

ارزیابی تنوع ژنتیکی زعفران (*Crocus sativus* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی iPBS و SSRمهدی بیات^{۱*}، رضا امیرنیا^۲، مهدی تاجبخش^۳ و بهاتین تانیولاج^۴

۱- دانش‌آموخته دکتری زراعت، گرایش اکولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

۲- دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

۳- استاد دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

۴- استاد دانشکده بیومهندسی، دانشگاه آگه، ازمیر، ترکیه.

* - نویسنده مسئول: E-mail: mahdibayat971@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۱۸

چکیده

به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی زعفران، شش اکوتیپ زراعی از نقاط مختلف استان خراسان رضوی (مشهد، تربت‌جام، گناباد و تربت-حیدریه) و استان خراسان جنوبی (قاین و بیرجند) تهیه و با استفاده از نشانگرهای مولکولی iPBS و SSR مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج تجزیه‌های مولکولی نشان داد که ۲۸ نشانگر iPBS و ۲۲ نشانگر SSR به ترتیب ۱۷۹ و ۴۴ آلل چندشکلی را شناسایی نمودند و تعداد باندهای تکثیر یافته برای هر نشانگر به ترتیب ۱۰-۳ (میانگین ۶/۴) و ۳-۱ (میانگین ۲) بود. همچنین میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرهای iPBS و SSR به ترتیب ۰/۷۹ و ۰/۴۰ تخمین زده شد. از طرفی، نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که بر اساس نشانگر iPBS واریانس درون اکوتیپ‌ها نسبت به واریانس بین اکوتیپ‌ها بیشتر می‌باشد، در حالی که بر اساس نشانگر SSR واریانس بین اکوتیپ‌ها بیشتر از واریانس داخل اکوتیپ‌ها بود. همچنین تجزیه خوشه، اکوتیپ‌های مورد مطالعه را در سه گروه قرار داد و این گروه‌بندی توسط تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مورد تأیید قرار گرفت. با این حال، اکوتیپ‌های بیرجند و گناباد و همچنین اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه و قاین از لحاظ هر دو تجزیه خوشه‌ای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. با این حال، شباهت ژنتیکی بالایی بین کلیه اکوتیپ‌های زعفران گزارش شد. نتایج این تحقیق نشان داد اگر چه هر دو نشانگر در ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زعفران کارآمد بودند، ولی نشانگر iPBS در مقایسه با نشانگر SSR کارایی بالاتری در تعیین تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران داشت.

واژه‌های کلیدی: اکوتیپ، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، تجزیه خوشه‌ای، محتوای اطلاعات چندشکلی.

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی علفی و چندساله است که اغلب در کشورهای با اقلیم خشک کشت می‌شود (Abdullaev, 2006). این گیاه جزء گران قیمت‌ترین و با ارزش‌ترین ادویه‌های دنیاست (Alipoor Miandehi et al., 2006; Soufizadeh et al., 2015) و مهم‌ترین گیاه صادراتی ایران محسوب می‌شود (Zand et al., 2014; Nekouei et al., 2015; Ahmadi and Nazari Alam, 2015). ایران به عنوان بزرگ‌ترین تولیدکننده زعفران تقریباً ۹۰ درصد از زعفران دنیا را تولید می‌کند (Abolhasani et al., 2005; Koocheki and Seyyedi, 2015). جنس کروکوس دارای ۱۰۰ گونه است که تمامی آن‌ها به جز زعفران دیپلوئید و بارور هستند. مطالعات کاریوتیپی انجام شده بر روی زعفران زراعی نشان داد که زعفران در سلول‌های سوماتیک خود $2n=3x=24$ کروموزوم دارد. بنابراین، زعفران زراعی یک اتوتتریپلوئیدی عقیم بوده و تکثیر آن صرفاً از طریق بیه‌انجام می‌گیرد (Abdullaev, 2002).

از نشانگرهای مولکولی به‌عنوان ابزاری کارآمد در مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی گیاهان استفاده می‌شود (Ozkan et al., 2005). این تکنیک‌ها بخصوص در گیاه زعفران که شدیداً تحت فرسایش ژنتیکی می‌باشد، مفید است (Fernandez, 2007). در تحقیق حاضر از دو نوع نشانگر $iPBS^1$ و SSR^2 جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی زعفران زراعی استفاده شده است. نشانگر $iPBS$ از جمله نشانگرهایی است که بر روی توالی‌های تکراری متحرک (رتروترانسپوزون‌ها) موجود در کروموزوم‌ها عمل کرده و باعث تکثیر این قسمت از کروموزوم می‌شود. امروزه عناصر رتروترانسپوزونی به دلیل اینکه کپی‌های فراوانی از آنها در سطح ژنوم وجود دارد و حدود ۴۰ تا ۷۰ درصد از ژنوم گیاهان را تشکیل می‌دهند (Aalami et al., 2012)، نشانگرهای مولکولی مناسبی جهت تعیین تنوع ژنتیکی در گیاهان محسوب می‌شوند (Queen et al., 2004). از طرفی ریزماهوره‌ها یا ردیف‌های تکراری ساده (SSR) شامل واحدهای نوکلئوتیدی تکی تا شش‌تایی تکرار شونده هستند که در ژنوم بیشتر یوکاریوت‌ها پراکنده‌اند (Gur-Aric et al.,

2000). از جمله ویژگی‌های این نشانگرها می‌توان به تنوع زیاد، توارث هم‌باز، مبتنی بودن بر PCR، پوشش ژنومی گسترده و نیاز به مقدار نسبتاً کم DNA اشاره کرد (Thiel et al., 2003). این مزایا باعث شده از نشانگرهای ریزماهوره به‌طور گسترده در نقشه‌یابی ژنومی و انگشت‌نگاری DNA گیاهان استفاده شود (Khlestkina et al., 2002).

امروزه تحقیقات گسترده‌ای جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زعفران در سرتاسر دنیا و ایران انجام و نتایج ضد و نقیضی در ارتباط با وجود یا عدم وجود تنوع در زعفران ارائه شده است. به‌طوری‌که برخی از محققان از جمله روبیوموراگا و همکاران (Rubio-Moraga et al., 2009)، گرلی-کایولا و همکاران (Grilli Caiola et al., 2004) و علوی‌کیا و همکاران (Alavi-Kia et al., 2008) هیچ‌گونه تنوعی را در بین اکوتیپ‌های زعفران شناسایی نکردند، لذا این محققین زعفران را گیاهی مونومورف معرفی نمودند، در حالی‌که لونت و همکاران (Levent et al., 2008)، 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) بین گونه‌های زراعی و غیرزراعی زعفران تنوع ژنتیکی مشاهده نمودند.

با توجه به نتایج تحقیقات فوق و اهمیت ارزیابی تنوع ژنتیکی زعفران، در این تحقیق سعی شده است، تنوع ژنتیکی زعفران زراعی ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی رتروترانسپوزونی ($iPBS$) و ریزماهوره‌ای (SSR) مورد ارزیابی و مطالعه قرار بگیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این مطالعه شش اکوتیپ زراعی زعفران از نقاط مختلف استان خراسان رضوی (مشهد، تربت‌جام، گناباد و تربت-حیدریه) و استان خراسان جنوبی (قاین و بیرجند) جمع‌آوری شدند (جدول ۱).

1- inter Primer Binding Site (iPBS)

2- Simple Sequence Repeats (SSR)

جدول ۱. خصوصیات جغرافیایی مناطق جمع آوری بنه زعفران.

Table 1. Altitude characteristics of regions that saffron corms collected.

