به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ۲ ■ شماره ۱ ■ بهار و تابستان ۱۳۹۳
صفحه‌های ۱۰۵-۱۱۸

مطالعهٔ ژنتیکی دو گونهٔ وحشی زعفران با استفاده از صفات مورفولوژی و نشانگر مولکولی RAPD

بیتا خوانساری‌نژاد[۱]، محمدرضا حسندخت*[۲]، و وحیده ناظری[۳]

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۲. دانشیار، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۳. دانشیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۲/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۳/۳۱

چکیده

در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ زعفران ایرانی از سه گونهٔ زعفران (*Crocus speciosus*، *Crocus cancellathus* و *Crocus sativus*) با استفاده از ۱۶ صفت مورفولوژی و نشانگر RAPD ارزیابی شد. در صفات تعداد برگ در بوته، طول گلبرگ، وزن گل، ارتفاع ساقهٔ گل‌دهنده و طول کلاله، گونهٔ زعفران زراعی (*C. sativus*) با گونهٔ *speciosus* متفاوت بود، ولی با گونهٔ *cancellatus* تفاوت معناداری نداشت. از نظر صفات تعداد پوشش بیرونی و وزن خشک کرم‌ها، گونهٔ زعفران زراعی با گونهٔ *cancellatus* متفاوت بود و با گونهٔ *speciosus* شباهت داشت. ۱۹ آغازگر تصادفی RAPD در انجام واکنش PCR بررسی شدند. درمجموع ۲۷۶ باند در کل نمونه‌ها تکثیر یافتند که از بین آن‌ها ۲۶۱ باند چندشکل بودند و ضریب کوفنتیکی r=۰/۹۶ به‌دست آمد. تجزیهٔ خوشه‌ای براساس نوارهای چندشکل و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA انجام گرفت و نمونه‌ها در حد تشابه ۰/۳۶ به چهار گروه مجزا تقسیم شدند. همچنین در این روش مانند صفات مورفولوژیک *C. speciosus* از دو گونهٔ دیگر جدا شد. زعفران زراعی در حد تشابه ۰/۲۸ به‌خوبی از دو گونهٔ *cancellatus* و *speciosus* جدا شد.

کلیدواژه‌ها: تنوع ژنتیکی، زعفران، RAPD، UPGMA.

* نویسنده مسئول
Email: mrhassan@ut.ac.ir

مقدمه

زعفران گیاهی دائمی، علفی و زینتی از تیرهٔ زنبقیان است و بنه[1] دارد که دوره‌ای را در زیر خاک به‌صورت رکود یا خواب می‌گذراند. از نظر گیاه‌شناسی زعفران گیاهی پیچیده است که قسمت‌های مهم آن ازجمله تخمدان در زیر خاک قرار دارد (۱). پراکنش در داخل این جنس محدود است و در گسترهٔ طول جغرافیایی ۱۰ درجهٔ غرب تا ۸۰ درجهٔ شرق و عرض جغرافیایی ۳۰ درجه تا ۵۰ درجهٔ شمالی در ناحیهٔ مدیترانه‌ای به سمت شرق مدیترانه که معروف به منطقهٔ ایرانو- تورانی است، وجود دارد (۱). این مناطق که جنس زعفران به‌خوبی با آن‌ها سازگار شده است، زمستان های سرد و بارش در بهار و پاییز و تابستان گرم و کم‌بارش دارند (۱۸). براساس زمان گلدهی، گونه‌های زعفران به سه گروه بهارگل، پاییزگل و زمستان‌گل تقسیم می‌شوند که گونه‌های *speciosus*، *cancellathus* و *sativus* مطالعه‌شده در این آزمایش پاییزگل هستند و برگ‌های پیشاگل و یا هماگل دارند (۱۴ و ۱۹). در ایران هشت گونه زعفران وحشی و یک گونهٔ زراعی گزارش شده است که برای شناسایی آن‌ها از انشعابات کلاله، پوشش کُرم و تعداد برگ استفاده می‌شود. در گونهٔ *C. cancellathus* پوشش کُرم بسیار مشبک و توری‌مانند و تعداد برگ‌ها سه تا چهار عدد، خامه زرد تا نارنجی، بلندتر یا مساوی پرچم‌ها است و به انشعاب‌های بسیار متعدد استوانه‌ای کلاله تقسیم می‌شود. در گونهٔ *C. speciosus* پوشش کُرم، چرمی با یک گردن قهوه‌ای رنگ و برگ‌ها به تعداد چهار و گاهی سه تا پنج عدد است. در این گونه، خامه بلندتر از پرچم‌ها و با انشعاب‌های باریک و بسیار متعدد زرد تا نارنجی تیره تقسیم می‌شود و در گونهٔ *C. sativus* پوشش کرم از نوع الیاف طولی موازی و به رنگ قهوه‌ای است، برگ‌ها شش تا نه عدد و خامه طویل و کشیده و زردرنگ است که در انتها به یک کلالهٔ سه شاخه‌ای قرمز تقسیم می‌شود (۵، ۹).

شناخت صحیح و دقیق از تنوع ژنتیکی هر گیاه و به‌خصوص گیاهان بومی هر منطقه، زمینه را برای کاربرد آن‌ها در به‌نژادی فراهم می‌کند. مهم‌ترین دلیل جمع‌آوری ژرم‌پلاسم یک گونه یا جمعیت خاص از یک منطقه، نجات ژرم‌پلاسم گیاهی از قرارگرفتن در معرض فرسایش ژنتیکی، حفظ و کاربرد آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی است (۱۱). تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی به تکامل و سیستم‌های به‌نژادگری، عوامل اکولوژی و جغرافیایی، گذشتهٔ گیاه و اغلب عوامل انسانی بستگی دارد و بخش عمده‌ای از تنوع گونه‌ای ممکن است در درون جمعیت‌های فردی یا بین جمعیت‌ها مختلف باشد (۱۳). نشانگرهای مورفولوژیکی، نوعی از نشانگرها هستند که از روی فنوتیپ ارزیابی می‌شوند و تحت‌تأثیر محیط‌اند. در سال‌های اخیر، کاربرد روش‌های ژنتیک مولکولی برای ارزیابی، حفاظت و استفاده از منابع ژنتیک گیاهی افزایش چشمگیری داشته است (۷، ۱۲).

پژوهش‌های محدودی به وسیلهٔ نشانگر RAPD بر روی جنس *Crocus* توسط برخی پژوهشگران انجام شده است. ۲۴ آغازگر RAPD در ۳۰ ژنوتیپ جنس کروکوس (۲۴ ژنوتیپ وحشی و شش کلون از گونهٔ زراعی زعفران) استفاده شد و درمجموع ۳۲۲ باند تولید شد که ۲۸۱ باند چندشکل بودند. میانگین درصد چندشکلی در آغازگرهای استفاده‌شده ۸۷/۳ درصد بود و در تجزیهٔ خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها به دو گروه اصلی تقسیم شدند. گروه اول شامل چهار ژنوتیپ مربوط به *C. cancellatus* بود و گروه دوم به دو زیرگروه تقسیم شد. زیرگروه دوم فقط شامل گونهٔ

