ویتامین‌هاست (Jain et al., 2016; Vahedi et al., 2018; Zinati et al., 2016). ارزش، شهرت و کیفیت زعفران مربوط به متابولیت‌های ثانویه آن (کروسین، پیکروکروسین و سافرانال) بوده و خواص دارویی آپوکاروتنوئیدهای مذکور اهمیت فراوانی دارد (Zeka et al., 2015; Vahedi et al., 2019). آپوکاروتنوئیدها مولکول‌های ایزوپرنوئید هستند که دارای ۴۰

۱ - Iridaceae

۲ - Corm

۳ - Tepal (گلبرگ و کاسبرگ)

کربن در شاخه اصلی خود بوده و تعدادی پیوندهای دوگانه دارند.



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

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

رنگ زرد بوده و متعلق به خانواده‌ی منو و دی‌گلیکوزیل استرهای پلی‌ان‌دی‌کربوکسیلیک اسید به نام کروسین می‌باشند (Hadizadeh et al., 2010; Vahedi et al., 2018). با توجه به اثرات کروسین به عنوان جزئی ضد سرطان و عامل آنتی‌اکسیدان، جداسازی آن از نظر تجاری و پزشکی مفید خواهد بود (Hadizadeh et al., 2010). علاوه بر مواد ذکر شده اخیراً گروه کیتیناز دفاعی<sup>۹</sup> به نام *Saftchi A* نیز از زعفران جداسازی شده (Castillo et al., 2007; Husaini et al., 2009) که امیدها برای یافتن مواد مؤثره مفید دیگر را قوت می‌بخشد. روش‌های مختلف شامل HPLC<sup>۱۰</sup>، GC<sup>۱۱</sup> و HPTLC<sup>۱۱</sup> برای بررسی متابولیت‌های زعفران استفاده شده که از بین آن‌ها روش HPLC معمولاً روش قابل اعتمادتری برای تشخیص و کمی‌ت سنجی ترکیبات مهم زعفران می‌باشد (Vahedi et al., 2018; Kabiri et al., 2017). تفاوت در متابولیت‌ها در گونه‌های مورد مطالعه حاضر کاملاً مورد انتظار بوده و تشخیص وجود ترکیبات فعال زیستی در گونه‌های وحشی بومی زعفران ایران در کنار گونه زراعی آن پتانسیل بالقوه‌ای برای مطالعه در این زمینه فراهم می‌نماید.

شناخت ترانسکریپتوم کلاله‌های زعفران دید مولکولی

کاروتنوئیدها پیش‌ماده آپوکاروتنوئیدها و مولکول‌های علامت‌دهی<sup>۱</sup> برای رشد گیاه بوده در محدوده وسیعی از فرایندها در گیاهان درگیرند که شامل رشد، پاسخ به محرک‌های محیطی و ... هستند (Ahrazem et al., 2019). مزه تلخ زعفران بوسیله یک گلوکوزید بی‌رنگ، پیکروکرسین<sup>۲</sup> (C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>) تولید می‌شود (Valle et al., 2014). بوی عطر آن از یک روغن فرار بوده که یک گلیکوزید منوترپن به نام سافرانال<sup>۳</sup> (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O) است (Vahedi et al., 2018; Assimopoulou et al., 2007; Cabollero-Ortega et al., 2005). واکنش بتاگلوکوزیداز روی پیکروکروسین موجب تولید سافرانال می‌شود. برای اهداف تجاری کیفیت رنگ نمونه‌های زعفران بستگی به تعیین کروسین‌های مشابه با رنگ‌سنجی<sup>۴</sup> و روش‌های کروماتوگرافی مثل TLC<sup>۵</sup>، GC-MS<sup>۶</sup> و HPLC<sup>۷</sup> دارد (Caballero-Ortega et al., 2005). کروسین‌ها مهم‌ترین جزئی ترکیبی فعال در زعفران و گروهی از ترکیبات آب‌دوست<sup>۸</sup> با

1 - Signaling

2- 4-(B-D-glucopyranosyloxy)-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde

3 - C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O:2,6,6-trimethyl-1,3-cyclohexene-1-carboxaldehyde

4 - Colorimetry

5 - Thin layer chromatography

6 - Gass Chromatography-Mass Specromerty

7 - High Performance Liquid Chromatography

8 - Hydrophilic

9 - Defense chitinase

10 - Gas Chromatography

11 - High Performance Thin-Layer chromatography

(مثل شش ژن تعیین کننده آنزیم‌های متابولیسم چربی و کارتنوئید و فاکتورهای رونویسی) که کارکردشان با کمک روش‌های *in vivo* یا *in vitro* می‌تواند مورد آزمون قرار گیرد (Husaini et al., 2009). به همین سبب در مطالعه کنونی، وجود سه آپوکارتونوئید مهم در ابتدا با کمک HPLC در کلاله‌گونه‌های وحشی زعفران ایرانی و گونه زراعی تعیین و سپس وجود تفاوت در مقادیر آن‌ها بین رقم زراعی با گونه‌های وحشی بررسی شد. همچنین توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای برخی ژن‌های مهم در مسیر سنتز آپوکارتونوئیدها و ساختار پروتئینی آن‌ها بررسی و همچنین وجود موتیف‌ها و دومین‌های آن‌ها با ابزارهای بیوانفورماتیکی نیز بررسی گردید.

