

Investigating the genetic diversity of saffron (*Crocus sativus* L.) corms induced by gamma ray irradiation using the SCoT marker

Seyed Ebrahim Seifati 

*Corresponding author. Assistant Professor, Department of Arid Land and Desert Management, School of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran. E-mail address: Seifati@yazd.ac.ir

Ali Mohammad Mohit-Ardakani 

MSc Student, School of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran. E-mail address: alimohammadmohit@gmail.com

Abstract

Objective

Due to its sterility, saffron reproduces only asexually and for this reason, except for some spontaneous mutations, other genetic changes do not occur naturally in it. Therefore, induced mutations can act as a suitable method to create diversity in the genetic structure of the plant and improve its growth, performance and quality characteristics. The present study was conducted to investigate the genetic diversity of irradiated saffron plants compared to control samples (without irradiation) using the SCoT markers.

Materials and methods

Healthy saffron corms were grown in the greenhouse along with control corms at two levels of 15 and 18 Gy gamma rays' radiation and immediately after irradiation. In order to investigate the created genetic diversity, after extracting DNA from the leaf sample and determining the quality and quantity of the extracted DNA using the nanodrop device, out of the 30 SCoT primers used, 9 primers were finally analyzed for this study.

Results

A total of 46 strips were scored, 31 strips had polymorphism, so that the highest number of polymorphic strips was related to SCoT05 (6 strips) and the lowest number was related to SCoT04, SCoT11 and SCoT12 (2 strips). The average percentage and Polymorphic Information Content (PIC) were 67.13 and 0.35, respectively, and the highest polymorphic content was related

to SCoT11 and SCoT17 (0.45) and the lowest was related to SCoT13 (0.13). SCoT17 (0.33) had the highest Marker Index (MI). Based on the results of the Jaccard's similarity coefficient matrix, the range of changes varied from 0.45 to 0.88 and its average was reported as 0.70. The results of cluster analysis also showed that two control samples in the first cluster, 3 out of 4 irradiated with 15 Gy dose in the second cluster, and except for 18G105 irradiated which was placed in a separate cluster, the other 18 Gy radiation along with 15G132 irradiated from the 15 Gy level were grouped in a cluster. The most observed alleles (Na) were estimated in the 15 Gy treatment (1.55) and the lowest in the control (1.2767). The amount of diversity in the population of 15 Gy based on Shannon and Ni indices ($I=0.2061$ and $He=0.3064$) was more than control and 18 Gy.

Conclusions

The results showed the high efficiency of SCoT17 in the incidence of polymorphism among irradiated and control samples of saffron. Molecular variance analysis (AMOVA) evaluated the diversity within groups more than between groups. In addition, the difference in the band pattern of SCoT markers, the clustering pattern and the genetic distance showed the usefulness of gamma irradiation and the efficiency of mutagenesis to create diversity in the saffron plant.

Keywords: Mutation Breeding, Radiation, Saffron, Polymorphic Information Content

Paper Type: Research Paper.

Citation: Seifati SE, Mohit-Ardakani AM (2023) Investigating the genetic diversity of saffron (*Crocus sativus* L.) corms induced by gamma ray irradiation using the SCoT marker. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (2), 121-140.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (2), 121-140. DOI: 10.22103/jab.2023.20666.1448

Received: March 20, 2023.

Received in revised form: April 25, 2023.

Accepted: April 26, 2023.

Published online: June 10, 2023.


Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.




© the authors

بررسی تنوع ژنتیکی بنه‌های زعفران (*Crocus sativus* L.) القا شده با پرتو گاما با استفاده از

نشانهگر SCoT

سید ابراهیم سیفتی 

*نویسنده مسئول: استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی و کویر شناسی، دانشگاه یزد، ایران. رایانامه: seifati@yazd.ac.ir

علی محمد محیط اردکانی 

دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، ایران. رایانامه: alimohammadmohit@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۶

چکیده

هدف: زعفران به دلیل عقیم بودن، صرفاً از طریق غیرجنسی تکثیر می‌یابد و از این جهت، به استثنای برخی جهش‌های خود به خودی، تغییرات ژنتیکی دیگری، به طور طبیعی در آن ایجاد نمی‌شود. از این رو، جهش‌های القایی می‌توانند به عنوان روشی مناسب جهت ایجاد تنوع در ساختار ژنتیکی گیاه و بهبود خصوصیات رشدی، عملکردی و کیفی آن عمل نمایند. مطالعه حاضر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی پرتودیده‌های گیاه زعفران نسبت به نمونه‌های شاهد (بدون پرتوتابی) با استفاده از نشانهگر SCoT انجام شد.

مواد و روش‌ها: بنه‌های سالم زعفران در دو سطح ۱۵ و ۱۸ گری پرتو گاما، پرتوتابی و بلافاصله پس از پرتوتابی به همراه بنه شاهد در گلخانه کشت شدند. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ایجاد شده، پس از استخراج DNA از نمونه برگ و تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ، از ۳۰ آغازگر SCoT استفاده شده، در نهایت ۹ آغازگر برای این بررسی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: در مجموع ۴۷ نوار نمره‌دهی شد که ۳۳ نوار چندشکلی نشان داد به طوری که بیشترین تعداد نوار چندشکل مربوط به SCoT05 (۶ نوار) و کمترین تعداد مربوط به SCoT04، SCoT11 و SCoT12 (۲ نوار) بود. میانگین درصد و محتوای اطلاعات چندشکلی به ترتیب ۶۹/۳۵ و ۰/۳۶ بدست آمد که بیشترین شاخص محتوای چندشکلی، مربوط به SCoT11 و SCoT17 (۰/۴۵) و کمترین آن مربوط به SCoT13 (۰/۲۳) بود. بیشترین مقدار شاخص نشانگر را نیز SCoT17 (۰/۳۳) به خود اختصاص داد. بر اساس نتایج ماتریس ضرایب تشابه جاکارد، دامنه تغییرات از ۰/۴۵ تا ۰/۸۸ متغیر و میانگین آن برابر با ۰/۷۰ گزارش شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای

نیز نشان داد که ۲ نمونه شاهد در خوشه اول، ۳ پرتودیده از ۴ پرتودیده دوز ۱۵ گری در خوشه دوم و به جز پرتودیده 18G105 که در خوشه مجزا قرار گرفت، سایر پرتودیده‌های ۱۸ گری به همراه پرتودیده 15G132 از سطح ۱۵ گری در یک خوشه گروه‌بندی شدند. بیشترین آل‌های مشاهده شده (Na) در تیمار ۱۵ گری (۱/۵۵) و کمترین آن در شاهد (۱/۲۷۶۷) برآورد شد. میزان تنوع در جمعیت ۱۵ گری بر اساس شاخص‌های شانون و نی ($H' = 0.3064$ و $I = 0.2061$) بیشتر از شاهد و ۱۸ گری بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌داد نشانگر SCoT17 کارایی بالایی در بروز چندشکلی میان پرتودیده‌ها و نمونه‌های شاهد زعفران دارد. تجزیه واریانس مولکولی نیز تنوع درون گروه‌ها را بیشتر از بین گروه‌ها ارزیابی نمود. همچنین تفاوت در الگوی نواری نشانگرهای SCoT، الگوی خوشه‌بندی و یافته‌های فاصله ژنتیکی، سودمندی پرتودهی گاما و کارایی جهش‌زایی را برای ایجاد تنوع در گیاه زعفران نشان داد.

کلیدواژه‌ها: اصلاح به روش جهش، پرتوتابی، زعفران، محتوای چندشکلی نشانگر

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: سیفتی سیدابراهیم، محیط اردکانی علی محمد (۱۴۰۲) بررسی تنوع ژنتیکی بنه‌های زعفران (*Crocus sativus* L.) القا شده با پرتو گاما با استفاده از نشانگر SCoT. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۲)، ۱۲۱-۱۴۰.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

زعفران یا طلای سرخ، با نام علمی *Crocus sativus* L. از خانواده زنبقیان^۱، با خواستگاه شرق (ایران، ترکیه، هندوستان) و غرب (یونان) مدیترانه (Farhan et al. 2020)، از گران‌بهارترین محصولات، در میان گیاهان دارویی جهان به شمار می‌رود (Leone et al. 2018). از جمله اصلی‌ترین شاخص‌های مورد استفاده برای کشت این گیاه، که تنها از طریق بنه تکثیر می‌شود، اندازه قطر بیش از ۲/۵ سانتی‌متر، وزن ۵-۱۵ گرم (Khorramdel et al. 2015) و فقدان عیوبی مانند آلودگی به ویروس، انگل و یا پوسیدگی است. بنابراین، ممکن است یک انتخاب ناآگاهانه، منجر به حذف یا کاهش عملکرد کمی و کیفی این گیاه شود (Shokrpour 2019).

