Archive of SID

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵ ص. ۲۰۰-۱۸۵

Saffron Agronomy & Technology
Vol. 4, No. 3, Fall 2016, P. 185-200
DOI: 10.22048/jsat.2016.13910

مطالعه تنوع ژنتیکی و برخی از صفات زراعی و کیفی در زعفران (*Crocus sativus* L.)

مهدی بیات[۱]، رضا امیرنیا[۲*]، مهدی تاجبخش[۳] و بهاتین تانیولاچ[۴]

تاریخ دریافت: ۱۲ شهریور ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: ۱۴ بهمن ۱۳۹۴

چکیده

به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی و زراعی زعفران، شش اکوتیپ از نقاط مختلف استان خراسان (مشهد، تربت‌جام، گناباد، تربت‌حیدریه، قاین و بیرجند) جمع‌آوری و در طی دو سال زراعی ۹۳-۱۳۹۱ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مزرعه‌ای نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها از لحاظ اکثر صفات زراعی و کیفی مورد مطالعه وجود دارد. به‌طوری‌که تجزیه خوشه‌ای، اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه، مشهد و تربت‌جام را در یک خوشه و اکوتیپ‌های بیرجند، قاین و گناباد را در خوشه دیگر گروه-بندی نمود. همچنین نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه و مشهد به ترتیب به‌عنوان بهترین اکوتیپ‌های زعفران در ارومیه شناخته شدند. از طرفی نتایج ژنتیکی نشان داد که از بین ۳۰ جفت آغازگر SSR مورد استفاده، ۲۲ جفت آغازگر (۷۳٪)، در مجموع ۴۴ آلل چندشکلی را شناسایی نمودند (میانگین ۲ عدد). میانگین شاخص شانون (I)، تنوع ژنتیکی (h) و محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) به ترتیب ۰/۶۸۸، ۰/۴۲۴ و ۰/۴۰۲ تخمین زده شد که این نتایج از وجود تنوع ژنتیکی در بین اکوتیپ‌های زعفران خبر می‌دهد و این تنوع توسط تجزیه‌های دیگری از جمله تجزیه واریانس مولکولی مورد تأیید قرار گرفت. از طرفی نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای داروین، هر کدام از اکوتیپ‌های بیرجند، مشهد و گناباد را در یک خوشه و سه اکوتیپ تربت‌حیدریه، قاین و تربت‌جام را به‌دلیل شباهت بالا همگی را در یک خوشه قرار داد و این گروه‌بندی توسط تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مورد تأیید قرار گرفت. قابل ذکر است شباهت ژنتیکی بالایی بین اکوتیپ‌های زعفران (۹۰-۶۵ درصد) تخمین زده شد. در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق ضمن بیان این موضوع که نشانگرهای ریزماهواره ابزار مفیدی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی اکوتیپ‌های زعفران هستند. این موضوع را نیز تأیید نمود که زعفران گیاهی منومورف نبوده و می‌توان تنوع مفیدی را جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی شناسایی کرد.

کلمات کلیدی: پارامترهای ژنتیکی، خوشه‌بندی، شباهت ژنتیکی، نشانگرهای ریزماهواره (SSR).

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. گران قیمت‌ترین گیاه دارویی دنیاست (Babaei et al., 2014) و ایران با تولید بیش از ۹۵/۶٪ از زعفران مصرفی دنیا، نخستین رتبه را در بین کشورهای تولیدکننده زعفران دارد (Aghhavani Shajari et al., 2015). کشت زعفران در ایران دارای سابقه تاریخی است به گونه‌ای که برخی محققین منشاء این گیاه را ایران دانسته‌اند. زعفران به دلیل نیاز آبی کم، ایجاد اشتغال در ایام بیکاری کشاورزان و درآمد کافی از اهمیت ویژه‌ای در بین گیاهان برخوردار است (Mollafilabi, 2004). این گیاه بعد از چای

۱- دانش آموخته دکتری زراعت، اکولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.
۲- دانشیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.
۳- استاد گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.
۴- استاد، دانشکده بیومهندسی، دانشگاه اگه، ازمیر، ترکیه.
(*- نویسنده مسئول: ramirnia@gmail.com)

www.SID.ir

Archive of SID

اشتغال‌زاترین محصول کشاورزی است به‌طوری‌که کشت زعفران سالانه ۶۵۰۰۰ فرصت شغلی ایجاد می‌کند که عامل مهمی در جلوگیری از مهاجرت روستاییان به شهرها محسوب می‌شود (Nehvi et al., 2008).

مطالعه اثرات محیطی و اقلیمی بر روی کمیت و کیفیت زعفران، توسط محققان زیادی انجام گرفته که از مهم‌ترین آنها می‌توان به لاگ و کانترل (Lage & Cantrell, 2009) اشاره کرد که زعفران را در یازده منطقه جغرافیایی متفاوت از لحاظ عرض جغرافیایی، خاک و اقلیم کشت نمودند و بیان کردند که شرایط محیطی به‌طور چشمگیری بر روی کیفیت زعفران تأثیر می‌گذارد. بنابراین، برای تولید محصول بیشتر با کیفیت خوب، بایستی سازگاری این گیاه به شرایط اقلیمی مختلف بررسی و مناطق مناسب برای کشت آن پیدا شود (Omid Beygi et al., 2000). از طرفی کاستیلو و همکاران (Castillo et al., 2005)، شکوهیان و اصغری (Shokohian & Asghari, 2008) و آناستاساکی و همکاران (Anastasaki et al., 2010) تفاوت‌های فنوتیپی بالایی را از لحاظ صفات زراعی، مورفولوژیکی و کیفی در بین اکوتیپ‌های زعفران گزارش نمودند.

از طرف دیگر مطالعات عملی در مباحث اکولوژی و تکامل اغلب وابسته به سنجش دقیق تنوع ژنتیکی است (Mueller & Wolfenbarge, 1999). برای رسیدن به این هدف، نشانگرهای ژنتیکی می‌توانند به‌عنوان ابزاری ضروری در توصیف و کمی کردن تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی، مورد استفاده قرار بگیرند. از جمله این نشانگرها می‌توان به نشانگرهای ریزماهواره (SSR۱) اشاره نمود. نشانگرهای SSR نسبت به نشانگرهای دیگر در مطالعات ژنتیکی برتری‌های زیادی دارند که از آن جمله می‌توان به شناسایی چندشکلی بالا، توارث هم‌بارز، پوشش ژنومی گسترده، لوکوس‌های اختصاصی و نیاز به مقدار نسبتاً کم DNA اشاره کرد. این مزایا باعث شده از نشانگرهای ریزماهواره به‌طور موفقیت‌آمیزی در شناسایی تنوع ژنتیکی و ترسیم نقشه ژنتیکی گونه‌های مختلف گیاهی، استفاده‌های زیادی شود (Cuc et al., 2008). نعمتی و همکاران (Nemati et al., 2012) و نماینده و همکاران (Namayandeh et al., 2013) از نشانگرهای SSR جهت شناسایی تنوع ژنتیکی در بین اکوتیپ‌های زعفران استفاده نمودند. نتایج تحقیقات این محققین نشان داد که اختلاف ژنتیکی معنی‌داری بین اکوتیپ‌های زراعی زعفران وجود دارد و هرچه فاصله جغرافیایی مناطق کشت زعفران بیشتر باشد، میزان تنوع و فاصله ژنتیکی اکوتیپ‌ها بیشتر خواهد بود. همچنین بابایی و همکاران (Babaei et al., 2014) تنوع ژنتیکی را در ۲۸ اکوتیپ زعفران که از نقاط مختلف کشور تهیه شده بودند را با کمک نشانگر SRAP مورد ارزیابی قرار دادند. این محققان ضمن گزارش اختلاف ژنتیکی بالا بین اکوتیپ‌های زعفران، بیان نمودند که اکوتیپ‌های زراعی رایج زعفران در ایران همه از یک کلون منشأ نگرفته‌اند، بلکه اکوتیپ‌ها با یکدیگر اختلاف داشته و دارای تنوع ژنتیکی می‌باشند. همچنین این محققین با مشاهده شباهت زیاد بین اکوتیپ‌های زعفران جمع‌آوری شده از استان‌های شیراز، یزد، اصفهان و همدان با اکوتیپ‌های استان خراسان به‌عنوان مرکز کشت زعفران ایران، بیان نمودند که این اکوتیپ‌ها از استان خراسان تهیه شده‌اند. با این حال محققین دیگری از جمله کایولا و همکاران (Caiola et al., 2004) با استفاده از نشانگر RAPD و علوی‌کیا و همکاران (Alavi-Kia et al., 2008) با استفاده از نشانگر RAPD و ISSR بیان نمودند که بین اکوتیپ‌های زعفران هیچ گونه اختلافی وجود ندارد و زعفران یک گیاه منومورف[۲] می‌باشد.

