



## القای تنوع مورفوفیزیولوژیکی در زعفران (*Crocus sativus* L.) با استفاده از پرتو گاما

علی محمد محیط اردکانی<sup>۱</sup>، سید ابراهیم سیفتی<sup>۲</sup>، علی ایزانلو<sup>۳</sup>، اعظم برزویی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده منابع طبیعی و کشاورزی، دانشگاه یزد

۲- استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده منابع طبیعی و کشاورزی، دانشگاه یزد

۳- دانشیار بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۴- دانشیار فیزیولوژی پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای ایران

\*نویسنده مسئول: Email: seifati@yazd.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۲۳

### چکیده

به منظور بررسی تنوع بانه‌های پرتوتابی شده در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج در دو سطح ۱۵ و ۱۸ گری پرتو گاما به همراه ژنوتیپ شاهد (بدون پرتوتابی)، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت نامتعادل در گلخانه دانشگاه یزد اجرا و تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های مورفوفیزیولوژیک شامل تعداد ساقه و گل، طول ساقه، گل و کلاله، روز تا گلدهی و برداشت، وزن تر و خشک گل و وزن خشک کلاله، محتوای کلروفیل، کارتنوئید و پرولین برگ با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. نتایج نشان داد که جهش‌یافته‌های نسل اول و ژنوتیپ شاهد از نظر ۸ خصوصیت مورفولوژیک و میزان کارتنوئید کل دارای تفاوت معنی‌داری بودند. اما اختلاف معنی‌داری در بین آنها براساس صفات تعداد ساقه، تعداد گل و نیز محتوای کلروفیل و پرولین برگ، مشاهده نشد. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دو گروه قرار گرفتند و صحت گروه‌بندی بر اساس تابع تشخیص، ۹۳ درصد به دست آمد. گروه اول شامل ۲۴ جهش‌یافته ۱۸ گری و یک ژنوتیپ شاهد بود. در گروه دوم نیز تمام جهش‌یافته‌های ۱۵ گری، ۶ جهش‌یافته ۱۸ گری و ۱۰ ژنوتیپ شاهد قرار داشتند. براساس نمایش گرافیکی روش تجزیه بای‌پلات، ۷ جهش‌یافته دز ۱۸ گری و ۵ جهش‌یافته مربوط به دز پرتوتابی ۱۵ گری، در رئوس چندضلعی قرار گرفتند که حاکی از بیشترین تفاوت آنها با ژنوتیپ بدون پرتوتابی بود. بر همین اساس، صفات مرتبط با عملکرد و رشد زایشی گیاه، بیشترین اثر را در تعیین جهش‌یافته‌های برتر داشتند. باتوجه به هدف این مطالعه، دز ۱۵ گری گاما منجر به ایجاد جهش‌یافته‌هایی با عملکرد بهتر و دز ۱۸ گری، تنوع مورفوفیزیولوژیک بیشتری را در بانه‌های زعفران، ایجاد نمود.

واژه‌های کلیدی: اصلاح موتاسیونی، تنش گاما، جی‌جی‌بای پلات، زعفران، عملکرد

## مقدمه

زعفران، متعلق به خانواده زنبقیان، یکی از شناخته شده‌ترین گیاهان دارویی، ادویه‌ای و از گونه‌های گیاهی معطر در جهان به‌شمار می‌رود. گیاهی با گل‌های پاییزی که به طلای سرخ معروف بوده و به عنوان گران‌قیمت‌ترین محصول کشاورزی جهان، جایگاه ویژه‌ای در محصولات صنعتی و صادراتی ایران دارد (Kafi et al., 2009). امروزه نیاز جهان به استفاده از کلاله‌های این گیاه نه تنها به خاطر تولید و استفاده از آن به‌عنوان ادویه، بلکه به جهت خصوصیات متعدد دارویی و کاربردهای صنعتی آن است (Lim, 2014). در واقع زعفران گیاهی اتوتریپلوئید ( $2n=3x=24$ )، نازا و نرعقیم است که ارتفاعی بین ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر داشته و تکثیر آن به صورت غیرجنسی و از طریق بنه‌های دختری می‌باشد. این گیاه که دارای مجموعه‌ای از ویژگی‌های زراعی، زیست محیطی و فیزیولوژیکی منحصر به فرد از جمله نیاز آبی کم، راندمان مصرف آب بالا، رشد و نمو در طول پاییز و زمستان است. از نظر گیاه‌شناسی، دارای گل‌هایی با سه پرچم و یک مادگی منتهی به کلاله سه‌شاخه به رنگ قرمز متمایل به نارنجی است (Abootalebian et al., 2017). با توجه به تکثیر غیرجنسی زعفران، اعتقاد بر این است که در سراسر جهان فقط یک رقم از این گیاه بارزش وجود دارد، بنابراین به دلیل عدم تنوع ژنتیکی، انتخاب و دست‌یافتن به ژنوتیپ‌های بهبود یافته با محدودیت مواجه شده است. استفاده از جهش در اصلاح گیاهان، به‌ویژه در گیاهانی با تکثیر غیرجنسی مانند زعفران، می‌تواند راه‌کاری مناسب برای دستیابی به تنوع ژنتیکی باشد (Mir et al., 2015). همچنان که در ۷۰ سال گذشته از جهش‌زاهای فیزیکی و شیمیایی به منظور ایجاد تنوع در گیاهان زراعی و تولید بسیاری از ارقام جهش یافته استفاده شده است (Jain, 2005).

در این بین، پرتوی گاما یکی از پرکاربردترین جهش-زاهای فیزیکی در برنامه‌های اصلاح گیاهان است چراکه علاوه بر در دسترس بودن چشمه مولد آن (کبالت ۶۰) در بسیاری از مراکز تحقیقاتی دنیا، تعیین دز دقیق مورد استفاده، تکرارپذیری قابل قبول، نفوذ بالا و یکنواخت در موجودات پرسولوی، از جمله مزایای مهم

استفاده از آن به‌شمار می‌رود (Ahloowalia and Maluszynski, 2001). به‌طور کلی، نتایج تحقیقاتی که بر روی گیاهان جهش‌یافته انجام شده است، نشان می‌دهد که برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی جهش‌یافته‌ها، می‌توان از خصوصیات مورفولوژیک (همچون تعداد گل، طول گل، وزن خشک و تر) و فیزیولوژیکی آنها در مقایسه با ژنوتیپ شاهد استفاده نمود (Rubio-Moraga et al., 2009).

در پژوهشی که به منظور شناسایی ژرم‌پلاسم مناسب با استفاده از شش نمونه زعفران ایرانی و دو نمونه زعفران ایتالیایی در ایتالیا انجام گرفت، از ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه زعفران جهت بررسی تنوع موجود در میان نمونه‌های کشت شده، استفاده گردید. نتایج مطالعه نشان داد که نمونه‌های ایتالیایی تعداد بیشتری گل نسبت به نمونه‌های ایرانی تولید نموده و قطر بنه، همبستگی مثبت و بالایی با تولید گل داشت (Torricelli et al., 2019).

در پژوهشی جهت بررسی تأثیر دزهای مختلف اشعه گاما بر گیاه زعفران، ۱۰۰ بنه زعفران به قطر ۴-۳ سانتی‌متر انتخاب و با دزهای ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ کیلو راد با چشمه  $^{60}Co$  تحت تابش پرتو گاما قرار گرفتند. تیمارها از نظر زمان جوانه‌زنی، ارتفاع گیاه، القای گلدهی و تعداد گلبرگ با شاهد مقایسه شدند. تاخیر در جوانه‌زنی و رشد آهسته در دزهای بالاتر (۲، ۲/۵ و ۳ کیلو راد)، افزایش ارتفاع گیاه در دزهای پایین‌تر (۰/۵ و ۱ کیلو راد) و کاهش ارتفاع در دزهای بالاتر (۲، ۲/۵ و ۳ کیلو راد) رخ داد. همچنین القای گلدهی در دزهای متوسط (۱، ۱/۵ و ۲ کیلو راد) مشاهده گردید (Khan, 2003).