1. Corm

C. caspius و زیرگروه اول شامل گونه‌های *speciosus*، *haussknechii* و زعفران زراعی بود. دو ژنوتیپ از ژنوتیپ‌های وحشی که گونهٔ آن‌ها شناسایی نشده بود و از استهبان و گلشن‌آباد استان فارس جمع‌آوری شده بودند، ۰/۳۲درصد با زعفران زراعی شباهت داشتند. براساس آنالیز خوشه‌ای، زعفران زراعی از گونه‌های وحشی زعفران جدا شد. بااین‌حال، این پژوهشگران معتقدند که گونهٔ زعفران زراعی از اجدادی مشتق شده است که بسیار شبیه به گونهٔ *speciosus* است (۶). در پژوهشی، برای بررسی تنوع ژنتیکی پنج ژنوتیپ زعفران زراعی (دو ژنوتیپ از ایتالیا، هلند، اسپانیا هر کدام یک ژنوتیپ) و شش گونهٔ جنس زعفران (*C. asumaniae* Mathew، *C. cartwrightianus*، *C. hadriaticus*، *C. oreocreticus*، *C. pallasii*، *C. thomasii*)، ۲۱ آغازگر RAPD استفاده شد. نتایج نشان داد درمجموع ۲۱۷ باند تولید شد و شش آغازگر هیچ باند چندشکلی تولید نکردند. از ۱۵ آغازگر باقی‌مانده، هر آغازگر بین یک تا هفت باند چندشکل تولید کردند که گونه‌های *cartwrightianus* و *thomasii* بیشترین شباهت‌های باندهای RAPD را با گونهٔ زعفران زراعی داشتند و به‌خصوص *cartwrightianus* که بیشترین شباهت را به زعفران زراعی داشت. گونهٔ *hadriaticus* خیلی از گونهٔ زراعی زعفران دور نبود، ولی به گونه‌های *oreocreticus*، *thomasii* شباهت داشت و گونه‌های *asumaniae* و *pallasii* متفاوت‌ترین الگوی RAPD را با زعفران زراعی نشان دادند و کایولا فرضیه‌ای را که براساس آن، گونهٔ *pallasii* به گونهٔ زعفران زراعی نزدیک است رد کرد و معتقد بود که گونهٔ *cartwrightianus* بیشترین شباهت را به گونهٔ زراعی دارد و بعد از آن گونهٔ *thomasii* به گونهٔ زعفران زراعی شبیه است (۸). ۴۴ ژنوتیپ زعفران زراعی که از کشورهای مختلف جمع‌آوری شده بود و یک ژنوتیپ از *C. kotschyanus*، توسط ۳۰ آغازگر RAPD آزمایش شد و هیچ باند چندشکلی مشاهده نشد (۱۶). پژوهشگران در مورد منشأ و محل پیدایش گونهٔ زراعی زعفران اتفاق نظر ندارند و برخی معتقدند *C. sativus* از گونهٔ *cartwrightianus* var.*albus* از یونان سرچشمه گرفته است. ابریشمی منشأ زعفران زراعی را دامنه‌های زاگرس می‌داند و معتقد است که رویشگاه طبیعی و اولیهٔ این گیاه نواحی کرمانشاه، همدان، تویسرکان، بروجرد و نهاوند تا نواحی اراک، قم، گلپایگان بوده است (۲).

باتوجه به اینکه اطلاعات کافی در مورد تنوع ژنتیکی دو گونهٔ *cancellatus* و *speciosus* و مقایسهٔ آن با زعفران زراعی موجود نبود، این پژوهش انجام شد. هدف پژوهش حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی این دو گونهٔ وحشی زعفران با گونهٔ زراعی زعفران با استفاده از صفات مورفولوژی و نشانگر مولکولی RAPD بود.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ نمونهٔ گیاهی

در سال ۱۳۹۰ ژنوتیپ‌های دو گونهٔ وحشی زعفران ایران براساس اطلاعات موجود در فلور ایرانیکا (۱۵) و فلور قهرمان (۴) شناسایی و این گیاهان از مناطق مختلف جمع‌آوری شدند و اطلاعات رویشگاهی ژنوتیپ‌های هر منطقه شامل ارتفاع از سطح دریا، عرض و طول جغرافیایی با استفاده از دستگاه GPS ثبت شد (جدول ۱). نمونه‌های برگی مربوط به این ژنوتیپ‌ها از رویشگاه‌های طبیعی آن ها از ۲۵ منطقهٔ جغرافیایی مختلف از چهار استان در فصل بهار (دههٔ اول فروردین تا هفتهٔ اول خرداد) جمع‌آوری شدند و نمونه‌های برگی برای آزمایش RAPD در بسته‌های ۰/۵ گرمی توزین و در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول۱. اسامی، منطقهٔ جمع‌آوری و اطلاعات رویشگاهی ژنوتیپ‌های زعفران وحشی (*C. cancellatus*، *C. speciosus*) و گونهٔ *sativus*

شماره	گونه	محل جمع‌آوری (استان- منطقه)	ارتفاع از سطح دریا (متر)	عرض جغرافیایی (درجه)	طول جغرافیایی (درجه)	شرایط آب و هوایی
۱	*C. speciosus*	سنقر- کرمانشاه	۱۷۱۴/۲	۳۴	۴۷	نیمه‌خشک و سرد
۲	*C. speciosus*	صحنه- کرمانشاه	۱۳۶۸/۹	۳۴	۴۷	مدیترانه‌ای و سرد
۳	*C. speciosus*	کنگاور- کرمانشاه	۱۴۳۷/۶	۳۴	۴۷	نیمه‌خشک و سرد
۴	*C. speciosus*	روان‌سر- کرمانشاه	۱۳۵۶/۳	۳۴	۴۶	مدیترانه‌ای و سرد
۵	*C. speciosus*	بی‌ستون- کرمانشاه	۱۴۶۰/۱	۳۴	۴۷	نیمه‌خشک و سرد
۶	*C. cancellathus*	دهلران- ایلام	۱۰۹۵	۳۲	۴۷	معتدل کوهستانی
۷	*C. cancellathus*	میمه- ایلام	۱۱۴۶/۹	۳۳	۴۶	معتدل کوهستانی
۸	*C. cancellathus*	مرغ- گلپایگان	۲۰۷۷/۸	۳۳	۵۰	کوهستانی و نیمه‌صحرایی
۹	*C. cancellathus*	وانشان- خوانسار	۱۹۰۶/۵	۳۳	۵۰	کوهستانی و نیمه‌صحرایی
۱۰	*C. cancellathus*	خانه‌میران- اراک	۱۹۲۷/۲	۳۴	۴۹	نیمه‌خشک و سرد
۱۱	*C. cancellathus*	شازند- مرکزی	۱۹۰۱/۷	۳۳	۴۹	نیمه‌مرطوب و سرد
۱۲	*C. cancellathus*	ساکی- شازند- مرکزی	۱۶۷۱/۳	۳۳	۵۰	نیمه‌مرطوب و سرد
۱۳	*C. cancellathus*	موچان- شازند- مرکزی	۱۶۹۵	۳۳	۵۰	نیمه‌مرطوب و سرد
۱۴	*C. cancellathus*	چشمه‌پهن- ایلام	۱۳۹۲	۳۳	۴۶	معتدل کوهستانی
۱۵	*C. cancellathus*	ورچه- خمین- مرکزی	۲۰۵۲/۶	۳۳	۵۰	نیمه‌خشک و سرد
۱۶	*C. cancellathus*	کرک- خمین- مرکزی	۱۷۸۰/۵	۳۳	۵۰	نیمه‌خشک و سرد
۱۷	*C. cancellathus*	کجرستان- خمین- مرکزی	۱۹۵۵/۷	۳۳	۵۰	نیمه‌خشک و سرد
۱۸	*C. cancellathus*	ازنا- خرم‌آباد	۱۹۲۹	۳۳	۴۹	معتدل و نیمه‌خشک
۱۹	*C. cancellathus*	خمین- مرکزی	۱۸۳۵	۳۳	۵۰	نیمه‌خشک و سرد
۲۰	*C. cancellathus*	آب‌باریک- شازند- مرکزی	۱۹۸۵/۴	۳۳	۴۹	نیمه‌مرطوب و سرد
۲۱	*C. cancellathus*	حسن‌آباد- شازند- مرکزی	۱۹۳۴/۷	۳۳	۴۹	نیمه‌مرطوب و سرد
۲۲	*C. cancellathus*	کودزر- مرکزی	۱۷۷۹	۳۳	۴۹	نیمه‌خشک و سرد
۲۳	*C. cancellathus*	تجمار- شازند- مرکزی	۱۹۷۴/۹	۳۳	۴۹	نیمه‌مرطوب و سرد
۲۴	*C. cancellathus*	خرم‌آباد- مرکزی	۱۸۳۹	۳۳	۴۹	نیمه‌مرطوب و سرد
۲۵	*C. sativus*	اراک	۱۷۹۰/۷	۳۴	۴۹	نیمه‌خشک و سرد

