زیست فناوری گیاهان دارویی
سال اول، شماره اول، بهار ۱۳۹٤

بررسی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک برخی گونه‌های جنس زعفران موجود در ایران با استفاده از نشانگر RAPD

هدی جعفری*[۱]، حمید نجفی زرینی[۲]، احمد رضا بلندی[۳] و هادی درزی رامندی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۰

چکیده

زعفران (*Crocus* spp.) از جمله گیاهان بومی ایران است که دارای خواص دارویی و ادویه‌ای متعدد می‌باشد و به لحاظ اقتصادی در ایران و جهان حائز اهمیت است. یکی از کاربردهای مهم تکنیک‌های مولکولی بررسی و برآورد سطح تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم‌ها و جمعیت‌ها، برای استفاده مطلوب از آن‌ها در به‌نژادی و مدیریت حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهان می‌باشد. به این منظور در تحقیق حاضر تنوع و ارتباط ژنتیکی ۲۵ نمونه از زعفران‌های زراعی و وحشی جمع آوری شده مناطق مختلف زعفران خیز ایران با استفاده از چند نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. این نمونه‌ها متعلق به گونه‌های *C. sativus*، *C. speciosus*، *C. cansellatuse*، *C. haussknechii* و *C. michelsonii* می‌باشد. یازده آغازگر RAPD ۹۰ نوار قابل امتیازدهی تولید کردند. میانگین چندشکلی به دست آمده برای نشانگر RAPD معادل ۷۸/۲۰ درصد محاسبه شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌ها معنی‌دار بود. بر اساس این تجزیه سهم تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها RAPD با استفاده از نشانگر RAPD، ۳۲ درصد برآورد گردید. توزیع مقادیر PIC بین ۰/۱۴۷ تا ۰/۴۲۱ با میانگین ۰/۳۲۴ متغیر بود. نتایج حاصل نشان داد که در بین و درون گونه‌های زعفران تنوع زیادی وجود دارد که می‌توان از آن در برنامه‌های به نژادی این گیاه با ارزش استفاده کرد.

واژگان کلیدی: تجزیه واریانس مولکولی، تنوع ژنتیکی، محتوای اطلاعات چندشکل

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساریhodijafari14@gmail.com
[۲] استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[۳] عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی طرق
[٤] دانشجوی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقدمه

جنس *Crocus* متعلق به زیر خانواده Crocoideae می‌باشد. این زیرخانواده از بزرگ‌ترین چهار زیرخانواده شناخته‌شده از خانواده Iridaceae می‌باشد . جنس *Crocus* بیش از ۸۰ گونه چندساله را شامل می‌شود که تا کنون ۹ گونه از این جنس در ایران گزارش شده است (ابریشمی، ۱۳۷۶) که از این میان ۳ گونه بهارگل (کیفی، ۱۳۸۶) و ۶ گونه دیگر پاییزگل هستند (صانعی، ۱۳۸۴). طبقه‌بندی اولیه جنس توسط بیکر (Baker, 1982) بر اساس درجه انشعاب کلاله و رنگ گل صورت گرفته است. ولی طبقه‌بندی که امروزه استفاده می‌شود بر پایه نظریه ماتیو (Mathew, 1982) استوار است. ماتیو بر اساس سه ویژگی که باعث تشخیص گونه‌های زعفران می‌شود مثل پوشش پیاز، انشعابات خامه و حضور یا غیاب پروفیل این جنس را طبقه‌بندی کرد. به جز گونه زراعی *Crocus sativus* که به دلیل تری‌پلوئید و عقیم بودن تنوع پایینی دارد سایر گونه‌های این جنس قدرت تولید بذر را دارند (Mathew, 1982) و انتظار می‌رود تنوع بالایی در گونه‌های وحشی این جنس در ایران وجود داشته باشد. تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگه‌داری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک بذر و اجرای برنامه‌های به‌نژادی می‌باشد (حبیبی، ۱۳۶۸). تنوع ژنتیکی را می‌توان در سطوح مختلف مشتمل بر جنس، گونه، جمعیت، فرد، ژنوم، مکان ژنی و توالی DNA بررسی کرد. علاوه بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، روش‌های دیگری همچون تغییرات کاریوتیپ، آیزوزایم‌ها و نشانگرهای مبتنی بر DNA در طبقه‌بندی گونه‌ها و در تعیین تنوع بین گونه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (Talbert et al., 1990). هر چند که روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات تا حدودی در اصلاح خصوصیات زراعی زعفران موفق بوده‌اند، ولی استفاده از ابزارهای جدید بیولوژیکی و مولکولی می‌تواند به منظور ارتقای کیفیت و کمّیت آن و تسریع در روند اصلاح مؤثر باشد (Fernandez, 2004).

