

Morphologic and biochemical evaluation of double haploid lines of the oil-medicinal plant *Camelina sativa* L. in Ahvaz condition

Elahe Mafakher¹, Payman Hassibi^{*2}, Danial Kahrizi³, Khosro Mehdi Khanlou⁴

1,2,4. Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, 3.

Department of Plant Production and Genetic, Razi university, Kermanshah

(Received: October 13, 2020 - Accepted: December 7, 2020)

ABSTRACT

Recently discovered properties of *Camelina* (*Camelina sativa* L.) from Brassicaceae family, including low-inputs requirement, fast growth, essential oil content with medicinal uses, significant content of linolenic acid, an unsaturated fatty acid, have been paid tremendous attention by both agronomic and industrial sectors. To achieve the highest possible level of the above-mentioned properties, it is necessary to find the superior lines. For this purpose, the morphological and biochemical characteristics of 26 double haploid lines were compared in a randomized complete block design with 3 replications in the 2018 cropping year at Shahid Chamran University of Ahvaz. The results of variance analysis showed that all measured characteristics were significantly different at 1% of probability level. The mean comparison results indicated that DH39 line had the highest height and average grain weight per plant and the highest plant dry weight, oil percentage and saturated fatty acids were observed in DH44 line. DH14 and DH46 lines had maximum total protein and unsaturated fatty acids, respectively. GC- mass analysis showed that DH22, DH39 and DH12 lines had the highest omega 3, 6, 9 fatty acids, respectively. Cluster analysis categorized the lines into 3 groups. Based on all results, a group containing DH07, DH14, DH21, DH32, DH39, DH41, DH44 and DH46 lines was chosen for further investigation.

Keywords: *Camelina*, fatty acids, line, oil, protein.

ارزیابی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی لاین‌های دابل هاپلوئید گیاه روغنی - داروئی کاملینا در شرایط اهواز

اله مفاخر^۱، پیمان حسیبی^{*۲}، دانیال کهریزی^۳، خسرو مهدیخانلو^۴

۱ و ۲ - به ترتیب دانشجوی، دانشیار و استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ۳ -

استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۱۷)

چکیده

ویژگی‌های اخیرا یافت شده کاملینا (*Camelina sativa* L.) از خانواده براسیکاسه، شامل کم نهاده خواه بودن، رشد سریع، داشتن روغن‌های ضروری برای استفاده دارویی و مقدار قابل توجه اسیدهای چرب غیراشباع لینولنیک اسید، مورد توجه فوق‌العاده بخش‌های زراعی و صنعتی قرار گرفته است. برای دستیابی به بالاترین سطح از خصوصیات گفته شده، لاین‌های برتر باید شناسایی شوند. به این منظور، خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی ۲۶ لاین دابل هاپلوئید، در یک طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۹۸-۱۳۹۷ در دانشگاه شهید چمران اهواز مقایسه شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که همه خصوصیات اندازه‌گیری شده در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار داشتند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین، بیشترین ارتفاع و متوسط وزن دانه در بوته در لاین DH44 به دست آمد و حداکثر پروتئین کل و اسیدهای چرب اشباع نشده به ترتیب در لاین‌های DH14 و DH46 مشاهده شد. تجزیه کروماتوگرافی گازی اسیدهای چرب نشان داد که بیشترین میزان امگا سه، شش و نه به ترتیب در لاین‌های DH12، DH22 و DH39 قرار داشت. تجزیه خوشه‌ای، لاین‌ها را به سه گروه طبقه‌بندی کرد. بر اساس نتایج تمامی آزمایشات انجام گرفته، گروهی شامل DH07، DH14، DH21، DH32، DH39، DH41، DH44 و DH46 برای تحقیقات بعدی انتخاب شدند.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای چرب، پروتئین، روغن، کاملینا، لاین.

مقدمه

غذا و تغذیه از مهم‌ترین پدیده‌های تاثیرگذار بر حیات موجودات زنده به‌شمار می‌روند و از بدو پیدایش و خلقت موجودات زنده با آن همراه بوده‌اند؛ بنابراین سابقه‌ای برابر با تاریخ تمدن بشر دارند (Piravi & Zayerzadeh, 2019). در میان محصولات زراعی، دانه‌های روغنی غنی از اسیدهای چرب، اهمیت خاصی دارند و در سراسر جهان نیاز به آن‌ها به‌طور پیوسته در حال توسعه است (Kahrizi *et al.*, 2017). اسیدهای چرب ضروری به اسیدهای چربی گفته می‌شود که در بدن انسان تولید نمی‌شوند و باید از طریق رژیم غذایی تامین شوند و شامل اسیدهای چرب گروه امگا سه و امگا شش است؛ در این بین، کمبود اسیدهای چرب ضروری به‌خصوص امگا سه بسیار رایج است. اسیدهای چرب امگا سه از اسید لینولنیک، امگا شش از اسید لینولنیک و امگا نه از اسید اولئیک مشتق می‌شوند. حداقل میزان صحیح اسید لینولنیک و اسید لینولنیک از طریق رژیم غذایی برای هر فرد بالغ به‌طور روزانه، ۱/۵ گرم از هر کدام است و نسبت صحیح مصرف اسیدهای چرب امگا شش به امگا سه باید بین یک به یک تا چهار به یک باشد، اما این نسبت در رژیم غذایی بسیاری از افراد، بین یک به ده تا یک به بیست و پنج است (Simopoulos & De Meester, 2009). تنها یک قاشق غذاخوری از روغن کتان یا روغن بزرک، همچنین روغن کاملینا و یا مقدار بیشتری از سایر غذاهای حاوی لینولنیک این مقدار را برای بدن فراهم می‌سازد (Eidhin & O'Beirne, 2010). با توجه به ضرورت اسیدهای چرب غیراشباع امگا شش و امگا سه در رژیم غذایی و محدودیت منابع موجود به نسبت افزایش جمعیت، محققین در پی یافتن منابع دیگری در این زمینه می‌باشند (Shaghuli *et al.*, 2017).