1 - Simple Sequence Repeats (SSR)

2- Monomorph

www.SID.ir

جدول ۱- خصوصیات جغرافیایی و آب و هوایی (میانگین سی ساله) مناطق جمع‌آوری بنه زعفران

Table 1– Geographic and climate (average of 30 years) characteristics of regions that saffron corms collected

شماره اکوتیپ Ecotype no.	منطقه جمع‌آوری Collected region	استان Province	ارتفاع Altitude (M)	عرض جغرافیایی Latitude (N)	طول جغرافیایی Longitude (E)	میانگین دمای روزانه Average of daily temperature (C) °	رطوبت نسبی Relative humidity (%)	میانگین بارندگی ماهانه Average of monthly rainfall (mm)	تعداد روزهای دارای دمای صفر و کمتر Number of days with temperature zero and less
1	بیرجند Birjand	خراسان جنوبی Jonubi Khorasan	1491	59° 12′	32° 52′	16.5	36	170.8	76.2
2	قاین Qaen	خراسان جنوبی Jonubi Khorasan	1432	59° 10′	33° 43′	14.9	37	175.8	93.8
3	گناباد Gonabad	خراسان رضوی Razavi Khorasan	1450.8	59° 13′	35° 16′	14.7	46	166.8	95.7
4	تربت‌حیدریه Torbat-Heydarieh	خراسان رضوی Razavi Khorasan	950.4	35° 60′	15° 35′	13.6	47	195.6	93.6
5	تربت‌جام Torbat-Jam	خراسان رضوی Razavi Khorasan	1056	58° 41′	34° 21′	17.3	37	143.6	49.2
6	مشهد Mashhad	خراسان رضوی Razavi Khorasan	999.2	59° 38′	36° 16′	14.1	55	255.2	89.3
7	ارومیه Urmia	آذربایجان غربی West Azarbayejan	1315.9	45° 05′	37° 32′	11.5	60	341	110.6

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به تحقیقات فوق و اهمیت کشت زعفران در ایران، در این تحقیق سعی شده است که امکان کشت زعفران در ارومیه مورد ارزیابی قرارگرفته و در نهایت مناسب‌ترین اکوتیپ زعفران تعیین گردد. از طرفی نیز با استفاده از نشانگر مولکولی SSR تنوع ژنتیکی زعفران زراعی مورد مطالعه قرار بگیرد.

مواد و روش‌ها

ارزیابی مزرعه‌ای

به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی و زراعی زعفران، شش اکوتیپ از نقاط مختلف استان خراسان رضوی (مشهد، تربت‌جام، گناباد و تربت‌حیدریه) و خراسان جنوبی (قاین و بیرجند) جمع‌آوری و در طی دو سال زراعی ۹۳-۱۳۹۱ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه در قالب آزمایش‌های اسپلیت پلات در زمان بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). ازآنجاکه کشت زعفران در شهرستان ارومیه برای اولین بار به‌صورت علمی در طی این تحقیق اجرا شده است. لذا سعی شده که اکوتیپ‌های زعفران از شهرستان‌های مختلف استان خراسان که تجربه طولانی در کشت زعفران دارند، انتخاب شوند (Mohammadi et al., 2011) تا بتوان با ریسک کمتر و با دقت بیشتر اکوتیپ مناسب زعفران در شرایط آب و هوایی ارومیه را انتخاب نمود.

بنه‌ها قبل از کشت بر اساس وزن، طبقه‌بندی شدند و از بنه‌هایی با وزن ۱۲-۱۰ گرم استفاده شد. پس از تهیه زمین و انجام دو بار شخم عمیق در جهت عکس، با توجه به نتایج آزمایش خاک، از ۱۵۰-۱۰۰-۱۰۰ کیلوگرم کود ازت، فسفر و پتاس در هکتار استفاده گردید سپس در اواخر تیرماه اقدام به کشت زعفران شد. کشت به‌صورت هیرم‌کاری و کرتی دانه تسبیحی بوده و هر کرت شامل شش ردیف به فاصله ۲۵ سانتیمتری و به طول دو متر بود. تراکم مورد نظر در کل آزمایش ۵۰ بوته در مترمربع و عمق کشت بنه زعفران ۲۰ سانتیمتر در نظر گرفته شد. در نیمه اول مهرماه اقدام به آبیاری زمین شد و حدود پانزده روز بعد از اولین آبیاری، مزرعه زعفران شروع به گل‌دهی نمود. در نهایت صفات عملکرد زعفران در واحد هکتار (عملکرد کلاله خشک در واحد هکتار)، تعداد گل، وزن خشک کلاله، طول کلاله، وزن خشک گل، تعداد برگ، طول برگ، وزن خشک برگ، تعداد بنه دختری، وزن خشک بنه دختری، زیست‌توده، سافرانال، کروسین و پیکروکروسین اندازه-گیری شدند. با توجه به این که این تحقیق در دو سال زراعی اجرا شد، لذا قبل از انجام هرگونه تجزیه و تحلیلی، مهم‌ترین فرض‌ها در تحلیل‌های آماری، یعنی نرمال بودن داده‌ها و متجانس بودن واریانس خطاهای آزمایشی با استفاده از آزمون بارتلت مورد تأیید (Yazdi Samadi et al., 2001) و در نهایت داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل بیشتر قرار گرفتند.

ارزیابی ژنتیکی

استخراج DNA

جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زعفران، از هر اکوتیپ ۱۰ بنه انتخاب (مجموعاً ۶۰ نمونه) و ماده ژنتیکی (DNA) آنها به روش بیکی و همکاران (Beiki et al., 2011) استخراج گردید. سپس کیفیت مطلوب DNA با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Perkin-Elmer مورد تأیید قرار گرفت. در نهایت DNA استخراجی به میزان ۲۰ ng/µl رقیق و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز محصول PCR

به‌منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از ۳۰ جفت آغازگر

www.SID.ir

Archive of SID

SSR جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی زعفران استفاده گردید که از این بین تنها ۲۲ جفت آغازگر تولید باندهای چندشکلی نمودند (جدول ۲).