ارزیابی صفات مورفولوژی

۱۶ صفت مورفولوژی در این ژنوتیپ‌ها اندازه‌گیری شدند. برای ارزیابی خصوصیات برگی کل برگ‌های هر بوته (که بین ۴ تا ۱۴ عدد متغیر بود) و برای اندازه‌گیری خصوصیات گل و کُرم از هر ژنوتیپ ۱۰ نمونه کُرم و گل جمع‌آوری و میانگین آن‌ها برای محاسبات استفاده شد. برای اندازه‌گیری طول و عرض برگ‌ها و گلبرگ‌ها و طول ساقهٔ گل‌دهنده از خط‌کش استفاده شد. ضخامت برگ، گلبرگ و قطر کوچک و بزرگ کُرم‌ها و ضخامت جام گل با کولیس دیجیتال مدل (Mytoyo Japan) اندازه‌گیری شد. برای توزین گل و کرم‌ها از ترازوی دیجیتال (با حساسیت ۰/۰۱ ± گرم) استفاده شد.

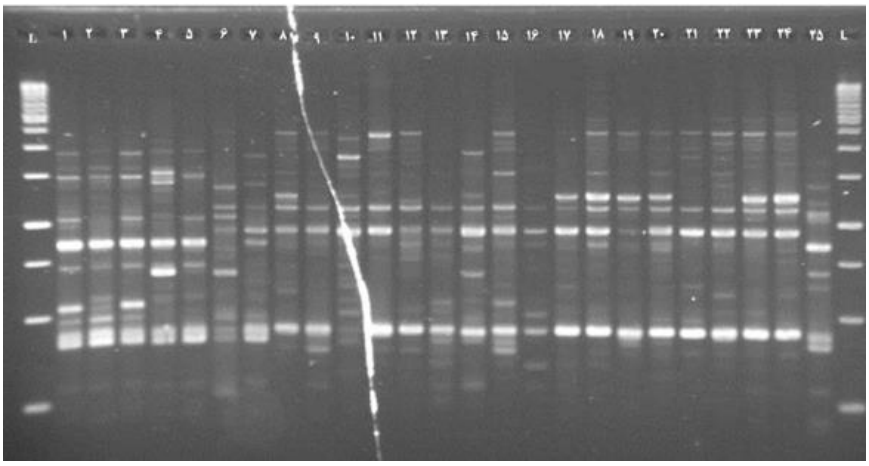
ارزیابی مولکولی

استخراج DNA به روش توصیه‌شده توسط شرکت Diversity Arrays Technology Pty Ltd (DArT P/L) صورت گرفت (۱۰). کمّیت و کیفیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ و الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد تعیین شد و به کمک آن‌ها غلظت یکسان از DNA نمونه‌ها (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر) آماده شد.

برای آزمایش RAPD، ۸۰ آغازگر از سری آغازگرهای تیب مول بیول انتخاب و ارزیابی شد و در نهایت ۱۹ آغازگر انتخاب شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر کیت پی‌سی‌آر (تهیه‌شده از شرکت سیناژن ایران)، دو میکرولیتر آغازگر (۱۰ میکرومول)، سه میکرولیتر DNA (۱۰ نانوگرم) و ۲/۵ میکرولیتر آب‌مقطر دو بار تقطیر انجام گرفت.

چرخهٔ دمایی شامل یک چرخهٔ ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت سه دقیقه، ۳۷ چرخه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۳۹/۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۵۰ ثانیه برای تکثیر قطعات و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio – Rad مدل i-cycler) انجام شد. به‌منظور بررسی قطعات حاصل، از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۴ درصد به مدت ۱۴۰ دقیقه با ولتاژ ۷۵ ولت استفاده شد.

رنگ‌آمیزی به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید انجام شد. قطعات DNA تکثیریافته تحت نور UV توسط ژل داک (Gel document, UVP, USA) مشاهده شد و درنهایت عکس‌برداری از ژل صورت گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. الگوی باندی حاصل از آغازگر BB20 پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و جداسازی آن در ژل آگارز ۱/۴درصد
شماره‌ها به‌ترتیب از چپ به راست، شمارهٔ ژنوتیپ‌ها براساس جدول۱ است.

تجزیهٔ صفات مورفولوژیکی با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخهٔ ۱۹) صورت گرفت. تجزیهٔ عامل‌ها با استفاده از تکنیک چرخش عامل‌ها[1] و به روش واریمکس[2] انجام شد و آنالیز کلاستر به روش وارد[3] و برحسب مجذور فواصل اقلیدسی صورت گرفت. در مورد نشانگر RAPD پس از اجرای آزمایش، برای بررسی مراحل چندشکلی بین نمونه‌ها به حضور یک نوار عدد یک و به عدم حضور آن عدد صفر داده شد. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک، ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc (Ver 2.02) و استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA محاسبه شد.

نتایج و بحث

ارزیابی صفات مورفولوژی

نتایج نشان داد که تعداد برگ در بوتهٔ زعفران زراعی با میانگین ۶/۰۴ سانتی‌متر در ژنوتیپ‌های مختلف از چهار سانتی‌متر در ژنوتیپ حسن‌آباد- شازند (مربوط به گونهٔ *cancellathus*) تا ۱۴ سانتی‌متر در ژنوتیپ بی‌ستون کرمانشاه (مربوط به گونهٔ *speciosus*) متغیر بود. میانگین طول کلاله در بین ژنوتیپ‌ها ۶/۶۱ سانتی‌متر به‌دست آمد و بیشترین مقدار مربوط به ژنوتیپ سنقر- کرمانشاه ۱۲/۰۱ (مربوط به گونهٔ *speciosus*) و کمترین مقدار مربوط به ورچه- خمین ۳/۰۴ سانتی‌متر (مربوط به گونهٔ *cancellathus*) بود. وزن تر کُرم‌ها از ۲/۱۱ گرم (چشمه‌پهن- ایلام مربوط به گونهٔ *cancellathus*) تا ۸/۸۷ گرم (بیستون- کرمانشاه مربوط به گونهٔ *speciosus*) متغیر بود. آمار توصیفی صفات نشان داد که بیشترین ضریب تغییرات مربوط به صفات طول گلبرگ، طول کلاله، ضخامت جام گل، وزن گل و وزن خشک کُرم بود.

جدول۲ آمار توصیفی صفات گونه‌های زعفران را به همراه میانگین صفات نشان می‌دهد.

تجزیه به عامل‌ها

در تجزیه به عامل‌ها چهار عامل اصلی و مستقل توانستند درمجموع ۷۹/۹۳درصد واریانس کل را توجیه کنند. میزان واریانس نسبی هر عامل نشان‌دهندهٔ اهمیت آن عامل در واریانس کل صفات بررسی شده است و به صورت درصد بیان شده است (جدول۳).

