مجله علوم و فنون باغباني ايران جلد ۱۰ شماره ۲ صفحه هاي ۱۰۷ تا ۱۲۶ (۱۳۸۸)

تعيين والدين نژادگان‌هاي انگور بيدانه از طريق رويكردهاي انتساب مبتني بر درست‌نمايي[۱]

PARENTAGE ANALYSIS OF SEEDLESS GRAPEVINE GENOTYPES WITH LIKELIHOOD BASED ASSIGNMENT APPROACHES

مهدي حدادي نژاد، علي عبادي و محمدرضا نقوي[2]

چكيده

برنامه بهنژادي انگور براي مصرف تازه‌خوري و كشمشي از سال ۱۳۷۵ در ايران شروع شده است. در پژوهش حاضر، چهار والد پدري بيدانه، هفت والد مادري دانه‌دار به كار رفته در برنامه بهنژادي ياد شده به همراه ۱۲ نتاج برتر حاصل از تلاقي آن ها، به منظور تاييد صحت تلاقي كنترل شده و نتيجه آن، به وسيله نشانگر مولكولي ريزماهواره بررسي شدند. نتايج به دست آمده از ضريب تشابه دايس نتوانست در مورد تعدادي از نتاج به معرفي دقيق والدين بپردازد، از اين رو براي جبران اين نقصان از لگاريتم طبيعي نسبت توابع درست‌نمايي براي محاسبه تفاوت‌هاي بين شبيه‌ترين والد و والد محتمل بعدي استفاده شد. سطوح اطمينان ۹۵% و معني‌دار اين اختلاف نيز با شبيه‌سازي محاسبه شد. بيشترين تشابه يك والد مادري با نتاج به ميزان ۰/۶۵ و بين رقم ‘علي بابا’ و سه نژادگان S_{54}, S_{55}, S_{40} به دست آمد. با به كارگيري تجزيه‌هاي شناسايي والديني، والد مادري و پدري هر يک از نتاج تعيين گرديد. در مواردي كه والدين زمينه ژنتيكي مشتركي داشتند، نتاج به صورت جزيي به والدين منتسب شدند و در ساير موارد والدين پدري و مادري هر يک از نتاج برتر تعيين و روابط خويشاوندي بين نتاج به خوبي مشخص شد. نشانگر ريزماهواره همچنين توانست والدين و نتاج را از يكديگر تفكيک نمايد و تنها در تفكيک دو والد پدري بيدانه سفيد و بي دانه قرمز به دليل تشابه بالاي آن ها كارآيي لازم را نداشت. نتايج نشان داد خودگرده افشاني در والدين مادري پس از اخته كردن آن ها رخ نداده است. بين نتاج روابط خواهر و برادر تني به خوبي مشخص گرديد. استفاده از روش هاي انتساب مبتني بر درست نمايي، ضمن كاهش خطاها، امكان انجام آزمون شناسايي والدين را فراهم نمود.

واژه‌هاي كليدي: انتساب والدين به نتاج، انگور، درست‌نمايي، نشانگر ريزماهواره.

مقدمه

انگور يكي از ارزشمندترين محصول هاى باغباني در سطح جهان است. انگور با نام علمي *Vitis vinifera* L.، مهمترين گياه از تيره Vitaceae مي باشد كه در نواحي معتدله در نيمكره شمالي و جنوبي گسترش يافته است. به تقريب ٦۰ گونه در جنس ويتيس در سراسر جهان وجود دارد (٢٦). به تازگي تخمين زده شده است كه حدود ٤/٥ ميليون هكتار انگور كاري در سراسر جهان وجود داشته باشد. توليد ساليانه انگور بيش از ۵۰ ميليون تن مي‌باشد و در بين كشورهاي توليد كننده انگور، كشورهاي ايتاليا، فرانسه، چين، ايالات متحده

۱- تاريخ دريافت: ۸۷/۹/۲۵ تاريخ پذيرش: ۸۸/۴/۲۱

۲- به ترتيب دانشجوي كارشناسي ارشد، دانشيار گروه علوم باغباني دانشگاه تهران و دانشيار گروه اصلاح نباتات دانشگاه تهران. كرج، جمهوري اسلامي ايران.