گیاه دارویی- روغنی کاملینا (*Camelina sativa L.*) از خانواده Brassicaceae و بومی اروپای شمالی و آسیای مرکزی است که به نام‌های کتان کاذب، کتان وحشی و کنجد آلمانی نیز شناخته می‌شود و به‌عنوان گیاهی کم توقع است که نسبت به سایر دانه‌های روغنی، به

آب، کود و آفت کش‌های کمتری نیاز دارد؛ به علاوه تحمل بالایی به علف‌های هرز دارد و می‌تواند در زمین‌های حاشیه‌ای رشد کند. کاملینا به دلایل ویژگی‌های زراعی منحصر به فردش از جمله دوره رشد کوتاه (۹۰ الی ۱۱۰ روز)، تحمل به شوری، سرما، خشکی و شرایط محیطی نیمه خشک و عملکرد دانه بالا و استفاده جهت تولید سوخت جایگزین، به‌خصوص در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Mohottalalage, 2016; Patade *et al.*, 2016; Mohammadi-nejad *et al.*, 2018; Ghamarnia *et al.*, 2020). این گیاه، منبع غنی از روغن و اسیدهای چرب امگا- سه می‌باشد و جزو روغن‌های فراسودمند به حساب می‌آید که علاوه بر سالم و ایمن بودن، سودمند است و از بروز بیماری‌ها جلوگیری می‌نماید (Piravi & Zayerzadeh, 2019). تحقیقات متعددی، ارزش تغذیه‌ای بالای روغن کاملینا را تایید نموده‌اند و اظهار داشته‌اند که می‌تواند جایگزین مناسبی برای روغن ماهی باشد (Hixson *et al.*, 2014; Tejera *et al.*, 2016)؛ همچنین باعث افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز، نیتریک اکسید سنتتاز می‌شود و بنابراین دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب است و می‌تواند جایگزین مناسبی برای روغن‌های خوراکی دیگر باشد (Taranu *et al.*, 2014). دانه کاملینا حاوی ۳۲۰ تا ۴۶۰ گرم روغن در کیلوگرم است و روغن آن شامل سطوح بالایی از آلفا لینولنیک اسید (گستره وسیعی بین ۲۸ تا ۴۳ درصد کل اسیدهای چرب) و مقدار کم اروسیک اسید است که می‌تواند در جهت کاهش کلسترول در رژیم غذایی انسان استفاده شود. اگرچه وجود اسیدهای چرب غیراشباع موجود در روغن کاملینا، آن را در مقابل اکسیداسیون چربی حساس می‌کند، ولی حضور آلفا-توکوفورول (ویتامین E) بالا که خود آنتی‌اکسیدانی قوی است، باعث پایداری آن در طول ذخیره‌سازی می‌شود و بنابراین نیاز به هیچ‌گونه افزودنی برای ماندگاری ندارد. کنجاله کاملینا نیز پس از استخراج روغن، حاوی ۱۰-۱۱ درصد فیبر، ۱۰-۱۴ درصد

به شمار می‌روند، در خوزستان به مرحله اجرا در آمد.

مواد و روش ها

آزمایش در سال زراعی ۹۸-۱۳۹۷ در قالب بلوک کامل تصادفی با سه تکرار، در گلدان های پلاستیکی با ابعاد ۲۵ در ۳۰ سانتی‌متر در مزرعه آزمایشی- پژوهشی گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، به صورت گلدانی و در شرایط طبیعی (The outdoor pot experiment) اجرا شد. مشخصات هواشناسی منطقه مورد آزمایش طی ماه‌های اجرای تحقیق در جدول ۱ آمده است.

روغن و حدود ۴۰ درصد پروتئین است که آن را محصولی ارزشمند برای تغذیه دام می‌نماید (Waraich *et al.*, 2013; Kahrizi *et al.*, 2017; Mohammadi-nejad *et al.*, 2018). با توجه به بحران آب در کشور، حجم بالای واردات روغن و دانه‌های روغنی و خروج بسیار بالای ارز، ضرورت اصلاح و معرفی یک گیاه دانه روغنی با مصرف نهاده کم، بسیار احساس است (Piravi & Zayerzadeh, 2019). تحقیق حاضر برای اولین بار و به منظور غربالگری لاین‌های دابل هاپلوئید کاملینا بر اساس برخی صفات مورفولوژیک گیاه، میزان روغن و ترکیب اسیدهای چرب دانه که از جمله مهم‌ترین عوامل در ارزیابی و توصیف دانه های روغنی

جدول ۱- میانگین مشخصات هواشناسی منطقه مورد آزمایش طی فصل رشد

Table1. Climate parameter means during the growing season at the experimental site

Month	Rainfall (mm)	Moisture (%)	Temperature(°C)
February	223.6	67.5	13.7
March	234.2	59.2	14.7
April	23.1	56.3	21.9
May	24.3	45.1	27.7
June	24.3	34.4	34.6

بررسی ایجاد شد و قالب‌های کوکوپیت از سینی‌های نشاء خارج و درون آن ها جای گرفت. درحالی‌که همچنان کوکوپیت‌ها خیس بودند، بر روی آن ها سوراخ ریزی ایجاد شد و بعد از قرار دادن بذر در آن، به‌وسیله کوکوپیت پوشانده شد.

از مزایای روش ابداعی قالب کوکوپیت در خاک این است که در این روش کشت، بذرها با اندازه بسیار ریز، حساس به بافت خاک و قوه نامیه ضعیف، به آسانی و با درصد بالایی (حداقل ۹۸ درصد) در حداقل زمان ممکن سبز می‌شوند. با توجه به فواصل منظم قالب‌های کوکوپیت در بستر کشت، فاصله بین گیاهان، بسیار دقیق و قابل پیش بینی است و فرآیند شسته‌شدن و جابه‌جایی بذرها ریز به حداقل می‌رسد. خصوصیت رطوبت‌گیری کوکوپیت باعث می‌شود که کوکوپیت همواره رطوبت را از خاک اطراف خود جذب نماید و بذر در محیطی کاملاً مرطوب قرار گیرد. قالب‌های کوکوپیت، صرفاً جهت تسهیل جوانه‌زنی و سبز شدن است و ریشه گیاه سریعاً وارد خاک اطراف کوکوپیت می‌شود و گیاه به بهترین شکل

تیمارهای آزمایش شامل ۲۶ لاین دابل هاپلوئید کاملینا تهیه شده از شرکت دانش بنیان بیستون کرمانشاه، با شناسه ارائه شده در جدول ۲ بود. مهم‌ترین استفاده از گیاهان دابل هاپلوئید، تولید لاین کاملاً خالص از طریق دو برابر کردن کروموزوم های گیاه هاپلوئید است. گیاهان دابل هاپلوئید از نظر همه صفات، به‌صورت کاملاً خالص هستند و به عنوان ابزاری قدرتمند برای تحقیقات پایه از جمله ژنتیک، سیتوژنتیک و انتخاب به عنوان والد مناسب استفاده می‌شوند (Golamian *et al.*, 2018).