در عامل اول که ۴۰/۸۳درصد از واریانس کل را توجیه کرد صفاتی نظیر ارتفاع ساقهٔ گل‌دهنده، طول کلاله، وزن گل، طول گلبرگ، طول پرچم و تعداد برگ در بوته با ضرایب مثبت به‌ترتیب ۰/۹۷، ۰/۹۵، ۰/۹۳، ۰/۹۵، ۰/۷۹ و ۰/۸۰ بیشترین واریانس مربوط به این گروه را توجیه کردند. از آنجا که صفات فوق در یک عامل قرار داشته و همبستگی داشتند، یک صفت را که بیشترین مقادیر را دارد می‌توان به عنوان نمایندهٔ بقیه صفات در مطالعات بعدی در نظر گرفت.

در عامل دوم صفات قطر بزرگ کُرم، قطر کوچک کُرم، طول برگ با ضرایب مثبت به‌ترتیب ۰/۹۲، ۰/۹۲ و ۰/۷۶ قرار داشتند که ۱۹/۶۳درصد واریانس کل را توجیه کرد. این دو عامل جمعاً ۶۰/۴۷درصد از واریانس کل را توجیه کردند.

صفاتی که در عامل سوم بیشترین نقش را ایفا کردند، صفات مربوط به وزن تر کُرم و قطر بزرگ کُرم به ترتیب با ضرایب مثبت ۰/۶۲، ۰/۶۶ بودند که درمجموع ۱۰/۹۶ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. در عامل چهارم صفات ضخامت جام گل و ضخامت گلبرگ با ضرایب مثبت به‌ترتیب ۰/۷۷ و ۰/۶۴ بودند که درمجموع ۸/۴۹درصد از واریانس کل را توجیه کردند. تجزیه به عامل‌ها نشان داد که صفاتی نظیر طول برگ، تعداد برگ در بوته، وزن کُرم، قطر برگ و کوچک کُرم، وزن گل، ارتفاع ساقهٔ گل‌دهنده، طول گلبرگ و پرچم از صفات تأثیرگذار در بررسی تنوع این گونه‌ها محسوب می‌شوند.

1. Rotation factor
2. Varimax
3. Ward

جدول۲. صفات بررسی‌شده در گیاه زعفران، میزان تغییرات، میانگین و ضرایب تغییرات آن‌ها

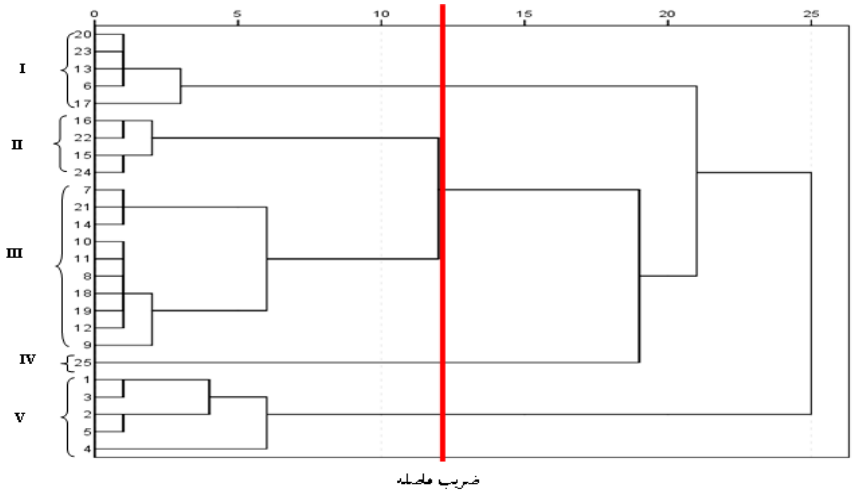
شماره	صفت	واحد اندازه‌گیری	حداقل	میانگین	حداکثر	ضریب تغییرات (٪)
۱	طول برگ	سانتی‌متر	۱۲/۵	۱۹/۰۶	۲۶/۳۳	۲۵/۳۲
۲	عرض برگ	میلی‌متر	۱/۸۰	۲/۱۴	۲/۷۳	۲۶/۳۲
۳	تعداد برگ در بوته	عدد	۴	۶/۰۴	۱۴	۴۷/۴۴
۴	ضخامت برگ	میلی‌متر	۰/۴۷	۰/۶۷	۵/۵	۱۹/۶۷
۵	وزن تر کُرم	گرم	۲/۱۱	۴/۷۸	۸/۸۷	۴۹/۴۸
۶	تعداد پوشش بیرونی کُرم	عدد	۳/۸	۶/۸۸	۱۱/۱	۳۹/۲۸
۷	قطر بزرگ کُرم	میلی‌متر	۱۵/۶۶	۲۱/۰۵	۲۸/۱۷	۲۰/۹۶
۸	قطر کوچک کُرم	میلی‌متر	۱/۸۳	۱۹/۳۵	۲۴/۴۶	۲۱/۷۱
۹	وزن خشک کُرم	گرم	۰/۸۷	۱/۹۱	۳/۹۷	۶۳/۵۱
۱۰	ضخامت گلبرگ	میلی‌متر	۰/۰۴	۰/۰۹	۰/۲۱	۴۱/۱۸
۱۱	طول گلبرگ	سانتی‌متر	۳/۴۱	۶/۱۹	۵/۷۲	۹۰/۴۸
۱۲	طول کلاله	سانتی‌متر	۳/۰۴	۶/۶۱	۱۲/۰۱	۷۸/۸۴
۱۳	طول پرچم‌ها	سانتی‌متر	۱/۵۷	۲/۴۹	۴/۰۲	۲۴/۶۳
۱۴	ضخامت جام گل	میلی‌متر	۱/۱۲	۲/۲۵	۲/۷۹	۶۰/۷۸
۱۵	وزن گل	گرم	۰/۱۶	۰/۴۹	۱/۱۶	۷۰/۰۷
۱۶	ارتفاع ساقهٔ گل‌دهنده	سانتی‌متر	۲/۱۶	۴/۶۷	۱۰/۱۲	۵۴/۱۶

تجزیهٔ خوشه‌ای

تجزیهٔ خوشه‌ای براساس صفات مهم مؤثر در چهار عامل اصلی انجام شد. در فاصلهٔ ۱۲ نمونه‌ها به پنج گروه اصلی تقسیم شدند (شکل۲). گروه اول شامل ژنوتیپ‌های گونهٔ *cancellatus*بود و ژنوتیپ‌های روستای موچان، کجرستان، آب‌باریک، تجمار و دهلران ایلام در آن قرار گرفتند که این ژنوتیپ‌ها تقریباً در یک عرض جغرافیایی قرار داشتند. در گروه دوم و سوم ژنوتیپ‌های گونهٔ *cancellatus* جای گرفتند. در زیرگروه دوم ژنوتیپ‌های مربوط به ورچه، کرک، کودزر، خرم‌آباد که مربوط به یک عرض جغرافیایی و شرایط آب و هوایی مشابه بودند، قرار گرفتند. در گروه سوم، بقیهٔ ژنوتیپ‌های مربوط به گونهٔ *cancellatus* مربوط به گلپایگان، روستای وانشان خوانسار و ژنوتیپ‌های مربوط به ازنا، خمین، اراک، ژنوتیپ‌های منطقه شازند و ایلام قرار گرفتند. گروه چهارم شامل گونه زعفران زراعی (*C. sativus*) بود که از دو گونهٔ دیگر جدا شد. زعفران اهلی در فاصلهٔ ۲۰ به گونهٔ *cancellatus* شباهت داشت، ولی از گونهٔ *speciosus* کاملاً جدا شد. گروه پنجم شامل ژنوتیپ‌های مربوط به *C. speciosus* بود. خصوصیات اصلی تفکیک نمونه‌ها در این گروه نسبت به گروه‌های دیگر در صفت‌های تعداد برگ در بوته، وزن گل، ارتفاع ساقهٔ گل‌دهنده بود که با بقیهٔ ژنوتیپ‌ها متفاوت بودند (جدول۴). شرایط آب و هوایی این ژنوتیپ‌ها با دیگر ژنوتیپ‌ها متفاوت بود.