شماره اکوتیپ Ecotype No.	منطقه جمع آوری Collected region	استان Province	ارتفاع Altitude (m)	عرض جغرافیایی Latitude (N)	طول جغرافیایی Longitude (E)
1	بیرجند Birjand	خراسان جنوبی South Khorasan	1491	59° 12'	32° 52'
2	قاین Qaen	خراسان جنوبی South Khorasan	1432	59° 10'	33° 43'
3	گناباد Gonabad	خراسان رضوی Razavi Khorasan	1450.8	13' 59°	16' 35°
4	ترت حیدریه Torbate Heydarieh	خراسان رضوی Razavi Khorasan	950.4	60' 35°	35' 15°
5	ترت جام Torbate Jam	خراسان رضوی Razavi Khorasan	1056	58° 41'	34° 21'
6	مشهد Mashhad	خراسان رضوی Razavi Khorasan	999.2	59° 38'	16' 36°

PCR در یک حجم نهایی ۱۵ میکرولیتری که شامل شش میکرولیتر (20 ng/μl) DNA ژنومی، ۱/۲ میکرولیتر dNTPs (1 mM)، دو میکرولیتر (25 mM) MgCl₂، ۰/۲ واحد آنزیم تگ پلیمرز، ۱/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۱ میکرولیتر آغازگر و ۳/۳ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده، انجام گرفت. برنامه زمانی مورد استفاده ترموسایکلر جهت تکثیر قطعه مورد نظر شامل مراحل زیر بود: مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل سه مرحله: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۳۰ ثانیه جهت واسرشت سازی ثانویه، ۶۰-۴۳ درجه سانتی-گراد به مدت زمان ۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگر و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه جهت گسترش آغازگر و در پایان نیز یک چرخه گسترش نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه در نظر گرفته شد.

نشانه‌گر مولکولی (SSR) (Simple Sequence Repeats)

در این بخش نیز از ۳۰ جفت آغازگر SSR جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی زعفران استفاده گردید که از این بین، تنها ۲۲ جفت آغازگر تولید باندهای چندشکلی نمودند (جدول ۲). واکنش PCR در یک حجم نهایی ۲۰ میکرولیتری که شامل پنج میکرولیتر (20 ng/μl) DNA ژنومی، دو میکرولیتر (1 mM) dNTPs، دو میکرولیتر (25 mM) MgCl₂، ۰/۲ واحد آنزیم تگ پلیمرز، دو میکرولیتر بافر 10X PCR، یک

استخراج DNA

جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زعفران، از هر اکوتیپ ۱۰ بنه انتخاب (مجموعاً ۶۰ نمونه) و در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه EBILTEM دانشگاه اگه (EGE)-ترکیه، مورد ارزیابی ژنتیکی قرار گرفتند. برای این منظور، DNA با استفاده از روش بیکی و همکاران (Beiki et al., 2011) استخراج گردید و 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، مدل EZ-201) مورد تأیید قرار گرفت. در نهایت DNA استخراجی به میزان ۲۰ ng/μl رقیق و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR

نشانه‌گر مولکولی (iPBS) (inter Primer Binding Site)

در این مطالعه برای اولین بار از نشانه‌گر iPBS برای ارزیابی روابط ژنتیکی اکوتیپ‌های زراعی زعفران (*C. sativus* L.) استفاده شده است. به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی زعفران از ۲۹ آغازگر iPBS که توسط کالندر و همکاران (Kalendar et al., 2010) طراحی شده بود استفاده گردید که از این بین، ۲۸ آغازگر تولید باندهای چند شکلی نمودند (جدول ۲). واکنش

ثانویه، ۶۲-۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۴۵ ثانیه برای اتصال آغازگر و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت گسترش آغازگر و در پایان، نیز یک چرخه گسترش نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه در نظر گرفته شد.

میکرولیترا از هر کدام از آغازگرها و هشت میکرولیترا آب دوبار تقطیر شده، انجام گرفت. برنامه زمانی مورد استفاده ترموسایکلر جهت تکثیر قطعه مورد نظر شامل مراحل زیر بود: مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه، ۴۵ چرخه حرارتی شامل سه مرحله: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۴۵ ثانیه جهت واسرشت‌سازی

جدول ۲. نام و مشخصات ۲۸ آغازگر iPBS و ۲۲ جفت آغازگر SSR تولید کننده باندهای چند شکلی در زعفران.

Table 2. Name and specification of the 28 iPBS primers and 22 SSR primers produced polymorphic bands in Saffron.

آغازگر آی بی بی اس iPBS Primer	توالی آغازگر Primer sequence (5'-3')	دمای اتصال آغازگر (°C) Annealing temperature	تعداد باندهای چند شکلی No. of polymorphic bands	محتوی اطلاعات چند شکلی Polymorphism information index (PIC)	آغازگر اس اس آر SSR Primer	توالی آغازگر Primer Sequence (5'-3')	دمای اتصال آغازگر (°C) Annealing temperature	تعداد باندهای چند شکلی No. of polymorphic bands	محتوی اطلاعات چند شکلی Polymorphism information index (PIC)
2080	CAGACGGCGCCA	47	8	0.49	SCA 15	ACCAGAGAAGCCCTCCTAGC GTTCTGTGGTGGTCACGTTG	47.1	1	0.371
2226	CGGTGACCTTTGATACCA	50	10	0.80	SCA 109	ATACTTACCAGTTCACCGCC CTGGAGATGTGTCAGCTTTA	64.8	3	0.335
2229	CGACCTGTTCTGATACCA	48	10	0.90	SCA 303	TCCGTATCCTAGTCGCGATC CGCCGTCATGACTCATACTC	64.8	2	0.496
2232	AGAGAGGCTCGGATACCA	43	4	0.81	SCA 319	GTAATCGATGCTGTGGGAAG GAGTCATGTGATAGCCGTATG	61.5	1	0.371
2237	CCCCTACCTGGCGTGCCA	65	6	0.89	SCA 327	CTCTCTCTCCCCACCCAATC GAGGGAGGAGGAGGTTAGG	64.8	2	0.455
2244	GGAAGGCTCTGATTACCA	60	8	0.90	SCA 381	CTCCAGCATGGCCTTTCTAC ACCTGATGGTCAAAGATGGG	57.5	1	0.179
2249	AACCGACCTCTGATACCA	47	6	0.91	SCA 382	AATTGGTAGAGAGGGGAGAG ACATGCCATTAGAGTCAGGC	61.5	1	0.186
2252	TCATGGCTCATGATACCA	45	7	0.83	SCA 393	GGATGAACACTGATGATGGC ACCTCCACCACGATATCCAC	64.8	3	0.359
2273	GCTCATCATGCCA	45	8	0.80	SCA 414	GTTACCATCGTCCGCAG CCATTAGGCCGAATAACA	64.8	1	0.090
2272	GGCTCAGATGCCA	47	8	0.90	SCA 416	ACTGTACCGGTCGAAGACG AAATTCCACGTCAGCTCC	64.8	3	0.538
2298	AGAAGAGCTCTGATACCA	45	8	0.87	SCA 426	TAAGATCGTAAGATCGCGGC AGGCAGGAAGAGGTGGAGG	64.8	2	0.427
2389	ACATCCTTCCCA	48	3	0.45	SCA 504	CCCATGCGTTTTAACTATTCT CGTTCCATCGATCCGTATGG	64.8	2	0.506
2087	GCAATGGAACCA	48	5	0.73	SCA 515	GGAGATGCTATAGAGCAGTG ATTGCTCCTTACCACCTTGC	64.8	2	0.578
2380	CAACCTGATCCA	50	7	0.90	SCA 547	GGCCAACGCGTGTGTATCTC TATATGCCAAGACGGATGGG	64.8	3	0.156
2391	ATCTGTCAGCCA	45	5	0.86	SCB 109	TGGTAGTATAGGTAATAACAT TCCTATACACATAAAACATAC	64.8	3	0.577
2393	TACGGTACGCCA	43	8	0.92	SCB 115	TCTCCCTATTCCCGTGTAAATCG CCCAGATCGATTGTACCTAGC	61.5	2	0.534
2394	GAGCCTAGGCCA	57	5	0.77	SCC 13	GTGGTGAGTAAACAGTGGTGG	64.8	3	0.435