عملیات کشت گیاه کاملینا در ۱۸ بهمن ما در بستر خاک شنی انجام گرفت و با توجه به اندازه ریز و میزان اندک بذری که در اختیار بود، از روش ابداعی قالب کوکوپیت در خاک استفاده شد. در این روش، قالب فشرده کوکوپیت، به مدت ۲۴ ساعت در آب تصفیه شده خیس خورده و بعد از باز شدن نسوج آن، در سینی‌های نشاء با اندازه سلول متناسب با اندازه بذر قالب زده شد. در بسترکشت، سوراخ‌هایی متناسب با ابعاد قالب‌های کوکوپیت و فواصل کشت گیاه مورد

استقرار می‌یابد و مواد غذایی مورد نیاز خود را از خاک دریافت می‌نماید. این روش در مواردی که میزان بذر اندکی در اختیار محقق قرار دارد، بسیار کاربردی است.

جدول ۲- لیست رقم‌های مورد استفاده به عنوان والدین در تلاقی برای تولید لاین‌های دابل هاپلوئید

Table 2. List of cultivars used as parents in crosses for production of doubled haploid lines

Lines Code	♀ Seed parents		♂ Pollen parents		DH Lines No.
	Cultivar	Origin	Cultivar	Origin	
1	Omskij Mestnyj	Russia	Irkutskij Mestnyj	Irkutsk Region	DH03
2	Voronezhskij349	Russia	Kirgizskij I	Kyrgyzstan	DH05
3	Przybrodzka	Poland	Hoga	Denmark	DH07
4	Saratouskij	Russia	Bronowska	Poland	DH08
5,6	Lindo	Germany	Ukrainskaja	Irkutsk Region	DH12, DH13
7	Przybrodzka	Poland	Hoga	Denmark	DH14
8	Voronezh349	Irkutsk Region	Czestochowska	Poland	DH16
9	Przybrodzka	Poland	Hoga	Denmark	DH17
10	Boha	Denmark	Volynskaja	Poland	DH18
11	Przybrodzka	Poland	Hoga	Denmark	DH20
12	Zavolzkij	Irkutsk Region	Sortandinskij	Irkutsk Region	DH21
13	Svalöf	Sweden	Ukrainskij	Irkutsk Region	DH22
14	Chulymskij	Russia	Omskij Mestnyj	Russia	DH29
15	Omskij Mestnyj	Russia	Irkutskij Mestnyj	Irkutsk Region	DH32
16	Zavolzkij	Irkutsk Region	Sortandinskij	Irkutsk Region	DH39
17,18	Chulymskij	Russia	Omskij Mestnyj	Russia	DH41, DH42
19,20	Zavolzkij	Irkutsk Region	Sortandinskij	Irkutsk Region	DH44, DH46
21	Calena	Germany	Blaine Greek	Greece	DH47
22	Voronezhskij349	Russia	Kirgizskij I	Kyrgyzstan	DH51
23	Svalöf	Sweden	Ukrainskij	Irkutsk Region	DH52
24	Lindo	Germany	Ukrainskaja	Irkutsk Region	DH53
25	Voronezh349	Irkutsk Region	Czestochowska	Poland	DH55
26	Krupnosemjannyj	Russia	Brzybrodzka II	Poland	DH63

استفاده شد.

تجزیه اسیدهای چرب آزاد به روش کروماتوگرافی گازی (GC)

اسیدهای چرب آزاد موجود در روغن بعد از حذف حلال و تحت شرایط خلأ به روش Lopez-Martinez *et al.* (2004) صابونی شدند. سپس اسیدهای چرب به دست آمده با استفاده از روش Lepage & Roy (1984) متیلی شدند و مشتق متیلی اسیدهای چرب، بعد از سرد شدن در دمای اتاق و حذف حلال، برای بررسی به روش GC جدا شد. برای جداسازی و شناسایی انواع اسیدهای چرب، دستگاه کروماتوگرافی گازی (Varian CP 3800) متصل به آشکار ساز FID و مجهز به ستون (CP8945) سیلیکای قطبی (طول ستون: ۶۰ متر، قطر داخلی: ۰/۲۵ میلی متر، ضخامت فیلم: ۰/۲ میکرومتر) مورد استفاده قرار گرفت و مقادیر کمی آن‌ها از طریق مقایسه مساحت زیر پیک اسیدهای چرب نمونه و استاندارد اسیدچرب تهیه شده از شرکت سیگما آلدریج (Sigma Aldrich) در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

کود شیمیایی مورد استفاده بر اساس دستورالعمل فنی N₅₀P₅₀K₅₀ بود که به صورت پایه و از منابع اوره، سوپرفسفات تریپل و سولفات پتاسیم تامین شد. عملیات تنک در مرحله چهارم برگری انجام گرفت و در نهایت، چهار گیاه در هر گلدان باقی ماند. برای هر تیمار و در هر تکرار، دو گلدان در نظر گرفته شد (در کل ۱۵۶ گلدان). در زمان رسیدگی کامل گیاه و برای اندازه‌گیری ارتفاع و زیست‌توده بوته و متوسط وزن دانه‌های موجود در تک بوته از هر تیمار در هر تکرار چهار گیاه استفاده شد (در کل ۱۲ بوته برای هر تیمار).

بخش بیوشیمیایی این آزمایش شامل اندازه‌گیری درصد اسیدهای چرب، روغن و پروتئین بود. اندازه‌گیری درصد پروتئین خام به روش کلجدال و با ضرب درصد ازت در ضریب ۶/۲۵ به دست آمد (Kjeldahl, 1883). استخراج روغن با استفاده از دستگاه سوکسله و هگزان نرمال به عنوان حلال انجام شد (Jensen, 2007). برای جداسازی و شناسایی انواع اسیدهای چرب، از دستگاه کروماتوگرافی گازی

نشان داد که بین لاین‌ها از نظر کلیه صفات مورد بررسی اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد وجود داشت (جدول ۳)؛ این موضوع نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بین لاین‌های کاملینا از نظر صفات مورد ارزیابی و امکان‌پذیری بر اساس صفات مورد مطالعه بود. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که از نظر ارتفاع بوته، لاین‌های شماره ۱۶ و هفت به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر را داشتند (جدول ۴).

