

ارزیابی تنوع ژنتیکی در لاین های هاپلوئید مضاعف شده کاملینا با استفاده از نشانگرهای رتروترانسپوزونی REMAP

Evaluation of genetic variation in doubled haploid lines of *Camelina* using REMAP retrotransposon markers

حمزه مینایی چنار^۱، سجاد رشیدی منفرد^{۱*}، دانیال کهریزی^۱، لیلیا زارعی^۲، امین ابراهیمی^۳
Hamzeh Minaei Chenar¹, Sajad Rashidi Monfared¹, Dnial Kahrizi¹, Leila Zarei², Amin Ebrahimi³

۱- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- گروه زراعت و به نژادی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۳- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، سمنان، ایران

1. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Thran, Iran

2. Faculty of Science and Agricultural Engineering, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran

3. Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Semnan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Email : *Corresponding Author

rashidims@modares.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۱۱)

چکیده

ایران کشوری نیمه خشک و خشک می باشد و بیش از ۷۰ درصد از زمین های کشاورزی آن دیم هستند. تا به حال گیاهی دانه روغنی مناسب با مناطق مختلف کشور معرفی نشده است. کاملینا (*Camelina sativa L.*)، گیاهی دانه روغنی - دارویی از خانواده براسیکاسه، گیاهی کم توقع، با نیاز آبی- کودی پایین، مقاوم به انواع بیماری ها و پاتوژن های معمول و مناسب جهت کشت در تناوب غلات است. در این مطالعه تنوع ژنتیکی در ۳۲ لاین هاپلوئید مضاعف شده کاملینا با استفاده از ۱۱ آغازگر ترکیبی REMAP مورد ارزیابی قرار گرفت. هشت آغازگر نوارهای واضح و قابل امتیازدهی تولید کردند و در مجموع ۷۴ قطعه تولید گردید که ۵۹ قطعه (۷۹/۲۲٪) چندشکل بودند. آغازگرهای IRAP1+P6 و IRAP1+P8 کمترین تعداد نوار (چهار نوار) و آغازگر IRAP979+P4 با تولید ۱۵ نوار، بیشترین تعداد را تولید کردند. میزان چندشکلی آغازگرها از ۶۹/۲۳ درصد تا ۱۰۰٪ و میزان PIC از ۰/۳۸ تا ۰/۴۱ متغییر بود. خوشه بندی بر اساس ضریب تشابه جاکارد، لاین ها را در شش گروه اصلی قرار داد. بر طبق تجزیه به مولفه های اصلی، دو مولفه اصلی اول در مجموع ۲۱/۵۱ درصد تغییرات را توجیه کردند که بیانگر پوشش مناسب نشانگرها در سطح ژنوم بود. بنابراین به نظر می رسد که نشانگر REMAP، با چندشکلی و توزیع بالا در سطح ژنوم کاملینا، یک نشانگر مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی در این گیاه می باشد.

واژه های کلیدی

آغازگر،
تنوع ژنتیکی،
کاملینا،
نشانگر REMAP،
PCR

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 2, 2023

Abstract

Iran is an arid and semi-arid country and more than 70% of its agricultural lands are rainfed. So far, no oilseed plant suitable for different regions of the country has been introduced. *Camelina* (*Camelina sativa* L.) is an oily-medicinal plant of the Brassicaceae family, a low-input plant, with low water-fertilizer requirements, resistant to a variety of common diseases and pathogens and suitable for cultivation in grain rotation. In this study, genetic variation of 32 doubled haploid lines of *Camelina* was evaluated by using 11 REMAP primers. Eight primers produced clear and scorable strips and totally, 74 bands were produced which 59 of them were polymorphic (79/72 %). IRAP1+P6 and IRAP1+P8 primers produced the lowest number of bands (4 bands) and IRAP979+P4 marker produced the most of bands (15 bands). The amount of primer polymorphism varies from 23.69% to 100% and the amount of PIC varies from 0.38 to 0.41. Clustering based on the Jaccard similarity placed the lines in six main groups. According to the principal components analysis, the first two components contributed 21.51% of the variance, which indicated the appropriate coverage of the markers at the genome level. Thus, it seems that the REMAP marker, with its high polymorphism and high distribution in the *Camelina* genome, is a suitable marker for investigating the genetic diversity in this plant.

Keywords: *Camelina*, genetic variation, PCR, primer, REMAP marker

مقدمه

al. 2014). با توجه به مقدار بالای اسیدهای چرب اشباع نشده چندگانه، همراه با اسید چرب امگا-۳ به عنوان ترکیب اصلی، این روغن می تواند به عنوان یک محصول غذایی مورد استفاده قرار گیرد (Faustino et al. 2016). هم چنین روغن و کنجاله کاملینا منبع مناسبی از پروتئین جهت تغذیه دام، طیور و آبزیان می باشند (Lawrence and Anderson, 2018; Betancor et al. 2021). کمبود دانه های روغنی و حجم بالای واردات روغن و محدودیت زیاد منابع آبی در کشور جهت تولید دانه های روغنی، تاکید بر شناسایی گونه ها و واریته های سازگار با شرایط خشک سالی را آشکار می سازد (Moosavifar et al. 2010). بنابراین به نظر می رسد کاملینا یک گیاه مناسب جهت کشت در ایران به منظور تامین روغن خوراکی و کنجاله باشد. یکی از مشکلات مربوط به کاملینا پایین بودن تنوع ژنتیکی آن است. ایجاد تنوع در این گیاه به جهت سازگاری برای اغلب مناطق آب و هوایی و هم به منظور مصارف خاص مورد توجه است. به طوری که فلاح و همکاران توانستند ۱۳۶ لاین هاپلوئید مضاعف شده از این گیاه را تولید کنند (Fallah, 2022). اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ ها، برای انتخاب والدین، جهت انجام تلاقی های کارا و اتخاذ روش اصلاحی