### مواد و روش‌ها

گیاهان مورد استفاده در این تحقیق شامل گونه زراعی *C. sativus* و گونه‌های وحشی خزر *C. caspius* و زیبا *C. speciosus* بوده که در سال ۱۳۹۹ و از مزرعه تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه گردید. گل‌ها به صورت کامل از هر بوته برداشت و پس از جداسازی کلاله‌ها، نمونه‌ها در دمای اتاق و در سایه به مدت ۷۲ ساعت کاملاً خشک و سپس درون هاون کاملاً ساییده شد. مقدار ۱۰ میلی‌گرم از کلاله خردشده با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در ۱۵ دقیقه در تاریکی و بطور جداگانه برای تعیین کرووسین، پیکروکروسین و سافرانال عصاره‌گیری و توسط دستگاه ارتعاش صوتی جداسازی گردید. سپس نمونه، با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، مطابق (Hadizadeh et al., 2010) سانتریفیوژ و محلول رویی برای انجام کروماتوگرافی برداشت شد. پس از آماده‌سازی نمونه جهت شناسایی و بررسی متابولیت‌های ثانویه اصلی زعفران، مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه به مدت ۴۰ دقیقه به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

روشنی برای فهم اساس طعم، تولید رنگ، سازماندهی ژنوم و زیست‌شناسی مجموعه مادگی گونه‌ها در جنس *Crocus* ارائه می‌دهد. اطلاعات بدست آمده از طریق بیوانفورماتیک برای طراحی مسیرهای بیولوژیکی جهت ساخت ترکیبات اساسی زعفران همچون کرووسین، پیکروکروسین، سافرانال می‌تواند به کار رود (Husaini et al., 2009). همچنین زیست‌شناسان مولکولی و بیوتکنولوژیست‌ها می‌توانند از دانش حاصل برای سازگاری گیاهان جنس زعفران برای مناطق جغرافیایی جدید کمک بگیرند. انگیزه اولیه جستجوی ژنومیک کاربردی در زعفران (خصوصاً در گونه‌هایی باقابلیت دست‌ورزی) محدود کردن لیست ژن‌های کاندید در تولید چاشنی‌ها و رنگ‌دانه‌های کلاله با هدف افزایش بیان آن‌ها با استفاده از روش تراریختگی<sup>۱</sup> بوده تا بتوان کیفیت کلاله زعفران را بهبود بخشید (Husaini et al., 2009). هرچند داده‌های زیادی از جنس زعفران موجود نیست، یک پایگاه اطلاعات مهم اخیراً برای زعفران جهت مدیریت و جستجوی EST<sup>۲</sup> کلاله‌های زعفران طراحی شده است [www.saffrongenes](http://www.saffrongenes). پایگاه داده مذکور اولین مجموعه مرجع برای ژنومیکس<sup>۳</sup> تیره زنبقیان برای زیست‌شناسی مولکولی تولید کلاله<sup>۴</sup> و مسیرهای متابولیکی متضمن متابولیسم‌های ثانویه زعفران است (Agostino et al., 2007). همچنین اخیراً حق و همکاران (Haq et al., 2022) مهم‌ترین ابزارها و پایگاه‌های داده مفید برای مطالعات مبتنی<sup>۵</sup> بر omic در گیاهان را بررسی نمودند. رونوشت‌های<sup>۶</sup> مشخص و مرتبط با آنزیم‌ها را می‌توان در گروه‌هایی سازماندهی شده و در مسیرهای متابولیکی لحاظ کرد. این مورد راه مستقیمی برای تحقیق ویژگی‌های ترانسکریپتوم کلاله بوده و حاوی یک سری از توالی‌های مورد علاقه است

- 1 - Transgenic
- 2 - Expressed Sequence Tag
- 3 - Genomics
- 4 - Stigma Biogenesis
- 5 - Omic- based studies
- 6 - Transcripts

### تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

ژن‌های مورد مطالعه درگیر در مسیر بیوسنتز آپوکارتونوئیدهای زعفران: *ALDH*<sup>۷</sup>، *CCD2*<sup>۸</sup>، *PSY*<sup>۹</sup>، *LYC*<sup>۶</sup>، *BCH*<sup>۱۰</sup> و *UGT 74*<sup>۱۱</sup> با جست‌وجو در پایگاه‌های داده از جمله NCBI<sup>۱۲</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)، DDBJ (<https://www.ddbj.nig.ac.jp>)، UniProt (<https://www.uniprot.org>)، Expasy (<https://www.expasy.org>) و ابزارهای مختلف از جمله BLAST<sup>۱۳</sup> (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)، ویژگی‌های مربوط به هر ژن بررسی گردید. اولین گام جهت بررسی این ژن‌ها، یافتن توالی ژنی و ناحیه کدکننده بر اساس شماره دسترسی ۱۵ می‌باشد که در پایگاه داده‌ی NCBI جست‌وجو شد. سپس توصیف موتیف و بررسی دومین‌های آن‌ها با استفاده از پایگاه‌های داده: Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence>) و Pfam (<http://pfam.xfam.org>) انجام شد. شبیه‌سازی و یافتن همولوژی با کمک ابزارهای Blastn و Blastp صورت گرفت. ویژگی پروتئین‌ها با UniProt و Expasy انجام و ترسیم ساختارهای سه بعدی پروتئین با کمک Swiss model صورت گرفت.

### نتایج و بحث

در مطالعه حاضر با کمک HPLC و مطابق با انتظار، بیشترین درصد از کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در کلاله‌های حاصل از نمونه‌های زراعی، مشاهده شد. لوزانو و

تزریق شد. دستگاه کروماتوگرافی از شرکت Knuer، مدل Well Chrom 2000، پمپ Maxi-star K-1000 و دتکتور Spectrophotometer K2500 استفاده شد. سافرانال با خلوص تقریبی ۷۵ درصد (GC، ۱۷۳۰۶) از شرکت آمریکایی Sigma-Aldrich خریداری شد. پیکروکروسین با خلوص ۹۱/۱۳ درصد و کروسین با خلوص ۹۷/۲۰ درصد در این مطالعه با کمک روش نیمه آماده سازی<sup>۱</sup> HPLC خالص سازی (Vahedi et al., 2018; Kabiri et al., 2017). و به‌عنوان استاندارد مرجع استفاده شد. استونیتریل<sup>۲</sup> با درجه<sup>۳</sup> HPLC از شرکت کره‌ای DAEJUNG Chemicals and Metals Co. خریداری شد. اتانول با درجه HPLC از شرکت فرانسوی Carlo S.A.S. Erba Reagents خریداری گردید. آب فوق خالص<sup>۴</sup> از طریق سیستم Millipore Milli-Q حاصل شد. آشکارساز در بیشینه طول موج‌های مختلف مطابق (Vahedi et al., 2018; Hadizadeh et al., 2010) شامل ۲۵۰ نانومتر، ۳۰۸ نانومتر و ۴۴۰ نانومتر به ترتیب برای مطالعه سافرانال، پیکروکروسین و کروسین تنظیم شد. مطابق لوزانو و همکاران (Lozano et al., 1998) ستون مورد استفاده Erospher 100 C18 به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر ۴ میلی‌متر و فاز متحرک اتیل استات، ایزوپروپانل و آب (۵۶:۳۴:۱۰) با شدت جریان ۰/۶ میلی‌متر در دقیقه تنظیم شد. نمونه استاندارد با متانول در سه رقت مختلف (۰/۲۴، ۰/۴۸ و ۰/۷۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه گردید. در این مطالعه از هر نمونه سه تکرار انجام شد. کمیت سنجی مواد مورد آزمایش با مقایسه فضای زیر منحنی (پیک<sup>۵</sup>) با نمونه‌های معتبر مرجع انجام شد.