تعیین شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش دانکن و در سطح احتمال پنج درصد توسط نرم افزار SAS9.1، رسم نمودارها در اکسل و ترسیم دندروگرام با محاسبه فواصل مربع اقلیدسی و روش حداقل واریانس وارد توسط نرم افزار R3.5.1 انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها از نظر صفات مورد مطالعه

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات مورد مطالعه در لاین‌های کاملینا

Table 3. Variance analysis (mean square) of studied traits in camelina lines

S.O.V	d.f	Plant Height	Plant dry matter	Plant grain weight average	Grain oil (%)	Grain protein	Saturated fatty acid	Unsaturated fatty acid	MUFA/PUFA
Replication	2	66.75	0.09	0.001	174.1	73.23	0.228	597.89	0.001
Treatment	25	**1.89	0.26**	**0.059	**5.40	**1.75	**0.783	**0.916	0.003**
Error	50	8.97	0.06	0.001	0.01	0.002	0.0013	0.0020	1.5×10 ⁻⁶
CV%	—	9.31	13.87	9.68	0.28	0.182	0.31	0.05	0.16
S.O.V	C12	C14	C16	C16:1	C18	C18:1	C18:2	C18:3	C20
Replication	0.16	0.14	4.07	0.13	0.995	35.65	30.976	92.332	0.026
Treatment	**0.00005	**0.00003	**0.18	**0.00039	**0.291	**2.873	**5.332	**2.345	**0.132
Error	1×10 ⁻⁷	7×10 ⁻⁸	0.0003	6.5×10 ⁻⁷	0.00052	0.0064	0.0077	0.00341	0.000215
CV%	0.67	0.25	0.28	0.42	0.86	0.50	0.46	0.1814	0.79
S.O.V	C20:1	C20:2	C20:3	C22	C22:1	C22:2	C22:3	C24	C24:1
Replication	19.056	0.0070	0.0039	0.152	0.181	0.155	0.079	0.133	0.0382
Treatment	**0.668	**0.0662	0.0136**	**0.004	**0.242	**0.0015	**0.0114	**0.0047	**0.010
Error	0.0010	0.0001	0.000022	0.000008	0.00035	0.0000025	0.000020	0.0000076	0.000015
CV%	0.227	0.70	0.386	0.61	0.63	0.87	0.93	1.036	0.506

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

**Significant at 1% of probability level.

(C12)، بهنیک اسید (C13)، میریستیک اسید (C14)، پالمیتیک اسید (C16)، لیگنوسریک اسید (C17)، استتاریک اسید (C18)، آراشیدیک اسید (C20). اسیدهای چرب تک غیراشباع (MUFA)^۲ شامل پالمیتولئیک اسید (C16:1)، اولئیک اسید (C18:1)، گاندوئیک اسید (C20:1)، اروسیک اسید (C22:1)، نرونیک اسید (C24:1) و اسیدهای چرب چند غیراشباع (PUFA)^۳ شامل لینولئیک اسید (C18:2)، لینولئیک اسید (C18:3)، ایکوزانویئیک اسید (C20:2)، ایکوزا تری انویئیک اسید (C20:3)، دوکوزا دی انویئیک اسید (C22:2)، دوکوزا تری انویئیک اسید (C22:3)

بیشترین وزن خشک بوته به لاین شماره ۱۹ و بیشترین میزان متوسط وزن دانه تک بوته، ابتدا به لاین شماره ۲۶ و بعد از آن لاین شماره ۱۶ داشتند. بالاترین درصد پروتئین و روغن، به ترتیب مربوط در لاین‌های شماره ۲۴ و ۲۵ مشاهده شد. لاین شماره ۲۲، بیشترین و کمترین درصد اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع را به خود اختصاص داد و همچنین کمترین و بیشترین درصد اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع به لاین شماره ۲۰ تعلق گرفت. در لاین‌های مورد بررسی، ۱۸ نوع اسید چرب شناسایی شد؛ اسیدهای چرب اشباع (SFA)^۱ شامل لوریک اسید

² Monounsaturated Fatty Acid

³ Polyunsaturated Fatty Acid

¹ Saturated Fatty Acid

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در لاین‌های کاملینا

4. Mean comparison of the studied traits in camelina lines Table

Line code	Plant Height (Cm)	Plant dry matter (gr)	Plant grain weight average (gr/plant)	Grain oil (%)	Grain protein (%)	Saturated fatty acid (%)	Unsaturated fatty acid (%)
1	33.83b-e	1.665d-g	0.46cde	37.75ab	28.14e	11.15lm	89.12e
2	27.86fgh	1.67d-g	0.349 g-k	37.37de	27.89g	11.58g	88.97h
3	34.08b-e	2.250ab	0.44 c-f	35.17 l	28.32d	11.09m	89.60b
4	36abc	1.660d-g	0.362g-i	34.55no	27.99f	12.42b	87.95m
5	30.72c-h	2.255ab	0.250l	37.62bc	27.05j	12.05e	88.38l
6	37.37ab	1.76c-g	0.3749 f-i	37.17f	26.45m	11.61g	88.96h
7	16.33i	1.74c-g	0.25l	35.65k	28.48c	11.13m	89.44c
8	37.11ab	2.09a-d	0.28 jkl	34.01p	28.68ab	11.36ij	88.62k
9	32.41b-g	1.445fg	0.3745f-i	34.55no	28.30d	11.22k	89.08ef
10	29.83d-h	1.34g	0.347g-k	34.992m	28.47c	11.60g	89.05efg
11	34b-e	1.68d-g	0.288jkl	34.88m	27.87g	11.86f	88.75j
12	34.25b-e	2.14abcd	0.48cd	37.24ef	26.94k	11.26k	89.51c
13	33.69b-g	1.91a-f	0.282kl	34.40o	28.63b	11.20kl	88.92h
14	31.5b-g	1.55efg	0.411efg	36.22i	27.68h	11.47h	89fgh
15	25.58h	1.42fg	0.360 g-j	37.08fg	27.39i	10.92n	89.471c
16	40.70a	1.54efg	0.57b	37.46cd	26.70l	11.41hi	89.477c
17	32.22b-g	1.97a-e	0.33 h-k	36.77h	27.84g	11.23k	89.27d
18	32.16b-g	1.87a-f	0.322ijk	36.94g	28.16 e	10.83o	89.64b
19	35b-e	2.34a	0.348g-k	37.73ab	26.26n	11.62g	89.07ef
20	29.5d-h	1.80b-g	0.414 d-g	37.72ab	26.51m	10.76p	89.79a
21	35.33a-d	2.13a-d	0.50c	34.993m	28.05f	11.59g	88.81ij
22	30.58c-h	1.57efg	0.30i-l	37.40de	26.88k	12.95a	87.56n
23	33.66b-f	1.70d-g	0.324 h-k	35.87j	27.85g	11.35j	88.83i
24	29.37e-h	1.442fg	0.396 e-h	37.9a	26.70l	12.11d	88.33l
25	36.91ab	2.22abc	0.398 e-h	33.78q	28.76a	12.30c	87.98m
26	27.5gh	1.50efg	0.97a	36.31i	27.60h	11.43h	88.99gh