دانه های روغنی نقش مهمی در صنعت غذا داشته و به عنوان منبع تجدیدپذیر برای تولید بیودیزل و فراورده های گوناگون شیمیایی در نظر گرفته می شوند (Zhang et al. 2017; Kumar et al. 2017; Bujnovsky et al. 2020). در حال حاضر دومین ذخایر غذایی جهان پس از غلات، دانه های روغنی می باشند (USDA, 2015; Food and Agriculture Organization, 2015). کشت دانه های روغنی از مهم ترین مولفه های امنیت و ایمنی غذایی محسوب می شود (Raziei et al. 2018). کاملینا (*Camelina Sativa* L.) یک گیاه دانه روغنی متعلق به خانواده براسیکاسه است که به طور فزاینده ای به خاطر ویژگی های خوب زراعی و کاربردهای گوناگون در بهداشت و صنعت مورد توجه قرار گرفته است (Berti et al. 2016). ویژگی های مفید زراعی و اقتصادی این گیاه شامل عملکرد رضایت بخش تحت شرایط خشکی، نیاز پایین به کود و آفت کش ها، سازگاری با امکانات کشاورزی موجود و دوره رشدی کوتاه می باشد (Putnam et al. 1993; Vollman et al. 2007; Bansal et al. 2016; Brown et al. 2016). بذور کاملینا حاوی تقریباً ۳۵٪ روغن، ۲۰٪ پروتئین، ۳۵٪ کربوهیدرات، ۵٪ رطوبت و ۵٪ تفاله تحت شرایط رشدی مختلف می باشد (Toncea et al. 2013; Li et al. 2013).

مورد استفاده قرار گیرند (Aalami and Karami, 2015). در ۴۵ ژنوتیپ از تیپ‌های مختلف توتون از ۲۰ ترکیب نشانگرهای رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP استفاده شد که این نشانگرها بهتر از سایر نشانگرهای استفاده شده توانستند فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کنند که نمایانگر برتری این نشانگرها در بررسی تنوع ژنتیکی توتون می‌باشند (Hassani et al. 2005). در مطالعه‌ای دیگر، جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین‌های گیاه کاملینا از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده شد که در مجموع ۱۴۲ قطعه چندشکل تشکیل شد و درصد چندشکلی متوسط ۱۴/۲ درصد بود (Shiri, 2018). هدف از مطالعه حاضر بررسی تنوع ژنتیکی تعداد ۳۲ لاین هاپلوئید مضاعف‌شده کاملینا از نظر صفات بیوشیمیایی دانه از قبیل درصد پروتئین، درصد روغن، میزان اروسیک اسید، میزان آلفا لینولنیک اسید (امگا-۳) و میزان توکوفرول با استفاده از نشانگر رتروترانسپوزونی REMAP بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA: بذور ۳۲ لاین هاپلوئید مضاعف-شده کاملینای مورد مطالعه از شرکت دانش بنیان بیستون شفا تهیه و در گل‌خانه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه کشت گردیدند. برگ‌های جوان و کاملاً سالم و سبز در مراحل اول رشد یعنی مرحله ۵-۴ برگی، برداشت و بلافاصله در ازت مایع قرار داده شدند و سپس روش دلاپورتا (Dellaporta et al. 1983) به منظور استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. شماره لاین‌ها، والدین و منشا آن‌ها در جدول ۱ ذکر شده است. هم‌چنین در جدول ۲ صفات بارز بیوشیمیایی که مبنای انتخاب لاین بوده، درج گردیده است.

آغازگرهای رتروترانسپوزونی مورد استفاده: بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده کاملینا از طریق نشانگر رتروترانسپوزونی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی صورت گرفت. بدین منظور ۱۱ آغازگر REMAP (ISSR+IRAP) استفاده گردید (جدول ۳). به منظور تعیین دمای اتصال بهینه آغازگرها، از PCR با شیب دمایی (گرادیانت) استفاده گردید.

مناسب، ضروری است و نشانگرهای مولکولی ابزارهایی توانمند برای شناسایی ارقام، بررسی تکامل گونه، بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها هستند (Russel et al. 1997). یکی از انواع نشانگرهای مولکولی رتروترانسپوزون‌ها می‌باشند که به دو گروه رتروترانسپوزون‌های دارای توالی انتهایی تکراری (Long Terminal Repeat) و رتروترانسپوزون‌های فاقد توالی تکراری انتهایی (Non-long term repeat) (Queen et al. 2004) تقسیم می‌شوند. انواع نشانگرهای رتروترانسپوزونی شامل، تکثیر توالی خاص SSAP (Sequence-specific amplification polymorphism)، چندشکلی در تکثیر بین رتروترانسپوزون‌ها IRAP (Inter-retrotransposon amplified polymorphism)، چندشکلی در تکثیر بین رتروترانسپوزون (Retrotransposon-microsatellite amplification polymorphism)، چندشکلی مبتنی بر الحاق ترانسپوزون RBIP (Retrotransposon-based insertion polymorphism)، چندشکلی بین عناصر ترانسپوزونی با توالی معکوس کوتاه IMP (Inter-MITE polymorphism) شامل این نشانگرها می‌باشند (Kalendar et al. 2011).

