دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی روابط فیلوژنتیکی برخی از گونه‌های جنس زعفران (*Crocus sp.*) براساس الگوی پروتئینی

هدی جعفری[1] و حمید نجفی زرینی[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: hodijafari14@gmail.com)
۲- استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۶

چکیده

زعفران از جمله گیاهان بومی ایران بوده که دارای خواص دارویی و ادویه‌ای متعدد می‌باشد و به لحاظ اقتصادی در ایران و جهان حائز اهمیت است. به منظور بررسی تنوع و روابط ژنتیکی، الگوی پروتئینی ۱۰ ژنوتیپ جنس زعفران شامل ۶ ژنوتیپ وحشی و ۴ ژنوتیپ زراعی با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای کورم روی ژل پلی‌آکریل‌آمید مورد بررسی قرار گرفت. دندروگرام و فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها مورد بررسی و محاسبه قرار گرفت. نتایج حاصل از الگوی پروتئینی ۱۰ ژنوتیپ منتخب زعفران، حضور ۲۵ باند پروتئینی را نشان داد که بیشترین تعداد باند (۱۹ باند) در ژنوتیپ منطقه رشتخوار مشاهده شد. دندروگرام حاصل نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به طور کلی در سه گروه قابل مطالعه هستند. ژنوتیپ های زراعی شامل مناطق رشتخوار، طرق، تربت، قائن و گناباد با فاصله ژنتیکی بیشتری از ژنوتیپ های وحشی در گروه متمایزی واقع شدند و دارای قرابت ژنتیکی بالایی (۹۴ درصد) با هم می‌باشند. همچنین مشاهده شد ژنوتیپ گونه *C. michelsonii* با ژنوتیپ‌های زراعی دارای کمترین شباهت (۱۵ درصد) نسبت به یکدیگر می‌باشند. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش تجزیه به مختصات اصلی، با نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای تا حدودی هم‌خوانی داشت. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده وجود پتانسیل بالای تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های زعفران مورد مطالعه می‌باشد. مشاهده الگوی باندی متفاوت ژنوتیپ‌های زراعی نشان داد که کلون‌های زعفران زراعی رایج در ایران همگی از یک کلون منشأ نگرفته‌اند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، زعفران، پروتئین‌های ذخیره‌ای، SDS-PAGE

مقدمه

جنس *Crocus sp.* بیش از ۸۰ گونه چندساله را شامل می‌شود که تا کنون ۹ گونه از این جنس در ایران گزارش شده است (۱) که از این میان سه گونه بهارگل (۱۱) و شش گونه دیگر پاییزگل هستند (۷). زعفران خوراکی با نام علمی (*Crocus sativus* L.) گرانبهاترین گیاه زراعی و مهم‌ترین گونه

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.2.0]

اقتصادی جنس *Crocus* محسوب می‌شود (۷).

بنه زعفران محل ذخیره پروتئین‌های لازم جهت نمو گیاه است. غلظت پروتئین‌های محلول بنه در طی نمو سریع جوانه، رو به کاهش گذاشته و در زمان گل‌دهی به حداقل می‌رسد. بعد از گل‌دهی به تدریج مواد اندوخته‌ای و پروتئین‌های فراوانی در آن ذخیره می‌شود که با انتقال به جوانه‌های محوری و جانبی در تشکیل بنه‌های دختری شرکت می‌نمایند. دوره فعالیت بنه از اوایل آبان تا اردیبهشت سال بعد است، با شروع فصل گرم برگ‌ها زرد و خشک می‌شوند ولی بنه‌ها سالم می‌مانند و به اصطلاح به خواب می‌روند. در این دوره غلظت پروتئین‌های محلول بافت بنه تغییر چندانی را نشان نمی‌دهد (۱۴).