جدول ۲ – نام و مشخصات ۲۲ جفت آغازگر SSR تولیدکننده باندهای چندشکلی در زعفران

Table 2- Name and specification of the 22 SSR primers produced polymorphic bands in saffron

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer Sequence (5'-3')	دمای اتصال آغازگر Annealing temperature (°C)	تعداد باندهای چندشکلی No. of polymorphic bands	ضریب شانون Shannon's Index (I)	تنوع ژنتیکی Genetic diversity (h)	محتوی اطلاعات چندشکلی Polymorphic information index (PIC)
SCA 15	ACCAGAGAAGCCCTCCTAGC GTTCTGTGGTGGTCACGTTG	47.1	1	0.686	0.493	0.371
SCA 109	ATACTTACCAGTTCACCGCC CTGGAGATGTGTCAGCTTTA	64.8	3	0.808	0.357	0.335
SCA 303	TCCGTATCCTAGTCGCGATC CGCCGTCATGACTCATACTC	64.8	2	0.931	0.582	0.496
SCA 319	GTAATCGATGCTGTGGGAAG GAGTCATGTGATAGCCGTATG	61.5	1	0.685	0.492	0.371
SCA 327	CTCTCTCTCCCCACCCAATC GAGGGAGGAGGAGGTTAGG	64.8	2	0.757	0.553	0.455
SCA 381	CTCCAGCATGGCCTTTCTAC ACCTGATGGTCAAAGATGGG	57.5	1	0.351	0.199	0.179
SCA 382	AATTGGTAGAGAGGGGAGAG ACATGCCATTAGAGTCAGGC	61.5	1	0.363	0.208	0.186
SCA 393	GGATGAACACTGATGATGGC ACCTCCACCACGATATCCAC	64.8	3	0.865	0.393	0.359
SCA 414	GTTCACCATCGTCCGCAG CCATTAGGCCGAATAACA	64.8	1	0.197	0.094	0.090
SCA 416	ACTGTACCGGTCGAAGACG AAATTCCACGTCAGCCTCC	64.8	3	0.964	0.601	0.538
SCA 426	TAAGATCGTAAGATCGCGGC AGGCAGGAAGAGGTGGAGG	64.8	2	0.766	0.518	0.427
SCA 504	CCCATGCGTTTAACTATTCT CGTTCCATCGATCCGTATGG	64.8	2	0.884	0.583	0.506
SCA 515	GGAGATGCTATAGAGCAGTG ATTGCTCCTTACCACCTTGC	64.8	2	0.953	0.621	0.578
SCA 547	GGCCAACGCGTGTGTATCTC TATATGCCAAGACGGATGGG	64.8	3	0.482	0.162	0.156
SCB 109	TGGTAGTATAGGTACTAAACAT TCCTATACACATACAAACATAC	64.8	3	0.944	0.644	0.577
SCB 115	TCTCCCTATTCCCGTGTAAATCG CCCGATGATCGATTGTACCTAGC	61.5	2	0.932	0.601	0.534
SCC 13	GTGGTGAGTAAACAGTGGTGG GAGAGCAGAGCAGAGGCAAC	64.8	3	0.898	0.455	0.435
SCC 209	GCGAAAACACAATGCAAAAA GCGTTGGTTGGACGGCTGAC	64.8	1	0.255	0.131	0.123
SCC 219	GTGTTTATAGGGGTGCCACG TGTTGGTGGTGCAGGTAAAG	64.8	1	0.202	0.097	0.092
SCC 247	TGCACGGACAGATCAGTTTC ACTGAACAACACCAAGTGCG	64.8	1	0.280	0.148	0.137
SCD 17	CCATTCGTGAGAAGATCTGA CACCTCATCCTCGTAACGCC	64.8	3	0.961	0.676	0.627
SCD 219	TCCTCCCTCCCTTCGCCCACTG CGATGTTCGCCATGGCTGCTCC	64.8	3	0.982	0.722	0.672
Total	---	---	44	15.147	9.331	8.243
Average	---	---	2	0.688	0.424	0.402

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش PCR در یک حجم نهایی ۲۰ میکرولیتری که شامل پنج میکرولیتر DNA (20 ng/µl) ژنومی، دو میکرولیتر dNTPs (1 mM)، دو میکرولیتر MgCl2 (25 mM)، ۰/۲ واحد آنزیم تگ پلیمراز، دو میکرولیتر بافر 10X PCR، یک میکرولیتر از هرکدام از آغازگرها و هشت میکرولیتر آب دو بار تقطیرشده، انجام گرفت. برنامه زمانی مورد استفاده ترموسایکلر جهت تکثیر قطعه مورد نظر شامل مراحل زیر بود: مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ^{o}C ۹۵ و به مدت ۵ دقیقه، ۴۵ سیکل حرارتی شامل سه مرحله: ^{o}C ۹۵ به مدت زمان ۴۵ ثانیه جهت واسرشت سازی ثانویه، ^{o}C ۶۲-۴۸ به مدت زمان ۴۵ ثانیه برای اتصال آغازگر و ^{o}C ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه جهت گسترش آغازگر و در پایان نیز یک چرخه گسترش نهایی با دمای ^{o}C ۷۲ به مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد. سپس ده میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شدند و در چاهک های ژل آگارز ۳٪ و بافر 1X TBE بارگذاری شد. سپس ژل با شدت جریان ۹۰ وات به مدت ۹۰ تا ۱۲۰ دقیقه الکتروفورز شد. جهت آشکارسازی قطعات DNA تکثیرشده، ژل آگارز به مدت ۱۵ دقیقه در اتیدیم برماید رنگ‌آمیزی شد و پس از شستشوی ژل با آب مقطر، عکس‌برداری در دستگاه Transiluminator UV در زیر نور ماوراءبنفش انجام گردید.

تجزیه داده‌های مولکولی

باندهای تکثیر یافته با استفاده از اعداد صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازبندی شدند. سپس تعداد آلل‌های هر آغازگر، تنوع ژنتیکی نی (h)، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، شباهت ژنتیکی (SG) و ضریب شانون (I) با استفاده از نرم‌افزار پاور میکر[1] نسخه ۳/۲۵ محاسبه گردید (Liu & Muse, 2005). تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار داروین[2] و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCoA) با استفاده از نرم‌افزار پست[3] انجام گرفت و در نهایت جهت محاسبه تجزیه واریانس مولکولی (ANOVA) از نرم‌افزار ژن الکس[4] نسخه ۶/۵ استفاده گردید (Yeh & Yang, 1999).

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات زراعی و کیفی

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد (جدول ۳) که اثر سال و اکوتیپ بر روی تمامی صفات زراعی و کیفی موردمطالعه در زعفران معنی‌دار بودند. مشاهده تفاوت‌های زراعی و کیفی بین اکوتیپ‌ها نشان می‌دهد که اکوتیپ‌های مختلف زعفران از لحاظ کیفیت با یکدیگر متفاوت می‌باشند. این نتیجه قابل انتظار بود چرا که اکوتیپ‌های زعفران مورد مطالعه از نقاط مختلف استان خراسان رضوی و جنوبی جمع‌آوری شده بودند که این مناطق از لحاظ شرایط آب و هوایی و جغرافیایی با یکدیگر متفاوت بودند (جدول ۱). از طرفی این نتیجه بیان می‌دارد که برای کشت زعفران در یک منطقه توجه به اکوتیپ زعفران و شرایط اقلیمی منطقه مورد مطالعه و منطقه جمع‌آوری بنه زعفران بسیار مهم و قابل توجه می‌باشد.

از طرفی نتایج تجزیه واریانس نشان داد (جدول ۳) که برهمکنش اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران در سال‌های مورد آزمایش (اکوتیپ × سال) برای صفات طول کلاله، وزن خشک گل، تعداد برگ، سافرانال، کروسین و پیکروکروسین معنی‌دار ولی برای صفات عملکرد زعفران، تعداد گل، وزن خشک کلاله و تعداد بنه دختری معنی‌دار نبود. این نتیجه نشان می‌دهد که صفات غیر معنی‌دار دارای روند مشابهی در طی دو سال آزمایش

1- Power Marker ver. 3.25

2- DarWin
3- PAST
4- GenAlex 6.501

www.SID.ir

Archive of SID

در اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران بودند و تحت تـأثیر شـرایط محیطی قرار نگرفتند.