آغازگر آی‌بی‌اس iPBS Primer	توالی آغازگر Primer sequence (5'-3')	دمای اتصال آغازگر (°C) Annealing temperature	تعداد باندهای چند شکلی No. of polymorphic bands	محتوی اطلاعات چند شکلی Polymorphism information index (PIC)	آغازگر اس‌اس‌آر SSR Primer	توالی آغازگر Primer Sequence (5'-3')	دمای اتصال آغازگر (°C) Annealing temperature	تعداد باندهای چند شکلی No. of polymorphic bands	محتوی اطلاعات چند شکلی Polymorphism information index (PIC)
2395	TCCCCAGCGGAGTCGCCA	60	3	0.49	SCC 209	GAGAGCAGAGCAGAGGCAAC GCGAAAACACAATGCAAAAA GCGTTGGTTGGACGGCTGAC	64.8	1	0.123
2415	CATCGTAGGTGGGCGCCA	47	6	0.75	SCC 219	GTGTTTATAGGGGTGCCACG TGTTGGTGGTGCAGGTAAG	64.8	1	0.092
2085	GGCTCAGATGCCA	55	7	0.94	SCC 247	TGCACGGACAGATCAGTTTC ACTGAACAACACCAAGTGCG	64.8	1	0.137
2277	GGCGATGATACCA	53	7	0.84	SCD 17	CCATTCGTGAGAAGATCTGA CACCTCATCCTCGTAACGCC	64.8	3	0.627
2074	GCTCTGATACCA	53	6	0.80	SCD 219	TCCTCCCTCCCTTCGCCACTG CGATGTTGCCATGGCTGCTCC	64.8	3	0.672
2075	CTCATGATGCCA	53	4	0.48	---	---	---	---	---
2222	ACTTGGATGCCGATACCA	47	7	0.87	---	---	---	---	---
2270	ACCTGGCGTGCCA	47	6	0.86	---	---	---	---	---
2381	GTCCATCTTCCA	55	5	0.84	---	---	---	---	---
2382	TGTTGGCTTCCA	55	8	0.90	---	---	---	---	---
2401	AGTTAAGCTTTGATACCA	53	4	0.56	---	---	---	---	---
Sum		---	179	22.03	---	---	---	44	8.243
Mean		---	6.40	0.79	---	---	---	2	0.402

انجام الکتروفورز

ده میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شدند و در چاهک‌های ژل آگارز ۳ درصد و بافر 1X TBE بارگذاری و از لدر 1 kb جهت تخمین طول قطعات تکثیر یافته استفاده گردید. سپس ژل با شدت جریان ۹۰ وات به مدت ۹۰ تا ۱۲۰ دقیقه الکتروفورز شد. جهت آشکارسازی قطعات DNA تکثیر شده، ژل آگارز به مدت ۱۵ دقیقه در اتیدیم برامید رنگ‌آمیزی شد و پس از شستشوی ژل با آب مقطر، عکس‌برداری در دستگاه Transilluminator UV در زیر نور ماوراء بنفش انجام گردید.

تجزیه داده های مولکولی

باندهای تکثیر یافته با استفاده از اعداد صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازبندی شدند. سپس تعداد آلل‌های هر آغازگر، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شباهت ژنتیکی (SG) با استفاده از نرم‌افزار پاور میکرو^۱ نسخه ۳/۲۵ محاسبه گردید (Liu and Muse, 2005). تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکاردا و روش UPGMA و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCoA) با استفاده از نرم‌افزار پست^۲ نسخه ۱/۹۸ انجام گرفت و در نهایت، جهت محاسبه تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) از نرم‌افزار ژن الکس^۳ نسخه ۱/۳۱ استفاده گردید (Yeh and Yang, 1999).

نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران بر اساس نشانگر iPBS و SSR

در این تحقیق از ۲۹ آغازگر iPBS جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی زعفران استفاده گردید. نتایج نشان داد که از این بین یک آغازگر منومورف بوده و چندشکلی نشان نداد؛ در حالی که ۲۸ آغازگر دیگر، در مجموع ۲۰۶ آلل را شناسایی نمودند که از بین آن‌ها ۱۷۹ آلل چندشکلی بودند (شکل ۱)، بنابراین، کارایی آغازگرها بیش از ۹۶٪، نسبت آلل‌های چندشکلی بیش از ۸۶٪ و میانگین تعداد آلل‌ها در هر آغازگر بیش از شش عدد

تخمین زده شد (جدول ۲). همچنین آغازگرهای ۲۲۲۶ و ۲۲۲۹ بیشترین (۱۰ آلل) و آغازگرهای ۲۳۸۹ و ۲۳۹۵ کمترین چندشکلی (سه آلل) را در بین اکوتیپ‌های زعفران شناسایی نمودند. بابایی و همکاران (Babaei et al., 2014) میزان چندشکلی شناسایی شده در بین اکوتیپ‌های زعفران را با استفاده از نشانگر رتروترانسپوزونی SRAP، ۴۳/۸۸ درصد گزارش نمودند و بیان کردند که نشانگر SRAP یک نشانگر مفید و کارآمد جهت انگشت نگاری و ارزیابی تنوع ژنتیکی زعفران می‌باشد. از طرفی، نتایج حاصل از نشانگر مولکولی - نشان داد که از بین ۳۰ جفت آغازگر استفاده شده، هشت جفت آغازگر منومورف‌سیم بودند و تولید باندهای یک شکل کردند، در حالی که ۲۲ جفت آغازگر دیگر (۷۳ درصد)، در مجموع، ۶۵ آلل تولید نمودند که از این بین ۴۴ آلل چندشکلی بودند (۶۷ درصد) و میانگین تعداد آلل‌های چندشکلی در هر آغازگر دو عدد تخمین زده شد (جدول ۲ و شکل ۲). همچنین نتایج نشانگر مولکولی SSR نشان دادند که حداکثر سه باند توسط پرایمرهای SCA₁₀₉, SCA₃₉₃, SCA₄₁₆, SCA₅₄₇, SCB₁₀₉, SCC₁₃, SCD₁₇, SCD₂₁₉ توسط پرایمرهای SCA₁₅, SCA₃₁₉, SCA₃₈₁, SCA₃₈₂, SCA₄₁₄, SCC₂₀₉, SCC₂₁₉, SCC₂₄₇ شناسایی شدند. این نتایج در مجموع نشان دادند که هر دو نشانگر مورد استفاده (iPBS و SSR) در تعیین و ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زعفران کارآمد و مفید می‌باشند، ولی با این حال، نشانگر iPBS در مقایسه با نشانگر SSR کارایی بالاتری در تعیین تنوع ژنتیکی زعفران داشته است. رولدان روزی و همکاران (Roldan- Rozi et al., 2001) معتقد بودند که نتایج به دست آمده از یک نشانگر کاملاً در انطباق با نتایج حاصل از نشانگر دیگر نمی‌باشد. این مسئله می‌تواند به دلیل تفاوت در ژنوم، میزان جهش، ویژگی نشانگر از لحاظ غالبیت یا همباز بودن، تعداد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و زمینه ژنتیکی آنها، تعداد نشانگرهای مورد استفاده و تکنیک به کار رفته در تعیین چندشکلی باشد (King and Burek, 1999). لذا جهت به حداقل رسانیدن خطاها و یا اشکالات اجتناب‌ناپذیر مربوط به هر یک از نشانگرها، استفاده از نشانگرهای مختلف و ترکیب اطلاعات حاصل از آن‌ها توصیه می‌شود (Mohammadi et al., 2009). از طرفی، لو و چن (Lou and Chen, 2007) با مقایسه

