Vol 27, No. 1, Spring 2025

University of Tehran Press

Journal of Crops Improvement

Online ISSN: 2345-6957

Homepage: https://jci.ut.ac.ir/

Investigating the Genetic Diversity of Different Iranian Saffron Accessions Using Multivariate Statistical Methods

Leyla Hoseinzadeh[1] | Seyed Alireza Salami[2] | Mohsen Ebrahimi[3]✉ | Ali Izadi Darbandi[4]

1. Department of Agronomy Sciences and Plant Breeding, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Iran. Email: l.hosseinzadeh@ut.ac.ir
2. Department of Horticultural Science and Landscape Architecture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. Email: asalami@ut.ac.ir
3. Corresponding author, Department of Agronomy Sciences and Plant Breeding, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Iran. Email: mebrahimi@ut.ac.ir
4. Department of Agronomy Sciences and Plant Breeding, College of Aburaihan, University of Tehran, Pakdasht, Iran. Email: aizady@ut.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received 21 June 2024
Received in revised form
8 January 2025
Accepted 23 January 2025
Published online 5 March 2025

Keywords:
Analysis of cluster
Crocin
Picrocrocin
Safranal

ABSTRACT

Objective: Saffron (*Crocus sativus* L.) is a perennial, sterile, and triploid plant. Moreover, dried saffron stigmas have many uses in the food and medicine industry. Saffron plants propagate by corms due to sterility. Therefore, it has limited diversity and a poor plant breeding background, leading to genetic erosion. As a result, being under severe risk of genetic erosion is an obstacle to the breeding and production of saffron. The objective of this study was to investigate the diversity among saffron ecotypes, to evaluate the correlation between morphological traits and the amounts of secondary metabolites, and to classify the ecotypes.

Methods: A complete randomized block design with two replications in three harvests has been conducted to investigate the biological diversity of 22 saffron accessions collected from different regions of Iran at the Tehran University research farm, Mohamadshahr, Alborz, Iran. The most important morphological traits and amount of secondary metabolites, including crocin, picrocrocin, and safranal, were measured by using high-performance liquid chromatography.

Results: Analysis of variance showed significant differences among accessions for studied traits in three consecutive harvests. Qaenat accession had the highest means of obtaining the most morphological characteristics. The factor analysis based on PCA showed that the two first components explained 97 percent of the total variance of traits. The traits of leaf length, stigma fresh weight, stigma length, and safranal in the first component and picrocrocin, crocin, and petal length in the second component had the most positive role in justifying 66.7 percent of the total variance, respectively. Based on cluster analysis, accessions were divided into five clusters. The Qaenat and Firdos 16 accessions had the most genetic similarity, and the Qaenat and Arak accessions had the farthest genetic distance. Moreover, the studied traits are divided into three clusters, so that the amount of crocin and picrocrocin and petal length are in the first category, the amount of safranal, the length of leaf, length of stigma and length of flower, fresh weight of flower and stigma are in the second category, and the final yield, the total number of flowers, and dry weight of stigma are in the third category.

Conclusion: Although studied accessions were cultivated and preserved in the same geographical environment, they had significant differences at morphological and phytochemical levels. Therefore, it can be concluded that the origin of the observed diversity is the result of the existence of diversity at the genome, transcriptome, or epigenome levels.

Cite this article: Hoseinzadeh, L., Salami, S. A., Ebrahimi, M., & Izadi Darbandi, A. (2025). Investigating the Genetic Diversity of Different Iranian Saffron Accessions Using Multivariate Statistical Methods. *Journal of Crops Improvement*, 27 (1), 69-89. DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2025.378342.2890

© The Author(s).
Publisher: University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2025.378342.2890

دوره بیست و هفتم، شماره اول، بهار ۱۴۰۴

انتشارات دانشگاه تهران

به زراعی کشاورزی

شاپا الکترونیکی: ۶۹۵۷-۲۳۴۵

Homepage: https://jci.ut.ac.ir/

بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف زعفران ایرانی با استفاده از روش‌های آماری چندمتغیره

لیلا حسین‌زاده[۱] | سید علیرضا سلامی[۲] | محسن ابراهیمی[۳]✉ | علی ایزدی دربندی[۴]

۱. گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران. رایانامه: l.hosseinzadeh@ut.ac.ir
۲. گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: asalami@ut.ac.ir
۳. نویسنده مسئول، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران. رایانامه: mebrahimi@ut.ac.ir
۴. گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران. رایانامه: aizady@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۰/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۴
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۱۲/۱۵

کلیدواژه‌ها:
پیکروکروسین
تجزیه خوشه‌ای
سافرانال
کروسین

چکیده

هدف: زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی چندساله، نرعقیم و تریپلوئید است. کلاله‌های خشک‌شده زعفران کاربردهای فراوانی در صنعت غذا و دارو دارند. زعفران به‌دلیل نرعقیمی و تکثیر غیرجنسی از طریق بنه‌ها، تنوع ژنتیکی بسیار کمی دارد. بنابراین، در معرض خطر شدید فرسایش ژنتیکی قرار دارد که مانعی برای تولید گسترده و انبوه زعفران است. این پژوهش با هدف، بررسی تنوع موجود در بین اکوتیپ‌ها، ارزیابی همبستگی بین صفات و دسته‌بندی اکوتیپ‌های زعفران انجام شد.

روش پژوهش: آزمایشی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو تکرار در سه برداشت جهت بررسی تنوع زیستی ۲۲ اکوتیپ زعفران در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تهران واقع در استان البرز اجرا شد. در این پژوهش صفات مهم زراعی و مقدار متابولیت‌های ثانویه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بین اکوتیپ‌ها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج تجزیه واریانس نشان‌دهنده وجود تنوع بین اکوتیپ‌ها از لحاظ تمام صفات موردبررسی بود. اکوتیپ قائنات از نظر اکثر صفات زراعی دارای بیش‌ترین میانگین بود. نتایج همبستگی نشان داد مقدار کروسین و پیکروکروسین با یکدیگر رابطه مثبت و معنی‌دار دارند، درحالی‌که هیچ رابطه معنی‌داری بین مقدار سافرانال با کروسین و پیکروکروسین مشاهده نشد. مقدار سافرانال نیز با صفات زراعی از جمله طول برگ و کلاله، وزن تر گل و کلاله رابطه مثبت ومعنی‌داری را نشان داد. براساس نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی هفت مؤلفه ۹۷ درصد از واریانس تغییرات کل را توجیه کردند. صفات طول برگ، وزن تر کلاله، طول کلاله و مقدار سافرانال در مؤلفه اول و صفات مقدار پیکروکروسین، کروسین و طول گلبرگ در مؤلفه دوم بیش‌ترین نقش مثبت را در توجیه ۶۶/۷ درصد از تغییرات کل را داشتند. در تحلیل خوشه‌ای اکوتیپ‌ها در پنج دسته مجزا قرار گرفتند. بیش‌ترین شباهت ژنتیکی بین اکوتیپ‌های قائنات و فردوس ۱۶ و بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین اکوتیپ‌های قائنات و اراک مشاهده شد. هم‌چنین، صفات نیز در سه دسته خوشه‌بندی شدند؛ به‌طوری‌که مقدار کروسین و پیکروکروسین و طول گلبرگ در دسته اول، مقدار سافرانال، طول برگ و کلاله و گل، وزن تر گل و کلاله در دسته دوم و درنهایت عملکرد با تعداد کل گل و وزن خشک کلاله در دسته سوم قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: با توجه به این‌که این اکوتیپ‌ها برای مدت طولانی در منطقه ثابت جغرافیایی کشت و نگه‌داری شده‌اند، اما همچنان از نظر صفات زراعی و فیتوشیمیایی دارای تنوع بودند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت منشأ تنوع مشاهده‌شده در نتیجه وجود تنوع در سطوح ژنوم، ترنسکریپتوم و یا اپی‌ژنوم است.

استناد: حسین‌زاده، لیلا؛ سلامی، سید علیرضا؛ ابراهیمی، محسن و ایزدی دربندی، علی (۱۴۰۴). بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف زعفران ایرانی با استفاده از روش‌های آماری چندمتغیره. *به‌زراعی کشاورزی*، ۲۷ (۱)، ۶۹-۸۹. DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2025.378342.2890

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

۱. مقدمه

کلاله خشک‌شده زعفران[۱] از زمان‌های دور به‌طور گسترده به‌عنوان افزودنی غذایی و در کاربردهای پزشکی و درمانی همواره موردتوجه قرار گرفته است (بوخاری[۲] و همکاران، ۲۰۱۸). در سال‌های اخیر، علاقه به مطالعه خواص دارویی زعفران به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی آپوکارتنوئیدهای موجود در کلاله آن بر روی سلامت انسان رو به افزایش است (گرستا[۳] و همکاران، ۲۰۰۹؛ لاگ[۴] و همکاران، ۲۰۰۹). متابولیت‌های ثانویه اصلی زعفران شامل کروسین، پیکروکروسین و سافرانال هستند که متعلق به گروه آپوکارتنوئیدها می‌باشند. کروسین مسئول رنگ زعفران است، درحالی‌که پیروکروسین و سافرانال مسئول طعم تلخ و عطر آن هستند (دژوآن[۵] و همکاران، ۲۰۰۹).

در حال حاضر، محصول زعفران زراعی به‌عنوان گران‌ترین ادویه با قیمت تجاری ۴۰–۶۰ دلار به‌ازای هر گرم دادوستد می‌شود (کاردون[۶] و همکاران، ۲۰۲۱)، به‌همین دلیل این ادویه به‌عنوان طلای سرخ نیز در سراسر جهان شناخته می‌شود (شاهی[۷] و همکاران، ۲۰۱۶). به‌طور عمده این قیمت بالا به روش‌های سنتی برداشت که بسیار پرهزینه و زمان‌بر و هم‌چنین عملکرد پایین محصول نسبت به تکنیک‌های پر زحمت برداشت نسبت داده می‌شود (کاردون[۸] و همکاران، ۲۰۲۱). این گیاه از زمان‌های دور در مناطق مختلف جغرافیایی به‌طور عمده منطقه مدیترانه، مراکش، پرتغال، روسیه، ایران تا غرب چین کشت و کار می‌شود، که در میان آن‌ها ایران با تولید بیش از ۹۰ درصد زعفران جهان در رتبه اول قرار دارد (کوثری[۹] و همکاران، ۲۰۲۱).

زعفران زراعی از نظر گیاه‌شناسی یک گونه گیاهی علفی، تک‌لپه‌ای، عقیم و اتوترپلوئید (۲n=۳x=۲۴) متعلق به خانواده Iridaceae می‌باشد (واحدی و همکاران، ۲۰۱۸). این گیاه به‌دلیل عقیم‌بودن ناشی از اتوترپلوئیدی قادر به تولید گرده نر با قابلیت باروری نمی‌باشد (زانیر[۱۰] و کایولا[۱۱]، ۲۰۰۰؛ فیور[۱۲] و همکاران، ۲۰۱۰). تاکنون پژوهش‌گران متعددی تلاش کرده‌اند خصوصیات مورفولوژیکی، مولکولی و فیتوشیمیایی ژرم‌پلاسم زعفران را در کشورهای مختلف مطالعه کنند (ایزدپناه و همکاران، ۲۰۱۵؛ شکرپور و همکاران، ۲۰۱۷؛ گرستا و همکاران، ۲۰۰۹؛ فرناندز[۱۳] و همکاران، ۲۰۱۱؛ پاردو[۱۴] و همکاران، ۲۰۰۳؛ سهیلی‌وند و همکاران، ۲۰۰۶).

علاوه بر این، روش‌های متعددی با ابزارهای آنالیزی مختلف برای خالص‌سازی ترکیبات زیستی فعال از جمله کروسین‌ها، پیکروکروسین و سافرانال ارائه شده است (ترانتیلیس[۱۵] و همکاران، ۱۹۹۵). پروفایل ترکیبات شیمیایی از نمونه‌های زعفران اسپانیا (لوزانو[۱۶] و همکاران، ۲۰۰۰)، یونان (کانکیس[۱۷] و همکاران، ۲۰۰۴)، چین (لی[۱۸]و همکاران، ۲۰۰۲)، هند (زارینا[۱۹] و

1. *Crocus sativus* L.
2. Bukhari
3. Gresta
4. Lage
5. De Juan
6. Cardone
7. Shahi
8. Cardone
9. Kothari
10. Zanier
11. Caiola
12. Fiore
13. Fernández
14. Pardo
15. Tarantilis
16. Lozano
17. Kanakis
18. Li
19. Zareena

همکاران، ۲۰۰۱)، آلمان (استاراوبینگر[1] و همکاران، ۱۹۹۸) و ایران (بول حسنی، ۱۹۸۶) نشان دادند مقدار اندازه‌گیری‌شده این ترکیبات رابطه مستقیمی با روش خشک‌کردن، استخراج، جداسازی و خالص‌سازی دارد. روش‌های کروماتوگرافی از جمله کروماتوگرافی لایه نازک (جین[2] و همکاران، ۱۹۸۶) و کروماتوگرافی گازی به‌عنوان بهترین و کارآمدترین روش‌ها برای تجزیه و تحلیل ترکیبات در زعفران شناخته می‌شوند (کازاز–کاتالان[3] و همکاران، ۲۰۰۵).