مطالعه تنوع بین گونه‌های این جنس به منظور یافتن خویشاوندان دیپلوئید وحشی نزدیک به زعفران زراعی به روش های مختلف انجام یافته که در این میان مطالعات کاریوتیپ نشان داد گونه‌های *C. carttwrightianus* و *C. oreocreticus* با گونه *C. sativus* بسیار مطابق بودند، اما اختلافاتی نیز داشتند. البته گونه *C. hardriaticus* مشابهت کمتری با گونه *C. sativus* داشت. که این نتیجه‌گیری‌ها نیاز به تحقیق بیشتر دارد (Agayev et al., 2009). در پژوهش علوی‌کیا و همکاران (۲۰۰۸) برای تعیین روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی جنس *Crocus* در ایران، ۲۰ اکوتیپ و گونه جمع‌آوری شده از سراسر کشور با استفاده از نشانگرهای ISSR، IRAP و REMAP مورد ارزیابی قرار گرفت و با استفاده از داده‌های هر سه نوع نشانگر، تنوع بالایی در بین و درون گونه‌های وحشی را گزارش شد. در این مطالعه ۲۸ آغازگر رتروترانسپوزونی که بر اساس بخشLTR رتروترانسپوزون‌های ژنوم جو طراحی شده بودند استفاده شد. پانزده آغازگر با موفقیت به قطعات تکثیرشده از ژنوم زعفران اتصال یافت. در تحقیقی دیگر با استفاده از نشانگر RAPD سه گونه *C. hyemalis*، *C. sativus* و *C. vernus* با یکدیگر مقایسه شدند و نتایج درجه بالایی از تنوع درون و بین جمعیت را در جمعیت‌های وحشی *C. hyemalis* نشان داد و شباهت ژنتیکی نزدیک *C. hyemalis* با گونه زراعی*C. vernus* مشاهده شد. امکان داشتن زیر گونه‌ای جدید از جمعیت *C. hyemalis*، در آینده وجود دارد (Syouf et al,. 2008). برخلاف یافته‌های قبلی، نتایج مردی و همکاران (۲۰۰۹) تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های زعفران زراعی ایران وجود دارد و اکوتیپ‌های مناطق گلپایگان و قائن از سایر نمونه‌ها متفاوت می-باشند. این نتایج اولین گزارش از وجود تنوع ژنتیکی در زعفران زراعی با استفاده از

نشانگرهای ISSR می‌باشد. سیک (Sik et al., 2008) با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR روابط ژنتیکی ۵۶ نمونه جمعیتی متعلق غرب ترکیه را بررسی نمودند. نتایج نشان داد تنوع ژنتیکی بسیار بالایی در میان این نمونه‌ها مشاهده می‌شود که حاکی از این است که ترکیه می‌تواند یکی از مراکز اصلی برای جنس *Crocus* باشد.

روش‌های مبتنی بر واکنش های زنجیره ای پلیمراز (PCR) به دلیل سهولت، هزینه پایین سرعت و عدم نیاز به کاوشگرهای رادیواکتیو امروزه به طور گسترده ای در بررسی تنوع و فاصله ژنتیکی در بین ارقام مختلف گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال های اخیر از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR به عنوان ابزار قدرتمندی برای شناسایی چند شکلی، مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده شده است (Williams et al., 1990 & Sicard et al., 2005). استفاده از نشانگر RAPD یکی از گسترده‌ترین روش‌ها برای مطالعات تنوع ژنتیکی است (Gupta and Rustgi, 2004). کارلیر و همکاران (Carlierl et al., 2004) از این نوع نشانگر در بررسی نقشه‌های ژنتیکی استفاده کردند. نشانگر RAPD بر مبنای تکثیر قطعات تصادفی DNA ژنوم استوار بوده و نیازی به اطلاع دقیق از توالی DNA الگو ندارد .