در نشانگرهای REMAP یکی از آغازگرها بر اساس توالی‌های تکراری انتهایی رتروترانسپوزون‌ها طراحی شده و آغازگر دیگر بر اساس توالی‌های تکراری ریزماهواره‌ها تعیین می‌شود. قطعات بین دو آغازگر تکثیر شده و چندشکلی بر اساس تفاوت در طول این قطعات آشکار می‌گردد. در REMAP از انواع آغازگرهایی استفاده می‌کند که بین IRAP و ISSR مشترک هستند. اگرچه به نظر می‌رسد که آغازگرهای SSR در REMAP باید محصولات ISSR و آغازگرهای LTR نیز محصولات IRAP را ارائه دهند، اما در عمل به‌ندرت چنین وضعیتی دیده می‌شود. این احتمالاً به دلیل ترکیبی از عوامل از جمله ساختار ژنوم و رقابت در واکنش‌های PCR است (Kalendar and Schulman, 2006). جهت بررسی تنوع ژنتیکی مطالعات گوناگونی با استفاده از نشانگرهای REMAP بر روی گیاهان مختلف صورت گرفته است. در پژوهشی نشانگرهای REMAP، IRAP، ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۴۰ لاین، رقم بومی و اصلاح شده برنج مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج، نشانگر REMAP، برای نشان دادن تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم قابلیت خوبی دارد و می‌تواند برای مطالعات ژنتیکی و اصلاحی برنج

جدول ۱- شماره لاین های مورد بررسی، والدین و منشا آنها

Table 1. The numbers of the investigated lines, their parents and their origin

Line number	Parental (♂)		Maternal (♀)	
	Origin	Cultivar name	Origin	Cultivar name
9	Russia	Irkutskij Mestnyj	Russia	Omskij Mestnyj
66, 40, 24	Poland	Bronowska	Russia	Saratouskij
26	Poland	Brzybrodzka II	Russia	Krupnosemjannyj
98	Poland	Volynskaja	Germany	Came
35	Russia	Omskij	Germany	Came
27	Russia	Ukrajinskij	Sweden	Svalöf
30, 47, 80, 83, 101, 114, 135	Greece	Blaine Greek	Germany	Calena
21, 45, 67	Russia	Sortandinskij	Russia	Zavolzskij
57, 74	Poland	Borowska	Russia	VNIIMK 17
10, 54, 61, 133	Poland	Czestochowska	Russia	Voronezh 349
64, 65, 33, 92, 107, 122	Russia	Ukrajinskaja	Germany	Lindo
97	Poland	Volynskaja	Denmark	Boha
2	Kazakhstan	Kirgizskij 1	Russia	Voronezskij 349

جدول ۲- لاین های هاپلوئید مضاعف شده کاملینا و صفات بارز آنها

Table 2. Doubled haploid lines of Camelina and their characteristic traits

The studied lines	Biochemical traits
133 -40 - 10 -54 -27	High protein
98 - 64 - 57 - 26 - 107	Low protein
45 - 27 - 2- 65 - 74	High oil
67 - 61 - 40- 54 - 21	Low oil
135 - 47 - 98 - 30 - 24	High erucic acid
21- 9 - 122- 92 - 67	Low erucic acid
65 - 27 - 66 - 35 - 33	High omega-3 and tocopherol
83 - 135- 80 - 114 -101	Low omega-3 and tocopherol

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای IRAP، ISSR و REMAP مورد استفاده در بررسی تنوع لاین های هاپلوئید مضاعف شده کاملینا

Table 3. The characteristics of IRAP, ISSR and REMAP primers used in investigating the diversity of doubled haploid lines of Camelina

Row	IRAP Primer	IRAP sequence (5' to 3')	Primer annealing temperature (°C)
1	IRAP979	5-CCG GGA GCC CAT TCG AAC-3	60.7
2	IRAP978	5-GGT GTG TCC GGG CGT TAC -3	52.1
3	IRAP1	5-TGA TCC ACT CCC CTG GGC GAT GTG G-3	60.5
Primer ISSR		ISSR sequence (5' to 3')	Primer annealing temperature (°C)
4	P4	CTG(GT) ₈	59
5	P6	(AG) ₈ GCC	64
6	P7	(AG) ₈ ACC	56
7	P8	(GA) ₈ ACC	59
8	P9	(GA) ₈ ATC	52
9	mm15	A(CA) ₇ YA	53
10	P13	(CA) ₈ G	54
REMAP primer			Primer annealing temperature (°C)
1	IRAP1-P4		61
2	IRAP1-P8		61
3	IRAP1-P7		61
4	IRAP979-P6		56.2
5	IRAP979-P8		60.7
6	IRAP1-P6		61
7	IRAP978-P13		56.1
8	IRAP979-P4		58.5
9	IRAP978-P9		56.1
10	IRAP978-mm15		50.1
11	IRAP979-P7		60.1

لاین ها توسط نرم افزار NTSYSpc 2.02e محاسبه گردید. جهت گروه بندی لاین ها، ترسیم دندروگرام بر اساس ماتریس تشابه جاکارد انجام گرفت و تعیین تعداد خوشه های مطلوب برای گروه بندی از طریق محاسبه شاخص F کاذب توسط نرم افزار SYSTAT انجام شد. ارتباط صفات بیوشیمیایی در ۳۲ لاین منتخب هاپلوئید مضاعف شده کاملینا با نشانگر REMAP، با استفاده از تجزیه رگرسیون گام به گام با هدف شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه، با در نظر گرفتن مکان های نشانگری به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورد مطالعه به عنوان متغیرهای وابسته با استفاده از نرم افزار IBM SPSS statistics 23، مورد بررسی قرار گرفت. شاخص های نشانگری برای هر آغازگر با استفاده از برنامه Excel بر اساس فرمول های ذیل محاسبه شدند.