1- Power Marker ver. 3.25 software

2 - PAST ver. 1.98 software

3- GenAlex 1.31 software

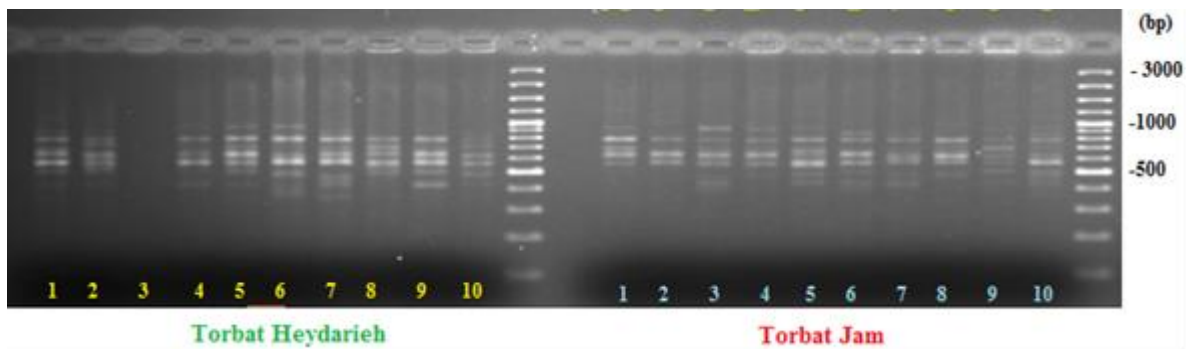
Namayandeh et al., 2014) و نماینده و همکاران (Erol et al., 2014) (al., 2013) میزان محتوای اطلاعات چندشکلی در جمعیت زعفران مورد مطالعه خود را به ترتیب بین ۰/۲۱۸ تا ۰/۵۱۲ (با میانگین ۰/۳۴) و بین ۰/۹ تا ۰/۵۵ (با میانگین ۰/۳۴) تخمین زدند.

تجزیه واریانس مولکولی

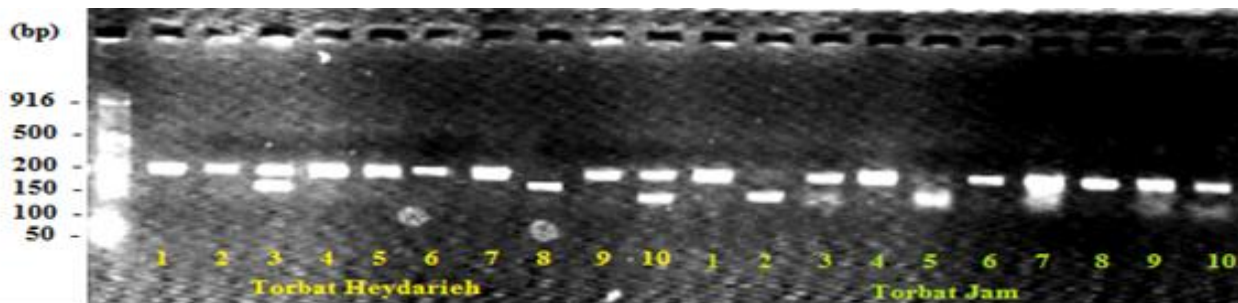
به منظور تقسیم‌بندی واریانس‌های ژنتیکی مشاهده شده به واریانس درون و بین اکوتیپ‌های زعفران از تجزیه واریانس مولکولی استفاده گردید. در تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر iPBS مشخص شد (جدول ۳) که واریانس درون اکوتیپ‌ها نسبت به واریانس بین اکوتیپ‌ها بیشتر می‌باشد. به‌طوریکه تنوع بین جمعیتی ۲۵ درصد و تنوع درون جمعیتی ۷۵ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند و این نتیجه نشان می‌دهد که بر اساس نشانگر iPBS تفاوت داخل اکوتیپ‌ها بیشتر از تفاوت بین اکوتیپ‌ها می‌باشد. بابایی و همکاران (Babaei et al., 2014) نیز با استفاده از داده‌های مولکولی حاصل از نشانگر رتروترانسپوزون SRAP بیان نمودند که اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌های زعفران وجود ندارد در حالی که تنوع درون اکوتیپ‌های زعفران بسیار بالاتر و معنی‌دار می‌باشد. این محققان واریانس بین و درون اکوتیپ‌های زعفران را به ترتیب ۰/۰۷ و ۹۹/۹۳ درصد گزارش نمودند؛ در حالی که کیفی و بیکی (Keify and Beiki, 2012) با ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های زعفران با استفاده از نشانگر SRAP، بیان نمودند که بیشترین تنوع ژنتیکی (۸۲/۶۵ درصد) بین جمعیت‌ها است و میزان تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های این گیاه را کم (۱۷/۳۴ درصد) گزارش نمودند. این محققان علت کمی تنوع را در داخل جمعیت زراعی این گونه دلیلی بر کلون بودن زعفران دانستند و بیان کردند که گونه‌های زراعی به علت اعمال گزینش مصنوعی از طرف انسان و تکثیر غیرجنسی به سمت یکنواختی پیش‌رفته و تنوع خود را نسبت به گونه‌های وحشی از دست دادند.

نشانگرهای رتروترانسپوزونی و نشانگرهای AFLP و SSR بیان نمودند که میزان چندشکلی مشاهده شده در نشانگر رتروترانسپوزونی ۲۵ درصد بیش تر از نشانگرهای AFLP و SSR می‌باشد و این محققان گزارش کردند که توانایی نشانگرهای رتروترانسپوزونی در شناسایی چندشکلی بسیار مؤثرتر و قدرتمندتر از نشانگرهای AFLP و SSR می‌باشد. در مجموع نتایج این تحقیق بیانگر این واقعیت می‌باشد که اگر چه گیاه زعفران عقیم بوده و بصورت غیرجنسی و از طریق بنه تکثیر می‌یابد، ولی به دلیل تفاوت‌های اقلیمی و اکولوژی مناطق مختلف کشت، جهش‌های خودبخودی و انتخاب‌های مصنوعی در طی سالیان سال تنوع ژنتیکی در این گیاه بوجود آمده و می‌توان از این تنوع جهت انتخاب اکوتیپ‌های برتر استفاده نمود (Agayev et al., 2009; Keify and Beiki, 2012).

میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) معیاری برای اندازه چندشکلی و کارایی نشانگرهای مولکولی است و با محاسبه این شاخص می‌توان بهترین جایگاه را برای مطالعات بعدی، گزینش و معرفی نمود (Alwala et al., 2006; Namayandeh et al., 2013). با محاسبه پارامتر محتوای اطلاعات چندشکلی مشخص گردید که میانگین این پارامتر در بین نشانگر iPBS و SSR به ترتیب ۰/۷۹ و ۰/۴۰ بود (جدول ۲) که با توجه به گزارش اکسی و همکاران (Xie et al., 2010) در ارتباط با میزان PIC (بالا $PIC > 0.5$)، متوسط ($0.25 < PIC < 0.5$) و پایین ($PIC < 0.25$) مشخص می‌شود که کارایی نشانگر iPBS در تعیین تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زراعی زعفران بیشتر از نشانگر SSR می‌باشد. کاسترو (Castro, 2011) نیز معتقد بود که استفاده از نشانگرهای مولکولی رتروترانسپوزونی در اصلاح گیاهان، مهم و با ارزش می‌باشد و چون تعداد کپی‌های آن‌ها به وفور در ناحیه یوکاریوتی وجود دارند، لذا می‌توان از این تنوع در مطالعات نقشه‌یابی کامل ژنوم گیاهی استفاده نمود. در ادامه نیز مشخص شد که آغازگرهای ۲۰۸۵ و ۲۳۹۳ در نشانگر iPBS به ترتیب با ۰/۹۴ و ۰/۹۲ و آغازگرهای SCD17 و SCD219 در نشانگر SSR به ترتیب با ۰/۶۷ و ۰/۶۳ بیشترین میزان PIC را داشتند که نشان می‌دهد این آغازگرها، مؤثرترین آغازگرها جهت مطالعه تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زعفران می‌باشند (جدول ۲). ارول و همکاران



شکل ۱. الگوی باندهای iPBS حاصل از اکوتیپ‌های تربت حیدیه و تربت جام با استفاده از آغازگر ۲۲۴۴. Figure 1. A iPBS pattern obtained from ecotypes Torbat-e Heydarieh and Torbat-e Jam using 2244 primer.