¹ Iridaceae

از طرفی، اهمیت حفظ و بهبود تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی در شرایطی مطرح است که تنوع زیستی، به دلیل نقش انسان در تغییرات اقلیمی و آب و هوایی، به سرعت در حال کاهش بوده و رویکردهای حفاظتی را به سمت مداخلات فعال^۲ (انتقال گونه‌های نزدیک از نظر رده‌بندی و یا گونه‌های مشابه از نظر زیست‌محیطی به مناطقی که گونه اصلی در آنها منقرض شده است^۳، ایجاد تنوع ژنتیکی در گونه‌های در معرض انقراض^۴، تسریع در فرایند تکامل طبیعی به کمک انسان^۵، انتخاب مصنوعی و مهندسی ژنتیک) سوق می‌دهد (Gaitán - Espitia & Hobday 2021). افزایش این تنوع، نه تنها برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی گونه‌ها (Mohammadifar & Mohammadabadi 2011; Gooki et al. 2019)، بلکه به منظور بهبود معیارهای کمی و کیفی گیاهان که به عنوان مواد اولیه بسیاری از محصولات صنعتی مانند مواد غذایی، دارویی، نساجی و غیره استفاده می‌شوند، بسیار حائز اهمیت است.

گیاه زعفران که از جنبه‌های مختلف اقتصادی، اجتماعی، زیست محیطی و سیاسی، جایگاه ویژه‌ای در کشاورزی ایران دارد، به دلیل ساختار ژنتیکی، عقیم بوده و صرفاً از طریق غیرجنسی تکثیر می‌یابد. از این جهت، به استثنای برخی جهش‌های خود به خودی، تغییرات ژنتیکی دیگری، به طور طبیعی در آن ایجاد نمی‌شود (Busconi et al. 2018). بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از جهش‌های القایی به خصوص پرتو گاما در محصولاتی از این قبیل، می‌تواند یک جایگزین مناسب، برای دستیابی به تنوع ژنتیکی باشد. چرا که تشخیص، انتخاب و حفاظت از جهش‌یافته‌های نسل M₁ به دلیل ماهیت کلونالی آن‌ها، امکان‌پذیر است (Mir et al. 2015). به طور کلی، اصلاح به روش جهش، برای ایجاد ویژگی‌های مورد نیاز در گیاهان و افزایش تنوع ژنتیکی آنها بسیار حائز اهمیت بوده و قادر است ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، فیتوشیمیایی و مولکولی گیاهان را بهبود بخشد تا جهش‌یافته‌های جدیدی برای تولید مقادیر بالای متابولیت‌های مهم تجاری و یا با عملکرد بالاتر ایجاد شوند (Hong et al. 2022).

در چند دهه اخیر، تحقیقات گسترده‌ای در خصوص استفاده از پرتو گاما به جهت توسعه ژرمپلاسم‌هایی با کیفیت برتر، انجام شده است زیرا پرتو گاما به راحتی در دسترس و مقرون به صرفه بوده و دارای قدرت نفوذ بیشتر و کارآمدتری است (Katiyar et al. 2022). در همین راستا، در مطالعه‌ای که بر روی برخی خصوصیات رشدی و فیتوشیمیایی بنه‌های زعفران القا شده با دو دوز ۱۵ و ۱۸ گری پرتو گاما انجام گرفت، نتایج نشان داد که پرتودیده‌های مورد مطالعه از نظر خصوصیات رشدی در رئوس چندضلعی نمودار بای‌پلات^۶ قرار گرفته و از این نظر بیشترین تفاوت را با یکدیگر و نمونه‌های شاهد (بدون پرتوتابی) نشان دادند. محتوای پیکروکروسین و کروسین کلاله نیز در پرتودیده‌های تیمار ۱۵ گری به طور معنی‌داری بیشتر از پرتودیده‌های ۱۸ گری و شاهد گزارش شد (Seifati et al. 2021; Mohit et al. 2022). همچنین در مطالعه دیگری که پرتودیده‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ گری بنه زعفران از نظر

² Active interventions

³ Rewilding

⁴ Assisted gene flow

⁵ Human-assisted evolution

⁶ GGE biplot

خصوصیات رشدی و عملکردی با تیمار بدون پرتوتابی مورد مقایسه قرار گرفتند، نتایج حاکی از آن بود که با افزایش دوز پرتو گاما (۲۰ و ۲۵ گری)، اکثر صفات مورد مطالعه نسبت به شاهد، کاهش معنی داری یافتند. هر چند نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR در این مطالعه، وجود چندشکلی در بین نمونه‌های شاهد و پرتودهی شده را نشان دادند (Jahandar Zaboli et al. 2022).

با افزایش چشمگیر مطالعات ژنومی و بررسی‌های تنوع ژنتیکی، تمایل برای استفاده از نشانگرهایی که به صورت تصادفی نواحی از ژنوم را تکثیر می‌کنند، به سوی استفاده از نشانگرهایی که ژن‌ها را مورد هدف قرار می‌دهد، سوق یافته‌است. این خصوصیت که نشانگرهای مولکولی، ژن‌ها را مورد هدف قرار می‌دهند، در مطالعاتی که به منظور مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی^۷ انجام می‌شوند، در مقایسه با سایر نشانگرها که به صورت تصادفی، نیمه تصادفی و یا نشانگرهایی که نواحی غیر ژنی را تکثیر می‌کنند، دارای برتری است (El-Mogy et al. 2022). نشانگر SCoT، یک نشانگر DNA پیشرفته، قابل اعتماد، کارآمد، منحصر به فرد و هدفمند ژنی است و بر اساس یک منطقه حفاظت شده کوتاه در کنار کدون آغاز (ATG) در ژن‌های گیاهی طراحی شده است که برخلاف سایر نشانگرهای مولکولی در تکرار پذیری الگوی نواربندی آنها، تنها طول و دمای اتصال آغازگرها نقش ندارند (Collard & Mackill 2009). نشانگرهای SCoT نسبت به نشانگرهای RAPD، ISSR و AFLP، نوارهای تکرار پذیرتر و قابل اطمینان‌تری ارائه داده و برای مطالعات جمعیت، نقشه برداری ژنتیکی و برنامه‌های انتخابی به کمک نشانگر در گیاهان مختلف، به خوبی مورد استفاده قرار گرفتند (Shaban et al. 2022).

به طور کلی، اصلاح به روش جهش در گیاهان بخصوص گیاهان دارویی، نه تنها با ایجاد تعداد زیادی جهش احتمالی (معمولاً پذیرفته شده) در گیاه مورد نظر، می‌تواند منجر به تولید جهش‌یافته‌هایی با صفات رشدی و کیفی مطلوب گردد (بیش از ۳۳۰۰ گونه جهش‌یافته‌ی زراعی، زینتی و باغی، به طور رسمی برای تجاری‌سازی بیش از ۲۲۰ گونه گیاهی در بیش از ۷۰ کشور دنیا مورد استفاده قرار گرفته‌است)، بلکه تنوع زیستی ایجاد شده با این روش، می‌تواند در اصلاح نباتات مدرن، به عنوان ماده خام تولید گیاهان هوشمند، به کار گرفته شود (Kolakar et al. 2018; Sivasankar 2022). بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی تاثیر سطوح مختلف تابش اشعه گاما بر ایجاد تنوع ژنتیکی در زعفران و بررسی آن با استفاده از نشانگر ژنی SCoT، برای اولین بار در پژوهش‌های پرتوتابی این گیاه، انجام شد.