جدول۳. نتایج تجزیه به عامل‌ها و مقادیر ضرایب عاملی اصلی مربوط به صفات مورفولوژی ژنوتیپ‌های دو گونهٔ زعفران وحشی و گونهٔ زعفران زراعی

	فاکتور	۱	۲	۳	۴
	مقادیر ویژه	۶/۵۳	۳/۱۴	۱/۷۵	۱/۳۵
	واریانس تجمعی (٪)	۴۰/۸۳	۶۰/۴۷	۷۱/۴۳	۷۹/۹۳
شماره	صفت				
۱	طول برگ	۰/۲۵۲	۰/۷۶۹	−۰/۲۸۵	−۰/۲۰۱
۲	عرض برگ	۰/۵۰۹	−۰/۱۴۱	۰/۰۲۵	−۰/۳۷۲
۳	تعداد برگ در بوته	۰/۸۰۹	۰/۳۷۲	۰/۰۲۴	۰/۱۹۶
۴	ضخامت برگ	۰/۲۴۷	−۰/۲۶۵	۰/۶۶۱	۰/۳۳۰
۵	وزن تر کُرم	۰/۲۳۳	۰/۶۵۹	۰/۶۲۳	۰/۰۴۳
۶	تعداد پوشش بیرونی کُرم	−۰/۶۶۱	۰/۰۳۹	۰/۴۸۸	−۰/۲۵۷
۷	قطر بزرگ کُرم	۰/۰۶۰	۰/۹۲۴	۰/۱۶۶	۰/۰۳۵
۸	قطر کوچک کُرم	۰/۰۹۲	۰/۹۲۳	۰/۰۸۲	−۰/۰۳۰
۹	وزن خشک کُرم	−۰/۳۰۲	۰/۲۵۸	۰/۸۱۱	−۰/۱۳۴
۱۰	ضخامت گلبرگ	۰/۴۸۴	−۰/۲۱۵	−۰/۰۳۰	۰/۶۴۶
۱۱	طول گلبرگ	۰/۹۵۵	۰/۱۶۶	۰/۰۱۱	−۰/۰۵۲
۱۲	طول کلاله	۰/۹۵۴	۰/۱۷۵	−۰/۰۱۵	۰/۰۲۶
۱۳	طول پرچم	۰/۷۹۲	۰/۱۲۵	−۰/۰۱۰	−۰/۳۵۷
۱۴	ضخامت جام گل	−۰/۲۶۷	۰/۰۰۷	۰/۰۵۶	۰/۷۷۴
۱۵	وزن گل	۰/۹۳۹	۰/۰۴۱	۰/۰۲۰	−۰/۰۵۳
۱۶	ارتفاع ساقهٔ گل‌دهنده	۰/۹۷۲	۰/۱۱۱	−۰/۰۷۰	۰/۰۰۴



شکل ۲. گروه‌بندی ۲۵ ژنوتیپ جنس زعفران (*C. sativus*، *C. speciosus* و *C. cancellathus*) براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی به روش وارد شمارهٔ ژنوتیپ‌ها براساس جدول۱ است.

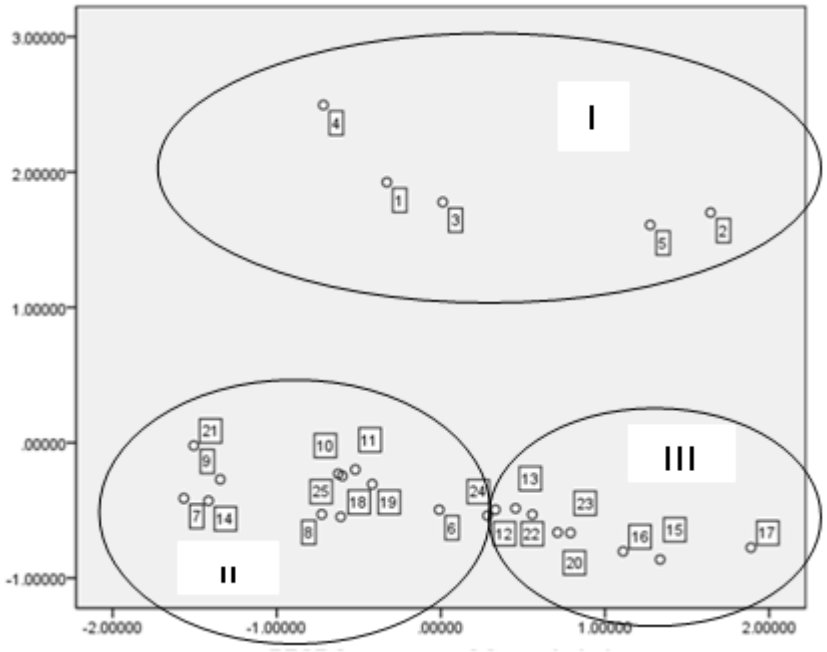
تجزیهٔ دوبعدی

براساس تجزیهٔ دوبعدی ژنوتیپ‌ها به سه گروه تقسیم شدند که با مشاهدهٔ تجزیهٔ دوبعدی می‌توان به فاصلهٔ بین ژنوتیپ‌های متعلق به *C. speciosus*، *C. cancellatus* و *C. sativus* پی برد (شکل۳). بیشترین صفات تأثیرگذار در عامل اول صفات گل و بیشترین صفات تأثیرگذار در عامل دوم صفات مربوط به قطر بزرگ و کوچک کُرم بودند. بنابراین، ژنوتیپ‌های *speciosus* و ژنوتیپ‌هایی که از لحاظ این صفات با یکدیگر متفاوت بودند، از یکدیگر جدا شدند و ژنوتیپ زعفران زراعی نیز با گونهٔ *cancellatus* در یک گروه قرار گرفتند.

نتایج نشانگر RAPD

از ۱۹ آغازگر استفاده‌شده در این آزمایش درمجموع ۲۷۶ باند به‌دست آمد که از بین آن‌ها ۱۵ باند یک‌شکل و ۲۶۱ باند در بین نمونه‌ها چندشکل بودند. تعداد باندهای تولید شده در بین هر آغازگر متفاوت بود، به‌طوری‌که آغازگر BE04 با تولید ۲۰ باند بیشترین و آغازگر BE17 با تولید هشت باند، کمترین باند را تولید کردند و میانگین درصد چندشکلی در آغازگرهای استفاده‌شده ۹۴/۲۶درصد به‌دست آمد که نشان از تنوع بالا بین ژنوتیپ‌های موجود در این مطالعه است (جدول۴).

بیشترین درصد چندشکلی (۱۰۰درصد) مربوط به آغازگرهای OPN06، BE15، BE14، BE04، BB12، BB07، BB04، BB03، BA09 و کمترین درصد چندشکلی (۷۸درصد) مربوط به آغازگر OPC09 بود. در بررسی قدرت تفکیک آغازگرها بیشترین مقدار مربوط به آغازگر BE04 به میزان (۱۳/۱۲) و کمترین قدرت تفکیک مربوط به آغازگر BE17 و به مقدار (۴/۳۲) بود. اندازهٔ باندها در تمام آغازگرها بین محدودهٔ ۲۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز تخمین زده شد.



شکل ۳. تجزیهٔ دوبعدی گروه‌بندی ۲۵ ژنوتیپ جنس زعفران (C. sativus، C. speciosus و C. cancellathus) **مطالعه‌شده با استفاده دو عامل اصلی شمارهٔ ژنوتیپ‌ها براساس جدول۱ است.**

در پژوهشی ۳۰ ژنوتیپ جنس کروکوس (۲۴ ژنوتیپ وحشی و شش کلون از گونهٔ زراعی زعفران) توسط ۲۴ نشانگر RAPD استفاده شد و نتایج آن‌ها نشان داد درمجموع ۳۲۲ باند تولید شد که ۲۸۱ باند چندشکل بودند و میانگین درصد چندشکلی در آغازگرهای استفاده‌شده ۸۷/۳درصد بود (۶).