جدول ۳ – تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در زعفران

Table 3 – Variance analysis of studied traits in saffron

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	عملکرد زعفران Saffron yield (kg/ha)	تعداد گل Flower No.	وزن خشک کلاله Dry stigma weight (mg)	طول کلاله Stigma length (cm)	وزن خشک گل Dry flower weight (mg)	تعداد برگ Leaf No.	تعداد پنه دختری No. of dugther Corm	سافرانال Safranal	کروسین Crocin	پیکروکروسین Picro-crocin
بلوک Block	2	0.01	1.26	0.36 **	0.42 **	11.15 **	0.07	0.19	0.19	0.68	0.74
اکوتیپ Ecotype	5	0.25 **	14.64 **	0.97 **	0.18 **	2.99 **	0.47 **	1.55 **	10.74 **	1214.92 **	21.71 **
بلوک × اکوتیپ Block × Ecotype	10	0.01	0.71	0.04	0.02	0.34	0.06	0.07	0.06	0.67	0.20
سال Year	1	15.73 **	4347.2** *	1.87 **	0.83 **	8.98 **	56.08 **	424.77 **	9.65 **	1061.35 **	107.19 **
سال × اکوتیپ Year × Ecotype	5	0.01	1.01	0.2	0.16 **	6.45 **	0.44 **	0.18	13.17 **	705.65 **	17.45 **
اشتباه Error	12	0.00	0.35	0.03	0.02	0.42	0.03	0.11	0.04	1.96	0.36
ضریب تغییرات Coefficience of Variation (%)	---	3.9	2.4	3.2	3.7	1.5	2.9	5.6	0.62	0.57	0.63

**: معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد.

**: significant at the 0.01 probability level.

www.SID.ir

Archive of SID

درحالی‌که صفاتی که برهمکنش آنها (اکوتیپ × سال) معنی‌دار شده است، نشان‌دهنده این امر می‌باشند که در طی دو سال آزمایش تحت تأثیر شرایط محیطی قرار گرفتند، لذا روند مشابهی را در اکوتیپ‌های زعفران نداشتند. در این راستا ایندریانی و همکاران (Indriyani et al., 2011) با مطالعه تغییرات اقلیمی بر روی رشد اکوتیپ‌های مختلف زعفران و مشاهده اختلافات معنی‌دار بین آنها بیان کردند که اثرات اقلیمی از جمله بارندگی و شرایط محیطی اثرات معنی‌داری بر روی قطر بنه، وزن بنه، تولید بنه دختری و وزن مخصوص بنه‌های زعفران دارد.

مقایسات میانگین اکوتیپ‌های زعفران

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اکوتیپ‌های زعفران نشان دادند (جدول ۴) که اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه و مشهد از لحاظ صفات زراعی و کیفی بخصوص عملکرد زعفران (به ترتیب ۱/۶۷ و ۱/۵۲ کیلوگرم در هکتار)، تعداد گل در مترمربع (به ترتیب ۲۶/۷۱ و ۲۶/۲۵)، تعداد بنه دختری (به ترتیب ۶/۶۱ و ۶/۶۱) و کروسین (به ترتیب ۲۵۷/۵۳ و ۲۶۵/۵۲) برتری داشتند و به ترتیب به‌عنوان بهترین و مناسب‌ترین اکوتیپ‌های زعفران در شرایط آب و هوایی ارومیه شناخته شدند. درحالی‌که اکوتیپ‌های گناباد و قاین از لحاظ صفات عملکرد زعفران (به ترتیب ۱/۱۸ و ۱/۱۵ کیلوگرم در هکتار)، تعداد گل در مترمربع (به ترتیب ۲۳/۲۶ و ۲۲/۸۳)، تعداد بنه دختری (به ترتیب ۵/۶۶ و ۵/۴۷) و کروسین (به ترتیب ۲۳۸/۱۰ و ۲۲۹/۴۴) کمترین مقادیر را داشتند و به‌عنوان نامناسب‌ترین اکوتیپ‌های زعفران در ارومیه معرفی شدند.

با ارزیابی آمارهای آب و هوایی و اقلیمی مناطق جمع‌آوری بنه زعفران و منطقه کشت زعفران (شهرستان ارومیه) مشخص شد (جدول ۱) که شهرستان‌های تربت‌حیدریه و مشهد از لحاظ شرایط آب و هوایی و اقلیمی بیشترین شباهت را با شهرستان ارومیه داشتند (بخصوص ازلحاظ میانگین دمای روزانه، رطوبت نسبی و میانگین بارندگی ماهانه) لذا این اکوتیپ‌ها کمترین تنش را در شرایط جدید تحمل نمودند؛ بنابراین عملکرد زعفران این اکوتیپ‌ها در شهرستان ارومیه نسبت به اکوتیپ‌های دیگر بهتر بود. در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که توجه به شرایط اقلیمی و جغرافیایی مناطق جمع‌آوری بنه زعفران و منطقه کشت زعفران بسیار مهم و ضروری می‌باشد و هرچه شباهت‌های اقلیمی و جغرافیایی مناطق بیشتر باشد، باعث افزایش عملکرد و اجزای عملکرد زعفران می‌شود. محمدی و همکاران (Mohammadi et al., 2011) با ارزیابی پتانسیل-های اقلیمی کشت زعفران در شهرستان مرودشت بیان نمودند که از نظر دمایی و نوسانات روزانه دما، شهرستان مرودشت با شهرستان‌های زعفران خیز ایران مانند قائن و تربت‌حیدریه به‌طور نسبی دارای مشابهت است و از این نظر برای کشت زعفران محدودیت وجود ندارد.

تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های زعفران با استفاده از صفات زراعی و کیفی

به‌منظور مقایسه اکوتیپ‌های مختلف زعفران از لحاظ کلیه صفات مورد مطالعه (زراعی و کیفی)، از تجزیه خوشه‌ای به روش وارد استفاده گردید (شکل ۲). نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که شش اکوتیپ مورد مطالعه زعفران در مجموع در دو گروه قرار گرفتند، به‌طوری‌که اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه، مشهد و تربت‌جام از لحاظ کلیه صفات مورد مطالعه بیشترین شباهت را با یکدیگر داشتند و در یک کلاس (کلاس a) و اکوتیپ‌های بیرجند، قاین و گناباد در کلاس دیگری (کلاس b) جای گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- مقایسات میانگین اکوتیپ‌های زعفران به روش توکی در سطح احتمال پنج درصد

Table 3 - Mean comparison of saffron ecotypes at 5% probability level using Tukey test

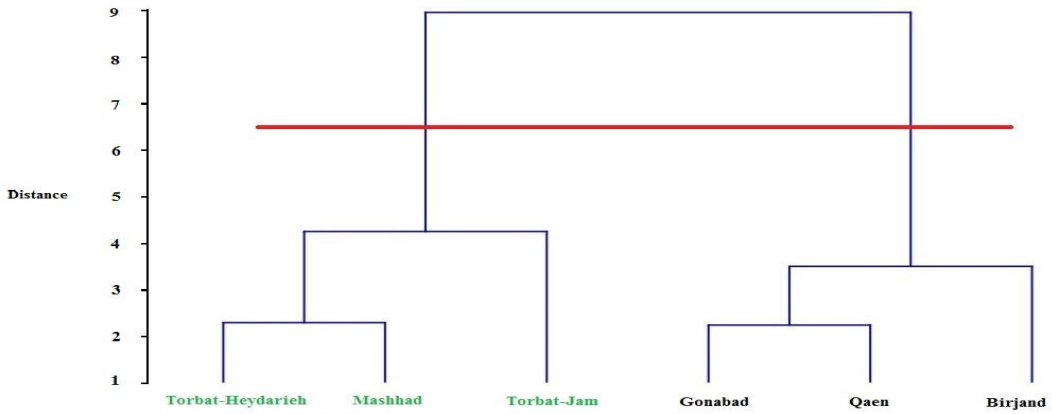
اکوتیپ (خوشه) Ecotype (cluster)	عملکرد زعفران Saffron yield ($kg.ha^{-1}$)	تعداد گل Flower No.	وزن خشک کلاله Dry stigma weight (mg)	طول کلاله Stigma length (cm)	وزن خشک گل Dry flower weight (mg)	تعداد برگ Leaf No.	تعداد بنه دختری No. of dugther corm	سافرانال Safranal	کروسین Crocin	پیکروکروسین Picro-crocin
گنابادGonabad (b)	1.18 cd*	23.26 c	5.06 cd	3.73 a	42.34 ab	5.92 bc	5.66 b	28.86 c	238.10 d	93.31 d
قائنQaen (b)	1.15 d	22.83 c	4.82 d	3.37 b	41.38 b	5.70 c	5.47 b	30.32 d	229.44 e	93.63 cd
بیرجندBirjand (b)	1.27 c	25.15 b	4.87 d	3.43 b	42.42 ab	6.26 ab	5.69 b	30.61 d	236.34 d	94.45 c
تربت‌جامTorbat-Jam (a)	1.41 b	25.20 b	5.29 bc	3.62 ab	43.31 a	6.09 abc	5.78 b	31.07 c	254.56 c	95.65 b
تربت‌حیدریهTorbat-Heydarieh (a)	1.67 a	26.71 a	5.85 a	3.80 a	43.23 a	6.49 a	6.61 a	31.67 b	257.53 b	95.92 b
مشهدMashhad (a)	1.52 b	26.25 ab	5.54 ab	3.43 b	42.41 ab	6.26 ab	6.61 a	32.83 a	265.52 a	98.48 a
میانگین خوشه a Average of Cluster a	1.53	26.05	5.56	3.62	42.98	6.28	6.33	32.19	259.20	96.68
میانگین خوشه b Average of Cluster b	1.20	23.75	4.92	3.51	42.05	5.96	5.61	29.93	234.63	93.80