آمريكا، اسپانيا، تركيه و ايران به ترتيب در رده‌هاي اول تا هفتم قرار دارند (فائو ٢٠٠٧). هرچند قسمت عمده آن صرف توليد صنايع تخميري مي‌شود اما بخش قابل توجهي از توليد جهاني در مصرف تازه‌خوري، توليد كشمش و فرايند توليد آب ميوه و ... مصرف مي‌شود (٢٦). بهنژادي انگور به منظور توليد رقم هاي برتر از سال ها قبل در كشورهاي مختلف انجام شده و ادامه دارد (١٦، ٢٦). در ايران نيز پژوهش به منظور بهنژادي انگور براي مصرف تازه‌خوري و كشمشي از سال ١٣٧٥ شروع شده است (۴). در بهنژادي انگور، نشانگرهاي مولكولي كاربرد زيادي يافته‌اند و در اين بين نشانگر ريزماهواره، به‌دليل تكرارپذيري، همبارز بودن، امكان جابه جايي و مقايسه داده‌ها بين آزمايشگاه‌هاي مختلف، اهميت بيشتري پيدا كرده است. از عمده‌ترين كاربردهاي نشانگرهاي ريزماهواره مي‌توان به انگشت‌نگاري رقم هاي مختلف انگورهاي ‘تازه‌خوري’، ‘كشمشي’، ‘پايه’ و ‘شرابي’ (٢، ٣، ١٥، ٣٣). تصحيح همنام ها[1] و دگرنام‌ها[2] (٧، ١١)، تشخيص چند شكلي همگروه ها (٢٨)، ترسيم شجره‌نامه رقم هاي قديمي انگور (١، ٨، ٩، ٣٠، ٣١، ٣٥) و تهيه نقشه هاي ژنتيكي (٢٩) اشاره نمود.

بررسي‌ها جهت شناسايي والدين در جمعيت‌هاي طبيعي با به كارگيري چند شكلي كروموزومي (٢٤) و پس از آن با الكتروفورز آلوزايم‌ها به كندي پيش رفت (١٤، ١٧، ٢٣). ظهور انگشت نگاري DNA در دهه ١٩٨٠ تحولي را در تجزيه‌هاي والديني به وجود آورد. در همين زمان، روش‌هاي آماري براي تجزيه والدين با استفاده از چند شكلي‌هاي تك مكاني مثل آلوزايم، توسعه يافت (١٠، ٢٣). از آن جا كه طبيعت چند مكاني داده‌هاي به دست آمده از انگشت نگاري DNA ، براي تجزيه‌هاي ساده آماري مشكل‌ساز بود، بنابراين مفاهيم نظري تجزيه والديني دچار انحراف قابل توجهي از تجزيه‌هاي عملي گرديد (٢٧). با كشف نشانگرهاي ريزماهواره و يكسان شدن مفاهيم نظري و عملي، حجم عظيمي از مطالعات والديني و روش‌هاي آماري براي تجزيه اين مطالعات امكان‌پذير و اجرايي گرديد (١٨). ريزماهواره‌ها، بر طبق قوانين مندلي به نتاج منتقل مي‌شوند. هرچند در هر دو دسته نشانگرهاي غالبيت و همبارز، در هر تلاقي هر يك از والدين تنها يك آلل در هر مكان ژني به نتاج منتقل مي‌نمايند و نتاج در هر مكان ژني فقط حامل يكي از آلل هاي هر پايه مي باشند، اما در نشانگرهاي غالب امكان تشخيص افراد هوموزيگوت از هتروزيگوت مقدور نمي باشد (٣٤). بنابراين تنها مي‌توان از نشانگرهاي همبارز همچون ريزماهواره در شناسايي ارتباط والدين و نتاج استفاده نمود (٣٠، ٣٢).

در زماني كه همه والدهاي كانديد نمونه‌گيري شده باشند، از رويكرد حذف[3]، رويكردهاي انتساب مبتني بر درست‌نمايي[4] (شامل تخصيص دسته‌بندي شده[5] يا قطعي و تخصيص جزئي[6] ياجزء به جزء) و بازسازي نژادگاني[7] به عنوان رويكردهاي اصلي براي شناسايي والدين استفاده مي‌شود (١٨).