شناسایی ژرم‌پلاسم زعفران و خویشاوندان آن و بررسی میزان خویشاوندی بین آن‌ها می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی و حفظ ذخایر ژنتیکی این گیاه ارزشمند مورد استفاده قرار گیرد. وجود و یا عدم وجود تنوع ژنتیکی در ارقام بومی و تجاری رایج زعفران کشور همواره یکی از سؤالات مهم محققین این زمینه بوده است. در این تحقیق سعی شده علاوه بر پاسخ به این سؤال مهم به بررسی و مطالعه روابط ژنتیکی در گونه‌های زراعی و غیر زراعی ایران برای شناسایی والدین مناسب جهت برنامه‌های اصلاحی و مطالعات ژنتیکی پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

مطالعه بر روی ۵ گونه از جنس *Crocus* شامل ۲۰ ژنوتیپ وحشی (*C. speciosus*، *C. cansellatuse*، *C. haussknechii* و *C. michelsonii*) به همراه ۵ ژنوتیپ زراعی (*C. sativus*) انجام شد. این نمونه‌ها از نقاط مختلف ایران جمع آوری شده مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی نگهداری می‌شد. نمونه‌برداری از برگ‌ها و بافت‌های جوان ژنوتیپ‌های زراعی در اواخر تابستان و اوایل پاییز و ژنوتیپ‌های وحشی در طول زمستان انجام شد. استخراج DNA از برگ‌ها و بافت‌های جوان طبق روش Doyle and Doyle (۱۹۸۷) صورت گرفت. نمونه‌های DNA استخراج شده جهت ارزیابی‌های دقیق کیفی و کمّی با ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفتند. نمونه‌های DNA تا غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. مراحل PCR شامل دمای آغازین ۹۴°C برای ۴ دقیقه و بعد از آن برای ۴۰ دور با دمای ۹۴°C (بمدت ۳۰ ثانیه) برای واسرشته سازی DNA ، ۳۶°C (بمدت ۱ دقیقه) برای اتصال آغازگر، ۷۲°C (بمدت ۲ دقیقه) و در نهایت ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

تجزیه خوشه‌ای برای تعیین تشابه بین ۲۵ ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه با الگوریتم UPGMA[1] مبتنی بر ضریب تشابه جاکارد[2] با استفاده از نرم افزار Xlstat انجام گرفت. برای تعیین همبستگی بین ماتریس‌های تشابه حاصل از تجزیه داده‌ها، با استفاده از بسته نرم‌افزاری NTSYS-pc نسخه 2.02 انجام شد. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) به منظور تفکیک واریانس مولکولی کل به واریانس ژنتیکی درون و بین گروه‌ها و محاسبه فاصله ژنتیکی نی (۲۵) بین جمعیت‌ها با نرم‌افزار GenAlEx نسخه 6.4 انجام

[1] Unweighted Paired Group Method UsingArithmetic Average
[2] Jaccard s Similarity Coefficient

گردید. برای تعیین قدرت تمایز نشانگرها در یک ژرم‌پلاسم ناشناخته، از پارامترهای میزان اطلاعات چندشکل PIC[1] و شاخص نشانگری MI[2] استفاده گردید. میزان اطلاعات چندشکل از فرمول PIC =∑[2 pi (1-pi)] برای نشانگرهای غالب که در آن‌ها رابطه آللی بین نوارها قابل دسترس نیست محاسبه شد.

نتایج و بحث

از هجده آغازگر RAPD مورد استفاده، ده آغازگر الگوی باندی واضح و چندشکل ایجاد کردند (جدول۳). همچنین یک آغازگر RAPD الگوی باندی واضح ولی مونومورف تولید نمود. توانایی آغازگرهای مختلف در آشکارسازی در بین ژنوتیپ‌های زعفران متغیر بود. از میان یازده آغازگر RAPD تعداد ۱۱۵ مکان ژنی تکثیر شد که از این تعداد ۹۰ مکان چندشکل (۷۸/۲۰ درصد) بودند که با آغازگر OPB_{12} بیشترین (۱۳ باند) و آغازگر OPM_{11} کمترین (۴ باند) تعداد مکان ژنی حاصل شد (جدول۳) در نتایج سیک (۲۰۰۸) بیشترین و کمترین باند رپید به ترتیب ۱۶ و ۶ و در نتایج کیفی (۱۳۸۶)، ۲۳ و ۱۱ باند است. آلل‌های حاصله توسط پرایمرهای مختلف از نظر وزن مولکولی در دامنه جفت باز۲۰۰۰-۵۰۰ جفت باز قرار گرفتند. نتایج گریلی و همکاران(Grilli Caiola et al., 2004) ، رنج آلل‌های مشاهده شده برای نمونه‌های *C. sativus* را ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز معرفی کرد. کیفی (۱۳۸۶) نیز در بررسی گونه زراعی و وحشی بومی ایران بیشترین آلل را در رنج ۶۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز مشاهده نمود.