هم‌چنین، امروزه به‌طور گسترده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC برای جداسازی و خالص‌سازی در زمینه‌های مختلف از جمله صنعت داروسازی، بیوتکنولوژی، محیط زیست، پلیمرها و غذا استفاده می‌شود. در طی دهه‌های اخیر، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به‌عنوان روش منتخب برای آنالیز طیف وسیعی از ترکیبات شناخته می‌شود. در همین راستا، برای کمی‌سازی کروسین‌ها، اندازه‌گیری پیکروکروسین و سافرانال در نمونه‌های مختلف زعفران، از کروماتوگرافی مجهز به شناساگر نوری (Vis) و فلورسانس (UV) استفاده می‌شود. روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای خالص‌سازی و شناسایی ترکیبات مختلف در زعفران تجاری با استفاده از شناساگر دایود[4] مورداستفاده قرار گرفت. در این روش، ده متابولیت مختلف که مسئول رنگ، طعم و عطر زعفران بودند، با دقت و وضوح بالا شناسایی و اندازه‌گیری شدند (لوزانو و همکاران، ۱۹۹۹).

۲. پیشینه پژوهش

در یک مطالعه تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زعفران ایرانی جمع‌آوری‌شده از هشت منطقه مختلف از استان خراسان با استفاده از صفات زراعی–موفولوژیکی و فیتوشیمیایی موردبررسی قرار گرفت (بقالیان و همکاران، ۲۰۱۰). در این مطالعه تمام صفات موردبررسی شامل صفات زراعی–موفولوژیکی و فیتوشیمیایی (پیکروکروسین، سافرانال و کروسین‌ها) به‌جز طول برگ و تعداد پرچم، در بین اکوتیپ ها تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. با این‌حال، هیچ ارتباط معنی‌داری بین الگوهای تنوع و پراکنش جغرافیایی اکوتیپ‌ها مشاهده نشد. در مطالعه‌ایی دیگر، تنوع ژنتیکی بیش از ۵۰ اکوتیپ مختلف زعفران جمع‌آوری‌شده از پنج منطقه مختلف ایران با استفاده از ۵۶ نشانگر SSR موردمطالعه قرار گرفت که از بین آن‌ها ۱۲ نشانگر از خود چندشکلی نشان دادند (نعمتی و همکاران، ۲۰۱۲). در پژوهشی دیگر به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ۳۸ اکوتیپ زعفران کشت شده در ایران و هم‌چنین ۲۹ گونه وحشی، از ۲۷ نشانگر SSR استفاده شد (نعمتی و همکاران، ۲۰۱۴). از میان این تعداد، ۲۴ جایگاه چندشکلی نشان دادند، هم‌چنین تفکیک خوبی بین *C. sativus* و سایر گونه‌های جنس *Crocus* مشاهده شد و مقادیر قابل‌قبولی از تنوع ژنتیکی در میان توده‌های ایرانی زعفران شناسایی شد. در مطالعه‌ایی دیگر تنوع ژنتیکی بین ۱۱۲ اکوتیپ از مجموعه جهانی زعفران و کروکوس[5]، با استفاده از ۱۲ ترکیب پرایمر نشانگر AFLP موردبررسی قرار گرفت که تنوع ژنتیکی بسیاری کمی مشاهده شد. درصورتی‌که، تنوع اپی‌ژنتیکی بالایی با استفاده از سه ترکیب آغازگر MS-AFLP ثبت گردید (بوسکانی[6] و همکاران، ۲۰۱۵). به‌تازگی تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زعفران جمع‌آوری‌شده از چهار منطقه اصلی تولیدکننده زعفران در هند که به‌عنوان نمونه‌های کشمیریانوس[7] نامگذاری شده‌اند، از طریق نشانگرهای ISSR و RAPD موردبررسی قرار گرفتند. برای هر دو نشانگر ISSR و RAPD، به‌ترتیب ۲۰ و ۱۰۷ امپلیکون چندشکل در تمام اکوتیپ‌های زعفران موردمطالعه

1. Straubinger
2. Jin
3. Casas-Catalán
4. Diode array
5. The World Saffron and Crocus Collection
6. Busconi
7. Kashmirianus

شناسایی شد، با این‌حال دامنه محدودی از تنوع ژنتیکی هم‌چنان در بین جمعیت‌های کشمیریانوس شناسایی شد (میر[1] و همکاران، ۲۰۲۱).

در پژوهشی دیگر، چهار اکوتیپ زعفران مشتق‌شده از کشورهای مدیترانه‌ای شامل ایتالیا، اسپانیا و یونان به‌منظور ارزیابی تنوع زیستی و فرسایش ژنتیکی براساس داده‌های فنومورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و مولکولی شامل نشانگرهای SSR، RAPD و SRAP به‌مدت دو سال پی‌درپی موردمطالعه قرار گرفتند (کاردون ۲ و همکاران، ۲۰۲۱). براساس نتایج حاصل، به‌غیر از چهار صفت طول پرچم، قدرت رنگ‌دهی گلبرگ‌ها، طول برگ و تعداد برگ در هر گیاه، بقیه صفات اندازه‌گیری‌شده به‌طور کلی وابسته به اکوتیپ بودند. علاوه بر این، برخلاف ویژگی‌های فنومورفولوژیکی و فیتوشیمیایی، نشانگرهای مبتنی بر PCR قادر به تفکیک واضح میان اکوتیپ‌های مختلف نبودند، زیرا هیچ‌کدام از آن‌ها امپلیکون‌های چندشکل تولید نکردند.

به‌طور کلی زعفران به‌دلیل داشتن تولیدمثل غیرجنسی یا از دست‌دادن توانایی تولیدمثل جنسی، تنوع ژنتیکی بسیار کمی دارد. به همین دلیل، زعفران در معرض خطر شدید فرسایش ژنتیکی قرار دارد که مانعی برای تولید گسترده و انبوه زعفران می‌شود (فرناندز و همکاران، ۲۰۰۶). این تنوع ژنتیکی کم باعث ایجاد یک خزانه ژنی با تنوع کم می‌شود که در نهایت موجب آسیب‌پذیری اجتناب‌ناپذیر این گیاه ارزشمند در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله تغییرات اقلیمی و پیامدهای ناشی از آن از جمله خشک‌سالی و مشکلات شوری، می‌گردد. تنش‌های یادشده در نهایت منجر به کاهش تنوع ژنتیکی در سطوح بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای می‌گردد (سلامی و همکاران، ۲۰۲۲).

بنابراین، مطالعه تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت اکوتیپ‌های زعفران زراعی مناطق مختلف جغرافیایی در ایران، به‌عنوان بزرگ‌ترین تولیدکننده زعفران در دنیا، امری مهم و ضروری است (شاهی و همکاران، ۲۰۱۶). این اطلاعات نه‌تنها برای برنامه‌های حفاظت از ژرم‌پلاسم‌های زعفران زراعی، بلکه برای توسعه برنامه به‌نژادی در آینده نیز ضروری است. یک برنامه اصلاح و بهبود ژنتیکی می‌تواند باعث توقف فرسایش ژنتیکی و در نهایت بهبود شرایط کشت و کار تجاری آن شود. برخی از دانشمندان بر این باورند که اگرچه زعفران تکثیر غیرجنسی دارد، اما به‌دلیل نشان‌دادن طیف وسیعی از سازگاری با انواع خاک، دما و طول روز، تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی قابل‌توجهی بین و درون جمعیت‌ها قابل مشاهده است (آقااوف[3] و همکاران، ۲۰۰۹). جمعیت‌های بومی که با شرایط منطقه کاملاً سازگار هستند، منابع ژنتیکی مهم و منبع اولیه برای انتخاب توده‌ایی به‌حساب می‌آیند. این جمعیت‌های بومی را می‌توان به‌طور هم‌زمان برای چندین صفت مهم مورفولوژیکی ارزیابی کرد تا اندازه و ماهیت تنوع ژنتیکی برای صفات مختلف مورفولوژیکی و رابطه ژنتیکی آن‌ها روشن شود (ترانتیلیس و همکاران، ۱۹۹۷). چنین اطلاعاتی برحسب پارامترهای آماری برای وراثت‌پذیری عمومی و خصوصی، همبستگی ژنتیکی و محیطی، تعاملات ژنوتیپ× محیط و پاسخ پیش‌بینی‌شده و مشاهده‌شده به انتخاب بیان می‌شود (مجیدی و همکاران، ۲۰۰۹). در این مطالعه، روش‌های آماری چند متغیره برای بررسی آماری تنوع زیستی در بین ۲۲ اکوتیپ مختلف زعفران ایرانی مورداستفاده قرار گرفت. از اهداف اصلی این مطالعه می‌توان به ارزیابی تنوع فنوتیپی و مقایسه محتوی فیتوشیمیایی، هم‌چنین تعیین همبستگی‌های احتمالی بین صفات مورفولوژیکی و محتوی فیتوشیمیایی در بین اکوتیپ‌های مختلف زعفران ایرانی با منشأهای جغرافیایی مختلف اشاره کرد.

۳. روش‌شناسی پژوهش

در پژوهش حاضر، ۲۲ اکوتیپ مختلف زعفران ایرانی با منشأهای جغرافیایی مختلف جهت بررسی تنوع زیستی این گیاه

1. Mir
2. Cardone
3. Agayev

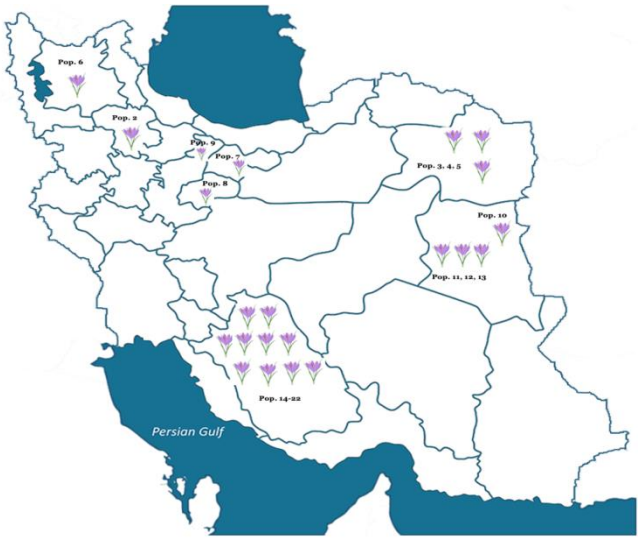
ارزشمند موردمطالعه قرار گرفت (جدول ۱). اکوتیپ‌های موردنظر از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری و در مزرعه تحقیقاتی گروه مهندسی باغبانی و فضای سبز دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران کشت و نگه‌داری شده‌اند (شکل ۱). موقعیت جغرافیایی مزرعه، ۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه شمالی و ۵۱ درجه شرقی، با ارتفاع ۱۳۲۰ متر از سطح دریا بود. به‌منظور احداث مزرعه، بنه‌های جمع‌آوری‌شده در خطوط جداگانه در عمق ۲۰ سانتی‌متر، با فاصله ۱۵ سانتی‌متر بین ردیف‌ها و ۲۵ سانتی‌متر درون ردیف مستقر شدند. آبیاری جهت القای گلدهی در اواسط شهریورماه انجام شد. کنترل علف‌های هرز به‌صورت دستی انجام شد. بافت خاک مزرعه از نوع خاک رسی‌لومی بود و هم‌چنین میانگین بارش سالانه ۲۵۴/۵ میلی‌متر بود.