۱) درصد چندشکلی (Polymorphism): درصد چندشکلی برابر با تعداد قطعات (نوارهای) چندشکل تقسیم بر تعداد کل قطعات تکثیر شده بر حسب درصد می باشد (Mohammadi and Prasanna, 2003).

$$\text{درصد چندشکلی} = \frac{\text{تعداد قطعات چندشکل}}{\text{تعداد کل قطعات}} \times 100$$

۲) شاخص محتوای چندشکلی (Polymorphic Information Content): این شاخص از رابطه $\text{PIC} = 1 - p^2 - q^2$ برای هر یک از آغازگرها محاسبه گردید (Mousapour et al. 2011).

$$p = \frac{\text{تعداد افرادی که دارای نوار هستند}}{\text{کل افراد}}$$

$$q = 1 - p$$

۳) نسبت چندشکلی مؤثر (EMR Effective Multiplex Ratio): نسبت چندشکلی مؤثر از طریق رابطه زیر برای هر آغازگر محاسبه شد (Kumar et al. 2008).

$$\text{EMR} = \frac{\text{تعداد نوار چندشکل}}{\text{تعداد کل نوارها}} \times \text{تعداد نوار چندشکل}$$

۴) این شاخص حاصل ضرب تعداد قطعات چندشکل در شاخص محتوای چندشکلی می باشد (Powell et al. 1996; Anderson et al. 1993).

$$\text{MI} = \text{PIC} \times \text{EMR}$$

تعیین کیفیت و کمیت نمونه های DNA: تعیین کیفیت نمونه های DNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر 1X TAE انجام شد. مقداری از محلول DNA مربوط به هر نمونه در دستگاه بارگذاری و الکتروفورز ژل به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۹۰ ولت انجام شد. برای تعیین کمیت نمونه های DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. مقداری از هر نمونه DNA بر روی دستگاه قرار داده شده و داده های حاصل در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (OD) قرائت گردید.

واکنش PCR: به منظور تکثیر DNA از واکنش زنجیره ای پلیمرز طبق روش ویلیامز و همکاران (Williams et al. 1990) در حجم محلول ۲۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA الگو (۱۰ نانوگرم)، ۲/۵ میکرولیتر آغازگر (۱۰ میکرومولار)، ۶/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و ۱۰ میکرولیتر مستر میکس ۲X (تهیه شده از شرکت سینا کلون) استفاده گردید. بر اساس نتایج PCR گرادینت، دمای اتصال مناسب برای آغازگرهای ترکیبی به دست آمد.

مخلوط مواد برای هر نمونه در میکروتیوب های جداگانه ریخته و در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. برنامه PCR شامل واسرشته سازی اولیه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد، در ادامه ۴۰ چرخه به صورت ۳۰ ثانیه واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد، ۲۰ ثانیه در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر (جدول ۲)، ۲ دقیقه مرحله توسعه ای رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد، و در آخر توسعه پایانی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد بود.

الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل: جهت تفکیک و مشاهده قطعات تکثیر شده DNA از ژل آگارز با غلظت ۱/۲ درصد استفاده گردید. مقدار هشت میکرولیتر DNA در چاهک های مجزا بارگذاری و الکتروفورز با ولتاژ ۱۳۰ به مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه انجام شد. رویت نوارها پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به کمک اشعه UV توسط دستگاه تصویربرداری از ژل انجام شد.

تجزیه های آماری: پس از انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز، امتیازدهی به صورت حضور و عدم حضور باندها (عدد یک و صفر) انجام شد. ماتریس تشابه جاکارد برای محاسبه تشابه ژنتیکی

نوار بیشترین تعداد نوار را تولید کرد. میزان چندشکلی از ۶۹/۲۳٪ (آغازگر IRAP979+P6) تا ۱۰۰٪ برای آغازگرهای IRAP979+P4، IRAP1+P4 و IRAP979+P8 متغیر بود. میزان شاخص PIC به عوامل مختلفی مانند تعداد آلل در هر جایگاه، فراوانی آلل های محتوی T و G در نواحی تکرار شده و تعداد ژنوتیپ وابسته می باشد (Roder *et al.* 1998). بالاترین میزان محتوای اطلاعاتی چندشکل (PIC) مربوط به آغازگر IRAP978+P13 به میزان ۰/۴۱ و آغازگرهای IRAP979+P4 و IRAP1+P7 به میزان ۰/۳۸ بود که نشان دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز لاین های مورد مطالعه و سودمندی آنها در مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی کاملینا می باشد.

