مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۱، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱
صفحه ۲۱۰-۲۰۱

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1401.11.2.1.0

DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.1.0

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 2
2023

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

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]، لیلا زارعی[۲]، امین ابراهیمی[۳]

Hamzeh Minaei Chenar*[1], Sajad Rashidi Monfared[1], Dnial Kahrizi[1], Leila Zarei[2], Amin Ebrahimi[3]

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 واصلاح 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 : *Corresponding Author, Email
rashidims@modares.ac.ir

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

چکیده

ایران کشوری نیمه‌خشک و خشک می‌باشد و بیش از ۷۰ درصد از زمین‌های کشاورزی آن دیم هستند. تا به‌حال گیاهی دانه روغنی مناسب با مناطق مختلف کشور معرفی نشده است. کاملینا (*Camelina sativa* L.)، گیاهی دانه روغنی- دارویی از خانواده براسیکاسه، گیاهی کم‌توقع، با نیاز آبی-کودی پایین، مقاوم به انواع بیماری‌ها و پاتوژن‌های معمول و مناسب جهت کشت در تناوب غلات است. در این مطالعه تنوع ژنتیکی در ۳۲ لاین هاپلوئید مضاعف‌شده 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 (۷۹/۷۲٪) 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. خوشه‌بندی بر اساس ضریب تشابه جاکارد، لاین‌ها را در شش گروه اصلی قرار داد. بر طبق تجزیه به مولفه‌های اصلی، دو مولفه اصلی اول در مجموع ۲۱/۵۱ درصد تغییرات را توجیه کردند که بیانگر پوشش مناسب نشانگرها در سطح ژنوم بود. بنابراین به‌نظر می‌رسد که نشانگر REMAP، با چندشکلی و توزیع بالا در سطح ژنوم کاملینا، یک نشانگر مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی در این گیاه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

آغازگر،
تنوع ژنتیکی،
کاملینا،
نشانگر REMAP،
PCR

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.18.7]

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

دانه‌های روغنی نقش مهمی در صنعت غذا داشته و به‌عنوان منبع تجدیدپذیر برای تولید بیودیزل و فراورده‌های گوناگون شیمیایی درنظر گرفته می‌شوند (Zhang *et al*. 2017; Kumar *et al*. 2017; Bujnovsky *et al*. 2020). در حال حاضر دومین ذخایر غذایی جهان پس از غلات، دانه‌های روغنی می‌باشند (USDA, 2015; Food and Agriculture Organization, 2015). کشت دانه‌های روغنی از مهم‌ترین مولفه‌های امنیت و ایمنی غذایی محسوب می‌شود (Raziei *et al*. 2018). کامِلینا (*Camelina Sativa* L.) یک گیاه دانه روغنی متعلق به خانواده براسیکاسه است که به‌طور فزاینده‌ای به‌خاطر ویژگی‌های خوب زراعی و کاربردهای گوناگون در بهداشت و صنعت مورد توجه قرار گرفته است (Berti *et al*. 2016). ویژگی‌های مفید زراعی و اقتصادی این گیاه شامل عملکرد رضایت‌بخش تحت شرایط خشکی، نیاز پایین به کود و آفت‌کش-ها، سازگاری با امکانات کشاورزی موجود و دوره رشدی کوتاه می‌باشد (Putnam *et al*. 1993; Vollman *et al*. 2007; Bansal *et al*. 2016; Brown *et al*. 2016). بذور کاملینا حاوی تقریبا ۳۵٪ روغن، ۲۰ ٪ پروتئین، ۳۵٪ کربوهیدرات، ۵٪ رطوبت و ۵٪ تفاله تحت شرایط رشدی مختلف می‌باشد (Toncea *et al*. 2013; Li *et al*. 2014). با توجه به مقدار بالای اسیدهای چرب اشباع نشده چندگانه، همراه با اسید چرب امگا-۳ به‌عنوان ترکیب اصلی، این روغن می‌تواند به‌عنوان یک محصول غذایی مورد استفاده قرار گیرد (Faustino *et al*. 2016). هم‌چنین روغن و کنجاله کاملینا منبع مناسبی از پروتئین جهت تغذیه دام، طیور و آبزیان می‌باشند (Lawrence and Anderson, 2018; Betancor *et al*. 2021). کمبود دانه‌های روغنی و حجم بالای واردات روغن و محدودیت زیاد منابع آبی در کشور جهت تولید دانه‌های روغنی، تاکید بر شناسایی گونه‌ها و واریته‌های سازگار با شرایط خشک‌سالی را آشکار می‌سازد (Moosavifar *et al*. 2010). بنابراین به‌نظر می‌رسد کاملینا یک گیاه مناسب جهت کشت در ایران به‌منظور 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. به‌طوری که فلاح و همکاران توانستند ۱۳۶ لاین هاپلوئید مضاعف‌شده از این گیاه را تولید کنند (Fallah, 2022). اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌ها، برای انتخاب والدین، جهت انجام تلاقی‌های کارا و اتخاذ روش اصلاحی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.18.7]