جدول ۱. لیست اکوتیپ‌های زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) جمع‌آوری شده از مناطق مختلف جغرافیایی در ایران

شماره	شهر یا منطقه جمع‌آوری‌شده	استان	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
۱	منطقه ناشناس	–	–	–	–
۲	کوشکن	زنجان	۳۶/ ۶۹۸	۴۸/۳۹۵	۱۵۵۰
۳	تربت حیدریه	خراسان رضوی	۳۵/۱۶۳	۵۹/۱۳۴	۱۴۵۰/۸
۴	زاوه	خراسان رضوی	۳۵/۱۶۳	۵۹/۲۷۴	۱۳۰۰
۵	باخزر	خراسان رضوی	۳۴/۹۹۳	۶۰/۲۹۷	۱۲۷۹
۶	هریس	آذربایجان شرقی	۳۸/۲۰۴	۴۶/۷۵۵	۱۹۱۴
۷	قرچک	تهران	۳۵/۴۳۶	۵۱/۵۷۲	۹۴۵
۸	اراک	مرکزی	۳۴/۰۸۷	۴۹/۷۰۲	۱۷۴۴
۹	نظرآباد	البرز	۳۶/۵۰۱	۵۰/۳۰۱	۱۳۳۱
۱۰	قائنات	خراسان جنوبی	۳۳/۴۳۱	۵۹/۱۰۵	۱۴۳۲
۱۱	فردوس ۱۵	خراسان جنوبی	۳۴/۰۱۴	۵۸/۱۰۳	۱۲۹۳
۱۲	فردوس ۱۶	خراسان جنوبی	۳۴/۰۱۴	۵۸/۱۰۳	۱۲۹۳
۱۳	فردوس ۱۷	خراسان جنوبی	۳۴/۰۱۴	۵۸/۱۰۳	۱۲۹۳
۱۴	استهبانات ۱	فارس	۲۹/۰۷۵	۵۴/۰۲۵۶	۱۷۳۰
۱۵	استهبانات ۲	فارس	۲۹/۰۷۵	۵۴/۰۲۵۶	۱۷۳۰
۱۶	استهبانات ۳	فارس	۲۹/۰۷۵	۵۴/۰۲۵۶	۱۷۳۰
۱۷	استهبانات ۴	فارس	۲۹/۰۷۵	۵۴/۰۲۵۶	۱۷۳۰
۱۸	استهبانات ۵	فارس	۲۹/۰۷۵	۵۴/۰۲۵۶	۱۷۳۰
۱۹	استهبانات ۶	فارس	۲۹/۰۷۵	۵۴/۰۲۵۶	۱۷۳۰
۲۰	استهبانات ۷	فارس	۲۹/۰۷۵	۵۴/۰۲۵۶	۱۷۳۰
۲۱	استهبانات ۸	فارس	۲۹/۰۷۵	۵۴/۰۲۵۶	۱۷۳۰
۲۲	استهبانات ۹	فارس	۲۹/۰۷۵	۵۴/۰۲۵۶	۱۷۳۰

به‌منظور بررسی تنوع فنوتیپی در بین اکوتیپ‌های زعفران زراعی، این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو تکرار برای سه برداشت (۱۳۹۹ تا ۱۴۰۱) اجرا شد. صفات موردمطالعه شامل طول گل (سانتی‌متر)، طول گلبرگ (سانتی‌متر)، طول برگ (سانتی‌متر)، طول کلاله (سانتی‌متر)، وزن تر گل (گرم)، وزن تر کلاله (گرم)، وزن خشک کلاله (گرم)، تعداد گل در مترمربع (تعداد) و عملکرد (گرم در مترمربع) بودند. برای اندازه‌گیری صفات فنوتیپی تعداد ۱۰ نمونه از هر کرت اندازه‌گیری شدند و سپس میانگین نمونه‌ها به‌عنوان معرف هر کرت در تجزیه و تحلیل داده‌ها مورداستفاده قرار گرفت. هم‌چنین جهت بررسی تنوع در سطح متابولوم و ایجاد پروفایل فیتوشیمیایی، کلاله‌های تازه گل‌ها جداسازی و در معرض جریان هوای آزاد خشک شدند. سپس جهت بالابردن میزان دقت اندازه‌گیری، تکرارهای هر اکوتیپ با یکدیگر مخلوط شدند و پس از آماده‌سازی، نمونه‌ها در سه تکرار آزمایشی جهت سنجش میزان متابولیت‌های ثانویه به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC[1] (مدل واترز ۱۵۲۵ باینری HPLC پامپ[2] ساخت کشور ایالات متحده) تزریق شدند (یائو[3] و همکاران، ۲۰۲۲).

1. High-performance liquid chromatography
2. Waters 1525 Binary HPLC Pump
3. Yao



شکل ۱. مناطق جغرافیایی مورداستفاده برای جمع‌آوری اکوتیپ‌های مختلف زعفران زراعی

به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، کلاله‌ها در هاون به‌خوبی پودر شدند، سپس ۰/۱ گرم از پودر حاصل به ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد سرد اضافه شد. تیوپ‌های حاوی کلاله پودر شده به‌همراه متانول به‌مدت یک ساعت در تاریکی با سرعت یکنواخت همگن شدند، سپس با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، از پنج میلی‌لیتر اتانول (v/v) ۵۰ درصد جهت شست‌وشو استفاده شد.

در نهایت محتوای سوپرناتانت به‌دست‌آمده از هر لوله جهت جداسازی محتویات فیتوشیمیایی کلاله زعفران با حجم نهایی ۲۰ میلی‌لیتر به دستگاه تزریق شد. جداسازی کروماتوگرافی بر روی یک ستون C۱۸ (۱۵۰×۴/۶ میلی‌متر) با فیلتر قطر پنج میکرومتر با استفاده از یک سیستم حلال شامل ۸۰ درصد استاتونیتریل و ۲۰ درصد آب با سرعت ۰/۸ (میلی لیتر در دقیقه) به‌مدت بیست دقیقه اجراشد. شناساگر دستگاه برای تشخیص مقدار سافرانال، پیکروکروسین و کروسین به‌ترتیب بر روی طول موج‌های ۳۳۰ نانومتر، ۲۵۰ نانومتر و ۴۴۰ نانومتر تنظیم شد. استانداردهای مرجع جهت سنجش متابولیت‌های موردنظر از شرکت سیگما–آلدریچ (ماساچوست، کشور ایالات متحده) تهیه شدند. برای کنترل دستگاه، جمع‌آوری و پردازش داده‌ها از نرم‌افزار Breez (نسخه ۲,۰) شرکت واترز[1] استفاده شد. تعیین کمی آپوکاروتنوئیدها با مقایسه زمان‌های نگه‌داری تجربی و طیف‌های UV با استاندارد مرجع صورت گرفت. در نهایت مقدار آپوکاروتنوئیدها به‌صورت میلی‌گرم در گرم گزارش شد.

برای انجام تحلیل‌های آماری، ابتدا نرمال‌بودن داده‌ها و متناجس بودن واریانس خطاهای آزمایشی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری‌های فنوتیپی و فیتوشیمیایی با استفاده از آزمون شاپیرو[2] در نرم‌افزار R (بسته stats) موردبررسی قرار گرفت. سپس داده‌ها با استفاده از روش Yeo و Jonhson در نرم‌افزار R (بسته bestNormalize) نرمال شدند (یئو و جانسون[3]، ۲۰۰۰). تجزیه واریانس صفات زراعی در هر برداشت در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹,۲) انجام شد. با توجه به این‌که زعفران گیاهی چندساله است، تجزیه واریانس داده‌های سه برداشت متوالی در قالب طرح کرت‌های خردشده در زمان با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹,۲) انجام شد. هم‌چنین

1. Waters
2. Shapiro test
3. Yeo and Jonhson

جهت مقایسه میانگین صفات زراعی بین اکوتیپ‌ها نیز از روش چند دامنه‌ای توکی[1] در سطح معنی‌داری یک درصد برای میانگین سه سال استفاده شد (سینگر[2]، ۱۹۹۸).

ازآنجایی‌که اندازه‌گیری مقدار متابولیت‌های ثانویه در شرایط آزمایشگاهی انجام شد، داده‌های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در نرم‌افزار SAS (نسخه ۹,۲) تجزیه واریانس مولکولی شدند. هم‌چنین، برای مقایسه میانگین مقدار متابولیت‌های ثانویه بین اکوتیپ‌ها از روش چند دامنه‌ای توکی[3] در سطح معنی‌داری یک درصد استفاده شد (سینگر، ۱۹۹۸). به‌منظور پردازش کل داده‌های فنوتیپی و فیتوشیمیایی، محاسبه همبستگی‌های پیرسون و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۹,۰) انجام شد. بای‌پلات مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار R (بسته base) ترسیم شد. براساس آزمون ضریب تجمعی در بسته تحلیل خوشه‌ای در نرم‌افزار R (بسته cluster)، با استفاده از روش وارد[4] به‌عنوان یک روش مناسب برای خوشه‌بندی، بررسی گروه‌بندی اکوتیپ‌ها و بررسی صفات موردمطالعه انجام شد. دندروگرام و نقشه حرارتی نیز با استفاده از نرم‌افزار R (بسته ComplexHeatmap) ترسیم شدند.

۴. یافته‌های پژوهش

نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای صفات زراعی در سال اول نشان داد بین اکوتیپ‌های موردمطالعه برای تمام صفات زراعی اندازه‌گیری‌شده به‌غیر از صفت طول کلاله اختلاف وجود داشت (جدول ۲) ($P\leq$۰/۰۱). در بین صفات زراعی در سال اول بیش‌ترین ضریب تغییرات برای صفت طول کلاله (۱۸/۹۹ درصد) و کم‌ترین ضریب تغییرات برای صفت طول برگ (۱/۶۹ درصد) ثبت شد.

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات زراعی اندازه‌گیری‌شده در ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) در سال اول

		میانگین مربعات								
منابع تغییرات	درجه آزادی	طول گل (سانتی‌متر) ($\times10^{-2}$)	طول برگ (سانتی‌متر)	طول گلبرگ (سانتی‌متر) ($\times10^{-3}$)	طول کلاله (سانتی‌متر) ($\times10^{-2}$)	وزن تر گل (گرم) ($\times10^{-1}$)	وزن تر کلاله (گرم) ($\times10^{-6}$)	وزن خشک کلاله (گرم) ($\times10^{-7}$)	تعداد کل گل (تعداد در مترمربع)	عملکرد (گرم در مترمربع) ($\times10^{-3}$)
بلوک	۱	۱۰/۶۵	۰/۰۱۷	۱/۳۱	۱۲۹/۵	۴/۸۵	۶/۶۲	<۰/۰۰۰۱	۱۶۸/۱	۵/۸۴
اکوتیپ	۲۱	۱۶۱/۷ **	۱۵۲/۵ **	۳۵۱/۲ **	۸۳/۴	۱۳۰/۵ **	۲۲۲/۱ **	۲۱/۲ **	۳۹۸۰ **	۲۸۳/۲ **
خطا	۲۱	۱۱/۳۴	۰/۱۷۶	۲۳/۸۲	۴۸/۶	۳/۶۱	۲/۷	۰/۴	۹۹/۹۵	۴/۱
ضریب تغییرات (درصد)		۲/۴۸	۱/۶۹	۳/۳۸	۱۸/۹۹	۳/۷۳	۳/۷۵	۲/۹۱	۸/۹	۸/۱۱

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

در سال دوم نیز اکوتیپ‌های موردبررسی از نظر اکثر صفات زراعی به‌غیر از صفت طول برگ اختلاف معنی‌دار نشان دادند (جدول ۳) ($P\leq$۰/۰۱). هم‌چنین بیش‌ترین ضریب تغییرات در بین صفات زراعی در سال دوم برای صفت طول برگ (۳۷/۸ درصد) و کم‌ترین ضریب تغییرات برای صفت طول گل (۱/۹۹ درصد) گزارش شد.

