



Identification and Sequencing of CCD4a and CCD4b Genes in Wild Saffron

Zahra Tahmasebi^{1*}, Hassan Feizi^{2,3}, Noosheen Fallahi⁴, Soheila Mohammadi⁴

Article type:

Research Article

Article history:

Submitted: 30 August 2024

Revised: 28 December 2024

Accepted: 15 February 2025

Available Online: 15 February 2025

How to cite this article:

Tahmasebi, Z., Feizi, H., Fallahi, N., Mohammadi, S. 2025. Identification and Sequencing of CCD4a and CCD4b Genes in Wild Saffron. Saffron Agronomy & Technology, 12(4), 471-485

DOI:10.22048/jsat.2025.476038.1539

Abstract

Apocarotenoid compounds cause various communication functions in plants. Apocarotenoids result from the enzymatic cleavage of carotenoids catalyzed by carotenoid dioxygenases (CCD). The CCD4 family is the largest family of plant CCDs. In this research, genomic DNA was extracted from fresh leaves of wild saffron *Crocus haussknechtii* BOISS and used as a template for amplifying CCD4a and CCD4b genes in PCR reaction. PCR products were sequenced after purification. Then, the gene sequence was compared with the saffron gene available in the gene bank and a phylogenetic tree related to their sequence was drawn. In addition, the amino acids of proteins were compared, and the spatial structure of the protein of these two genes was drawn. The results showed that the number of nucleotides in CCD4a gene is equal to 2402 and in CCD4b gene is 2373 kb. The dendrogram related to the sequence of the CCD4a gene showed that the species were divided into five separate groups based on the similarity in the sequence of nucleic acids, and the highest similarity was related to the CCD4a gene of Iranian agricultural saffron with a rate of 99.82. In addition, the dendrogram diagram for the CCD4b gene was divided into three groups, with the lowest distance between this gene and the genes of saffron species. By defining the exon regions, the protein sequence of CCD4a and CCD4b genes was determined, and their number of amino acids was equal to 577 and 567, respectively. The findings of this research can provide valuable information regarding the behavior and reaction of CCD4a and CCD4b enzymes in the synthesis of *C. haussknechtii* apocarotenoids. They can be used in gene transfer programs from wild saffron to saffron be a useful crop.

Keywords: Apocarotenoids, Dendrogram, Gene bank, Protein.

1- Associate Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

2- Associate Professor, Department of plant production, University of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran

3- Saffron institute, University of Torbat Heydarieh, Torbat Heydarieh, Iran

4- Ph. D. of Plant Breeding -Molecular genetics and genetic engineering, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

Corresponding author email: z.tahmasebi@ilam.ac.i



مقاله پژوهشی

جداسازی و تعیین توالی دو ژن CCD4a و CCD4b در زعفران وحشی (*Crocus haussknechtii*)

زهرا طهماسبی^{۱*}، حسن فیضی^۲، نوشین فلاحی^۳ و سهیلا محمدی^۴

تاریخ دریافت: ۹ شهریور ۱۴۰۳

تاریخ بازنگری: ۸ دی ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۲۷ بهمن ۱۴۰۳

طهماسبی، ز.، فیضی، ح.، فلاحی، ن.، محمدی، س. ۱۴۰۳. جداسازی و تعیین توالی دو ژن CCD4a و CCD4b در زعفران وحشی (*Crocus haussknechtii*). زراعت و فناوری زعفران، ۱۲(۴): ۴۸۶-۴۷۱.

چکیده

ترکیبات آپوکاروتنوئیدی عملکردهای ارتباطی متنوعی را در گیاهان موجب می‌شوند. آپوکاروتنوئیدها نتیجه برش آنزیمی کاروتنوئیدها هستند که توسط دی‌اکسیژنازهای کاروتنوئیدی (CCD) کاتالیز می‌شوند. خانواده CCD4 بزرگترین خانواده CCDهای گیاهی است. در این پژوهش DNA ژنومی از برگ‌های تازه زعفران وحشی *Crocus haussknechtii* BOISS استخراج و به عنوان الگو جهت تکثیر دو ژن CCD4a و CCD4b در واکنش PCR استفاده شد. محصولات PCR پس از تخلیص توالی‌یابی شدند. سپس توالی ژن‌ها با ژن زعفران زراعی موجود در بانک ژن مقایسه شد و درخت فیلوژنتیکی مربوط به توالی آن‌ها ترسیم گشت. همچنین مقایسه اسیدهای آمینه پروتئین‌ها و ترسیم ساختار فضایی پروتئین این دو ژن انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که تعداد نوکلئوتید در ژن CCD4a برابر با ۲۴۰۲ و در ژن CCD4b ۲۳۷۳ کیلو باز است. دندروگرام مربوط به توالی ژن CCD4a نشان داد که گونه‌ها براساس شباهت در ترتیب اسیدهای نوکلئیک به ۵ گروه مجزا تقسیم شدند که بیشترین شباهت مربوط به ژن CCD4a زعفران زراعی ایرانی و به میزان ۹۹/۸۲ بود. همچنین نمودار دندروگرام برای ژن CCD4b به سه گروه تقسیم‌بندی شد که کمترین فاصله این ژن با ژن‌های گونه‌های زعفران بود. با مشخص شدن نواحی اگزونی، توالی پروتئینی ژن‌های CCD4a و CCD4b تعیین شد که تعداد اسیدهای آمینه آنها به ترتیب برابر با ۵۷۷ و ۵۶۷ بود. یافته‌های این تحقیق می‌تواند اطلاعات با ارزشی در رابطه با رفتار و واکنش آنزیم‌های CCD4a و CCD4b در مسیر سنتز آپوکاروتنوئیدهای *C. haussknechtii* فراهم کند و همچنین می‌تواند در برنامه‌های انتقال ژن از زعفران وحشی به زعفران زراعی مفید باشد.

کلمات کلیدی: آپوکاروتنوئیدها، بانک ژن، پروتئین، دندروگرام.