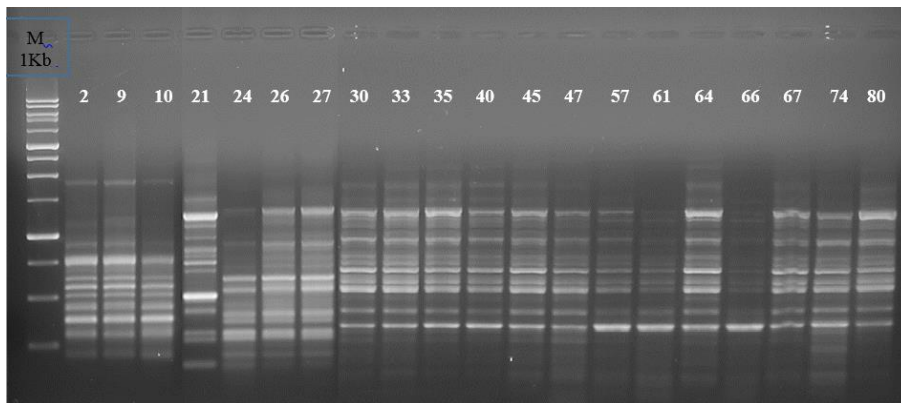
۵) قدرت تفکیک (Resolving Power): قدرت تفکیک هر یک از آغازگر از رابطه $RP = \sum IB$ محاسبه گردید (Altintas *et al.* 2008).

$$IB = 1 - [2 \times (0.5 - P_i)]$$

$$P_i = \frac{\text{تعداد افرادی که دارای نوار هستند}}{\text{کل افراد}}$$

نتایج و بحث

از مجموع ۱۱ آغازگر ترکیبی REMAP مورد استفاده، هشت آغازگر نوارهای واضح و قابل امتیازدهی ایجاد نمودند (شکل ۱). آغازگرها در مجموع ۷۴ قطعه تولید کردند که ۵۹ قطعه چندشکل بود (۷۹/۷۲٪) (جدول ۴). آغازگرهای IRAP1+P6 و IRAP1+P8 کمترین تعداد نوار (۴ نوار) و آغازگر IRAP979+P4 با تولید ۱۵



شکل ۱- الگوی نواری آغازگر IRAP979+P6 در لاین های هاپلوئید مضاعف شده کاملینا M: سایز مارکر 1Kb
Fig 1. IRAP979+P6 primer banding pattern in doubled haploid lines of Camelina M: Size marker 1Kb

جدول ۴- نتایج شاخص های محاسبه شده برای آغازگرهای REMAP در لاین های هاپلوئید مضاعف شده کاملینا

Table 4. Results of calculated indices for REMAP primers in doubled haploid lines of Camelina

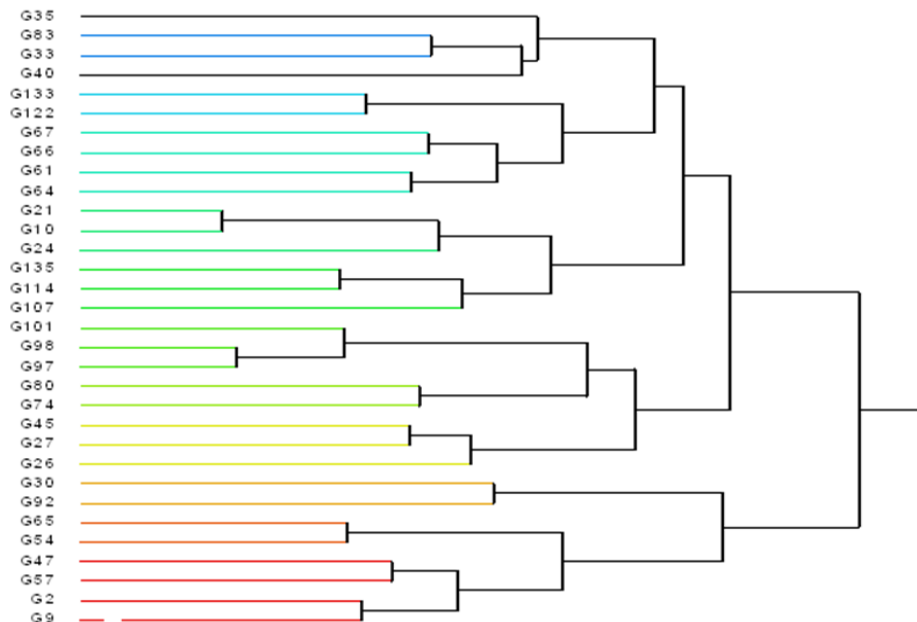
Row	Marker name	Number of total bands	Number of polymorphic bands	Polymorphism percent	Polymorphic Information Content (PIC)	Resolving Power (RP)	Effective Multiplex Ratio (EMR)	Marker index (MI)
1	IRAP1+P6	4	0	0	0	0	0	0
2	IRAP1+P8	4	0	0	0	0	0	0
3	IRAP1+P7	5	3	60	0.38	1.75	1.8	0.69
4	IRAP979+P6	13	9	69.23	0.19	2.687	6.24	1.18
5	IRAP979+P8	10	10	100	0.33	4.69	10	3.3
6	IRAP1+P4	11	11	100	0.26	4.06	11	2.86
7	IRAP978+P13	12	11	91.67	0.41	7.31	10.08	4.13
8	IRAP979+P4	15	15	100	0.38	8.625	15	5.7
Total	-	74	59	-	-	-	-	-
Average	-	9.25	7/37	65.11	0.24	3.13	6.765	8.98