تنوع در الگوی باندهای الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به روش SDS-PAGE در مطالعات تنوع ژنتیکی، روابط خویشاوندی و تکامل در گونه‌های مختلف گیاهی استفاده شده است (۸). تنوع ژنتیکی زعفران توسط محققان مختلفی در داخل و خارج با روش‌های مختلف مورفولوژیکی و مولکولی انجام گرفته که در این میان کمتر به استفاده از پروتئین برای بررسی تنوع پرداخته شده است. بیشترین پژوهش‌هایی که با روش SDS-PAGE روی زعفران انجام شده با هدف بررسی پروتئین خاصی در این گیاه بوده و کمتر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است. با توجه به اهمیت اقتصادی زعفران و همچنین تنوع ژنتیکی گسترده جنس *Crocus* در ایران ضرورت بررسی این تنوع و مقایسه میزان شباهت‌ها و تفاوت‌های گونه‌های مختلف این جنس با گونه *C. sativus* و همچنین ژنوتیپ‌های مختلف این گونه احساس می‌شود (۷). در تحقیقی که کوته و همکاران (۳) برای بررسی آنزیم مسیر بیوسنتزی کروسین، از عمده‌ترین کاروتنوئیدهای محلول در آب کلاله‌های زعفران است و تنها در این گیاه وجود دارد، صورت گرفت. روش SDS-PAG باند عمده ۲۶ کیلودالتونی را نشان داد. همچنین در پژوهشی که روی فاکتور پروتئینی با خواص متراکم‌کننده بر پلاکت انسانی که در بنه‌های *Crocus sativus*، واریته *Cartwrightianus* وجود دارد، انجام شد وزن مولکولی این پروتئین توسط روش SDS-PAGE، ۴۲۰۰۰ کیلودالتون برآورد شد (۵). استفاده از روش SDS-PAGE برای بررسی تنوع ژنتیکی زعفران‌های بومی ایران در سال ۲۰۰۳ توسط صبورا و همکاران (۱۳) انجام گرفته که براساس نتایج این تحقیق *Crocus pallssi* subsp *haussknechtii* (جوقاسم) نسبت به سایر گونه‌ها به زعفران زراعی نزدیکتر است و استفاده از این روش به منظور بررسی تنوع در این جنس را مفید دانست.

تاکنون نیز در گیاهانی مانند سیب‌زمینی از روش SDS-PAGE برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است (۴). بیشترین مطالعات مولکولی انجام شده تا کنون تنها در شناسایی اجداد *C. sativus* L. متمرکز بوده است. در مطالعات محدود فیلوژنتیکی انجام

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.2.0]

شده با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف تاکنون، در بین ژنوتیپ‌های گونه *C. sativus* هیچ تنوع ژنتیکی مشاهده نشده است (۶). علوی‌کیا و همکاران (۱) با استفاده نشانگرهای رتروترانسپوزون (IRAP) هتروژنی معنی‌داری را در درون و در میان گونه‌های جنس *Crocus* به جز در بین ژنوتیپ‌های گونه *C. sativus* گزارش کردند. بر خلاف یافته‌های قبلی، مردی و همکاران (۱۰) با استفاده از نشانگرهای ISSR تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های زعفران زراعی ایران را گزارش کردند و اکوتیپ‌های مناطق گلپایگان و قائن را از سایر نمونه‌ها متفاوت معرفی کردند. این نتایج اولین گزارش از وجود تنوع ژنتیکی در زعفران زراعی می‌باشد. مطابق همین نتایج، بِیکی و همکاران (۲) نیز با نشانگرهای RAPD در بین ژنوتیپ‌های زراعی تنوع را نشان داد. وجود 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 مطالعه سعی شده علاوه بر پاسخ به این سؤال مهم به بررسی و مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف زعفران از طریق الگوی پروتئینی و مقایسه این تنوع در بین ژنوتیپ‌های وحشی و زعفران زراعی، جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج پروتئین

بنه‌های ۱۰ ژنوتیپ از جنس زعفران (*Crocus* sp.) متعلق به چهار گونه مختلف این جنس موجود از بانک ژن مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی دریافت شد. نام و محل جمع‌آوری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- نام و محل جمع‌آوری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌های *Crocus* بومی ایران براساس نقوش پروتئینی

نام ژنوتیپ	محل جمع آوری	کد	نام ژنوتیپ	محل جمع آوری	کد
C. sativus	خراسان رضوی- طرق	*C.sa-Tq*	*C. michelsonii*	خراسان شمالی- گیفان	*C.mi*
C. sativus	خراسان رضوی- رشتخوار	*C.sa-R*	*C. speciosus*	گیلان- رودبار	*C.sp-Ru*
C. sativus	خراسان رضوی- تربت حیدریه	*C.sa-T*	*C. speciosus*	گیلان- رستم‌آباد	*C.sp-Ro*
C. sativus	خراسان جنوبی- گناباد	*C.sa-G*	*C. speciosus*	گیلان- دیلمان	*C.sp-D*
C. cansellatus	مرکزی - اراک	*C.ca-A*	*C. cansellatus*	مرکزی – مشک‌آباد	*C.ca-M*