۱- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲- دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، پژوهشکده زعفران، دانشگاه تربیت مدرس، تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دکتری اصلاح نباتات- ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

*- نویسنده مسئول: z.tahmasebi@ilam.ac.ir

مقدمه

نام محلی (Pēēshūkk)، زعفران JoeQāsem یا زعفران زاگرس (شکل ۱) است که بیشتر در کوه‌های زاگرس در ایران، شمال عراق و جنوب اردن رشد می‌کند. این گیاه خوراکی و خودرو در استان‌های غربی ایران (کرمانشاه، ایلام، لرستان و همدان) در فصل بهار قابل برداشت می‌باشد (Mosaviniya et al., 2019). زعفران زراعی گیاهی تریپلوئید ($2n = 3x = 24$) و با اندازه ژنوم $1C = 3/45 \text{ Gbp}$ است (Pandita, D., 2021) ولی اطلاعات ژنتیکی برای گونه وحشی در منابع محدود است.

زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) (شکل ۱) گیاهی گلدار از خانواده زنبقیان است که در مناطق مختلف آسیا، آفریقا و اروپا کشت می‌شود (Bukhari et al., 2018). کشت این گیاه از زمان‌های قدیم در ایران رواج داشته است و کلاله این گیاه یکی از گرانتین ادویه‌ها و با ارزش‌ترین گیاهان دارویی است (Izadpanah et al., 2014).

گیاه زعفران جو قاسم *Crocus haussknechtii* Boiss با



ب- زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.)
https://en.wikipedia.org/wiki/Crocus_sativus



الف- زعفران جو قاسم (*Crocus haussknechtii* Boiss)
 (Najari et al., 2016).

شکل ۱- عکس از زعفران زراعی و وحشی

Figure 1- Photos of cultivated and wild saffron.

میکروارگانیزم‌های غیر فتوسنتزی سنتز می‌شوند (Moise et al., 2014; Rodriguez-Concepcion et al., 2018). بدن انسان قادر به سنتز کاروتنوئید نیست اما به دلیل نقش این رنگدانه آنها در سنتز ویتامین A و نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی، انسان‌ها به آن نیاز دارد (Zheng et al., 2020). این ترکیبات آبریز با ایجاد رنگ‌های زرد، نارنجی و قرمز در گل‌ها و میوه‌ها عامل جذب حشرات هستند و به این وسیله گرده‌افشانی و

تجزیه و تحلیل فیتوشیمیایی وجود چندین ترکیب فرار و غیرفرار در کلاله‌های زعفران را تایید کرده است. این گیاه علاوه بر مواد معدنی، پروتئین‌ها، قند و ویتامین‌هایی مانند B1 و B2، دارای چهار ماده فعال زیستی کاروتنوئیدی اصلی شامل کروستین، کروستین، پیکروکروستین و سافرانال است (Al-Snafi., 2016). کاروتنوئیدها بزرگ‌ترین دسته از رنگدانه‌های ایزوپرنوئید هستند که توسط همه ارگانیزم‌های فتوسنتزی و بسیاری از

شکستن پیوندهای دو گانه C9-C10 و C9'-C10' در کاروتنوئیدهای حلقوی است آنها به این وسیله واسطه تشکیل کتونهای فرار می‌شوند. این آنزیم‌ها بر اساس پیوند دوگانه به دو گروه CCD4a و CCD4b تقسیم می‌شوند (Mi & Al-Babili, 2019).

پژوهش‌های ژنتیکی در حوزه ژنومیکس یکی از مهم‌ترین جنبه‌های تحقیقاتی برای درک مکانسیم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و یافتن راه‌کاری برای افزایش کمیت و کیفیت آنها محسوب می‌شود (Khakpour et al., 2019). تاکنون تلاش‌های زیادی جهت شناسایی ژن‌ها و آنزیم‌های مؤثر در بیوسنتز آپوکاروتنوئیدها در زعفران صورت گرفته است (Yue et al., 2020; Luo et al., 2023; Eshaghi & Rashidi-Monfared, 2024)، اما مشکلاتی مانند تریپلوئیدی بودن، اندازه بزرگ ژنوم و وجود توالی‌های تکراری در ژنوم زعفران نتایج این مطالعات را با مشکل مواجه کرده است (Tan et al., 2019; Ahrazem et al., 2019; Qian et al., 2019; Ahrazem et al., 2018; Cheng et al., 2017). اطلاعات در مورد ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز آپوکاروتنوئیدها در زعفران وحشی در منابع بررسی شده وجود ندارد.

با توجه با اهمیت گیاه زعفران و ترکیبات کاروتنوئیدی در این گیاه و همچنین نقش ژن‌های CCD4a و CCD4b به عنوان ژن کلیدی در روند بیوسنتز کاروتنوئیدها و عدم وجود اطلاعات در مورد گونه‌های وحشی زعفران در بانک ژن برسی و مطالعه بر روی این ژن‌ها ضروری به نظر می‌رسد. هدف از انجام این پژوهش شناسایی و جداسازی این ژن‌ها و بررسی روابط فیلوژنتیکی آن به منظور تسهیل روش‌های اصلاحی در روند افزایش کارتنوئید در زعفران بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش پیاز جمع‌آوری شده از گیاه زعفران وحشی

پراکندگی بذر در گیاهان را تسهیل می‌کنند و همچنین برای محافظت دستگاه فتوسنتزی گیاه و حفاظت آنها در مقابل اکسیداسیون نور ضروری می‌باشند (Ahrazem et al., 2016; Hashimoto et al., 2016; Yuan et al., 2015). همچنین کاروتنوئیدها به فرآیندهای اکسیداسیون حساس هستند و با شکستن پیوندهای دوگانه خود به آپوکاروتنوئیدها تبدیل می‌شوند. آپوکاروتنوئیدها شامل رنگدانه‌ها، مواد فرار، تنظیم‌کننده‌های رشد و فیتوهورمون‌ها می‌شود (Hou et al., 2016; Moreno et al., 2021; Wang et al., 2019).