مواد و روش‌ها

پرتوتابی و شرایط رشد: در مرحله آماده‌سازی مواد گیاهی، بنه‌های سالم زعفران از مزارع استان خراسان جنوبی، شهرستان قائن با طول "۲۳' ۱۱' ۵۹" و عرض "۳۱' ۴۳' ۳۳" و ارتفاع ۱۴۴۶ متر از سطح دریا انتخاب شدند. لایه تونیکای بنه‌های سالم با وزن ۱۲ تا ۱۵ گرم، حذف و سپس بنه‌ها با آب و هیپوکلریت سدیم یک درصد، ضدعفونی شدند. جهت شکستن خواب، بنه‌ها به مدت یک

⁷ Quantitative Traits Loci; QTL

ماه درون یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تحت تیمار سرمایی قرار گرفتند. پس از اتمام زمان تیمار سرمایی، بنه‌های زعفران به منظور ایجاد تنوع به صورت تصادفی به سه گروه ۱۵۰ تایی تقسیم و در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج، دو بخش از آن تحت تابش گاما (با استفاده از چشمه Co^{60}) در دو سطح ۱۵ و ۱۸ گری (Khan et al. 2011; Jun et al. 2006) قرار گرفتند. سپس بنه‌های پرتوتابی شده، درون گلدان‌هایی با قطر ۱۲ و ارتفاع ۱۱/۵ سانتی‌متر که با مخلوطی از خاک لومی شنی و کود کمپوست گیاهی کاملاً پوسیده به نسبت ۲:۱ پر شده بودند، در گلخانه پژوهشی دانشگاه یزد با طول ۳۲' ۲۱' ۵۴" و عرض ۴۷' ۴۹' ۳۱" و ارتفاع ۱۲۶۹ متر از سطح دریا، کاشته شدند. همچنین کود پودری قابل حل در آب که حاوی عناصر اصلی (۶-۶-۳۰ NPK) و عناصر ریزمغذی بود، دو مرتبه به فاصله ۲۵ روز، در طول مرحله رشد رویشی، به صورت محلول در آب آبیاری به طور مساوی برای هر گلدان مورد استفاده قرار گرفت (Seifati et al. 2021).

این پرتودیده‌ها، ابتدا با نمونه‌های شاهد بدون پرتوتابی از نظر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی شامل تعداد ساقه، تعداد گل، طول ساقه، طول گل، طول کلاله، روز تا گلدهی و روز تا برداشت، وزن تر و خشک گل، وزن خشک کلاله و محتوای کلروفیل‌های a, b و کل و کارتنوئید کل برگ مورد ارزیابی قرار گرفتند (Seifati et al. 2021). سپس بر اساس نتایج بدست آمده از آن مطالعه، ۱۱ پرتودیده از هر کدام از تیمارهای ۱۵ و ۱۸ گری به همراه ۱۰ نمونه‌های شاهد، انتخاب و از نظر خصوصیات فیتوشیمیایی و رشدی شامل محتوای کروستین، پیکروکروسین و سافرانال و شاخص‌های رشد شامل شاخص سطح برگ (LAI)، شاخص برداشت (HI)، محتوای کلروفیل نسبی، تعداد بنه دختری و متوسط وزن بنه دختری با یکدیگر مقایسه شدند (Mohit et al. 2022). در نهایت بر اساس دو پژوهش فوق، ۸ نمونه پرتودیده زعفران (شامل ۴ پرتودیده ۱۵ گری و ۴ پرتودیده ۱۸ گری) به همراه ۲ نمونه شاهد به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از مارکرهای مولکولی در این مطالعه انتخاب شدند، به طوری که به ترتیب نمونه‌های Ctrl01 و Ctrl06 مربوط به تیمار شاهد، نمونه‌های 15G21، 15G36، 15G89 و 15G132 مربوط به تیمار ۱۵ گری و نمونه‌های 18G22، 18G49، 18G105 و 18G138 مربوط به تیمار ۱۸ گری بودند.

آزمایش‌های مولکولی: به منظور بررسی نمونه‌ها، استخراج DNA از برگ‌ها به روش CTAB⁸ انجام گردید. همچنین به جهت تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از ژل آگاروز ۰/۸ درصد و دستگاه نانودراپ (Analytik jena Scan Drop 250) استفاده شد. سپس نمونه‌های موجود تا غلظت 50 ngml^{-1} رقیق و در واکنش‌های زنجیره‌ای PCR مورد استفاده قرار گرفت. از مجموع ۳۰ آغازگر SCoT مورد استفاده برای این مطالعه، ۹ آغازگر نوارهای چندشکل و قابل امتیازدهی ایجاد نمودند که توالی و مشخصات آنها در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر (مسترمیکس آماده یک برابر، ۱۰ پیکومول آغازگر، ۱۰۰ نانوگرم DNA و آب مقطر دوبار تقطیر) در ترموسایکلر (BioRad C1000 touch) و بر اساس برنامه دمایی شامل واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای 95°C ، سپس ۳۵ چرخه با واسرشت‌سازی در دمای 95°C به مدت

⁸ Cetyl- Trimethy Ammonium Bromide (CTAB)

۴۵ ثانیه، اتصال در دمای °C ۵۰ به مدت ۴۰ ثانیه و بسط در دمای °C ۷۲ به مدت ۲ دقیقه و در نهایت بسط نهایی به مدت ۷ دقیقه انجام شد. سپس مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه و قدرت ۸۰ ولت الکتروفورز ران و در نهایت در دستگاه مستندساز (شرکت فردادآزما) تصویر برداری شد. اندازه باندهای تفکیک شده توسط نشانگر اندازه ۱ کیلو باز، تخمین زده شدند.

جدول ۱. توالی، محتوای GC (%) و دمای ذوب آغازگرهای SCoT مورد مطالعه

Table 1. Sequence, GC content (%) and Melting temperature of the studied SCoT primers

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر (5' → 3') Primer Sequence 5' to 3'	% G/C	دمای ذوب °C Melting temperature (°C)
SCoT 02	CAACAATGGCTACCACCA	50	54
SCoT 03	CAACAATGGCTACCACCC	56	56
SCoT 04	CAACAATGGCTACCACCG	55	56
SCoT 05	CAACAATGGCTACCACGA	50	54
SCoT 11	AAGCAATGGCTACCACCA	50	56
SCoT 12	ACGACATGGCGACCAACG	61	58
SCoT 13	ACGACATGGCGACCACCA	61	58
SCoT 17	ACCATGGCTACCACCGAG	61	58
SCoT 30	CCATGGCTACCACCGCG	72	63

تجزیه و تحلیل داده‌ها: از آنجا که نشانگر SCoT دارای الگوی نواری غالب است، نمره‌دهی نوارهای آشکار شده بر روی ژل آگاروز به صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) صورت گرفت. لازم به ذکر است که فقط به نوارهای واضح تکرار پذیر نمره داده شد. داده‌های ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزارهای NTSYSpc-2.10، POPGen32 و GenAIEx6.5 مورد بررسی قرار گرفت. شاخص محتوای چندشکلی نشانگر^۹ (PIC) برای نشانگرهای غالب، بر اساس معادله زیر (Chesnokov & Artemyeva 2015) در نرم‌افزار Excel محاسبه شد که در این معادله، f بیانگر فراوانی نشانگر است.

$$PIC = 1 - [f^2 + (1 - f)^2] \quad \text{رابطه (۱)}$$

همچنین نسبت چندشکلی موثر^{۱۰} (EMR) و شاخص نشانگر^{۱۱} (MI) از طریق فرمول زیر (Powellet et al. 1996; Nagarajuet al. 2001) محاسبه شدند به طوری که در این رابطه n_p تعداد باندهای چندشکل و n تعداد کل باندهای تکثیر شده است.

^۹. Polymorphic Information Content; PIC

^{۱۰}. Effective Multiplex Ratio; EMR

^{۱۱}. Marker Index; MI

$$EMR = n_p (n_p - n) \quad \text{رابطه ۲}$$

$$MI = PIC * EMR \quad \text{رابطه ۳}$$

در این پژوهش، برای هر آغازگر قدرت تفکیک^{۱۲} (Rp) نیز محاسبه شد (Altıntaset al. 2008) به طوری که I_b میزان آگاهی بخش بودن هر باند یک پرایمر $(I_b = 1 - 2(0.5 - P_i))$ ، در نظر گرفته شد.

$$Rp = \sum I_b \quad \text{رابطه ۴}$$

به منظور تعیین تشابه ژنتیکی بین نمونه‌های مورد مطالعه از ضریب جاکارد و در نهایت برای گروه‌بندی نمونه‌ها از الگوریتم UPGMA^{۱۳} و ضریب تشابه جاکارد استفاده شد. واریانس مولکولی^{۱۴} نیز با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.5 محاسبه گردید.