- 6 - Chromoplast-specific lycopene beta cyclase
- 7 - Aldehyde dehydrogenase
- 8 - Carotenoid cleavage dioxygenase
- 9 - Phytoene synthase
- 10 - Beta carotene hydroxylase
- 11 - Glucosyltransferase
- 12 - National Center for Biotechnology Information
- 13 - DNA Data Bank of Japan
- 14 - Basic local alignment search tool
- 15 - Accession Number

- 1 - Semi-preparative HPLC
- 2 - Acetonitrile
- 3 - Grade
- 4 - Ultrahigh pure
- 5 - Peak

آنتی اکسیدانی آن مشخص تر می‌شود (Soeda et al., 2007). در دو گونه وحشی مقادیر پیکروکروسین و سافرانال غیر قابل تشخیص بوده در حالی که در گونه زراعی هر سه متابولیت دارای مقادیر قابل ملاحظه هستند. در مطالعه واحدی و همکاران (Vahedi et al., 2018)، ضمن غربالگری ژنوتیپ‌های زراعی از نظر میزان وجود کروسین، مقادیر بدست آمده از نمونه‌های زعفران از مناطق مختلف ایران (خراسان رضوی)، نشانگر تفاوت در میزان سه متابولیت بین نمونه‌ها و مقادیر متفاوت کروسین در بین ۵۳ نمونه (اکوتیپ) تحت مطالعه بود. بطوری که بالاترین مقدار کروسین به میزان ۵۳ درصد و کمترین مقدار کروسین برابر ۲۱ درصد در بین اکوتیپ‌های ایرانی بود حال آن‌که مقدار کروسین حاصل در مطالعه حاضر در حدواسط اعداد ذکر شده و تنها به عنوان نماینده‌ای از زعفران زراعی ایران با گونه‌های وحشی، مورد مقایسه قرار گرفت. البته مقادیر کروسین به طور عموم از مقادیر دو متابولیت دیگر (پیکروکروسین و سافرانال) بیشتر است (Mashmoul et al., 2014)، چیزی که در مطالعه کنونی نیز مشهود است. به‌علاوه مطالعاتی که توسط سایر پژوهشگران انجام شده نیز مشخص گردید هم‌چون مطالعه کنونی، کروسین بالاترین مقدار و سافرانال کمترین میزان را در زعفران زراعی تشکیل می‌دهد، (Gregory et al., 2005; Mashmoul et al., 2014). همچنین مطابق مطالعات صورت گرفته با کمک HPLC در بین نمونه‌های زعفران زراعی هند، آذربایجان، اسپانیا و ایران نشان داد که نمونه‌های ایرانی دارای رنگ (کروسین) و عطر (سافرانال) مطلوبی هستند (Caballero-Ortega et al., 2004). مسلماً با تفاوت بسیار در ماهیت ژنوم نمونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق (دو گونه وحشی متفاوت از هم در برابر یک گونه اهلی زراعی) انتظار تفاوت در میزان و نوع مواد مؤثره دور از انتظار نیست، چرا که حتی در مطالعه نمونه‌های مختلف زعفران زراعی ایران، مشخص شد که تفاوت

همکاران (Lozano et al., 1998) HPLC (روش استفاده شده در مطالعه حاضر) را ابزاری مطلوب برای جداسازی مواد تقلبی از ترکیبات اصلی زعفران تلقی نمودند (Sujata et al., 1999). بنابراین اطمینان بیشتری می‌توان به روش انجام شده در این تحقیق داشت. آن‌ها ترکیبات شیمیایی نمونه‌های زعفران از ۱۱ منبع مختلف را با استفاده از فاز معکوس<sup>۱</sup> HPLC (C18) و با شرایط کروماتوگرافی اتخاذ شده ۱۰ ماده عمده را در هر نمونه بدست آورده و هر ترکیب را با مقایسه زمان انتظار<sup>۲</sup> تشخیص دادند (Caballero-Ortega, 2005). هرچند ممکن است سایر ترکیبات موجود در زعفران ارزشمند باشند ولی سنجش کیفی و ارزش زعفران اساساً بر مبنای سه متابولیت مهم (Vahedi et al., 2018) مورد مطالعه در این تحقیق بوده و عمده‌ترین مواد مؤثره تجاری (در حال حاضر) در زعفران می‌باشد. همچنین از آنجا که در مطالعه‌ی حاضر، استاندارد مواد از قبل معین شده بود، مقایسه پیک‌ها در طول موج‌های مشخص، نشانگر وجود سه ماده تحت مطالعه در نمونه‌ها است. نکته امیدوارکننده در تحقیق حاضر، وجود مقادیری از متابولیت مهم کروسین (مقدار مساحت زیر منحنی<sup>۳</sup> AUC) به میزان ۰/۷۴ درصد ماده خشک در نمونه وحشی خزر و از آن بیشتر مقدار ۲/۸ درصد کروسین در نمونه وحشی زیبا در مقابل ۲۷/۷۶ درصد کروسین در گونه زراعی (اکوتیپ استهبان) بوده است (جدول ۱). مقادیر سه متابولیت ارزشمند در هر گونه متفاوت از دیگری و عمدتاً مقادیر کروسین از مقادیر دو متابولیت دیگر بالاتر بود. غلظت بالای کروسین در بین متابولیت‌های ثانویه یکی از عوامل اصلی انتخاب زعفران قلمداد شده به طوری که از ۶ تا ۱۶ درصد ماده خشک زعفران زراعی کروسین است (Gregory et al., 2005). اهمیت ماده مذکور با وجود اثرات بازدارندگی رادیکال‌های آزاد و پتانسیل