مقایسه درصد چندشکلی و همچنین میانگین مکان‌های ژنی چندشکل به‌دست آمده به ازای هر آغازگر (۸/۳ درصد) بود. مقادیر محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای هر آغازگر، به همراه نوع آغازگرها، تعداد نوارهای چندشکل و شاخص نشانگری (MI) در جدول ۳ نشان داده شده است. تفاوت در تعداد نوارهای مشاهده شده می‌تواند به دلیل منشاء و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ‌های مورد استفاده و نیز ماهیت تفاوت در نشانگرهای مورد مطالعه باشد. توزیع مقادیر PIC برای نشانگرهای RAPD بین ۰/۱۴۷ تا ۰/۴۲۱ با میانگین ۰/۳۲۴ متغیر بود و نشان داد بیشترین و کمترین مقدار مربوط به آغازگرهای OPM_4و OPM_{16} به ترتیب می‌باشد. محاسبه شاخص نشانگر (MI) برای هر کدام از آغازگرهای مورد استفاده، نشان داد که بیشترین میزان شاخص نشانگر مربوط به آغازگر OPB_{12}و برابر با ۴/۳۰ و کمترین مقدار مربوط به آغازگر OPM_{20} و برابر با ۰/۹۸ بود. میانگین این شاخص برای آغازگرهای RAPD مورد استفاده در آنالیزها برابر ۲/۶۸ برآورد شد (جدول ۳). این شاخص بیانگر توانایی هر آغازگر در تولید نوار بیشتر است. تفاوت MI نسبت به PIC این است که در MI تعداد کل نوارها در نظر گرفته می‌شود ولی در PIC تعداد نوارهای چندشکل در نظر گرفته می‌شود. مقدار بالا PIC و MI برای آغازگر OPM_4 و OPB_{12} نشان دهنده کارایی بالا آن‌ها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در تحقیق بود که می‌تواند استفاده از این آغازگرها در تحقیقات مشابه پیشنهاد گردد.

گروه‌بندی ۲۵ ژنوتیپ مورد مطالعه با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA مبتنی بر ضرایب تشابه جاکارد انجام شد. دندروگرام حاصل از داده‌های RAPD ژنوتیپ‌های مورد آزمایش را به چهار گروه تقسیم بندی کرد. گروه اول شامل تمام ژنوتیپ متعلق به گونه *C. sativus* که نمونه‌های گناباد و قائن بیشترین شباهت و نمونه طُرق کمترین شباهت را به سایرین داشتند. گروه دوم شامل سه زیر شاخه اصلی که در زیر شاخه اول یک ژنوتیپ از *C. spesiosus* (Cps1) و ژنوتیپ‌های و ژنوتیپ‌های گونه *C. haussknechii* و ژنوتیپ (Cu0) قرار داشتند. در زیر شاخه دوم شش ژنوتیپ متعلق به گونه *C. cansellatuse* و ژنوتیپ دیگر *C. spesiosus* (Csp2) بود. همچنین در زیر شاخه سوم ژنوتیپ

[1] Polymorphic information content
[2] Marker index

متعلق به گونه *C. cansellatus* (Cca9) قرار داشت. گروه سوم سه ژنوتیپ متعلق به گونه *C. michelsoni* را در خود جای داد. گروه چهارم شامل دو ژنوتیپ متعلق به گونه *C. cansellatuse* (Cca11) و (Cca12) بود. با توجه به این که ژنوتیپ‌های داخل هر گونه باید شباهت بیشتری به هم داشته باشند قرار گرفتن ژنوتیپ‌های هر گونه در یک گروه طبیعی است ولی در مورد ژنوتیپ‌های متعلق به یک گونه که در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند می‌تواند حاکی از وجود تنوع بالا در این گونه‌ها باشد و در دندروگرام رسم شده ژنوتیپ‌های گونه *C. cansellatus* با فاصله از هم در دو گروه بودند که با توجه به وجود زیر گونه‌های متعدد از این گونه دور از انتظار نبوده است. با توجه به این که ژنوتیپ‌های داخل هر گونه باید شباهت بیشتری به هم داشته باشند قرار گرفتن ژنوتیپ‌های هر گونه در یک گروه طبیعی است ولی در مورد ژنوتیپ‌های متعلق به یک گونه که در گروه‌های متفاوت قرار گرفتند می‌تواند حاکی از وجود تنوع بالا در این گونه‌ها باشد و در دندروگرام رسم شده بر اساس نتایج RAPD (شکل ۲) ژنوتیپ‌های گونه *C. cansellatus* با فاصله از هم در دو گروه مشاهده شدند که با توجه به وجود زیر گونه‌های متعدد از این‌گونه دور از انتظار نبوده است. مشابه این نتیجه در پژوهش‌های کیفی ۱۳۸۶ و علوی‌کیا (Alavi-Kia et al., 2008) و نماینده ۲۰۱۳ مشاهده می‌شود (Namayandeh et al., 2013).