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد، اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means with the same letter(s) in the same column are not significantly different, according to Duncan's multiple range tests (5%).

براسی‌کاسه دارا است (Popa & Dumitriu, 2017). همچنین طی پژوهشی، دانه کاملینا (DH1025) در شهرهای کرمانشاه، کنگاور و سرپل ذهاب کشت شد و ویژگی‌های روغن آن مورد مطالعه قرار گرفت. ۱۳ اسیدچرب مختلف با استفاده از کروماتوگرافی گازی در روغن حاصل از این دانه شناسایی شد و چهار اسیدچرب عمده در تمام نمونه‌های روغن به ترتیب لینولنیک اسید (۲۸/۰۳-۳۰/۳۱ درصد)، لینولئیک اسید (۱۸/۶۴-۱۹/۳۳ درصد)، اولئیک اسید (۱۵/۴۴-۱۷/۴۸-۱۵/۹۴ درصد) و ایکوزانویئیک اسید (۱۷/۴۸-۱۵/۹۴ درصد) بودند (Mohammadi-nejad et al., 2018). محققین دیگری نیز آنالیز پروفایل اسیدهای چرب غیراشباع در ۲۱ لاین دابل هاپلوئید از گیاه روغنی کاملینا را بررسی کردند؛ بر اساس نتایج تجزیه واریانس آن‌ها، میان لاین‌های مورد بررسی، تنوع معنی‌داری از نظر برخی اسیدهای چرب غیراشباع وجود داشت. لاین‌های DH5 و DH86 بیشترین میزان روغن را دارا بودند. همچنین لینولنیک اسید (امگا سه)

بودند. از میان تمامی اسیدهای چرب شناسایی شده در این بررسی، لینولنیک (۳۲/۱۸) و لینولئیک (۱۹/۱۳) در گروه اسیدهای چرب چندغیراشباع، اولئیک (۱۵/۸۸) و گاندوئیک (۱۴/۴۸) در گروه اسیدهای چرب تک غیراشباع و پالمیتیک (۶/۱۳) در گروه اسیدهای چرب اشباع (جدول ۵)، به ترتیب پنج اسید چرب عمده در تمام لاین‌ها مربوط بودند. حداکثر امگا سه، شش و نه، به ترتیب در لاین‌های شماره ۱۳، ۱۶ و پنج به دست آمد و حداقل این اسیدهای چرب در لاین‌های شماره ۲۲، پنج و چهار بود (جدول ۵).

بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی روغن کاملینا در آزمایش دیگری نشان داد که پروفایل اسیدهای چرب کاملینا شامل اسیدهای چرب غیراشباع، تک و عمدتاً چند غیراشباعی (بیشتر از ۵۵ درصد) و اسیدهای چرب اشباع (۹/۱-۱۰/۸ درصد) بود. عمده اسیدهای چرب، از گروه لینولنیک، لینولئیک و ایکوزانویئیک بودند و اظهار داشتند که روغن کاملینا، کمترین میزان اروسیک اسید را در بین گیاهان تیره

در کشور اسلوونی نشان داد که روغن کاملینا، غنی از آلفا-لینولنیک اسید و دارای ۱۴/۹ درصد گندوئیک اسید است که در سایر روغن‌های گیاهی موجود نیست؛ از طرفی میزان اروسیک اسید آن ۱/۶ درصد است که آن را برای مصرف روغن‌های خوراکی مناسب می‌سازد.

و لینولئیک اسید (امگا شش)، بیشترین میزان اسیدهای چرب غیراشباع را به خود اختصاص دادند که در لاین‌های DH3، DH9، DH43، DH12 و DH13 مشاهده شد (Bozgoari & Kahrizi, 2018). ارزیابی پروفایل اسیدهای چرب و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی روغن استخراج شده از دانه روغنی کاملینا

جدول ۵- مقایسه میانگین پنج اسید چرب عمده روغن دانه لاین‌های کاملینا مورد بررسی (برحسب درصد)

Table 5. Mean comparison of five major fatty acids in studied camelina lines seed oil (%)

Line Code	PUFA		MUFA		SFA
	Linoleic	Linolenic	Gondoic	Oleic	Palmitic
1	19.99f	32.45h	14.13m	14.70m	5.36p
2	20.78c	31.44m	13.88o	15.31j	6.08jk
3	19.588g	32.22i	14.21l	16.69d	6.39b
4	20.21e	31.49m	14.27jk	14.29n	6.48a
5	16.60o	32.92d	14.55h	17.67a	5.816o
6	17.58m	31.93jk	15.02c	17.32b	6m
7	19.585g	32.71f	14.11m	16.09f	6.37bc
8	18.04l	33.70c	14.97cd	14.35n	6.11j
9	18.39j	32.85ed	14.92d	15.88g	6.09jk
10	20.96b	31.15n	13.85o	15.28j	6.49a
11	19.93f	31.44m	14.30j	16.06f	6.32e
12	19.86f	31.86k	14.13m	17.06c	6.28f
13	18.28jk	34.12a	14.31j	15.10k	6.084jk
14	18.71i	31.99j	14.639f	16.16f	6.29f
15	19.55gh	32.56g	14.28j	15.40j	6.07k
16	21.62a	30.76o	13.75p	16.31e	6.22g
17	19.62g	32.14i	14.633fg	15.68l	6.16l
18	18.28jk	32.80e	15.12b	16.57d	6.18hi
19	19.48gh	31.62l	14n	17.01c	6.34de
20	20.39d	31.92jk	14.22kl	15.68l	5.56n
21	17.51m	31.45m	15.86a	15.73hi	6.04l
22	20.43d	30.75o	14.39i	14.58m	6.19h
23	17.28n	33.85b	14.62fg	15.84gh	6.23g
24	16.62o	32.87ed	14.57gh	17.79a	5.819o
25	18.83i	32.20i	14.73e	14.86l	6.36cd
26	19.40h	31.49m	14.94d	15.38j	5.17n
Mean	19.13	32.18	14.48	15.88	6.13

