

شناسایی، تعیین توالی و ارزیابی پایداری بیان هشت ژن مرجع گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.)

سید سجاد سهرابی^۱، سید محسن سهرابی^{۱*}، سید کریم موسوی^۲ و محسن محمدی^۳

- ۱- دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد
 - ۲- استادیار، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، خرم‌آباد
 - ۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۰۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۳)

چکیده

زعفران (*Crocus sativus* L.) ارزشمندترین و گران‌ترین ادویه در سطح جهان است. کلاله‌های این گیاه منبع آپوکاروتنوئیدهای با ارزشی مانند کروسین، پیکروکروسین و سافرانال هستند. مطالعات ترنسکریپتومی و بیانی ژن‌ها یکی از مهم‌ترین مراحل در بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند. یکی از پیش‌نیازهای مهم در این گونه مطالعات، شناسایی ژن‌های مرجع قابل‌اعتماد و پایدار به‌منظور نرمال‌سازی بیان سایر ژن‌ها است. در پژوهش حاضر، با استفاده از ترنسکریپتوم گیاه زعفران هشت ژن مرجع شناسایی و تعیین توالی شد، سپس میزان پایداری بیان آن‌ها با استفاده از روش‌های غیرپارامتریک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تکثیر و توالی‌یابی، جداسازی صحیح هشت ژن مرجع *UBQ*، *UBC*، *TBP*، *MDH*، *H3*، *GAPDH*، *EF1*، *Actin* را از گیاه زعفران نشان داد. بررسی میزان پایداری بیان ژن‌های مرجع نشان داد که ژن‌های *MDH* و *UBQ* به‌ترتیب بیشترین میزان پایداری را بین بافت‌های مختلف گیاه زعفران داشته و کمترین میزان پایداری مربوط به ژن *TBP* بود. در این پژوهش توالی هشت ژن مرجع در زعفران جداسازی و پایداری بیان آن‌ها برای اولین بار در بافت‌های مختلف این گیاه سنجیده شد. ژن‌های مرجع شناسایی شده در این پژوهش می‌توانند به‌عنوان ژن‌های پایدار برای نرمال‌سازی بیان ژن‌ها در مطالعات ترنسکریپتومی گیاه زعفران به‌کار برده شوند.

واژگان کلیدی: آماره‌های غیرپارامتریک، پایداری بیان ژن، ترنسکریپتوم، زعفران، ژن‌های مرجع

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: sohrabi.sa@fa.lu.ac.ir

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی چندساله، متعلق به خانواده زنبق و ازجمله ارزشمندترین گیاهان دارویی جهان محسوب می‌شود (Zeng et al., 2003; Tan et al., 2019). ارزش اقتصادی بسیار بالای این گیاه به دلیل وجود سه متابولیت مهم شامل کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در کلاله‌های قرمز، بلند و معطر این گونه می‌باشد (Fernández, 2004; Zeng et al., 2003; Rajabi, 2015). از زعفران به‌طور ویژه در صنایع غذایی به‌عنوان طعم‌دهنده و در صنایع داروسازی به‌عنوان ضد تشنج، ضدافسردگی، ضدالتهاب، ضدتومور، کاهنده کلسترول و اشتهاآور استفاده می‌شود (Xie et al., 2019; Sampathu et al., 1984; Ahrazem et al., 2015; Kamalipour and Akhondzadeh, 2011).

کشورهای ایران، یونان، اسپانیا، ایتالیا و هند مهم‌ترین تولیدکنندگان زعفران در دنیا، چه از نظر تولید و چه از لحاظ سطح زیرکشت محسوب می‌شوند (Baba et al., 2019; Tan et al., 2015). چندساله بودن، نیاز آبی کم و داشتن برگ‌های باریک و ضخیم از جمله دلایل انطباق این محصول با شرایط اقلیمی خشک و نیمه‌خشک ایران محسوب می‌شود (Behdani and Fallahi, 2015; Azizi, 2016; Zohan et al., 2009; Koocheki et al., 2016). اهمیت اقتصادی بالای این گیاه منجر به سوق یافتن مطالعاتی جهت ارائه بهترین راهکار برای افزایش کمیت و کیفیت این محصول در ایران و سرتاسر جهان شده است.

تحقیقات ژنتیکی به‌ویژه در حوزه ژنومیکس کارکردی یکی از مهم‌ترین جنبه‌های تحقیقی برای درک مکانیسم بیوستز متابولیت‌های ثانویه و یافتن راهکارهایی برای افزایش کمیت و کیفیت آن‌ها محسوب می‌شود (D'Agostino et al., 2007; Khakpour et al., 2019). هرچند تلاش‌هایی در راستای شناسایی ژن‌ها و آنزیم‌های کلیدی دخیل در بیوستز ترکیبات دارویی زعفران صورت گرفته است (Tan et al., 2019; Ahrazem et al., 2019; Ahrazem et al., 2018; Malik and Ashraf, 2017; Jain et al., 2016)، اما چالش‌هایی نظیر تریپلوئیدی بودن، اندازه

بزرگ ژنوم و وجود توالی تکراری در ساختار DNA زعفران نتایج این مطالعات را با محدودیت‌های جدی مواجه ساخته (Brandizzi and Caiola, 1998; Fernández, 2004; Cheng et al., 2017; Qian et al., 2019). به‌طوری‌که تاکنون تنها یک عامل رونویسی مهم (CsULT1) در مسیر بیوستز آپو- کاروتنوئیدها در زعفران شناسایی شده است (Ashraf et al., 2019; Tan et al., 2015)؛ بنابراین، توسعه روش‌هایی که بتوان از نتایج آن‌ها در اصلاح گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف زعفران با هدف افزایش محتوای متابولیت‌های مهم استفاده نمود، امری ضروری به‌شمار می‌رود. بررسی الگو و میزان بیان ژن‌ها در جمعیت‌ها و بافت‌های مختلف گیاهی با محتوای متابولیتی متنوع و همچنین تحلیل بیان ژن طی مراحل مختلف رشد و نمو از جمله راهکارهای مطلوب برای شناسایی عوامل دخیل در بیوستز مسیرهای متابولیکی به‌شمار می‌رود (Husaini et al., 2009; Skladnev and Johnstone, 2017; Ahrazem et al., 2018).

در میان روش‌های رایج مطالعات بیان ژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی^۱ یکی از دقیق‌ترین روش‌ها برای ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها محسوب می‌گردد. حساسیت بالا، اختصاصی بودن و سادگی این روش در مقایسه با دیگر روش‌های بررسی بیان ژن از قبیل نوردن‌بلات و دورگ‌سازی در محل قابل مقایسه نیست (Gutierrez et al., 2018; Ebrahimi et al., 2008). هم‌زمان با ظهور نسل جدید توالی‌یابی^۲ (NGS) بسیاری از چالش‌های روش‌های سنتی تحلیل ترنسکرپتوم مرتفع و استفاده از این روش‌ها بسیار محدود شد (Garg and Jain, 2013). با این حال واکنش Real-time PCR به دلیل دقت و حساسیت بالایش همچنان به‌طور وسیعی در مطالعات مولکولی مورد استفاده قرار گرفته و محققان به‌طور ویژه‌ای از نتایج این واکنش برای تأیید اطلاعات حاصل از روش‌های جامع تحلیل ترنسکرپتوم از جمله RNA-Seq استفاده می‌کنند (Ahrazem et al., 2018; Qian et al., 2019; Majidi et al., 2015).

1- Real-time PCR
2- Next generation sequencing

با توجه به عدم وجود ژنوم مرجع و اطلاعات لازم برای تعیین پایدارترین ژن‌های خانه‌دار در این گیاه، در مطالعه حاضر برای اولین بار، شناسایی و تعیین پایداری بیان برخی از ژن‌های مرجع پرکاربرد گیاه زعفران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و کیفیت‌سنجی داده‌های ترنسکریپتومی: در این مرحله از پژوهش، پنج مجموعه داده، حاوی خوانش‌های کوتاه مربوط به بافت‌های کورم، برگ، گلبرگ، پرچم و کلاله‌ی زعفران مورد استفاده قرار گرفتند (Jain et al., 2016). داده‌های مذکور با استفاده از ابزار ASPERA و با شماره‌های دسترسی SRR1767298، SRR1767299، SRR1767300، SRR1767301 و SRR1767302 از پایگاه SRA پایگاه داده NCBI دریافت شدند. کیفیت اولیه‌ی خوانش‌های کوتاه موجود در تمامی نمونه‌ها با استفاده نرم‌افزار FastQC v.0.11.6 مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی‌های آداپتوری و همچنین خطاهای حاصل از توالی‌یابی به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای Cutadapt و RCorrector از خوانش‌های کوتاه حذف شدند (Martin, 2011; Song and Florea, 2015). حذف توالی‌های با کیفیت پایین، توالی‌های با طول کمتر از ۵۰ باز و توالی‌های با میزان بالای نوکلئوتیدهای خوانش نشده با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic v.0.27 صورت گرفت (Bolger et al., 2014).