کروسین و کروستین ترکیبات آپوکاروتنوئیدی هستند که با عثرنگ زرد زعفران می‌شوند. طعم زعفران به دلیل پیروکروسین است در حالی که بو و عطر خاص آن نیز به سافرانال نسبت داده می‌شود (El Midaoui et al., 2022). از خواص دارویی زعفران می‌توان به آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد دیابتی و ضد فشارخون ضد اضطراب اشاره کرد همچنین ثابت شده که کروسین موجود در کلاله زعفران در کاهش علائم بیماری آلزایمر مؤثر است (Cerdá-Bernad et al., 2022; Ghahghaei et al., 2013; Tiribuzi et al., 2017). تشکیل آپوکاروتنوئید در گیاهان عموماً توسط آنزیم‌های دی‌اکسیژنازهای کاروتنوئیدی کاتالیز می‌شود. این آنزیم‌ها به دو گروه NCEDs و دی‌اکسیژنازهای کاروتنوئیدی CCD تقسیم می‌شوند (Anaiegoudari, 2022). کاروتنوئید اکسیژنازها (CCD) آنزیم‌هایی هستند که در بیوسنتز کاروتنوئیدها نقش دارند. تاکنون پنج دسته از CCDها شناسایی شده‌اند که شامل CCD1، CCD2، CCD4، CCD7 و CCD8 هستند. تفاوت این آنزیم‌ها در نوع پیش‌ماده و جایگاه فعالیت آنها می‌باشد. تاکنون محققین کاروتنوئید اکسیژنازهایی مانند CsCCD1، CsCCD2، CsCCD4a و CsCCD4b را در زعفران شناسایی و جداسازی کرده‌اند (Ahrazem et al., 2016; Rubio et al., 2008). آنزیم‌های CCD4 در پلاستید وجود دارند و کار آنها

Rabbit کشور آلمان استفاده شد. برای بررسی حضور و همچنین ارزیابی کمیت و کیفیت DNA ازدستگاه نانودراپ مدل BOECO N-1C, Germany و ژل آگارز یک درصد استفاده گشت.

طراحی آغازگر و شناسایی ژن با PCR

اولین مرحله در شناسایی ژن، طراحی آغازگر مناسب و استفاده از آن‌ها در واکنش PCR است. جهت طراحی آغازگر از توالی زعفران ایرانی با شماره دسترسی MK618660.1 و MK618659.1 موجود در سایت NCBI استفاده شد. در ابتدا جهت شناسایی هر یک از ژن‌ها یک جفت پرایمر طراحی و واکنش PCR انجام شد (جدول ۱).

بعد از ضد عفونی شدن با قارچ‌کش، در گلدان‌های پلاستیکی (قطر ۱۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر) پر شده با پرلیت کشت شدند و در گلخانه دانشکده کشاورزی داز شگاه ایلام با شرایط دمایی ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتیگراد، رطوبت ۶۰ درصد و در فتوپریود ۱۶ ساعت رو شنایی ۸ ساعت تاریک نگهداری شدند (Molina et al., 2005). بعد از رشد برگ‌های جوان گیاه زعفران جهت انجام مطالعات مولکولی جمع آوری شد.

استخراج DNA ژنومی

پس از جمع‌آوری و انجماد برگ‌های جوان در نیتروژن مایع، جهت استخراج DNA از دو روش CTAB تغییر یافته (Beiki et al., 2011) و کیت استخراج DNA شرکت Biotech

جدول ۱- برنامه دمایی واکنش PCR

Table 1- PCR program temperature

مرحله Step	دما Temperature (°C)	زمان Time (sec)
واسرشته سازی اولیه Initial denaturation	96	300
واسرشته‌سازی Denaturation	96	45
اتصال Annealing	60	45
۳۵ چرخه 35 Cycle گسترش Extension	72	165
گسترش نهایی Final extension	72	420

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر دو ژن CCD4a و CCD4b

Table 2- The primers used in the amplification of CCD4b and CCD4a genes

نام آغازگر Primer name	توالی Sequence
F CCD4a1	5'-ATGGATTATCGGTTGTCATCCTCCT-3'
R CCD4a1	5'-CTACCCTTCAGTACAATGAC-3'
F CCD4a2	5'-CTCGTCTTCTTCTCCGGGTC-3'
R CCD4a2	5'-AGACGGCATAAGTGTTCGGTGAT-3'
F CCD4a3	5'-GTACTCCCCTTACGACTG-3'
R CCD4a3	5'-CTACTGCTGTGACAGCAGCTCAG-3'
F CCD4b1	5'-ATGGAGTATCGGTTGTCATCCTCCC-3'
R CCD4b1	5'-AGCCTACCAGTTGTCCGT-3'
F CCD4b2	5'-GTCTTCTTCTCCGGTTCTTG-3'
R CCD4b2	5'-CGGTGATCGCAAAGTCGTG-3'
F CCD4b3	5'-ACGTACTCCCATTACGACC-3'
R CCD4b3	5'-CTACTGCTGTGACAGCAGCTCAG-3'

جدول ۳- برنامه دمایی واکنش PCR
Table 3- PCR program temperature

مرحله Step	دما Temperature (°C)	زمان Time (sec)
واسرشته سازی اولیه Initial denaturation	95	240
واسرشته سازی Denaturation	95	30
اتصال ۳۵ چرخه 35 Cycle Annealing	برای هر ژن مطابق با دمای اتصال For each gene according to the annealing temperature	20
گسترش Extension	72	45
گسترش نهایی Final extension	72	240

توالی ژن‌های CCD4a و CCD4b با توالی این ژن‌ها در زعفران ایرانی، تو سطر ابزار نرم افزار MEGA11 انجام پذیرفت. به منظور بررسی روابط فیلوژنتیک بین این دو ژن، در گیاه زعفران وحشی با سایر ارقام و گونه‌ها، ابتدا هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها با استفاده از روش ClustalW انجام شد و سپس جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی از نرم افزار MEGA11 و روش Neighbour joining استفاده گشت (Tamura et al., 2013). همچنین جهت بررسی و صحت تکرارپذیری درخت ترسیم شده، از آزمون بوت استرپ^۱ با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد و در نهایت ساختار فضایی پروتئین و میزان اسیدهای آمینه در هر دو ژن توالی‌یابی شده، تعیین شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA ژنومی با کمیت و کیفیت مناسب از الزامات یک پژوهش مولکولی است. استخراج DNA از بافت گیاه زعفران به علت حضور کربوهیدرات، متابولیت‌های ثانویه، تانن‌ها، ترکیبات فنلی و پروتئین‌ها با مشکلاتی روبرو است. زیرا این مواد بر کیفیت DNA اثر منفی می‌گذارند. در این پژوهش

بعد از شناسایی ژن، به دلیل بزرگ بودن اندازه ژن‌ها و جهت سهولت در تعیین توالی برای هر ژن سه جفت آغازگر طراحی شد (جدول ۲). واکنش PCR برای تکثیر قطعات ژنی با استفاده از آنزیم Taq تولید شرکت Amliqon کشور دانمارک، DNA استخراج شده به عنوان الگو و دستگاه PCR شرکت BioRad، کشور آمریکا انجام شد (جدول ۳).