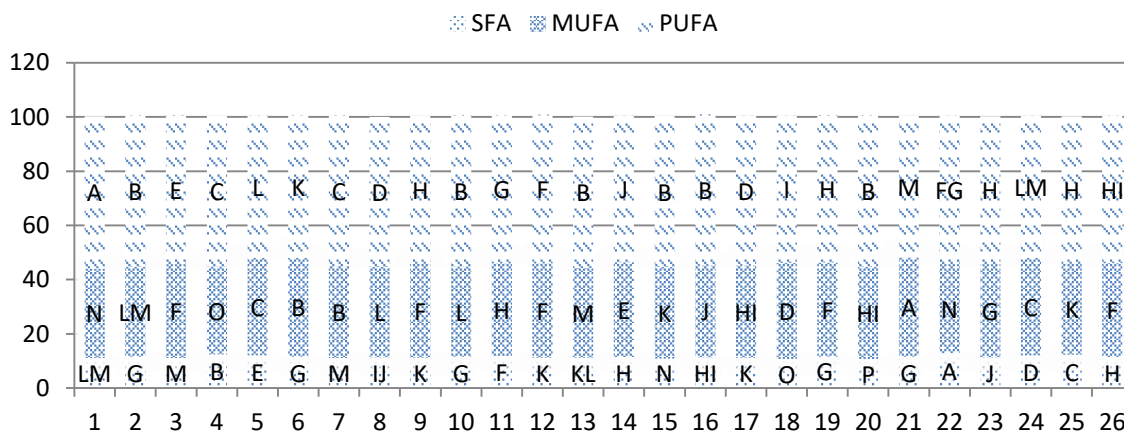
میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد، اختلاف معنی‌داری ندارند
Means with the same letter(s) in the same column are not significantly different, according to Duncan's multiple range tests (5%).

توکوفرول ها، فیتوسترول ها و کارتنوئیدها، مهر تاییدی بر ارزش غذایی بالای این روغن است (Ratusz et al 2018). در شکل ۱، کلیه اسیدهای چرب اشباع، تک غیراشباع و چند غیراشباع شناسایی شده در میان لاین‌های مختلف مقایسه شده است. نتایج ارزیابی اسیدهای چرب روغن در لاین‌های کاملینا مورد بررسی نشان داد که اسیدهای چرب چندغیراشباعی، بیشترین درصد اسیدهای چرب را داشتند (با میانگین ۵۴/۴۲)؛ پس از آن اسیدهای چرب تک غیراشباع (با میانگین ۳۴/۱۱) قرار داشت و کمترین درصد اسیدهای چرب (با میانگین ۱۱/۴۷)، به اسیدهای

همچنین دانسیته و ضریب شکست این روغن کمی بالاتر از سایر روغن‌های گیاهی ارزیابی شد و گفته شد که پایداری آن از سایر روغن‌های خوراکی پالایش نشده بهتر است و مقدار قابل توجهی آنتی اکسیدان دارد (Abramovic & Abram, 2004). طی تحقیق دیگری در لهستان، ۲۹ واریته روغن کاملینای حاصل از پرس سرد مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج آن‌ها نشان داد که روغن کاملینا، حاوی SFA پایین (حدود شش درصد)، اسید لینولئیک بالا (۳۴/۷-۳۷/۱ درصد) و نسبت امگا سه به امگا شش ۱/۷۹-۲/۱۷ درصد می‌باشد. همچنین اظهار داشتند که میزان بالای

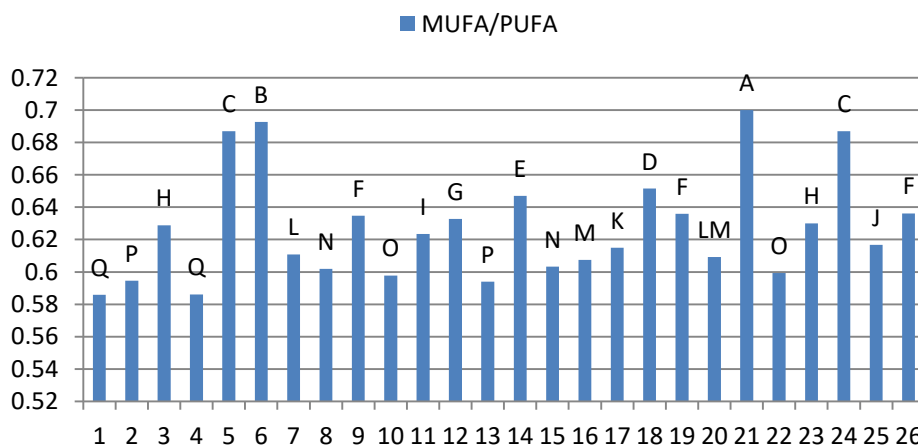
اکسیداسیون و امکان نگهداری بیشتر آن می‌شود، اما اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند مضاعف، در مقابل اکسیداسیون حساستر هستند اما از نظر تغذیه ای و سلامت انسان از اهمیت بیشتری برخوردارند (Golzari *et al.*, 2013).

چرب اشباع تعلق داشت (شکل ۱). نسبت اسیدهای چرب تک غیراشباع به چند غیراشباع لاین‌های مورد بررسی کاملینا در شکل ۲ آمده است. نسبت اسیدهای چرب در ارزش تغذیه‌ای و اقتصادی روغن بسیار مهم است. نسبت بالاتر اسیدهای چرب غیراشباع با یک پیوند مضاعف، سبب دوام بیشتر روغن در مقابل



شکل ۱- درصد توزیع اسیدهای چرب اشباع (SFA)، تک غیراشباع (MUFA) و چند غیراشباع (PUFA) در لاین‌های کاملینا. در هر صفت، لاین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی داری بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 1- Distribution percentage of SFA (Saturated Fatty Acid), MUFA (Monounsaturated Fatty Acid) and PUFA (Polyunsaturated Fatty Acid) in Camelina lines. Lines with the same letter(s) in the same trait are not significantly different at 5% of probability level, based on Duncan's multiple range tests.