1. Tukey’s Studentized Range (HSD) test
2. Singer
3. Tukey’s Studentized Range (HSD) test
4. Ward

جدول ۳. تجزیه واریانس صفات زراعی اندازه‌گیری‌شده در ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) در سال دوم

		میانگین مربعات							
منابع تغییرات	درجه آزادی	طول گل(سانتی‌متر) ($x10^{-3}$)	طول برگ (سانتی‌متر)	طول گلبرگ (سانتی‌متر) ($x10^{-3}$)	طول کلاله (سانتی‌متر) ($x10^{-2}$)	وزن تر گل (گرم) ($x10^{-4}$)	وزن تر کلاله (گرم) ($x10^{-6}$)	وزن خشک کلاله (گرم) ($x10^{-7}$)	تعداد کل گل (تعداد در مترمربع)	عملکرد (گرم در مترمربع) ($x10^{-3}$)
بلوک	۱	۱۶۱/۱	۰/۱۷	۹۲/۷۴	۲/۸۵	۰/۷۵	۰/۶۴	<۰/۰۰۰۱	۲۴۵/۸	۱۴/۲
اکوتیپ	۲۱	۱۴۳/۱ **	۶۸/۵	۳۱۵/۵ **	۲۷/۱ **	۱۲۴/۳ **	۱۹۳/۲ **	۱۹/۸ **	۴۱۸۶ **	۲۸۰/۶ **
خطا	۲۱	۷/۲۲	۸۸/۷	۵۶/۹۶	۵/۲۴	۷/۴۹	۱/۸۱	۰/۳	۷۷/۷۲	۱۰/۲
ضریب تغییرات (درصد)		۱/۹۹	۳۷/۸	۵/۱	۶/۶۴	۵/۳۲	۳/۰۴	۲/۳۶	۷/۸۷	۱۲/۶۳

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

نتایج تجزیه واریانس در سال سوم نیز نشان داد بین اکوتیپ‌ها از لحاظ تمام صفات زراعی اندازه‌گیری‌شده اختلاف وجود داشت (جدول ۴) ($P\leq$۰/۰۱). در سال سوم بیش‌ترین ضریب تغییرات در بین صفات موردمطالعه برای صفت عملکرد (۱۶/۹۹ درصد) و کم‌ترین ضریب تغییرات برای صفت طول گل (۲/۴۳ درصد) گزارش شد. بالابودن درصد ضریب تغییرات صفات طول کلاله و طول برگ به‌ترتیب در سال اول و دوم، می‌تواند حاکی از اثر بالای محیط بر روی این صفات باشد و به همین دلیل این تنوع از نظر آماری برای این صفات به‌ترتیب در سال اول و دوم معنی‌دار نشده است (جدول‌های ۲ و ۳) ($P\leq$۰/۰۱).

جدول ٤. تجزیه واریانس صفات زراعی اندازه‌گیری‌شده در ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) در سال سوم

		میانگین مربعات							
منابع تغییرات	درجه آزادی	طول گل (سانتی‌متر) ($X10^{-1}$)	طول برگ (سانتی‌متر)	طول گلبرگ (سانتی‌متر) ($X10^{-1}$)	طول کلاله (سانتی‌متر) ($X10^{-1}$)	وزن تر گل (گرم) ($X10^{-4}$)	وزن تر کلاله (گرم) ($X10^{-1}$)	وزن خشک کلاله (گرم) ($X10^{-1}$)	تعداد کل گل (تعداد در مترمربع)	عملکرد(گرم در مترمربع) ($X10^{-1}$)
بلوک	۱	۱۰/۸	۱۲/۸۲	۱۸۸/۵	۳۶	۴/۱	۱۳/۹۳	۰/۲	۲۹۷۸	۱۷۷
اکوتیپ	۲۱	۱۲۹/۳۶ **	۱۶۶/۶ **	۳۵۸/۷ **	۱۷/۳۶ **	۱۳۲/۷۲ **	۱۷۴/۷ **	۲۳/۶ **	۲۴۲۱ **	۲۵۲/۶ **
خطا	۲۱	۱۰/۹۴	۷/۱۱	۴۳/۹۶	۶	۲/۲۵	۷/۶۴	۰/۳	۳۱۲/۲	۱۷/۰۳
ضریب تغییرات (درصد)		۲/۴۳	۱۰/۵۵	۴/۳۴	۷/۱۴	۲/۹۱	۶/۲۲	۲/۶۶	۱۶/۳۳	۱۶/۹۹

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس طرح کرت‌های خردشده در زمان برای سه برداشت نشان داد بین اکوتیپ‌های موردبررسی از لحاظ تمام صفات زراعی اندازه‌گیری‌شده اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۵) ($P\leq$۰/۰۱). هم‌چنین مشخص شد که صفات طول گل، طول گلبرگ و طول کلاله در طی برداشت‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌دار هستند. با توجه به این‌که صفات یادشده تعیین‌کننده اندازه گل می‌باشند، احتمالاً با گذشت زمان و استقرار

بهتر بنه‌ها و بوته‌ها در خاک اندازه گل‌ها افزایش یافته است، لذا این صفات در برداشت‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. با این‌حال، هیچ اختلاف معنی‌داری برای سایر صفات از جمله وزن تر و خشک کلاله، وزن تر گل، طول برگ، تعداد گل و عملکرد در برداشت‌های مختلف مشاهده نشد. هم‌چنین معنی‌دار نبودن برهم‌کنش اکوتیپ در برداشت برای تمام صفات به‌غیر از تعداد گل در مترمربع و عملکرد نیز تائیدی بر این موضوع است که ترتیب اکوتیپ‌ها از لحاظ اکثر صفات زراعی موردمطالعه بین سه برداشت تغییر نکرده است. با این وجود، معنی‌دارشدن برهم‌کنش اکوتیپ در برداشت برای صفت تعداد گل در مترمربع و عملکرد نشان‌دهنده تفاوت در ترتیب اکوتیپ‌ها در طی برداشت‌های مختلف می‌باشد. بیش‌ترین ضریب تغییرات در تجزیه داده‌های سه برداشت متوالی مربوط به صفت طول برگ (۲۲/۴ درصد) و کم‌ترین آن متعلق به صفت وزن خشک کلاله (۱/۹۱۹ درصد) بود (جدول ۵).

جدول ۵. تجزیه واریانس کرت‌های خردشده در زمان برای صفات زراعی اندازه‌گیری‌شده در ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی

		میانگین مربعات							
منابع تغییرات	درجه آزادی	طول گل (سانتی‌متر) $(x10^{-2})$	طول برگ (سانتی‌متر)	طول گلبرگ (سانتی‌متر)^2 $(x10^{-2})$	طول کلاله (سانتی‌متر) $(x10^{-2})$	وزن تر گل (گرم) $(x10^{-4})$	وزن تر کلاله (گرم) $(x10^{-6})$	وزن خشک کلاله (گرم) $(x10^{-7})$	تعداد گل (تعداد در مترمربع)	عملکرد (گرم در مترمربع) $(x10^{-3})$
بلوک	۱	۱۲۳/۴	۳/۶۴	۲۰/۰۱	۱۲۱/۲	۳/۷۵	۱۶/۸۳	۰/۱	۲۳۰۸/۳	۱۲۶/۷
اکوتیپ	۲۱	۴۱۵/۷ **	۳۲۶/۸**	۹۴/۰۷ **	۸۸/۹**	۳۸۰/۹**	۵۸۱/۲**	۶۴/۱**	۹۱۹۲/۸**	۷۴۴/۸**
خطای اول	۲۱	۱۵/۶	۳۳/۴۲	۵/۳۶	۲۴/۶	۵/۴۳	۴/۴	۰/۷	۱۴۹/۵۸	۹/۴۷
برداشت	۲	۲۵/۹*	۳/۴۸	۷۶/۰۷**	۷۷/۳۹ *	۵/۱۵	۱۰/۷۳	۰/۱	۲۳۷/۹	۱۱/۶
برداشت× اکوتیپ	۴۲	۹/۲۵	۳۰/۴۱	۴/۲۳	۱۹/۴۷	۳/۳۳	۴/۳۷	۰/۲	۶۹۷/۷**	۳۵/۷**
خطای دوم	۴۴	۷/۹۶	۳۰/۰۷	۳/۵۸	۱۷/۹۱	۳/۹۲	۳/۷۸	۰/۲	۱۸۷/۰۵۳	۱۲/۰۳
ضریب تغییرات (درصد)		۲/۰۸۳	۲۱/۹۶	۴/۰۳۲	۱۲/۰۲۷	۳/۸۵۷	۴/۴۲۷	۱/۸۸۷	۱۲/۳۴	۱۳/۹۶

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین صفات زراعی اندازه‌گیری‌شده برای میانگین سه سال با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای توکی در سطح یک درصد در جدول (۶) نشان داده شده است. براساس نتایج به‌دست‌آمده، اکوتیپ جمع‌آوری‌شده از منطقه قائنات برای اکثر صفات موردمطالعه از جمله طول گل (۱۴/۹۶ سانتی‌متر)، طول برگ (۴۵/۸ سانتی‌متر)، طول کلاله (۴/۶۳ سانتی‌متر)، وزن تر گل (۰/۶۸۵ گرم)، وزن تر کلاله (۰/۰۶۶۶ گرم)، وزن خشک کلاله (۰/۰۰۹۷۵۸ گرم) و عملکرد (۱/۷۵۸۸ گرم در مترمربع) بیش‌ترین مقدار میانگین را داشت. هم‌چنین بیش‌ترین میانگین طول گلبرگ و مجموع تعداد گل در هر مترمربع به‌ترتیب برای اکوتیپ آذربایجان (۵/۴۲ سانتی‌متر) و اکوتیپ کوشکن (۱۸۸/۳ عدد) ثبت شد. کوتاه‌ترین طول گل (۱۱/۵ سانتی‌متر) و طول برگ (۱۶/۹ سانتی‌متر) برای اکوتیپ باخزر ثبت شد. هم‌چنین کم‌ترین میانگین وزن خشک کلاله و عملکرد به‌ترتیب متعلق به اکوتیپ‌های استهبانات ۴ (۰/۰۰۵۵ گرم) و استهبانات ۹ (۰/۳۳۸ گرم) بود.

جدول ٦. مقایسه میانگین صفات زراعی موردبررسی در ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) براساس میانگین سه سال با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای توکی