سرهم‌بندی نوپدید (De novo assembly): پس از انجام مراحل کیفیت‌سنجی، خوانش‌های کوتاه با کیفیت بالا برای سرهم‌بندی نوپدید ترنسکریپتوم گیاه زعفران مورد استفاده قرار گرفتند. سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌های کوتاه گیاه زعفران با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench v.7.5.0 و بر اساس پارامترهای پیش‌فرض این نرم‌افزار و همچنین الگوریتم De Bruijn Graph صورت گرفت (Grabherr et al., 2011; Matvienko 2015). سرهم‌بندی نوپدید خوانش‌های کوتاه تا رسیدن به کانتیگ‌ها ادامه پیدا کرد و کانتیگ‌های اضافی با استفاده از بسته‌ی نرم‌افزاری v.2013.07.27 EvidentialGene حذف شدند (Gilbert, 2016). ارزیابی کمیت سرهم‌بندی نوپدید ایجاد شده برای گیاه زعفران با تعیین مواردی

واکنش Real-time PCR مانند سایر روش‌های مولکولی با چالش‌هایی از جمله برطرف کردن تنوع بین نمونه‌های مختلف از نظر مقدار و کیفیت مواد آغازین، آماده‌سازی RNA، سنتز cDNA، رقیق‌سازی و پیپت کردن روبرو می‌باشد (Karge et al., 1998; Ebrahimi et al., 2018). رایج‌ترین روشی که امروزه برای کنترل خطا در واکنش Real-time PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد، نرمال‌سازی سطوح RNA با یک ژن مرجع یا خانه‌دار^۱ می‌باشد (Bustin, 2000).

در مطالعات مختلف ژن‌های خانه‌دار زیادی معرفی و توسط محققان مورد بررسی قرار گرفته‌اند. از جمله ژن‌های خانه‌داری که در گیاهان به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌اند می‌توان به ژن‌های *EF-1α*، *18S rRNA*، *Elongation factor 1-α*، *UBIQUITIN*، *ACTIN*، *α-TUBULIN*، *GAPDH*، *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase* (Gomez-Gomez et al., 2018; Ahrazem et al., 2018; Shahraki et al., 2014; Ebrahimi et al., 2018; Kiarash et al., 2018). با توجه به این‌که سطح بیان ژن کنترل داخلی می‌بایست در بین بافت‌های مختلف و نیز تمامی مراحل رشد یک موجود زنده ثابت باشد و نیز تحت تأثیر تیمارهای آزمایش قرار نگیرد (Wang et al., 2019; Bustin, 2000)، از این‌رو در هر یک از آزمایش‌های بیان ژن می‌بایست ثبات و پایداری بیان چندین ژن رفرنس مورد آزمایش و ارزیابی قرار گیرد تا مناسب‌ترین ژن رفرنس به‌منظور نرمال‌سازی داده‌های حاصل از بیان ژن هدف انتخاب گردد (Jain et al., 2006; Jaiswal et al., 2019). انتخاب یک ژن مرجع مطلوب، ابتدا با شناسایی ژن‌های مرجع کاندید و سپس با بررسی میزان پایداری بیان این ژن‌ها در نمونه‌های مورد نظر تعیین می‌گردد. روش‌های آماری استفاده شده در بررسی پایداری ژن‌های مرجع، مبتنی بر آماره‌هایی نظیر واریانس، ضریب تغییرات، میانگین هندسی و ضریب همبستگی می‌باشند (Pfaffl et al., 2004; Vandesompele et al., 2002).

1- Housekeeping gene

مانند تعداد کانتینگ، طول بزرگ‌ترین کانتینگ، N50، طول متوسط کانتینگ‌ها و توسط نرم‌افزار Transrate v.1.0.3 انجام شد (Smith-Unna *et al.*, 2016).

شناسایی ژن و طراحی آغازگرها: در این مرحله، تمامی توالی‌های مربوط به ژن‌های مرجع *GAPDH*, *EF1*, *Actin*, *UBQ*, *TBP*, *MDH*, *H3* در گیاهان خانواده Iridaceae از بانک ژن دریافت شدند. سپس، با استفاده از ابزار BLASTn موجود در نرم‌افزار CLC Genomics Workbench v.7.5.0، توالی‌های مربوط به ژن‌های مرجع در گیاهان خانواده Iridaceae با $E.value \leq 0.001$ در برابر سرهم‌بندی نوپدید ایجاد شده‌ی گیاه زعفران، مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. توالی‌های حاصل از هم‌ردیفی هر ژن مرجع به‌صورت جداگانه جمع‌آوری و با استفاده از نرم‌افزارهای Vector NTI v.11.0 و ORF finder برای وجود چارچوب خوانش باز کامل مورد بررسی قرار گرفتند. کانتینگ‌ها و سینگلتون‌های دارای چارچوب خوانش باز کامل برای هر ژن، با استفاده از ابزار BLASTn موجود در NCBI، در برابر بانک ژن مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند و جداسازی موفق ژن‌های مرجع تأیید شد. از کانتینگ‌های دارای چارچوب خوانش باز

کامل مربوط به هر ژن مرجع برای طراحی آغازگر استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده برای جداسازی کامل قطعات ژنی با استفاده از AlleleID v.7.0 طراحی شدند (جدول ۱).

تکثیر و توالی‌یابی ژن‌ها: بنه‌های (کورم‌های) توده‌های محلی زعفران (*Crocus sativus*) از مزارع منطقه کمالوند شهر خرم‌آباد تهیه و در گلدان‌هایی حاوی نسبت مساوی از خاک، کود حیوانی و ماسه کشت و در فضای باز نگهداری شدند. بافت‌های هوایی گیاه (شامل برگ و گل) به‌صورت مخلوط در ازت مایع قرار گرفته و در فریزر منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج RNA کل از مخلوط بافت‌های هوایی گیاه و با استفاده از بافر RNX-Plus شرکت سیناژن صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز و نانودراپ بررسی شد. رشته اول cDNA با استفاده از کیت شرکت سیناکلون و طبق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. واکنش PCR برای تکثیر قطعات ژنی با استفاده از آنزیم *Taq* پلیمرز شرکت سیناکلون و با برنامه دمایی، واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتصال مربوط به هر جفت آغازگر (جدول ۱) و گسترش به مدت ۱ دقیقه و ۴۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، طی ۳۵ چرخه انجام شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده

Table 1. Primers characteristics used in this study

نام	توالی آغازگر (5'-3')	دمای اتصال (°C)	اندازه قطعه تکثیری
Name	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)
Actin-F	5'-GCCATCTTTGTTTCCAGGTC-3'	57.3	1210
Actin-R	5'-GGCTCAACACAATACTTGGG-3'		
EF1-F	5'-AGGAGAAGGTTACATTAGCATAG-3'	58	1450
EF1-R	5'-AACACAGACAACAGAGCAGAC-3'		
GAPDH-F	5'-GGCAAGAAGATCAAGATCGGAATC-3'	57.8	1130
GAPDH-R	5'-AAAGGAAAGTTGGACAATCCTGTC-3'		
H3-F	5'-GCACGAGGTTTCTTGGAG-3'	57.2	460
H3-R	5'-AGGTATCATTATTCTAGTTAAGCC-3'		
MDH-F	5'-TCTCAATTTCTCTCCGTGTCG-3'	55.9	1079
MDH-R	5'-TTGTGACCTCAAACCTTAACCTCC-3'		
TBP-F	5'-TTGGTGGAGAAGAATGGCAGATG-3'	56.3	812
TBP-R	5'-CCTCACACAAGACCGAACAGC-3'		
UBC-F	5'-TGCGAAGAAGAGGCTAATG-3'	54.1	704
UBC-R	5'-TAAATCTGCTTATATCTACCATCC-3'		
UBQ-F	5'-TTGCGAACGAGGAAAGTTTTGAGG-3'	60.6	1417
UBQ-R	5'-GCCACCACGGAGACGAAGC-3'		

گرفت (Jones et al., 2014; Nielsen, 2017).

بررسی پایداری ژن‌های مرجع: به‌منظور بررسی میزان بیان هر یک از ژن‌های مرجع، خوانش‌های کوتاه با کیفیت بالای بافت‌های کورم، برگ، گلبرگ، پرچم و کلاله‌ی زعفران، به‌صورت جداگانه و با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench v.7.5.0 بر هر توالی ژنی مرجع نقشه‌یابی شد. پس از نقشه‌یابی، مقادیر FPKM (Fragments per kilo base of transcript per million mapped reads) هر ژن مرجع در هر بافت با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench v.7.5.0 محاسبه شد. بررسی پایداری ژن‌های مرجع با استفاده از مقادیر FPKM و همچنین با استفاده از آماره‌های غیرپارامتریک روش ناصر و هوهن و همچنین آماره‌های ناپارامتریک روش ترازو (Nassar and Huehn, 1987; Thennarasu, 1995) صورت گرفت که در هر دو روش مقادیر کمتر آماره حاکی از پایداری بیشتر می‌باشد. همچنین از شاخص SIIG که برگرفته از مدل TOPSIS یا اولویت‌بندی بر اساس شباهت به راه‌حل ایده‌آل می‌باشد، برای رتبه‌بندی نهایی و افزایش کارایی انتخاب ژن‌های پایدار استفاده شد (Tzeng and Huang, 2011; Zali et al., 2015).