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 ریزماهواره و رتروترانسپوزون REMAP (Retrotransposon –microsatllite 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 به‌نظر 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 می‌توانند برای مطالعات ژنتیکی و اصلاحی برنج 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 کاملا 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) به‌منظور 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). به‌منظور تعیین دمای اتصال بهینه آغازگرها، از PCR با شیب دمایی (گرادیانت) استفاده گردید.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.18.7]

جدول ۱- شماره لاین‌های مورد بررسی، والدین و منشا آن‌ها

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

	Parental (♂)		Maternal (♀)	
Line number	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- لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده 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 لاین‌های هاپلویید مضاعف‌شده 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	$(AG)_8GCC$	64
6	P7	$(AG)_8ACC$	56
7	P8	$(GA)_8ACC$	59
8	P9	(GA)8ATC	52
9	mm15	A(CA)7YA	53
10	P13	$(CA)_8G$	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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.18.7]

تعیین کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA: تعیین کیفیت نمونه‌های 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 نمونه‌های DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. مقداری از هر نمونه DNA بر روی دستگاه قرار داده شده و داده‌های حاصل در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (OD) قرائت گردید.

واکنش PCR: به‌منظور تکثیر DNA از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبق روش ویلیامز و همکاران (Wiliams *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 2X (تهیه شده از شرکت سینا کلون) استفاده گردید. بر اساس نتایج PCR گرادیانت، دمای اتصال مناسب برای آغازگرهای ترکیبی به‌دست آمد.

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

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

تجزیه‌های آماری: پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، امتیازدهی به صورت حضور و عدم حضور باندها (عدد یک و صفر) انجام شد. ماتریس تشابه جاکارد برای محاسبه تشابه ژنتیکی لاین‌ها توسط نرم‌افزار NTSYSpc 2.02e محاسبه گردید. جهت گروه‌بندی لاین‌ها، ترسیم دندروگرام بر اساس ماتریس تشابه جاکارد انجام گرفت و تعیین تعداد خوشه‌های مطلوب برای گروه-بندی از طریق محاسبه شاخص F کاذب توسط نرم‌افزار SYSTAT انجام شد. ارتباط صفات بیوشیمیایی در ۳۲ لاین منتخب هاپلوئید مضاعف‌شده کاملینا با نشانگر REMAP، با استفاده از تجزیه رگرسیون گام‌به‌گام با هدف شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه، با درنظرگرفتن مکان‌های نشانگری به‌عنوان متغییرهای مستقل و صفات مورد مطالعه به‌عنوان متغیرهای وابسته با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS statistics 23، مورد بررسی قرار گرفت. شاخص‌های نشانگری برای هر آغازگر با استفاده از برنامه Excel بر اساس فرمول‌های 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 می‌باشد (Mohammadi and Prasanna, 2003).

$$\text{درصد چند شکلی} = \frac{\text{تعداد قطعات چندشکل}}{\text{تعداد کل قطعات}} \times ۱۰۰$$

۲) شاخص محتوای چندشکلی (Polymorphic Information Content): این شاخص از رابطه $PIC= 1- p^2-q^2$ 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 موثر (EMR Effective Multiplex Ratio): نسبت چندشکلی مؤثر از طریق رابطه زیر برای هر آغازگر محاسبه شد (Kumar *et al.* 2008).