* - در هر ستون، تیمارهای دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

*- In each column, means followed by letter in common have not significantly different.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران به روش وارد با استفاده از صفات زراعی و کیفی

Figure 2- Cluster analysis of studied saffron ecotypes using Ward method based on quality and agronomic triats.

از طرفی جهت مقایسه کلی خوشه a و b، میانگین صفات در داخل هر خوشه محاسبه گردید (جدول ۳). مقایسه میانگین صفات در خوشه a و b نشان داد که اختلاف فاحشی بین خوشه‌ها از لحاظ صفات زراعی و کیفی مورد مطالعه ازجمله عملکرد زعفران (خوشه a: ۱/۵۳؛ خوشه b: ۱/۲۰ کیلوگرم بر هکتار)، تعداد گل (خوشه a: ۲۶/۰۵؛ خوشه b: ۲۳/۷۵ عدد در مترمربع)، سافرانال (خوشه a: ۳۲/۱۹؛ خوشه b: ۲۹/۹۳)، کروسین (خوشه a: ۲۵۹/۲۰؛ خوشه b: ۲۳۴/۶۳) و پیکروکروسین (خوشه a: ۹۶/۶۸؛ خوشه b: ۹۳/۸۰) وجود دارد که این نتیجه از وجود تفاوت‌های ژنتیکی و یا فنوتیپی بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران خبر می‌دهد. امید بیگی و همکاران (Omid Beygi et al., 2000) بیان کردند که اگرچه زعفران، گیاهی است متحمل به شرایط نامساعد محیطی و به طیف وسیعی از شرایط اقلیمی و جغرافیایی سازگاری دارد ولی شرایط محیطی به میزان زیادی بر روی عملکرد و اجزای عملکرد این گیاه تأثیر می‌گذارد. این محققین اختلافات زیادی بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه خود مشاهده نمودند و معتقد بودند برای کشت زعفران در منطقه باید سازگارترین اکوتیپ زعفران انتخاب شود.

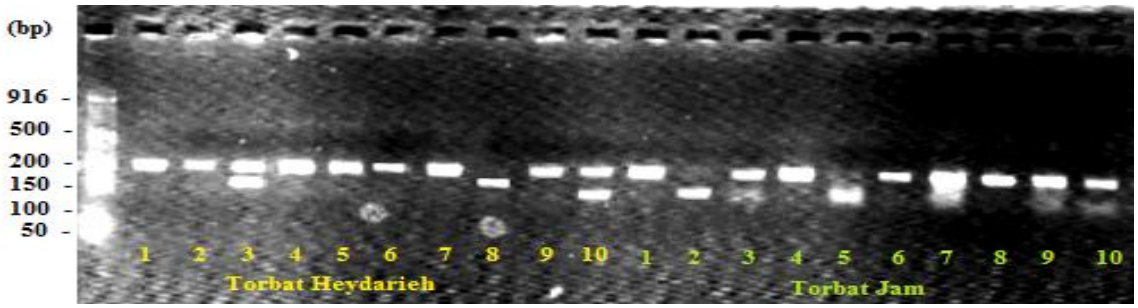
تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران بر اساس نشانگر ریزماهواره SSR

در این بررسی از ۳۰ جفت آغازگر ریزماهواره SSR جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در شش اکوتیپ زعفران استفاده شد. نحوه انتخاب این آغازگرها طوری بود که بتوانند تا حد امکان تمام ژنوم زعفران زراعی را پوشش دهند. از بین ۳۰ جفت آغازگر، ۸ جفت آغازگر منومورف بودند و تولید باندهای یک شکل کردند، درحالی‌که ۲۲ جفت آغازگر دیگر (۷۳٪)، در مجموع ۴۴ آلل را شناسایی نمودند (شکل ۱) که میانگین چندشکلی در کل جایگاه‌ها ۲ عدد بود (جدول ۲). بیکی و همکاران (Beiki et al., 2010) با مطالعه تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زعفران با استفاده از مارکر RAPD و موراگا و همکاران (Moraga et al., 2010) با استفاده از مارکر ISSR به ترتیب به‌طور میانگین ۳/۸ و ۴/۸ عدد باند شناسایی نمودند.

از طرفی نتایج نشان داد (جدول ۲) که آغازگرهای SCA109, SCA393, SCA416, SCA547, SCB109, SCC13, SCD17, SCD219 بیشترین باندهای چندشکلی (سه باند) و آغازگرهای SCA15, SCA319, SCA381, SCA382, SCA414, SCC209, SCC219, SCC247 کمترین باندهای چندشکلی (یک باند) را تولید کردند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- الگوی باندی SSR حاصل از اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه و تربت‌جام با استفاده از آغازگر SCB 109

Figure 1- SSR pattern obtained from ecotpyes Torbat-Heydarieh and Torbat-Jam using SCB 109 primer.

این نتایج بیان می‌کند که نشانگرهای ریزماهواره قادر به شناسایی چند شکلی در بین اکوتیپ‌های زعفران می‌باشند و ازاین رو ابزار مفیدی برای انگشت‌نگاری و گروه‌بندی اکوتیپ-های زعفران هستند. هرچند که تنوع مشاهده‌شده چندان وسیع نمی‌باشد که این امر را می‌توان به ماهیت عقیم بودن و تکثیر غیرجنسی زعفران نسبت داد (Babaei et al., 2014). بااین حال، تنوع مشاهده شده در بین اکوتیپ‌های زعفران این امید را می‌دهد که بتوان با روش‌های صحیح اصلاحی باعث بهبود و انتخاب اکوتیپ‌های مناسب شد. تحقیقات گذشته نتایج ضد و نقیضی را نشان داده‌اند، به‌طوری‌که برخی از محققان ازجمله روبیوموراگا و همکاران (Rubio-Moraga et al., 2009) و علوی کیا و همکاران (Alavi-Kia et al., 2008) هیچ گونه چندشکلی را در بین اکوتیپ‌های زعفران شناسایی نکردند لذا این محققین زعفران را گیاهی منومورف معرفی نمودند، درحالی‌که بیکی و همکاران (Beiki et al., 2010)، نماینده و همکاران (Namayandeh et al., 2013)، بابائی و همکاران (Babaei et al., 2014) و ارول و همکاران (Erol et al., 2014) در بین اکوتیپ‌های زعفران تنوع ژنتیکی شناسایی نمودند.