شکل ۲. الگوی باندهای SSR حاصل از اکوتیپ‌های تربت حیدیه و تربت جام با استفاده از آغازگر SCB 109. Figure 2. A SSR pattern obtained from ecotypes Torbat-e Heydarieh and Torbat-e Jam using SCB 109 primer.

به دلیل اینکه زعفران از طریق بیه و به صورت غیرجنسی تکثیر پیدا می‌کند. لذا انتظار می‌رفت که تنوع درون اکوتیپ‌ها کمتر تخمین زده شود. با این حال هی و همکاران (He et al., 2011)، باراکت و همکاران (Baraket et al., 2011) و کنی و همکاران (Kenedi et al., 2011) معتقد بودند که در تعیین واریانس درون و بین جمعیت‌های مورد مطالعه اختلاف ضد و نقیضی در تحقیقات مختلف وجود دارد که این اختلافات ممکن است تحت تاثیر نوع ژرم‌پلاسما، نوع نشانگر، نوع آغازگر و نحوه نمونه‌برداری باشد.

از طرفی، تجزیه واریانس مولکولی بر اساس نشانگر SSR نشان داد (جدول ۳) که واریانس بین اکوتیپ‌ها نسبت به واریانس داخل اکوتیپ‌ها بیشتر می‌باشد. به طوری که تنوع بین جمعیتی ۵۴ درصد و تنوع درون جمعیتی ۴۶ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند و این امر نشان می‌دهد که بر اساس نشانگر SSR تفاوت بین اکوتیپ‌ها بیشتر از تفاوت درون اکوتیپ‌ها می‌باشد. این نتیجه قابل انتظار و پیش‌بینی بود، چرا که اکوتیپ‌ها از مناطق مختلف جغرافیایی تهیه شده بودند و این امر طبیعی است که با یکدیگر اختلاف داشته باشند. از طرفی،

جدول ۳. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس نشانگر iPBS و SSR.

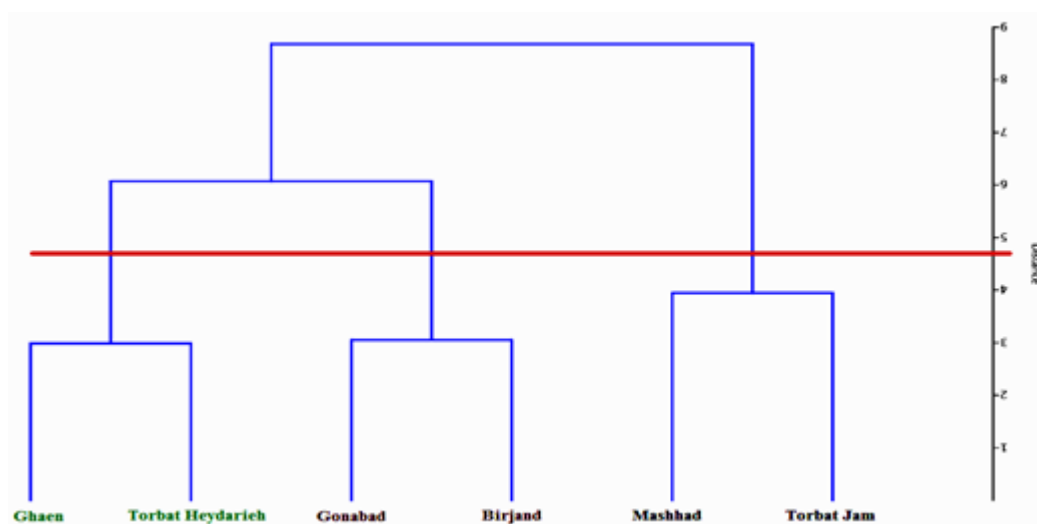
Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) based on iPBS and SSR markers.

واریانس تجمعی (%)		واریانس		درجه آزادی df	منابع تغییر S.O.V
SSR	iPBS	SSR	iPBS		
54	25	5.82	11.21	5	بین جمعیت Between population
46	75	4.94	34.06	54	درون جمعیت Within population
100	100	10.76	45.27	59	کل Total

تجزیه خوشه‌ای

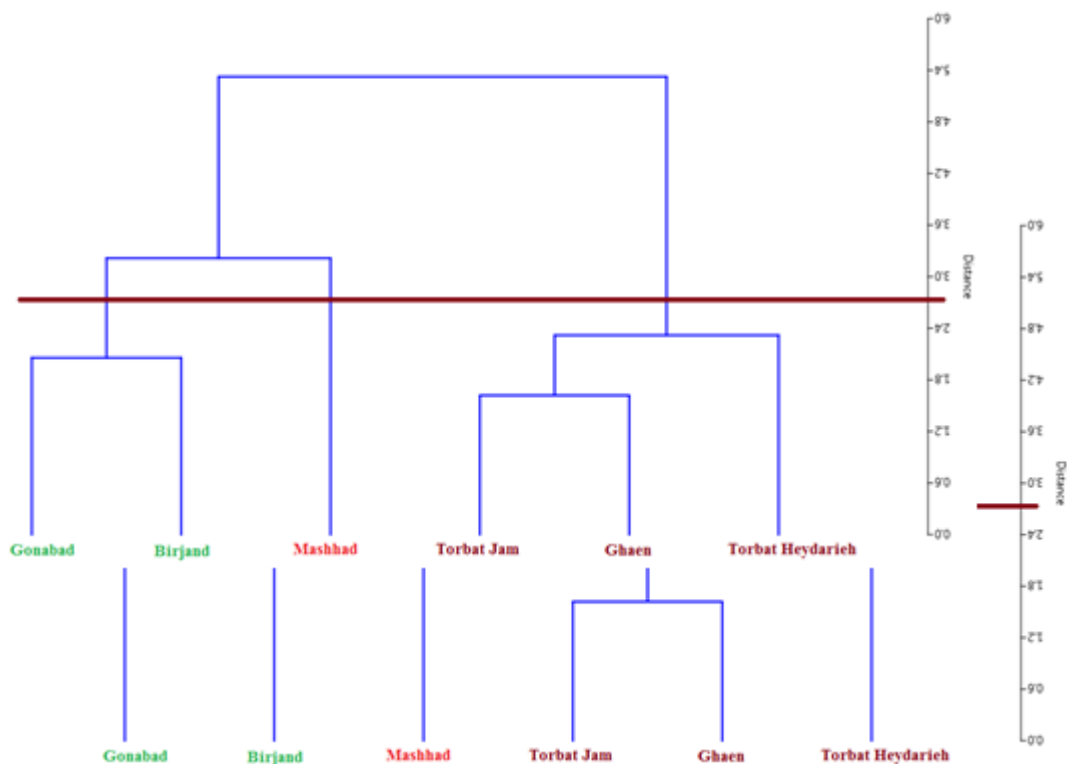
جهت گروه‌بندی اکوتیپ‌های زعفران بر اساس داده‌های مولکولی نشانگرهای مورد مطالعه از تجزیه خوشه‌ای استفاده گردید. نتایج تجزیه خوشه‌ای حاصل از نشانگر iPBS نشان داد که شش اکوتیپ زعفران مورد مطالعه در سه گروه قرار گرفتند (شکل ۳). به طوری که اکوتیپ‌های مشهد و تربت‌جام، اکوتیپ‌های بیرجند و گناباد و اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه و قاین اختلاف چندانی از لحاظ نشانگر iPBS نداشتند و دو به دو در یک خوشه گروه‌بندی شدند. از طرفی خوشه‌بندی اکوتیپ‌های زعفران بر اساس داده‌های مولکولی نشانگر SSR نیز شش اکوتیپ زعفران مورد مطالعه را در سه گروه قرار داد

(شکل ۴). با این تفاوت که اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه، قاین و تربت‌جام اختلاف چندانی از لحاظ نشانگر SSR نداشتند و هر سه اکوتیپ در یک خوشه گروه‌بندی شدند و اکوتیپ مشهد به طور مستقل در یک گروه و اکوتیپ‌های بیرجند و گناباد هر دو در یک خوشه قرار گرفتند. نتایج تجزیه خوشه‌ای در مجموع نشان داد که اکوتیپ‌های بیرجند و گناباد و همچنین اکوتیپ‌های تربت‌حیدریه و قاین از لحاظ هر دو نشانگر اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و در هر دو تجزیه خوشه‌ای در یک گروه قرار گرفتند این نتیجه نشان می‌دهد که این اکوتیپ‌ها از قرابت ژنتیکی نزدیک‌تری برخوردار هستند.