1 - Reverse phase

2 - Retention time

3 - Area under curve

۲۵۰ نانومتر معرف پیکروکروسین، ۳۱۰ نانومتر معرف سافرانال و نهایتاً ۴۴۰ نانومتر معرف کروسین بوده است (Caballero- Ortega, 2005) که با تحقیق واحدی و همکاران (Vahedi et al., 2018) و نیز آلونسون (Alonson et al., 2001) مطابقت داشت. در مطالعه زکا و همکاران (Zeka et al., 2015) نیز ترکیبات استخراج شده از گل‌های زعفران زراعی با کمک HPLC-DAD تعیین و طول موج‌های ۳۵۰ و ۳۶۰ نانومتر به ترتیب برای کمی‌تسنجی کروسین (حدوداً مشابه تحقیق حاضر، ۴۰۰ نانومتر) و کامپفرول استفاده شد (Zeka et al., 2015). همچنین مطابق با تحلیل‌های کابالرو (Caballero- Ortega, 2005) در تعداد ۱۱ نمونه مختلف زعفران اهلی در ۱۰ نمونه، ترکیب شیمیایی مورد مطالعه یکسان، و تفاوت در غلظت هر ترکیب بوده است. بر این اساس، زعفران یونانی بیشترین غلظت (پیکروکروسین برابر ۵/۹۵ درصد، سافرانال ۱/۲۹ درصد و ترنس کروسین ۴۰/۷۷ درصد) در حالی که مقادیر در زعفران چینی حداقل مقادیر را داشته، پیکروکروسین ۰/۵۳ درصد، سافرانال ۰/۲۲ درصد و ترنس کروسین ۴ برابر ۶/۲۹ درصد، در این میان زعفران زراعی ایرانی با مقادیر نزدیک به حداقل (پیکروکروسین ۳/۶۹ درصد، سافرانال ۰/۶۵ درصد و ترنس کروسین ۴، برابر با ۳۸/۴۱ درصد) را در بین ۱۰ نمونه داشت. همچنین نمونه تبّت از چین حداقل مقدار از ترکیبات (ترنس کروسین ۴ برابر ۶/۲۹ درصد، پیکروکروسین برابر ۰/۵۳ درصد و سافرانال برابر ۰/۲۲ درصد) را داشت (Caballero- Ortega, 2005). در مورد سافرانال مقدار آن در تحقیق حاضر (در زعفران زراعی) نیز همچون تحقیق یادشده در حداقل مقدار بوده است. با انجام روش‌های مختلف تشخیص همچون کروماتوگرافی گازی<sup>۵</sup> (GC) و HPLC و غیره مشخص شد مقدار غلظت سافرانال در نمونه‌های تازه (تر) در حداقل مقدار

مواد مؤثره علاوه بر تفاوت در مناطق مختلف رشد به عواملی همچون ژنتیک، نیز بستگی دارد (Vahedi et al., 2018). مورد مذکور به طریق دیگری تایید شد و ترکیبات فعال زیستی بین ژنوتیپ‌های مختلف زعفران یا ژنوتیپ‌هایی که در مناطق مختلف رشد می‌کنند، باهم متفاوت بودند (Vahedi et al., 2012; Pavarini et al., 2012).

منابع وجود آپوکارتونوئیدها (کروسین) علاوه بر کلاله در تپال‌های گونه‌های زراعی نیز وجود دارد (Zeka et al., 2015)، که نیازمند انجام مطالعه در تپال‌های گونه‌های وحشی مورد مطالعه در این تحقیق است البته با تحقیق انجام شده روی ژن‌های مهم مؤثر در مسیر ساخت آپوکارتونوئیدهای زعفران در گونه‌های وحشی مورد بحث (Hassanlou et al., 2023) و با وجود مقادیر بیان ژن‌های مد نظر، احتمال وجود محصولات نهایی (متابولیت‌های مورد تحقیق) در تپال‌ها روشن می‌شود. همچنین کامپفرول<sup>۱</sup> و کروسستین جداشده از تپال‌ها بوسیله HPLC, MS<sup>۲</sup>, TLC و چند روش دیگر تایید شد که با استانداردهای معتبر همسانی داشتند (Zeka et al., 2015). سه نمونه از کروماتوگرام‌های انجام شده برای ماده کروسین در گونه زراعی، گونه خزر و گونه زیبا با زمان تأخیر<sup>۳</sup> در حدود همدیگر و از دقیقه ۱۵ تا ۲۵ و به عنوان بیشترین نواحی معرف آپوکارتونوئید کروسین مشخص و کروسین مد نظر با بیشترین طول موج (حدود ۴۰۰ نانومتر) مشخص شده است (شکل ۲). همچنین مطابق تحقیق لوزانو و همکاران (Lozano et al., 1998) هر کروماتوگرام برای سه متابولیت مورد تحقیق در سه طول موج (۲۵۰، ۳۱۰ و ۴۴۰ نانومتر) مطابق با بیشترین ارتفاع هر پیک و با غلظت نوری یکسان رسم شده و هر پیک در کروماتوگرام نشانگر یکی از مواد مؤثره بوده است بطوری‌که