نتایج و بحث

در این پژوهش، تمام مجموعه داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA بافت‌های کورم، برگ، گلبرگ، پرچم و کلاله‌ی گیاه زعفران ادغام شدند و پس از سنجش کیفیت و حذف خوانش‌های کوتاه با کیفیت پایین، ۱۲۸۳۲۰۵۶۷ خوانش کوتاه با کیفیت بالا ایجاد شد (جدول ۲).

همچنین واسرشته‌سازی اولیه ۲ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۲۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از پایان واکنش، محصولات روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شده و اندازه‌ی آن‌ها تأیید شد. در مرحله‌ی بعد، قطعات تکثیری از ژل آگارز برش خورده و با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت سیناکلون طبق دستورالعمل شرکت سازنده، خالص‌سازی شدند. قطعات خالص‌سازی شده برای تعیین توالی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال شدند و توالی‌یابی به‌صورت دوطرفه و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت. نتایج توالی‌یابی هر ژن به‌صورت جداگانه و با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI v.11.0 بررسی شدند. سپس، توالی‌های جداسازی شده با استفاده از ابزار BLASTn با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شده و صحت جداسازی آن‌ها بررسی شد.

آنالیزهای بیوانفورماتیکی: پس از بررسی نتایج توالی‌یابی، هر ژن در چارچوب خوانش باز خود با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI v.11.0 به توالی پروتئینی ترجمه شد. توالی‌های پروتئینی ایجاد شده با استفاده از ابزار BLASTp با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شده و صحت جداسازی آن‌ها بررسی شد. دامین‌های عملکردی محافظت‌شده احتمالی موجود در هر توالی با جستجو در پایگاه پروتئینی Interproscan، CDD و Pfam مشخص شدند (Marchler-Bauer et al., 2014; Jones et al., 2014; Finn et al., 2016). محل تجمع سلولی و همچنین وجود یا عدم وجود سیگنال پپتید در توالی‌های پروتئینی با استفاده از نرم‌افزارهای CELLO و SignalP مورد بررسی قرار

جدول ۲- اطلاعات آماری مجموعه‌ی داده ترنسکریپتوم زعفران

Table 2. Basic statistics of saffron transcriptome dataset

شماره دسترسی Accession number	بافت Tissue	مرحله‌ی رشدی Growth stage	تعداد خوانش‌های خام Raw read counts	تعداد خوانش‌های تمیز شده Clean read counts	درصد خوانش‌های با کیفیت بیشتر از Q30 Percentage of reads with Q > 30
SRR1767298	کورم Corm	بالغ Mature	38678236	35548718	96.98
SRR1767299	برگ Leaf	بالغ Mature	41354788	37140996	96.93
SRR1767300	گلبرگ Tepal	بالغ Mature	53541250	47642136	96.95
SRR1767301	پرچم Stamen	بالغ Mature	42789692	37977034	97.95
SRR1767302	کلاله Stigma	بالغ Mature	49463790	45362138	98.98

کانتیگ‌های منحصربه‌فرد پایین‌تر، میزان N50 بالاتری در سرهم‌بندی نهایی ترنسکریپتوم زعفران ایجاد شد. سرهم‌بندی نهایی ترنسکریپتوم گیاه زعفران دارای طول ۸۴/۵۰ مگاباز و همچنین محتوای GC حدود ۴۳/۴۵ درصد بود (جدول ۳).

جستجو در سرهم‌بندی نهایی ترنسکریپتوم گیاه زعفران، کانتیگ‌هایی با طول ۱۳۹۲، ۱۷۸۷، ۱۱۶۹، ۶۵۱، ۱۳۴۴، ۱۰۲۳، ۸۹۷ و ۱۴۷۵ باز را به ترتیب برای ژن‌های مرجع *Actin*، *EF1*، *GAPDH*، *H3*، *MDH*، *TBP*، *UBC* و *UBQ* نشان داد. آغازگرهای اختصاصی بر اساس هشت کانتیگ ایجاد شده طراحی شدند. کیفیت نسبتاً خوب RNA استخراج شده از مخلوط اندام هوایی زعفران با استفاده از ژل - الکتروفورز مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱-الف). نتایج حاصل از تکثیر با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، قطعاتی با طول ۱۲۱۰، ۱۴۵۰، ۱۱۳۰، ۴۶۰، ۱۰۷۹، ۸۱۲، ۷۰۴ و ۱۴۱۷ جفت‌بازی را به ترتیب برای ژن‌های مرجع *Actin*، *EF1*، *GAPDH*، *H3*، *MDH*، *TBP*، *UBC* و *UBQ* نشان داد (شکل ۱-ب و جدول ۱).

نتایج سنجش کیفیت و پردازش خوانش‌های کوتاه نشان داد که درصد توالی‌های با کیفیت بالاتر از Q30، در تمامی نمونه‌های کورم، برگ، گلبرگ، پرچم و کلاله‌ی گیاه زعفران بالاتر از ۹۵ درصد بود و این امر نشان دهنده‌ی کیفیت مناسب خوانش‌های کوتاه وارد شده به سرهم‌بندی ترنسکریپتوم است. از سرهم‌بندی خوانش‌های با کیفیت بالا پس از حذف توالی‌های تکراری، تعداد ۸۰۲۴۵ رونوشت منحصربه‌فرد ایجاد شد. کانتیگ‌های اضافی باعث ایجاد خطا در تجزیه و تحلیل داده‌ها خواهند شد، از این‌رو استفاده از نرم‌افزارهای مناسب برای ایجاد کانتیگ‌های منحصربه‌فرد، اعتبار نتایج تحلیل داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA را به‌طور قابل‌توجهی افزایش خواهد داد (Ono et al., 2015). بر اساس نتایج پارامترهای کمی و کیفی سرهم‌بندی نهایی، پارامتر N50 برای سرهم‌بندی ایجاد شده ۱۴۵۲ نوکلئوتید بود و از کیفیت نسبتاً مناسبی برخوردار است. پارامترهای کمی و کیفی مطالعه‌ی حاضر به نحو قابل‌توجهی بهتر از مطالعه‌ی اصلی بودند، به‌طوری‌که در این مطالعه، با تعداد

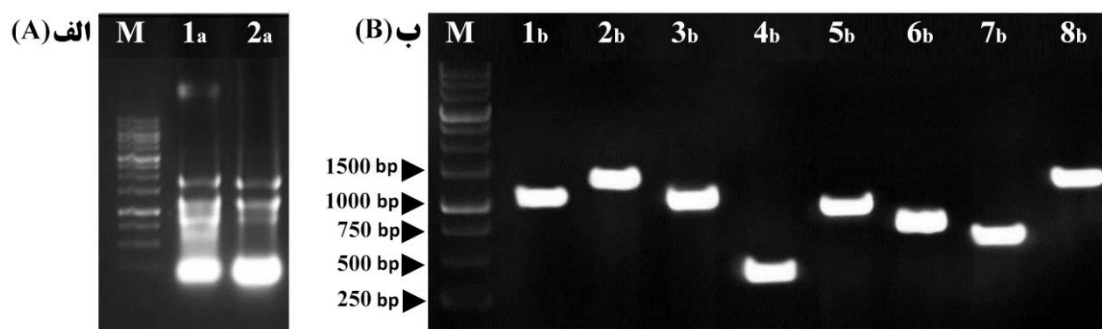
جدول ۳- مشخصات کمی و کیفی سرهم‌بندی ترنسکریپتوم زعفران

Table 3: Quantitative and qualitative features of created saffron transcriptome assembly

ویژگی Feature	مقادیر Values
تعداد رونوشت Number of read	80245.00
کوتاه‌ترین اندازه رونوشت (نوکلئوتید) The shortest size of transcript (nt)	206.00
بلندترین اندازه رونوشت (نوکلئوتید) The longest size of transcript (nt)	15424.00
تعداد نوکلئوتید Number of nucleotides	84496115.00
میانگین طول (نوکلئوتید) Average length (nt)	1052.98
تعداد رونوشت با طول کمتر از 200 نوکلئوتید Number of transcripts with the length of less than 200 nt	0.00
تعداد رونوشت با طول بیشتر از 1 کیلو نوکلئوتید Number of transcripts with the length of more than 1 Knt	30128.00
تعداد رونوشت با طول بیشتر از 10 کیلو نوکلئوتید Number of transcripts with the length of more than 10 Knt	23.00
تعداد رونوشت‌های دارای قاب خوانش باز Transcripts containing ORF	30433.00
میانگین درصدی از طول رونوشت‌ها که با قاب خوانش باز پوشش می‌خورد The average of transcript lengths (%) covered by the ORF	56.01
N90 (nt)	450.00
N70 (nt)	942.00
N50 (nt)	1452.00
N30 (nt)	2137.00
N10 (nt)	3582.00
%GC	43.46