اکوتیپ	طول گل (سانتی‌متر)	طول برگ (سانتی‌متر)	طول گلبرگ (سانتی‌متر)	طول کلاله (سانتی‌متر)	وزن تر گل (گرم)	وزن تر کلاله (گرم) ($x10^{-2}$)	وزن خشک کلاله (گرم) ($x10^{-3}$)	تعداد کل گل (تعداد در مترمربع)	عملکرد (گرم در مترمربع) ($x10^{-1}$)
منطقه بی‌نام	۱۳/۰۲ e-g	۱۹/۷۹ de	۴/۵ c-g	۲/۹۹ b	۰/۵۱ e-h	۳/۹ d-g	۵/۲۱ h	۱۰۶/۷ e-h	۶/۰۷ e-h
کوشکن	۱۳/53 b-f	۱۹/۳۱ de	۴/۱۶ fg	۲/۹۳ b	۰/۴۲ ij	۴/۲ c-f	۶/۶۶ ef	۱۸۸/۳ a	۱۲/۵۴ b
تربت حیدریه	۱۲/88 fg	۱۹/۰۲ e	۴/۶ c-g	۳/۳۷ ab	۰/۴۱۵ j	۴/۶۳ c	۷/۴۶ b-d	۱۴۸ cd	۱۱/۰۵ bc
زاوه	۱۳/46 b-f	۲۰/۲۲ de	۴/۹ a-e	۳/۳۸ ab	۰/۴۲۱ ij	۳/۸ d-g	۶/۹۲ d-f	۵۵/۵ k	۳/۸۳h
باخزر	۱۱/۵ h	۱۶/۹ e	۴/۴۵ d-g	۳/۳ ab	۰/۴۲۶ ij	۳/۸ d-g	۷/۴۲b-d	۱۱۲ e-g	۹/۱۱cd
آذربایجان	۱۴/۴۲ a-c	۲۱/۸۸ b-e	۵/۴۲ a	۳/۹۵ ab	۰/۶۵۳ a	۴/۶۶ c	۷/۴۱ b-d	۱۵۳ b-d	۱۱/۳۲ bc
قرچک	۱۲/۲۷ gh	۱۹/۷۴ de	۴/۷ b-f	۳/۲۹ ab	۰/۴۶ g-j	۳/۹ d-g	۷/۴۳ b-d	۱۶۱ a-c	۱۱/۹۵ b
اراک	۱۲/۷fg	۲۰/۹۳ c-e	۴/۸ a-f	۳/۰۹ b	۰/۴۴ ij	۴/۳ c-e	۷/۴۲ b-d	۱۴۸ cd	۱۰/۹۶ bc
نظرآباد	۱۲/۶۴ f-h	۲۰/۰۶ de	۴/۶ c-g	۳/۴۱ ab	۰/۴۶g-j	۴/۱c-f	۶/۸۵ d-f	۱۱۳ e-g	۷/۶۹ de
قائنات	۱۴/۹۶ a	۴۵/۸ a	۴/۳ e-g	۴/۶۳ a	۰/۶۸۵ a	۶/۶۶ a	۹/۷۶a	۱۸۳ ab	۱۷/۸۶ a
فردوس ۱۵	۱۴/۳۱ a-d	۳۹/۴ a-c	۴/۱۵ fg	۳/۹۲ ab	۰/۵۷۸ b-d	۵/۷۹ b	۷/۳۴ b-e	۸۱g-k	۵/۹۴ e-h
فردوس ۱۶	۱۴/۴۵ a-c	۴۰/۷ ab	۳/۹۸ g	۴/۰۴ ab	۰/۵۸۶ bc	۵/۶۲ b	۷/۳۳ b-e	۶۴/۳jk	۴/۷۲ f-h
فردوس ۱۷	۱۴/۵۱ ab	۳۹/۵ a-d	۴/۱۶ fg	۳/۸۹ ab	۰/۵۴۵ c-f	۵/۵۳ b	۷/۶۴ bc	۷۶/۷h-k	۵/۸۹e-h
استهبانات ۱	۱۴/۳ a-d	۳۲/۴ a-e	۴/۵۷ c-g	۳/۵۳ ab	۰/۵۸۲ b-d	۵/۴۵ b	۶/۸۸ d-f	۹۹f-i	۶/۸d-g
استهبانات ۲	۱۳/۵ b-f	۳۱/۸ a-e	۵/۱۲ a-c	۳/۷ab	۰/۶۲ ab	۵/۳۶ b	۶/۷۸ d-f	۷۱/۲ i-k	۴/۸۳ f-h
استهبانات ۳	۱۳/۷ b-f	۲۹/۲ a-e	۴/۴۷ d-g	۳/۳۳ ab	۰/۵۶b-e	۴/۴ cd	۸/۰۱ b	۹۸f-j	۴/۸۲de
استهبانات ۴	۱۴/۲ a-d	۱۸/۰۳ e	۵/۰۴ a-d	۳/۴۸ab	۰/۴۶ g-j	۳/۶ fg	۵/۵۳ gh	۸۶f-k	۴/۷۶f-h
استهبانات ۵	۱۳/۱ e-g	۱۸/۳ b-e	۴/۸۵ a-e	۳/۳۵ab	۰/۴۷ g-j	۳/۷ e-g	۵/۵۶ gh	۱۳۸c-e	۷/۷۲ de
استهبانات ۶	۱۳/۴ c-g	۱۹ b-e	۵/۰۵ a-d	۳/۳۷ ab	۰/۴۸ f-i	۲/۵۲ h	۵/۶۵ gh	۷۳/۷h-k	۴/۱۳ gh
استهبانات ۷	۱۳/۵ b-f	۱۸/۵ b-e	۵/۲۹ ab	۳/۵۳ ab	۰/۴۵ h-j	۳/۳۵ g	۶/۹۶ c-e	۹۵ f-j	۶/۵۸ d-g
استهبانات ۸	۱۳/۳ d-g	۱۹/۹ b-e	۴/۹۵ a-e	۳/۳۱ab	۰/۵۲ d-g	۳/۳۸ g	۶/۲۳fg	۱۱۹d-f	۷/۴۱ d-f
استهبانات ۹	۱۴/۱ a-e	۲۱/۵ b-e	۵/۰۷ a-d	۳/۵۸ ab	۰/۵۴ c-f	۳/۸d-g	۵/۴۶ h	۷۰/۳ i-k	۳/۸۳h

در هر ستون، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه از جمله کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار نشان داد اکوتیپ‌ها از لحاظ مقدار آنالیت‌های سافرانال، پیکروکروسین و کروسین تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۷) ($P\leq$۰/۰۱). هم‌چنین، بیش‌ترین و کم‌ترین درصد ضریب تغییرات به‌ترتیب برای مقدار سافرانال (۶/۷۱۲ درصد) و کروسین (۲/۲۵۴ درصد) ثبت شد.

جدول ۷. تجزیه واریانس مولکولی مقدار آنالیت متابولیت‌های ثانویه در ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.)

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		سافرانال (میلی‌گرم در گرم)	پیکروکروسین (میلی‌گرم در گرم)	کروسین (میلی‌گرم در گرم)
اکوتیپ	۲۱	۰/۶۳۶۹۹ **	۱۳/۴۴۴ **	۳۴/۶۲۶ **
خطا	۴۴	۰/۰۱۳۰۵	۰/۱۹۷۶۴۵	۰/۳۳۹۳۵
ضریب تغییرات (درصد)		۶/۷۱۲۶	۴/۱۶۲۶	۲/۲۵۴۴

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

بیش‌ترین مقدار سافرانال، پیکروکروسین و کروسین به‌ترتیب برای اکوتیپ‌های فردوس۱۶ (۲/۴۲ میلی‌گرم در گرم)، استهبانات ۵ (۱۴/۰۱ میلی‌گرم در گرم) و استهبانات ۷ (۳۰/۸۶ میلی‌گرم در گرم) گزارش شد. درحالی‌که کم‌ترین مقدار سافرانال، پیکروکروسین و کروسین به‌ترتیب برای اکوتیپ‌های کوشکن (۰/۷ میلی‌گرم در گرم)، قرچک (۳ میلی‌گرم در گرم) و استهبانات ۹ (۱۸/۷۹ میلی‌گرم در گرم) به ثبت رسید (جدول ۸).

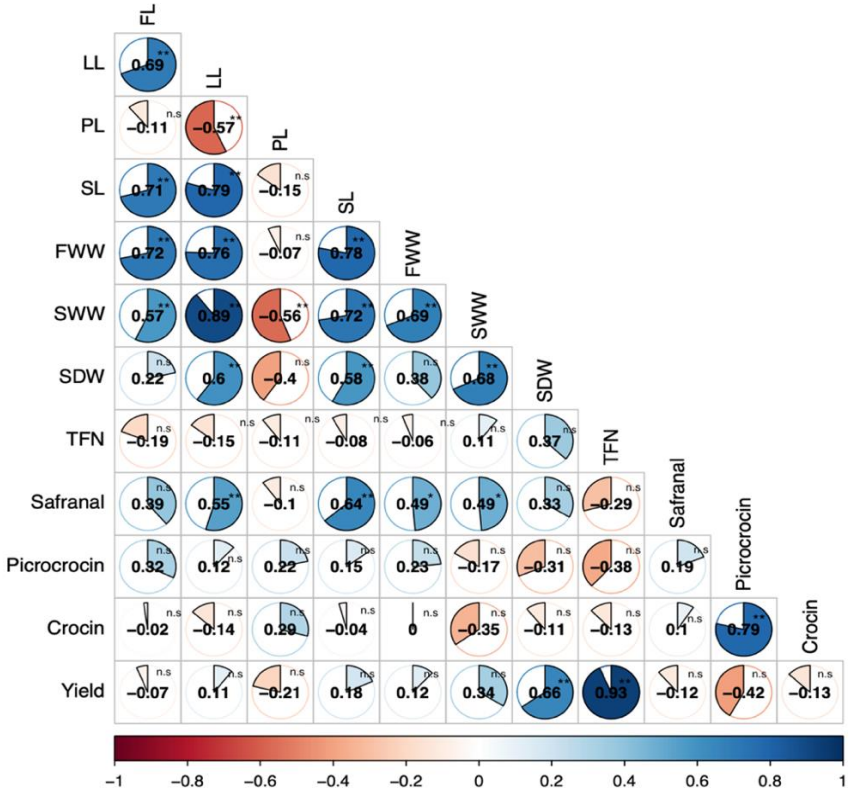
جدول ۸. مقایسه میانگین مقدار آنالیت متابولیت‌های ثانویه در ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای توکی

اکوتیپ	سافرانال (میلی‌گرم در گرم)	پیکروکروسین (میلی‌گرم در گرم)	کروسین (میلی‌گرم در گرم)
منطقه بی‌نام	۱/۶۴ c-f	۱۱/۱۵ cd	۲۸/۷۸ a-d
کوشکن	۰/۷ h	۸/۷۲f-h	۲۳/۱ hi
تربت حیدریه	۱/۰۸ gh	۷/۷۶hi	۲۳/۲۱ ij
زاوه	۱/۳۹ gh	۹/۸۴ d-f	۲۷/۸۸ c-e
باخزر	۱/۷۳ c-e	۸/۳۵ f-i	۲۴/۸۹ gh
آذربایجان	۲/۱۷ ab	۹/۷۶ d-g	۲۵/۶۴ fg
قرچک	۱/۲۶ fg	۳ d-g	۲۵/۳۸ fg
اراک	۱/۷ b-e	۷/۱۱ i	۲۱/۹۶ ij
نظرآباد	۲/۰۵ a-c	۸/۱۷ g-i	۲۴/۴۶ gh
قائنات	۲/۰۵ a-c	۱۰/۳۸ de	۲۷/۱۹ d-f
فردوس ۱۵	۲/۱۶ ab	۹/۵۳ e-g	۲۰/۶۱ jk
فردوس ۱۶	۲/۴ a	۱۲/۲ bc	۲۵/۷۲ fg
فردوس ۱۷	۲/۴۲ a	۱۲/۲۵ bc	۲۵/۷۹ e-g
استهبانات ۱	۱/۶۱ d-f	۹/۹۴d-f	۲۲/۲۴ij
استهبانات ۲	۱/۸۴ b-d	۱۲/۷۲d-f	۲۷/۳۲ d-e
استهبانات ۳	۱/۶۱ d-f	۱۲/۰۸bc	۲۹/۷۹ a-c
استهبانات ۴	۱/۶۵ c-f	۱۳/۰۹ ab	۲۸/۴۲ b-d
استهبانات ۵	۱/۸۱ b-d	۱۴/۰۱ a	۲۹/۰۵ b-d
استهبانات ۶	۱/۱۸ g	۱۲/۹ ab	۲۸/۹۳ a-d
استهبانات ۷	۱/۱۸ g	۱۲/۸۸ ab	۳۰/۸۶ a
استهبانات ۸	۱/۱۴ g	۱۳/۸۵ a	۳۰/۴۶ ab
استهبانات ۹	۱/۴۴ d-g	۸/۷۴ f-h	۱۸/۷۹ k

در هر ستون، حروف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار.

آن‌گونه که نتایج همبستگی بین صفات زراعی و فیتوشیمیایی نشان داد، بین مقدار کروسین و پیکروکروسین به‌عنوان دو متابولیت ثانویه مهم در کلاله زعفران رابطه مثبت و معنی‌دار وجود دارد (شکل ۲). به این صورت‌که، با افزایش مقدار کروسین در کلاله‌ها، مقدار پیکروکروسین نیز افزایش می‌یابد. این در حالی است که هیچ رابطه معنی‌داری بین مقدار کروسین و پیکروکروسین با مقدار سافرانال به‌عنوان عامل اصلی بوی مطبوع زعفران وجود ندارد. از طرف دیگر، مقدار آنالیت‌های سافرانال با صفات زراعی از جمله طول گل، طول کلاله، وزن تر گل و وزن تر کلاله رابطه معنی‌دار مثبتی داشت. به این‌صورت که با افزایش صفات مربوط به طول گل و کلاله، مقدار سافرانال نیز افزایش می‌یابد. هم‌چنین وزن خشک کلاله به‌عنوان مهم‌ترین صفت زراعی در زعفران با صفات طول برگ، طول کلاله و وزن تر کلاله ارتباط مثبت و معنی‌داری نشان داد. به‌عبارت دیگر، با افزایش طول برگ، طول کلاله نیز افزایش می‌یابد که درنهایت منجر به تولید کلاله‌هایی با وزن بیش‌تر می‌شود. به‌طور کلی، بوته‌ها با برگ‌های بزرگ‌تر و بلندتر فتوسنتز بیش‌تری انجام داده و مقدار مواد مغذی بیش‌تری را در بنه‌های دختری ذخیره می‌کنند، که منجر به تولید گل‌های بزرگ‌تر با کلاله‌های طویل‌تر و سنگین‌تر در سال بعد می‌شود. همان‌طورکه در شکل (۲) نشان داده شده صفت طول برگ با تمام صفات زراعی

اندازه‌گیری شده به‌غیر از تعداد کل گل در مترمربع و مقدار کروسین و پیکروکروسین، رابطه مثبت و معنی‌دار دارد. در مجموع می‌توان گفت صفت طول برگ یکی از مهم‌ترین صفات تعیین‌کننده عملکرد اکوتیپ‌ها در سال آینده است و می‌توان با استناد به نتایج همبستگی بین صفت طول برگ و سایر صفات تعیین‌کننده عملکرد مانند وزن خشک کلاله، بنه‌های قوی‌تر و بهتر را برای داشتن عملکرد بالاتر انتخاب کرد.