در بررسی دیگری بنه‌های زعفران با وزن یکنواخت (۱۰ گرم) جمع‌آوری و تحت تأثیر ۵ دز ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ کیلو راد اشعه گاما قرار گرفت. همچنین از موتاژن‌های شیمیایی، اتیل متیل سولفانات (۰/۱ و ۰/۲ درصد)، اتیدیوم بروماید<sup>۳</sup> (۰/۱ و ۰/۲ درصد) و کلشی‌سین<sup>۴</sup> (۰/۵۰ درصد) استفاده شد. در بین موتاژن‌های فیزیکی حداکثر تعداد گل در نسل  $M_1$  و  $M_2$  با القا دز ۰/۲ کیلو راد، همراه با کاهش تعداد گل در

2. Ethyl Methyl Sulphonate

3. Ethidium Bromide

4. Colchicine

1. Iridaceae

نامیده می‌شود، ژنوتیپ‌ها به عنوان لاین و صفات به عنوان تستر<sup>۳</sup> مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند (Yan and Kang, 2002). این روش ابزاری قدرتمند برای ارزیابی و شناسایی ژنوتیپ‌های مطلوب از لحاظ چند صفت می‌باشد. بنابراین می‌توان از ژنوتیپ‌های متنوع شناسایی شده به عنوان والد در برنامه‌های اصلاحی و یا به طور مستقیم برای تولید لاین‌های تجاری استفاده نمود.

از دیگر روش‌هایی که می‌توان برای بررسی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه استفاده کرد، روش تجزیه خوشه‌ای است که در این روش می‌توان ژنوتیپ‌ها را در گروه‌های مختلفی، دسته‌بندی نمود. ژنوتیپ‌های موجود در یک گروه نسبت به ژنوتیپ‌های موجود در گروه‌های دیگر دارای قرابت ژنتیکی بیشتری هستند. در واقع استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای برای مطالعه تنوع ایجاد شده در بین آنها بسیار مفید خواهد بود، چراکه به جای صرف وقت و انرژی زیاد برای انجام تلاقی‌های متعدد، می‌توان از برترین ژنوتیپ‌ها در گروه‌های دور حاصل از تجزیه خوشه‌ای با توجه به صفات مورد نظر، در دورگیری یا پیش‌برد نسل‌ها استفاده نمود و به نتایج هدفمند و دقیق‌تری در برنامه‌های اصلاحی دست یافت (Hossainzade Fashalami et al., 2015).

به‌طور کلی با توجه به اینکه زعفران گیاهی آتوتریپلوئید و عقیم بوده و همچنین تنوع ذخائر گیاهی در آن کم است، هدف از این پژوهش، بررسی تنوع ایجاد شده توسط پرتو گاما بر روی بنه‌های زعفران در کشت گلخانه‌ای به منظور ردیابی بهتر بنه‌های دختری جهش‌یافته با استفاده از برخی صفات مورفوفیزیولوژیک مرتبط با عملکرد و زودرسی بود.

### مواد و روش‌ها

در مرحله آماده سازی مواد آزمایشی، بنه‌های سالم و توپر زعفران در مرداد ماه ۱۳۹۸ از مزارع استان خراسان جنوبی، شهرستان قائن با طول  $29^{\circ} 23' 11''$  و  $59^{\circ} 11'$  عرض  $31^{\circ} 31' 43''$  و با ارتفاع ۱۴۴۶ متر از سطح دریا برداشت و بر اساس اندازه مرتب شدند. سپس بنه‌های سالم ۱۲ تا ۱۵ گرمی انتخاب و پس از حذف

دزهای بالاتر، افزایش تعداد گل با حداکثر وزن گل و حداکثر وزن کلاله همراه بود. در میان جهش‌های شیمیایی تیمار اتیدیوم بروماید (۰/۲ درصد) حداکثر تعداد گل را نشان داد. اتیل متیل سولفونات (۰/۲ درصد) حداکثر تعداد گل را نشان داد (Nehvi et al., 2009).

به منظور چنده‌سنجی<sup>۱</sup> و اصلاح گیاه زنبق ایرانی (*Iris persica L.*)، محققین دزهای ۵، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ گری حاصل از پرتوی گاما را با ژنوتیپ شاهد (بدون پرتو) مورد مقایسه قرار دادند. نتایج نشان داد که با افزایش دز پرتو از ۵ تا ۱۵ گری، افزایش معنی‌داری در تجمع کارتنوئید گلبرگ‌ها نسبت به شاهد مشاهده شد اما با همین افزایش، محتوای کلروفیل کاهش یافت. همچنین این محققین گزارش نمودند که با افزایش دز پرتوتابی، روند افزایش در تجمع پرولین مشاهده شد (Jozghasemi and Rabiei, 2019).

شناسایی ژنوتیپ‌های مطلوب از لحاظ چند صفت، یکی از اهداف اولیه برنامه‌های اصلاح‌نبات می‌باشد. به این منظور، صفات مورد استفاده در انتخاب ژنوتیپ‌های مطلوب از نظر صفات کمی و کیفی باید به وضوح مشخص باشند. چنین صفاتی در ترکیب با صفات مهم اقتصادی می‌توانند برای به حداکثر رساندن عملکرد ژنوتیپ‌های انتخاب شده به کار گرفته شوند. جهت نیل به این هدف، چندین روش آماری شامل تجزیه همبستگی، تجزیه رگرسیون چندگانه و تجزیه ضرایب مسیر توسط متخصصین اصلاح‌نبات به‌طور گسترده‌ای استفاده شده است. کلیه این روش‌ها دارای این نقص عمومی هستند که قادر به شناسایی ژنوتیپ‌های مطلوب از نظر مجموعه‌ای از صفات نمی‌باشند. در روش جی‌جی‌ای بای‌پلات<sup>۲</sup> از دو مؤلفه اصلی اول که از طریق تجزیه مقادیر ویژه روی داده‌های عملکرد چند محیط حاصل می‌شود استفاده نموده‌اند. اگرچه این روش برای تجزیه آزمایش‌های چند مکانی معرفی شده است ولی برای هر نوع داده‌ای که ساختار دوطرفه به عنوان لاین-تستر، ژنوتیپ × محیط یا ژنوتیپ × صفت دارند قابل استفاده است (Yan, 2001). در تجزیه بای‌پلات بر اساس چند صفت که اصطلاحاً جی‌جی‌ای بای‌پلات

1. Dosimetry  
2. GGE-Biplot

بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف در نرم‌افزار SPSS (ver. 25) بررسی شد. سپس تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت نامتعادل انجام شد. مقایسه میانگین داده‌های نرمال شده با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد و همبستگی پیرسون بر روی کلیه صفات انجام گرفت. به منظور بررسی تنوع و مقایسه گروهی ژنوتیپ‌های پرتوتایی شده و شاهد، تجزیه خوشه‌ای<sup>۱</sup> به روش وارد<sup>۲</sup> و تجزیه بای‌پلات براساس صفات یادداشت‌برداری شده انجام گردید.

صفات مورفولوژیک بررسی شده در این مطالعه شامل میانگین تعداد ساقه، تعداد گل، طول ساقه (cm)، طول گل (cm)، طول کلاله (cm)، روز تا گلدهی و روز تا برداشت، میانگین وزن تر و خشک گل و وزن خشک کلاله بر حسب گرم بود که با استفاده از شمارش و یا سایر ابزارهای اندازه‌گیری همچون خط‌کش (با دقت میلی‌متر) و ترازوی دقیق آزمایشگاهی (با دقت ۰/۰۰۱)، یادداشت‌برداری گردید.