در روش حذف، بر اساس داده‌هاي ژنتيكي موجود، همه والدين كانديد، غير از يك جفت آن ها حذف مي شوند (٢٥). اين روش (كه بر مبناي قوانين توارث مندلي استوار است) از ناسازگاري‌هاي بين والدين و نتاج براي رد فرضيه والد- نتاج خاص استفاده مي‌كند. از عوامل تضعيف رويكرد موفقي چون حذف مي‌توان به اشتباه در وارد نمودن داده‌هاي مولكولي نژادگان‌ها، وقوع آلل‌هاي خاموش و جهش‌ها اشاره نمود، كه منجر به حذف اشتباهي مي شوند (١٨).

در روش دسته‌بندي شده يا قطعي از مقدار لگاريتم نسبت توابع درست نمايي يا امتياز LOD[8]، براي انتخاب شبيه‌ترين والد بهره مي‌گيرند. در اين روش پس از بررسي دقيق همه والدين احتمالي، نتاج بر مبناي

---

[1] Synonyms
[2] Homonyms
[3] Exclusion
[4] Likelihood based assignment
[5] Categorical allocation
[6] Fractional allocation
[7] Genotypic reconstruction
[8] Log of odds

بيشترين امتيازLOD به والد يا جفت والدين منتسب مي شود. در اين روش به طور معمول مقداري خطاي جابه جايي، مربوط به اشتباه در وارد كردن اطلاعات مولكولي نژادگان‌ها يا جهش در نظر گرفته مي‌شود و مي‌تواند در تجزيه وراثت پذيري نيز مفيد باشد (۲۵). مدل تخصيص جزيي، به طور انحصاري بر پايه احتمالات انتقالي (مندلي) است و نتاج را بين والدين كانديد تقسيم مي‌كند. چرا كه اگر نتاج یک به یک و بر اساس احتمال والديني بين همه والدين موجود تقسيم شده و به آن ها تخصيص يابند، ارتباط و انحراف يك طرفه موجود در تخصيص دسته بندي شده هم از بين مي رود (۱۸). هر دو روش تخصيص دسته‌بندي شده و جزيي، احتمال‌ها را از مسير مشابهي محاسبه مي‌كنند، با اين تفاوت كه روش دسته‌بندي شده همه نتاج را در پايان به يك والد قطعي (در مثل نر) مي‌رساند. در حالي كه روش جزئي نتاج را بين والدهاي نر توزيع مي‌كند و براي هر یک از آن ها احتمال تعلق آن والد به نتاج را ارائه مي‌دهد. روش بازسازي ساختار ژنتيكي زماني به كار مي‌آيد كه یک والد از قبل مشخص باشد. اين روش از نژادگان‌هاي چند مكاني والدين و نتاج استفاده نموده و نژادگان والد ناشناخته‌اي كه گامت هايش را در آرايه نتاج توزيع نموده را بازسازي مي كند (۱۸). نرم افزارهاي متعددي براي انجام اين محاسبات وجود دارد كه هر یک داراي مزايا و معايبي مي باشند و كاربر مي بايستي با توجه به جمعيت والدين ـ نتاج، نشانگر مورد استفاده و خطاهاي احتمالي، برنامه مورد نياز خود را انتخاب كند. در اين بررسي با توجه به مزايايي چون امكان تعيين والد پدري و مادري، امكان تعيين اطمينان آماري، توانايي محاسبه احتمال حذف و خطاهاي مربوط به آلل خاموش، داده‌دهي و جهش و مزاياي ديگري همچون تعريف الگوريتمي مناسب جهت جايگزيني نژادگان‌هاي حاوي خطا با نژادگان ديگر(كه از نظر فراواني مورد انتظار در جمعيت با آن تطابق دارد) و استفاده از روش شبيه‌سازي براي تعيين مقادير بحراني از نسخه جديد برنامه CERVUS 3.0[1] انتخاب گرديد.

هدف از اين پژوهش تاييد دورگه بودن نتاج برتر، شناسايي والدين آن ها و تعيين روابط بين والدين و نتاج حاصل از تلاقي انگورهاي بيدانه ايراني با انگورهاي دانه‌دار (با منشا ايراني و خارجي) و بررسي وقوع خودگرده‌افشاني است.