شکل ۳. تجزیه خوشه‌ای اکوتیپ‌های زعفران با استفاده از نشانگر iPBS.

Figure 3. Cluster analysis of saffron ecotypes using iPBS marker.



شکل ۴. تجزیه خوشه‌های اکوتیپ‌های زعفران با استفاده از نشانگر SSR.

Figure 4. Cluster analysis of saffron ecotypes using SSR marker.

کل را توجیه نمایند (۱۰۰٪). از طرفی در هر دو تجزیه مشخص گردید که مؤلفه اول با اختلاف کاملاً فاحشی در مقایسه با مؤلفه دوم بیشترین واریانس را در توجیه واریانس کل جامعه داشت (مؤلفه اول: ۸۷/۰۸ و مؤلفه دوم: ۱۲/۹۲ در نشانگر iPBS؛ مؤلفه اول: ۹۷/۶۳ و مؤلفه دوم: ۲/۳۷ در نشانگر SSR) که این امر از دقت بالای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در این تحقیق خبر می‌دهد. همچنین نمودار دو بعدی بای‌پلات بر اساس این دو مؤلفه نشان داد (شکل‌های ۵ و ۶) که اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران از پراکنش خوبی برخوردار هستند و با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی نشانگرهای iPBS و SSR تطابق کامل داشت و تأییدی بر صحت نتایج تجزیه خوشه‌ای می‌باشد.

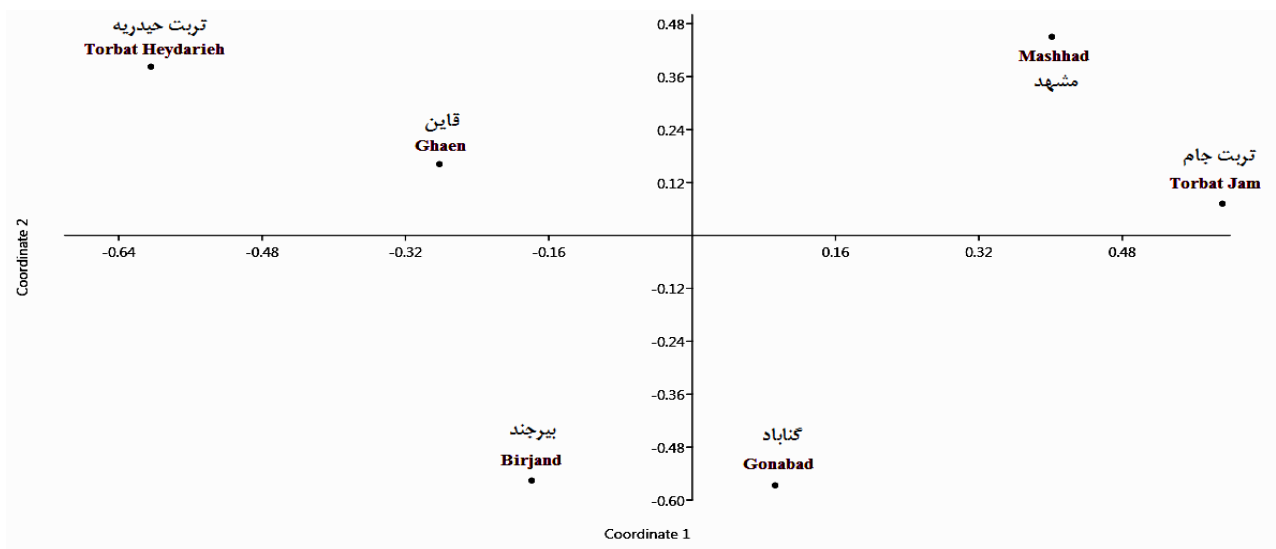
تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ابزاری قدرتمند جهت مطالعه و گروه‌بندی افراد مورد مطالعه می‌باشد (Budak et al., 2004; Johnson et al., 2001). همچنین برخی از محققین معتقد هستند که تجزیه به مؤلفه‌های اصلی روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای است و منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثری اطلاعات از داده‌های مولکولی می‌شود (Messmer et al., 1992). لذا در تحقیق حاضر جهت تعیین صحت نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده گردید. نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس داده‌های مولکولی نشانگرهای iPBS و SSR، دو مؤلفه را شناسایی نمودند (جدول ۴) که توانستند بخوبی تمام تغییرات

جدول ۴. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس نشانگر iPBS و SSR.

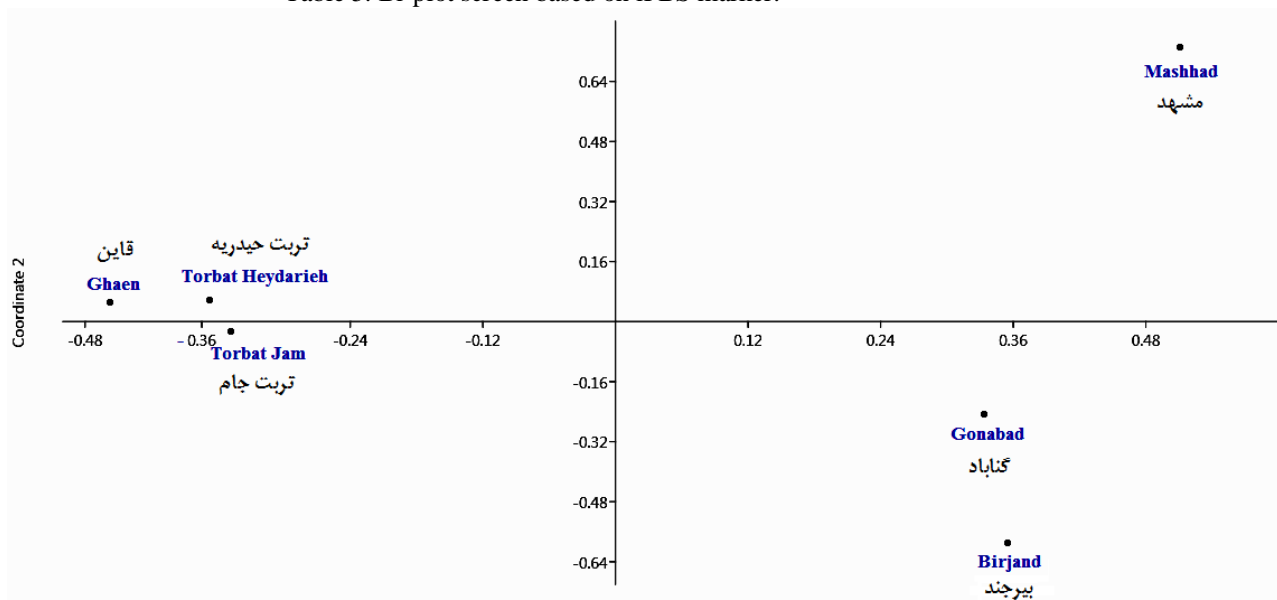
Table 4. Principal coordinate analysis based on iPBS and SSR markers.

SSR		iPBS		مؤلفه Component
وارانس تجمعی (%) Cumulative variance (%)	وارانس (%) Variance (%)	وارانس تجمعی (%) Cumulative variance (%)	وارانس (%) Variance (%)	
97.63	97.63	87.08	87.08	اول First
100	2.37	100	12.92	دوم Second



شکل ۵. نمودار بای پلات بر اساس نشانگر iPBS.