به منظور اندازه‌گیری محتوای کلروفیل و کارتنوئید کل برگ، مقدار ۰/۲ گرم از پهنک آخرین برگ توسعه یافته، با نیتروژن مایع در هاون چینی پودر شد. سپس نمونه‌های برگ با اضافه کردن استون ۸۰ درصد، داخل هاون له شدند. سپس محتوی هر فاکون با استون ۸۰ درصد به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. میزان جذب نوری هریک از عصاره‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل SPECORD 210, Analytik Jena AG) در سه طول موج ۴۷۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد. داده‌های حاصل جهت محاسبه محتوای کلروفیل (mg/g) برگ تازه) و محتوای کارتنوئید کل در روابط زیر وارد شدند (Lichtenthaler, 1987).

**Acetone (80%, v/v):** (فرمول ۱)

$$\text{Chlorophyll a (mg/g)} = (12.25 \times \text{abs663}) - (2.79 \times \text{abs646}) \text{ mL acetone/mg}$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/g)} = (21.21 \times \text{abs646}) - (5.1 \times \text{abs663}) \text{ mL acetone/mg}$$

$$\text{Total Chlorophyll (mg/g)} = (\text{mg/g}) = (7.15 \times \text{abs663}) + (18.71 \times \text{abs646}) \text{ mL acetone/mg}$$

لایه‌های غشایی<sup>۱</sup> از روی بنه، با آب شستشوی سطحی شدند. بنه‌ها، سپس با هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی و به مدت یک ماه تحت تیمار سرمایی جهت شکستن خواب، درون یخچال در دمای ۴°C قرار گرفتند. در مرحله بعد به منظور ایجاد تنوع، بنه‌های زعفران به صورت تصادفی به سه بخش ۱۵۰ تایی تقسیم و دو بخش از آن جهت پرتوتایی با تابش گاما (با استفاده از چشمه <sup>60</sup>Co) در دو سطح ۱۵ و ۱۸ گری مطابق با یافته‌های مطالعات انجام شده جهت تعیین بهترین دز پرتوی گاما (Khan et al., 2011; Jun et al., 2006)؛ به پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج ارسال گردید. به منظور سهولت رهگیری بنه‌های دختری در نسل‌های بعدی و نیز با توجه به تفاوت دز دریافتی بنه‌ها در هر سطح پرتوتایی، کشت گلخانه‌ای انتخاب و برای هر بنه، گلدانی با قطر ۱۲ و ارتفاع ۱۱/۵ سانتی‌متر که با مخلوطی از خاک لومی-شنی و کود کمپوست گیاهی کاملاً پوسیده به نسبت ۱:۱ پر شده بودند، در نظر گرفته شد. بلافاصله پس از پرتودهی، بنه‌ها به گلدان‌های آماده شده در گلخانه پژوهشی دانشگاه یزد با طول جغرافیایی ۳۲°۲۱' ۴۴" و عرض جغرافیایی ۴۷°۳۳' ۴۹" و ارتفاع ۱۲۶۹ متر از سطح دریا منتقل و به همراه بنه‌های بدون پرتو (شاهد)، در عمق ۷ سانتی-متری گلدان کشت گردیدند. هر گلدان حاوی یک بنه پرتوتایی شده در سطوح ۱۵ و ۱۸ گری، به عنوان یک تکرار برای آن سطح پرتوتایی در نظر گرفته شد تا تنوع ناشی از دریافت دز پرتوی گاما نیز به طور دقیق، مشاهده و یادداشت‌برداری شود. همچنین در طول مرحله رشد رویشی، دو مرتبه به فاصله هر ۲۵ روز، از کود پودری قابل حل در آب شرکت گیاه که حاوی عناصر اصلی (۶-۳۰-NPK) و عناصر ریزمغذی بود به صورت محلول در آب آبیاری و به صورت یکسان برای هر گلدان استفاده گردید. در تمام مراحل رشد رویشی و زایشی، دما، نور، رطوبت و دفعات آبیاری گلدان‌ها در گلخانه مشابه با شرایط محیطی مزرعه تنظیم گردید.

در نهایت از بین گلدان‌های کشت شده، ۳۰ گلدان برای هر سطح پرتوتایی به همراه ۱۱ گلدان از ژنوتیپ شاهد (بدون پرتو) برای این مطالعه انتخاب و ابتدا نرمال

2. Cluster analysis

3. Ward method

1. Tunica layers

تنها در گیاهان سطح ۱۸ گری، معنی دار بود (شکل ۱). از سوی دیگر، مطابق با نتایج جدول همبستگی (جدول ۲) که حاکی از رابطه عکس و معنی دار این گروه از صفات با صفات مرتبط با زودرسی بود، بازهم جهش یافته‌های ۱۸ گری بودند که در دو صفت روز تا گلدهی و روز تا برداشت نسبت به دو سطح دیگر افزایش معنی داری را نشان دادند. به عبارت دیگر، در جهش یافته‌های ۱۵ گری، پرتوی گاما نتوانست تغییر معنی داری را در صفات مرتبط با رشد طولی و زودرسی گیاه ایجاد نماید و بیشترین تغییر در گیاهان دز ۱۸ گری مشاهده گردید. خان (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای که بر روی جهش یافته‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ گری زعفران حاصل از تابش پرتو گاما انجام داد، گزارش نمود که پرتوتابی بر روی خصوصیات جوانه‌زنی، رشد و روز تا گلدهی این گیاهان موثر بوده است اما بر روی تعداد گل، تاثیر معنی داری نداشت. به طوری که این تغییرات در جهش یافته‌های ۵ و ۱۰ گری نسبت به شاهد افزایش و در دزهای بالاتر از ۲۰ گری، با افزایش میزان پرتوی گاما، روند کاهشی معنی داری را به خود گرفته است. در این مطالعه، تاخیر در جوانه‌زدن، کاهش رشد در دزهای بالاتر، افزایش و یا کاهش ارتفاع گیاه و نیز تغییر در مدت زمان گلدهی در جهش یافته‌های نسل اول در دزهای پایین‌تر، ناشی از تغییرات تولید اکسین در طی مراحل رشد و جوانه‌زنی گزارش شد. در حالی که در تحقیقی که بر روی جهش یافته‌های گل داوودی انجام شد، نتایجی مشابه نتایج این پژوهش به دست آمد و محققین دلیل آن را ناشی از میزان و ماهیت تغییرات کروموزومی بیان نمودند (Banerji and Datta, 2002). در همین راستا، در تحقیق دیگری که به منظور بهبود صفات مرتبط با عملکرد و کیفیت متابولیت‌های ثانویه بر روی جهش یافته‌های ۵، ۱۵ و ۲۵ گری زعفران انجام شد، محققین گزارش نمودند که تأثیر مثبت و معنی داری در بین جهش یافته‌ها از نظر صفات تعداد گل و ارتفاع گیاه نسبت به ژنوتیپ شاهد وجود دارد به طوری که گیاهان سطوح ۵ و ۱۵ گری پرتوی گاما نسبت به شاهد افزایش و گیاهان دز ۲۵ گری، کاهش معنی داری را نشان دادند (Ahamed, 2019).

$$Cx+C (mg/g) = \frac{\{(1000abs470) - (1.8Chlorophyll a) - (85.02Chlorophyll b)\}}{198}$$

همچنین برای تعیین محتوای پرولین، ۰/۵ گرم برگ تازه گیاه، با هاون خرد و درون میکروتیوب ریخته شد. سپس ۱۰ ml سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ به آن اضافه و نمونه درون یخ قرار داده شد. هر تیوب در دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شد تا مواد اضافی از محلول جدا شود. مقدار ۲ ml از عصاره بالای درون تیوب جدید ریخته و ۲۰ ml معرف ناین هیدرین<sup>۲</sup> (۱/۲۵) گرم ناین هیدرین + ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۶ مولار + ۳۰ میلی لیتر اسید استیک خالص) و ۲ ml اسید استیک<sup>۳</sup> به هر یک از تیوب‌های محتوی عصاره و یا استاندارد افزوده شد. تیوب‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب جوش در دمای ۱۰۰°C قرار گرفته و سپس به منظور خنک شدن به مخلوط آب و یخ منتقل شدند. مقدار ۶ ml تولوئن به محلول افزوده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد تا فاز مشخص پرولین پدید آید. میزان جذب نور ۱ ml از فاز بالایی تیوب‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد (Bates et al., 1973).