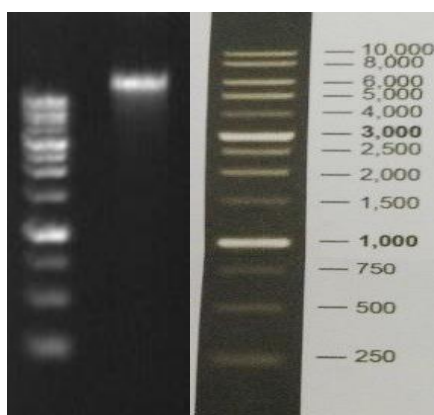
پس از انجام واکنش، محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری و اندازه باندها تأیید شد. پس از تأیید اندازه، باندهای قطعات دو ژن CCD4a و CCD4b از ژل آگارز برش خورده و با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت زیست فناوران رنا خالص‌سازی شده و در نهایت به صورت دو طرفه توسط شرکت Microsynth کشور سوئیس توالی‌یابی شدند.

آنالیزهای بیوانفورماتیکی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

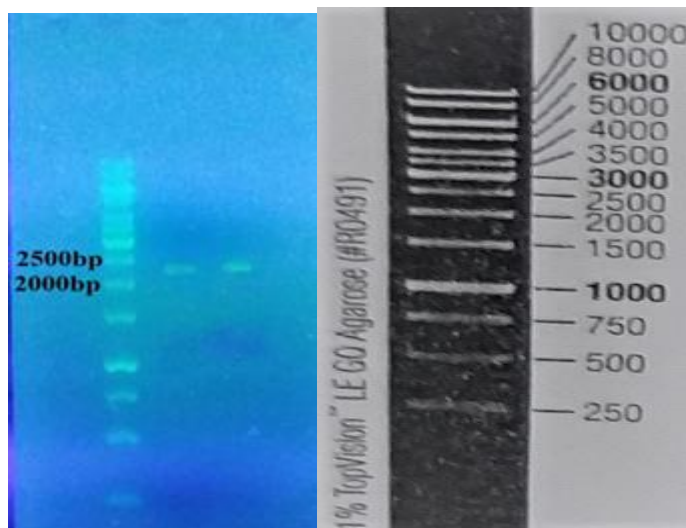
نتایج توالی‌یابی برای هر قطعه به طور جداگانه و با استفاده از نرم افزار CLC Genomics Workbench سرهم‌بندی شد و صحت نتایج توالی‌یابی با استفاده از ابزار BLAST پایگاه نوکلئوتیدی NCBI تأیید شد. هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها و مقایسه

استفاده از دستگاه نانو داراپ میزان جذب نور در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شد. نسبت به دست آمده میزان جذب نور در این دو طول موج بین ۲-۱/۸ بود که این نسبت نشان‌دهنده کیفیت بالای DNA استخراج شده است. همچنین آنالیزها نشان‌دهنده غلظت ۷۰۰ نانو گرم بر میکرولیتر DNA بود.

DNA استخراج شده به روش کیت نسبت به روش CTAB تغییر داده شده کیفیت بهتری داشت (شکل ۲). برای تعیین کمیت، کیفیت، خلوص DNA استخراج شده ابتدا ۶ میکرولیتر از آن در درون چاهک ژل آگارز یک درصد تخلیه و الکتروفورز افقی انجام شد. وجود تک باند در نیم رخ الکتروفورزی، دلیلی بر کیفیت مناسب DNA استخراج شده بود (شکل ۲). در ادامه با



شکل ۲ - تهیه DNA از زعفران وحشی بر روی ژل آگارز یک درصد به روش کیت
Figure 2- Preparation of DNA from wild saffron on 1% agarose gel by the Kit method.



شکل ۳- ژل الکتروفورز پس از PCR دو ژن CCD4a و CCD4b. لاین ۱: سایز مارکر لاین ۲: ژن CCD4b و لاین ۳: ژن CCD4a
Figure 3- Gel electrophoresis after PCR of CCD4a and CCD4b genes. Line 1: size marker, line 2: CCD4b gene and line 3: CCD4a gene.

طراحی آغازگرها صورت گرفته است، هنوز تمامی عوامل مؤثر در تکثیر محصول مورد نظر، شناخته نشده است (Litt & Irish., 2003). کارایی و حساسیت PCR به میزان زیادی به