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

۴) این شاخص حاصل‌ضرب تعداد قطعات چندشکل در شاخص محتوای چندشکلی می‌باشد (Powell *et al.* 1996; Anderson *et al.* 1993).

$$MI=PIC\times EMR$$

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.18.7]

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

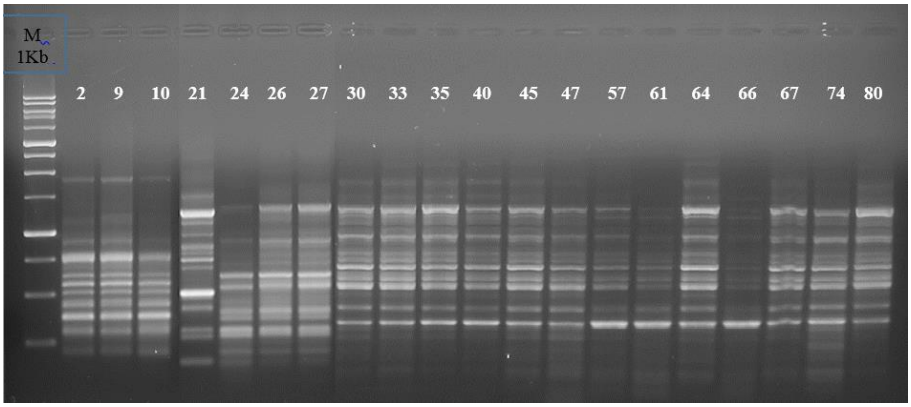
$$IB=1-[2\times(0.5-P_i)]$$

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

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 ۷٤ قطعه تولید کردند که ۵۹ قطعه چندشکل بود (۷۹/۷۲٪) (جدول ٤). آغازگرهای IRAP1+P6 و IRAP1+P8 کم‌ترین تعداد نوار (٤ نوار) و آغازگر IRAP979+P4 با تولید ۱۵ نوار بیش‌ترین تعداد نوار را تولید کرد. میزان چندشکلی از ٦۹/۲۳٪ (آغازگر IRAP979+P6) تا ۱۰۰٪ برای آغازگرهای IRAP979+P4، IRAP1+P4 و IRAP979+P8 متغییر بود. میزان شاخص PIC به عوامل مختلفی مانند تعداد آلل در هر جایگاه، فراوانی آلل‌های محتوی T و G در نواحی تکرارشده و تعداد ژنوتیپ وابسته می‌باشد (Roder *et al.* 1998). بالاترین میزان محتوای اطلاعاتی چندشکل (PIC) مربوط به آغازگر IRAP978+P13 به میزان ۰/٤۱ و آغازگرهای IRAP979+P4 و IRAP1+P7 به میزان ۰/۳۸ بود که نشان دهنده‌ی کارایی بالای این آغازگرها در تمایز لاین‌های مورد مطالعه و سودمندی آن‌ها در مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی کاملینا می‌باشد.



شکل ۱- الگوی نواربندی آغازگر IRAP979+P6 در لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده کاملینا M : سایز مارکر 1Kb

Fig 1. IRAP979+P6 primer banding pattern in doubled haploid lines of Camelina M: Size marker 1Kb

جدول ٤- نتایج شاخص‌های محاسبه شده برای آغازگرهای REMAP در لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده 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

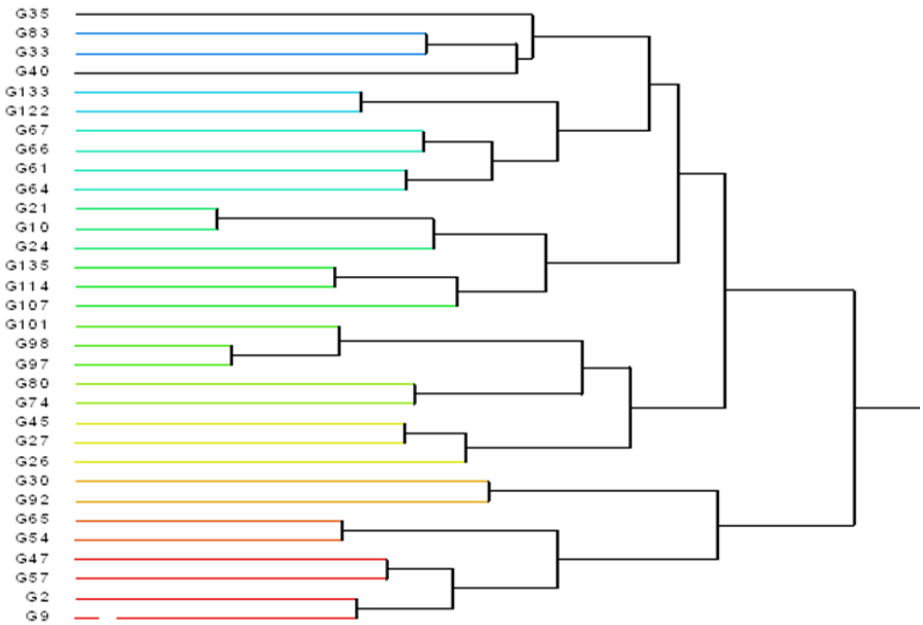
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.18.7]