مرجع در گیاه زعفران است (جدول ۵). شباهت بالای توالی‌های جداسازی شده‌ی ژن‌های مرجع گیاه زعفران به دیگر گیاهان تک‌لپه و همچنین گیاهان دولپه نشان دهنده‌ی میزان محافظت‌شدگی بالای این ژن‌ها در گیاهان مختلف است. ژن‌های مرجع به‌علت نقش‌های حیاتی که در موجودات زنده بازی می‌کنند، در طول تکامل تغییرات کمتری را نسبت به دیگر ژن‌ها متحمل شده‌اند و تا حد زیادی توالی خود را از تغییرات حفظ کرده‌اند (Zhang and Li, 2004; Zhang et al., 2015). پروتئین‌های کد شونده توسط ژن‌های *Actin*، گروهی از پروتئین‌های رشته‌ای هستند که با ایجاد یک شبکه، اسکلت سلولی را در گیاهان و دیگر موجودات یوکاریوتی ایجاد می‌کنند. اسکلت سلولی ایجاد شده به‌وسیله‌ی این پروتئین‌ها، نقش مهمی در تمامی نقل و انتقالات درون سلولی، حرکت اندامک‌های سلولی و همچنین حفظ ساختار سلولی بازی می‌کند (Staiger et al., 2013; Paez-Garcia et al., 2018; Hurley, 1996; Pettigrew, 2009). عامل طویل‌کننده‌ی ترجمه یوکاریوتی آلفا (*EF1*)، پروتئین ضروری برای طویل شدن پپتید در حال ترجمه و همچنین ادامه‌ی فرآیند ترجمه در تمامی سلول‌های یوکاریوتی است (Graganova et al., 2011; Sasikumar et al., 2012).

نتایج تعیین‌توالی هر ژن به‌طور جداگانه توسط نرم‌افزار Vector NTI v.11.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج این بررسی، خوانش توالی مناسبی را برای تمامی ژن‌های مرجع مورد بررسی نشان داد که به دلیل طراحی دقیق آغازگرهای مورد استفاده بوده است. این خوانش توالی مناسب با ویژگی‌هایی مانند پیک‌های مجزا، عدم وجود نوکلئوتیدهای خوانش نشده و هرز و همچنین سرهم‌بندی مناسب خوانش‌های رفت و برگشت همراه بود. به‌منظور تأیید صحت شناسایی و جداسازی، کانتیگ‌های ایجاد شده از نتایج تعیین توالی ابتدا با توالی‌های موجود در بانک ژن مورد مقایسه و هم‌ردیفی قرار گرفتند. نتایج هم‌ردیفی نوکلئوتیدی با ابزار BLASTn در پایگاه NCBI نشان داد که ژن‌های مرجع گیاه زعفران با ۷۸ تا ۹۴ درصد همسانی به گیاهان تک‌لپه و با ۷۷ تا ۹۵ درصد همسانی به گیاهان دولپه شباهت دارند. این میزان شباهت نشان دهنده‌ی جداسازی صحیح این ژن‌های مرجع در گیاه زعفران است (جدول ۴). نتایج هم‌ردیفی پروتئینی با ابزار BLASTp در پایگاه NCBI نشان داد که ژن‌های مرجع گیاه زعفران با ۸۰ تا ۱۰۰ درصد همسانی به گیاهان تک‌لپه و با ۸۷ تا ۱۰۰ درصد همسانی به گیاهان دولپه شباهت دارند. این میزان شباهت، تأیید دیگری بر جداسازی صحیح این ژن‌های



شکل ۱- الکتروفورز محصولات استخراج RNA (الف) و PCR (ب) روی ژل آگارز یک درصد.

Figure 1. The electrophoresis pattern of the RNA extraction (A) and PCR products (B) on a 1% agarose gel. M: نشانگر مولکولی 1Kbp؛ ۱a و ۲a: RNA استخراج شده از بافت‌ها؛ ۱b-۸b به ترتیب: محصول PCR ژن‌های *Actin*, *EF1*, *GAPDH*, *H3*, *MDH*, *TBP*, *UBC* و *UBQ*.
M: 1kb DNA Ladder; Column 1a and 2a: RNA extracted from saffron tissues; 1b-8b: *Actin*, *EF1*, *GAPDH*, *H3*, *MDH*, *TBP*, *UBC* and *UBQ* PCR gene products, respectively.

جدول ۴- نتایج BLASTn توالی نوکلئوتیدی ژنهای مرجع زعفران با گیاهان تک‌لپه و دولپه

Table 4. BLASTn results of saffron reference genes (nucleotide sequence) against nucleotide database of monocotyledonous and dicotyledonous plants

نام ژن Gene name	گیاهان تک‌لپه Monocotyledons plants			گیاهان دولپه Dicotyledonous plants		
	درصد همسانی Identity%	درصد پوشش Coverage%	E-value	درصد همسانی Identity%	درصد پوشش Coverage%	E-value
<i>Actin</i>	83-94	73-96	0.00	83-85	80-83	00.0
<i>EF1</i>	85-86	75	0.00	85-87	74-75	0.00
<i>GAPDH</i>	80-84	44-89	0.00	80-82	81-87	0.00
<i>H3</i>	81-89	26-65	146-e5	81-89	52-65	146-e3
<i>MDH</i>	78-89	17-74	0.00	77-95	56-74	0.00
<i>TBP</i>	83-93	30-58	0.00	80-88	17-58	163-e9
<i>UBC</i>	81-92	13-51	142-e2	81-85	50-53	129-e7
<i>UBQ</i>	83-88	76-94	0.00	82-88	76-94	0.00

جدول ۵- نتایج BLASTp توالی پروتئینی ژنهای مرجع زعفران با گیاهان تک‌لپه و دولپه

Table 5. BLASTp results of saffron reference genes (protein sequence) against protein database of monocotyledonous and dicotyledonous plants

نام ژن Gene name	گیاهان تک‌لپه Monocotyledons plants			گیاهان دولپه Dicotyledonous plants		
	درصد همسانی Identity%	درصد پوشش Coverage%	E-value	درصد همسانی Identity%	درصد پوشش Coverage%	E-value
<i>Actin</i>	96-98	100	0.00	97-98	100	0.00
<i>EF1</i>	92-96	100	0.00	94-96	100	0.00
<i>GAPDH</i>	85-92	93-100	0.00	87-92	97-100	0.00
<i>H3</i>	93-100	98-100	95-e3	93-100	97-100	94-e1
<i>MDH</i>	90-95	53-100	0.00	89-93	99-100	0.00
<i>TBP</i>	89-98	81-100	142-e1	94-98	97-100	143-e2
<i>UBC</i>	80-96	72-100	107-e7	92-96	100	107-e2
<i>UBQ</i>	84-100	100	0.00	99-100	100	0.00

کاتالیز می‌شود، مرحله‌ی کلیدی در فرآیندهایی مانند چرخه‌ی اسید سیتریک در ماتریکس میتوکندری و شاتل مالات/آسپاراتات در غشاء میتوکندری را تشکیل می‌دهد (Minarik *et al.*, 2002). پروتئین متصل شونده به جعبه‌ی TATA یا *TBP*، یکی از فاکتورهای نسخه‌برداری عمومی در موجودات یوکاریوت است. این پروتئین یکی از زیرواحدهای اصلی فاکتور نسخه‌برداری TFIID بوده و نقشی اساسی در نسخه‌برداری بازی می‌کند (Nikolov *et al.*, 1992; Burley, 1996).

آنزیم ادغام کننده‌ی یوبی‌کوئیتین (*UBC*)، دومین مرحله از واکنش یوبی‌کوئیتینه شدن را که طی آن یک پروتئین برای تجزیه به‌وسیله‌ی پروتئوزوم نشانه‌گذاری می‌شود را کاتالیز می‌کند. این آنزیم نقش مهمی را در سیستم تجزیه‌ی پروتئین‌های اضافی و

آنزیم گلیسرآلدهید فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*)، مدت‌زمان طولانی است که به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در متابولیسم انرژی و تولید ATP و پیرووات از طریق فرآیند گلیکولیز شناخته شده است (Nicholls *et al.*, 2012). گلیسرآلدهید فسفات دهیدروژناز علاوه بر نقش‌های متابولیکی دارای نقش‌های غیرمتابولیکی مانند فعال‌سازی نسخه‌برداری و شروع آپوپتوز سلولی نیز می‌باشد (Zaffagnini *et al.*, 2013; Yang and Zhai, 2017). هیستون H3 یکی از پنج هیستون مهم است که در تنظیم ساختار کروماتین در سلول‌های یوکاریوتی نقش دارند (Houben *et al.*, 2007; Zheng and Chen, 2011). آنزیم مالات دهیدروژناز (*MDH*)، مالات را به اوکسالواستات تبدیل می‌کند. واکنش تبدیل مالات به اگرالواستات که توسط این آنزیم

مرجع گیاه زعفران تنها مختص به این گیاه نبوده و در اغلب گیاهان وجود دارد. محصولات ژن‌های مرجع شناسایی شده در گیاه زعفران ممکن است به این دلیل که عمدتاً در هسته و سیتوپلاسم فعالیت کرده و تجمع دارند، نیازی به پیتید نشانه نداشته باشند (Agrawal et al., 2010). محصولات این ژن‌ها همچنین ممکن است از طریق مکانیسم‌های غیرمعمول ترشحی در سلول منتقل شوند (Nickel and Seedorf, 2008).