جاکارد محاسبه شد. بر اساس نتایج حاصل، بیشترین شباهت ژنتیکی مربوط به لاین های ۲۱ و ۱۰ به میزان ۰/۸۵ و کمترین شباهت ژنتیکی مربوط به لاین های ۲۶ و ۹۲ به میزان ۰/۱۳ بود. لاین های ۲۱ و ۱۰ علی رغم شباهت ژنتیکی بالا، والدین یکسان نداشتند. تجزیه خوشه ای بر اساس ماتریس تشابه جاکارد انجام شد. پس از بررسی دندروگرام های حاصل از الگوریتم های مختلف، روش Complete به دلیل عدم وجود اثر زنجیره ای Chaining effect (که سبب ایجاد اربیبی در نتایج گروه بندی می شود) و داده های حاصل از ضریب تشابه جاکارد جهت ترسیم دندروگرام مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس شاخص F کاذب، ۳۲ لاین مورد مطالعه در شش گروه قرار گرفتند (شکل ۲). گروه اول شامل لاین های ۶۰، ۳۳، ۸۳ و ۳۵، گروه دوم شامل لاین های ۱۳۳، ۱۲۲، ۶۷، ۶۱ و ۶۱ (لاین های ۱۳۳ و ۶۱ والدین یکسان، لاین های ۱۲۲ و ۶۴ والدین یکسان)، گروه سوم شامل لاین های ۲۱، ۲۱، ۱۰، ۲۴، ۱۳۵، ۱۱۴ و ۱۰۷ (لاین های ۱۳۵ و ۱۱۴ والدین یکسان)، گروه چهارم شامل لاین های ۱۰۱، ۹۸، ۹۷، ۸۰، ۷۴، ۴۵، ۲۷ و ۲۶ (لاین های ۱۰۱ و ۸۰ والدین یکسان)، گروه پنجم شامل لاین های ۳۰ و ۹۲ و گروه ششم شامل لاین های ۶۵، ۵۴، ۴۷، ۵۷، ۲ و ۹ بود.

در پژوهشی با استفاده از ۲۳ آغازگر REMAP، تنوع ژنتیکی در ۳۶ ژنوتیپ کلزا مورد بررسی قرار گرفت که ۱۸ آغازگر، نوار قابل امتیازدهی و واضح تولید کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگر REMAP به طور مؤثری می تواند برای مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های کلزا و تمایز ژنوتیپ های کلزا مورد استفاده قرار گیرد (Doosti et al. 2004). در مطالعه ای دیگر جهت ارزیابی کارایی نشانگرهای رتروترانسپوزونی REMAP و IRAP در بررسی تنوع مولکولی ۴۵ لاین هاپلوئید مضاعف گیاه کاملینا، سه رقم کلزا و یک ژنوتیپ آراییدوبسیس، از ۱۴ آغازگر منفرد و ترکیبی استفاده شد. هشت آغازگر IRAP در مجموع ۱۰۳ قطعه تولید نمودند که ۹۵ عدد از آنها چندشکل بودند (۹۲/۲۳٪)، در حالی که شش آغازگر ترکیبی REMAP، در کل ۵۴ قطعه تولید کرده، که ۴۹ قطعه از آنها چندشکل بودند (درصد چندشکلی ۹۰/۷۰٪) (Seifi, 2021).

بررسی تشابه ژنتیکی با استفاده از ضریب جاکارد و تجزیه خوشه ای

ماتریس تشابه بین لاین های هاپلوئید مضاعف شده مورد بررسی با استفاده از داده های نشانگر REMAP بر اساس ضریب تشابه



شکل ۲- دندروگرام حاصل از نشانگر REMAP بر اساس ماتریس تشابه جاکارد و به روش Complete در لاین های مورد بررسی هاپلوئید مضاعف شده کاملینا

Fig 2. REMAP dendrogram based on Jaccard similarity matrix and by Complete method in doubled haploid lines of Camelina

جدول ۵- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه های اصلی در لاین های مورد بررسی هاپلوئید مضاعف شده کاملینا بر اساس نشانگرهای REMAP

Table 5. Results of principal component analysis in doubled haploid lines of Camelina based on REMAP markers

Component	Eigenvalue	Percent	Cumulative
1	1.94	11.92	11.92
2	1.56	9.59	21.52
3	1.31	8.07	29.60
4	1.23	7.58	37.18
5	1.02	6.27	43.46
6	0.81	4.98	48.45
7	0.70	4.34	52.79
8	0.66	4.11	56.91
9	0.62	3.81	60.73
10	0.61	3.75	64.48
11	0.54	3.31	67.80
12	0.51	3.18	70.98
13	0.48	2.99	73.97
14	0.42	2.62	76.60
15	0.40	2.51	79.11
16	0.35	2.20	81.32
17	0.32	2.01	83.34
18	0.31	1.92	85.26
19	0.29	1.83	87.10
20	0.25	1.57	88.68

اساس ماتریس تشابه جاکارد مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر ویژه ۲۰ مؤلفه اصلی اولیه، میزان تغییرات توجیه شده و درصد تجمعی تغییرات توجیه شده توسط هر یک از این مؤلفه ها جدول ۵ نشان داده شده است. اولین مؤلفه ۹۱/۹۲٪ از تغییرات کل و مؤلفه دوم به میزان ۹/۵۹٪ و مؤلفه تغییرات را تبیین کرد (در مجموع ۲۱/۵۱٪). در داده های مولکولی دو یا سه مؤلفه اول بهتر است که حدود ۲۹-۱۹ درصد از تغییرات مربوط به نشانگرها را توجیه کنند که از نظر ژنتیکی نشان دهنده نمونه برداری مطلوب نشانگرها از کل ژنوم است. به عبارت دیگر، زمانی که تعداد صفات یا نوارها به تعداد کمی مؤلفه کاهش یابد، آغازگرهای مورد استفاده به طور صحیح انتخاب نشده اند و تعداد محدودی از کروموزومها را تحت پوشش قرار می دهند، در نتیجه نمی توانند افراد را از هم دیگر به خوبی جدا کنند. اما اگر تعداد مؤلفه ها زیاد باشد، آغازگرهای مورد استفاده، کروموزومهای بیش تری را تحت پوشش قرار می دهند و نشانگر به خوبی تنوع ژنتیکی افراد را تعیین می کند (Siahsar et al. 2010).