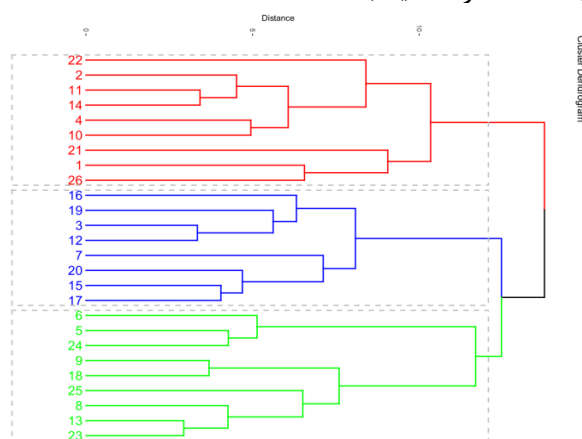


شکل ۲- نسبت اسیدهای چرب تک غیراشباع (MUFA) به چند غیراشباع (PUFA) در لاین‌های کاملینا. لاین‌های دارای حروف مشابه، اختلاف معنی داری بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Figure 2. MUFA (Monounsaturated Fatty Acid) to PUFA (Polyunsaturated Fatty Acid) ratio in camelina lines. Lines with the same letter(s) are not significantly different at 5% of probability level, based on Duncan's multiple range tests.

در بررسی پایداری اکسیداتیو روغن کاملینا حاصل از پرس سرد مشاهده شد که روغن کاملینا با وجود محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع، پایداری بیشتری نسبت به روغن کلزا و کتان داشت (Mierina *et al.*, 2017). تفاوت‌هایی که در میزان روغن و ترکیب اسیدهای چرب روغن دانه ارائه شده در تحقیق حاضر با سایر مطالعات وجود دارد می‌تواند به دلیل اختلاف ارقام، مناطق و شرایط مختلف رشد گیاه باشد

در بررسی پایداری اکسیداتیو روغن کاملینا حاصل از پرس سرد مشاهده شد که روغن کاملینا با وجود محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع، پایداری بیشتری نسبت به روغن کلزا و کتان داشت (Mierina *et al.*, 2017). تفاوت‌هایی که در میزان روغن و ترکیب اسیدهای چرب روغن دانه ارائه شده در تحقیق حاضر با سایر مطالعات وجود دارد می‌تواند به دلیل اختلاف ارقام، مناطق و شرایط مختلف رشد گیاه باشد



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای لاین‌های مورد بررسی کاملینا بر اساس کلیه صفات مطالعه شده با استفاده از روش گروه‌بندی حداقل (Ward 1963)

Figure 3. Cluster analysis dendrogram of studied camelina lines by Ward's minimum variance method (Ward, 1963)

تک بوته، اختلاف بین دو کلاستر یک و سه بیشتر بود و از نظر وزن خشک بوته، اختلافی بین کلاسترها مشاهده نشد. بیشترین فاصله ارتفاع بوته، درصد روغن و اسیدهای چرب غیراشباع، بین کلاسترهای دو و سه و همچنین بیشترین فاصله برای درصد پروتئین و اسیدهای چرب اشباع، بین کلاسترهای یک و دو بود؛ در نتیجه برای انجام تلاقی و اصلاح این صفات، بهتر است انتخاب والدین از لاین‌های داخل این کلاسترها انجام شود.

تمایل به استفاده از والدین مشابه و عدم شناخت و استفاده از ارقام جدید در برنامه‌های اصلاحی، منجر به کاهش تنوع ژنتیکی می‌شود، درحالی‌که ارقام دورتر، با داشتن چندشکلی بیشتر، تفاوت بیشتری از نظر ژنتیکی نشان می‌دهند و از نظر دورگه‌گیری، ارقام با تفاوت بیشتر و یا انتقال صفات نادر را به دنبال خواهد داشت. نتایج مقایسه صفات در داخل کلاسترها به‌منظور بررسی وجود اختلاف در بین کلاسترها در جدول ۶ آمده است. از نظر صفت متوسط وزن دانه در

جدول ۶- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه در گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای لاین‌های کاملینا

Table 6. Mean comparison of the studied traits in camelina lines derived from cluster analysis

Cluster	Line No.	Plant Height (Cm)	Plant dry matter (gr)	Plant grain weight average(gr/plant)	Grain oil (%)	Grain protein (%)	Saturated fatty acid (%)	Unsaturated fatty acid (%)
1	9	31.82ab	1.64a	0.44a	36.05b	27.84a	11.78a	88.69b
2	8	30.96b	1.90a	0.40b	36.85a	27.30b	11.18c	89.45a
3	9	33.60a	1.85a	0.33c	35.82c	27.84a	11.56b	88.75b

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد، اختلاف معنی‌داری ندارند. Means with the same letter(s) in the same column are not significantly different, according to Duncan's multiple range tests (5%).

نتیجه‌گیری کلی

در نهایت و با توجه به نتایج تجزیه خوشه‌ای از نظر کلیه خصوصیات مورد بررسی، بهتر است غربالگری لاین‌ها از بین هشت لاین موجود در کلاستر گروه دوم (DH07)۳، (DH14)۷، (DH21)۱۲، (DH32)۱۵، (DH39)۱۶، (DH41)۱۷، (DH44)۱۹، (DH46)۲۰ انجام گیرد. در میان لاین‌های این گروه، بیشترین ارتفاع و متوسط وزن دانه در تک بوته، در لاین DH39 و بیشترین وزن خشک بوته (اندام هوایی و ریشه)، درصد روغن و اسیدهای چرب اشباع در لاین DH44 مشاهده شد. حداکثر پروتئین کل و اسیدهای چرب غیراشباع به ترتیب دبر لاین‌های DH14 و DH46

تعاق داشت. لازم به ذکر است که با توجه به نوین بودن گیاه و وجود تنها یک رقم ثبت شده در ایران، انجام تحقیقات وسیع‌تر در این زمینه به‌منظور جهت دهی به برنامه‌های اصلاحی ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به جهت تامین هزینه مورد نیاز این پژوهش که قسمتی از قرارداد پژوهانه به شماره ۹۸/۳/۰۵/۱۴۹۰۹ می باشد، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