بررسی دمین‌های عملکردی محافظت‌شده با استفاده از ابزارهای مختلف نشان داد که دمین‌های عملکردی موجود در توالی‌های جداسازی شده از گیاه زعفران مشابه با دمین‌های عملکردی موجود در ژن‌های مرجع سایر گیاهان هستند. وجود دمین‌های عملکردی محافظت‌شده در ژن‌های مرجع گیاه زعفران، صحت جداسازی آن‌ها را نشان می‌دهد (جدول ۷).

بررسی میزان بیان ژن‌های مرجع مورد مطالعه در بافت‌های مختلف گیاه زعفران نشان داد که ژن یوبی کوئیتین بیشترین میزان بیان و ژن‌های TBP، H3 و UBC کمترین میزان بیان را در مقایسه با سایر ژن‌ها در بافت‌های مختلف داشته‌اند (شکل ۲). بر اساس محاسبات آماری میزان پایداری، ژن‌های MDH و UBQ به‌ترتیب به‌عنوان پایدارترین ژن‌های مرجع بین بافت‌های مختلف گیاه زعفران مشخص شدند. این محاسبات همچنین ژن TBP را به‌عنوان ژن مرجع با میزان پایداری کم مشخص کردند (شکل ۳ و جدول ۸).

پروتئین‌های تغییر شکل یافته‌ی مضر در سلول بازی می‌کند (Scheffner et al., 1995; Hochstrasser, 1996; Komander, 2009). یوبی کوئیتین UBQ، گروهی از پروتئین‌های تنظیمی با وزن مولکولی پایین هستند که در تمامی سلول‌ها و بافت‌های موجودات یوکاریوتی وجود دارند. یوبی کوئیتین‌ها با اتصال به دیگر پروتئین‌ها باعث هدایت آن‌ها به مسیر تجزیه پروتئوزومی می‌شوند. این پروتئین‌ها همچنین می‌توانند با اتصال به دیگر پروتئین‌ها، جایگاه سلولی، میزان فعالیت و همچنین برهمکنش آن‌ها را تغییر دهند (Hershko and Ciechanover, 1998; Komander and Rape, 2012; Swatek and Komander, 2016). نقش‌های بیولوژیکی که برای ژن‌های مرجع ذکر شد، نشان‌دهنده‌ی اهمیت بالای این ژن‌ها در حفظ حیات موجودات زنده بوده و دلیلی بر بیان دائمی آن‌ها در بافت‌های مختلف است (Zhang and Li, 2004; Zhang et al., 2015).

آنالیز توالی‌های پروتئینی ژن‌های مرجع گیاه زعفران با استفاده از ابزارهای SignalP، عدم وجود پیتید نشانه را در ساختار تمام این ژن‌ها مشخص کرد (جدول ۶). آنالیز محل تجمع سلولی با استفاده از ابزار CELLO محل‌های تجمع سلولی مختلفی را برای ژن‌های مرجع گیاه زعفران نشان داد. برخی از این ژن‌ها تنها در هسته، برخی دیگر تنها در سیتوپلاسم، برخی در هسته و سیتوپلاسم و برخی دیگر در سیتوپلاسم و کلروپلاست تجمع پیدا می‌کردند (جدول ۶). روند مشاهده شده برای محل تجمع سلولی و همچنین وجود یا عدم وجود سیگنال پیتید در ژن‌های

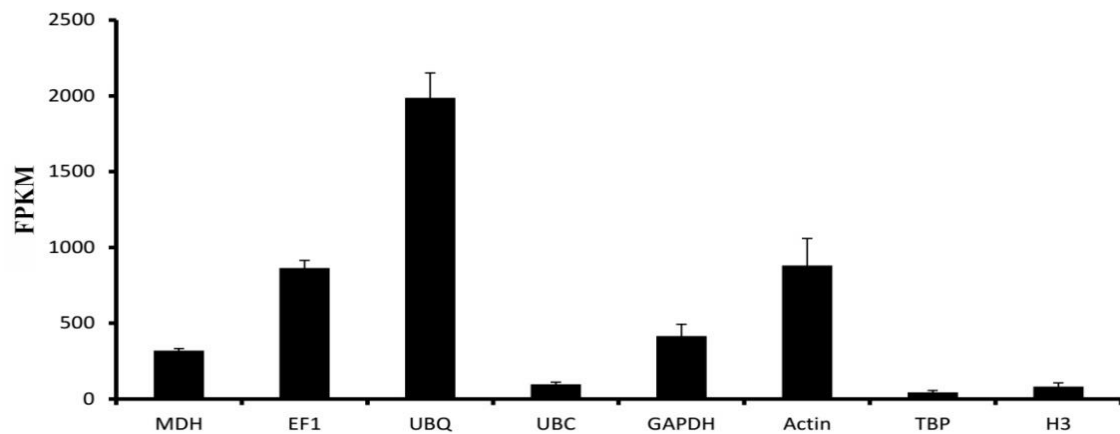
جدول ۶- ویژگی‌های ژن‌های مرجع گیاه زعفران
Table 6. Characteristics of saffron reference genes

نام ژن Gene name	طول (جفت‌باز) ORF size (bp)	طول پروتئین (اسید آمینه) Protein lengths (aa)	موقعیت پیتید نشانه (اسید آمینه) Signal peptide position (aa)	محل تجمع سلولی Protein localization
<i>Actin</i>	1134	377	ندارد Non	سیتوپلاسم Cytoplasm
<i>EF1</i>	1344	447	ندارد Non	سیتوپلاسم Cytoplasm
<i>GAPDH</i>	1026	341	ندارد Non	سیتوپلاسم Cytoplasm
<i>H3</i>	411	136	ندارد Non	هسته Nucleus
<i>MDH</i>	999	332	ندارد Non	سیتوپلاسم و کلروپلاست Cytoplasm and chloroplasts
<i>TBP</i>	615	204	ندارد Non	هسته Nucleus
<i>UBC</i>	459	152	ندارد Non	هسته Nucleus
<i>UBQ</i>	1374	457	ندارد Non	هسته و سیتوپلاسم Nucleus and cytoplasm

جدول ۷- دمین‌های عملکردی محافظت شده در ژن‌های جداسازی شده از زعفران

Table 7. Conserved functional domains of genes isolated from saffron

نام ژن Gene name	نام دمین عملکردی Functional domain name	محدوده روی ORF (جفت باز) Position domain on ORF (bp)	محدوده روی توالی پروتئینی (اسید آمینه) Position of domain in protein sequences (aa)	E-value
<i>Actin</i>	NBD_sugar-kinase_HSP70_actin	13-1131	5-377	0.00
<i>EF1</i>	Elongation factor 1- alpha	1-1308	1-436	0.00
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	10-1020	4-340	0.00
<i>H3</i>	Histone H3	1-408	1-136	90-e5.05
<i>MDH</i>	Malate dehydrogenase	70-993	24-331	0.00
<i>TBP</i>	TATA-box-binding protein	76-612	26-204	141-e5.57
<i>UBC</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	19-435	7-145	72-e9.44
<i>UBQ</i>	ubiquitin-like (Ubl) domain	1-1374	1-456	46-e1.76



شکل ۲- میزان بیان ژن‌های مرجع در گیاه زعفران برحسب FPKM

Figure 2. Expression level of reference genes in saffron based on FPKM

خطای استاندارد بر اساس میزان بیان ژن در بافت‌های مختلف محاسبه شده است.

The error bar indicates standard error. Standard error (SE) is calculated based on the amount of gene expression in different tissues.