بنابراین در پژوهش حاضر تعداد زیاد مؤلفه ها نشان دهنده ی توزیع مناسب نشانگرها در ژنوم می باشد. این بهترین حالت در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده های مولکولی است، به دلیل اینکه نشانگرهای مولکولی از کروموزومهای مختلف انتخاب شده و

اجرای هر برنامه اصلاحی متکی به وجود تنوع بوده، انتخاب والدین مناسب در برنامه های تلاقی برای تولید هیبریدهایی با حداکثر هتروزیس امری ضروری می باشد. بنابراین باید والدین دور از هم را که از گروه های مختلف تجزیه خوشه ای هستند، انتخاب کرد. با افزایش فاصله ژنتیکی بین والدین، هتروزیس بیش تری به دست می آید، هم چنین تنوع زیادی در نتاج حاصل از تلاقی در نسل های در حال تفرق ایجاد می شود که در برنامه های گزینش برای صفات مطلوب مورد استفاده قرار می گیرد (Moghadam et al. 1994). تلاقی بین لاین هایی که کم ترین تشابه را دارند، می تواند در برنامه های دورگ گیری جهت افزایش تنوع طبیعی کاملینا استفاده شوند. به عنوان مثال لاین های گروه اول فاصله ژنتیکی زیادی با لاین های گروه ششم دارند که تلاقی این لاین ها می تواند منجر به هتروزیس قوی گردد. مثلاً لاین ۴۰ در گروه اول دارای میزان پایین روغن و لاین ۶۵ در گروه ششم دارای میزان بالای روغن می باشد که این دو لاین علاوه بر فاصله ژنتیکی زیاد از نظر محتوای روغن نیز با هم دیگر اختلاف زیادی داشته که تلاقی این دو لاین می تواند منجر به هتروزیس قوی از نظر روغن گردد. تجزیه به مؤلفه های اصلی به عنوان مکمل تجزیه خوشه ای، منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده های مولکولی خواهد شد (Messmer et al. 1992). پراکندگی لاین ها به واسطه ی تجزیه به مؤلفه های اصلی بر

با IRAP979+P8 و IRAP979+P4, IRAP978+P13, IRAP1+P4 داشتن مقادیر بالای تعداد نوار چندشکل، شاخص نشانگری، نسبت چندشکلی مؤثر و قدرت تفکیک می‌تواند به‌عنوان آغازگرهای آگاهی‌بخش و کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی کاملینا در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرند. در تحقیق حاضر تعداد زیادی از مولفه‌ها توجه کننده درصد کمی از تغییرات کل بودند، بنابراین نشانگرها به‌خوبی در سطح ژنوم پراکنده شده بودند. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مطالعات قبلی به‌نظر می‌رسد نشانگرهای REMAP جهت بررسی تنوع ژنتیکی کاملینا، نشانگرهایی مناسب می‌باشند و قابلیت کاربرد در تحقیقات بعدی را دارند.

توزیع مناسب و یکنواخت در ژنوم دارد (Hajmansoor *et al.* 2010).

نتیجه‌گیری کلی

باتوجه به شرایط اقلیمی، روند افزایشی خشک‌سالی، کم‌بود منابع آب‌های زیرزمینی و نیاز مبرم کشور به دانه‌های روغنی، معرفی گیاهان دانه روغنی سازگار با این شرایط از مهم‌ترین اقدامات در جهت تامین احتیاجات کشور می‌باشد. به‌نظر گیاه کاملینا یک گیاه مناسب است. اما پایین بودن سطح تنوع ژنتیکی آن از جمله مشکلات مربوط به توسعه کاملینا می‌باشد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده کاملینا از آغازگرهای رتروترانسپوزونی REMAP استفاده گردید. آغازگرهای