Table 5. Bi-plot screen based on iPBS marker.



شکل ۶- نمودار بای پلات بر اساس نشانگر SSR.

Table 6. Bi-plot screen based on SSR marker.

میزان شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زعفران

جهت ارزیابی میزان شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زعفران بر اساس نشانگرهای iPBS و SSR، مقادیر همسانی ژنتیکی محاسبه گردید (جدول ۵). نتایج نشان داد که از لحاظ نشانگر iPBS، کمترین شباهت به ترتیب مربوط به اکوتیپ‌های تربت‌جام و تربت‌حیدریه (۷۵ درصد) و مشهد و تربت‌حیدریه (۷۶ درصد) و بیشترین شباهت به ترتیب مربوط به اکوتیپ‌های بیرجند و قاین (۸۹ درصد) و بیرجند و گناباد (۸۹ درصد) محاسبه گردید. از طرفی، نتایج حاصل از میزان شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زعفران بر اساس نشانگر SSR نشان داد که کمترین شباهت بین اکوتیپ‌ها به ترتیب مربوط به اکوتیپ‌های مشهد و قاین (۶۵ درصد)، مشهد و تربت‌جام (۶۶ درصد) و مشهد و تربت‌حیدریه (۶۷ درصد) و بیشترین میزان

به ترتیب مربوط به اکوتیپ‌های تربت‌جام و قاین (۹۰ درصد) و تربت‌حیدریه و تربت‌جام (۸۸ درصد) محاسبه گردید. بابایی و همکاران (Babaei et al., 2014) در تحقیق خود نیز شباهت ژنتیکی بالایی بین اکوتیپ‌های زعفران گزارش کردند. هر چند که این محققین در تحقیق خود علت شباهت ژنتیکی پایین بین اکوتیپ‌های اصفهان و قاین را فاصله زیاد بین این شهرستان‌ها عنوان کردند. در مجموع، نتایج محاسبه شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زعفران بر اساس نشانگرهای SSR و iPBS نشان داد که اکوتیپ‌های مورد مطالعه شباهت بالایی از لحاظ این دو نشانگر با یکدیگر دارند که این موضوع می‌تواند به عقیم بودن گیاه زعفران و تکثیر غیرجنسی (از طریق بنه) مرتبط باشد (Fernandez and Bendersky, 2004; Negbi, 1999).

جدول ۵. مقادیر همسانی ژنتیکی اکوتیپ‌های زعفران (نشانگر iPBS زیر قطر و نشانگر SSR بالای قطر)

Table 5. Genetic similarity values of saffron ecotypes (iPBS marker under diameter and SSR marker above diameter)

اکوتیپ Ecotype	بیرجند Birjand	گناباد Gonabad	تربت‌حیدریه Torbat-e Heydarieh	قاین Qaen	تربت‌جام Torbat-e Jam	مشهد Mashhad
بیرجند Birjand	***	0.83	0.81	0.69	0.72	0.75
گناباد Gonabad	0.79	***	0.78	0.73	0.72	0.78
تربت‌حیدریه Torbat-e Heydarieh	0.82	0.79	***	0.88	0.88	0.67
قاین Qaen	0.89	0.85	0.88	***	0.90	0.65
تربت‌جام Torbat-e Jam	0.81	0.83	0.75	0.83	***	0.66
مشهد Mashhad	0.81	0.81	0.76	0.82	0.82	***

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه زعفران مهم‌ترین گیاه صادراتی ایران می‌باشد و از اهمیت دارویی و غذایی بسیار بالایی برخوردار است، لذا محققین زیادی در سرتاسر ایران و دنیا بر آن شدند تا تنوع بین اکوتیپ‌های زعفران را از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی مورد ارزیابی قرار دهند. در این مطالعه نیز برای اولین بار از نشانگرهای مولکولی SSR و iPBS بصورت توأم جهت ارزیابی

ذخایز ژنتیکی زعفران زراعی ایران استفاده شد. نتایج در مجموع نشان داد اگرچه اکوتیپ‌های زعفران از شباهت ژنتیکی بالایی برخوردارند و این امر نشان دهنده وجود جد مشترک و انتشار از یک منطقه جغرافیایی می‌باشد، ولی به دلیل تفاوت‌های اقلیمی و اکولوژیکی مناطق مختلف کاشت، جهش‌های خودبخودی و انتخاب‌های مصنوعی در طی سالیان سال تنوع ژنتیکی در این گیاه بوجود آمده و می‌توان از این

قدردانی

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 بالارزشی در طی انجام آزمایش داشته‌اند، به عمل آورد.

تنوع جهت انتخاب اکوتیپ‌های برتر استفاده نمود. با این حال، در تحقیق حاضر هر دو نشانگر مولکولی مورد استفاده اطلاعات مفیدی را در خصوص وجود تنوع در ذخایر ژنتیکی زعفران زراعی نشان دادند و از این بین نشانگر iPBS در مقایسه با نشانگر SSR کارایی بالاتری در ارزیابی و تعیین تنوع ژنتیکی زعفران داشت.

منابع

- Aalami, A., Safiyar, S., Abdollahi Mandoulakani, B., 2012. R-RAP: a retrotransposon-based DNA fingerprinting technique in plants. *Palnt Omics Journal*. 5(4), 359-364.
- Abdullaev, F., 2006. Biological properties and medicinal use of saffron (*Crocus sativus* L.). Proceedings of the 2nd International Symposium on Saffron Biology and Technology. Mashhad, Iran, 28-30 October, p. 339-345.
- Abdullaev, F.I., 2002. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Experimental Biology and Medicine*. 227, 20-25.
- Abolhasani, A., Bathaie, S.Z., Yavari, I., Moosavi-Movahedi, A.A., Ghaffari, M., 2005. Separation and purification of some components of Iranian saffron. *Asian Journal of Chemistry*. 17, 725-729.
- Agayev, Y.M.O., Fernandez, J.A., Zarifi, E., 2009. Clonal selection of saffron (*Crocus sativus* L.): the first optimistic experimental results. *Euphytica*. 169, 81-99.
- Ahmadi, A., Nazari Alam, J., 2015. Effects of biological and chemical fertilizers on quantity yield of saffron (*Crocus sativus* L.) in different planting densities. *Journal of Saffron Research*. 3(1): 51-63. [In Persian with English Summary]
- Alavi-Kia, S.S., Mohammadi, S.A., Aharizad, S., 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.
- Alipoor Miandehi, Z., Mahmoodi, S., Behdani, M.A., Sayyari, M.H., 2015. Effects of corm weight and application of fertilizer types on some growth characteristics and yield of saffron (*Crocus sativus* L.) under Mahvelat conditions. *Journal of Saffron Research*. 2(2): 97-112. [In Persian with English Summary]
- Alwala, S., Suman, A., Arro, J.A., Veremis, J.C., Kimbeng, C.A., 2006. Target region amplification (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop Science*. 46, 448-455.
- Babaei, S., Talebi, M., Bahar, M., Zeinali, H., 2014. Analysis of genetic diversity among saffron (*Crocus sativus* L.) accessions from different regions of Iran as revealed by SRAP markers. *Scientia Horticulturae*. 171, 27-31.
- Baraket, G., Chatti, K., Saddoud, O., Abdelkarim, A.B., Mars, M., Trifi, M., Hannachi, A.S., 2011. Comparative assessment of SSR and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of fig, *Ficus carica* L., genetic resources in Tunisia. *Plant Molecular Biology Report*. 29, 171-184.
- 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.
- Beiki, A.H., Keifi, F., Mozafari, J., 2010. Genetic differentiation of *Crocus* species by random amplified polymorphic DNA. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*. 18, 1-10.
- Budak, H., Shearman, R.C., Parmaksiz, I., Gaussoin, R.E., Riordan, T.P., Dweikat, I., 2004. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 108, 328-334.