جدول ۸- پارامترهای محاسبه شده و رتبه‌بندی پایداری ژن‌های مرجع زعفران

Table 8. The calculated parameters and stability ranking values of saffron reference genes

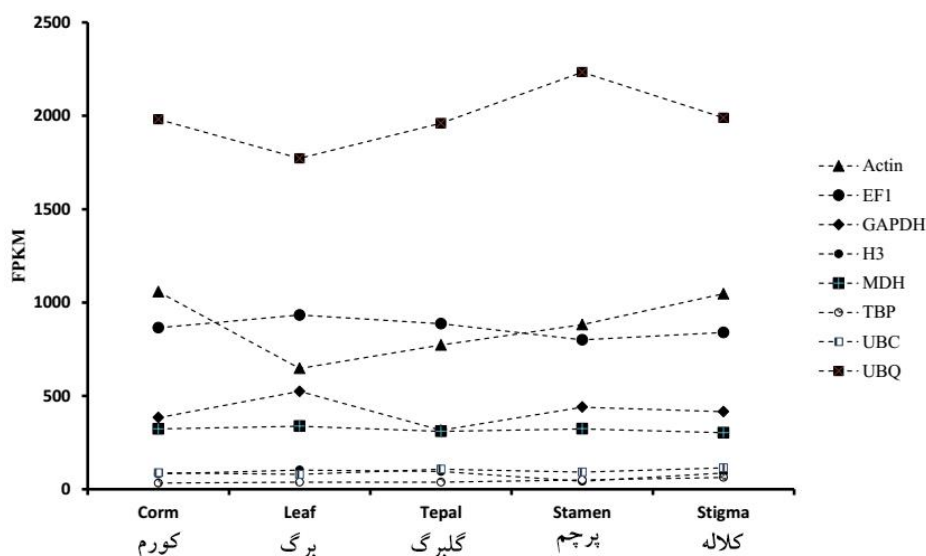
نام ژن Gene name	میانگین کل Total average	انحراف استاندارد Standard deviation	ضریب تغییرات Coefficient of variation	رتبه‌بندی Final ranking of stability
<i>MDH</i>	319.60	13.53	4.23	1
<i>UBQ</i>	1987.19	164.44	8.27	2
<i>UBC</i>	96.58	14.43	14.94	3
<i>H3</i>	82.50	23.47	28.45	4
<i>EF1</i>	864.85	49.74	5.75	5
<i>GAPDH</i>	415.92	76.43	18.38	6
<i>Actin</i>	881.39	176.92	20.07	7
<i>TBP</i>	44.49	12.32	27.68	8

Si⁽¹⁾: میانگین اختلاف رتبه؛ Si⁽²⁾: واریانس رتبه؛ Si⁽³⁾: مجموع مربعات هر رتبه نسبت به میانگین رتبه؛ Si⁽⁶⁾: مجموع قدرمطلق هر رتبه نسبت به میانگین رتبه؛ NP⁽¹⁾, NP⁽²⁾, NP⁽³⁾ و NP⁽⁴⁾: آماره‌های روش تنارزو (Thennarasu, 1995).

Si⁽¹⁾: mean rank difference; Si⁽²⁾: Variance of the ranks; Si⁽³⁾: The sum of the squares of ranks for each gene relative to the mean of ranks; Si⁽⁶⁾: Total absolute value of ranks for each gene relative to the mean of ranks; NP⁽¹⁾, NP⁽²⁾, NP⁽³⁾ and NP⁽⁴⁾: Non-parametric stability statistics of Thennarasu (Thennarasu, 1995) method.

*به منظور بهره‌وری از تمام روش‌های غیرپارامتریک مورد مطالعه در جمع‌بندی نهایی، از آماره SIIG استفاده شد.

*In order to benefit from all non-parametric methods in the final ranking, SIIG statistics were used.



شکل ۳- روند بیان ژن‌های مرجع در بافت‌های مختلف گیاه زعفران
Figure 3. The expression trend of reference genes in different saffron tissues

انحرافات هر رتبه نسبت به میانگین رتبه، مجموع قدرمطلق انحرافات هر رتبه نسبت به میانگین رتبه و آماره‌های روش تنارزو به منظور سنجش میزان پایداری ژن‌های مرجع زعفران استفاده شد (داده‌ها آورده نشده‌اند). مقادیر پایین‌تر این آماره‌ها نشان دهنده‌ی پایداری بیشتر می‌باشد (Nassar and Huehn, 1987; Thennarasu, 1995). همچنین از شاخص SIIG که برگرفته از مدل TOPSIS یا اولویت‌بندی بر اساس شباهت به راه‌حل ایده‌آل می‌باشد، برای رتبه‌بندی نهایی و افزایش کارایی انتخاب ژن‌های مرجع پایدار استفاده شد (Tzeng and Huang, 2011; Zali et al., 2015). این آماره‌ها و روش رتبه‌بندی در ابتدا برای تعیین میزان پایداری صفات مختلف در گیاهان در مناطق و تحت شرایط مختلف محیطی ابداع و به کار برده شده‌اند و کارایی مناسبی در این‌گونه مطالعات داشته‌اند. با توجه به شباهت ماهیت پژوهش حاضر با مطالعات پایداری صفات، در این پژوهش برای اولین بار از آماره‌های تعیین میزان پایداری صفات به منظور تعیین میزان پایداری بیان ۸ ژن مرجع در بافت‌های کورم، برگ، گلبرگ، پرچم و کلاله‌ی گیاه زعفران استفاده شد و رتبه‌بندی میزان پایداری بیان محاسبه شده با استفاده از این آماره‌های غیرپارامتریک

روش‌های مختلفی برای تعیین میزان پایداری بیان ژن‌های مرجع وجود دارند. ساده‌ترین این روش‌ها استفاده آماره‌های پارامتریک مانند انحراف استاندارد است که در آن میزان انحراف استاندارد بیان ژن‌های مرجع بین شرایط و بافت‌های مختلف محاسبه شده و ژن یا ژن‌هایی که کمترین میزان انحراف استاندارد را دارند به عنوان ژن‌های پایدار در نظر گرفته می‌شوند. با این حال، استفاده از آماره‌های پارامتریک نیازمند پیش‌فرض‌هایی مانند نرمال بودن توزیع داده‌ها دارند و در صورتی که این پیش‌فرض‌ها محقق نشوند، محاسبات انجام شده با این آماره‌ها از دقت مناسبی برخوردار نخواهد بود (Sheskin, 2003). داده‌های ترنسکرپتومی در مقیاس بالا مانند داده‌های توالی‌یابی نسل جدید، معمولاً توزیع نرمال نداشته (Conesa et al., 2017; Li and Tibshirani, 2013)، بنابراین استفاده از آماره‌های پارامتریک برای تجزیه و تحلیل آن‌ها توصیه نمی‌شود. در مورد چنین داده‌هایی بهتر است از آماره‌های غیرپارامتریک استفاده شود زیرا این آماره‌ها به توزیع داده‌ها حساس نبوده و مشروط به مفروضات آمار کلاسیک نیستند (Sheskin, 2003)؛ بنابراین، در این پژوهش از دو گروه آماره غیرپارامتریک شامل آماره‌های میانگین اختلاف رتبه، واریانس رتبه، مجموع مربعات

تفاوت قابل توجهی با رتبه بندی بر اساس آماره های پارامتریک مرسوم مانند انحراف استاندارد نشان داد. امروزه حجم انبوه داده های ژنومی، ترنسکریپتومی و پروتئومی و تلفیق آنها با ابزارهای محاسباتی جدید، شناسایی ژن ها و نقش های بیولوژیک آنها را تسهیل نموده است. در سال های اخیر فن آوری توالی یابی نسل جدید، تولید داده های امیکس در گیاهان را به صورت قابل توجهی افزایش داده است و ژنوم مرجع برای اغلب گیاهان مدل به صورت کامل مستندسازی شده و یا در حال مستندسازی است (Singh et al., 2015). در گیاهان دیگر مانند گیاهان دارویی و یا گیاهانی که اندازه ژنوم بزرگی دارند، ایجاد سرهم بندی های ترنسکریپتومی با استفاده از فن آوری توالی یابی RNA، امکان شناسایی اغلب ژن ها را بدون نیاز به یک ژنوم مرجع مستندسازی شده، فراهم می کند (Soltani Howyze et al., 2019; Unamba et al., 2015). ترنسکریپتوم موجودات مختلف مجموعه ای پیچیده از ژن هایی است که پروفایل بیانی متفاوتی بین بافت های مختلف دارند. تعدادی از ژن ها در یک زمان خاص تنها در برخی از بافت ها بیان شده و برخی دیگر از ژن ها در همان زمان دارای بیان یکسانی در همان بافت ها

هستند. از ژن هایی که دارای بیان نسبتاً یکسان در شرایط یا بافت های مختلف هستند به منظور نرمال کردن بیان سایر ژن ها استفاده می شود. شناسایی و تعیین پایداری ترین ژن ها با استفاده از روش های مختلفی صورت می گیرد که عمده ترین آن روش ها استفاده از PCR کمی است. با این حال، این روش دارای محدودیت هایی مانند سرعت کم، هزینه بالا و محدود بودن به چند ژن اندک بوده و قادر نیست که در سطح وسیع مانند ترنسکریپتوم موجودات عمل کند. روش های محاسباتی روش هایی سریع و کم هزینه می باشند که با استفاده از آنها می توان با دقت نسبتاً زیاد و در مدت زمان کمتری، پایداری ترین ژن های مرجع را در سطح ترنسکریپتوم موجودات زنده تشخیص داده و برای نرمال سازی بیان مورد استفاده قرار داد.

بر اساس نتایج این پژوهش، ژن های *UBQ*، *MDH* و *UBC* بهترین ژن های مرجع برای استفاده در مطالعات ترنسکریپتومی زعفران پیشنهاد می شوند و می توانند با دقت نسبتاً بالایی به منظور نرمال سازی داده های بیانی در چنین مطالعاتی مورد استفاده قرار گیرند. از طرفی، به علت میزان پایداری بسیار پایین، استفاده از ژن *TBP* برای نرمال سازی بیان ژن ها در زعفران توصیه نمی شود.