منابع

- Aalami A, Karami N. 2015.** The study of genetic diversity in Iranian rice cultivar using ISSR, IRAP and REMAP marker. *Journal of crop breeding* 20: 41-51. (In Farsi with English abstract).
- Altintas S, Toklu F, Kafkas S, Kilian B, Brandolini A, Ozkan H. 2008.** Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL Markers *Plant Breeding* 127: 9-14.
- Anderson JA, Church JE, Autrique SD, Thanksley S, Sorrells ME. 1993.** Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 86-181.
- Bansal S, Durrett TP. 2016.** Camelina sativa. An ideal platform for the metabolic engineering and field production of industrial lipids. *Biochimie* 120: 9-16.
- Berti M, Gesch R, Eynck C, Anderson J, Cermak S. 2016.** Camelina uses, genetics, genomics, production, and management. *Industrial crops and products* 94: 690-710.
- Betancor MB, MacEwan A, Sprague M, Gong X, Montero D, Han L, Napier JA, Norambuena F, Izquierdo M, Tocher DR. 2021.** Oil from transgenic Camelina sativa as a source of EPA and DHA in feed for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 530: 735-759.
- Brown TD, Hori TS, Xue X, Ye CL, Anderson DM, Rise M.R. 2016.** Functional Genomic Analysis of the Impact of Camelina (*Camelina sativa*) Meal on Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Distal Intestine Gene Expression and Physiology. *Marine Biotechnology* 18: 418-435.
- Bujnovsky R, Holickova M, Ondrejickova P. 2020.** Spring Camelina sativa—Perspective cultivation as biofuel feedstock in Slovakia. *Industrial Crops and Products*. 154: 112634.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983.** A plant DNA mini preparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Doosti M, Mahjoob B, Hashemi SHR, Vafadar F. 2004.** Development of REMAP markers in Brassica sp. For analysis of genetic diversity. The 1st international and 13th Iranian genetics congress. Iran, Tehran, Shahid Beheshti university. (In Farsi with English abstract).
- Fallah F. 2022.** Development and evaluation of Camelina doubled haploid lines. *Plant breeding PhD thesis, Campus of agriculture and natural resources, Razi university, 238 pp.*
- FAOSTAT. 2015.** Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. FAO of the United Nations. Available at <http://faostat3.fao.org>.
- Faustino AR., Osorio NM, Tecelão C, Canet A, Valero F, Ferreira-Dias S. 2016.** Camelina oil as a source of polyunsaturated fatty acids for the production of human milk fat substitutes catalyzed by a heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 118: 532- 544.
- Hajmansoor Sh, Bihamta MR, Nabipour A, Mohamadi SM, Pirseyedi SM, Nikkhah HR. 2010.** Genetic diversity in barely genotypes: Ii. Microsatellite marker and morphological traits. *Seed and Plant Improvement Journal*. 26: 151-171. (In Farsi with English abstract)
- Hassani Tassyeh SF, Samizadeh Lahiji H, Shoaie Dailami M. 2005.** Assessment of genetic diversity

- among and within different types of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) using IRAP and REMAP markers. *Journal of Crop Breeding* 7: 1-9.
- Kalendar R, Flavell AJ, Ellis THN, Sjakste T, Moisy C, Schulman AH. 2011.** Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity* 106: 520-530.
- Kalendar R, Schulman AH. 2006.** IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols* 1: 2478- 2484.
- Kamal-Eldin A, Andersson R. 1997.** A Multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* 74: 375-380.
- Kumar J, Gupta PK. 2008.** Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. *Plant Biotechnology Reports* 2: 93-112.
- Lawrence RD, Anderson JL. 2018.** Ruminant degradation and intestinal digestibility of *Camelina* meal and *Carinata* meal compared with other protein sources. *Animal Science Journal* 34: 10-18.
- Messmer, M.M., Melchinger AA, Boppenmair J, Hermann RG, Brunklaus-Jung E. 1992.** RFLP analysis of early-maturing European maize germplasm. Genetic diversity among flint and dent inbreds. *Theoretical and Applied Genetic* 83: 1003-1012.
- Moghaddam M, Mohammadi A, Aghaie M, 1994.** Introduction to multivariate statistical method. Pishtaz Elm Press, 1st Edn. Tabriz. (In Persian).
- Mohammadi SA, Prasanna BM. 2003.** Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43:1235-1248.
- Moosavifar BE, Behdani MA, Jami Alahmadi M, Hosaini Bojd MS. 2010.** Effect of deficit irrigation on growth and yield of spring safflowers (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes in Birjand. *Agroecology* 4: 627-639. (In Farsi with English abstract).
- Mousapour Gorji A, Poczai P, Polgar Z, Taller J. 2011.** Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCOT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research* 88:226-237.
- Powell W, Morgante M, Ander C, Hanafey M, VogelJ, Tingy S, Rafalaski A. 1996.** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225-38.
- Putnam DH, Budin JT, Field LA, Breene WM. 1993.** *Camelina*: A promising low-input oilseed. In *New Crops*. Wiley: New York, USA 314-322.
- Queen R.B, Gribbon C, James P, Jack A. 2004.** Retrotransposons-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 271: 91-97.
- Raziei Z, Kahrizi D, Rostami-Ahmadvandi H. 2018.** Effects of climate on fatty acid profile in *Camelina sativa*. *Cellular and Molecular Biology* 64: 91- 96.
- Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW. 1998.** A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
- Russell JR, Fuller JD, Macaulay M, Hatz BG, Jahoor A, Powell W, Waugh R. 1997.** Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPD. *Theoretical and Applied Genetics* 95:714- 722.
- Shiri S. 2018.** Study on morphological traits, fatty acids profile and molecular markers in *Camelina sativa* doubled haploid lines. Agriculture biotechnology M.Sc. thesis. Campus of agriculture and natural resources, Razi university, 97 pp. (In Farsi with English abstract).
- Siahsar BA, Allahdoo M, Shahsavand Hassani H. 2010.** Evaluation of genetic diversity of Triticum, triticale and wheat lines through RAPD and ISJ markers. *Iranian journal of field crop science* 41:555-568. (In Farsi with English abstract).
- Toncea I, Necseriu D, Prisecaru T, Balint LN, Ghilvacs MI, Popa M. 2010.** The seed's and oil composition of *Camelia* – first Romanian cultivar of *Camelina sativa*, L. Crantz). *Romanian Biotechnological Letters* 18:8594-8602.
- USDA NASS. 2015.** National Agricultural Statistics Service. USDA. Available at <http://www.nass.usda.gov/>.
- Vollmann J, Moritz T, Kargl C, Baumgartner S, Wagentristsl, H. 2007.** Agronomic evaluation of *Camelina* genotypes selected for seed quality characteristics. *Industrial Crops and Products* 26:270-277.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* 18: 6531-6535.
- Zhang C, Garrison T, Madbouly S, Kessler M. 2017.** Recent advances in plant oil-based polymers and their composites. *Progress in Polymer Science* 71:91-143.