ژنوتیپ‌های مزبور همگی بومی ایران بوده و با توجه به تعلق به گونه‌های مختلف، دارای تفاوت‌هایی از نظر زمان گل‌دهی، رنگ گل و شکل پوشش کورم بودند. جهت استخراج پروتئین از نمونه‌های منجمد بنه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، یک گرم از بافت به همراه پنج میلی‌لیتر بافر استخراج پروتئین (92 mM Tris base pH 8.1, 23 mM $CaCl_2$) حل و

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.2.0]

پس از تهیه سوسپانسیون، آن را با دور ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ نموده و از فاز رویی آن جهت استفاده گردید. روش SDS-PAGE پروتئین‌ها طبق روش لاملی (۹) انجام گرفت. در این روش از ژل بالا یا ژل متراکم‌کننده با غلظت ۳ درصد (Acrylamid 3%, Tris-HCL 0.15 M pH= 6.8 and 0.1% SDS) و ژل پایین یا ژل تفکیک‌کننده با غلظت ۱۲/۵٪ (Acrylamid 12%, Tris-HCL 0.9 M pH= 8.8 and 0.1% SDS) استفاده می‌شود. از هر نمونه به میزان ۸۰ میلی‌گرم پروتئین در چاهک بارگذاری شد. از تانک الکتروفورز عمودی (پدیده نوژن پارس، مدل VU-130D) و مولد جریان (بیوراد، مدل Power Pack Basic) استفاده شد. شدت جریان ۳۰ میلی‌آمپر اعمال شد (۱۵). باندهای پروتئینی با کوماسی‌بلو R-250 ۰/۲ درصد رنگ‌آمیزی شدند.

تجزیه داده‌ها

الگوهای نواربندی به صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) امتیازدهی شدند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA و با ضرایب تشابه جاکارد با نرم‌افزار آماری XLSTAT انجام شد. روش تجزیه به مختصات اصلی برای تفسیر ماتریس فاصله ژنتیکی جاکارد با نرم‌افزار NTSYS-pc Ver 2.02 انجام گرفت. در ادامه تعداد باندهای مشترک و غیرمشترک در سه سطح پروتئین‌های سبک، متوسط و سنگین شمارش شدند و درصد چند شکلی در هر کدام از این سطوح محاسبه گردید و مشخصات الکتروفوریتیکی تمامی باندهای مشاهده شده ثبت گردید.