- Castro, I., Martin, J.P., Ortiz, J.M., Pinto-Carnide, O., 2011. Varietal discrimination and genetic relationships of *Vitis vinifera* L., cultivars from two major controlled appellation (DOC) regions in Portugal. *Scientia Horticulture*. 127, 507-514.
- Erol, O., Kaya, H.B., Şik, L., Tuna, M., Can, L., 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., 2007. Genetic resources of saffron and allies (*Crocus* spp.). *Acta Horticulturae*. 739, 167-185.
- Fernandez, S.C., Bendersky, G., 2004. Therapy with saffron and the goddess at Thera. *Prospects of Biology and Medicine*. 47, 199-226.
- Grilli Caiola, M., Caputo, P., Zanier, R., 2004. RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. *Biologia Plantarum*. 48(3), 375-380.
- Gur-arie, R., Cohen, C.J., Eitan, Y., Shelef, L., Hallerman, E.M., Kashin, Y., 2000. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome Research*. 10, 62-71.
- He, Q., Li, X.W., Liang, G.L., Ji, K., Guo, Q.G., Yuan, W.M., Zhou, G.Z., Chen, K.S., Van de Weg, W.E., Gao, Z.S., 2011. Genetic diversity and identity of Chinese loquat cultivars, accessions (*Eriobotrya japonica*) using apple SSR markers. *Plant Molecular Biology Report*. 29, 197-208.
- Johnson, P.G., Kenworthy, K.E., Auld, D.L., Riordan, T.P., 2001. Distribution of buffalograss polyploid variation in the southern Great Plains. *Crop Science*. 41, 909-913.
- Kalendar, R., Antonius, K., Smýkal, P., Schulman, A.H., 2010. iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*. 121, 1419-1430.
- Keify, F., 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.
- Keneni, G., Bekele, E., Imtiaz, M., Dagne, K., Getu, E., Assefa, F., 2011. Genetic diversity and population structure of Ethiopian chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm accessions from different geographical origins as revealed. *Annual Applied Biology*. 159, 17-26.
- Khlestkina, E.K., Pestsova, E.G., Salina, E., Roder, M.S., Arbuzova, V.S., Koval, S.F., Borner, A., 2002. Genetic mapping and tagging of wheat genes using RAPD, STS and SSR markers. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 7, 795-802.
- King, T.L., Burek, T., 1999. Special issue on gene conservation: identification and management of genetic diversity. *Molecular Ecology*. 8, 51-53.
- Koocheki, A., Seyyedi, S.M., 2015. Phonological stages and formation of replacement corms of saffron (*Crocus sativus* L.) during growing period. *Journal of Saffron Research*. 3(2): 134-154. [In Persian with English Summary]
- Levent, S., Candan, F., Soya, S., Karamenderes, C., Kesercioglu, T., Tanyolac, B., 2008. Genetic Variation among *Crocus* L. Species from Western Turkey as Revealed by RAPD and ISSR Markers. *Journal of Applied Biological Sciences*. 2 (2), 73-78.
- Liu, K., Muse, S.V., 2005. Power Marker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*. 21, 2128-2129.
- Lou, Q., Chen, J., 2007. Ty1-copia retrotransposon-based SSAP marker development and its potential in the genetic study of cucurbits. *Genome*. 50, 802-810.
- Messmer, M.M., Melchinger, A.A., Boppenmair, J., Brunklaus-Jung, E., 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, S.A., Khodarahmi, M., Jamalirad, S., Jalal Kamali, M.R., 2009. Genetic diversity in a collection of old and new bread wheat cultivars from Iran as revealed by simple sequence repeat-based analysis. *Annual Applied Biology*, 154, 67-76.
- Namayandeh, A., Nemati, Z., Kamelmanesh, M.M., Mokhtari, M., Mardi, M., 2013. Genetic relationships among species of Iranian crocus (*Crocus* spp.). *Crop Breeding Journal*. 3(1), 61-67.
- Negbi, M., 1999. Saffron cultivation: past, present and future prospect. In: Negbi, M. (Ed.), *Saffron: Crocus sativus* L. Harwood Academic Publishers, Australia, pp. 1-18.

- Nekouei, N., Behdani, M.A., Khashei-Siuki, A., 2014. Predicting saffron yield from meteorological data using expert system, Razavi and South Khorasan Provinces. *Journal of Saffron Research*. 2(1): 15-33. [In Persian with English Summary]
- Ozkan, H., Kafkas, S., Ozer, MS., Brondolini, A., 2005. Genetic relationships among South-East Turkey wild barley populations and sampling strategies of *Hordeum spontaneum*. *Theoretical and Applied Genetics*. 112, 12-20.
- Queen, R.A., Gribbon, B.M., James, C., Jack, P., Falvell, A.J., 2004. Retrotransposon-based molecular marker for linkage and genetic diversity analysis in wheat. *Molecular Genetics and Genomics*. 271, 91-97.
- Roldan- Rozi, I., Van- Eeuwijk, F.A., Gilliland, T.J., 2001. A comparative study of molecular and morphological methods describing relationships between perennial ryegrass. (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 103, 1138-1150.
- Rubio-Moraga, A., Castillo-López, R., Gómez-Gómez, L., Ahrazem, O., 2009. Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. *BMC Research Notes*. 2, 1-5.
- Soufizadeh, S., Zand, E., Baghestani, M.A., Kashani, F.B., Nezamabadi, N., Sheibany, K., 2006. Integrated weed management in saffron (*Crocus sativus* L.). *Proceedings of the 2nd International Symposium on Saffron Biology and Technology*. Mashhad, Iran, 28-30 October, p. 133-137.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K., Graner, A., 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 106, 411-422.
- Xie, W., Zhang, X., Cai, H., Liu, W., Peng, Y., 2010. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) *Biochemical Systematics and Ecology*. 38, 740-749.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., 1999. POPGENE Version 1.31. University of Alberta and Tim Boyle, Center for International Research.
- Zand, A., Riahi, H., Shariatmadari, Z., Zangeneh, S., 2015. Effect of *Funneliformis mosseae* mycorrhiza symbiosis on growth and yield of *Crocus sativus* L. *Journal of Saffron Research*. 2(2): 141-151. [In Persian with English Summary]



Genetic Diversity of Saffron (*Crocus sativus* L.) using iPBS and SSR Molecular Markers

Mehdi Bayat^{1*}, Reza Amir Niya², Mehdi Taj Bakhsh³ and Bhatyn Tanyvlach⁴

1- PhD Graduated, Agronomy- Crop Ecology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

2- Associate 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: mahdibayat971@gmail.com

Received 8 September 2015; Accepted 7 January 2016

Abstract

In order to study the genetic diversity of saffron, six cropping ecotypes from different regions of Razavi Khorasan province (Mashhad, Torbat-e Jam, Gonabad and Torbat-e Heydrieh) and South Khorasan province (Qaen and Birjand) were collected and evaluated with two molecular marker systems, iPBS and SSR. The results of molecular analysis showed that 28 iPBS markers and 22 SSR markers were detected 179 and 44 polymorphic alleles, respectively. The numbers of amplified bands for each marker were 3-10 (average 6.4) and 1-3 (average 2), respectively. Also, the average of polymorphism information content (PIC) for SSR and iPBS markers were estimated 0.79 and 0.40, respectively. On the other hand, the results of molecular variance analysis showed that the variance within ecotypes was more than between ecotypes based on iPBS markers, while the variance between ecotypes was greater than within ecotypes based on SSR markers. Also, cluster analysis grouped saffron ecotypes in three clusters and this classification was approved by principal coordinate analysis (PcoA). However, ecotypes Gonabad and Birjand and ecotypes Torbat-e Heydarieh and Qaen had no significant differences with each other in respect to both cluster analyses. Also, high genetic similarities between all saffron ecotypes were reported. Overall, the results of the present study showed that although both markers were efficient to assess genetic diversity of saffron but the iPBS markers in comparison with the SSR markers were higher efficiency to determine the genetic diversity of studied saffron ecotypes.

Keywords: Cluster analysis, Ecotype, Polymorphism information content, Principal coordinate analysis.