- Abramovič, H. & Abram, V. (2005). Physico-Chemical properties, composition and oxidative stability of *Camelina sativa* Oil. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 63–70.
- Bozgodari, A. & Kahrizi, D. (2018). Study of unsaturated fatty acid profile in double-haploid genotypes of oilseed crop *Camelina sativa*. In: *15th National Iranian Crop Science Congress*, 4-6 Sep., Karaj, Iran, pp. 1-4. (In Persian)
- Eidhin, D. & O'Beirne, D. (2010). Oxidative stability of camelina oil in salad dressings, mayonnaises and during frying. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(3), 444–452.
- Ghamarnia, H., Kahrizi, D. & Rostami Ahmadvandi, H. (2020). *Camelina: A low input and adaptable plant*. Razi University Press. (In Persian)
- Golamian, S. M., Ghamarnia, H. & Kahrizi, D. (2018). Effects of saline water on *Camelina (Camelina sativa)* yield in greenhouse condition. *Scientific Journal of Agriculture*, 7(2), 334–346. (In Persian)
- Golzari, M., Rahemi, M., Hassani, D., Vahdati, K. & Mohammadi, N. (2013) Protein content, fat and fatty acids of kernel in some Persian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars affected by kind of pollen. *Journal of Food Science and Technology*, 38(10), 21-31. (In Persian)
- Hixson, S. M., Parrish, C. C. & Anderson, D. M. (2014). Changes in tissue lipid and fatty acid composition of farmed rainbow trout in response to dietary camelina Oil as a replacement of fish oil. *The Journal of AOCS*, 49, 97–111.
- Hixson, S., Parrish, C. & Anderson, D. (2013). Changes in tissue lipid and fatty acid composition of farmed rainbow trout in response to dietary camelina Oil as a replacement of fish oil. *Lipids*, 49(1), 97-111.
- Jensen, W. B. (2007). The origin of the soxhlet extractor. *Journal of Chemical Education*. 84(12), 1913–1914.
- Kahrizi, D., Kazemitabar, S. K., Ghazi, S., Karimi, N., Feizi, M., Rostami-Ahmadvandi, H., Soorni, J., Falah, F., Razinei, Z., Bakhsham, M. & Rahimi, T. (2017). A review on biotechnological research on camelina sativa oilseed crop. In: 2nd international and 10th national biotechnology congress of the Islamic Republic of Iran, 29-31 August., Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran, 1-6. (In Persian)
- Kjeldahl, J. (1883). A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22, 366-382.
- Lepage, G. & Roy, C. (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, 25(12), 1391-1396.
- López-Martínez, J., Campra-Madrid, P. & Guil-Guerrero, J. (2004). γ -Linolenic acid enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* seed oils and fatty acids by low temperature crystallization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(5), 294-298.
- Mierina, I., Adere, L., Krasuaska, K., Zoltnere, E., Skrastina, D. Z. & Jure, M. (2017). Antioxidant properties of camelina sativa oil and press-cakes. . *Proceedings of The Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.*, 71(6), 515-521.

15. Mohammadi-nejad, R., Bahramian, S. & Kahrizi, D. (2018). Evaluation of physicochemical properties, fatty acid composition and oxidative stability of *Camelina sativa* (DH 1025) oil. *Journal of Food Science & Technology*, 15(77), 261-269. (In Persian)
16. Patade, V., Khatri, D., Kumar, K., Agarwal, A., Kumari, M. & Nasim, M. (2016). PEG treatment improves germination and establishment in older seeds of camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz): A Potential Biofuel Crop. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences*, 53, 26-28.
17. Piravi, Z. & Zayerzadeh, E. (2019). *Subchronic toxicity study of camelina oil in rats and determination of its chemical specifications*. (Final Report of Research Project). Food Industries and Agriculture Research Center. 9604004. 46. (In Persian)
18. Popa, A., Jurcoane, Ş. & Dumitriu, B. (2017). *Camelina Sativa* oil-a review. *Scientific bulletin. Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, XXI, 233-238.
19. Ratusz, K., Symoniuk, E., Wroniak, M. & Rudzinska, M. (2018). Bioactive compounds, nutritional quality and oxidative stability of cold-pressed camelina (*Camelina sativa* L.) oils. *Applied Sciences*, 8(12), 2606.
20. Shaghuli, S., Maryamabadi, A., Mohebbi, G. H., Barmak, A., Armin S., Vazirzadeh, A., Gudarzi, S. & Saleki, M. (2017). Determination of fatty acids profile and physicochemical study of sea lettuce (*Ulva lactuca*) oil from Bushehr city coast. *Iranian South Medical Journal*, 20(2), 143-162. (In Persian)
21. Simopoulos, A. P. & De Meester, F. (2009). A balanced omega-6/omega-3 fatty acid ratio cholesterol and coronary heart disease. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 100, 1-25.
22. Taranu, I., Gras, M., Pistol, G. C., Motiu, M., Marin, D. E., Lefter, N., Ropota, M. & Habeanu, M. (2014). ω -3 PUFA rich camelina oil by-products improve the systemic metabolism and spleen cell functions in fattening pigs. *Plos One*, 9(10), e110186.
23. Tejera, N., Vauzour, D., Betancor, M. B., Sayanova, O., Usher, S., Cochard, M., Rigby, N., Ruiz-Lopez, N., Menoyo, D., Tocher, D. R., Napier, J. A. & Miniñane, A. M. (2016). A transgenic *camelina sativa* seed oil effectively replaces fish oil as a dietary source of eicosapentaenoic acid in mice 1–3. *The Journal of Nutrition*. 146(2), 227-235.
24. Ussetti Mohottalalage, S. (2016). *A comparative study of the structural and physicochemical properties of the major proteins from Camelina sativa (L.) Crantz and Brassica napus L.* M.Sc. Thesis. Department of Food and Bioproduct Sciences, Saskatchewan University, Saskatoon. 201.
25. Waraich, E. A., Ahmed, Z., Ahmad, R., Ashraf, M. Y., Saifullah., Shahbaz Naeem., M. & Rengel, Z. (2013). *Camelina sativa*, a climate proof crop, has high nutritive value and multiple-uses: A review. *Australian Journal of Crop Science*, 7(10), 1551-1559.
26. Ward, Jr. J. H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58 (301), 236-244.