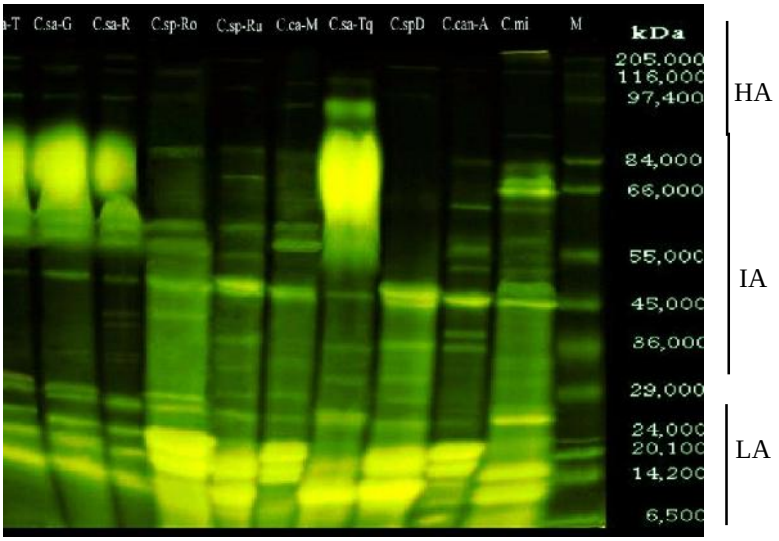
نتایج و بحث

با توجه به اطلاعات حاصل از امتیازدهی نوارهای پروتئینی، در مجموع از ۱۰ ژنوتیپ زعفران مورد بررسی، ۲۵ مکان یا نوار پروتئینی شناسایی شد (اشکال ۱ و ۲). نتایج حاصل از الکتروفورز ژنوتیپ‌ها، نشان داد که بیشترین تعداد باند (۱۹ باند) در گونه *C. sativus* از منطقه رشتخوار مشاهده گردید. باندهای پروتئینی ارقام مختلف در دامنه ۷ تا ۲۰۵ کیلودالتون مشاهده شد (شکل ۱). در این میان باندهای پروتئینی به سه گروه سبک، متوسط و سنگین تقسیم گردیدند. بیشترین تعداد باند در دامنه سنگین (۱۰ باند) و کمترین آن در دامنه سبک (۷ باند) قرار داشت. در ادامه، درصد چند شکلی در دامنه‌های فوق‌الذکر محاسبه گردید که بر این اساس دامنه سنگین (۱۰۰ درصد) به عنوان تأثیرگذارترین دامنه شناسایی شد. در این تحقیق، در میان نواحی سه‌گانه وزن پروتئینی، ناحیه متوسط دارای کمترین تنوع در الگوی مقطعی پروتئینی بود. بیشترین پروتئین در گونه زراعی *C. sativus* در ناحیه ۶۰۰۰۰ تا ۸۵۰۰۰ کیلودالتون بود، که این ناحیه شامل پروتئین‌های متوسط تا سنگین است. در حالی‌که این ناحیه برای سایر گونه‌ها و به ویژه در دو گونه *C. spesiosus* و *C. cansellatus* ناحیه تأثیرگذاری نبود. در این دو گونه بیشتر در حدود ناحیه ۶۵۰۰ تا ۲۵۰۰۰ کیلودالتون

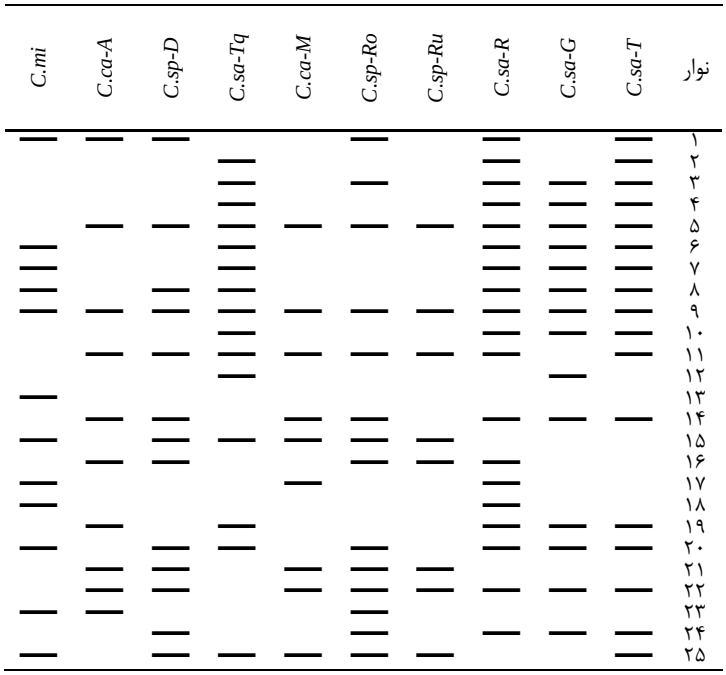
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.2.0]

کـه شـامل پـروتئین‌هـای سـبک اسـت باند مشـاهده شـد. نمونـه متعلـق بـه گونـه *C. michelsonii* کـه از لحـاظ فیزیولـوژی و مورفولوژیکی بـا سـایرنمونه‌هـا تفـاوت عمـده داشته و گونه‌ای بهارگل است، الگوی باننددهی متفـاوتی داشـت و بانـدهای پروتئینـی آن در محـدوده گسـترده‌ای پراکنـده بـود (اشکال ۱ و ۲).



شکل ۱- نقوش پروتئینی حاصل از الکتروفرز ۱۰ ژنوتیپ زعفران (HA: ناحیه پروتئین‌های با وزن مولکولی سنگین، IA: ناحیه پروتئین‌های با وزن مولکولی متوسط و LA: ناحیه پروتئین‌های با وزن مولکولی سبک).