References

- Agrawal, G.K., Jwa, N.S., Lebrun, M.H., Job, D. and Rakwal, R. (2010). Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*, **10**: 799-827.
- Ahrazem, O., Argandona, J., Fiore, A., Aguado, C., Lujan, R., Rubio-Moraga, A., Marro, M., Araujo-Andrade, C., Loza-Alvarez, P., Diretto, G. and Gomez-Gomez, L. (2018). Transcriptome analysis in tissue sectors with contrasting crocins accumulation provides novel insights into apocarotenoid biosynthesis and regulation during chromoplast biogenesis. *Scientific Reports*, **8**: 2843.
- Ahrazem, O., Argandona, J., Fiore, A., Rujas, A., Rubio-Moraga, A., Castillo, R. and Gomez-Gomez, L. (2019). Multi-species transcriptome analyses for the regulation of crocins biosynthesis in *Crocus*. *BMC Genomics*, **20**: 320.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Nebauer, S.G., Molina, R.V. and Gómez-Gómez, L. (2015). Saffron: its phytochemistry, developmental processes, and biotechnological prospects. *Journal of agricultural and food chemistry*, **63**: 8751-8764.
- Ashraf, N., Jain, D. and Vishwakarma, R.A. (2015). Identification, cloning and characterization of an ultrapetala transcription factor CsULT1 from *Crocus*: a novel regulator of apocarotenoid biosynthesis. *BMC Plant Biology*, **15**: 25.
- Azizi-Zohan, A.A., Kamgar-Haghighi, A.A. and Sepaskhah, A.R. (2009). Saffron (*Crocus sativus* L.) production as influenced by rainfall, irrigation method and intervals. *Archives of Agronomy and Soil Science*, **55**: 547-555.

- Baba, S.A., Mohiuddin, T., Basu, S., Swarnkar, M.K., Malik, A.H., Wani, Z.A., Abbas, N., Singh, A.K. and Ashraf, N.** (2015). Comprehensive transcriptome analysis of *Crocus sativus* for discovery and expression of genes involved in apocarotenoid biosynthesis. *BMC Genomics*, **16**: 698.
- Behdani, M. and Fallahi, H.** (2015) *Saffron: Technical Knowledge Based on Research Approaches*. University of Birjand Publication, Birjand, IR (In Persian).
- Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B.** (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**: 2114-2120.
- Brandizzi, F. and Caiola, M.G.** (1998). Flow cytometric analysis of nuclear DNA in *Crocus sativus* and allies (Iridaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **211**: 149-154.
- Burley, S.K.** (1996). The TATA box binding protein. *Current Opinion in Structural Biology*, **6**: 69-75.
- Bustin, S.A.** (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, **25**: 169-193.
- Cheng, B., Furtado, A. and Henry, R.J.** (2017). Long-read sequencing of the coffee bean transcriptome reveals the diversity of full-length transcripts. *Gigascience*, **6**: gix086.
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szcześniak, M.W., Gaffney, D.J., Elo, L.L., Zhang, X. and Mortazavi, A.** (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*, **17**: 13.
- D'Agostino, N., Pizzichini, D., Chiusano, M.L. and Giuliano, G.** (2007). An EST database from saffron stigmas. *BMC Plant Biology*, **7**: 53.
- Ebrahimi, A., Rashidi Monfared, S., moradi sarabshelli, A. and heidari, P.** (2018). Validation of some of Housekeeping Genes in *Aeluropus litoralis* under Salinity Stress. *Journal of Crop Breeding*, **10**: 110-117 (In Persian).
- Fernández, J.A.** (2004). Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Res Dev Plant Science*, **2**: 127-159.
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M. and Sangrador-Vegas, A.** (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, **44**: D279-D285.
- Garg, R. and Jain, M.** (2013). *RNA-Seq for Transcriptome Analysis in Non-Model Plants*. In: Rose, R.J., Ed., *Legume Genomics*, pp. 43-58, Springer Science & Business Media, Berlin, DE.
- Gilbert, D.G.** (2018). Genes of the Pig, *Sus scrofa*, reconstructed with Evidential Gene. *PeerJ Preprints*, **7**: e6374.
- Gomez-Gomez, L., Pacios, L.F., Diaz-Perales, A., Garrido-Arandia, M., Argandona, J., Rubio-Moraga, A. and Ahrazem, O.** (2018). Expression and Interaction Analysis among Saffron ALDHs and Crocetin Dialdehyde. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(5): 1409.
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R. and Zeng, Q.** (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, **29**: 644-652.
- Greganova, E., Altmann, M. and Bütikofer, P.** (2011). Unique modifications of translation elongation factors. *The FEBS Journal*, **278**: 2613-2624.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Pelloux, J., Bellini, C. and Van Wuytswinkel, O.** (2008). Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *The Plant Cell*, **20**: 1734-1735.
- Hershko, A. and Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, **67**: 425-479.
- Hochstrasser, M.** (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual Review of Genetics*, **30**: 405-439.

- Houben, A., Demidov, D., Caperta, A.D., Karimi, R., Agueci, F. and Vlasenko, L. (2007). Phosphorylation of histone H3 in plants-a dynamic affair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, **1769**: 308-315.
- Hurley, J.H. (1996). The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **25**: 137-162.
- Husaini, A.M., Wani, S.A., Sofi, P., Rather, A.G., Parray, G.A., Shikari, A.B. and Mir, J.I. (2009). Bioinformatics for saffron (*Crocus sativus* L.) improvement. *Communications in Biometry & Crop Science*, **4(1)**: 3-8.
- Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A.K. and Khurana, J.P. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **345**: 646-651.
- Jain, M., Srivastava, P.L., Verma, M., Ghargal, R. and Garg, R. (2016). De novo transcriptome assembly and comprehensive expression profiling in *Crocus sativus* to gain insights into apocarotenoid biosynthesis. *Scientific Reports*, **6**: 22456.
- Jaiswal, P.S., Kaur, N. and Randhawa, G.S. (2019). Identification of reference genes for qRT-PCR gene expression studies during seed development and under abiotic stresses in *Cyamopsis tetragonoloba*. *Crop Science*, **59**: 252-265.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A. and Nuka, G. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, **30**: 1236-1240.
- Kamalipour, M. and Akhondzadeh, S. (2011). Cardiovascular effects of saffron: An evidence-based review. *The Journal of Tehran Heart Center*, **6(2)**: 59-61.
- Karge, W.H., Schaefer, E.J. and Ordovas, J.M. (1998). Quantification of Mrna By Polymerase Chain Reaction (PCR) Using An Internal Standard and A Nonradioactive Detection Method. In: Ordovas, J.M., Ed., *Lipoprotein Protocols*, pp. 43-61, Springer Science & Business Media, Berlin, DE.
- Khakpour, A., Zolfaghari, M. and Sorkheh, K. (2019). Bioinformatics Study and Investigation of the Expression Pattern of Several Important Genes Involved in Glycyrrhizin Synthesis of *Glycyrrhiza glabra* L. in Autumn and Spring Seasons. *Plant Genetic Researches*, **6(1)**: 55-68 (In Persian).
- Kiarash, J.G., Wilde, H.D., Amirmahani, F., Moemeni, M.M., Zaboli, M., Nazari, M., Moosavi, S.S. and Jamalvandi, M. (2018). Selection and validation of reference genes for normalization of qRT-PCR gene expression in wheat (*Triticum durum* L.) under drought and salt stresses. *Journal of Genetics*, **97**: 1433-1444.
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society Transactions*, **37**: 937-953.
- Komander, D. and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annual Review of Biochemistry*, **81**: 203-229.
- Koocheki, A., Ebrahimian, E. and Seyyedi, S.M. (2016). How irrigation rounds and mother corm size control saffron yield, quality, daughter corms behavior and phosphorus uptake. *Scientia Horticulturae*, **213**: 132-143.
- Li, J. and Tibshirani, R. (2013). Finding consistent patterns: a nonparametric approach for identifying differential expression in RNA-Seq data. *Stat Methods Med Res*, **22**: 519-36.
- Malik, A.H. and Ashraf, N. (2017). Transcriptome wide identification, phylogenetic analysis, and expression profiling of zinc-finger transcription factors from *Crocus sativus* L. *Molecular Genetics and Genomics*, **292**: 619-633.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M. and Hurwitz, D.I. (2014). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, **43**: D222-D226.