میزان شاخص شانون (I) و تنوع ژنتیکی (h) به ترتیب از ۰/۱۹۷ تا ۰/۹۸۲ (میانگین ۰/۶۸۸) و ۰/۰۹۴ تا ۰/۷۲۲ (میانگین ۰/۴۲۴) متغیر بود (جدول ۲). این نتایج از وجود سطح متوسطی از تنوع ژنتیکی در بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران خبر می‌دهد. بیکی و همکاران (Beiki et al., 2010) با ارزیابی تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زعفران با استفاده از مارکر SRAP مشاهده کردند که میانگین شاخص شانون ۰/۲۷ بود. این محققین نتیجه‌گیری کردند که میزان تنوع ژنتیکی میان اکوتیپ‌های زعفران مورد مطالعه‌شان پایین می‌باشد. همچنین تنوع ژنتیکی زعفران در مطالعه نماینده و همکاران (Namayandeh et al., 2013) که از نشانگر SSR استفاده کرده بودند، بین ۰/۲۵ تا ۰/۴۹ متغیر بود (میانگین ۰/۴۱).

با محاسبه شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مشخص شد که میزان این شاخص در بین آغازگرهای موردمطالعه بین ۰/۰۹۰ تا ۰/۶۷۲ متغیر می‌باشد و آغازگرهای ACS414 و SCC219 کمترین میزان PIC را داشتند (به ترتیب ۰/۰۹۰ و ۰/۰۹۲) درحالی‌که برای آغازگرهای SCD219 و SCD17 بیشترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۶۷۲ و ۰/۶۲۷) تخمین زده شد و این آغازگرها به‌عنوان آغازگرهای مفید و کارآمد جهت مطالعه تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زعفران معرفی شدند (جدول ۲). در مجموع میانگین PIC در مطالعه حاضر (۰/۴۰۲) نشان داد که نه‌تنها مارکر SSR یک تکنیک با ارزش در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زعفران می‌باشد، بلکه تأیید نمود که زعفران گیاهی منومورف نبوده و ما می‌توانیم تنوع مفیدی را جهت استفاده در برنامه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

اصلاحی شناسایی نماییم. در همین راستا ارول و همکاران (Erol et al., 2014) میزان PIC در جمعیت زعفران مورد مطالعه خود را بین ۰/۲۱۸ تا ۰/۵۱۲ (با میانگین ۰/۳۴) و نماینده و همکاران (Namayandeh et al., 2013) بین ۰/۹ تا ۰/۵۵ (با میانگین ۰/۳۴) تخمین زدند.

میزان شباهت اکوتیپ‌های زعفران بر اساس نشانگر SSR

نتایج حاصل از محاسبه میزان شباهت ژنتیکی نشان داد (جدول ۵) که اکوتیپ‌های زعفران مورد مطالعه شباهت بالایی از لحاظ نشانگر SSR با یکدیگر دارند. به‌طوری‌که کمترین میزان شباهت بین اکوتیپ‌ها به‌ترتیب مربوط به اکوتیپ‌های مشهد و قاین (۶۵٪)، مشهد و تربت‌جام (۶۶٪) و مشهد و تربت‌حیدریه (۶۷٪) بود. از طرفی بیشترین میزان شباهت بین اکوتیپ‌ها به‌ترتیب مربوط به اکوتیپ‌های تربت‌جام و قاین (۹۰٪)، تربت‌حیدریه و تربت‌جام (۸۸٪) و تربت‌جام و تربت‌حیدریه (۸۸٪) محاسبه گردید. با توجه به شباهت‌های بالای ژنتیکی اکوتیپ‌های زعفران، می‌توان بیان نمود که به احتمال زیاد اکوتیپ‌های زعفران از یک مکان تکثیر یافتند و دارای اجداد مشترکی هستند و خصوصیت اتوتری پلوئیدی و عقیم بودن زعفران و تکثیر از طریق غیرجنسی می‌تواند تأییدی بر این فرضیه باشد (Fernandez, 2004). از طرفی آگایو و همکاران (Agayev et al., 2009) علت شباهت بالای اکوتیپ‌های زعفران را انتخاب اکوتیپ‌های برتر در طول سالیان سال توسط کشاورزان عنوان نمودند.

جدول ۵ - مقادیر همسانی ژنتیکی اکوتیپ‌های زعفران

Table 5- Genetic similarity values of saffron ecotypes

اکوتیپ Ecotype	بیرجند Birjand	گناباد Gonabad	تربت‌حیدریه Torbat-Heydarieh	قاین Qaen	تربت‌جام Torbat-Jam
گناباد Gonabad	0.83				
تربت‌حیدریه Torbat-Heydarieh	0.71	0.78			
قاین Qaen	0.69	0.73	0.88		
تربت‌جام Torbat-Jam	0.72	0.72	0.88	0.90	
مشهد Mashhad	0.75	0.78	0.67	0.65	0.66

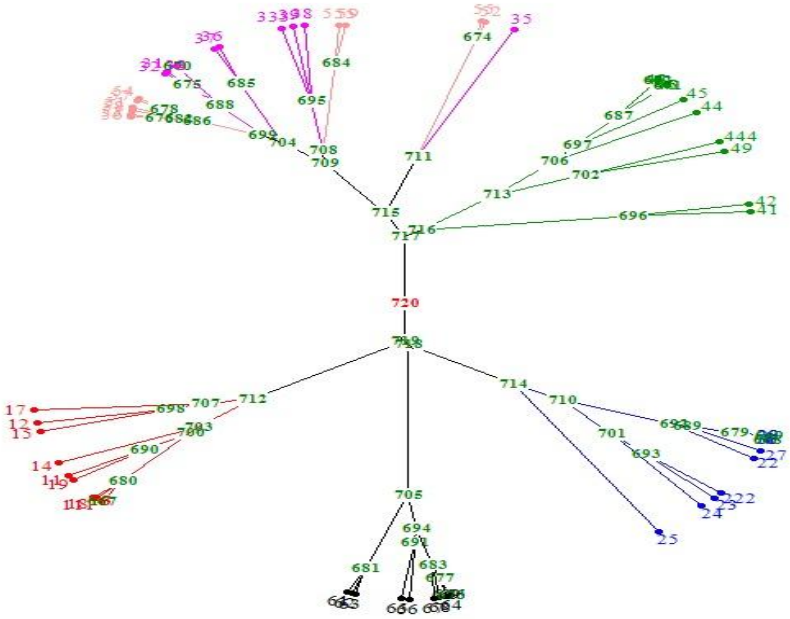
تجزیه خوشه‌ای داروین اکوتیپ‌های زعفران بر اساس داده‌های مولکولی حاصل از نشانگر SSR

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای داروین نشان داد (شکل ۳) که اکوتیپ‌های مورد مطالعه در چهار خوشه قرار گرفتند که عبارتند از: خوشه اول، دوم و سوم به ترتیب شامل اکوتیپ بیرجند (کد ۱۰ تا ۱۹)، مشهد (کد ۶۰ تا ۶۹) و گناباد (کد ۲۰ تا ۲۹) و خوشه چهارم شامل سه اکوتیپ تربت‌حیدریه (کد ۳۰ تا ۳۹)، قاین (کد ۴۰ تا ۴۹) و تربت جام (کد ۵۰ تا ۵۹) بودند. این نتایج نشان دادند که اکوتیپ‌های بیرجند، مشهد و گناباد ضمن اینکه از لحاظ ژنتیکی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند، بااین‌حال نمونه‌های داخل هر اکوتیپ (۱۰ نمونه) شباهت بالایی با هم داشته و همگی در کنار یکدیگر و در داخل یک خوشه قرار گرفتند. وقتی که این مناطق را از لحاظ جغرافیای مورد بررسی قرار می‌دهیم می‌بینیم که این مناطق به اندازه کافی از یکدیگر فاصله دارند. لذا وجود اختلاف ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها دور از ذهن نبوده و قابل پیش‌بینی است. از طرف دیگر نیز مشخص شد که

www.SID.ir

Archive of SID

سه اکوتیپ تربت‌حیدریه، قاین و تربت‌جام از لحاظ ژنتیکی و بر اساس نشانگر SSR شباهت زیادی با هم دارند با این حال اکوتیپ قاین از خلوص ژنتیکی بالاتری برخوردار بود ولی اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه و تربت‌جام با یکدیگر اختلاط یافته و خلوص ژنتیکی نداشتند. این نتیجه ممکن است به این دلیل باشد که این اکوتیپ‌ها در سالیان قبل از یک منطقه نشأت گرفته باشند.