شکل ۲. همبستگی صفات مختلف اندازه‌گیری‌شده در ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.)

+FL: طول گل، LL: طول برگ، PL: طول گلبرگ، SL: طول کلاله، FWW: وزن تر گل، SWW: وزن تر کلاله، SDW: وزن خشک کلاله، TFN: تعداد کل گل، Safranal: مقدار آنالیت‌های سافرانال، Picrocrocin: مقدار آنالیت‌های پیکروکروسین، Crocin: مقدار آنالیت‌های کروسین.

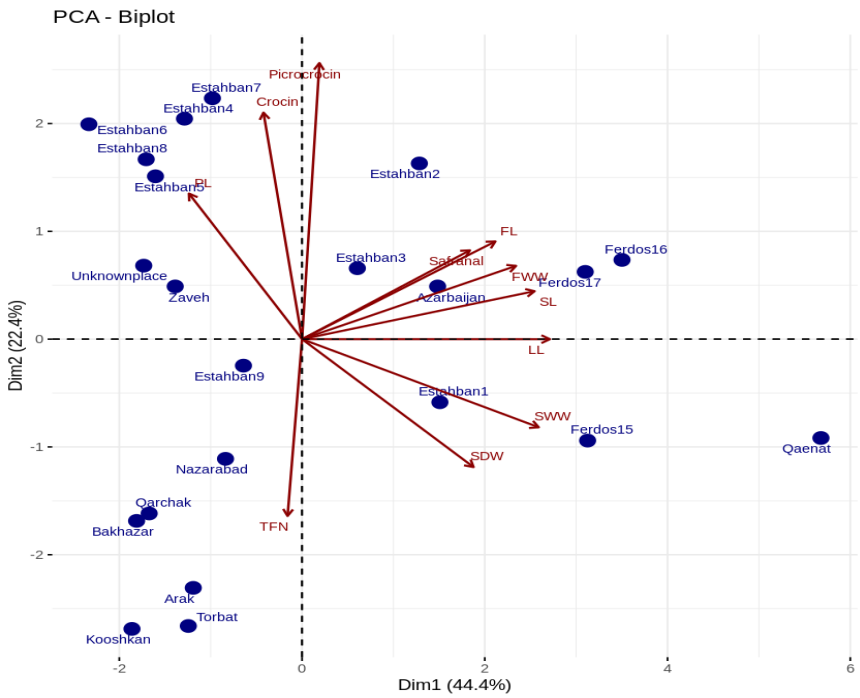
به‌منظور جمع‌بندی تنوع بین اکوتیپ‌ها براساس صفات اندازه‌گیری‌شده، تجزیه به عامل‌ها به‌روش مؤلفه‌های اصلی برای اکوتیپ‌های موردمطالعه انجام شد و پس از دوران واریمکس جهت مستقل‌کردن کامل صفات در مؤلفه‌ها، نتایج نشان داد که به‌طورکلی هفت مؤلفه ۹۷/۱ درصد تغییرات کل را توجیه می‌کنند (جدول ۹).

براساس نتایج حاصل، دو مؤلفه اصلی با مقادیر ویژه بزرگ‌تر از یک انتخاب شدند که در مجموع ۶۶/۷۲ درصد از واریانس تغییرات را توجیه کردند. صفات طول برگ (۰/۴۳۳)، وزن تر کلاله (۰/۴۱۴)، طول کلاله (۰/۴۰۷) و سافرانال (۰/۲۹۴) بیش‌ترین نقش را روی مؤلفه اول در جهت مثبت داشتند، بنابراین این صفات در بیان ۴۴/۳۶ درصد از تغییرات کل از اهمیت بیش‌تری برخوردار بودند. هم‌چنین صفات مقدار پیکروکروسین (۰/۵۷۷)، کروسین (۰/۴۷۳) و طول گلبرگ (۰/۳۰۴۱) به‌ترتیب بیش‌ترین نقش را روی مؤلفه دوم در جهت مثبت داشتند که نشان‌دهنده اهمیت این صفات در بیان ۲۲/۳۶ درصد از تغییرات کل است. هم‌چنین صفات تعداد گل و وزن خشک کلاله بیش‌ترین نقش در جهت منفی را بر

روی مؤلفه دوم ایفا کردند. بای‌پلات دو مؤلفه اصلی اول نیز نمایی دیگر از نقش صفات در توجیه واریانس تغییرات کل را نشان می‌دهد (شکل ۳). همان‌طورکه در این بای‌پلات نشان داده شده است، اکوتیپ قائنات با بالاترین میانگین برای اکثر صفات موردمطالعه، از لحاظ مؤلفه‌های اول مقدار بزرگ‌تری را داشت، درحالی‌که اکوتیپ فردوس ۱۶ در مقایسه با اکوتیپ قائنات، مقدار مؤلفه اول کم‌تر و مقدار مؤلفه دوم بیش‌تری را دارد.

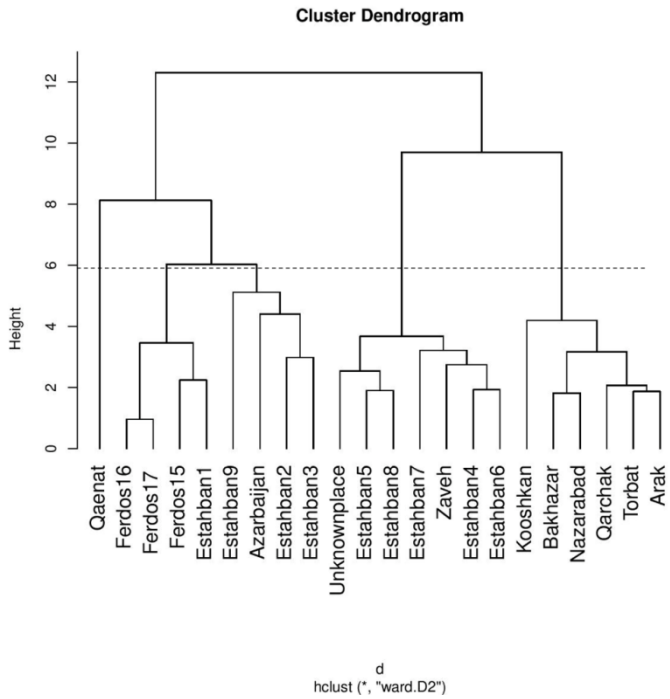
جدول ۹. مقادیر ویژه صفات موردمطالعه و واریانس توضیح داده‌شده توسط هر مؤلفه در ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.)

صفات	مؤلفه اول	مؤلفه دوم	مؤلفه سوم	مؤلفه چهارم	مؤلفه پنجم	مؤلفه ششم	مؤلفه هفتم
طول گل	۰/۳۳۸	۰/۲۰۴	۰/۱۲۲	۰/۲۲۵	۰/۴۴۷	−۰/۰۳۲	۰/۶۳۷
طول برگ	۰/۴۳۳	$-۵/۴۹ \times ۱۰^{-۵}$	۰/۰۸۳	−۰/۲۱	۰/۱۱۵	۰/۱۱۵	۰/۱۳
طول گلبرگ	−۰/۱۹۸	۰/۳۰۴۱	−۰/۱۲۸	۰/۷۴۳	−۰/۱۹۸	۰/۱۹۲	۰/۰۵۳
طول کلاله	۰/۴۰۷	۰/۱	−۰/۰۷۴	۰/۲۲۲	−۰/۱۲۳	۰/۱۵۵	−۰/۲۱
وزن تر گل	۰/۳۷۴	۰/۱۵۳	−۰/۰۷	۰/۳۰۶	۰/۱۹۷	−۰/۰۸۱	۰/۶۷۸
وزن تر کلاله	۰/۴۱۴	۰/۱۸۴	۰/۰۱۹۳	−۰/۰۵۳	۰/۰۶	−۰/۰۸۸	۰/۱۹۵
وزن خشک کلاله	۰/۲۹۹	−۰/۲۶۷	−۰/۴۲۵	−۰/۰۷۷	−۰/۲۹	۰/۵۴۹	−۰/۱۲۹
تعداد کل گل	۰/۰۲۵۳	−۰/۳۶۹۳	−۰/۶۸	۰/۱۷۴	۰/۲۱۸	−۰/۵۲	−۰/۱۰۶
سافرانال	۰/۲۹۴	۰/۱۸۵	۰/۰۹	−۰/۰۲۳	−۰/۷۱	−۰/۵۵	−۰/۱۳۳
پیکروکروسین	۰/۰۳۰۴	۰/۵۷۷	−۰/۱۷	−۰/۲۶۲	۰/۲۲۹	−۰/۱۲۵	۰/۰۱۶۶
کروسین	−۰/۰۶۷۴	۰/۴۷۳	−۰/۵۲۲	−۰/۳۲	−۰/۰۷۸	۰/۱۲۳	۰/۰۲۱
مقدار ویژه	۲/۲۰۹	۱/۵۶۸۲	۱/۰۴۴۵۲	۰/۹۵۴۵	۰/۸۶۵۶	۰/۵۷۷	۰/۵۰۸۸
واریانس توضیح داده‌شده (درصد)	۴۴/۳۶	۲۲/۳۶	۹/۹۱۸	۸/۲۸۲	۶/۸۱۱	۳/۰۲۷	۲/۳۵۳
واریانس تجمعی (درصد)	۴۴/۳۶	۶۶/۷۲	۷۶/۶۳۴	۸۴/۹۱۷	۹۱/۷۲۷	۹۴/۷۵۴	۹۷/۱۰۸



شکل ۳. نمودار بای‌پلات دو مؤلفه اصلی مربوط به تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات اندازه‌گیری‌شده در ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) + FL: طول گل، LL: طول برگ، PL: طول گلبرگ، SL: طول کلاله، FWW: وزن تر گل، SWW: وزن تر کلاله، SDW: وزن خشک کلاله، TFN: تعداد کل گل، Safranal: مقدار آنالیت‌های سافرانال، Picrocrocin: مقدار آنالیت‌های پیکروکروسین، Crocin: مقدار آنالیت‌های کروسین.

در پژوهش حاضر، تحلیل خوشه‌ای براساس فاصله اقلیدوسی و روش وارد[1] جهت گروه‌بندی اکوتیپ‌ها و صفات موردمطالعه انجام شد (شکل ۴). نتایج حاصل نشان داد اکوتیپ‌های موردبررسی از نظر صفات موردمطالعه، به پنج گروه مجزا تقسیم شدند. براساس نتایج حاصل از تحلیل خوشه‌ای اکوتیپ‌هایی که از نظر جغرافیایی مشابه بودند، تقریباً در یک گروه جای گرفتند. اکوتیپ‌های قائنات و اراک بیش‌ترین فاصله اقلیدوسی را از یکدیگر داشتند که نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی و عدم تشابه ژنتیکی بین این دو اکوتیپ است. درحالی‌که اکوتیپ فردوس۱۶ کم‌ترین فاصله ژنتیکی و بیش‌ترین تشابه ژنتیکی را با اکوتیپ قائنات داشت و در خوشه‌بندی اکوتیپ‌ها در نزدیک‌ترین فاصله با قائنات قرار گرفت.