شکل ۲- دیاگرام شماتیک باندهای مشاهده شده حاصل از الکتروفورز ژنوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.2.0]

براساس تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند که در آن گونه *C. michelsonii* به تنهایی در یک گروه مجزا قرار گرفت. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های گونه زراعی *C. sativus* و در گروه آخر ژنوتیپ‌های گونه *C. spesiosus* و *C. cansellatus* قرار داشتند (شکل ۳). از لحاظ فیزیولوژی نیز ژنوتیپ گونه *C. michelsonii* با سایر ژنوتیپ‌ها تفاوت عمده داشته و برخلاف سایر گونه‌های مورد آزمایش گونه بهارگل بوده در حالی‌که سه گونه دیگر پاییزگل هستند.

در گونه زراعی *C. sativus* تفاوت‌هایی در بین ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف زعفران‌خیز در استان خراسان مشاهده شد که از این میان ژنوتیپ‌های تربت حیدریه و رشتخوار بیشتر بهم شباهت داشتند و نمونه طرق شباهت کمتری به سایرین داشت. در بین ژنوتیپ‌های گونه *C. spesiosus* نیز دو ژنوتیپ رستم‌آباد و دیلمان نسبت به ژنوتیپ رودبار بیشتر مشابهت داشتند.

نتایج ماتریس تشابه با استفاده از ضریب جاکارد نیز بیشترین شباهت را میان ژنوتیپ‌های تربت‌حیدریه و رشتخوار متعلق به گونه زراعی *C. sativus* و نیز دو ژنوتیپ رستم‌آباد و دیلمان متعلق به گونه *C. spesiosus* با مقدار ۰/۸ مشخص کرد و بر همین اساس کمترین شباهت بین نمونه گونه *C. michelsonii* و نمونه اراک از گونه *C. cansellatus* به میزان ۰/۱۵ می‌باشد. براساس این ماتریس میانگین شباهت در بین ژنوتیپ‌های زراعی ۰/۸ محاسبه شد که نسبت به سایر گونه‌ها از مشابهت بیشتری برخوردار است (جدول ۲).

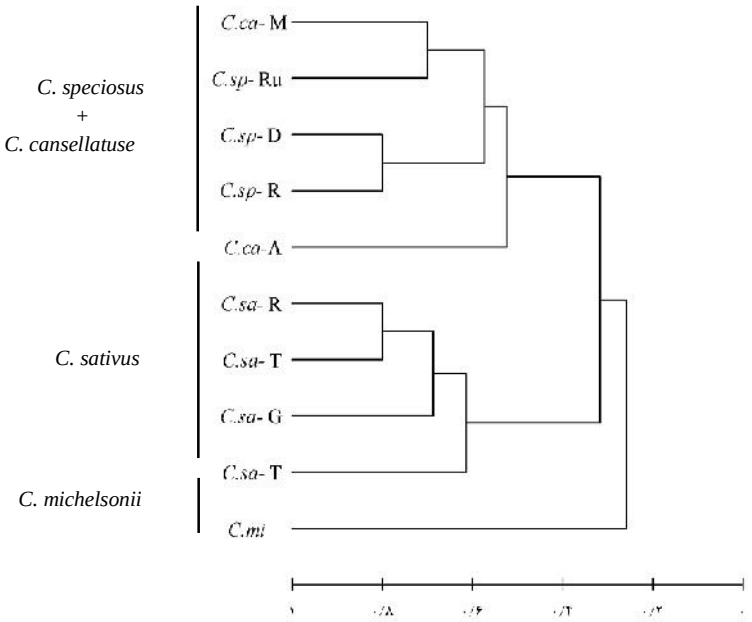
جدول ۲- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد ۱۰ ژنوتیپ منتخب گونه‌های *Crocus* از لحاظ قرابت ژنتیکی براساس الگوی پروتئینی