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای داروین اکوتیپ‌های زعفران با استفاده از داده‌های مولکولی حاصل از نشانگر SSR

۱: بیرجند (کد ۱۰ تا ۱۹)، ۲: گناباد (کد ۲۰ تا ۲۹)، ۳: تربت‌حیدریه (کد ۳۰ تا ۳۹)، ۴: قاین (کد ۴۰ تا ۴۹)، ۵: تربت‌جام (کد ۵۰ تا ۵۹)، ۶: مشهد (کد ۶۰ تا ۶۹)

Figure 3- Darwin cluster analysis of saffron ecotypes based on SSR molecular data

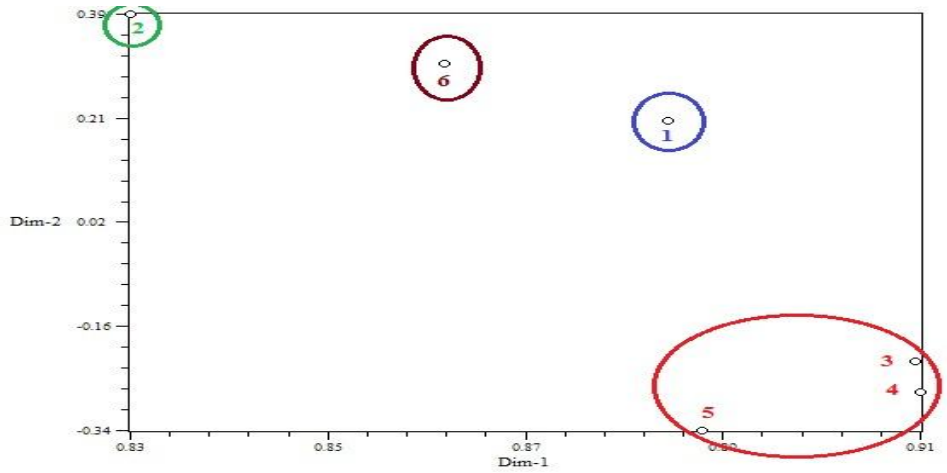
1: Birjand (code 10-19), 2: Gonabad (code 20-29), 3: Torbat-Heydarieh (code 30-39), 4: Qaen (code 40-49), 5: Torbat-Jam (code 50-59), 6: Mashhad (code 60-69).

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از داده‌های مولکولی حاصل از نشانگر SSR

در این تحقیق از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌منظور گروه‌بندی و تعیین پراکنش اکوتیپ‌های زعفران استفاده گردید. بر اساس نتایج حاصل از این تجزیه، دو مؤلفه شناسایی شدند که توانستند به‌خوبی تمام تغییرات کل را توجیه نمایند (۱۰۰٪) و سهم مؤلفه اول به‌تنهایی بیش از ۹۷٪ از تغییرات کل بود. نمودار دو بعدی بای پلات بر اساس این دو مؤلفه نشان داد (شکل ۴) که اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران از پراکنش خوبی برخوردار بودند و با نتایج حاصل از خوشه‌بندی اکوتیپ‌های زعفران هم‌خوانی کامل داشتند. این نتایج در مجموع توانایی تجزیه خوشه‌ای را در گروه‌بندی اکوتیپ‌های زعفران مورد تأیید قرار داد. در این راستا مسمر و همکاران (Messmer et al., 1992) پیشنهاد نمودند که تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به‌عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای، منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثری اطلاعات از داده‌های مولکولی می‌شود. از طرفی بوداک و همکاران (Budak et al., 2004) از تجزیه به مؤلفه های اصلی به‌عنوان ابزاری قدرتمند جهت مطالعه و گروه‌بندی افراد مورد مطالعه استفاده نمودند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤- تجزیه بای پلات اکوتیپ‌های زعفران با استفاده از داده‌های مولکولی حاصل از نشانگر SSR

۱: بیرجند ۲: گناباد ۳: تربت‌حیدریه ۴: قاین ۵: تربت‌جام ۶: مشهد

Figure 4- bi-plot analysis of saffron ecotypes based on SSR molecular data

1: Birjand 2: Gonabad 3: Torbat-Heydarieh 4: Qaen 5: Torbat-Jam 6: Mashhad.

تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر SSR

برای ارزیابی واریانس ژنتیکی درون و بین اکوتیپ‌های زعفران از تجزیه واریانس مولکولی استفاده گردید. نتایج نشان دادند که واریانس بین اکوتیپ‌ها (۵۴٪) نسبت به واریانس داخل اکوتیپ‌ها (۴۶٪) بیشتر می‌باشد و از طرفی تأکید نمود که بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران تنوع ژنتیکی وجود دارد. در مجموع نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی، نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای را تأیید نمود. در همین راستا کیفی و همکاران (Keify et al., 2012) با ارزیابی تنوع ژنتیکی زعفران با استفاده از نشانگر SRAP، بیان نمودند که تنوع ژنتیکی بین و درون اکوتیپ‌ها به ترتیب ۸۲/۶۵ و ۱۷/۳۴ درصد می‌باشد. این محققین تکثیر غیرجنسی و کلون بودن زعفران را عامل اصلی در پایین بودن تنوع در درون اکوتیپ‌های زعفران زراعی دانستند. درحالی‌که بابایی و همکاران (Babaei et al., 2014) با استفاده از تکنیک SRAP گزارش نمودند که ۰/۰۷ و ۹۹/۹۳ درصد از تنوع ژنتیکی به ترتیب در بین و درون اکوتیپ‌های زعفران وجود دارد. در مجموع علت تفاوت بین نتایج حاصل از این محققین و نتایج حاضر، ممکن است به علت تفاوت در تکنیک و نمونه‌های زعفران مورد استفاده، باشد (Indriyani et al., 2011).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که از لحاظ زراعی اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران وجود دارد و از این بین اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه و مشهد مناسب‌ترین اکوتیپ‌های زعفران در شرایط آب و هوایی ارومیه شناخته شدند. از طرفی با ارزیابی تنوع ژنتیکی زعفران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره SSR مشخص گردید که بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران تنوع ژنتیکی وجود دارد و این تنوع با استفاده از تجزیه خوشه‌ای داروین، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه واریانس مولکولی مورد تأیید قرار گرفت؛ بنابراین در مجموع می‌توان بیان نمود که زعفران گیاهی منومورف نبوده و نشانگرهای ریزماهواره SSR قادر به شناسایی چندشکلی در بین اکوتیپ‌های زعفران می‌باشند. لذا می‌توان از این تکنیک به‌عنوان یک روش مفید و کارآمد برای انگشت‌نگاری و ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زراعی زعفران استفاده نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

بخش مطالعات تنوع ژنتیکی زعفران در مرکز بیومهندسی دانشگاه اگه ترکیه انجام گرفت که لازم است تقدیر و تشکر ویژه‌ای از خانم‌های دکتر طلا، بتول، تورچه، دویگو، صدا و آقایان و خانم‌های مهندس اسین، گمزه، گیزم، ثامت، تانر، ایلکم، برجو، فولیا، حنده و گلگون که کمک‌های بسیار با ارزشی در طی انجام آزمایش داشته‌اند، به عمل آورد.