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) طرح کاملاً تصادفی نامتعادل برای ۱۵ خصوصیت مورفوفیزیولوژیک موتانت‌ها و ژنوتیپ شاهد نشان داد که جهش یافته‌های نسل اول (VMI) و ژنوتیپ شاهد بدون پرتوتابی از نظر هشت خصوصیت مورفولوژیک و همچنین میزان کارتنوئید کل به ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد دارای تفاوت معنی دار بودند. اما اختلاف معنی داری در بین آنها براساس صفات تعداد ساقه، تعداد گل و نیز محتوای کلروفیل و پرولین برگ، مشاهده نشد.

براساس نتایج مقایسه میانگین صفات با آزمون چند دامنه‌ای دانکن، با افزایش دز پرتوی گاما، صفات طول ساقه، طول گل و طول کلاله در جهش یافته‌های ۱۵ و ۱۸ گری نسبت به شاهد کاهش یافتند، اما این کاهش

1. Sulfosalicylic acid  
2. Ninhydrin  
3. Acetic acid

جدول ۱. تجزیه واریانس برخی صفات مورفوفیزیولوژیک موتانت‌های زعفران تحت تاثیر پرتو گاما در مقایسه با ژنوتیپ شاهد

Table 1. ANOVA of the some morphophysiological traits of saffron mutants under gamma radiation in comparison with control genotype

		میانگین مربعات Mean of squares														
منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی df	تعداد ساقه Stem no.	تعداد گل Flower no.	طول ساقه Stem length (cm)	طول گل Flower length (cm)	طول کلاله Stigma length (cm)	روز تا گلدهی Days to flowering	روز تا برداشت Days to harvesting	وزن تر گل Flower fresh weight (gr)	وزن خشک گل Flower dry weight (gr)	وزن خشک کلاله Stigma dry weight (gr)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg/g leaf fresh weight)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g leaf fresh weight)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g leaf fresh weight)	پرولین Proline ( $\mu$ mol/g leaf fresh weight)	کارتنوئید کل Total carotenoid (mg/g leaf fresh weight)
ژنوتیپ Genotype	2	0.09	0.037	17.15**	38.50**	39.005**	261.54**	283.62**	1.78**	2.26**	2.41**	0.02	0.22	0.14	0.02	3.05*
خطا Error	68	0.149	0.09	0.69	1.20	1.70	14.93	14.50	0.23	0.07	0.06	0.04	0.34	0.07	0.10	0.80
CV (%)		19	19	11	16	20	6	6	18	12	16	20	16	16	17	18

\* و \*\* به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد و معنی‌داری در سطح یک درصد است

\* significant at 5% level and \*\* significant at 1% level

جدول ۲. همبستگی برخی صفات مورفوفیزیولوژیک موتانت‌های زعفران تحت تاثیر پرتو گاما در مقایسه با ژنوتیپ شاهد

Table 2. Correlation of the some morpho-physiological traits on Saffron mutants under gamma radiation in comparison with control genotype

تعداد ساقه Stem no.	تعداد گل Flower no.	طول ساقه Stem length (cm)	طول گل Flower length (cm)	طول کلاله Stigma length (cm)	روز تا گلدهی Days to flowering	روز تا برداشت Days to harvesting	وزن تر گل Flower fresh weight (gr)	وزن خشک گل Flower dry weight (gr)	وزن خشک کلاله Stigma dry weight (gr)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg/g leaf fresh weight)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g leaf fresh weight)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g leaf fresh weight)	پرولین Proline (μmol/g leaf fresh weight)	کارتنوئید کل Total carotenoid (mg/g leaf fresh weight)	
تعداد ساقه Stem No.	1.00														
تعداد گل Flower No.	0.48**	1.00													
طول ساقه Stem length (cm)	0.03	0.04	1.00												
طول گل Flower length (cm)	0.13	-0.01	0.65**	1.00											
طول کلاله Stigma Length	0.13	0.12	0.65**	0.80**	1.00										
روز تا گلدهی Flowering Day	-0.17	-0.19	-0.65**	-	0.69**	1.00									
روز تا برداشت Harvesting Day	-0.17	-0.18	-0.64**	-	0.70**	-0.83**	0.99**	1.00							
وزن تر گل Flower fresh weight (gr)	-0.02	-0.16	0.47**	0.68**	0.59**	-0.53**	-0.54**	1.00							
وزن خشک گل Flower dry weight (gr)	0.12	0.14	0.52**	0.65**	0.65**	-0.61**	-0.63**	0.64**	1.00						
وزن خشک کلاله Stigma dry weight (gr)	0.14	0.12	0.55**	0.63**	0.66**	-0.61**	-0.62**	0.49**	0.73**	1.00					
کلروفیل کل Total chlorophyll (mg/g leaf fresh weight)	0.02	-0.20	-0.11	-0.10	-0.13	0.12	0.10	0.01	0.06	-0.05	1.00				
کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g leaf fresh weight)	-0.03	-0.20	0.02	0.05	0.04	-0.09	-0.11	0.08	0.09	0.01	0.60**	1.00			
کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g leaf fresh weight)	0.07	-0.12	-0.10	-0.12	-0.15	0.23	0.20	-0.07	0.04	-0.04	0.87	0.22	1.00		
پرولین Proline (μmol/g leaf fresh weight)	0.02	0.19	-0.03	-0.02	-0.04	0.14	0.12	-0.09	0.04	0.04	-0.09	-0.12	0.03	1.00	
کارتنوئید کل Total carotenoid (mg/g leaf fresh weight)	0.13	0.05	0.17	0.36**	0.35**	-0.27*	-0.28*	0.42**	0.30*	0.34**	0.43**	0.47**	0.32**	0.85	1.00

\* significant at 5% level and \*\* significant at 1% level

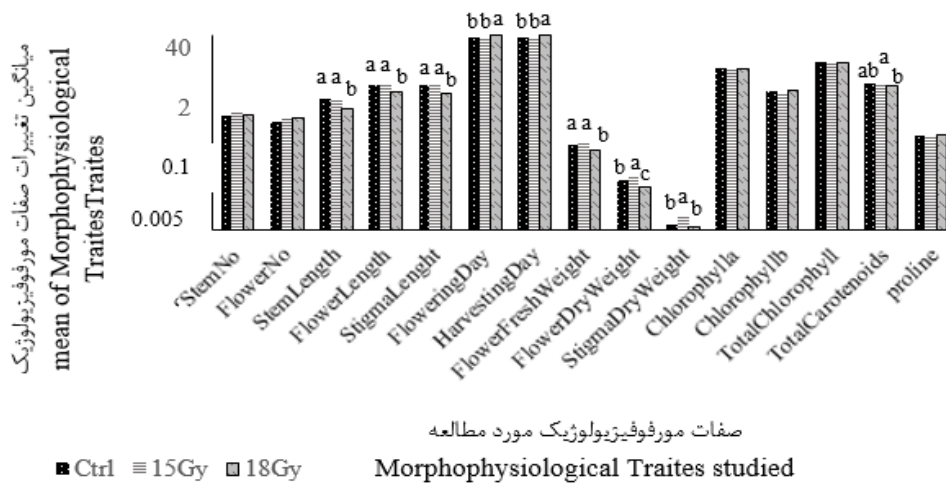
\* و \*\* به ترتیب معنی‌داری در سطح پنج درصد و معنی‌داری در سطح یک درصد

گاما جهت رسیدن به تنوع مطلوب در ژنوتیپ زعفران، دزهای ۵ و ۱۵ گری معرفی گردید به طوری که بیشترین وزن خشک کلاله و گل در این دزها حاصل شد (Ahamed, 2019). همچنین در این مطالعه گزارش شد که جهش‌یافته‌های دز ۲۵ گری در مورد صفت وزن خشک گل با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند اما در مورد صفت وزن خشک کلاله، همین جهش‌یافته‌ها کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد و سایر جهش‌یافته‌ها داشتند.