ژنوتیپ	*C.sa-T*	*C.sa-G*	*C.sa-R*	*C.sp-Ru*	*C.sp-Ro*	*C.ca-M*	*C.sa-Tq*	*C.sp-D*	*C.ca-A*	*C.mi*
C.sa-T	۱									
C.sa-G	۰/۷۲۲	۱								
C.sa-R	۰/۸۰۰	۰/۶۵۰	۱							
C.sp-Ru	۰/۲۵۰	۰/۱۵۸	۰/۲۲۷	۱						
C.sp-Ro	۰/۴۷۶	۰/۳۳۳	۰/۴۳۶	۰/۵۷۱	۱					
C.ca-M	۰/۳۰۰	۰/۲۱۱	۰/۲۷۳	۰/۷۰۰	۰/۵۳۳	۱				
C.sa-Tq	۰/۶۸۴	۰/۶۱۱	۰/۵۴۵	۰/۲۷۸	۰/۳۱۸	۰/۲۶۳	۱			
C.sp-D	۰/۵۰۰	۰/۳۵۰	۰/۴۵۵	۰/۶۱۵	۰/۸۰۰	۰/۵۷۱	۰/۳۳۳	۱		
C.ca-A	۰/۳۵۰	۰/۲۶۳	۰/۳۸۱	۰/۵۰۰	۰/۶۰۰	۰/۴۶۲	۰/۱۹۰	۰/۵۳۳	۱	
C.mi	۰/۳۰۴	۰/۲۲۷	۰/۳۳۳	۰/۱۶۷	۰/۲۸۶	۰/۲۲۲	۰/۳۳۳	۰/۳۰۰	۰/۱۵۰	۱

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.2.0]

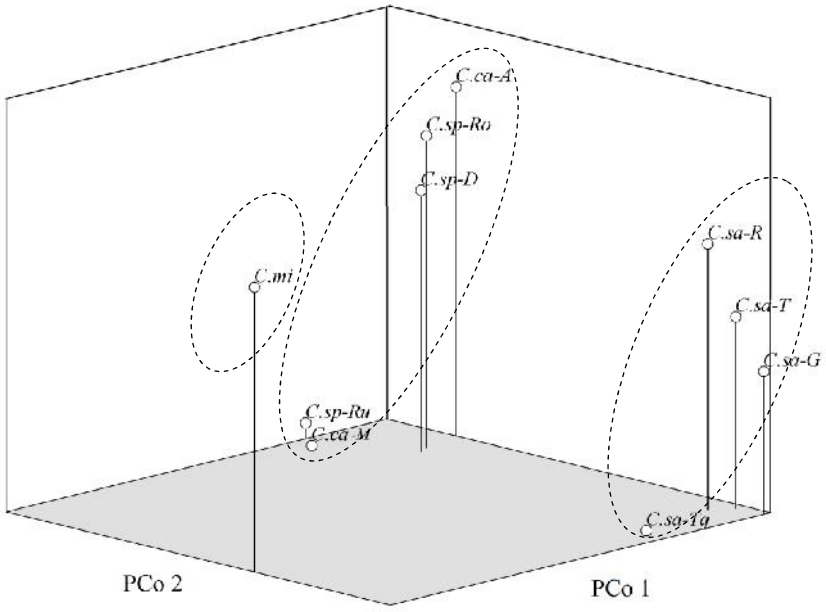
در تجزیه به مختصات اصلی بر اساس الگوی پروتئینی با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد، دو مؤلفه اول به ترتیب ۳۴/۰۶ و ۱۷/۳۱ درصد و در مجموع ۵۱/۳۷ درصد از کل واریانس را تبیین کردند (شکل ۴). در پلات سه‌بعدی با توجه اینکه تجمع ژنوتیپ‌ها در یک ناحیه نشان از تشابه ژنتیکی آنها دارد، همانند دندروگرام ژنوتیپ‌ها در سه ناحیه تجمع داشتند که ژنوتیپ‌های قرار گرفته در نواحی مختلف نیز مشابه نتایج دندروگرام بود. فاصله عمودی ژنوتیپ‌ها نسبت به هم روی پلات سه‌بعدی مشابه فاصله آنها روی خوشه‌های دندروگرام بود که همه این نتایج تصدیق‌کننده صحت دندروگرام رسم شده و نتایج حاصل از آن است (شکل ۳).



شکل ۳- دندروگرام به دست آمده برای ۱۰ ژنوتیپ منتخب گونه‌های *Crocus* با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA براساس داده‌های الکتروفورزی.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.2.0]



شکل ۴- نمودار سه بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) به روش ماتریس تشابه جاکارد برای ۱۰ ژنوتیپ با استفاده از چندشکلی در الگوی پروتئینی.