منابع

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

Aghhavani Shajari, M., Rezvani Moghaddam, P., Koocheki, A., Fallahi, H.R., Taherpour Kalantari, R. 2015. Evaluation of the effects of soil texture on yield and growth of saffron (*Crocus sativus* L.). Saffron Agronomy & Technology 2 (4): 311-322.(In Persian)

Alavi-Kia, S.S., Mohammadi, S.A., Aharizad, S., and Moghaddam, M. 2008. Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in Crocus genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism. Biotechnology & Biotechnological Equipment 22: 795-800.

Anastasaki, E., Kanakis, C., Pappas, C., Maggi, L., del Campo, C.P., Carmona, M., Alonso, G.L., and Polissiou, M.G. 2010. Differentiation of saffron from four countries by mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. European Food Research and Technology 230: 571–577.

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

Beiki, A.H., Keifi, F., and Mozafari, J. 2010. Genetic differentiation of Crocus species by random amplified polymorphic DNA. Journal of genetic engineering and biotechnology 18: 1- 10.

Beiki, A.H., Keify, F., and 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.

Budak, H., Shearman, R.C., Parmaksiz, I., Gaussoin, R.E., Riordan, T.P., and Dweikat, I. 2004. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. Theoretical & Applied Genetics108: 328–334.

Caiola, M.G., and Zaier, R. 2004. RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related Crocus species. Biologia Plantarum 48: 375-380.

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.

Cuc, L.M., Mace, E.S., Crouch, J.H., Quang, V.D., Long, T.D., and Varshney, R.K. 2008. Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea*). BMC Plant Biology 10: 1186-1193.

Erol, O., Kaya, H. B., Şik, L., Tuna, M., Can, L., and Tanyolaç, M.B. 2014. The genus Crocus, series Crocus (Iridaceae) in Turkey and 2 East Aegean islands: a genetic approach. Turkish Journal of Biology 38: 48-62.

Fernandez, J. A. 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Recent Research Developments in Plant Science 2:127-159.

Indriyani, S., Arisoesilaningsih, E., Wardiyati, T., and Purnobasuki, H. 2011. A model of relationship between climate and soil factors

www.SID.ir

Archive of SID

related to oxalate content in porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) corm. Biodiversitas 12 (1): 45-51.

Keify, F., and Beiki, A.H. 2012. Exploitation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for genetic diversity of saffron collection. Journal of Medicinal Plants Research 6 (14): 2761-2768.

Lage, M., and Cantrell, C.L. 2009. Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. Scientia Horticulturae 121: 366–373.

Liu, K., and Muse, S.V. 2005. Power Marker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics 21: 2128-2129.

Messmer, M.M., Melchinger, A.A., Boppenmair, J., Brunklaus-Jung E., and Hermann, R.G. 1992. Relationship among early European maize inbreds. I. Genetic diversity among flint and dent lines as revealed by RFLP. Crop Science 32: 1301- 1309.

Mohammadi, H., Ranjbar, F., and Soltani, M. 2011. Climatic potentials assessment for saffron cultivation in Marvdasht. Geography and Environmental Planning (University of Isfahan) 22 (3): 143-154. (In Persian).

Mollafilabi, A. 2004. Experimental finding of production and echo physiological aspects of saffron (*crocus Sativus* L.). International symposium on saffron biology and biotechnology. Albacete, Spain.

Moraga, A.R., Trapero-Mozos, A., Gomez-Gomez, L., and Ahrazem, O. 2010. Intersimplesequence repeat markers for molecular characterization of Crocus cartwright-ianus cv. albus. Industrial Crops and Products 32: 147–151.

Mueller, U.G., and Wolfenbarger, L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. Tree 14: 389-394.

Namayandeh, A., Nemati, Z., Kamelmanesh, M.M., Mokhtari, M., and Mardi, M. 2013. Genetic relationships among species of Iranian crocus (*Crocus* spp.). Crop Breeding Journal 3 (1): 61-67.

Nehvi, F., Qadri, A., Henna, S., and Singh, P. 2008. Saffron in India and Iran: A Review of Production, Processing and Marketing. Indian Journal of Crop Science 3 (1): 156-162.

Nemati, Z., Zeinalabedini, M., Mardi, M., Pirseyediand, S.M., Marashi, S.H., and Khayam Nekoui, S.M. 2012. Isolation and characterization of a first set of polymorphic microsatellite markers in Saffron, *Crocus Sativus* (Iridaceae). American Journal of Botany 27: 340-343.

Omid Beygi, R., Sadeghi, B., and Ramezani, A.A. 2000. Effects of cultivation site on quality of saffron (*Crocus sativus* L.). Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 1 (3-4): 167-178. (In Persian).

Rubio-Moraga, A., Castillo-López, R., Gómez-Gómez, L., and Ahrazem, O. 2009. Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. BMC Research Notes 2: 1-5.

Shokohian, A.A., and Asghari, A. 2008. Evaluation of saffron ecotypes adaptation to Ardabil weather condition. Iranian Journal of Field Crop Science (Iranian Journal of Agricultural Sciences) 38 (4): 563-570. (In Persian).

Yazdi Samadi, B., Rezaei, A.M., and Valyzadeh, M. 2001. Statistical designs in agricultural research. Tehran university publications. Second edition. 1-762. (In Persian).

Yeh, F.C., and Yang, R.C. 1999. POPGENE Version 1.31. University of Albert and Tim Boyle, Center for International Research.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of genetic diversity and some of the quality and agronomic traits in saffron (*Crocus sativus* L.)

Mahdi Bayat[1], Reza Amirnia[2], Mahdi Tajbakhsh[3] and Bahattin Tanyulac[4]*

Received: 3 September, 2015 **Accepted:** 3 February, 2016

DOI: 10.22048/jsat.2016.13910

Abstract

In order to study genetic diversity and some of the quality and agronomic traits in saffron, six cultivated ecotypes were collected from different regions of the Khorasan province (Mashhad, Torbat-Jam, Gonabad, Torbat-Heydarieh, Qaen and Birjand) and they were evaluated during two cropping seasons in 2011-13 in the research farm of the agricultural faculty, Urmia University, Urmia-Iran. The farming results showed that there were significant differences between the ecotypes in the studied agronomic and qualitative traits. Thus,, the cluster analysis grouped ecotypes Torbat-Heydarieh, Mashhad and Torbat-Jam in a cluster and ecotypes Birjand, Qaen and Gonabad in the other cluster. The results of mean comparison also showed that ecotypes Torbat-Heydarieh and Mashhad were the best saffron ecotypes in the Urmia condition. On the other hand, the genetic results showed that 22 of 30 SSR primers (73%) detected a total of 44 polymorphic alleles (average 2). The average of Shannon index (I), genetic diversity (h) and polymorphic information content (PIC) were estimated to be 0.688, 0.424 and 0.402, respectively. These results not only clarified the existence of genetic diversities among saffron ecotypes, but also, the genetic diversities were proven with other analyses such as analysis of molecular variance. The results of cluster analysis of Darwin grouped each ecotype of Birjand, Mashhad and Gonabad in a cluster and three ecotypes. Torbat-Heydarieh, Qaen and Torbat-Jam were placed in the same cluster because of their high genetic similarity. This grouping was confirmed by principal coordinate analysis. It was notable that high genetic similarities were estimated between saffron ecotypes (65-90%). Overall, the results of this research not only introduced microsatellite molecular markers as useful tools for evaluating genetic diversity and grouping of saffron ecotypes, but also confirmed that saffron is not a monomorphic plant and we can identify useful genetic diversities for breeding programs.

Keywords: Cluster analysis, Genetic parameters, Genetic similarity, Microsatellite markers (SSR).

1- graduated of agronomy Ph.D. – Crop Ecology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
3- Professor, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
4- Professor, Department of Bioengineering, EBILTEM institute, EGE University, Izmir, Turkey.
(*-Corresponding author E-mail: ramirnia@gmail.com)

www.SID.ir