در پژوهشی دیگر، پژوهشگران ۲۱ آغازگر RAPD را برای بررسی تنوع ژنتیکی پنج ژنوتیپ زعفران زراعی (دو ژنوتیپ از ایتالیا، هلند، اسپانیا هر کدام یک ژنوتیپ) و شش گونه جنس زعفران (*C. asumaniae* Mathew، *C. cartwrightianus*، *C. hadriaticus*، *C. oreocreticus*، *C. pallasii*، *C. thomasii*) استفاده کردند که درمجموع ۲۱۷ باند تولید شد. از ۲۱ آغازگر استفاده‌شده، شش آغازگر هیچ باند چندشکلی تولید نکردند و از ۱۵ آغازگر باقی‌مانده، هر آغازگر بین یک تا هفت باند چندشکل تولید کردند (۸).

جدول۴. نتایج آغازگرهای RAPD استفاده‌شده در این آزمایش

شماره	آغازگر	توالی آغازگرها	تعداد قطعات تکثیرشده	تعداد قطعات چندشکل	درصد چندشکلی	قدرت تفکیک آغازگرها
۱	BA 02	5 ′TGCTCGGCTC 3′	۱۱	۱۰	۹۰	۷/۲
۲	BA 04	5 ′TCCTAGGCTC 3′	۱۷	۱۵	۸۸	۹/۰۴
۳	BA 09	5′ GGAACTCCAC 3′	۱۴	۱۴	۱۰۰	۸/۸۴
۴	BA 20	5′ GAGCGCTACC 3′	۱۶	۱۵	۹۳	۵/۷۶
۵	BB 03	5′ TCACGTGGCT 3′	۱۲	۱۲	۱۰۰	۷/۲۸
۶	BB 04	5′ ACCAGGTCAC 3′	۱۰	۱۰	۱۰۰	۶/۶۴
۷	BB 07	5 ′GAAGGCTGGG 3′	۱۱	۱۱	۱۰۰	۵/۷۶
۸	BB 12	5′ TTCGGCCGAC 3′	۱۳	۱۳	۱۰۰	۷/۸۴
۹	BB 19	5′ TTGCGGACAG 3′	۱۵	۱۴	۹۳	۵/۸۴
۱۰	BB 20	5′ CCAGGTGTAG 3′	۱۸	۱۷	۹۴	۹/۷۶
۱۱	BE 04	5′CCCAAGCGAA 3′	۲۰	۲۰	۱۰۰	۱۳/۱۲
۱۲	BE 14	5′ CTTTGCGCAC 3′	۱۵	۱۵	۱۰۰	۸/۴
۱۳	BE 15	5′ TTCGGCGATG 3′	۱۸	۱۸	۱۰۰	۱۱/۴۴
۱۴	BE 17	5′ GGGAAAAGCC 3′	۸	۷	۸۷	۴/۳۲
۱۵	OPC 09	5′ CTCACCGTCC 3′	۱۴	۱۱	۷۸	۶/۸۸
۱۶	OPC 19	5′ GTTGCCAGCC 3′	۱۹	۱۶	۸۴	۱۰/۴۸
۱۷	OPN 06	5′ GAGACGCACA 3′	۱۴	۱۴	۱۰۰	۹/۴۴
۱۸	OPK 10	5′ GTGCAACGTG3′	۱۳	۱۱	۸۴	۶/۴
۱۹	OPC05	5 ′GATGACCGCC 3′	۱۸	۱۸	۱۰۰	۱۰/۶۴
مقدار کل	-		۲۷۶	۲۶۱	-	-
میانگین	-		۱۴/۵۲	۱۳/۷۳	۹۴/۲۶	۸/۱۶

جدول۵. تشابه ژنتیکی جاکارد بین ۲۵ نمونه ژنوتیپ‌های دو گونهٔ وحشی زعفران و زعفران زراعی براساس داده‌های حاصل از نشانگر RAPD

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵
۱	۱/۰۰																								
۲	۰/۵۳	۱/۰۰																							
۳	۰/۷۶	۰/۵۶	۱/۰۰																						
۴	۰/۵۶	۰/۵۹	۰/۶۳	۱/۰۰																					
۵	۰/۵۷	۰/۵۳	۰/۶۲	۰/۶۴	۱/۰۰																				
۶	۰/۲۰	۰/۲۳	۰/۱۸	۰/۲۱	۰/۲۲	۱/۰۰																			
۷	۰/۲۷	۰/۲۶	۰/۲۹	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۴۵	۱/۰۰																		
۸	۰/۲۷	۰/۳۰	۰/۳۲	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۳۲	۰/۳۷	۱/۰۰																	
۹	۰/۲۲	۰/۲۸	۰/۲۶	۰/۲۵	۰/۲۳	۰/۳۰	۰/۳۶	۰/۶۲	۱/۰۰																
۱۰	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۲۴	۰/۲۵	۰/۳۸	۰/۶۱	۰/۴۳	۰/۳۹	۱/۰۰															
۱۱	۰/۲۸	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۲۹	۰/۳۱	۰/۳۲	۰/۳۸	۰/۵۷	۰/۴۹	۰/۳۹	۱/۰۰														
۱۲	۰/۲۵	۰/۲۹	۰/۲۹	۰/۲۷	۰/۲۸	۰/۳۴	۰/۳۷	۰/۵۸	۰/۵۱	۰/۴۱	۰/۵۵	۱/۰۰													
۱۳	۰/۲۶	۰/۲۹	۰/۲۶	۰/۲۷	۰/۲۵	۰/۳۶	۰/۳۸	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۳۴	۰/۴۲	۰/۵۳	۱/۰۰												
۱۴	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۶	۰/۲۵	۰/۳۰	۰/۴۱	۰/۴۴	۰/۳۶	۰/۲۹	۴۰	۰/۳۹	۰/۳۷	۰/۳۷	۱/۰۰											
۱۵	۰/۲۷	۰/۳۱	۰/۳۰	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۳۴	۰/۳۹	۰/۵۲	۰/۴۹	۰/۴۰	۰/۵۴	۰/۵۵	۰/۴۶	۰/۴۰	۱/۰۰										
۱۶	۰/۳۰	۰/۳۵	۰/۲۹	۰/۳۰	۰/۲۸	۰/۳۵	۰/۳۹	۰/۵۰	۰/۴۵	۰/۴۰	۰/۴۹	۰/۵۴	۰/۶۰	۰/۳۹	۰/۵۸	۱/۰۰									
۱۷	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۲۷	۰/۲۹	۰/۲۷	۰/۳۳	۰/۳۴	۰/۴۵	۰/۴۳	۰/۳۴	۰/۴۷	۰/۴۸	۰/۴۹	۰/۳۹	۰/۵۷	۰/۶۳	۱/۰۰								
۱۸	۰/۲۵	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۲۸	۰/۲۳	۰/۲۹	۰/۳۳	۰/۴۹	۰/۴۳	۰/۳۷	۰/۴۸	۰/۵۲	۰/۴۴	۰/۳۵	۰/۵۲	۰/۵۳	۰/۵۷	۱/۰۰							
۱۹	۰/۲۹	۰/۳۴	۰/۳۲	۰/۳۳	۰/۳۰	۰/۳۲	۰/۳۷	۰/۴۷	۰/۴۷	۰/۴۰	۰/۴۷	۰/۵۴	۰/۴۹	۰/۴۲	۰/۵۳	۰/۵۷	۰/۵۲	۰/۵۷	۱/۰۰						
۲۰	۰/۲۸	۰/۳۰	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۴	۰/۳۰	۰/۳۷	۰/۴۶	۰/۴۳	۰/۴۰	۰/۴۶	۰/۵۳	۰/۵۰	۰/۳۵	۰/۵۳	۰/۵۸	۰/۵۴	۰/۵۹	۰/۵۴	۱/۰۰					
۲۱	۰/۳۰	۰/۳۳	۰/۳۱	۰/۳۲	۰/۳۰	۰/۲۹	۰/۳۶	۰/۴۸	۰/۴۵	۰/۴۰	۰/۴۴	۰/۵۳	۰/۴۷	۰/۳۱	۰/۵۱	۰/۵۸	۰/۵۴	۰/۵۲	۰/۵۸	۰/۴۹	۱/۰۰				
۲۲	۰/۳۱	۰/۳۴	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۳۲	۰/۲۹	۰/۳۰	۰/۴۹	۰/۴۷	۰/۳۵	۰/۴۷	۰/۵۴	۰/۴۰	۰/۲۹	۰/۴۷	۰/۵۳	۰/۴۳	۰/۴۷	۰/۴۶	۰/۴۴	۰/۵۴	۱/۰۰			
۲۳	۰/۳۳	۰/۳۴	۰/۲۸	۰/۳۰	۰/۲۸	۰/۳۴	۰/۳۱	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۳۹	۰/۴۷	۰/۵۲	۰/۴۳	۰/۳۰	۰/۴۸	۰/۵۳	۰/۵۰	۰/۵۶	۰/۵۵	۰/۵۱	۰/۵۱	۰/۵۴	۱/۰۰		
۲۴	۰/۲۴	۰/۲۵	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۲۴	۰/۳۱	۰/۳۳	۰/۴۶	۰/۵۲	۰/۳۸	۰/۴۴	۰/۵۶	۰/۵۰	۰/۳۶	۰/۵۱	۰/۵۰	۰/۴۷	۰/۵۴	۰/۵۳	۰/۵۰	۰/۵۲	۰/۵۸	۰/۵۳	۱/۰۰	
۲۵	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۱	۰/۱۸	۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۱۶	۰/۱۹	۰/۲۳	۰/۱۴	۰/۱۸	۰/۲۲	۰/۱۶	۰/۱۷	۰/۲۲	۰/۱۹	۰/۱۷	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۲	۰/۲۰	۰/۱۸	۰/۲۲	۱/۰۰