نتایج و بحث

در این پژوهش با استفاده از نشانگرهای SCoT، در مجموع ۴۷ نوار نمره‌دهی شد که ۳۳ نوار آن چندشکل بود. بیشترین تعداد نوار تکثیر شده و چندشکل در بین ۹ آغازگر مورد مطالعه، به ترتیب مربوط به آغازگرهای SCoT13 با ۸ نوار (شکل ۱) و SCoT05 با ۶ نوار بود. همچنین آغازگر SCoT05 به همراه SCoT30 بیشترین درصد چندشکلی (۸۳/۳۳ درصد) را از خود نشان داد. کمترین تعداد نوار چندشکل با ۳، ۵ و ۳ باند تکثیر شده، به ترتیب مربوط به SCoT04، SCoT11 و SCoT12 (۲ نوار) بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۳۶ بدست آمد به نحوی که SCoT11 و SCoT17، بیشترین شاخص محتوای چندشکلی (۰/۴۵) و SCoT13 کمترین شاخص (۰/۳۳) را به خود اختصاص داد (جدول ۲). از آنجا که محتوای اطلاعات چندشکلی، معیاری برای سنجش چندشکلی و برآورد کارایی نشانگرهای مولکولی است، با محاسبه این شاخص می‌توان بهترین جایگاه را برای مطالعات بعدی استفاده نمود (Ren & Timko 2001). بنابراین اگر چه بیشترین تعداد نوار چندشکل مربوط به SCoT05 بود اما SCoT17 به دلیل محتوای اطلاعات چندشکلی بالاتری که از خود نشان داد، اطلاعات سودمند بیشتری نسبت به سایر نشانگرهای مورد مطالعه داشته و به نظر می‌رسد این نشانگر توانسته ضمن ایجاد پراکندگی متناسب‌تر در کل ژنوم، کارایی بالاتری را در تمایز ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان دهد.

در مطالعه‌ای که به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ایجاد شده با استفاده از جهش القایی پرتو گاما بر روی پرتودیده‌های نوعی لوبیا انجام شد نیز نتایج نشان داد که استفاده از نشانگر SCoT، در مجموع ۸۷ آمپلیکون را مشخص نموده و از این تعداد، ۲۰ آمپلیکون چندشکلی را نشان دادند. بیشترین تعداد آمپلیکون در SCoT10 (۳۹) مشاهده شد، در حالی که کمترین تعداد آمپلیکون توسط SCoT09 (۰/۷) تولید شد. درصد چندشکلی نیز در این بررسی، از ۱۸/۸ تا ۲۸/۵۷ درصد و با میانگین ۲۱/۱۲ درصد متغیر بود. همچنین دامنه مقادیر محتوای اطلاعات چندشکلی از ۰/۱۹۷ تا ۰/۳۴۵ گزارش شد (Sankar et al. 2022).

¹². Resolving power; Rp

¹³. Unweighted Paired GROUP Method using Arithmetic average

¹⁴ Analysis of Molecular Variance; AMOVA

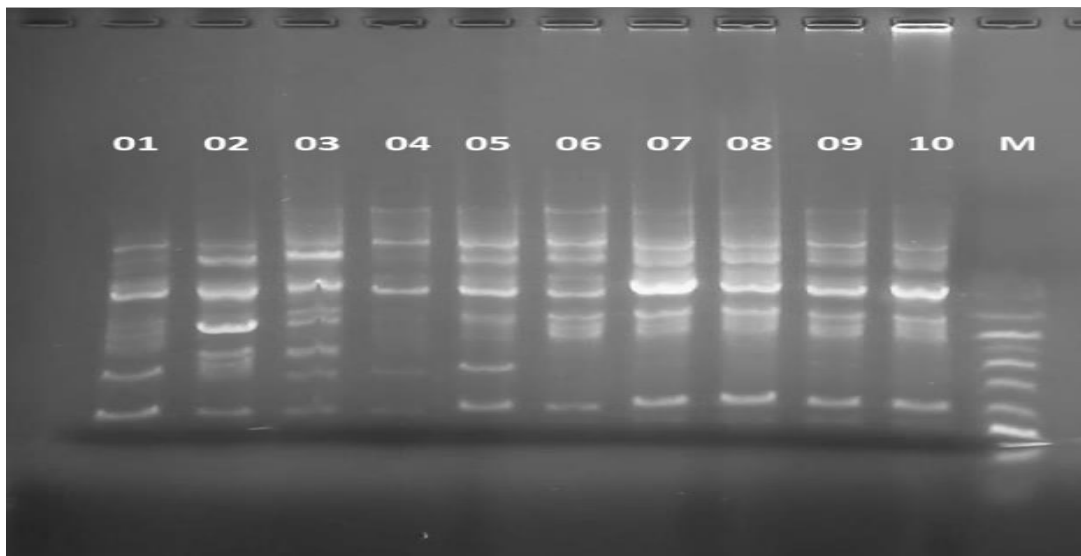
شاخص نشانگر نیز در مطالعات تنوع ژنتیکی، نمایانگر کارایی بالای نشانگرها در بروز چندشکلی میان افراد مورد بررسی است (Mirzaei & salari 2021). در این مطالعه، نشانگرهای SCoT17 (۰/۳۳) بیشترین شاخص نشانگر را به خود اختصاص دادند و کمترین مقدار این شاخص در نشانگر SCoT13 (۰/۱۵) مشاهده شد. بنابراین با توجه به اینکه این شاخص، به تعداد باندهای چندشکل به دست آمده و به پوشش زیاد ژنوم توسط نشانگر نسبت داده می‌شود (Milbourne et al. 1997)، می‌توان نتیجه گرفت که نشانگر SCoT17، توانسته اطلاعات بیشتری از ژنوم را در این مطالعه فراهم آورد.

همچنین مقادیر محاسبه شده برای قدرت تفکیک نشانگرها، در محدوده‌ی ۶ تا ۱۵/۶۷ مشخص شد، به طوری که بیشترین و کمترین مقدار این شاخص به ترتیب برای SCoT30 و SCoT04 تعیین گردید (جدول ۲). پژوهشگران معتقدند، قدرت تفکیک یک نشانگر می‌تواند هم به عنوان تخمینی از حداقل فاصله مفید نشانگر^{۱۵} و هم به عنوان تخمینی از فاصله اطمینان ۹۵ درصدی مکان نقشه QTL عمل کند (Darvasi & soler 1997). در مطالعه‌ای که به منظور ارزیابی پایداری ژنتیکی کلون‌های زعفران با نشانگرهای SCoT، DAMD و IRAP^{۱۶} انجام شد، نتایج نشان داد که نشانگرهای هدفمند ژن مانند SCoT در مقایسه با نشانگرهای غالب معمولی، برای بررسی تنوع ژنتیکی در زعفران مناسب‌تر و دارای کارایی بالاتری بوده است (Gautam & Bhattacharya 2021). بر اساس جدول ماتریس ضرایب تشابه ژنتیکی پرتودیده‌ها، دامنه تغییرات ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد در این مطالعه، از ۰/۴۵ تا ۰/۸۸ متغیر و میانگین آن برابر با ۰/۷۰ بود (جدول ۳) به طوری که بیشترین شباهت ژنتیکی میان نمونه‌های شاهد Ctrl01 و Ctrl06 با ضریب تشابه ۰/۸۸ و کمترین شباهت بین Ctrl01 و 18G105 با ضریب تشابه ۰/۴۵ مشاهده شد. محققین گزارش نمودند که علی‌رغم چندین تفاوت مورفولوژیکی یافت شده بین توده‌های زعفران ایتالیایی، ایرانی و اسپانیایی، نشانگرهای مولکولی AFLP تفاوت‌های ژنتیکی محدودی را به ویژه برای نمونه‌های ایتالیا و ایران (۰/۹۸۵ = شباهت ژنتیکی) نشان دادند (Torricelli et al. 2019). همچنین طی بررسی که خصوصیات مولکولی و شیمیایی ژنوتیپ‌های جهش‌یافته و غیر جهش‌یافته زعفران کشت شده در عربستان با استفاده از ۲۰ نشانگر RAPD انجام شد، تنها سه جفت آغازگر دلخواه چندشکلی (۳۳/۳-۸۸/۲) درصد را در کل DNA ژنومی استخراج شده از این ژنوتیپ‌ها نشان دادند و شاخص شباهت جاکارد از ۰/۸۸ تا ۱ متغیر بود (Sharaf-Eldin et al. 2019).

تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد انجام شد و بر این اساس ۱۰ نمونه مورد مطالعه در ۹ خوشه قرار گرفتند (شکل ۲). به طوری که هر دو نمونه شاهد در خوشه اول و ۳ پرتودیده از ۴ پرتودیده دوز ۱۵ گری در خوشه دوم قرار داشتند. همچنین به جز پرتودیده 18G105 که در یک خوشه مجزا قرار گرفت، سایر پرتودیده‌های دوز ۱۸ گری به همراه پرتودیده 15G132 از سطح ۱۵ گری پرتو گاما در یک خوشه گروه‌بندی شدند.

¹⁵ Minimum useful marker spacing

¹⁶ Inter-retrotransposon amplified polymorphism



شکل ۱. الگوی نواری آغازگر SCoT13 برای پرتودیده‌های ۱۵ و ۱۸ گری زعفران به همراه نمونه‌های شاهد. در این شکل، اعداد ۱ تا ۱۰ به ترتیب مربوط به Ctrl01 و Ctrl06 (تیمار بدون پرتوتابی)، 15G21، 15G36، 15G89 و 15G132 (پرتودیده‌های ۱۵ گری) و 18G22، 18G49، 18G105 و 18G138 (پرتودیده‌های ۱۸ گری) و M، نشانگر راهنما بر اساس جفت باز است.

Figure 1. The bands pattern of SCoT13 primer in 15 and 18 Gy irradiated saffron compared to control samples. In this figure, Numbers 01 to 10 are related to Ctrl01 and Ctrl06 (no radiation) 15G21, 15G36, 15G89 and 15G132 (15 Gy radiation) and 18G22, 18G49, 18G105 and 18G138 (18 Gy radiation) respectively. "M" is related to ladder marker per bp.

جدول ۲. شاخص‌های چندشکلی، قدرت تفکیک، میزان اطلاع دهنده‌گی نواری و محتوای چندشکلی آغازگرهای SCoT مورد مطالعه

Table 2. The polymorphism indices, Resolving power, band informativeness and polymorphic content in the studied SCoT primers

نام آغازگر	تعداد کل نواریهای تکثیر شده	تعداد نواریهای چندشکل	درصد چندشکلی	شاخص محتوای چندشکلی	شاخص نشانگر	شاخص قدرت تفکیک	اندازه نواریها
Primer name	Total number of bands	Number of polymorphic bands	Polymorphism %	Polymorphic Information Content (PIC)	Marker Index (MI)	Resolving power (Rp)	Band Size
SCoT 02	6	4	66.67	0.31	0.21	10.20	310-930
SCoT03	5	4	80.00	0.33	0.26	7.30	310-970
SCoT 04	3	2	66.67	0.43	0.28	6.00	740-950
SCoT 05	7	6	83.33	0.37	0.30	6.67	630-960
SCoT 11	5	2	40.00	0.45	0.18	9.60	140-860
SCoT 12	3	2	66.67	0.41	0.27	10.00	540-1100
SCoT 13	8	5	62.50	0.23	0.15	12.50	310-1900
SCoT 17	4	3	75.00	0.45	0.33	11.00	380-750
SCoT 30	6	5	83.33	0.25	0.21	15.67	90-780
تعداد کل Total	47	33					
میانگین Mean	5.22	3.67	69.35	0.36	0.24	8.77	

جدول ۳. ماتریس ضرایب تشابه جاکارد بر اساس نشانگر SCoT برای پرتودیده‌های ۱۵ و ۱۸ گری زعفران در مقایسه با نمونه‌های شاهد

Table 3. Jaccard's similarity coefficient matrix based on SCoT markers for 15 and 18 Gy irradiated saffron compared to control samples

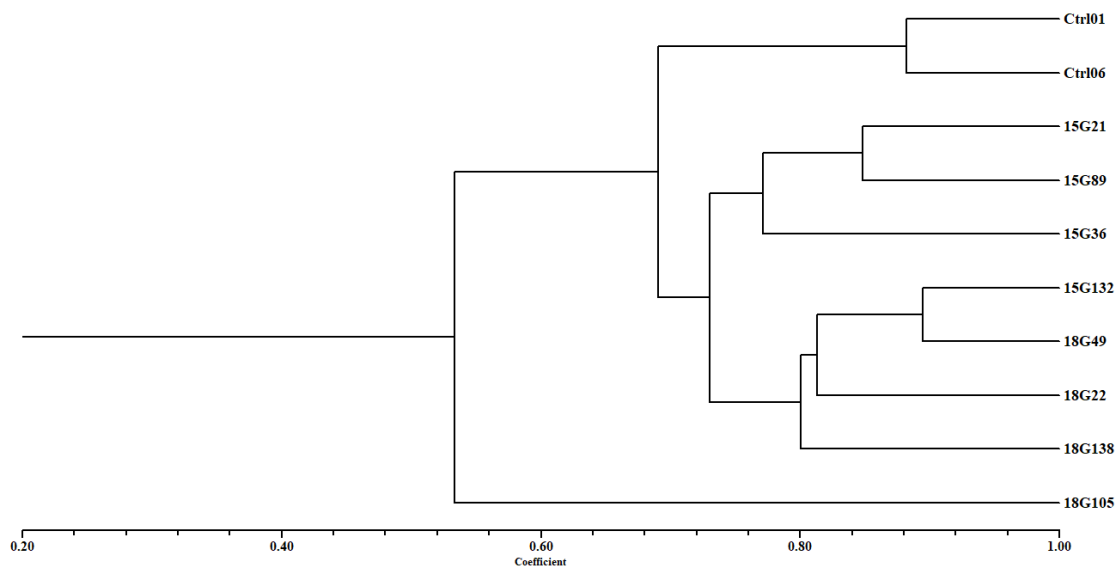
	Ctrl01	Ctrl06	15G21	15G36	15G89	15G132	18G22	18G49	18G105	18G138
Ctrl01										
Ctrl06	0.88									
15G21	0.69	0.73								
15G36	0.65	0.67	0.76							
15G89	0.67	0.74	0.85	0.81						
15G132	0.61	0.63	0.75	0.82	0.78					
18G22	0.55	0.59	0.65	0.72	0.69	0.78				
18G49	0.57	0.61	0.70	0.78	0.75	0.81	0.81			
18G105	0.45	0.48	0.59	0.67	0.62	0.71	0.81	0.75		
18G138	0.50	0.53	0.64	0.69	0.66	0.75	0.85	0.79	0.83	

در پژوهشی که به منظور گروه‌بندی اکوتیپ‌های زعفران بر اساس داده‌های مولکولی نشانگرهای SSR و iPBS^{۱۷} انجام شد، نتایج تجزیه خوشه‌ای حاصل از نشانگر، حاکی از آن بود که ۶ اکوتیپ زعفران مورد مطالعه، در ۳ خوشه گروه‌بندی شده است. اما اگر چه در این بررسی، نشانگر iPBS در مقایسه با نشانگر SSR، دارای کارایی بالاتری برای تعیین تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مورد مطالعه زعفران معرفی شد، اما نتایج نشان داد اکوتیپ‌های بیرجند، گناباد و همچنین اکوتیپ‌های تربت حیدریه و قائن از لحاظ هر دو تجزیه خوشه‌ای، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (Bayat et al. 2015). همچنین تجزیه خوشه‌ای داده‌های حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ توده زعفران با استفاده از نشانگر SRAP^{۱۸} نیز نشان داد که توده‌های مورد مطالعه به ۴ خوشه تقسیم‌بندی شدند که اکثر آنها در خوشه اصلی قرار گرفتند. به نحوی که این خوشه شامل ۲۲ توده زعفران از مناطق مختلف جغرافیایی بود و خوشه‌های دیگر هر کدام فقط شامل دو توده از این گیاه بودند (Babaei et al. 2014). بر این اساس، گروهی از محققین معتقدند هیچ گونه تنوعی در بین اکوتیپ‌های مختلف زعفران وجود ندارد (Rubio-Moraga et al. 2009; Alavi-Kia et al. 2008). اما در مطالعه‌ای که جهاندار زابلی و همکاران با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بر روی زعفران به منظور تعیین دوز مناسب القا جهش با استفاده از پرتو گاما انجام دادند، گزارش نمودند که نمونه‌های شاهد در این مطالعه کاملاً مشابه بودند در حالی که سایر نمونه‌های پرتودیده، در زیرگروه‌های متفاوتی از شاهد‌ها قرار گرفتند. در این پژوهش، محققین نشان دادند که پرتودیده‌های دوز ۵ و ۲۵ گری پرتو گاما با تیمار سرمایی مشابه به همراه پرتودیده ۱۰ گری با تیمار سرمایی متفاوت، در کنار یکدیگر و در یک گروه قرار گرفتند. نتایج این پژوهش نشان داد نه تنها در بنه‌های مورد مطالعه زعفران، جهش القایی توانسته در جهت ایجاد تنوع موثر باشد، بلکه نشانگرهای RAPD و ISSR در شناسایی نواحی چندشکلی و شناسایی جهش‌ها، مفید بودند (Jahandar

¹⁷. Inter-primer binding site

¹⁸ Sequence-related amplified polymorphism; SRAP

(Zaboli et al., 2022). بنابراین به نظر می‌رسد فارغ از ساختار اتوتریپلوئیدی و عقیم بودن گیاه زعفران که منجر به کاهش تنوع ژنتیکی در این گیاه شده است (Abdullaev 2002)، پرتوتایی توانسته نقش موثری در جهت تغییر ساختار ژنتیکی زعفران داشته باشد. در مطالعه حاضر نیز، استفاده از نشانگر SCoT توانست پرتودیده‌ها و نمونه‌های شاهد را در گروه‌های مجزایی تقسیم‌بندی نماید.