با توجه به این که ژنوتیپ‌های داخل هر گونه باید شباهت بیشتری بهم داشته باشند قرار گرفتن ژنوتیپ‌های هر گونه در یک گروه طبیعی است ولی در مورد گونه‌های *C. spesiosus* و *C. cansellatus* قرار گرفتن ژنوتیپ‌ها در گروه‌های متفاوت حاکی از وجود تنوع بالا در این گونه‌هاست و با توجه به وجود زیر گونه‌های متعدد در این دو گونه این امر طبیعی است (۱، ۲). می‌توان این احتمال را در نظر گرفت که ژنوتیپ‌های یک گونه که در دو گروه متمایز قرار گرفته‌اند در اثر قرار گرفتن و رشد در مناطق مختلف و تأثیر شرایط محیطی متفاوت روی آنها که منجر به طی مسیر تکاملی متفاوت شده است و به ایجاد تنوع در داخل این گونه‌ها گردیده است (۱۲).

از بین سه گونه وحشی هیچکدام شباهت قابل‌توجهی با گونه زراعی نشان ندادند و براساس ضریب جاکارد در ماتریس تشابه میانگین ضریب شباهت ۰/۳ بین گونه زراعی و گونه *C. spesiosus* نسبت به دو گونه دیگر بیشتر بود (جدول ۲). اما لزوم مقایسه سایر گونه‌های بومی ایران با گونه زراعی برای یافتن گونه‌ای که قرابت بیشتری داشته باشد، برای عملیات اصلاح زعفران احساس می‌شود. با وجود تنوع مشاهده شده در بین ژنوتیپ‌های گونه زراعی باز هم نمی‌توان با اطمینان تنوع موجود را تأیید کرد زیرا در هر آزمایشی امکان خطا در مراحل مختلف نمونه‌گیری، استخراج تا انجام آزمایش نهایی وجود دارد (۵). ولی نتایج این پژوهش می‌تواند با انجام پژوهش‌های مشابهی با

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.2.0]

نمونه‌هایی از سایر نواحی زعفران‌خیز ایران بین گونه‌های مورد آزمایش یا سایر گونه‌های دیگر این جنس با نمونه‌های متفاوت و نیز با نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی مقایسه و به نتیجه‌گیری صحیح دست یافت تا بتوان این جنس ارزشمند در کشورمان را بیشتر شناخته و از نتایج حاصل و مقایسه نتایج با هم در بهبود و اصلاح این جنس و بخصوص گونه زراعی استفاده شود (۶). اما نکته‌ای که در اینجا باید به آن اهمیت داد این است که پروتئین‌های محلول در غده در بین گونه‌ها باهم تفاوت آشکار داشته و از این تفاوت می‌توان در طبقه‌بندی این جنس بهره جست (۴). به طور کلی نتایج این تحقیق نشان دهنده وجود پتانسیل بالای تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های زعفران بومی ایران می‌باشد. همچنین آنالیز باندهی پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE کارآیی بالایی در تفکیک ژنوتیپ‌های مختلف از یکدیگر دارد. در نتیجه‌گیری نهایی از این تحقیق مشخص شد که استفاده از روش الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای در ارزیابی تنوع ژنتیکی در بخشی از ژرم‌پلاسم گونه‌های جنس *Crocus* می‌تواندگامی بسیار مهم و مؤثر در رسیدن به اهدافی نظیر ارزیابی، نگه‌داری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک بذر و اجرای برنامه‌های به نژادی باشد. پروتئین‌ها به عنوان محصولات مستقیم ژن‌ها، نشانگرهای مناسبی در بررسی تنوع ژنتیکی محسوب می‌شوند. چرا که این نشانگرها در مقایسه با نشانگرهای مورفولوژیک کمتر تحت‌تأثیر شرایط مختلف محیطی قرار گرفته و نسبت نشانگرهای مورفولوژیک به مراتب قابلیت و اعتبار بیشتری دارند (۱۲). به‌طور کلی نتایج این مطالعه نشان‌دهنده وجود پتانسیل بالای تنوع ژنتیکی در جنس *Crocus* مورد مطالعه می‌باشد. براساس این نتایج فواصل جغرافیایی گونه‌های وحشی مورد مطالعه از گونه زراعی کشور تا اندازه‌ای موجب تمایز بین گونه‌ها شد ولی این تمایز کامل نبود و هنوز وجوه مشترک زیادی در سطح مولکولی بین این گونه‌ها وجود دارد که حکایت از یک پیشینه ژنتیکی مشترک دارد.