در تحقیقی ۴۴ ژنوتیپ زعفران زراعی از کشورهای مختلف جمع‌آوری شد و یک ژنوتیپ از *C. kotschyanus*، توسط ۳۰ آغازگر RAPD آزمایش شد که هیچ باند چندشکلی مشاهده نشد (۱۶). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تعداد آغازگرهای استفاده‌شده (۱۹ عدد آغازگر)، نسبت به مطالعهٔ سایر پژوهشگران کمتر بود، ولی درصد چندشکلی بیشتری تولید کردند که می‌توان گفت این آغازگرها، بخش بیشتری از ژنوم را پوشش داده‌اند و برای این گونه‌ها مناسب بوده‌اند.

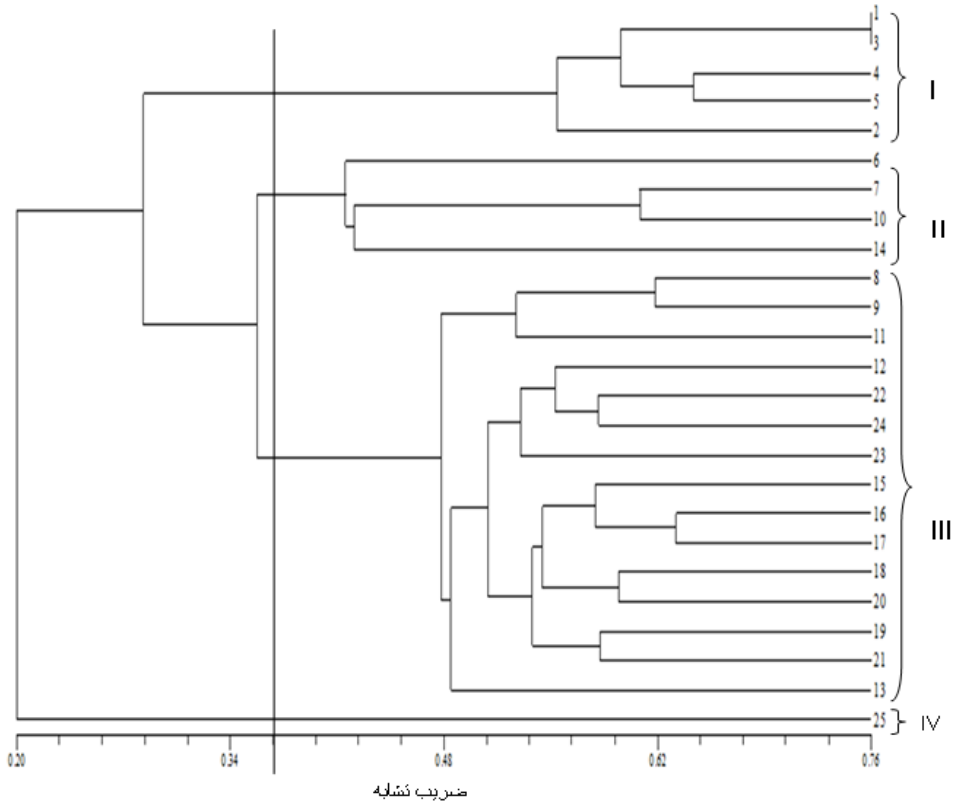
ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS براساس ضریب تشابه جاکارد به‌دست آمد (جدول۵). براساس نتایج به‌دست آمده از ماتریس تشابه، کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۱۴) بین ژنوتیپ‌های ۱۱ (شازند) و ۲۵ (زعفران زراعی- اراک) بود که اولی مربوط به *C. cancellatus* و دومی مربوط به گونهٔ زعفران زراعی بود. بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۷۶) بین ژنوتیپ‌های ۱ (سنقر) و ۳ (کنگاور) و هر دو مربوط به *C. speciosus* بود. همچنین تشابه زیادی (۰/۶۴) بین ژنوتیپ‌های روان‌سر- کرمانشاه با بی‌ستون- کرمانشاه، (۰/۶۳) کرک- خمین با کجرستان- خمین، (۰/۶۲) کنگاور با روان‌سر مشاهده شد.

ضریب همبستگی کوفنتیک r=۰/۹۶ به‌دست آمد که نشان‌دهندهٔ همبستگی قابل قبول ماتریس تشابه و دندروگرام بود. در دندروگرام حاصل از ماتریس تشابه، در حد تشابه ۰/۳۶ ژنوتیپ‌ها به چهار گروه تقسیم شدند (شکل۴). در گروه اول، ژنوتیپ‌های *C. speciosus* قرار گرفتند که ژنوتیپ‌های سنقر و کنگاور بیشترین شباهت (۰/۷۶) را در بین ژنوتیپ‌ها داشتند. ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از گونهٔ *speciosus* از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیکی با ژنوتیپ‌های دو گونهٔ دیگر متفاوت بودند. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های متعلق به *C. cancellatus* بود که مربوط به ژنوتیپ‌های منطقهٔ ایلام و خانه‌میران- اراک بودند. گروه سوم در حد تشابه ۰/۵۶ به هشت زیرگروه تقسیم شدند. که همگی مربوط به *C. cancellatus* بودند و شامل ژنوتیپ‌های شازند، خمین، ازنا، گلپایگان و خوانسار بود. گروه چهارم تنها شامل گونهٔ زعفران زراعی بود که کاملاً از دو گونهٔ *cancellatus* و *speciosus* جدا شد.