1 - Kaempferol

2 - Mass spectroscopy

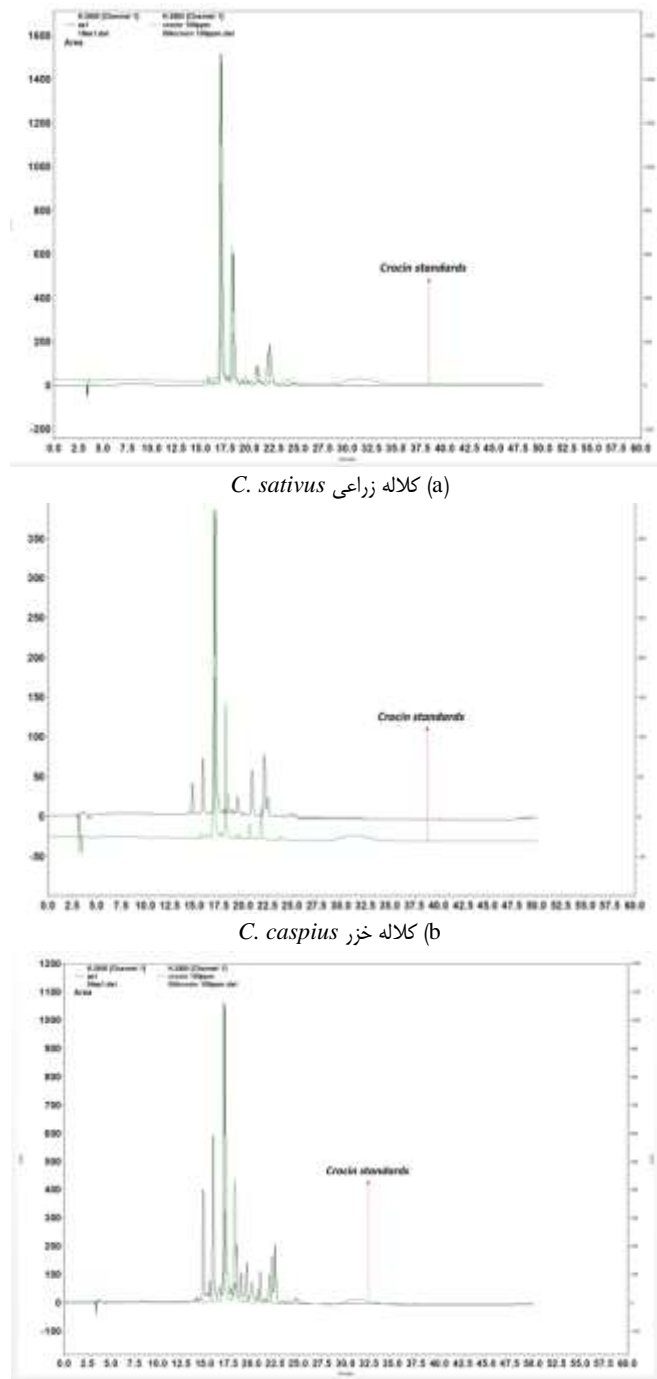
3 - Retention time

4 - Trans crocin

5 - Gas chromatography



بوده و نیز بستگی زیادی به شرایط خشک و ذخیره کردن آن دارد (Caballero- Ortega, 2005).



(a) کلاله زراعی *C. sativus*

(b) کلاله خزر *C. caspius*

(c) کلاله زیبا *C. speciosus*

شکل ۲- نمونه کروماتوگرام‌های انجام شده کروسین در سه گونه مورد تحقیق، (a) کلاله زراعی *C. sativus* (b) کلاله خزر *C. caspius* و (c) کلاله زیبا *C. speciosus*، محور افقی زمان (دقیقه) محور عمودی آمپر (میلی‌آمپر)

Figure 2. Chromatogram sample of crocin, (a) Cultivated stigma (b) Caspian saffron stigma and (c) Ziba saffron stigma, horizontal axis, time (minutes) vertical axis, amper (milliamper).

دیپلوئید بودن و توانایی تولید بذر در گونه‌های زعفران وحشی ایران و نیز احتمال انجام‌پذیر بودن مسیر اصلاح ژنتیکی می‌تواند با تحقیقات بیشتر با هدف تولید مواد مؤثره از گونه‌های بومی کشاورزان اقدام نمود که به عنوان راهی جدید در تجاری‌سازی و ایجاد اشتغال و درآمد می‌تواند مطرح شود.

### تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

هرچند برای زعفران ژنوم مرجع قابل اتکا و کاملی وجود ندارد (Vahedi et al., 2018) و عموماً داده‌های کافی برای زعفران و خصوصاً گونه‌های وحشی مورد مطالعه در این تحقیق در پایگاه‌های داده اندک است، توالی‌های مربوط به ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتز سه آپوکارتونوئید مهم (ALDH, CCD2, UGT, PSY, BCH, LYC) مورد بحث مطابق با شماره دسترسی از پایگاه داده‌های NCBI استخراج گردید. در گام بعد نواحی غیرکدکننده<sup>۱</sup> انتهای<sup>۳</sup> پرایم و ۵ پرایم بررسی و توالی-های این نواحی از پایگاه‌های داده مختلف استخراج به همراه نواحی کدکننده<sup>۲</sup> در (جدول ۲) درج شد. در مطالعه زکا و همکاران (Zeka et al., 2015) نیز توالی نواحی DNA (ITS/ITS2<sup>۴</sup>) تپال‌های خشک شده به میزان ۹۷ درصد یکسانی با نظایرش در زعفران زراعی و در پایگاه داده NCBI نشان داد. همچنین با کمک تکنیک ABPP<sup>۴</sup> که ترکیبی از شیمی، پرتئومیکس و بیوانفورماتیک است، تعداد ۶۷ گلوکوزیداز فعال در رشد کلاله با تحلیل‌های بیوانفورماتیکی کشف و تعیین شد و پیشنهاد گردید که گلوکوزیدازها در بلوغ کلاله، که همراه با انباشته شدن آپوکارتونوئیدهاست، نقش مهمی دارند (Haq et al., 2022).