در مجموع سهم تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ۳۲ درصد می‌باشد (جدول ۴). در نتیجه می‌توان گفت گونه‌های مورد بررسی از نظر ژرم‌پلاسم دارای تنوع نسبتاً بالا با یکدیگر هستند و همچنین واریانس درون جمعیت‌ها ، ۶۸ درصد برآورد شد که از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد. با یک نگاه کلی به دندروگرام و نیز نتایج تجزیه واریانس مولکولی تنوع ژنتیکی در گونه های وحشی بیشتر از گونه زراعی است. نتایج بیکی (Beiki et al., 2010) و نیز نتایج سیک (Sik et al., 2008) که از آغازگرهای RAPD در بررسی تنوع گونه‌های زعفران بهره جستند نیز این موضوع را تأیید می‌کند و می‌تواند بیانگر توانایی این آغازگرها در بررسی تنوع باشد. همچنین کاربرد مطمئن‌تر روش های مولکولی برای تشخیص شباهت‌ها و تفاوت‌ها در مقایسه با بررسی صفات مورفولوژیک به دلیل عدم ثبات و تغییرپذیری در اثر عوامل طبیعی می‌توانند معیار مناسب‌تری باشند. نشانگرهای مولکولی ابزارهای مفید و قدرتمندی برای درک بهتر شباهت‌ها و تفاوت-های ژنتیکی هستند، چرا که تحت تأثیر محیط قرار نگرفته و در کل ژنوم پراکنده‌اند و می‌توانند تفاوت‌های افراد را در سطح توالی نوکلئوتیدی مشخص نمایند (Baradakci, 2001).

به طور کلی نتایج پژوهش حاصل نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در نمونه‌های زعفران موجود در ایران می‌باشد که با توجه به عقیم بودن و تکثیر رویشی زعفران زراعی می‌توان با استفاده از روش‌های مدرن اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی نسبت به انتقال صفات مفید از گونه‌های وحشی به گونه زراعی اقدام نمود. با توجه به اینکه جد واقعی این گونه زراعی یکی از معماهایی است که هنوز به طور دقیق حل نشده است و نیز از آنجا که ایران یکی از مراکز مهم پراکنش گیاهی به خصوص جنس *Crocus* می‌باشد، انجام مطالعات تکمیلی‌تر بر روی این گونه‌ها با استفاده از نشانگرهای اختصاصی به منظور دست یافتن به اطلاعات دقیق‌تر و کامل‌تر ضروری به نظر می‌رسد.