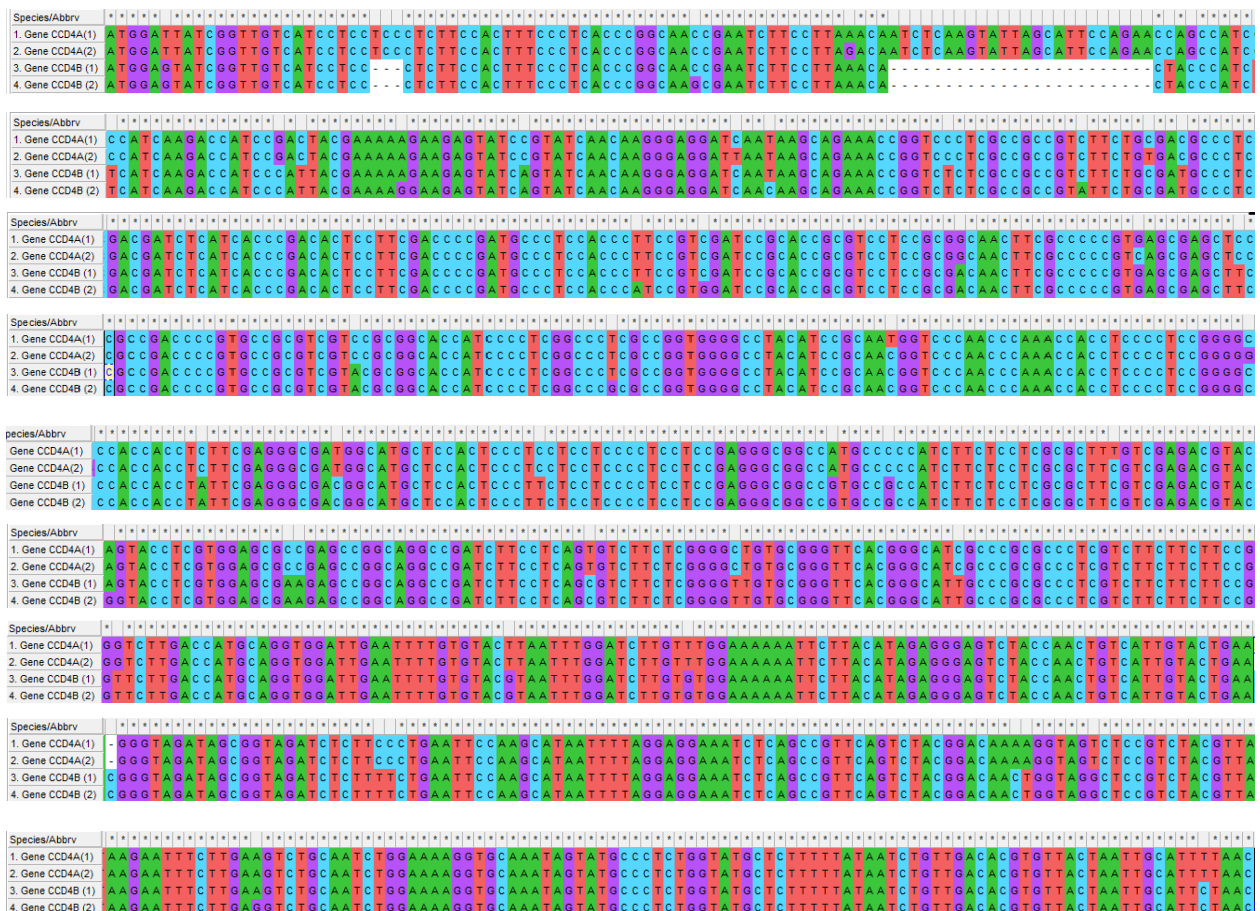
یکی از مهمترین بخش‌های تمامی مطالعات و روش‌های تشخیصی که بر پایه PCR است، طراحی آغازگر می‌باشد. با وجود تلاش‌های بسیار و تحقیقاتی که در سال‌های اخیر روی

کیفیت گراف‌های حاصل از توالی‌یابی نشان‌دهنده میزان دقت در تعیین توالی‌یابی در این پژوهش بود جهت بررسی شاخص‌های ژنتیکی در این پژوهش از MEGA, BLAST استفاده شد (شکل ۴).

بررسی توالی این دو ژن و مقایسه آن با توالی‌های موجود در سایت NCBI در زعفران زراعی نشان داد که هر دو ژن دارای سه قطعه با ترتیب اگزون – اینترون – اگزون بودند که این موضوع با نتایج پژوهش حبیب زاده و همکاران (Habibzadeh et al., 2020) مطابقت داد. همدریف کردن توالی‌ها، به روش مرتب کردن توالی‌های بیولوژیکی، موقعیت دقیق نوکلئوتیدها را در مکان‌های مشابه مشخص می‌کند. مکان‌های مشابه بین دو یا چند توالی می‌تواند نشانگر ارتباط عملکردی، ساختاری یا تکاملی بین توالی‌ها باشد به طوری که همه آن‌ها دارای یک جد مشترک باشند (Shahraki et al., 2020).

کارایی آغازگرها بستگی دارد چرا که طراحی آغازگرها، اصلی‌ترین عامل موفقیت PCR است و ضعف در طراحی آغازگر، مانع از انجام صحیح PCR می‌شود (SU et al., 2000). نتایج الکتروفورز محصول PCR نشان داد که دو ژن CCD4a و CCD4b به طول تقریبی ۲۳۰۰ تا ۲۴۰۰ کیلو باز در گیاه زعفران وحشی به خوبی تکثیر شده است. در این مطالعه به دست آمدن تک باند اختصاصی حاصل از PCR روی ژل آگارز بیانگر طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و برنامه PCR مناسب (به خصوص دمای اتصال) بود (شکل ۳).

پس از توالی‌یابی و تحلیل داده‌های حاصل از آن مشخص شد که طول ژن‌های CCD4a و CCD4b در زعفران وحشی به ترتیب برابر با ۲۴۰۲ و ۲۳۷۳ کیلو باز است. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Chromas مورد بازنگری قرار گرفت (Lopez & Bonasora, 2017) و سپس جهت آنالیزهای بیوانفورماتیکی از نتایج حاصل از توالی نمونه‌ها استفاده شد.





شکل ۴ - نتایج حاصل از هم‌ردیفی ژن‌های CCD4a و CCD4b توالی‌یابی شده با توالی‌های زعفران ایرانی موجود در سایت NCBI: ۱: ژن CCD4a موجود در سایت NCBI ۲: ژن CCD4a توالی‌یابی شده ۳: ژن CCD4b موجود در سایت NCBI ۴: ژن CCD4b توالی‌یابی شده