همچنان‌که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود در زعفران زراعی مورد تحقیق همچون موارد ذکر شده، مقدار کروسین در بالاترین و سپس مقادیر پیکروکروسین و سپس سافرانال (در حداقل مقدار) بوده است. همچنین درصد کروسین در گونه‌های وحشی موضوع تحقیق حاضر از حداقل مقدار (انواع زراعی چینی در تحقیق یاد شده) هم کمتر است (در گونه زیبا ۲/۸ درصد و در خزر ۰/۷۴ درصد). با توجه به اینکه این گونه‌ها، نوع وحشی (و نه زراعی) هستند، همچنین در کنار تمام مباحث مربوط به تأثیر جغرافیا و شرایط محیطی حاکم بر تفاوت اکوتیپ‌های زعفران (Vahedi et al., 2018) در داشتن مقادیر متفاوت متابولیت‌های ثانویه، موضوع فوق به مقدار زیادی قابل توجیه است. به‌علاوه در تحقیق قلمکاری و همکاران (Ghalamkari et al., 2016)، در بررسی تفاوت بین نمونه‌های زعفران کلکسیون باغبانی دانشگاه تهران عامل عمده تفاوت فیتوشیمیایی بین نمونه‌های زراعی تحت مطالعه، عامل ژنتیک، بوده است. در همه نمونه‌های زراعی مورد تحقیق (Caballero- Ortega, 2005) میزان کروسین (همه انواع آن) از دو ماده مؤثره مهم دیگر بیشتر بوده و عموماً بیشترین مقدار ماده مؤثره را شامل می‌شود که تاییدی بر نتایج مطالعه کنونی بوده و در مورد زعفران زراعی در این تحقیق (۲۶/۷۶ در برابر ۸/۴ و ۰/۰۳) و حتی تاییدی در دو گونه وحشی است (چراکه کروسین دارای مقادیری بوده ولی دو ترکیب دیگر حتی مقادیر قابل تشخیصی نیز نداشتند). هرچند در مورد دو متابولیت دیگر، در دو گونه وحشی و در این تحقیق مقادیر قابل توجهی حاصل نشده است، همچون مطالعه انجام شده در گونه وحشی *C. ancycrensis* که مقادیر کروسین نیز اندک بوده است (Jimenez-Lopez et al., 2016)، ولی وضعیت متفاوت کروسین، امیدها را برای ادامه تحقیق و جستجوی منابع قابل توجه در کلاله سایر گونه‌های وحشی و یا در تپال آن‌ها در آینده زنده نگه داشته است. از طرفی با توجه به

1 - Untranslated region

2 - Coding sequence

3 - Internal transcribed spacer

4 - Activity- based protein profiling







جدول ۱- مقادیر سه متابولیت اصلی (برحسب میلی گرم در صد میلی گرم) حاصل از (HPLC) در کلالة نمونه‌های زعفران زراعی و گونه‌های وحشی

Table 1- mounts of three main metabolites (in mg.100 mg<sup>-1</sup>) obtained from (HPLC) in the stigma of cultivated and wild saffron samples

ردیف Row	گونه Species	نام ایرانی Iranian name	بافت Organ	کروسین Crocine	پیکروکروسین Picrocine	سافرانال Safranal
1	<i>Crocus caspius</i>	خزر Khazar	Stigma	0.74 % ± 0.005 (n=3)	ND	ND
2	<i>Crocus speciosus</i>	زیبا Ziba	Stigma	2.8 % ± 0.01 (n=3)	ND	ND
3	<i>Crocus sativus</i>	زراعی Cultivate	stigma	26.76 % ± 0.006 (n=3)	8.4 % ± 0.07 (n=3)	0.03% ± 0.001 (n=3)

جدول ۲- موقعیت 5' UTR و 3' UTR برای رونوشت‌های مورد مطالعه

Table 2- 5' UTR and 3' UTR position for the studied transcripts

ردیف Raw	نام ژن Gene name	نواحی 5'UTR-CDS-3'UTR* 3'UTR and 5'UTR regions
1	ALDH	5'  3'
2	PSY	5'  3'
3	CCD2	5'  3'
4	BCH	5'  3'
5	LYC	5'  3'
6	UGT74	5'  3'

توضیح: نواحی 5'UTR به رنگ سبز، نواحی CDS به رنگ آبی و 3'UTR به رنگ زرد مشخص شده اند.

Explanation: 5'UTR regions are marked in green, CDS regions in blue, and 3'UTR in yellow.

با اعتماد به روش یاد شده و با توجه به نتایج حاصل شده در این مطالعه و نیز تعمیم موضوع به سایر گونه‌های وحشی بومی ایران برای جستجوی کروسین، به عنوان مهم‌ترین آپوکاروتنوئید در مجموعه متابولیت‌های ثانویه زعفران، می‌توان زمینه‌های تحقیقی جدیدی بنا نهاده و برای تولید مواد مؤثره تجاری بنابر استعداد طبیعی موجود در ایران اقدامات مؤثری در پیش گرفت. از طرفی تپال‌های زعفران زراعی کاربردهایی در طب سنتی داشته و ارزش افزوده‌ای نیز برای کشاورزان دارند.

شماره دسترسی توالی نوکلئوتیدی و نیز توالی اسید آمینه‌ای پروتئین‌ها از پایگاه داده NCBI و نیز تعداد دومین و عملکرد آن‌ها و همچنین طول دومین و همچنین شماره Pfam<sup>۳</sup> مربوط به شش ژن مورد بحث در (جدول ۳) فراهم شده است.