جدول ۱- مشخصات ۲۵ ژنوتیپ مختلف جنس *Crocus* و منشأ جغرافیایی آن‌ها

شماره	کد ژنوتیپی	گونه	سطوح پلوئیدی	منشأ جغرافیایی	تیپ
۱	*Csa1*	*C. sativus*	3X	خراسان رضوی-طُرق	زراعی
۲	*Csa2*	*C. sativus*	3X	خراسان رضوی-رشت‌خوار	زراعی
۳	*Csa3*	*C. sativus*	3X	خراسان رضوی-تربت حیدریه	زراعی
۴	*Csa4*	*C. sativus*	3X	خراسان جنوبی-گناباد	زراعی
۵	*Csa5*	*C. sativus*	3X	خراسان جنوبی-قائن	زراعی
۶	*Csp1*	*C. speciosus*	2X	گیلان- رودبار	خودرو
۷	*Csp2*	*C. speciosus*	2X	گیلان- دیلمان	خودرو
۸	*Cca1*	*C. cansellatuse*	2X	مرکزی- شازند	خودرو
۹	*Cca2*	*C. cansellatuse*	2X	مرکزی- شازند	خودرو
۱۰	*Cca3*	*C. cansellatuse*	2X	مرکزی- مُشک‌آباد	خودرو
۱۱	*Cca4*	*C. cansellatuse*	2X	مرکزی- خمین	خودرو
۱۲	*Cca5*	*C. cansellatuse*	2X	مرکزی- خمین	خودرو
۱۳	*Cca6*	*C. cansellatuse*	2X	همدان- اسدآباد	خودرو
۱۴	*Cca9*	*C. cansellatuse*	2X	کرمانشاه- بوژان	خودرو
۱۵	*Cu0*	*C. cansellatuse*	2X	مرکزی- ساوه	خودرو
۱۶	*Cca11*	*C. cansellatuse*	2X	کرمانشاه- کنگاور	خودرو
۱۷	*Cca12*	*C. cansellatuse*	2X	کرمانشاه-گیلان غرب	خودرو
۱۸	*Cmi1*	*C. michelsonii*	2X	خراسان شمالی- بهکده رضوی	خودرو
۱۹	*Cmi2*	*C. michelsonii*	2X	خراسان شمالی- گیفان	خودرو
۲۰	*Cmi3*	*C. michelsonii*	2X	خراسان شمالی- گیفان	خودرو
۲۱	*Cha2*	*C. haussknechii*	2X	همدان- اسدآباد	خودرو
۲۲	*Cha3*	*C. haussknechii*	2X	همدان- اسدآباد	خودرو
۲۳	*Cha4*	*C. haussknechii*	2X	همدان- نهاوند	خودرو
۲۴	*Cha5*	*C. haussknechii*	2X	همدان- اسدآباد	خودرو
۲۵	*Cu1*	*C. haussknechii*	2X	همدان- اسدآباد	خودرو

جدول ۲- کد و توالی آغازگرهای RAPD مورد استفاده در آزمایش (دمای تکثیر Annealing temperature برای تمام آغازگرها ۳۶°C در نظر گرفته شد)

شماره آغازگر	کد آغازگر	توالی آغازگر (۵′→۳′) توالی آغازگر
۱	OPM_2	ACAACGCCTC
۲	OPM_4	GGGGGTTGTC
۳	OPM_9	GTCTTCGCAC
۴	OPM_{10}	TCTGGCGCAC
۵	OPM_{14}	AGGGTCGTTC
۶	OPM_{16}	GTAACCAGCC
۷	OPM_{17}	TCAGTCCGGG
۸	OPM_{19}	TCTGTTCCCC

ادامه جدول ۲

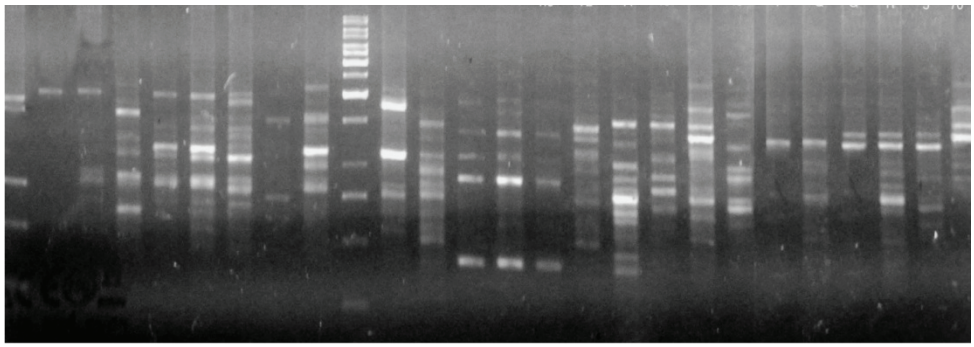
شماره آغازگر	کد آغازگر	توالی آغازگر (۵′→۳′) توالی آغازگر
۹	OPM_8	GGAGGGTGTT
۱۰	OPB_{12}	TTCCGACGCA
۱۱	A_9	GTCCACACGG
۱۲	OPA_9	GGGTAACGCC
۱۳	OPA_8	GTGACGTAGG
۱۴	A_8	GTCGCCGAC
۱۶	OPB_6	TGCTCTGCCC
۱۷	OPM_3	GGGGGATGAG
۱۸	OPM_{11}	GTCCACTGTG
۱۹	OPC_{11}	GACGGATCAG

جدول۳- تعداد مکان‌های چندشکل، درصد چندشکلی، میزان اطلاعات چندشکل (PIC) و شاخص نشانگری (MI) در بررسی تنوع ۲۵ ژنوتیپ زعفران با استفاده از نشانگرهای RAPD