مواد و روش ها

به منظور بهنژادي انگور براي مصرف تازه‌خوري و كشمشي، رقم هاي ‘عسكري’، ‘ياقوتي’، ‘بيدانه سفيد’ و ‘بيدانه قرمز’ به عنوان والدهاي پدري و رقم هاي‘ موسكات هامبورگ’، ‘قزل اوزوم’، ‘ديزماري’، ‘رجبي سفيد’، ‘علي بابا’، ‘الحقي قرمز’ و ‘تبرزه’ به عنوان والدهاي مادري، از مجموعه انگور گروه علوم باغباني دانشگاه تهران انتخاب و دورگه گيري شدند. از مجموع ۱٤۰۰ نتاج به‌دست آمده، ۳۸۱ نتاج حاصل از ۲٦ تلاقي طي دو سال ۱۳۸۵ و ۱۳۸٦ مورد ارزيابي هاي ريخت شناسي قرار گرفتند (٤). از بين نتاج، ۱۲ نژادگان برتر به طور كامل بيدانه (I_{21}، K_{67}، R_{80}، I_{73}، A_{119}، R_{84}، B_{98}، S_{40}، K_{93}، S_{55}، L_{125}، S_{54}) و ٤ رقم والد پدري و ۷ رقم والد مادري از مجموعه ياد شده، مورد بررسي قرار گرفتند. به اين منظور از آن ها نمونه‌هاي برگ جوان گرفته و DNA آن ها به روش توماس و همكاران (۳٤) استخراج شد. براي ارزيابي هاي نژادگاني، ١٤ جفت آغازگر ريزماهواره با توجه به گزارش‌هاي مختلف انتخاب و تهيه شد (جدول۱) DNA ژنومي نمونه‌ها با آغازگرهاي ياد شده تكثير شدند. واكنش زنجيره اي پليمراز (PCR)[2] با استفاده از دستگاه ترموسايكلر Perkin Elmer مدل ۹٦۰۰ انجام گرديد.

---

[1] http://www.fieldgenetics.com -۱

[2] Polymerase chain reaction -۲

جدول ۱- ویژگی های نشانگرهاي ریزماهواره.

Table 1. The characters of microsatellite markers.

مکان‌هاي ریزماهواره Microsatellire looci	دماي اتصال Annealing tem.	طول آغازگر Primer length		اندازه گيري آلل (bp) Allele size	توالي Sequence 5′ → 3′	منبع Reference
		R	F			
VVS2	54	25	21	129-155	CAGCCCGTAAAGTGTCCATC AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	33
VVS4	50	22	24	167-186	CCATCAGTGATAAAACCTAATGCC CCCACCTTGCCCTTAGATGTTA	33
VVMD5	56	24	20	226-246	CTAGAGCTACGCCAATCCAA TATACCAAAAATCATATTCCTAAA	7
VVMD7	52	20	20	233-263	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT CGTTCCTTCACACGCTTGAT	7
VVMD14	56	26	25	222-250	CATGAAAAAATCAACATAAAAGGGC TTGTTACCCAAACACTTCACTAATGC	9
VVMD24	56	25	22	208-219	GTGGATGATGGAGTAGTCACGC GATTTTAGGTTCATGTTGGTGAAGG	9
VVMD25	56	24	24	243-275	TTCCGTTAAAGCAAAAGAAAAAGG TTGGATTTGAAATTTATTGAGGGG	9
VVMD27	56	22	27	173-193	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	9
VVMD36	56	26	25	244-315	TAAAATAATAATAGGGGGACACGGG GCAACTGTAAAGGTAAGACACAGTCC	9
VMC4A1	61	23	23	265-275	ATGCGACCTTAATAAATTGGGAA AAGCTACCGTTGTATGAGGGAGA	36
VMC4H6	61	22	22	152-168	GTATAGAACCACGCATCCAACA CCCTTAGTTTCCTCGTGCTTTT	12
VMC4G6	51	22	22	114-176	CCTTGAAGAGATGAGTTTGCTA TATTTAACTTTGTGCCTCTGCT	12
VrZAG21	50	25	25	190-214	TCATTCACTCACTGCATTCATCGGC GGGGCTACTCCAAAGTCAGTTCTTG	30
VrZAG64	50	25	25	137-197	TATGAAAGAAACCCAACGCGGCACG TATGAAAGAAACCCAACGCGGCACG	30

هر محلول واكنش در حجم ۲۵ ميكروليتر تهيه و حاوي مواد زير بود: ۸ ميكروليتـر DNA ژنـومي (٤٠ نـانو گـرم DNA)، ۲/۵ ميكروليتربافرPCR يک برابر حاوي ۲/۱ميلي مـولار کلريـد منيـزيم، ۰/۲۵ ميكروليتـر مخلـوط چهـار نوع dNTPs با غلظت۱۰۰ ميكرومولار، ۱ميكروليتراز هر كدام از آغازگرهاي رو به جلو[1] و رو به عقب[2] با غلظت ۰/٤ ميلي مولار، ۱/۵ واحد آنزيم تک پليمراز DNA و در نهايت با ۱٤/۲ ميكروليتر آب دوبار تقطير، حجم محـيط واكنش به ۲۵ ميكروليتر رسانده شد.