اما نکته حائز اهمیت در پژوهش حاضر این بود که اگرچه جهش‌یافته‌های ۱۵ گری، به‌طور کلی و با توجه به نتایج میانگین داده‌ها، عملکرد بهتری نسبت به گیاهان دز ۱۸ گری و در بعضی موارد شاهد نشان دادند (شکل ۱) اما براساس مشاهدات و نیز یادداشت‌برداری‌های انجام شده، علاوه بر تنوع بیشتر رشد طولی و دوره گلدهی، تنوع عملکردی ایجاد شده در جهش‌یافته‌های ۱۸ گری نیز نسبت به جهش‌یافته‌های ۱۵ گری برتری داشت (شکل ۲).

باتوجه به نتایج جدول تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات، در خصوص ویژگی‌های محتوای کلروفیل *a*، *b*، کل و نیز پرولین برگ، تفاوت معنی‌داری بین گیاهان ژنوتیپ شاهد و جهش‌یافته‌های ۱۵ و ۱۸ گری مشاهده نشد (جدول ۱).

در خصوص صفات مرتبط با عملکرد، نتایج پژوهش حاضر حاکی از کاهش معنی‌دار وزن کل تر و خشک گل با افزایش میزان پرتوی گاما بود به طوری‌که کمترین وزن تر و خشک گل در گیاهان دز ۱۸ گری مشاهده گردید. با این تفاوت که در صفت وزن تر گل، گیاهان ژنوتیپ شاهد و ۱۵ گری و در صفت وزن خشک گل، جهش‌یافته‌های ۱۵ گری بیشترین وزن را داشتند. در مورد صفت وزن خشک کلاله نیز نتایج نشان داد که هرچند جهش‌یافته‌های ۱۸ گری دارای وزن کمتری نسبت به شاهد بودند، اما اختلاف بین آنها معنی‌دار نبود، در صورتی‌که گیاهان دز ۱۵ گری با وزن بیشتر، تفاوت معنی‌داری با شاهد و جهش‌یافته‌های ۱۸ گری داشتند (شکل ۱). در واقع براساس این نتایج و نتایج جدول همبستگی، هرچند گیاهان دز ۱۵ گری در صفات مرتبط با رشد طولی و زودرسی تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند اما در صفات مرتبط با عملکرد و به ویژه در مورد وزن خشک کلاله، برتری معنی‌داری نسبت به شاهد و دیگر سطح پرتوایی از خود نشان دادند. در واقع تحقیقات زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد سطوح پایین پرتوایی زعفران با استفاده از اشعه گاما می‌تواند با تحریک فرایندهای فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی، منجر به تغییر در عملکرد ماده خشک این گیاه ارزشمند گردد (Jindal et al., 2005; Guo et al., 2008; Khan et al., 2011). در همین راستا، بهترین دز پرتوایی با اشعه



شکل ۱. مقایسه میانگین برخی صفات مورفوفیزیولوژیک موتانت‌های زعفران تحت تاثیر پرتو گاما در مقایسه با ژنوتیپ شاهد

Figure 1. Mean comparison of the some morphophysiological traits of saffron mutants under gamma radiation in comparison with control genotype





شکل ۲. مقایسه تنوع مورفولوژیکی کلاله بین دو جهش یافته ۱۵ و ۱۸ گری زعفران  
**Figure 2. Comparison of stigma morphological diversity between 15 and 18 Gy saffron mutants**

کارتنوئید نیز کاهش یافته است (Asgarani and Khaneghaye, 2013).

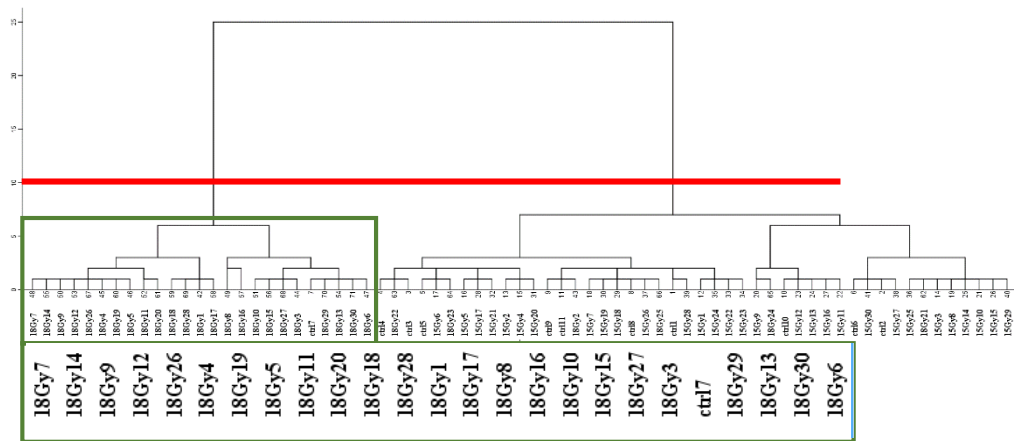
جهت تعیین فاصله و تنوع بین ژنوتیپ‌ها، تجزیه خوشه‌ای بر اساس میانگین صفات داده‌های مورد مطالعه برای تمامی جهش‌یافته‌ها و ژنوتیپ بدون پرتوتابی زعفران به روش وارد و با مربع فاصله اقلیدسی انجام شد (شکل ۳). با توجه به نقطه برش که براساس روش‌های آماری چندمتغییره ترسیم گردید، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این پژوهش در دو گروه با خصوصیات درون گروهی مشابه و بین گروهی غیرمشابه قرار گرفتند که صحت گروه‌بندی بر اساس تابع تشخیص ۹۳ درصد به دست آمد. گروه اول شامل ۲۴ جهش یافته ۱۸ گری از ۳۰ جهش یافته این دز پرتوتابی و یک ژنوتیپ شاهد بود. در گروه دوم نیز تمام جهش‌یافته‌های ۱۵ گری، ۶ جهش یافته ۱۸ گری و ۱۰ ژنوتیپ شاهد قرار داشتند. در واقع گروه دوم حاصل از تجزیه خوشه‌ای، بیشتر جایگاه جهش‌یافته‌های ۱۵ گری بود که نزدیک‌ترین قرابت ژنتیکی را نیز به ژنوتیپ‌های شاهد داشتند. براساس نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها، گروه دوم از نظر اکثر صفات یادداشت‌برداری شده از میانگین بالاتری برخوردار بودند اما نتایج حاکی از تنوع بالای مورفوفیزیولوژیکی اکثر جهش‌یافته‌های ۱۸ گری در گروه اول خوشه‌بندی بود چراکه در ۸ صفت از صفات یادداشت برداری شده، این گروه دارای دورترین فاصله ژنتیکی و اختلاف معنی‌دار با جهش‌یافته‌های سطح ۱۵ گری و شاهد بودند. به‌منظور بررسی فیلوژنی ۱۶ گونه از جنس *Crocus* زعفران، از