- Martin, M.** (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnetjournal*, **17**(1): 10-12.
- Matvienko, M.** (2015). *CLC Genomics Workbench. Plant and Animal Genome*. Sr. Field Application Scientist, CLC Bio, Aarhus, DE.
- Majdi, M., Karimzade, G. and Malboobi, M.A.** (2015). The study of relative gene expression of key genes of terpene biosynthesis in tissues and different developmental stages of feverfew (*Tanacetum parthenium*) genotypes using real-time PCR. *Plant Genetic Researches*, **1**: 25-32 (In Persian).
- Minarik, P., Tomaskova, N., Kollarova, M. and Antalík, M.** (2002). Malate dehydrogenases-structure and function. *General Physiology and Biophysics*, **21**: 257-266.
- Nassar, R. and Huehn, M.** (1987). Studies on estimation of phenotypic stability: Tests of significance for nonparametric measures of phenotypic stability. *Biometrics*, **43**(1): 45-53.
- Nicholls, C., Li, H. and Liu, J.P.** (2012). GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **39**: 674-679.
- Nickel, W. and Seedorf, M.** (2008). Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **24**: 287-308.
- Nielsen, H.** (2017). Predicting Secretory Proteins with SignalP. In: Kihara, D., Ed., *Protein Function Prediction, Methods and Protocols*, pp. 59-73, Springer Science & Business Media, Berlin, DE.
- Nikolov, D.B., Hu, S.H., Lin, J., Gasch, A., Hoffmann, A., Horikoshi, M., Chua, N.H., Roeder, R.G. and Burley, S.K.** (1992). Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature*, **360**: 40-46.
- Ono, H., Ishii, K., Kozaki, T., Ogiwara, I., Kanekatsu, M. and Yamada, T.** (2015). Removal of redundant contigs from de novo RNA-Seq assemblies via homology search improves accurate detection of differentially expressed genes. *BMC Genomics*, **16**: 1031.
- Paez-Garcia, A., Sparks, J.A., de Bang, L. and Blancaflor, E.B.** (2018). Plant Actin Cytoskeleton :New Functions From Old Scaffold. In: Sah,V.P. and Baluška, F., Eds., *Concepts in Cell Biology-History And Evolution*, pp. 103-137, Springer Science & Business Media, Berlin, DE.
- Pettigrew, D.W.** (2009). Amino acid substitutions in the sugar kinase/hsp70/actin superfamily conserved ATPase core of *E. coli* glycerol kinase modulate allosteric ligand affinity but do not alter allosteric coupling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **481**: 151-156.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. and Neuvians, T.P.** (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, **26**: 509-515.
- Qian, X., Sun, Y., Zhou, G., Yuan, Y., Li, J., Huang, H., Xu, L. and Li, L.** (2019). Single-molecule real-time transcript sequencing identified flowering regulatory genes in *Crocus sativus*. *BMC Genomics*, **20**: 857.
- Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S.M., Mahoonak, A.S. and Rajabzadeh, G.** (2015). Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food Hydrocolloids*, **51**: 327-337.
- Sampathu, S., Shivashankar, S., Lewis, Y. and Wood, A.** (1984). Saffron (*Crocus sativus* Linn.)-cultivation, processing, chemistry and standardization. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **20**: 123-157.
- Sasikumar, A.N., Perez, W.B. and Kinzy, T.G.** (2012). The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, **3**: 543-555.
- Scheffner, M., Nuber, U. and Huibregtse, J.M.** (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, **373**: 81-83.

- Shahraki, S., Kazemitabar, S.K. and Hashemi, S.H.R.** (2014). Study of Reference Genes in Sesame Leaves under Salt Stress by Real-Time PCR Method. *Crop Biotech*, **8**: 1-10 (In Persian).
- Sheskin, D.J.** (2003) *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Singh, V.K., Singh, A.K., Singh, S. and Singh, B.D.** (2015). Next-Generation Sequencing (NGS) Tools and Impact in Plant Breeding. In: Al-Khayri, J.M., Jain, S.M. and Johnson, D.V., Eds., *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools*, pp. 563-612, Springer Science & Business Media, Berlin, DE.
- Skladnev, N.V. and Johnstone, D.M.** (2017). Neuroprotective properties of dietary saffron: more than just a chemical scavenger? *Neural Regeneration Research*, **12**: 210-211.
- Smith-Unna, R., Bournsnel, C., Patro, R., Hibberd, J.M. and Kelly, S.** (2016). TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. *Genome Research*, **26**: 1134-1144.
- Soltani Howyzeh, M., Sadat Noori, S.A., Shariati, V. and Amiripour, M.** (2019). Large scale identification of SSR molecular markers in Ajowan (*Trachyspermum ammi*) using RNA sequencing. *Plant Genetic Researches*, **6**: 31-46 (In Persian).
- Song, L. and Florea, L.** (2015). Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *Gigascience*, **4**: 48.
- Staiger, C.J., Baluska, F., Volkmann, D. and Barlow, P.** (2013) *Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions*. Springer Science & Business Media, Berlin, DE.
- Swatek, K.N. and Komander, D.** (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Research*, **26**: 399-422.
- Tan, H., Chen, X., Liang, N., Chen, R., Chen, J., Hu, C., Li, Q., Li, Q., Pei, W., Xiao, W., Yuan, Y., Chen, W. and Zhang, L.** (2019). Transcriptome analysis reveals novel enzymes for apo-carotenoid biosynthesis in saffron and allows construction of a pathway for crocetin synthesis in yeast. *Journal of Experimental Botany*, **70**: 4819-4834.
- Thennarasu, K.** (1995). *On Certain Non-parametric Procedures for Studying Genotype-Environment Interactions and Yield Stability*. New Dehli, IND.
- Tzeng, G.H. and Huang, J.J.** (2011) *Multiple Attribute Decision Making: Methods and Applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Unamba, C.I.N., Nag, A. and Sharma, R.K.** (2015). Next generation sequencing technologies: the doorway to the unexplored genomics of non-model plants. *Frontiers in Plant Science*, **6**: 10.3389/fpls.2015.01074.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F.** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, **3**: research0034
- Wang, Y., Dai, M., Cai, D. and Shi, Z.** (2019). Screening for quantitative real-time PCR reference genes with high stable expression using the mRNA-sequencing data for pear. *Tree Genetics & Genomes*, **15**: 54.
- Xie, X., Xiao, Q., Xiong, Z., Yu, C., Zhou, J. and Fu, Z.** (2019). Crocin-I ameliorates the disruption of lipid metabolism and dysbiosis of the gut microbiota induced by chronic corticosterone in mice. *Food & Function*, **10**: 6779-6791.
- Yang, S. and Zhai, Q.** (2017). Cytosolic GAPDH: a key mediator in redox signal transduction in plants. *Biologia Plantarum*, **61**: 417-426.
- Zaffagnini, M., Fermani, S., Costa, A., Lemaire, S.D. and Trost, P.** (2013). Plant cytoplasmic GAPDH: redox post-translational modifications and moonlighting properties. *Frontiers in Plant Science*, **4**: 450.
- Zali, H., Sofalian, O., Hasanloo, T., Asgharii, A. and Hoseini, S.M.** (2015). Appraising of drought tolerance relying on stability analysis indices in canola genotypes simultaneously,

- using selection index of ideal genotype (SIIG) technique: Introduction of new method. Paper presented at the *Biological Forum*, **7(2)**: 703-711.
- Zeng, Y., Yan, F., Tang, L. and Chen, F.** (2003). Increased crocin production and induction frequency of stigma-like-structure from floral organs of *Crocus sativus* L. by precursor feeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **72**: 185-191.
- Zhang, L. and Li, W.H.** (2004). Mammalian housekeeping genes evolve more slowly than tissue-specific genes. *Molecular Biology and Evolution*, **21**: 236-239.
- Zhang, Y., Li, D. and Sun, B.** (2015). Do housekeeping genes exist? *PLoS One*, **10(5)**: e0123691
- Zheng, B. and Chen, X.** (2011). Dynamics of histone *H3* lysine 27 trimethylation in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**: 123-129.

Identification, Sequencing and Stability Evaluation of Eight Reference Genes in Saffron (*Crocus sativus* L.)

Seyed Sajad Sohrabi¹, Seyed Mohsen Sohrabi^{1,*}, Seyed Karim Mousavi²
and Mohsen Mohammadi³

1- Ph.D., Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2- Assistant Professor, Plant Protection Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Khorramabad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology and Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

(Received: February 23, 2020 – Accepted: July 13, 2020)

Abstract

Saffron (*Crocus sativus* L.) is the most valuable and expensive spice in the world. The stigmas of saffron are the source of valuable apocarotenoids such as crocin, picrocrocins, and safranal. Transcriptomic and expression studies of genes are important steps in investigating of secondary metabolites in plants. One of the important prerequisites for such studies is identification of reliable and stable reference genes to normalize the expression of other genes. In the present study, eight reference genes were identified and isolated using transcriptome of saffron and their expression stability was evaluated by non-parametric statistical methods. The results of amplification and sequencing showed accurate identification of eight reference genes *Actin*, *EF1*, *GAPDH*, *H3*, *MDH*, *TBP*, *UBC*, and *UBQ*. The expression stability evaluation revealed that *MDH* and *UBQ* genes had the highest stability among different saffron tissues and *TBP* had the lowest stability among them. In this study, eight reference genes were isolated and their expression stability was evaluated from different tissue types of saffron, for the first time. The reference genes identified in the present study can be used as stable genes to normalize gene expression in transcriptomic and expression studies of saffron plant.

Keywords: Non-parametric statistics, Gene expression stability, Transcriptome, Saffron, Reference genes

* Corresponding Author, E-mail: sohrabi.sa@fa.lu.ac.ir