چرخه حرارتي شامل يك مرحله واسرشت سازي اوليه در دماي ٩٤ درجه سلسيوس به مدت پنج دقيقـه، سپس ۳۵ چرخه حرارتي اصلي كه شامل سه مرحله واسرشت سازي DNA الگو در ٩٤ درجه سلسيوس به مدت ۳۰ ثانيه، اتصال با آغازگر با توجه به دماي خاص هر آغازگر (جدول۱) به مدت ۳۰ ثانيه و بسط آغازگر در دماي ۷۲ درجه سلسيوس به مدت ۳۰ ثانيه بود و در پايان بسط نهايي در دماي ۷۲ درجه سلسيوس به مدت هفت دقيقه انجام شد. در ۱۰ چرخه ابتدايي چرخه حرارتي اصلي، دماي اتصال آغازگرها ۱۰ درجه سلسيوس بالاتر از دمـاي واقعي آن ها در نظر گرفته شد و در هر چرخه يـک درجـه سلسـيوس كـاهش يافـت تـا بـه دمـاي اتصـال واقعـي آغازگرها رسيد[3]. اين كار تا حدودي از ايجاد باندهاي شبه ريزماهواره كه در چرخه‌هاي عادي PCR باعث بـروز مشكلاتي در امتيازبندي مي‌شوند، جلوگيري مي كند.

فرآورده‌هاي واكنش زنجيره‌اي پليمراز روي ژل پلي‌آكريلاميد ٦% ، در شـرايط واسرشـت‌سـازي (اوره ۷ مولال) تفكيک و جهت آشكارسازي باندها از روش رنگ آميزي نيترات نقره (٦) استفاده شد. امتيازدهي بانـدها بـه صورت كدهاي صفر و يک[4] ثبت (براي هر فرد ديپلوئيد: هوموزيگوس غالـب۰/۱، هتروزيگـوس۱/۱، هوموزيگـوس مغلوب۱/۰) و سپس اطلاعات هر فرد طبق روش كار نرم‌افزار، به ماتريس عددي قراردادي تبديل گرديد(۲۰).

به منظور تعيين كارايي ۱٤ نشانگر ريزماهواره در ۲۳ نمونه مورد مطالعه، تعداد آلل مؤثر، محتواي اطلاعات چنـد شكل(PIC)[5] و درصد هتروزيگوسيتي مورد انتظار(He)[6] و مشـاهده شـده(Ho)[7] توسـط نسـخه سـوم نـرم افـزار CERVUS محاسبه شدند.

Pi، فراواني آلل i ام، Pj، فراواني آلل j ام و K، تعداد آلل‌ها

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{k} p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1}\sum_{j=i+1}^{k} 2p_i^2 p_j^2$$

X، فراواني آلل i ام وK، تعداد آلل‌ها

$$He = 1 - \sum_{i=0}^{k} x_i^2$$

Ho عبارت است از تعداد افراد هتروزيگوت تقسيم بر كل افراد

براي آناليز درست‌نمايي، داده‌ها به عنوان نقطه شروع انتخاب و فرضياتي كه داده هاي يـاد شـده از آن حاصـل شده بودند از طريق معادله زير بررسي گرديد:

$$L(H_1, H_2 | D) = \frac{P(D|H_1)}{P(D|H_2)}$$

در معادله فوق $P(D|Hi)$ احتمال به دست آمدن داده D در شرايط فرضHi، D داده‌هاي نژادگان‌هاي نتاج، مادر و پدر مورد گمان دريك مكان خاص،H_1 يا فرض صفر به‌صورت پدر مشكوك، پدر واقعي است. H2 يا فرض مقابل (فرض يک) به صورت پدر مشكوك، فردي بيگانه و تصادفي است و L احتمال درست‌نمايي والديني يك والد خاص نسبت به احتمال درست‌نمايي يك والد تصادفي مي‌باشد. لازم به ذكر است كه جمعيت والدين در