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 به‌طور مؤثری می‌تواند برای مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های کلزا و تمایز ژنوتیپ‌های کلزا مورد استفاده قرار گیرد (Doosti *et al.* 2004). در مطالعه‌ای دیگر جهت ارزیابی کارایی نشانگرهای رتروترانسپوزونی REMAP و IRAP در بررسی تنوع مولکولی ٤٥ لاین هاپلوئید مضاعف گیاه کاملینا، سه رقم کلزا و یک ژنوتیپ آرابیدوبسیس، از ١٤ 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 حالی‌که شش آغازگر ترکیبی REMAP، در کل ٥٤ قطعه تولید کرده، که ٤٩ قطعه از آن‌ها چندشکل بودند (درصد چندشکلی ٪۹۰/۷۰) (Seifi, 2021).

بررسی تشابه ژنتیکی با استفاده از ضریب جاکارد و تجزیه خوشه‌ای

ماتریس تشابه بین لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده مورد بررسی با استفاده از داده‌های نشانگر REMAP بر اساس ضریب تشابه جاکارد محاسبه شد. بر اساس نتایج حاصل، بیش‌ترین شباهت ژنتیکی مربوط به لاین‌های ۲۱ و ۱۰ به میزان ۰/۸۵ و کم‌ترین شباهت ژنتیکی مربوط به لاین‌های ٢٦ و ۹۲ به میزان ۰/۱۳ بود. لاین‌های ۲۱ و ۱۰ علی‌رغم شباهت ژنتیکی بالا، والدین یکسان نداشتند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ماتریس تشابه جاکارد انجام شد. پس از بررسی دندروگرام‌های حاصل از الگوریتم‌های مختلف، روش Complete به دلیل عدم وجود اثر زنجیره‌ای Chaining effect (که سبب ایجاد اریبی در نتایج گروه‌بندی می‌شود) و داده‌های 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 لاین‌های ٤٠، ۳۳، ۸۳ و ۳۵، گروه دوم شامل لاین‌های ۱۳۳، ۱۲۲، ٦٧، ٦٦، ٦١ و ٦٤ (لاین‌های ۱۳۳ و ٦١ والدین یکسان، لاین‌های ۱۲۲ و ٦٤ والدین یکسان)، گروه سوم شامل لاین‌های ۲۱، ۱۰، ٢٤، ۱۳۵، ١١٤ و ۱۰۷ (لاین‌های ۱۳۵ و ١١٤ والدین یکسان)، گروه چهارم شامل لاین‌های ۱۰۱، ۹۸، ۹۷، ۸۰، ۷٤، ٤٥، ۲۷ و ٢٦ (لاین‌های ۱۰۱ و ۸۰ والدین یکسان)، گروه پنجم شامل لاین‌های ۳۰ و ۹۲ و گروه ششم شامل لاین‌های ٦٥، ٥٤، ٤٧، ٥٧، ۲ و ۹ بود.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از نشانگر REMAP بر اساس ماتریس تشابه جاکارد و به‌روش Compelete در لاین‌های مورد بررسی هاپلوئید مضاعف‌شده کاملینا

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.18.7]

جدول ۵- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در لاین‌های مورد بررسی هاپلوئید مضاعف‌شده کاملینا بر اساس نشانگرهایREMAP