اما در ارتباط با محتوای کارتنوئید کل برگ، هرچند هیچ یک از جهش‌یافته‌های ۱۵ و ۱۸ گری نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند، اما بیشترین میزان محتوای کارتنوئید کل برگ در جهش‌یافته‌های ۱۵ گری مشاهده گردید که نسبت به گیاهان دز ۱۸ گری تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۱). کاروتنوئیدها، ترکیبات رنگی محلول در آب موجود در زعفران (کروسین‌ها) هستند که به‌همراه گلیکوزیدهای تلخ‌مزه (پیکرکروسین‌ها) و ترکیبات فرار معطر (سافرانال)، مهم‌ترین ترکیبات کلاله زعفران را تشکیل می‌دهند (Maggi et al., 2011). این ترکیبات رنگی، نقش محافظتی برای گیاه در مواجهه با تنش را نیز ایفا می‌کنند به‌طوری‌که با ورود پرتو یونیزه‌کننده به داخل بافت یا سلول، رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها تولید و بسته به شدت پرتو، تغییرات مثبت و یا منفی در فرایندهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی و ژنتیکی گیاهان ایجاد می‌کنند (Wi et al., 2007). در همین راستا محققین نشان دادند که افزایش محتوای کارتنوئید در *Haloarcula IRU1* می‌تواند با نقش حفاظتی خود، باعث کاهش آسیب پرتوهای یونیزه‌کننده به DNA شود. احتمالاً در این مطالعه، با ورود پرتوی گاما به درون بافت گیاه، میزان کارتنوئید جهت جلوگیری از خسارت به DNA در جهش‌یافته‌های ۱۵ گری افزایش یافته است اما با افزایش دز پرتوی گاما، توانایی گیاه برای تحمل آسیب‌های ناشی از تابش و در نتیجه تولید

۱. یک سوپه آرکیایی بسیار نمک دوست و مقاوم به پرتوهای پونیزه کننده گاما و نور فرابنفش

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مولفه‌های اصلی در این پژوهش نشان داد که هیچ تفاوتی از نظر میزان ترکیبات شیمیایی در دو گروه ژنوتیپ‌های پرتوتابی شده و بدون پرتو وجود نداشت (Luo et al., 2018)

تجزیه خوشه‌ای به منظور گروه‌بندی گونه‌ها استفاده شد (Nemati et al., 2018). همچنین در مطالعه مشابه دیگری، محققین برای ارزیابی تاثیر فناوری سترون‌سازی تابش گاما (با استفاده از چشمه کبالت-۶۰) بر ترکیبات شیمیایی زعفران، ۱۰ نمونه زعفران را جمع‌آوری و آنها را با دزهای مختلف، پرتوتابی نمودند.



شکل ۳. تجزیه خوشه‌ای موتانت‌های زعفران (۱۵ و ۱۸ گری) تحت تاثیر پرتو گاما در مقایسه با ژنوتیپ شاهد با استفاده از برخی صفات مورفوفیزیولوژیک

Figure 3. The tree dendrogram of cluster analysis in Saffron mutants (15 and 18 Gy) under gamma radiation in comparison with Control genotype with some morpho-physiological traits

چندضلعی قرار گرفته و سپس خطوطی از مرکز بای پلات، عمود بر اضلاع چندضلعی رسم می‌گردد. جهش‌یافته‌هایی که در راس چندضلعی قرار داشته باشند، بهترین جهش‌یافته‌ها برای صفاتی می‌باشند که در آن محدوده قرار گرفته است. براساس نمایش گرافیکی الگوی "کدام برای کجا مناسب است" ۱ بای پلات (شکل ۴)، جهش‌یافته‌های ۲۴، ۱۸، ۱۲، ۲۶، ۲۷، ۱۰ و ۳ از دز ۱۸ گری و نیز جهش‌یافته‌های ۲۳، ۲۹، ۱۷، ۳ و ۱۵ مربوط دز پرتوتابی ۱۵ گری در رئوس چندضلعی قرار گرفتند. بنابراین هریک برای صفاتی که در نزدیکی آن جهش‌یافته قرار دارند، بیشترین میزان یا غلظت را نشان می‌دهد. براین اساس، صفات تعداد گل، طول ساقه، روز تا گلدهی و روز تا برداشت در بخش جهش‌یافته ۱۸ گری قرار گرفتند که نشان می‌دهد این جهش‌یافته بیشترین تنوع را برای این صفات داشتند. اما در خصوص جهش‌یافته‌های دز ۱۵ گری، سایر صفات به جز صفات مربوط به محتوای کلروفیل

به منظور بررسی روابط متقابل بین صفات یادداشت‌برداری شده، مقایسه جهش‌یافته‌ها و تعیین بیشترین تنوع در بین آنها با شاهد و همچنین جهت تایید نتایج تجزیه خوشه‌ای، از روش تجزیه بای پلات استفاده شد. در تجزیه بای پلات انجام شده به منظور شناسایی متنوع‌ترین جهش‌یافته‌های مربوط به دو سطح پرتوتابی ۱۵ و ۱۸ گری از نظر صفات یادداشت‌برداری شده در این مطالعه، ۶۶/۶ درصد از تغییرات توسط مولفه‌های اصلی توجیه گردید به طوری که سهم مولفه اصلی اول ۵۰/۴ درصد و سهم مولفه اصلی دوم ۱۶/۲ درصد بود. یکی از کاربردهای استفاده از تجزیه بای پلات در مطالعات مربوط به تنوع، شناسایی بهترین جهش‌یافته برای هر یک از ارقام (ژنوتیپ‌ها) و یا سطوح مختلف پرتوتابی است.

در این موارد برای انتخاب بهترین جهش‌یافته در هر سطح پرتوتابی، از چندضلعی استفاده می‌شود که این چندضلعی از اتصال نقاط مربوط به تعدادی از جهش‌یافته‌ها که از مرکز بای پلات بیشترین فاصله را دارند بدست می‌آید. سایر جهش‌یافته‌ها در داخل این

بای پلات ۷۵/۵۷ درصد از تغییرات ژنوتیپی را توجیه نموده و با استفاده از این روش، چهار جهش یافته *G9* (*ShL3P74*)، *G10* (*ShR3P4*)، *G12* (*ShR9P5*) و *G4* (*ShL2P4*) توانستند با بیشترین عملکرد در بین ژنوتیپ‌ها شناسایی شوند.

#### نتیجه‌گیری

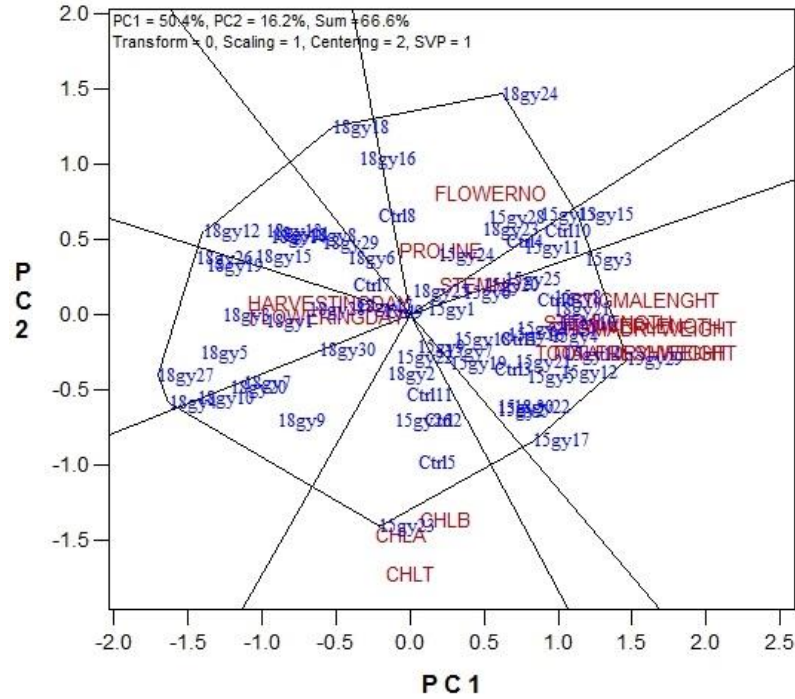
براساس نتایج بدست آمده از این پژوهش، در جهش‌یافته‌های ۱۵ گری زعفران، هرچند پرتوی گاما نتوانست تغییر معنی‌داری را در بسیاری از صفات مورفوفیزیولوژیک مورد مطالعه، نسبت به شاهد ایجاد نماید اما افزایش وزن خشک گل و وزن خشک کلاله موجب شد تا براساس نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات، این جهش‌یافته‌ها مطلوبیت بیشتری نسبت به جهش‌یافته‌های ۱۸ گری کسب نمایند. درحالی که باتوجه به هدف این مطالعه و مشاهداتی که در زمان یادداشت‌برداری صفات انجام گرفت و نیز نظر به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و بای پلات صفات و ژنوتیپ‌ها، به نظر می‌رسد دز پرتو ۱۸ گری اشعه گاما توانست تنوع مورفوفیزیولوژیک بیشتری را در بنه‌های زعفران انتخاب شده، ایجاد نماید. این موضوع می‌تواند مطالعه و پیش‌برد نسل‌های بعدی این جهش‌یافته‌ها را در کنار جهش‌یافته‌های ۱۵ گری، تقویت نماید. همچنین در مطالعات قبلی که بر روی همین جهش‌یافته‌ها صورت گرفت، مشاهده شد که بنه‌های پرتوتابی شده با دز ۱۸ گری اشعه گاما، تحمل بیشتری در مرحله رشد رویشی به عناصر سنگین موجود در آب آبیاری در نسل اول جهش‌یافته‌ها از خود نشان دادند (*Mohit-Ardakani et al., 2020*). بنابراین پیشنهاد می‌شود که در نسل‌های آتی، تنوع این جهش‌یافته‌ها از نظر میزان تحمل به تنش‌های غیرزیستی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