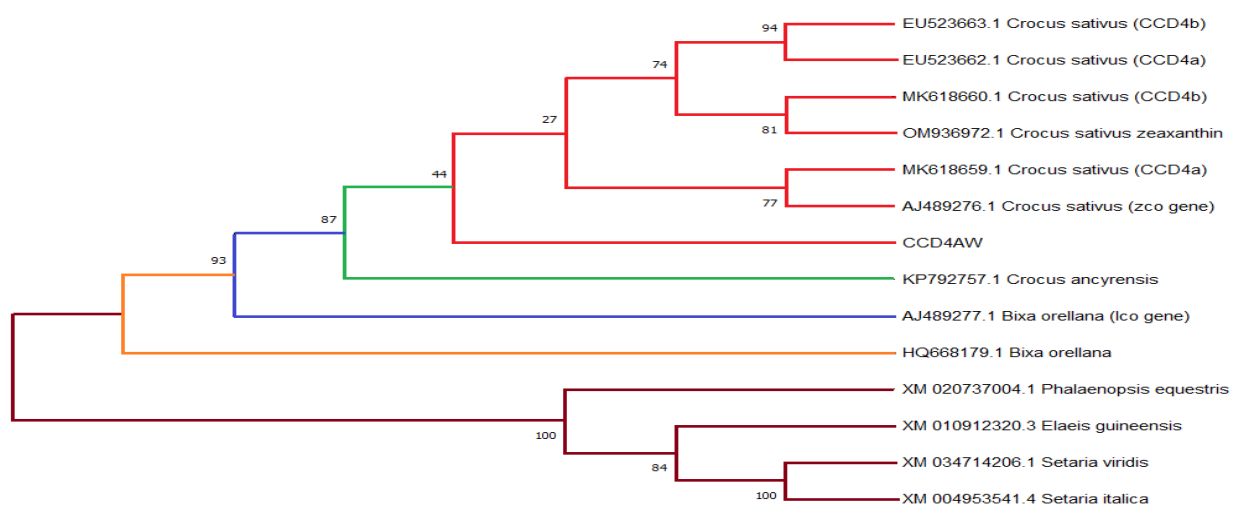
Figure 4- The results of alignment of sequenced CCD4a and CCD4b genes with Iranian saffron sequences available on NCBI website 1: CCD4a gene available on NCBI website 2: CCD4a gene sequenced 3: CCD4b gene available on NCBI website 2: CCD4b gene sequenced.

تحقیق کمترین فاصله را با کدهای د ستر سی EU523663.1، EU523662.1، MK618659.1، MK618660.1، OM936972.1، AJ489276.1، و بیشترین شباهت مربوط به ژن CCD4a زعفران زراعی ایرانی با شماره دسترسی EU523663.1 و به میزان ۹۹/۸۲ بود بیشترین فاصله نیز مربوط به گونه‌های *Setaria Elaeis guineensis* و *Phalaenopsis equestris Setaria italica viridis* بود (شکل ۵).

همچنین نمودار دندروگرام برای ژن CCD4b در زعفران وحشی به سه گروه مجزا تقسیم شد. کمترین فاصله در این ژن با ژن‌های CCD4a و CCD4b سایر گونه‌های زعفران بود و کمترین شباهت نیز مربوط به دو گونه *Phalaenopsis equestris* و *Elaeis guineensis* با سه کد دسترسی XM020737004.1 و XM010912320.3، AJ489277.1 بودند (شکل ۶).

در پژوهشی توالی DNA تعداد زیادی از ارقام زعفران را بررسی کردند و توانستند دو ژن CCD4a و CCD4b را از گیاه زعفران و با استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR جداسازی کنند. آن‌ها اظهار داشتند که تا کنون آل‌های مختلفی از CCD4 را شناسایی کرده‌اند. به طوری که در ژن CCD4a سه توالی متفاوت شامل کپی حاوی یک اینترون، کپی با توالی اینترون کوتاه شده و کپی فاقد اینترون را گزارش دادند. آنها همچنین اعلام کردند که در تمامی کپی‌های ژن CCD4b یک اینترون دیده شده است (Ahrazem et al., 2016).

در این مطالعه میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی ژن‌های CCD4a و CCD4b در گیاه زعفران وحشی با سایر هم ساخت‌های آن مقایسه گردید. به این منظور توالی‌های مشابه آن در سایت NCBI دریافت شد و درخت فیلوژنتیکی آن رسم شد. نمودار دندروگرام مربوط به توالی ژن CCD4a نشان داد که گونه‌ها براساس شباهت در ترتیب اسیدهای نوکلئیک به ۵ گروه مجزا تقسیم شدند که توالی ژن جداسازی شده CCD4a در این



شکل ۵- نمودار دندروگرام مربوط به توالی ژن CCD4a مورد مطالعه و سایر توالی‌های انتخاب شده

Figure 5- Dendrogram diagram related to the studied CCD4a gene sequence and other selected sequences.

دارد. وجود بخش آبریز به این دلیل است که آنزیم باید به غشا سلولی متصل شود تا به این وسیله به سوبسترای خود دسترسی پیدا کند (Wang et al., 2019).

نتیجه‌گیری

یافته‌های این تحقیق می‌تواند اطلاعات با ارزشی در رابطه با رفتار و واکنش آنزیم‌های CCD4a و CCD4b در مسیر سنتز آپوکاروتنوئیدهای *C.haussknechtii* فراهم کند. همچنین این یافته‌ها در مطالعه روابط فیلوژنیکی گونه‌های مختلف زعفران مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجائیکه اطلاعات محدودی در زمینه بیوشیمی و مولکولی گونه‌های وحشی زعفران در ایران وجود دارد. مطالعات بیشتر می‌تواند به برنامه‌های اصلاحی و انتقال ژن از زعفران وحشی به زعفران زراعی مفید باشد.

قدردانی

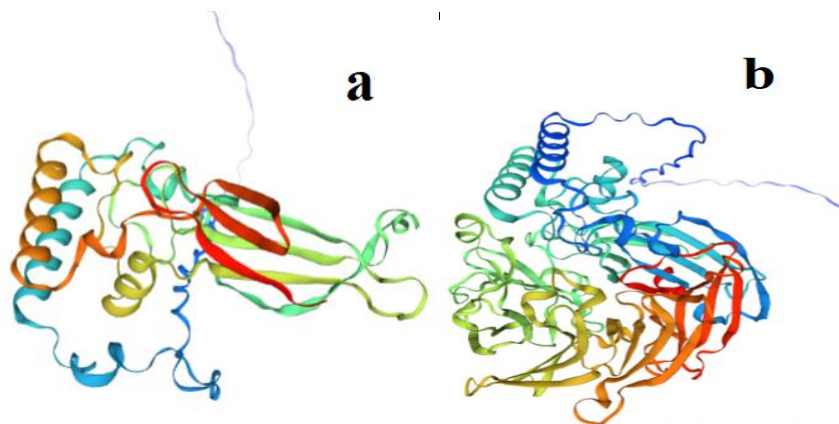
این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی اجرا شده به شماره قرارداد ۱۲۸۸۵۲ از محل اعتبارات پژوهش‌شده زعفران دانشگاه تربیت‌حیدریه می‌باشد

تغییر کرده و اسیدآمینه همچنان بدون تغییر مانده‌اند. همچنین نتایج نشان‌دهنده آن بود که در بعضی از موقعیت‌ها با تغییر نوکلئوتید کد نیز تغییر کرده است و در واقع جهش به وجود آمده مؤثر بوده است.