نتایج این پژوهش نشان داد گونهٔ زعفران زراعی از دو گونهٔ *cancellatus* و *speciosus* کاملاً جدا شد که با نتایج دیگر آزمایش‌ها مطابقت نداشت (۶ و ۸). البته از نظر صفات مورفولوژیکی ژنوتیپ‌های مربوط به گونهٔ *speciosus* با گونهٔ *sativus* متفاوت بودند و در گروهی جداگانه قرار گرفتند.

از نظر صفات مورفولوژی ژنوتیپ‌ها براساس نوع گونه و شرایط اقلیمی از یکدیگر تفکیک شدند. در تجزیهٔ خوشه‌ای مورفولوژی و RAPD گونهٔ *speciosus* کاملاً از گونه‌های *cancellatus* و گونهٔ اهلی زعفران جدا شد، درحالی‌که گونهٔ زراعی زعفران در فاصلهٔ ۱۲ از دو گونهٔ وحشی جدا شد، ولی در فاصلهٔ ۲۰ به گونهٔ *cancellatus* شباهت داشت. در تجزیهٔ دوبعدی نیز گونهٔ *speciosus* از دو گونهٔ دیگر جدا شد و گونهٔ زراعی زعفران با ژنوتیپ‌های گونهٔ *cancellatus* در یک گروه قرار گرفتند که نشان‌دهندهٔ همبستگی بالا با تجزیهٔ خوشه‌ای است. در این پژوهش، در مقایسهٔ بین کلاسترهای مورفولوژی و RAPD در بعضی حالات شباهت‌هایی وجود داشت، به‌طوری‌که در هر دو کلاستر گونهٔ *speciosus* در گروهی جداگانه قرار گرفت. به‌طورکلی، نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد که تنوع در بین گونه‌های جنس کروکوس قابل توجه بوده است و اینکه ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده می‌تواند منبع مناسبی برای انجام کارهای به‌نژادی استفاده‌شده قرار بگیرد و نشانگر مولکولی RAPD برای مطالعهٔ تنوع ژنتیکی جنس *Crocus* کارایی مطلوبی داشت و در تفکیک ژنوتیپ‌ها مؤثر بود.

از نظر صفات مورفولوژی ژنوتیپ‌ها براساس نوع گونه و شرایط اقلیمی از یکدیگر تفکیک شدند. در تجزیهٔ کلاستر گونهٔ *specious* کاملاً از گونه‌های *cancellatus* و گونهٔ اهلی زعفران جدا شد، درحالی‌که گونهٔ اهلی زعفران در فاصلهٔ ۱۲ از دو گونهٔ وحشی جدا شد، ولی در فاصلهٔ ۲۰ به گونهٔ *cancellatus* شباهت داشت. در تجزیهٔ دوبعدی نیز گونهٔ *specious* از دو گونهٔ دیگر جدا شد و گونهٔ اهلی زعفران با ژنوتیپ‌های گونهٔ *cancellatus* در یک گروه قرار گرفتند که نشان‌دهندهٔ همبستگی بالایی با تجزیهٔ کلاستر است. در این پژوهش، در مقایسه بین کلاسترهای مورفولوژی و RAPD در بعضی حالات شباهت‌هایی وجود داشت، به‌طوری‌که در هر دو کلاسترها گونهٔ *specious* در گروهی جداگانه قرار گرفتند و در بعضی حالت‌ها برای تقسیم‌بندی ژنوتیپ‌ها تفاوت‌هایی وجود دارد، چون صفات مورفولوژیکی تحت‌تأثیر محیط هستند و با توجه به شرایط آب و هوایی تغییر می‌کنند و نیز نشانگر RAPD بیشتر ژنوم را پوشش می‌دهد و می‌تواند تقسیم‌بندی آن مطمئن‌تر باشد (۳). نتیجهٔ مناسبی که در این پژوهش به‌دست آمد این است که نشانگر مولکولی RAPD برای مطالعهٔ تنوع ژنتیکی جنس Crocus کارایی مطلوبی دارد.



شکل ۴. دندروگرام مربوط به گروه‌بندی ۲۵ ژنوتیپ جنس زعفران (*C. sativus*، *C. speciosus* و *C. cancellathus*) با استفاده از داده‌های RAPD، ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA

شمارهٔ ژنوتیپ‌ها براساس جدول۱ است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران که امکانات اجرای این پژوهش را فراهم آوردند، قدردانی می‌شود.

منابع

۱. ابراهیم‌زاده ح، رجبیان ط، کرمیان ر، ابریشم‌چی، پ و صبورا ع (۱۳۸۵) (زعفران ایران با نگاهی پژوهشی). انتشارات اطلاعات، تهران. ۶۴۴ ص.

۲. ابریشمی م ح (۱۳۸۳) *زعفران از دیرباز تا امروز*. انتشارات امیرکبیر. ۸۳۲ ص.

۳. نقوی م ر، قره‌یاضی ب و حسینی سالکده ق (۱۳۸۸) *نشانگرهای مولکولی*. انتشارات دانشگاه تهران، تهران. ۳۴۰ ص.

۴. قهرمان ا و عطار ف (۱۳۷۷) *تنوع زیستی گونه‌های گیاهی ایران*. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۱۲ ص.

۵. کافی م (۱۳۸۱) *زعفران فناوری تولید و فراوری*. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد. ۲۷۶ ص.

6. Beiki A, Keifi F and Mozafari J (2010) Genetic differentiation of *Crocus* species by random amplified polymorphic DNA. Genetic Engineering and Biotechnology. Pp. 1-10.

7. Domyati FM, Younis R, Edris S, Mansour A, Sabir G and Bahieldin A (2011) Molecular markers associated with genetic diversity of some medicinal plants in Sinai. Medicinal Plants Research. 5(2): 200-210.

8. Grilli Caiola M, Caputo P and Zanier R (2004) RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. Biologia Plantarum. 48(3): 375-380.

9. Hosseinzadeh H, Abootorabi A and Sadeghnia HR (2008) Protective effect of *Crocus sativus* stigma extract and crocin (trans-crocin 4) on methyl methanesulfonate–induced DNA damage in mice organs. DNA and Cell Biology. 27: 1–8.

10. https://www.diversityarrays.com/files/DArT_DNA_isolation.pdf

11. Painting K (1995) Introduction to collecting, training support materials, the international plant genetic Resources Institute. Rome. 233 p.

12. Andersen J and Lubberstedt T (2003) Functional markers in plants. Trends in Plant Science. 8: 554-560.

13. Rao V and Hodgkin T (2002) Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 68: 1-19.

14. Rashed-Mohassel HM (2007) Saffron from wild to the field. Acta Horticulturae. 739: 187-194.

15. Rechinger KH (1969) Iridaceae, in: Rechinger K.H. (ed), *Flora Iranica*. Akademische Druck-u, Verlgsantalt, Graz, Austria. 66: 187-203.

16. Rubio-Moraga A, Castillo-López R, Gomez-Gomez L and Ahrazem O (2009) Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. BMC Research Notes. 2(189): 1-5.

17. Rubio Moraga A, Trapero-Mozos A, Gemez-Gemez L and Ahrazem O (2010) Intersimple sequence repeat markers for molecular characterization of *Crocus cartwrightianus* cv. *Albus*. Industrial Crops and Products. 32: 147-151.

18. Saxena R and Chandra A (2010) Isozyme, ISSR and RAPD profiling of genotypes in marvel grass (*Dichanthium annulatum*). Environmental Biology. 31(6): 883-890.

19. Safipouriyan A, Amir Shekari H, Rajabian T and Fotokian H (2011) The evaluation of time of corms lifting (Harvesting) and foliar nutriton on some morphological and chemical yield of saffron (*Crocus sativus* L.). Advances in Environmental Biology. 5(2): 243-247.