#### قدردانی

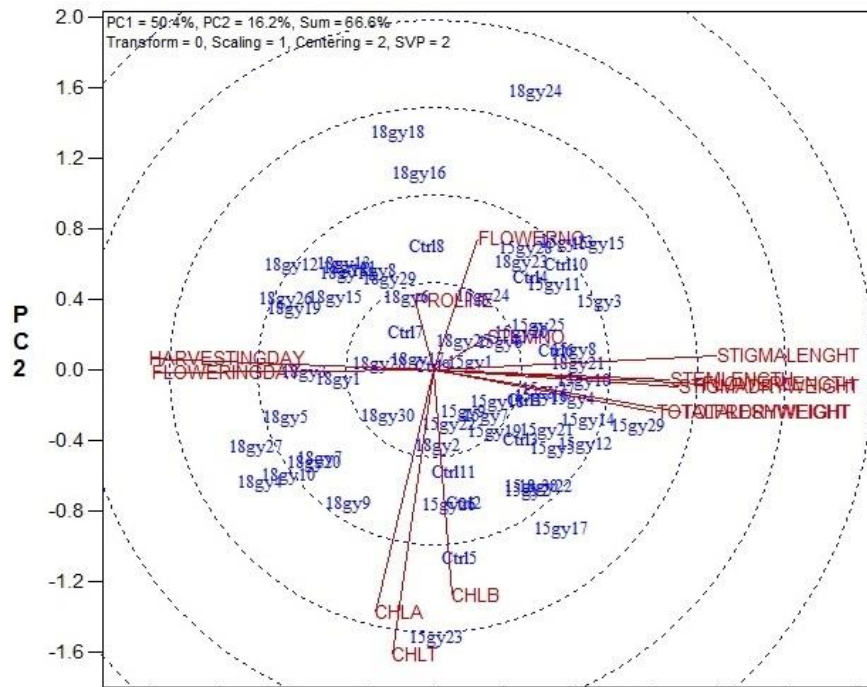
از خانم مهندس نسرين حیدری خورمیزی به خاطر زحمات فراوانی که در کمک به انجام این پژوهش کشیدند، قدردانی می‌شود.

بیشترین تاثیر را در گروه‌بندی جهش‌یافته‌ها داشتند بطوریکه اکثر جهش‌یافته‌های ۱۵ گری و ژنوتیپ‌های شاهد در این بخش تجمع یافته‌اند. درواقع با این روش می‌توان دزهایی را که با توجه به یک یا چند صفت در میان سایر دزها دارای ارزش بالاتر هستند، شناسایی نمود (*Farshadfar, 2013*).

تصویربرداری بای پلات براساس صفات، به درک روابط متقابل بین صفات کمک می‌کند و در آن، صفات از طریق خطوطی به نام بردارها با مبداء بای پلات مرتبط هستند. بای پلات صفات مورد بررسی (شکل ۵) نشان داد که مولفه اول و دوم در مجموع ۶۶/۶ درصد تغییرات بین صفات را توجیه می‌کنند. درمورد تفسیر این نوع بای پلات، کسینوس زاویه بین بردارهای دو صفت، برآوردی از ضریب همبستگی بین آنها را فراهم می‌کنند. براساس این بای پلات‌ها، هر چه زاویه بین دو صفت کمتر از ۹۰ درجه باشد، ارتباط مثبت و قوی‌تری وجود دارد و بالاتر از زاویه ۹۰ درجه ارتباط منفی و به نسبت زیاد شدن زاویه، این ارتباط قوی‌تر می‌شود. همچنین زاویه ۹۰ درجه بین دو صفت نشان می‌دهد که ارتباطی بین صفات وجود ندارد. از آنجایی که بای پلات کلیه تغییرات موجود در یک مجموعه از داده‌ها را بطور کامل توضیح نمی‌دهد، کسینوس زاویه‌ها بطور دقیق به ضرایب همبستگی قابل تبدیل نیستند. با این وجود زاویه‌ها می‌توانند اطلاعات کافی برای ارایه یک تصویر کلی از روابط متقابل بین صفات را فراهم کند (*Yan, 2001*). همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، ارتباط مثبت بالا و معنی‌داری (زاویه کمتر از ۹۰ درجه) بین صفات مرتبط با عملکرد و طول کلاله و گل، همچنین بین صفات مرتبط با زودرسی با کلروفیل‌های *a* و *b* و کل و پرولین وجود دارد که این نتایج نیز با نتایج حاصله از جدول همبستگی (جدول ۲) مطابقت دارد. دراین‌راستا همچنین ارتباط منفی معنی‌داری (زاویه بیشتر از ۹۰ درجه) نیز بین صفات مرتبط با عملکرد و صفات مربوط به زودرسی وجود دارد. در این رابطه در مطالعه‌ای که هورن و همکاران (۲۰۱۸) به منظور بررسی تنوع و سازگاری ژنوتیپ‌های لوبیای چشم بلبلی (*Vigna unguiculata L.*) انجام دادند، گزارش نمودند که تجزیه داده‌ها با استفاده از روش



شکل ۴. نمایش گرافیکی الگوی "کدام برای کجا مناسب است" بای پلات جهت شناسایی موتانت‌های (۱۵ و ۱۸ گری) برتر زعفران در مقایسه با ژنوتیپ شاهد برای صفات مورفوفیزیولوژیک مطالعه شده  
 Figure 4. The "which-won-where" view of the GGE biplot to show better saffron mutants (15 and 18 Gy) in comparison with control genotype for morpho-physiological traits studied



شکل ۵. نمایش گرافیکی بای پلات همبستگی موتانت‌های (۱۵ و ۱۸ گری) زعفران در مقایسه با ژنوتیپ شاهد برای صفات مورفوفیزیولوژیک مطالعه شده  
 Figure 5. Graphical representation of the GGE biplot to show correlation of saffron mutants (15 and 18 Gy) and control genotype for morpho-physiological traits studied