شکل ٤. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) موردمطالعه به روش وارد

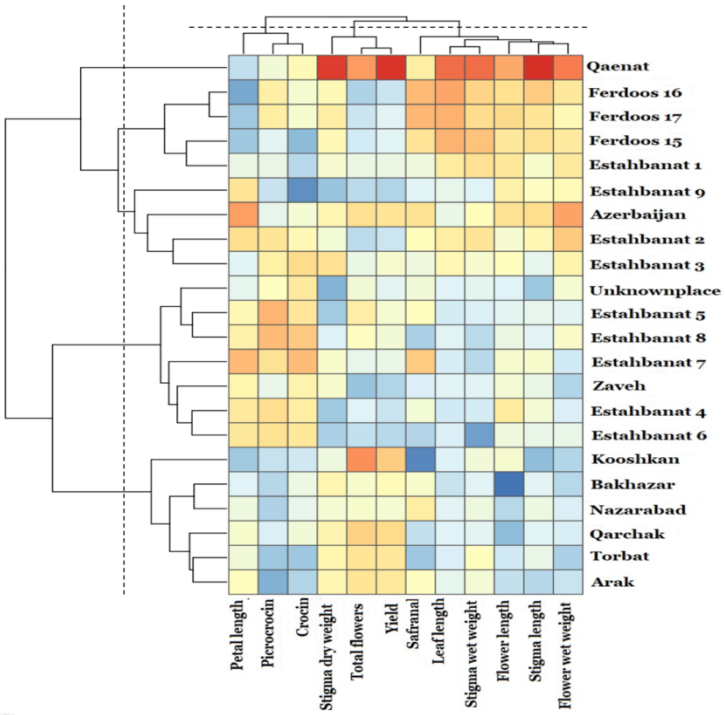
نقشه حرارتی نیز نمایی دیگر از تحلیل خوشه‌ای براساس فاصله اقلیدوسی و روش وارد را نشان می‌دهد که اکوتیپ‌ها و صفات موردبررسی را به‌صورت دو طرفه گروه‌بندی کرده است (شکل ۵). براساس نقشه حرارتی صفات موردمطالعه در سه دسته جداگانه قرار گرفتند. به‌طوری‌که صفات طول گلبرگ و مقدار کروسین و پیکروکروسین در دسته اول، صفات وزن خشک کلاله، تعداد کل گل و عملکرد نهایی در دسته دوم و درنهایت صفات مقدار سافرانال، طول برگ، وزن تر کلاله، وزن تر گل، طول گل و طول کلاله در دسته سوم جای گرفتند. نتایج حاصل از تحلیل خوشه‌ای با نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه به عامل مطابقت داشت. همان‌طورکه قبلاً نیز اشاره شد، اکوتیپ‌ها نیز در پنج خوشه مجزا دسته‌بندی شدند. دسته اول شامل اکوتیپ قائنات بود، این اکوتیپ از نظر اکثر صفات زراعی میانگین بالاتری را نسبت به سایر اکوتیپ‌ها داشت و از نظر مقدار کروسین و پیکروکروسین مشابه دسته بعدی بود. دسته دوم شامل اکوتیپ‌های فردوس ۱۶، فردوس ۱۷، فردوس ۱۵، استهبانات یک بود که از نظر صفات وزن تر کلاله و گل، طول گل و کلاله

1. Ward

بیش‌ترین شباهت را به اکوتیپ قائنات داشتند. با این‌حال، مقدار پیکروکروسین و سافرانال در اکوتیپ‌های دسته دوم بیش‌تر از اکوتیپ قائنات بود. لازم به ذکر است که دو دسته اول بیش‌ترین میانگین مقدار سافرانال و وزن خشک کلاله را داشتند. دسته سوم شامل اکوتیپ‌های استهبانات۲، استهبانات۳، استهبانات۹ و آذربایجان بود، در این دسته طول گلبرگ و مقدار کروسین بیش‌تری نسبت به دو دسته قبل ثبت شد که می‌توان به همبستگی بین این دو صفت نسبت داد.

دسته چهارم شامل اکوتیپ‌های استهبانات ۴، استهبانات ۵، استهبانات ۶، استهبانات ۷، استهبانات ۸، زاوه و منطقه بی‌نام بود. از ویژگی‌های قابل‌توجه دسته چهارم اکوتیپ‌ها می‌توان به مقدار کروسین، پیکروکروسین بیش‌تر و طول گلبرگ بلندتر اشاره کرد. در نهایت، اکوتیپ‌های کوشکن، باخزر، نظرآباد، قرچک، تربت‌حیدریه و اراک در دسته پنجم جای گرفتند و از نظر اکثر صفات زراعی و مقدار متابولیت‌های ثانویه میانگین کم‌تری را نشان دادند، با این‌حال به‌دلیل تعداد گل‌های تولیدی بیش‌تر، عملکرد قابل‌قبولی را داشتند.

با وجود این‌که، اکوتیپ قائنات از نظر صفات زراعی از میانگین بالاتری در شرایط آب‌وهوایی استان البرز برخوردار بود، اما بیش‌ترین میانگین مقدار کروسین، پیکروکروسین متعلق به اکوتیپ‌های دسته چهارم بود. ازآنجایی‌که کیفیت‌سنجی زعفران براساس مقدار متابولیت‌های ثانویه در کلاله خشک‌شده آن انجام می‌شود، برای تولید زعفران با کیفیت بالاتر با مقدار متابولیت‌های ثانویه بیش‌تر انتخاب از دسته چهارم اکوتیپ‌ها پیشنهاد می‌شود. درحالی‌که برای داشتن بوته‌های زعفران قوی‌تر، مقدار سافرانال، وزن خشک کلاله بیش‌تر و درنهایت عملکرد بالاتر اکوتیپ‌های قائنات، فردوس ۱۶، فردوس ۱۷ و فردوس ۱۵ جهت انتخاب و کشت مناسب‌تر هستند.



شکل ۵. نقشه حرارتی و دندروگرام حاصل از تجزیه‌ایی خوشه‌ای برای صفات اندازه‌گیری شده در ۲۲ اکوتیپ زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) +Flower length: طول گل، Leaf length: طول برگ، Petal length: طول گلبرگ، Stigma length: طول کلاله، Flower wet weight: وزن تر گل، Stigma wet weight: وزن تر کلاله، Stigma dry weight: وزن خشک کلاله، Total flower number: تعداد کل گل، Safranal: مقدار سافرانال، Picrocrocin: مقدار پیکروکروسین، Crocin: مقدار کروسین.

نتایج مبتنی بر تحلیل آماری و فاصله‌های اقلیدوسی در پژوهش حاضر نشان‌دهنده وجود تنوع در بین اکوتیپ‌های زعفران موردمطالعه از نظر صفات زراعی و پروفایل فیتوشیمیایی است. تنوع مشاهده‌شده و فاصله‌های ژنتیکی محاسبه‌شده می‌تواند به‌دلیل وجود تنوع در سطح ژنوم، ترنسکریپتوم و یا اپی‌ژنوم باشد. با این وجود که اکوتیپ‌های زعفران موردمطالعه در پژوهش حاضر در یک منطقه جغرافیایی ثابت و یکسان کشت و نگه‌داری شده‌اند، اما نتایج نشان می‌دهد که همچنان از نظر صفات زراعی اندازه‌گیری‌شده و پروفایل فیتوشیمیایی بین اکوتیپ‌ها تنوع معنی‌داری وجود دارد.

۵. بحث

تحلیل خوشه‌ای یکی از روش‌های آماری چندمتغیره است که جهت تعیین تنوع در بین جوامع گیاهی و جانوری و دسته‌بندی آن‌ها براساس تشابه ژنتیکی یا فاصله ژنتیکی آن‌ها کاربرد دارد (رومزبرگ[1]، ۲۰۰۴). در پژوهشی برای بررسی تنوع ژنتیکی گندم‌های تتراپلوئید در کشور اتیوپی از دو روش تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مورداستفاده قرار گرفت که نتایج حاصل از دو روش گروه‌بندی با هم مطابقت داشت (هایلو[2] و همکاران، ۲۰۰۶). کارگر و همکاران (۱۳۹۹) به‌منظور بررسی اثر تنش سرما بر صفات زرعی اکوتیپ‌های زعفران، آزمایشی بر روی پنج اکوتیپ شامل تربت‌حیدریه، فردوس، گناباد، قائن و کاشمر در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار انجام دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری برای بیش‌تر صفات زراعی اندازه‌گیری‌شده از جمله طول ساقه، درصد کلروفیل برگ، متوسط سطح برگ و وزن تر بنه در شرایط تنش و غیر تنش وجود داشت (کارگر و همکاران، ۲۰۲۰). در پژوهشی دیگر برای مطالعه تنوع ژنتیکی و زراعی زعفران، شش اکوتیپ مختلف که از استان خراسان جمع‌آوری شده بود به‌مدت دو سال در دانشگاه ارومیه موردبررسی قرار گرفتند (بیات و همکاران، ۲۰۱۶). نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد اختلاف معنی‌داری بین اکوتیپ‌های زعفران از نظر صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری‌شده وجود داشت. برای پی‌بردن به منشأ تنوع می‌توان از مارکرهای مولکولی برای بررسی تنوع در سطح ژنوم و ایجاد پروفایل بیان ژن‌های مهم درگیر در مسیر تولید آپوکارتنوئیدها برای بررسی تنوع در سطح رونوشت استفاده کرد (سلامی و حسینی، ۲۰۲۲).

۶. نتیجه‌گیری و پیشنهادات

زعفران یکی از گران قیمت‌ترین ادویه‌ها در جهان است که کاربرد گسترده‌ایی در صنعت غذا دارد. هم‌چنین به‌دلیل حضور ترکیبات فعال زیستی کمیاب در کلاله زعفران، این گیاه به‌عنوان یک گیاه ارزشمند دارویی در صنعت دارو مورداستفاده قرار می‌گیرد. با این‌حال، به‌دلیل تکثیر غیرجنسی و عدم وجود تنوع ژنتیکی در معرض فرسایش ژنتیکی قرار دارد. پژوهش حاضر جهت بررسی تنوع زیستی ۲۲ اکوتیپ مختلف زعفران زراعی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با دو تکرار در طی سه برداشت اجرا شد. اکوتیپ‌های موردمطالعه از مناطق جغرافیایی مختلف در ایران جمع‌آوری و در منطقه جغرافیایی استان البرز مستقر و نگه‌داری شده‌اند. به‌منظور ارزیابی تنوع بین اکوتیپ‌های موردمطالعه، صفات مهم زراعی در سه برداشت متوالی و مقدار متابولیت‌های ثانویه در شرایط آزمایشگاهی اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس صفات زراعی نشان داد اکوتیپ‌ها از نظر این صفات در طی سه برداشت متوالی دارای تفاوت معنی‌داری بودند. عدم تفاوت معنی‌دار در صفت طول کلاله در سال نخست آزمایش، احتمالاً به سبب این بوده است که هنوز بوته‌ها کاملاً مستقر نشده بودند و لذا طول کلاله تفاوت معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها نشان نداده است. هم‌چنین، در طی سه برداشت متوالی تغییری در روند اکثر صفات رخ نداده است. علاوه بر این،

1. Romesburg
2. Hailu

برای اکثر صفات در برداشت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که نشان‌دهنده عدم تغییر روند صفات در طی سه برداشت بود. با این‌حال، صفات تعیین‌کننده اندازه گل از جمله طول گل، طول گلبرگ و طول کلاله در طی برداشت‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌دار بودند که احتمالاً می‌تواند به‌دلیل استقرار بهتر بنه‌ها و بوته‌ها در خاک و تولید گل‌های بزرگ‌تر در طی برداشت‌های بعدی باشد. نتایج تجزیه واریانس مولکولی مقدار متابولیت‌های ثانویه نیز نشان داد اکوتیپ‌ها از نظر مقدار کروسین، پیکروکروسین و سافرانال تفاوت معنی‌دار دارند.

نتایج همبستگی نیز نشان داد که مقدار کروسین و پیکروکروسین به‌ترتیب عامل رنگ و طعم زعفران با یکدیگر رابطه مثبت و معنی‌دار دارند، درحالی‌که هیچ رابطه معنی‌داری بین مقدار سافرانال با کروسین و پیکروکروسین مشاهده نشد. مقدار سافرانال به‌عنوان عامل اصلی بوی مطبوع زعفران با صفات زراعی از جمله طول برگ و کلاله، وزن تر گل و کلاله رابطه مثبت و معنی‌داری را نشان داد. درحالی‌که، مقدار کروسین و پیکروکروسین فقط با صفت طول گلبرگ مرتبط بود. هم‌چنین عملکرد اکوتیپ با صفت وزن خشک کلاله و تعداد گل کل رابطه مثبت و معنی‌دار نشان داد، اما با هیچ‌یک از صفات دیگر رابطه معنی‌داری نداشت. در نتایج تجزیه به عامل‌ها، هفت مؤلفه حدود ۹۷ درصد از تغییرات کل را توجیه کرد. مؤلفه اول و دوم با مقدار ویژه بالاتر از یک حدود ۶۶ درصد از تغییرات کل را توجیه کردند. در مؤلفه اول صفات طول برگ، وزن تر کلاله، طول کلاله و سافرانال بیش‌ترین نقش مثبت را در توجیه ۴۴ درصد از تغییرات کل را ایفا کردند. در مؤلفه دوم نیز صفات پیکروکروسین و کروسین و طول گلبرگ بیش‌ترین تاثیر مثبت در توجیه ۲۲ درصد تغییرات کل را داشتند.