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

اجرای هر برنامه اصلاحی متکی به‌وجود تنوع بوده، انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های تلاقی برای تولید هیبریدهایی با حداکثر هتروزیس امری ضروری می‌باشد. بنابراین باید والدین دور از هم را که از گروه‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای هستند، انتخاب کرد. با افزایش فاصله ژنتیکی بین والدین، هتروزیس بیش‌تری به‌دست می‌آید، هم‌چنین تنوع زیادی در نتاج حاصل از تلاقی در نسل‌های در حال تفرق ایجاد می‌شود که در برنامه‌های گزینش برای صفات مطلوب مورد استفاده قرار می‌گیرد (Moghadam *et al.* 1994). تلاقی بین لاین‌هایی که کم‌ترین تشابه را دارند، می‌تواند در برنامه‌های دورگ‌گیری جهت افزایش تنوع طبیعی کاملینا استفاده شوند. به عنوان مثال لاین‌های گروه اول فاصله ژنتیکی زیادی با لاین‌های گروه ششم دارند که تلاقی این لاین‌ها می‌تواند منجر به هتروزیس قوی گردد. مثلا لاین ٤٠ در گروه اول دارای میزان پایین روغن و لاین ٦٥ در گروه ششم دارای میزان بالای روغن می‌باشد که این دو لاین علاوه بر فاصله ژنتیکی زیاد از نظر محتوای روغن نیز با هم‌دیگر اختلاف زیادی داشته که تلاقی این دو لاین می‌تواند منجر به هتروزیس قوی از نظر روغن گردد. تجزیه به مولفه‌های اصلی به‌عنوان مکمل تجزیه خوشه‌ای، منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی خواهد شد (Messmer *et al.* 1992). پراکندگی لاین‌ها به‌واسطه‌ی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر 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 مؤلفه‌ها جدول ۵ نشان داده شده است. اولین مؤلفه ٪۱۱/۹۲ از تغییرات کل و مؤلفه دوم به میزان ٪۹/۵۹ و مولفه تغییرات را تبیین کرد (در مجموع ٪۲۱/۵۱). در داده‌های مولکولی دو یا سه مؤلفهٔ اول بهتر است که حدود ۲۹-۱۹درصد از تغییرات مربوط به نشانگرها را توجیه کنند که از نظر ژنتیکی نشان‌دهندهٔ نمونه‌برداری مطلوب نشانگرها از کل ژنوم است. به عبارت دیگر، زمانی که تعداد صفات یا نوارها به تعداد کمی مؤلفه کاهش یابد، آغازگرهای مورد استفاده به‌طور صحیح انتخاب نشده‌اند و تعداد محدودی از کروموزوم‌ها را تحت پوشش قرار می‌دهند، در نتیجه نمی‌توانند افراد را از هم‌دیگر به‌خوبی جدا کنند. اما اگر تعداد مؤلفه‌ها زیاد باشد، آغازگرهای مورد استفاده، کروموزوم‌های بیش‌تری را تحت پوشش قرار می‌دهند و نشانگر به‌خوبی تنوع ژنتیکی افراد را تعیین می‌کند (Siahsar *et al.* 2010).

بنابراین در پژوهش حاضر تعداد زیاد مولفه‌ها نشان دهنده‌ی توزیع مناسب نشانگرها در ژنوم می‌باشد. این بهترین حالت در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی است، به‌دلیل اینکه نشانگرهای مولکولی از کروموزوم‌های مختلف انتخاب شده و

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.18.7]

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 IRAP1+P4، IRAP978+P13، IRAP979+P4 و IRAP979+P8 با داشتن مقادیر بالای تعداد نوار چندشکل، شاخص نشانگری، نسبت چندشکلی مؤثر و قدرت تفکیک می‌توانند به‌عنوان آغازگرهای آگاهی‌بخش و کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی کاملینا در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرند. در تحقیق حاضر تعداد زیادی از مولفه‌ها توجیه 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.

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, Shoaei Dailami M. 2005. Assessment of genetic diversity

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.18.7]

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. Ruminal 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 inbreeds. 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 Tritipyrum, 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. The seed's and oil composition of Camelia – first Romanian cultivar of Camelina (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, Wagentristl, 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.18.7]