منابع

- Abootalebian, M., Karbasi, M., Sadeghi, M., Abdinian, M. & Polikarpov, I. 2017. Investigating the effect of saffron (*Crocus sativus L.*) nano-sizing on its colour extraction efficiency: A Preliminary Study. *Natural Product Research*, 31, 2308-2311. (In Persian with English summary)
- Ahamed, T. E. S. 2019. Bioprospecting elicitation with gamma irradiation combine with chitosan to enhance, yield production, bioactive secondary metabolites and antioxidant activity for saffron. *Journal of Plant Sciences*, 7, 137-143.
- Ahloowalia, B. & Maluszynski, M. 2001. Induced mutations—a new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118, 167-173.
- Ahmad, M., Zaffar, G., Habib, M., Arshid, A., Dar, N. & Dar, Z. 2014. Saffron (*Crocus sativus L.*) In the light of biotechnological approaches: a review. *Scientific Research And Essays*, 9, 13-18.
- Asgarani, E., Khaneghaye, F. 2013. Protective role of Carotenoides on the Resistance of *Haloarcula IRU1* against Hydrogen Peroxide. *Applied Biology*. 25, 49-60. (In Persian)
- Banerji, B.K. and Datta, S.K., 2002. Induction and analysis of gamma ray-induced flower head shape mutation in 'Lalima' *chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium*). *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 72(1).
- Bates, L. S., Waldren, R. P. & Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Farshadfar, E. 2013. Simultaneous selection of yield and yield stability in chickpea genotypes using the gge biplot technique. *Acta Agronomica Hungarica*, 61, 185-194.
- Guo, J., Han, W. & Wang, M. 2008. Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: a review. *African Journal of Biotechnology*, 7, 4966-4972.
- Hossain Zade Fashalami, N., Shahadati Mogadam, Z. & Kiani, G. 2015. Investigation of genetic diversity among different oriental tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) varieties using multivariate methods. *Journal of Crop Breeding*, 7, 126-134. (In Persian with English Summary)
- Jahandar Zaboli, F., A. , Izanloo, M. G. G. & M. Rahimi. 2020. Radio-sensitivity test to determine the suitable dose to induce mutation in saffron (*Crocus sativus L.*). *Journal of Saffron Research*, *Acceptd.* (In Persian with English Summary)
- Jain, S. M. 2005. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 113-123.
- Jindal, S., Singh, M. & Sivadasan, R. 2005. Induced mutations in senna. *Arid Legumes for Sustainable Agriculture and Trade*. CAB International, Wallingford, UK, 120-123.
- Jozghasemi, S. & Rabiei, V. 2019. The assessment and feasibility of breeding study in *Iris persica* by gamma-ray. *Applied Crop Breeding*, 4, 75-89. (In Persian with English Summary)
- Jun, Z., Xiaobin, C. and Fang, C. 2006. The effects of <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -Irradiation on development of *Crocus sativus L.* In *II International Symposium on Saffron Biology and Technology* 739, 307-311.
- Kafi, M., Borzouey, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masoumi, A. & Nabati, J. 2009. Physiology of environmental stresses in plants. *Jahad Daneshgahi Mashhad Press*. pp. 502. (In Persian)
- Khan, I. A. 2003. Induced mutagenic variability in saffron (*Crocus sativus L.*). *I international symposium on saffron biology and biotechnology* 650, 281-283.
- Khan, M. A., Naseer, S., Nagoo, S. & Nehvi, F. 2011. Behaviour of saffron (*Crocus sativus L.*) corms for daughter corm production. *Journal of Phytochemistry*, 3(7): 47-49.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Lim, T.K. 2014. *Crocus sativus*. *Edible Medicinal And Non Medicinal Plants*. Springer Netherlands. P. 77-136.

- Luo, D.-Q., Zhao, S.-S., Tang, Y.-R., Wang, Q.-J., Liu, H.-J. & Ma, S.-C. 2018. Analysis of the effect of 60Co- $\gamma$  irradiation sterilization technology on the chemical composition of saffron using Uplc And Uplc/Q-ToF-Ms. *Journal of Analytical Methods In Chemistry*, 1-7.
- Maggi, L., Sánchez, A. M., Carmona, M., Kanakis, C. D., Anastasaki, E., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G. & Alonso, G. L. 2011. Rapid determination of safranin in the quality control of saffron spice (*Crocus sativus* L.). *Food Chemistry*, 127, 369-373.
- Mir, J., Ahmed, N., Singh, D., Khan, M., Zaffer, S. & Shafi, W. 2015. Breeding and biotechnological opportunities in saffron crop improvement. *African Journal of Agricultural Research*, 10, 970-974.
- Mohit-Ardakani, A. M., Seifati, S. E., Izanloo, A., Borzouei A. 2020. Evaluation of some morphophenological characteristics of saffron mutants under sesame waste water. *The 2nd National Conference on Management Strategies of Water Resources & Environmental Challenges. Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Accepted. (In Persian with English Summary)*
- Nehvi, F., Khan, M., Lone, A. A., Maqhdoomi, M., Wani, S. A., Yousuf, V. & Yasmin, S. 2009. Effect of radiation and chemical mutagen on variability in saffron (*Crocus sativus* L.). III *International Symposium On Saffron: Forthcoming Challenges In Cultivation, Research And Economics* 850, 67-74.
- Nemati, Z., Blattner, F.R., Kerndorff, H., Erol, O. and Harpke, D. 2018. Phylogeny of the saffron-crocus species group, *Crocus* series *Crocus* (Iridaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 127, pp.891-897.
- Rubio-Moraga, A., Castillo-López, R., Gómez-Gómez, L. & Ahrazem, O. 2009. Saffron is a monomorphic species as revealed by RAPD, ISSR and Microsatellite analyses. *Bmc Research Notes*, 2, 1-5.
- Torricelli, R., Yousefi, J., Albertini, E., Venanzoni, R. & Hosseinzadeh, Y. 2019. Morphological and molecular characterization of italian, iranian and spanish saffron (*Crocus sativus* L.) accessions. *Applied Ecology And Environmental Research*, 17, 1875-1887.
- Wi, S. G., Chung, B. Y., Kim, J.-S., Kim, J.-H., Baek, M.-H., Lee, J.-W. & Kim, Y. S. 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron*, 38, 553-564.
- Yan, W. 2001. GGEbiplot-a windows application for graphical analysis of multienvironment trial data and other types of two-way data. *Agronomy Journal*, 93, 1111-1118.
- Yan, W. & Kang, M. S. 2002. *GGE Biplot Analysis: A Graphical Tool For Breeders, Geneticists, and Agronomists*, Crc Press. 16 pages



Original Article:

## Induced Morpho-physiological Variation in Saffron (*Crocus sativus* L.) Using Gamma Radiation

Ali Mohammad Mohit-Ardakani<sup>1</sup>, Seyed Ebrahim Seifati<sup>2\*</sup>, Ali Izanloo<sup>3</sup>, Azam Borzouei<sup>4</sup>

1. MSc Student of Biotechnology, School of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran.

2. Assistant Professor of Biotechnology, Department of Arid Land and Desert Management, School of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran.

3. Associate Professor of Biotechnology, Department of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.

4. Associate Professor, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran.

\*Corresponding Author Email: [seifati@yazd.ac.ir](mailto:seifati@yazd.ac.ir)

Received 22 September 2020; Accepted 13 November 2020

### Abstract

In order to investigate the diversity of irradiated genotypes at two levels of 15 and 18 Gy gamma ray with control genotype (without radiation), an experiment was conducted in a completely randomized design in the greenhouse of Yazd University. The results of analysis of variance showed that the first generation mutants and control genotype were significantly different in terms of eight morphological characteristics and total carotenoid content. While there was no significant difference among them based on the number of stems, number of flowers as well as chlorophyll and leaf proline content. Based on the results of cluster analysis, the studied genotypes were divided into two groups and the accuracy of grouping based on the detection function was 93%. The first group consisted of 24 18-Gy mutants and a control genotype. All of 15 Gy mutants, 6 mutants of 18 Gy and 10 control genotypes were in the second group. Based on the graphical representation of biplot analysis method, 7 mutants at 18 Gy dose and 5 mutants in 15 Gy radiation dose were located in polygonal vertices, which showed the greatest difference between them and genotype without radiation. Accordingly, traits related to plant yield and reproductive growth had the greatest effect in determining superior mutations. According to the aim of this study, 15 Gy dose of gamma radiation resulted in mutations with better performance and 18 Gy dose caused more morpho-physiological diversity in saffron stems.

**Keywords:** Gamma Stress, GGE-biplot, Mutation Breeding, Saffron, Yield.