هم‌چنین نتایج تحلیل خوشه‌ای براساس فاصله اقلیدوسی و روش وارد، اکوتیپ‌ها را به پنج دسته مجزا تقسیم کرد. نتایج حاصل نشان داد بیش‌ترین شباهت ژنتیکی و کم‌ترین فاصله اقلیدوسی بین اکوتیپ‌های قائنات و فردوس ۱۶ وجود داشت. درحالی‌که، اکوتیپ اراک کم‌ترین شباهت ژنتیکی و بیش‌ترین فاصله اقلیدوسی را از اکوتیپ قائنات داشت.

علاوه براین، صفات موردبررسی به سه دسته مجزا تقسیم‌بندی شدند، به‌طوری‌که مقدار کروسین و پیکروکروسین و طول گلبرگ در یک دسته جای گرفتند. هم‌چنین مقدار سافرانال با صفات طول برگ و کلاله و گل، وزن تر کلاله و وزن تر گل در دسته دوم و درنهایت عملکرد با تعداد کل گل و وزن خشک کلاله در دسته سوم قرار گرفتند. شایان ذکر است که نتایج حاصل از تحلیل خوشه‌ای به‌منظور دسته‌بندی صفات با نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مطابقت داشت.

با وجود این‌که اکوتیپ‌های موردمطالعه در پژوهش حاضر در اقلیم و شرایط آب‌وهوایی یکسان مستقر و نگه‌داری شده‌اند، با این‌حال همچنان در پروفایل فیتوشیمیایی و صفات زراعی تنوع مشاهده می‌شود. با وجود این‌که برخی از دانشمندان معتقدند که زعفران گیاهی مونومورف است و تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها وجود ندارد، اما براساس نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر و سایر پژوهش‌های پیشین تفاوت معنی‌داری بین اکوتیپ‌های مختلف از نظر صفات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی مشاهده شده است. می‌توان با استناد به نتایج حاصل از پژوهش حاضر بیان کرد که منشأ این تنوع مشاهده‌شده در بین اکوتیپ‌های می‌تواند به‌دلیل وجود تنوع در سطح ژنوم، ترنسکریپتوم و یا اپی‌ژنوم باشد. برای پی‌بردن به منشأ تنوع‌های مشاهده بین اکوتیپ‌ها باید مطالعات دقیق‌تری با استفاده از نشانگرهای مولکولی و ایجاد پروفایل بیان ژن‌های مهم در مسیر تولید متابولیت‌های ثانویه انجام شود.

۷. تشکر و قدردانی

از همکاری بی‌دریغ کارکنان محترم مزرعه تحقیقاتی گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و جناب دکتر مسعود شهسواری جهت پیشبرد این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۸. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد

۹. منابع

امیریان، فاطمه؛ مصطفایی، علی و کارگر، سیدمحمدعلی (۱۳۹۹). بررسی تنوع ژنتیکی صفات رویشی اکوتیپ‌های زعفران خوراکی (*Crocus sativus* L.) تحت تنش سرما. *نشریه پژوهش‌های زعفران*، ۸(۲)، ۱۹۱-۲۰۶.

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

References

Agayev, Y. M. O., Fernandez, J. A., & Zarifi, E. (2009). Clonal selection of saffron (*Crocus sativus* L.): the first optimistic experimental results. *Euphytica*, *169*, 81-99.

Amiriyan, F., Mostafaie, A., & Seyyed Mohammad Ali, K. (2020). The Investigation of Genetic Diversity of Saffron (*Crocus sativus* L.) Ecotypes Traits under Chilling Stress. *Journal of Saffron Research*, *8* (2), 191-206. (In Persian).

Baghalian, K., Sheshtamand, M. S., & Jamshidi, A. H. (2010). Genetic variation and heritability of agro-morphological and phytochemical traits in Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) populations. *Industrial Crops and Products*, *31*(2), 401-406.

Bayat, M., Amir Niya, R., Taj Bakhsh, M., & Tanyvlach, B. (2016). Genetic Diversity of Saffron (*Crocus sativus* L.) using iPBS and SSR Molecular Markers. *Journal of Saffron Research*, *4*(1), 103-119. (in Persian).

Bolhasani, A., Bathaie, S. Z., Yavari, I., Moosavi-Movahedi, A. A., & Ghaffari, M. (2005). Separation and purification of some components. *Asian Journal of Chemistry*, *17*(2), 725-729.

Bukhari, S. I., Din, I., Grewal, S., & Dhar, M. K. (2018). Antiproliferative effect of saffron and its constituents on different cancerous cell lines. *Pharmacognosy Research*, *10*(3).

Busconi, M., Colli, L., Sánchez, R. A., Santaella, M., De-Los-Mozos Pascual, M., Santana, O., ... & Fernandez, J. A. (2015). AFLP and MS-AFLP analysis of the variation within saffron crocus (*Crocus sativus* L.) germplasm. *PloS one*, *10*(4), e0123434.

Cardone, L., Candido, V., Castronuovo, D., Perniola, M., & Cicco, N. (2021). Comparing annual and biennial crop cycle on the growth, yield and quality of saffron using three corm dimensions. *Scientia Horticulturae*, *288*, 110393.

Cardone, L., Castronuovo, D., Perniola, M., Cicco, N., Molina, R. V., Renau-Morata, B., ... & Candido, V. (2021). *Crocus sativus* L. Ecotypes from Mediterranean countries: Phenological, morpho-productive, qualitative and genetic traits. *Agronomy*, *11*(3), 551.

Casas-Catalán, M. J., & Doménech-Carbó, M. T. (2005). Identification of natural dyes used in works of art by pyrolysis–gas chromatography/mass spectrometry combined with in situ trimethylsilylation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *382*, 259-268.

Fernández, J. A., Santana, O., Guardiola, J. L., Molina, R. V., Heslop-Harrison, P., Borbely, G., ... & De-Los-Mozos-Pascual, M. (2011). The world saffron and Crocus collection: strategies for establishment, management, characterisation and utilisation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *58*, 125-137.

Fiore, A., Pizzichini, D., Diretto, G., Scossa, F., & Spanò, L. (2010). Genomics and transcriptomics of saffron: new tools to unravel the secrets of an attractive spice. *The Editor*, *25*, 1-14.

Gresta, F., Avola, G., Lombardo, G. M., Siracusa, L., & Ruberto, G. (2009). Analysis of flowering, stigmas yield and qualitative traits of saffron (*Crocus sativus* L.) as affected by environmental conditions. *Scientia Horticulturae*, *119*(3), 320-324.

Gresta, F., Lombardo, G. M., & Avola, G. (2009, May). Saffron stigmas production as affected by soil texture. In III International Symposium on Saffron: Forthcoming Challenges in Cultivation, Research and Economics 850 (pp. 149-152).

Hailu, F., Merker, A., Belay, G., & Johansson, E. (2006). Multivariate analysis of diversity of tetraploid wheat germplasm from Ethiopia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *53*, 1089-1098.

Izadpanah, F. A., Kalantari, S. A., Hassani, M. E. B., Naghavi, M. R. C., & Shokrpoura, M. (2015). Molecular and morphological variation in some Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) accessions. *Genetika*, *47*(2), 711-722.

Jin, R. L., Qiao, Z. P., Zhou, S. D., Ye, Y. L., & Zhou, J. X. (1986). Investigation of saffron preparations by thin layer chromatography. *Journal of Nanjing College of Pharmacy*, *17*, 247.

Kanakis, C. D., Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. G. (2004). Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-hydroxy-2, 6, 6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek saffron. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(14), 4515-4521.

Kothari, D., Thakur, R., & Kumar, R. (2021). Saffron (*Crocus sativus* L.): Gold of the spices A comprehensive review. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, *62*(5), 661-677.

Lage, M., & Cantrell, C. L. (2009). Quantification of saffron (*Crocus sativus* L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions. *Scientia Horticulturae*, *121*(3), 366-373.

Li, C. Y., & Wu, T. S. (2002). Constituents of the stigmas of crocus s ativus and their tyrosinase inhibitory activity. *Journal of Natural Products*, *65*(10), 1452-1456.

Lozano, P., Castellar, M. R., Simancas, M. J., & Iborra, J. L. (1999). A quantitative high-performance liquid chromatographic method to analyse commercial saffron (*Crocus sativus* L.) products. *Journal of Chromatography*, *830*(2), 477-483.

Lozano, P., Delgado, D., Gomez, D., Rubio, M., & Iborra, J. L. (2000). A non-destructive method to determine the safranal content of saffron (*Crocus sativus* L.) by supercritical carbon dioxide extraction combined with high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *43*(1-3), 367-378.

Majidi, M. M., Mirlohi, A., & Amini, F. (2009). Genetic variation, heritability and correlations of agro-morphological traits in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Euphytica*, *167*(3), 323-331.

Mir, M. A., Mansoor, S., Sugapriya, M., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., & Ahmad, P. (2021). Deciphering genetic diversity analysis of saffron (*Crocus sativus* L.) using RAPD and ISSR markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(2), 1308-1317.

Nemati, Z., Mardi, M., Majidan, P., Zeinalabedini, M., Pirseyedi, S. M., & Baharodi, M. (2014). Saffron (*Crocus sativus* L.), a monomorphic or polymorphic species? *Spanish Journal of Agricultural Research*, *12*(3), 753-762.

Nemati, Z., Zeinalabedini, M., Mardi, M., Pirseyediand, S. M., Marashi, S. H., & Khayam Nekoui, S. M. (2012). Isolation and characterization of a first set of polymorphic microsatellite markers in saffron, Crocus sativus (Iridaceae). *American Journal of Botany*, *99*(9), e340-e343.

Pardo, J., Fernández, J. A., & Gomez, L. G. (2003, October). Development of molecular markers for origin determination in saffron. In *I International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology 650* (pp. 95-98).

Romesburg, C. (2004). *Cluster analysis for researchers*. Lulu. com.

Salami, S. A., & Husaini, A. M. (2022). Genetic Mapping and Molecular Markers in Saffron. In *The Saffron Genome* (pp. 83-94). Cham: Springer International Publishing.

Salami, S. A., & Husaini, A. M. (2022). SaffronOMICS: Novel Approaches Toward Putting Saffron Data at Work. In *The Saffron Genome* (pp. 43-62). Cham: Springer International Publishing.

Shahi, T., Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2016). Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron. *Trends in Food Science & Technology*, *58*, 69-78.

Shokrpour, M., Abedi, Z., Kalantari, S., & Salami, S. A. (2017). Study of genetic variation in some Iranian saffron accessions using molecular markers of RAPD and ISSR.

Singer, J. D. (1998). Using SAS PROC MIXED to fit multilevel models, hierarchical models, and individual growth models. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, *23*(4), 323-355.

Soheilivand, S., Agayev, Y. M., Shakib, A. M., Fathi, M., & Rezvani, E. (2006, October). Comparison of diversity in flowering rate of two saffron (*Crocus sativus*) populations of Iran. In *II International Symposium on Saffron Biology and Technology 739* (pp. 303-306).

Straubinger, M., Bau, B., Eckstein, S., Fink, M., & Winterhalter, P. (1998). Identification of Novel Glycosidic Aroma Precursors in Saffron (*Crocus s ativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(8), 3238-3243.

Tarantilis, P. A., & Polissiou, M. G. (1997). Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(2), 459-462.

Tarantilis, P. A., Tsoupras, G., & Polissiou, M. (1995). Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *699*(1-2), 107-118.

Vahedi, M., Kabiri, M., Salami, S. A., Rezadoost, H., Mirzaie, M., & Kanani, M. R. (2018). Quantitative HPLC-based metabolomics of some Iranian saffron (*Crocus sativus* L.) accessions. *Industrial Crops and Products*, *118*, 26-29.

Yao, L., Guo, S., Wang, H., Feng, T., Sun, M., Song, S., & Hou, F. (2022). Volatile fingerprints of different parts of Chongming saffron (*Crocus sativus*) flowers by headspace-gas chromatography-ion mobility spectrometry and in vitro bioactive properties of the saffron tepals. *Journal of Food Science*, *87*(10), 4491-4503.

Yeo, I. K., & Johnson, R. A. (2000). A new family of power transformations to improve normality or symmetry. *Biometrika*, *87*(4), 954-959.

Zanier, R., & Caiola, M. G. (2000). Self-incompatibility mechanisms in the Crocus sativus aggregate (Iridaceae): a preliminary investigation. *Annali di Botanica*, *58*.

Zareena, A. V., Variyar, P. S., Gholap, A. S., & Bongirwar, D. R. (2001). Chemical investigation of gamma-irradiated saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(2), 687-691.