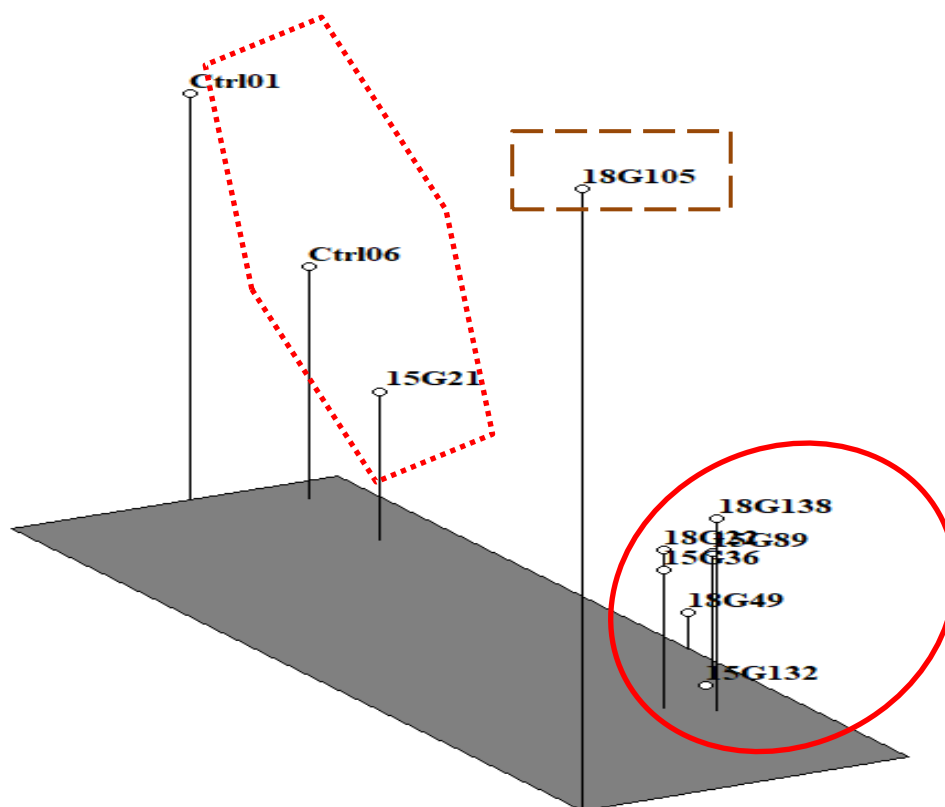
شکل ۲. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از UPGMA و بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای پرتودیده‌های ۱۵ و ۱۸ گری زعفران به همراه نمونه‌های شاهد

Figure 2. Dendrogram obtained from cluster analysis using UPGMA and based on Jaccard's similarity coefficient for 15 and 18 Gy irradiated saffron along with control samples

به منظور ارائه بینش بهتر در خصوص تفاوت‌های ژنتیکی بین پرتودیده‌ها و شاهد، تجزیه به مختصات اصلی^{۱۹} (یا تجزیه به مؤلفه‌های متعادل) انجام شد. تجزیه به مختصات اصلی به عنوان یک روش مکمل با تجزیه خوشه‌ای، منجر به استفاده بهینه از داده‌های مولکولی شده و به نوعی بیانگر میزان توزیع پراکندگی نشانگر در سطح ژنوم گیاه است. در واقع در این تجزیه، یک نمودار پراکندگی دو یا سه بعدی از نمونه‌ها ایجاد می‌شود که فاصله بین نمونه‌ها در نمودار، منعکس کننده فواصل ژنتیکی بین آنها با حداقل انحراف است. در این مطالعه، تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ماتریس تشابه جاکارد انجام و نتایج نشان داد که سه مؤلفه اول به ترتیب ۲۴/۲۹، ۱۹/۲۸ و ۱۴/۹۵ (در مجموع ۵۸/۵۲) درصد از تغییرات کل را توجیه نمودند. ترسیم پلات سه بعدی تجزیه به مختصات اصلی (شکل ۳)، نتایج تجزیه خوشه‌ای را تا حدود زیادی تأیید نمود. به نحوی که در این پلات، پرتودیده‌ها و نمونه‌های شاهد در سه

¹⁹ Principal Coordinates Analysis; PCoA

گروه تقسیم‌بندی شدند. گروه اول شامل دو نمونه شاهد به همراه پرتودیده 15G21 بود و گروه دوم شامل مابقی پرتودیده‌های ۱۵ و ۱۸ گری پرتو گاما به جز پرتودیده 18G105 بود. این پرتودیده به تنهایی در یک گروه مجزا قرار گرفت. در مطالعه‌ای که تنوع ژنتیکی زعفران اتوتریپلوئید منشأ گرفته از ۱۸ منطقه جغرافیایی مجزای ایران با استفاده از ۱۶ نشانگرهای ریزماهواره بررسی شد، سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های زعفران (بیش از ۸۰ درصد) و همچنین همبستگی معنی‌داری بین فواصل ژنتیکی و جغرافیایی مشاهده گردید. تجزیه خوشه‌ای این جمعیت‌ها را به سه گروه اصلی تقسیم کرد و تجزیه به مختصات اصلی نیز بیانگر توجیه حدود ۶۹ درصد از کل تنوع توسط صفات تاثیرگذار مهم بود (Alavi-Siney et al. 2022). در بررسی کارایی جهش القا شده با پرتو گاما بر روی لوبیای چشم بلبلی با استفاده از نشانگر SCOT، ضمن تأیید کارایی این نشانگر در تفکیک و گروه‌بندی پرتودیده‌ها، گزارش شد که تجزیه به مولفه‌های متعادل، دو گروه اصلی را نشان داده است به طوری که گروه اول شامل ۱۰ ژنوتیپ، گروه دوم شامل ۶ ژنوتیپ و سایر ژنوتیپ‌ها به طور جداگانه یا نزدیک به یکدیگر قرار گرفتند. همچنین پژوهشگران بیان نمودند که مولفه‌های اول، دوم و سوم به ترتیب ۴۵/۴۱، ۶۹/۰۳ و ۸۴/۶۹ درصد از تغییرات تجمعی را نشان دادند (Sankar et al. 2022).