منابع:

1. Alavi-Kia, S.S., S.A. Mohammadi, S. Aharizad and M. Moghaddam. 2008. Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in *crocus* genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 22(3): 795-800.
2. Beiki, A.H., F. Keifi and J. Mozafari. 2010. Genetic Differentiation of *Crocus* Species by Random Amplified Polymorphic DNA. Genetic Engineering and Biotechnology Journal, 18: 1-18.
3. Côté, F., F. Cormier, C. Dufresne and C. Willemot. 2001. A highly specific glucosyltransferase is involved in the synthesis of crocetin glucosylesters in *Crocus* sativus cultured cells. Journal of Plant Physiology, 158(8): 553-560.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.2.0]

4. Ebadi, E., A.R. Bolandi, H. Hamidi and J. Moaven. 2012. An evaluation of genetic diversity in cultivars of potato with SDS-PAGE of tuber storage protein. Journal of Horticultural Science. 26(2): 189-196. (In Persian).
5. Fernandez, J.A. 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Plant Science. 2: 127- 159.
6. Fluch, S., K. Hohl, M. Stierschneider, D. Kopecky and B. Kaar. 2009. *Crocus sativus* L-molecular evidence on its clonal origin. ISHS Acta Horticulturae 850: III International Symposium on Saffron: Forthcoming Challenges in Cultivation, Research and Economics. pp: 41-46.
7. Kafi, M. 2002. Saffron production and processing technologies. Publication Language and Literature. Mashhad. pp: 21-171. (In Persian)
8. Ladizinsky, G. and D. Hymowitz. 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. Theoretical and Applied Genetics, 54: 45-151.
9. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
10. Mardi, M., S.M. Pirseiedi and S. Soheilivand. 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)
11. Mazhari, N. 1998. Flora of Iran. Institute of Forest and Rangeland Research Publications, Tehran. Volume 31(Iridaceae). (In Persian)
12. Mirzaei Nadoshan, H., A. Shariat and F. Asadi Karam. 2001. Evaluation of genetic diversity in Haloxylon sp. population using electrophoresis. Forest Plant Genetic Research and Breeding, 7: 77-117. (In Persian)
13. Saboora, A., T. Rajabian, P. Abrishamchi and H. Ebrahimzadeh. 2003. Phenetic studies by SDS-PAGE and PAGE analysis of corm proteins in Iranian *Crocus* species and populations 1st international symposium on saffron Biology and Biotechnology October 22-25, Albacete, 51.
14. Saboora, O. 1994. Ontogeny and phylogeny preliminary studies of *Crocus sativus* and some genus in IRAN. MSc Thesis University of Tehran, 120. (In Persian)
15. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular coning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, chapter 13: 2344.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.2.0]

Evaluation of Phylogenetic Relationships of *Crocus* Species Using Protein Profiles

Hoda Jafari[1] and Hamid Najafi Zarini[2]

1- MSc Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: hodijafari14@gmail.com)
2- Assistance Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
Received: February 27, 2012 Accepted: March 16, 2013

Abstract

Saffron (*Crocus sativa* L.) is a native plant of Iran with various medical and food properties. It also has an important role in terms of economical issues in Iran. To determine the genetic relationship and polymorphism of *Crocus* species, protein patterns of 10 various saffron including 6 wild type and 4 cultivated genotypes were obtained using protein storage of corm by sodium dodysol solfate poly acril amid gel electrophoresis (SDS-PAGE). Dendrogram was plotted and genetic distance of ecotypes were calculated. The results of protein profile of 10 selected types have showed 25 protein bands with maximum in Roshtkhar ecotype. The results of dendrogram indicated that the ecotypes can be divided into 5 different groups. The crop ecotypes including Roshtkhar, Torogh, Estahban, Torbat, Gonabad and Ghaen showed more genetic distance from the wild ecotypes and were divided in a distinguished group with a higher genetic relationship (94%). There was a minimum similarity (15%) between ecotype of *C. michelsonii* and ecotype of Toroq among the ecotypes. The survey indicate high potential presence of genetic variation between Crocus species. Differences of observed banding pattern shows that saffron cultivate in Iran probably have not originated from a single clone.

Keywords: Polymorphism, Saffron, Storage Proteins, SDS-PAGE

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.2.0]