اساس ترسیم ساختار سه بعدی یک پروتئین بر پایه مدل سازی همولوژی است و این ساختار تا حدود زیادی خواص عملکردی پروتئین را مشخص می‌کند. بخش‌های متفاوت شکل فضایی تعیین‌کننده کاربرد و عملکرد ویژه پروتئین است و هر نوع تغییر در این بخش‌ها می‌تواند باعث اختلال در عملکرد آن شود (Yousefi Javan, 2017).

جهت بررسی ساختار پروتئینی دو ژن CCDA4a و CCD4b ترجمه این ژن‌ها توسط نرم افزار تحت شبکه و با استفاده از روش مدل‌سازی SWISS-MODEL موجود در سایت EXPASY انجام گرفت و ساختار سه بعدی ژن مورد نظر شبیه‌سازی شد (شکل ۸). بررسی‌های حاصل از روش X-RAY 2.6 Å نشان داد که پروتئین این دو ژن دارای سه سایت لیگاندی با نام‌ها CO، PIT و BEZ می‌باشد.

در پروتئین خانواده CCDها یک بخش پروانه‌ای شکل و یک لکه آبریز که توسط دو مارپیچ آلفا تشکیل شده است وجود



شکل ۸- ساختار فضایی پروتئین. a: CCDA4a b: CCD4b.
Figure 8- Spatial structure of protein. a: CCDA4a b: CCD4b.

منابع

Ahrazem, O., Argandoña, J., Fiore, A., Aguado, C.,

Luján, R., Rubio-Moraga, Á., Marro, M.,

- Araujo-Andrade, C., Loza-Alvarez, P., Diretto, G., & 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), 2843-2859. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21225-z>.
- Ahrazem, O., Argandoña, J., Fiore, A., Rujas, A., Rubio-Moraga, Á., Castillo, R., & Gómez-Gómez, L. (2019). Multi-species transcriptome analyses for the regulation of crocins biosynthesis in *Crocus*. *BMC Genomics*, 20, 1-15.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Argandona-Picazo, J., Castillo, R., & Gómez-Gómez, L. (2016). Intron retention and rhythmic diel pattern regulation of carotenoid cleavage dioxygenase 2 during crocetin biosynthesis in saffron. *Plant Molecular Biology*, 91, 355-374. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5666-5>.
- Al-Snafi, A. E. (2016). Nutritional value and pharmacological importance of citrus species grown in Iraq. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6 (8), 76-108. <https://doi.org/10.9790/3013-0680176108>.
- Anaeigoudari, A. (2022). Antidepressant and anti-nociceptive effects of *Nigella sativa* and its main constituent, thymoquinone: A literature review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 12 (12), 495-503. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.363875>.
- Beiki, A. H., Keify, F., & Mozafari, J. (2011). Rapid genomic DNA isolation from corm of *Crocus* species for genetic diversity analysis. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (18), 4596-4600. <https://doi.org/10.5897/JMPR>.
- Bukhari, S. I., Manzoor, M., & Dhar, M. K. (2018). A comprehensive review of the pharmacological potential of *Crocus sativus* and its bioactive apocarotenoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 733-745. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.090>.
- Cerdá-Bernad, D., Valero-Cases, E., Pastor, J. J., & Frutos, M. J. (2022). Saffron bioactives crocin, crocetin and safranal: Effect on oxidative stress and mechanisms of action. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 62 (12), 3232-3249. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1864279>.
- Cheng, B., Furtado, A., & Henry, R. J. (2017). Long-read sequencing of the coffee bean transcriptome reveals the diversity of full-length transcripts. *Gigascience*, 6 (11), 1-13. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix086>.
- El Midaoui, A., Ghzaïel, I., Vervandier-Fasseur, D., Ksila, M., Zarrouk, A., Nury, T., Khallouki, F., El Hessni, A., Ibrahimi, S. O., Latruffe, N., & Lizard, G. (2022). Saffron (*Crocus sativus* L.): A source of nutrients for health and for the treatment of neuropsychiatric and age-related diseases. *Nutrients*, 14 (3), 597-617. <https://doi.org/10.3390/nu14030597>.
- Eshaghi, M., & Rashidi-Monfared, S. (2024). Co-regulatory network analysis of the main secondary metabolite (SM) biosynthesis in *Crocus sativus* L. *Scientific Reports*, 14 (1), 15839- 1584. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65870-z>.
- Ghahghaei, A., Bathaie, S. Z., Kheirkhah, H., & Bahraminejad, E. (2013). The protective effect of crocin on the amyloid fibril formation of A β 2 peptide in vitro. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 18, 328-339. <https://doi.org/10.2478/s11658-013-0092-1>.
- Habibzadeh, M. J., Dorani, E., Ziaratnia, S. M., & Valizadeh, M. (2020). Cloning and bioinformatics investigation on CCD4a and CCD4b genes from Iranian saffron (*Crocus sativus* L.). *Saffron Agronomy & Technology*, 8 (2), 211-229 (In Persian with English Abstract). <https://doi.org/10.22048/jsat.2023.403704.1492>.
- Hashimoto, H., Urugami, C., & Cogdell, R. J. (2016). Carotenoids and photosynthesis. *Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation & Function*, 111-139. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_4.
- Hou, X., Rivers, J., León, P., McQuinn, R. P., &