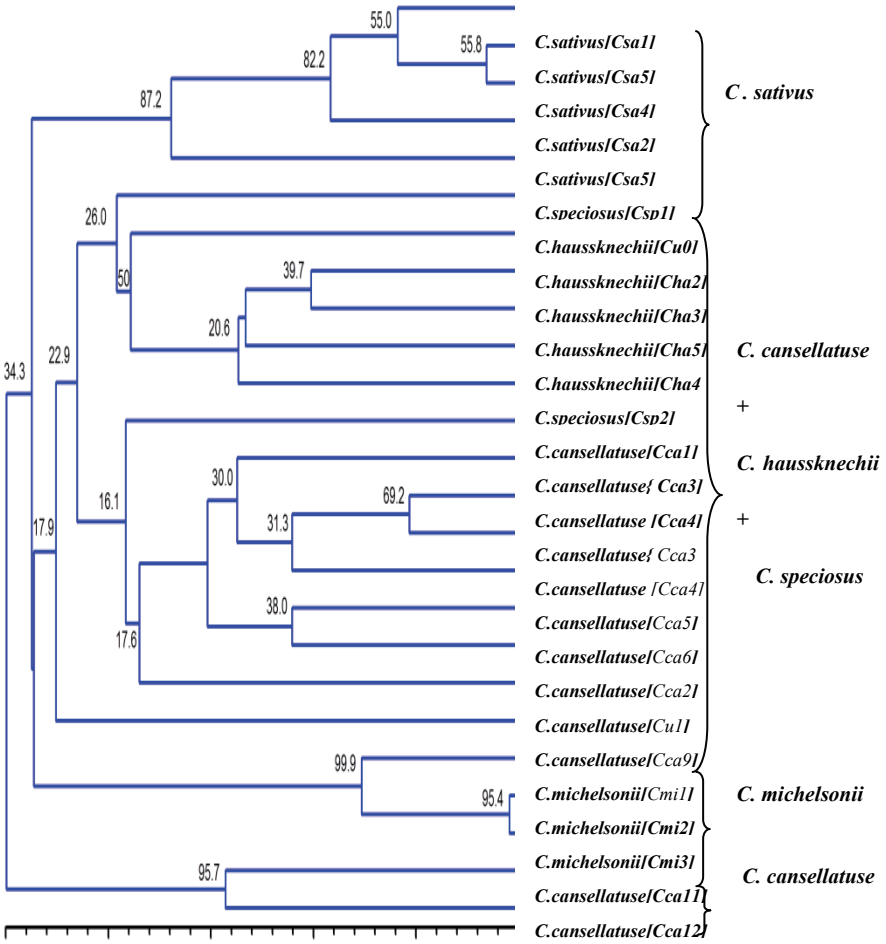
شماره آغازگر	کد آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چندشکل	درصد چندشکلی	میزان اطلاعات چندشکل(PIC)	شاخص نشانگری (MI)
۱	A_8	۸	۸	۱۰۰.۰	۰.۳۴۸	۲.۷۸
۲	OPA_8	۸	۷	۸۷.۵	۰.۳۷۲	۲.۶۰
۳	OPB_{12}	۱۳	۱۱	۸۴.۶	۰.۳۹۱	۴.۳۰
۴	OPM_2	۱۱	۱۰	۹۰.۹	۰.۳۲۷	۳.۲۷
۵	OPM_4	۹	۸	۸۸.۹	۰.۴۲۱	۳.۳۷
۶	OPM_{11}	۴	۴	۱۰۰.۰	۰.۳۹۲	۱.۵۷
۷	OPM_{14}	۱۲	۱۰	۸۳.۳	۰.۲۷۲	۲.۷۲
۸	OPM_{16}	۱۲	۱۰	۸۳.۳	۰.۱۴۷	۱.۴۷
۹	OPM_{17}	۱۰	۱۰	۱۰۰.۰	۰.۳۷۵	۳.۷۵
۱۰	OPM_{20}	۷	۵	۷۱.۴	۰.۱۹۷	۰.۹۸
مجموع		۹۴	۸۳	—	—	—
میانگین		۹.۴	۸.۳	۸۸.۳	۰.۳۲۴	۲.۶۸

جدول۴- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ژنوتیپ‌های زعفران براساس داده‌های حاصل از آغازگرRAPD