### نتیجه گیری

با توجه به اینکه HPLC روشی اثر بخش، ساده و با قابلیت استفاده راحت در موضوع تفکیک آپوکاروتنوئیدها است،

- 1 - Non Detectable
- 2 - Transcripts
- 3 - Protein family

جدول ۳- اطلاعات ژن‌ها، پروتئین‌ها و دومین‌ها و طول آن‌ها برای شش ژن مورد مطالعه در مسیر ساخت آپوکاروتنوئیدها

Table 3- Genes information, proteins and domains and their length for the six studied genes in apocarotenoids biosynthesis pathway

ردیف Raw	نام ژن‌ها Gene name	شماره دسترسی توالی <sup>۱</sup> Sequence accession number	شماره دسترسی پروتئین <sup>۲</sup> Protein accession number	شماره دومین Pfam Pfam domain number	تعداد دومین Domain number	طول دومین Domain length	عملکرد دومین Domain function
1	ALDH	KU577904.2	AQM36714.2	PF00171	1	433	آلدهید دهیدروژناز (آلدهید به عنوان سوبسترا) Aldehyde dehydrogenase (aldehyde as substrate)
2	PSY	MH124239.1	QCI61141.1	PF00494	1	361	فایتون سینتاز: (تبدیل دو مولکول جیرانیل جیرانیل دی فسفات (GGDP) به فیتون Phyton synthase: conversion of two molecules of geranyl geranyl diphosphate (GGDP) to phyton
3	CCD2	KJ541749	AIG94929.1	PF03055	1	562	شکست داکسیژناز کارنوئید Cleavage of carotenoid deoxygenase
4	BCH	AY579207.1	AAT84408.1	PF04116	1	125	دهیدروکسیلاز اسید چرب Fatty acid dehydroxylase
5	LYC	AJ888515.1	CAI777.1	PF05834	1	139	لیکوپن سیکلاز: حلقوی‌سازی لیکوپن به‌عنوان کلید ساخت کارنوئیدها، جلوگیری از فتواکسیداسیون، حذف انرژی نوری اضافه Lycopene cyclase: cyclization of lycopene as the key to making carotenoids, preventing photooxidation, removing excess light energy
6	UGT74	AY262037.1	AAP94878.1	PF00201	1	460	کرسستین گلیکوزیل ترانسفراز Crestine glycosyltransferase

این ژن‌ها در این گیاه و انطباق آن‌ها با ژن‌های مشابه در گونه‌های دیگر، ساختارهای حفاظت شده را یافته و ژن‌های درگیر در بیوسنتز سایر متابولیت‌های ثانویه را احصاء کنند. همچنین با توجه به نقص داده در پایگاه داده‌ها برای زعفران به‌ویژه گونه‌های وحشی، شایسته است در مطالعات آتی از تکنیک‌هایی دارای عملیات بالا<sup>۳</sup> نیز استفاده گردد.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از رئیس محترم آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران و همکاران آزمایشگاه تشکر و

لذا شایسته است در تحقیقات آتی با انجام HPLC ردیابی صحیحی در تپال ارقام زراعی و خصوصاً گونه‌های وحشی در ایران صورت گیرد. همچنین با توجه به بررسی‌هایی که درباره‌ی توالی و ساختار ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز آپوکاروتنوئیدهای گیاه زعفران انجام شد و با اتکا به ابزارهای جدید لازم است دست‌ورزی ژن بر اساس یک مبنای مهندسی ژنتیک جهت تولید آپوکاروتنوئید، و بر اساس مسیر بیوشیمیایی تولید ماده مد نظر صورت گیرد. از طرفی محققین حوزه بیوانفورماتیک می‌توانند بر اساس شباهت سنجی و درصد انطباق

1 - Accession number of sequence

2 - Accession number of protein

3 - High throughput

## منابع

- Ahrazem, O., Argandona, J., Fiore, A., Rujas, A., Rubio-Moraga, A., Castillo, R. & Gomez-Gomez, L. (2019). Multi-species transcriptome analyses for the regulation of crocins biosynthesis in *Crocus*. *BMC Genomics*, 20, 320. doi.org/10.1186/s12864-019-5666-5.
- Alonson, G.L., Salinas, M.R., Sánchez-Fernández, M.A., & Garijo, J. (2001). Note. Safranal content in Spanish saffron. *Revista de Agarquímica y Tecnología de Alimentos*, 7(3), 225-229. doi.org/10.1106/WT2H-DQVP-NK9E-HWAT.
- Alsayed, N.F., Fernandez, J.A., Schwarzacher, T., & 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. doi.org/10.1093/aob/mcv103.
- Assimopoulou, A., Sinakos, Z., & Papageorgiou, V. (2005). Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytotherapy Research*, 19(11), 997-1000. doi.org/10.1002/ptr.1749.
- Agostino, N.D., Pizzichini, D., Chiusano, M.L., & Giuliano, G. (2007). An EST database from saffron stigmas. *BMC Plant Biology*, 7(53), 1-8. doi.org/10.1186/1471-2229-7-53.
- Baba, S.A., Mohiuddin, T., Basu, S., Swarnkar, M.K., Malik, A.H., Wani, Z.A., Abbas, N., Singh, A.K., & Ashraf, N. (2015). Comprehensive transcriptome analysis of *Crocus sativus* for discovery and expression of genes involved in apocarotenoid biosynthesis. *BMC Genomics*, 16(698), 1-14. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1894-5.
- Caballero-Ortega, H., Pereda-Miranda, R., & Abdullaev, F.I. (2005). HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. *Food Chemistry*, 100(3), 1126-1131. doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.020.
- Caballero-Ortega, H., Pereda-Miranda, R., Riverón-Negrete, L., Hernández, J.M., Medécigo-Ríos, M., Castillo-Villanueva, A., & Abdullaev, F.I. (2004). Chemical composition of saffron (*Crocus sativus* L.) from four countries. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 650, 321-326. doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.650.39.
- Castillo, R., Fernandez, J.A., & 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. doi.org/10.1104/105.067827.
- Ebrahimzadeh, H., Saboora, A., Noori-Dalooii M.R., & Ghaffari, S.M. (1998). Chromosomal studies on four Iranian *Crocus* species (Iridaceae). *Iran Journal of Botany*, 7(2), 179-192.
- Fernandez, J.A. (2004). Biology, biotechnology, and biomedicine of saffron. *Recent Research Developments in Plant Science*, 127-159.
- Ghalamkari, A. (2016). Morphological and phytochemical evaluation of Khorasan saffron samples. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Iran. (In Persian with English Summary).
- Golshani, F., Fakhri B.A., Solouki, M., Mahdinezhad, N., & 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.
- Gregory, M.J., Menary, R.C., & Davies, N.W. (2005). Effect of drying temperature and airflow on the production and retention of