- Pogson, B. J. (2016). Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants. *Trends in Plant Science*, 21 (9), 792-803. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.001>.
- Izadpanah, F., Kalantari, S., Hassani, M. E., Naghavi, M. R., & Shokrpour, M. (2014). Variation in Saffron (*Crocus sativus* L.) accessions and *Crocus* wild species by RAPD analysis. *Plant Systematics & Evolution*, 300, 1941-1944.
- Khakpour, A., Zolfaghari, M., & Sorkheh, K. (2019). Bioinformatics study and investigation of the expression pattern of several important genes involved in glycyrrhizin synthesis of *Glycyrrhiza glabra* L. in autumn and spring seasons. *Plant Genetic Researches*, 6 (1), 55-68. (In Persian with English Abstract). <https://doi.org/10.29252/pgr.6.1.55>.
- Litt, A., & Irish, V. F. (2003). Duplication and diversification in the APETALA1/FRUITFULL floral homeotic gene lineage: implications for the evolution of floral development. *Genetics*, 165 (2), 821-833. <https://doi.org/10.1093/genetics/165.2.821>.
- López, A., & Bonasora, M. G. (2017). Phylogeography, genetic diversity and population structure in a Patagonian endemic plant. *AoB Plants*, 9 (3), 1-12. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plx017>.
- Luo, D., Wang, T., Ye, M., Zhu, X., Cheng, Y., Zheng, Y., Xing, B & Shao, Q. (2023). Identification and characterization of *Crocus sativus* WRKY and its interacting MPK involved in crocins biosynthesis based on full-length transcriptome analysis. *Industrial Crops & Products*, 197, 1159-1165. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116559>.
- Mosaviniya, M., Kikhavani, T., Tanzifi, M., Yarak, M. T., Tajbakhsh, P., & Lajevardi, A. (2019). Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Crocus haussknechtii* Bois bulb extract: Catalytic activity and antibacterial properties. *Colloid & Interface Science Communications*, 33, 100-111. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2019.100211>.
- Mi, J., & Al-Babili, S. (2019). To color or to decolor: that is the question. *Molecular Plant*, 12 (9), 1173-1175. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.07.007>.
- Moise, A. R., Al-Babili, S., & Wurtzel, E. T. (2014). Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. *Chemical Reviews*, 114 (1), 164-193. <https://doi.org/10.1021/cr400106y>.
- Molina, R. V., Valero, M., Navarro, Y., Guardiola, J. L., & Garcia-Luis, A. J. S. H. (2005). Temperature effects on flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *Scientia Horticulturae*, 103 (3), 361-379. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.06.005>.
- Moreno, J. C., Mi, J., Alagoz, Y., & Al-Babili, S. (2021). Plant apocarotenoids: from retrograde signaling to interspecific communication. *The Plant Journal*, 105 (2), 351-375. <https://doi.org/10.1111/tpj.15102>.
- Najari, G., Aazami, F., Taghi Mollaei, Y., & Fattahi, S., 2016. The morphological survey of wild saffron species in forests and rangeland of Ilam Province Ghasem. *Forest Sterategical Approachment Journal*, 1 (3), 46-53. (In Persian with English Abstract). <https://www.magiran.com/p1684320>.
- Pandita, D., Pandita, A., Wani, S. H., Abdelmohsen, S. A., Alyousef, H. A., Abdelbacki, A. M., Al-Yafrasi, M.A., Al-Mana, F. A., & Elansary, H. O. (2021). Crosstalk of multi-omics platforms with plants of therapeutic importance. *Cells*, 10 (6), 1296. <https://doi.org/10.3390/cells10061296>.
- Qian, X., Sun, Y., Zhou, G., Yuan, Y., Li, J., Huang, H., & Li, L. (2019). Single-molecule real-time transcript sequencing identified flowering regulatory genes in *Crocus sativus*. *BMC Genomics*, 20, 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6200-5>.
- Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-

- Mendez, D., & Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 70, 62-93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>.
- Rubio, A., Rambla, J. L., Santaella, M., Gomez, M. D., Orzaez, D., Granell, A., & Gomez-Gomez, L. (2008). Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in β -ionone release. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (36), 24816-24825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804000200>.
- Shahraki, H., Mahdinezhad, N., Fakhri, B., & Haddadi, F. (2020). Separation and identification of FEH1 gene in thorny artichoke plant (*Cynara cardunculus*) and its relative expression under the influence of abiotic stresses. Separation and identification of FEH1 gene in thorny artichoke plant (*Cynara cardunculus*) and its relative expression under the influence of abiotic stresses. *Journal of Modern Genetics*, 15 (2), 171-181 (In Persian with English Abstract). <https://doi.org/20.1001.1.20084439.1399.15.2.9.2>.
- Su, C., Zhang, X., & Dubey, J. P. (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*, 36 (7), 841-848. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>.
- Tan, H., Chen, X., Liang, N., Chen, R., Chen, J., Hu, C & Zhang, L. (2019). Transcriptome analysis reveals novel enzymes for apo-carotenoid biosynthesis in saffron and allows construction of a pathway for crocetin synthesis in yeast. *Journal of Experimental Botany*, 70 (18), 4819-4834. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz211>.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology & Evolution*, 30 (12), 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Tiribuzi, R., Crispoltoni, L., Chiurchiù, V., Casella, A., Montecchiani, C., Del Pino, A. M., & Orlacchio, A. (2017). Trans-crocetin improves amyloid- β degradation in monocytes from Alzheimer's Disease patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 372, 408-412. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.11.004>.
- Wang, J. Y., Haider, I., Jamil, M., Fiorilli, V., Saito, Y., Mi, J., Baz, L., Kountche, B.A., Jia, K, P., Guo, X., Balakrishna, A., & Al-Babili, S. (2019). The apocarotenoid metabolite zaxinone regulates growth and strigolactone biosynthesis in rice. *Nature Communications*, 10 (1), 810-819. doi.org/10.1038/s41467-019-08461-1.
- Yousefi Javan, I., & Gharari, F. (2017). The structure of the protein and gene expression of PIC2 affecting blooming flowers (*Crocus sativus* L.). *Saffron Agronomy & Technology*, 5 (1), 73-90. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22048/jsat.2017.63141.1200>.
- Yuan, H., Zhang, J., Nageswaran, D., & Li, L. (2015). Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. *Horticulture Research*, 2, 15036-15047. <https://doi.org/10.1038/hortres.2015.36>.
- Yue, J., Wang, R., Ma, X., Liu, J., Lu, X., Thakar, S. B., An, N., Liu, J., Xia, E & Liu, Y. (2020). Full-length transcriptome sequencing provides insights into the evolution of apocarotenoid biosynthesis in *Crocus sativus*. *Computational & Structural Biotechnology Journal*, 18, 774-783. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.022>.
- Zheng, X., Mi, J., Deng, X., & Al-Babili, S. (2021). LC-MS-based profiling provides new insights into apocarotenoid biosynthesis and modifications in citrus fruits. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 69 (6), 1842-1851. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06893>.