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات انحرافات (SSE)	برآورد واریانس	درصد تبیین واریانس
بین گروه‌ها	۴	۱۵۴.۵۳	۵.۱۵	۳۲
درون گروه‌ها	۲۰	۲۰۶.۸۳	۱۰.۸۹	۶۸
کل	۲۴	۳۶.۳۶	۱۶.۰۳	۱۰۰



شکل ۱-الگوی نواری DNA حاصل از تکثیر آغازگرهای RAPD خط کش مولکولی ۱ kb (نمونه ها موجود در شکل به ترتیب از سمت چپ شامل C.ca9، C.u0، C.ha3، C.ha5، C.ca6، C.ha4، C.u1، C.sp1، C.sp2، M(1kb)، C.ca1، C.mi2، C.ca2، C.mi3،C.mi1، C.ca12، C.ca3، C.ca4، C.ca5، C.ha2، C.sa3، C.sa5، C.C.sa4، C.sa2، C.sa1، C.ca11)



شکل ۲- دندروگرام ۲۵ ژنوتیپ زعفران به روش UPGMA و مبتنی بر ضریب تشابه جاکارد براساس آغازگر RAPD

منابع

ابریشمی، م. ج. (۱۳۷۶). زعفران ایران، شناخت تاریخی، فرهنگی و کشاورزی. انتشارات آستان قدس رضوی. مشهد

حبیبی، م. ب. و باقری، ع. ر. (۱۳۶۸). زراعت، فرایند، ترکیبات شیمیایی و استانداردهای آن. سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران مرکز خراسان

صانعی، م. (۱۳۸۴). بررسی سیتوژنتیک شش گونه از جنس *Crocus* در ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

کیفی، ف. (۱۳۸۶). بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های زعفران ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی SRAP و RAPD پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه زنجان

Agayev, Y. M., Zarifi, E. and Fernández, J. A. (2009). A study of karyotypes in the *Crocus sativus* L. aggregate and origin of cultivated saffron .ISHS Acta Horticulturae 850: III International Symposium on Saffron: Forthcoming Challenges in Cultivation, Research and Economics

AlaviKia, 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, 795-800

Baker, J. G. (1982). Handbook of Iridaceae. George Bell and Sons. London. 76- 95.

Baradakci, F. (2001). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.Turkish Journal of Biology 25: 185-196.

Beiki, A. H., Keifi, F. and Mozafari, J. (2010). Genetic Differentiation of *Crocus* Species by Random Amplified Polymorphic DNA. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, 18: 1-18.

Carlier, J. D., Reis, A., Duval, M. F., Conppens, G. and Leitao, J. M. (2004). Genetic maps of RAPD, AFLP, and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *Ananas comosus* using the pseudo-testcross strategy. Plant Breeding 123: 186–192.

Doyle, J. J. (1991). DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation. in: Hewitt GM, Johnston A (eds), molecular techniques in taxonomy. Springer, Berlin, pp. 283-293.

Fernandez, J. A. (2004). Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Plant Science. 2: 127- 159.

Grilli, Caiola, M., Caputo, P. and Zanier. R. (2004). RAPD analysis in *Crocus sativus* L. and related *Crocus* species. Biologia Planta Rum. 48: 375- 380.

Gupta, P. K., and Rustgi, S. (2004). A review, molecular markers from the transcribed expressed region of genome in higher plants. Functional Integrative Genomic 4: 139–162.

Mardi, M., Pirseiedi S. M. and Soheilivand, S. (2009). Study of Genetic Variation among *Crocus* L. ecotipe from Iran as Revealed by ISSR Markers. Agricultural Biotechnology Research Institute's annual report 1388, 116 pp. (In Persian).

Mathew, B. (1982). The Crocus. A revision of the genus *Crocus* (*Iridaceae*). B.T.Bastford Limited. London. UK. 224 pp.

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.

Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D. and Papa, R. (2005). Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. Plant Breeding 124 (5): 464–472.

Sik, L., Candan, F., Soya, S., Karamenderes, C., Kesercioglu, T. and 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.

Syouf, M. Q., Al-Gharaibeh, M., Shibli, R. A., Alali, F. Q. and Migdadi, H. (2008). Study of Genetic Diversity in *Crocus hyemalis* Boiss. and Blanche Using RAPD Techniques. Jordan Journal of Agricultural Sciences. 4:2 31-241.

Talbert, I. E., Doebley, I. F., Larson S. and V.I. Chandler. (1990). *Tripsacum andersonii* is a natural hybrid involving zea and tripsicum: molecular evidence. American Journal of Botany. 77: 722- 726.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalskiand, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18: 6531-6