شکل ۳. نمودار پراکنش سه بعدی با استفاده از تجزیه به مختصات اصلی برای پرتودیده‌های ۱۵ و ۱۸ گری زعفران در مقایسه با نمونه‌های شاهد

Figure 3. 3D scatter diagram using principal coordinate Analysis for 15 and 18 Gy irradiated saffron compared to control samples

نتایج تجزیه واریانس مولکولی، تنوع ژنتیکی مشاهده شده در مجموعه مورد ارزیابی را به دو بخش تنوع بین و درون گونه‌ها تفکیک نمود (جدول ۴). تجزیه واریانس مولکولی که طبق گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار GenALex انجام شد، نشان داد که درون گروه‌ها (سه گروه شامل شاهد، پرتودیده ۱۵ گری و پرتودیده ۱۸ گری)، تنوع بیش‌تر از بین گروه‌ها بود. بر این اساس، تنوع در درون گونه‌ها برابر ۷۸ درصد و در بین گروه‌ها برابر ۲۲ درصد برآورد گردید. وجود تنوع زیاد در درون جمعیت‌ها، نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های ژنتیکی زیاد افراد درون جمعیت از لحاظ مکان‌های ژنی تکثیر یافته و به عبارتی، ناهمگنی درون جمعیت است (Dadras et al. 2013). به نظر می‌رسد در مطالعات مربوط به القای جهش که به منظور ایجاد تنوع بر روی یک گونه و یا اکتیپ خاص صورت می‌گیرد، این تفاوت به شکل قابل توجه‌تری بروز می‌کند چرا که به دلیل ماهیت تصادفی بودن جهش، ممکن است تغییرات ساختاری که برای هر پرتودیده در درون یک جمعیت رخ می‌دهد، متفاوت باشد. در مطالعه‌ای که به منظور شناسایی تنوع فنوتیپی و ژنتیکی پرتودیده‌های برنج (*Oryza sativa* L.) با استفاده از نشانگر SSR انجام گرفت، محققین گزارش نمودند که تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی، حاکی از تمایز ژنتیکی قابل توجه بین گروه‌ها و درون گروه‌ها بود. به نحوی که تنوع ژنتیکی در بین گروه‌ها ۳۴ درصد گزارش شد اما در بین افراد درون گروه، ۶۶ درصد تنوع وجود داشت (Tu et al. 2018). در همین راستا، مطالعه دیگری به منظور ارزیابی مولکولی جهش‌یافته‌های کینو (Kinnow) در مقایسه با گیاهان شاهد با استفاده از نشانگر SSR انجام شد. نتایج تجزیه مولکولی این پژوهش نیز نمایانگر تنوع بیشتر درون گروه‌ها (۸۰٪) نسبت به بین گروه‌ها (۲۰٪) بود (Mallick et al. 2017).

جدول ۴. تفاوت بین و درون دو گروه پرتودیده ۱۵ و ۱۸ گری و شاهد بدون پرتوتابی با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی

Table 4. Differentiation Between and within two groups of 15 and 18 Gy irradiated and control genotypes by AMOVA

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس	درصد واریانس	PhiPT
S.O.V	df	Sum of Squares	Mean of Squares	Variance	Percentage of total variance	
بین جمعیتی Between Populations	2	41.9	20.95	3.132	٪22	0.002
درون جمعیتی Within Populations	7	76.5	10.92	10.929	٪78	
کل Total	9	118.4	31.87	14.06	٪100	

بر اساس نتایج بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی در پرتودیده‌ها و نمونه‌های شاهد مورد مطالعه، بیشترین آلل‌های مشاهده

شده (Na) در تیمار ۱۵ گری با ۱/۵۵ و کمترین مقدار آن در شاهد با ۱/۲۷۶۷ آلل برآورد گردید. آلل‌های مؤثر (Ne)، در جمعیت تیمار ۱۵ گری با ۱/۳۵۰۷ آلل بیشترین و در جمعیت شاهد با مقدار ۱/۱۸۰۰ کمترین بود. میزان تنوع در جمعیت ۱۵ گری بر اساس شاخص شانون و شاخص نی (برابر با $I=0/۲۰۶۱$ و $He=0/۳۰۶۴$) بیش از جمعیت شاهد و ۱۸ گری بود (جدول ۵).

جدول ۵. نتایج بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی در پرتودیده‌ها و نمونه‌های شاهد مورد مطالعه. Na: تعداد آلل‌های مشاهده شده؛ Ne: تعداد آلل‌های مؤثر؛ I: شاخص اطلاعات شانون؛ He: تنوع ژنی

Table 5. The results of examining the genetic diversity indices in the irradiated and control samples studied. Na: number of observed alleles; Ne: number of effective alleles; I: Shannon information index; He: genetic diversity

جمعیت	شاهد	تیمار 15 گری	تیمار 18 گری	میانگین
Population	Control	15 Gy treatment	18 Gy treatment	Mean
Na	1.2545	1.5500	1.3036	1.3693
Ne	1.1800	1.3507	1.2087	1.2464
I	0.1054	0.2061	0.1206	0.1440
He	0.1539	0.3046	0.1770	0.2124

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این پژوهش، نشانگرهای SCoT توانستند چندشکلی مناسبی را در تفکیک پرتودیده‌های ۱۵ و ۱۸ گری زعفران نسبت به نمونه‌های شاهد بدون پرتوتابی ارائه دهند. به طوری که SCoT17 با بیشترین محتوای چندشکلی و شاخص نشانگر و نیز بالاترین قدرت تفکیک پس از SCoT30 و SCoT13، توانست ضمن ایجاد پراکندگی مناسب‌تر در سطح ژنوم، کارایی بالاتری را در تمایز ژنوتیپ‌ها و بروز چندشکلی میان آنها نشان دهد. همچنین بر اساس ماتریس ضرایب تشابه جاکارد، تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی در مطالعه ما، هم‌راستا با مطالعاتی که با استفاده از سایر نشانگرهای هم‌بارز یا غالب بر روی زعفران انجام شده بود، نشانگرهای SCoT توانستند پرتودیده‌ها و نمونه‌های بدون پرتوتابی را در گروه‌های مجزایی تقسیم‌بندی نمایند. به نحوی که پرتودیده 18G105، در فاصله بیشتری از نمونه‌های شاهد و سایر پرتودیده‌ها، در گروه مجزایی قرار گرفت و می‌توان از آن در مطالعات اصلاحی بعدی استفاده نمود. در این مطالعه، به منظور بررسی تنوع بین و درون گروهی پرتودیده‌های ۱۵ و ۱۸ گری و نیز نمونه‌های شاهد، تجزیه واریانس مولکولی بر اساس سه گروه فوق، انجام و تنوع درون گروه‌ها بیشتر از بین گروه‌ها ارزیابی شد. به طور کلی، تفاوت در الگوی نواری نشانگرهای SCoT مورد مطالعه، الگوی خوشه‌بندی و یافته‌های فاصله ژنتیکی در پرتودیده‌ها نسبت به نمونه‌های شاهد، سودمندی پرتودهی گاما و کارایی جهش‌زایی را برای ایجاد تنوع در گیاه زعفران نشان دادند.

سپاسگزاری: نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از آقایان دکتر علی ایزانلو، دکتر سعید ترکش اصفهانی، خانم دکتر اعظم برزویی

و نیز پژوهشکده کشاورزی پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای که در تمام مراحل عملیاتی و نگارش این پژوهش در کنار ما بودند، قدردانی نمایند. همچنین از داوران محترم که با ارائه نظرات ارزشمند خود باعث ارتقا سطح علمی و نگارشی این پژوهش شدند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

بهدانی محمدعلی، ایزانلو علی (۱۳۹۸) بررسی تنوع ژنتیکی در زعفران های با بیش از سه کلاله با استفاده از نشانگر مولکولی SSR و ISSR. زراعت و فناوری زعفران. ۷(۳)، ۳۵۸-۳۴۷.

بیات مهدی، امیرنیا رضا، تاجبخش مهدی، تانیولاج باتین (۱۳۹۵) ارزیابی تنوع ژنتیکی زعفران (*Crocus sativus L.*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی iPBS و SSR. نشریه پژوهش‌های زعفران. ۴(۱)، ۱۱۹-۱۰۳.

دادرسی احمدرضا، صبوری حسین، محمدی نژاد قاسم، صبوری عاطفه، شعاعی دیلمی مرداویج (۱۳۹۲) بررسی تنوع ژنتیکی ارقام توتون دسته بارلی و ویرجینیا با استفاده از چند شکلی طولی قطعات تکثیر. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی کرمان ۵(۲)، ۴۳-۲۹.

سیفتی سید ابراهیم، محیط اردکانی علی محمد، ایزانلو علی، برزویی اعظم (۱۳۹۹) القای تنوع مورفوفیزیولوژیکی در زعفران (*Crocus sativus L.*) با استفاده از پرتو گاما. نشریه پژوهش‌های زعفران. ۹(۱)، ۱۲۹-۱۱۵.

شکرپور مجید، عابدی زینب، کلانتری سیامک، سلامی سید علیرضا (۱۳۹۵) بررسی تنوع ژنتیکی برخی نمونه‌های زعفران ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR. زراعت و فناوری زعفران ۴(۴)، ۲۶۵-۲۵۷.

محمدی فرآمنه، محمدآبادی، محمدرضا (۱۳۹۰). کاربرد نشانگرهای ریزماهواره برای مطالعه ژنوم گوسفند کرمانی. علوم دامی ایران ۴۲ (۴)، ۳۳۷-۳۴۴.