- secondary metabolites in saffron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5969–5975.
- Hadizadeh, F., Mohajeri, S.A., & Seifi, M. (2010). Extraction and purification of crocin from saffron stigmas employing a simple and efficient crystallization method. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13, 691-698. doi.org/10.3923/pjbs.2010.691.698.
- Haq, S.A.U., Salami, S.A., & Husaini, A.M. (2022). Bioinformatics for Saffron-Omics and Crop Improvement. In: Vakhlu, J., Ambardar, S., Salami, S.A., Kole, C. (eds) *The Saffron Genome. Compendium of Plant Genomes*. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-031-10000-0\_4.
- Hassanlou, M., Azimi Moghaddam, M., Salami, S.A., & 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 and Technology*, 11(1), 71- 85. doi: 10.22048/jsat.2023.387897.1482.
- Heslop-Harrison, J.S., & Schwarzacher, T. (2012). Genetics and genomics of crop domestication. In: Altman A, Hasegawa PM, eds. *Plant biotechnology and agriculture: prospects for the 21st century*. Dordrecht: Elsevier, 3–18.
- Husaini, A.M., Wani, S.A., Sofi, P., Rather, A.G.S. (2009). Bioinformatics for saffron (*Crocus sativus* L.) improvement. *Communications in Biometry and Crop Science*, 4(1), 3–8.
- Jain, M., Srivastava, P.L., Verma, M., Ghangal, R., & 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. doi.org/10.1038/srep22456.
- Jimenez-Lopez, J.C, Lopez-Valverde, F.J, Robles-Bolivar, P, Lima-Cabello, E, Gachomo, E.W, & Kotchoni, S.O. (2016). Genome-wide identification and functional classification of tomato (*Solanum Lycopersicum*) aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily. *PLoS ONE*, 11, e0164798. doi:10.1371/journal.pone.0164798.
- Kabiri, M., Rezadoost, H., & Ghassempour, A. (2017). A comparative quality study of saffron constituents through HPLC and HPTLC methods followed by isolation of crocins and picrocrocin. *LWT-Food Science Technology*, 84, 1-9. doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.033.
- Khansarinejad, B., Hasandokht, M.R., & 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. https://civilica.com/doc/488281.
- Lozano, P., Castellar, M.R., Simancas M.J., & Iborra, J.L. (1999). Quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. *Journal of Chromatography A*, 830, 477-483.
- Mashmoul, M., Azlan, A., Yusof, B.N.M., Khaza'ai, H., Mohtarrudin, N., & Boroushaki, M.T. (2014). Effects of saffron extract and crocin on anthropometrical, nutritional, and lipid profile parameters of rats fed a high-fat diet. Elsevier, 180-187. doi.org/10.1016/j.jff.2014.03.017.
- Mathew, B., & Brighton, C.A. (1977). Four central Asian *Crocus* species (Liliaceae). *Iran Journal Botany*, 1(2), 123-135.
- Namayandeh, A., Nemati, Z., Kamelmanesh, M.M., Mokhtari, M., & Mardi, M. (2012). Genetic relationships among species of Iranian *Crocus* (*Crocus* spp.). *Crop Breeding Journal*, 3(1), 61-67.
- Pavarini, D.P., Pavarini, S.P., Niehues, M., & Lopes, N.P. (2012). Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Anim. Animal Feed Science and Technology*, 176(1), 5–16. doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.002.

- Soeda, S., Ochiai, T., Shimeno, H., Saito, H., Abe, K., Tanaka, H., & Shoyama, Y. (2007). Pharmacological activities of crocin in saffron. *Journal of Natural Medicines*, 61(2), 102-111. <https://doi.org/10.1007/s11418-006-0120-9>.
- Sujata. V., Ravishankar, G.A., & Venkataraman. L.V. (1992). Methods for the analysis of the saffron metabolites crocin, crocetins, picrocrocins, and safranal for the determination of the quality of the spice using thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 624, 497-502. [doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85699-T](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85699-T).
- Taheri-Dehkordi, A., Naderi, R., Martinelli, F., & 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, 1-10. [doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05841](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05841).
- Tofighi, Z., Mohamadi, H., Shokrzadeh, M., Ghahremani, M.H., Noori, S., & Habibi, E. (2017). Cytotoxic effect of hydro-alcoholic extract of *Crocus caspius* on breast cancer cell lines. *Journal of Mazandaran University Medical Sciences*, 27(151), 32-40.
- Vahedi, M., Salami, S.A., Shokrpour, M., & Rezadoost, H. (2019). Comparative performance of transcriptome assembly programs for saffron (*Crocus sativus* L.). *Saffron Agronomy and Technology*, 7(1), 69-80. [doi.org/10.220480/jsat.2017.87859.1235](https://doi.org/10.220480/jsat.2017.87859.1235). (In Persian with English Summary).
- Vahedi, M., Kabiri, M. Salami, S.A., Rezadoost, H., Mirzaie, M., & Kanani, M.R. (2018). Quantitative HPLC-based metabolomics of some Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) accessions. *Elsevier*, 118, 26-29. [doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.024](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.024).
- Valle, García-Rodríguez., Serrano-Díaz, M., López-Córcoles, C., Carmona, M., & Alonso, G.L. (2014). Tarantilis P.A., determination of saffron quality by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(32), 8068-8074. [doi.org/10.1021/jf5019356](https://doi.org/10.1021/jf5019356).
- Zeka, K., Ruparelia, K.C., Continenza, M.A., Stagos, D., Vegliò, F., & Arroo, R.R. (2015). Petals of *Crocus sativus* L: as a potential source of the antioxidants crocin and kaempferol. *Fitoterapia*, 107, 128-134. [doi.org/10.1016/j.fitote.2015.05.014](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.05.014).
- Zinati, Z., Shamloo-Dashtpajardi, R., & 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.