محیط اردکانی علی محمد، سیفتی سید ابراهیم، ایزانلو علی، کریمی‌بکر زهرا (۱۴۰۱) تاثیر پرتو گاما بر برخی شاخص‌های رشدی و فیتوشیمیایی زعفران (*Crocus sativus L.*). زراعت و فناوری زعفران ۱۰(۳)، ۲۸۶-۲۷۳.

References

- Abdullaev F (2006) Biological properties and medicinal use of saffron (*Crocus sativus L.*). Proceedings of the second International Symposium on Saffron Biology and Technology. Mashhad, Iran. p. 339-345 (In Persian).
- Alavi-Kia SS, Mohammadi SA, Aharizad S, Moghaddam M (2008) Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in *Crocus* genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism. *Biotechnol Equip* 22, 795-800.
- Alavi-Siney SM, Saba J, Nasiri J (2022) Genetic variability and population genetic structure in autotriploid saffron using allelic phenotypes of microsatellite markers. *Sci Hortic* 299, e111043.

- Altıntas S, Toklu F, Kafkas S et al. (2008) Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breed* 127, 9-14.
- Babaei S, Talebi M., Bahar M, Zeinali H (2014) Analysis of genetic diversity among saffron (*Crocus sativus*) accessions from different regions of Iran as revealed by SRAP markers. *Sci Hortic* 171, 27-31.
- Bayat M, Amir Niya R, Taj bakhsh M, Tanyvlach B (2015) Evaluation of genetic diversity of saffron (*Crocus sativus* L.) using iPBS and SSR molecular markers. *J Saffron Res* 4(1), 103-119 (In Persian).
- Busconi M, Soffritti G, Stagnati L, et al. (2018) Epigenetic stability in Saffron (*Crocus sativus* L.) accessions during four consecutive years of cultivation and vegetative propagation under open field conditions. *Plant Sci* 277, 1-10.
- Chesnokov YV, Artemyeva AM (2015) Bioinformatics and math statistics. *Agric Biol* 50(5), 571-578.
- Collard BC, Mackill DJ (2009) Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Mol Biol Rep* 27(1), 86-93.
- Dadras AR, Sabouri H, Mohammadi Nezhad Q, et al. (2013) Investigation of genetic diversity of Barley and Virginia tobacco varieties using Amplified Fragment Length Polymorphism. *Agric Biotechnol J* 5(2), 29-44 (In Persian).
- Darvasi A, Soller M (1997) A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location. *Behav Genet* 27(2), 125-132.
- El-Mogy MM, Atia MA, Dhawi F, et al. (2022) Towards Better Grafting: SCoT and CDDP Analyses for Prediction of the Tomato Rootstocks Performance under Drought Stress. *J Agron* 12(1), 1-21.
- Gaitán-Espitia JD, Hobday AJ (2021) Evolutionary principles and genetic considerations for guiding conservation interventions under climate change. *Glob Change Biol Bioenergy* 27(3), 475-488.
- Gautam N, Bhattacharya A (2021) Molecular marker based assessment of genetic homogeneity within the in vitro regenerated plants of *Crocus sativus* L.–a globally important high value spice crops. *Afr J Bot* 140, 461-467.
- Gooki FG, Mohammadabadi M, Fozi MA, Soflaei M (2019) Association of Biometric Traits with Growth Hormone Gene Diversity in Raini Cashmere Goats. *Walailak J Sci Technol* 16 (7), 499-508.

- Hong MJ, Kim DY, Jo YD et al. (2022) Biological Effect of Gamma Rays According to Exposure Time on Germination and Plant Growth in Wheat. *Appl Sci* 12(6), 3208.
- Jahandar Zaboli F, Izanloo A, Ghaderi MG, Rahimi M (2022) Radiosensitivity Test to Determine the Suitable Dose of Induce Mutation in Saffron (*Crocus sativus* L.). *J Saffron Res* 9(2), 259-243 (In Persian).
- Jun Z, Xiaobin C, Fang C (2006) The Effects of ^{60}Co γ -Irradiation on Development of *Crocus sativus* L. In II International Symposium on Saffron Biol Tech 739, 307-311.
- Katiyar P, Pandey N, Keshavkant S (2022) Gamma Radiation: A Potential Tool for Abiotic Stress Mitigation and Management of Agroecosystem. *J Plant Stress* 16, e100089.
- Khan MA, Nagoo S, Naseer S, et al. (2011) Induced mutation as a tool for improving corm multiplication in saffron (*Crocus sativus* L.). *J Phytol* 3(7), e2314.
- Khorramdel S, Eskandari Nasrabadi S, Mahmoodi G (2015) Evaluation of mother corm weights and foliar fertilizer levels on saffron (*Crocus sativus* L.) growth and yield components. *J Appl Res Med Arom Plant* 2, 9–14.
- Kolakar SS, Nadukeri S, Jakkeral SA, et al. (2018) Role of mutation breeding in improvement of medicinal and aromatic crops. *J Pharmacogn Phytochem* 3, 425-429.
- Leone S, Recinella L, Chiavaroli A, et al (2018) Phytotherapeutic use of the *Crocus sativus* L.(Saffron) and its potential applications: A brief overview. *Phyther Res* 32(12), 2364-2375.
- Mallick M, Bharadwaj C, Srivastav M, et al. (2017) Molecular characterization of Kinnow mandarin clones and mutants using cross genera SSR markers. *Indian J Biotechnol* 16, 244-249.
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JE, et al. (1997) Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol Breed* 3, 127-136.
- Mir JI, Ahmad N, Sing DB, et al. (2015) Breeding and biotechnological opportunities in saffron crop improvement. *Afr J Agric Res* 10(9), 970–974
- Mirzaei S, Salari H (2021) Study on the genetic diversity of tomato's cultivars via SCoT marker. *Agric Biotechnol J* 13(4), 101-120.
- Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2011) Application of Microsatellite Markers for a Study of Kermani Sheep Genome. *Iran J Anim Sci* 42 (4), 337-344 (In Persian).
- Mohit-Ardakani AM, Seifati SE, Izanloo A, Karimi-bekr Z (2022) The Effect of Gamma Radiation on Some Growth and Phytochemical Indices of Saffron (*Crocus sativus*). *Saffron Agron Tech* 10(3), 273-285 (In Persian).
- Ren N, Timko MP (2001) AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome* 44(4), 559-571.

- Rubio-Moraga A, Castillo-López R, Gómez-Gómez L, et al. (2009) Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and microsatellite analyses. BMC Res Note 2, 1-5.
- Sankar V, Dhanarajan A, Gurunathan S, Elangovan D (2022) ⁶⁰Co gamma ray induced mutants of cowpea and assessment of genetic variability by SCoT marker. Plant Sci Today 9(3), 672-680.
- Seifati SE, Mohit Ardakani AM, Izanloo A, Borzoei A (2021) Induced Morpho-physiological Variation in Saffron (*Crocus sativus* L.) Using Gamma Radiation. J Saffron Res 9(1), 115-129 (In Persian).
- Shaban AS, Arab SA, Basuoni MM, et al. (2022) SCoT, ISSR, and SDS-PAGE Investigation of Genetic Diversity in Several Egyptian Wheat Genotypes under Normal and Drought Conditions. Int J Agron 3, 1-14.
- Sharaf-Eldin MA, Alam P, Elkholy SF (2019) Molecular and chemical characterization of mutant and nonmutant genotypes of saffron grown in Saudi Arabia. Food Sci Nutr 7(1), 247-255.
- Shokrpour M (2019) Saffron (*Crocus sativus* L.) breeding: opportunities and challenges. Advances in plant breeding strategies. Ind Crops Prod 675-706.
- Sivasankar S (2022) New CRP: Radiation-induced Crop Diversity and Genetic Associations for Accelerating Variety Development. IAEA, D24015.
- Smith JSC, Kresovich S, Hopkins MS, et al. (2000) Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats. Crop sci 40(1), 226-232.
- Toricelli R, Yousefi JAVAN, Albertini E, et al. (2019) Morphological and molecular characterization of Italian, Iranian and Spanish saffron (*Crocus sativus* L.) accessions. Appl Ecol Environ Res 17, 1875-1887.
- Tu Anh TT, Khanh TD, Dat TD, Xuan TD (2018) Identification of phenotypic variation and genetic diversity in rice (*Oryza sativa* L.) mutants. Agriculture 8(2), 30.