---

[1] Forward

[2] Reverse

[3] Touch down

[4] Binary

[5] Polymorphic information content

[6] Expected heterozygosity

[7] Observed heterozygosity

اين بررسي دامنه مشخصي داشت. تعداد والدين پدري و مادري مشخص بود ولي نقش آن ها به عنوان والد اصلي با ابهام روبه رو بود. اما نتايج دي وسچي استاراز (۱۲، ۱۳) نشان داد دامنه اين جمعيت مي تواند تا جمعيت‌هاي چند هزار فردي انگور را شامل گردد و نرم افزار از لحاظ تعداد افراد مورد بررسي محدوديت ندارد. ولي با توجه به جمعيت والدين، لازم است از نسبت والدين نمونه‌گيري شده و براي نرم افزار تعريف شود (جدول ۲). اين مقدار نشان مي‌دهد چه تعداد از والدين اصلي به احتمال در جمعيت نمونه‌گيري شده حضور دارند.

سپس طبق پيشنهاد ميگر[1] (۲۲) براي توسعه رويکرد درست‌نمايي تامپسون، هنگام تجزيه داده از تعيين والد با بالاترين مقدار لگاريتم نسبت درست‌نمايي يا امتياز LOD استفاده مي‌گردد. مقادير درست‌نمايي ممکن است از ضرب هر مکان در يکديگر و گرفتن لگاريتم طبيعي ($\log_e$) نسبت توابع درست‌نمايي مشتق شود، که آن را امتياز LOD مي‌نامند. امتياز LOD برابر صفر بيانگر اين است که والد يا والدين معرفي شده مي‌توانند به طور کامل بي پايه و به صورت تصادفي انتخاب شده باشد. در اين صورت (که به طور معمول به خاطر شباهت ژنتيکي آن ها مي باشد) امکان شناسايي والدين مقدور نخواهد بود. مقدار مثبت امتياز LOD حکايت از آن دارد که احتمال والد واقعي بودن گزينه کانديد انتخاب شده از اين که يک فرد به طور تصادفي انتخاب شود، بيشتر است. امتياز منفي LOD نيز در صورتي رخ مي‌دهد که والد مورد گمان و نتاج مجموعه‌اي از آلل‌ها را به اشتراك بگذارند و اگر دو والد در امتياز LOD مساوي باشند، مثل زماني که والدين نژادگان مشابهي دارند شناسايي والدين با ابهام روبه رو مي شود (۲۵).

از اختلاف لگاريتم درست‌نمايي پدري، که بيشترين تشابه را نشان داده و کانديد پدر غريبه‌اي که پس از پدر اصلي بيشترين تشابه را نشان مي‌دهد، استفاده نموده و آستانه‌اي به عنوان معيار انتخاب مي‌شود (ΔL).

$$\Delta L = LogL_1 - LogL_2$$

$LogL_1$: لگاريتم درست‌نمايي پدري، که بيشترين تشابه را نشان داده و $LogL_2$: لگاريتم درست‌نمايي کانديد پدري غريبه که پس از پدر اصلي، بيشترين تشابه را نشان مي‌دهد.

در نسخه جديد برنامه، معادلات درست‌نمايي توسط کالينوفسکي[2] و همکاران (۱۹) بازنگري شده و اطمينان آماري و سطح معني داري به دو روش دلتا و سطح بالاي LOD محاسبه مي‌گردد. پارامترهاي مورد نياز نرم افزار جهت انجام شبيه سازي طبق جدول ۲ براي نرم افزار تعريف شد.

از سه روش تجزيه والديني موجود در برنامه CERVUS 3.0 شامل تجزيه براي شناسايي والد گرده گيرنده (مادري)، تجزيه براي شناسايي والد گرده دهنده(پدري) و تجزيه براي شناسايي جفت والد تلاقي يافته استفاده گرديد.

نتايج و بحث

تنوع در مکان‌هاي ريزماهواره

تمامي ۱٤ نشانگر ريزماهواره مورد آزمون در جمعيت تحت مطالعه چند شکل بودند (شکل ۱) و در مجموع ۷۸ آلل در ۲۳ نژادگان توليد کردند. تعداد آلل ها در هر مکان ريزماهواره‌اي از ۳ آلل در مکان VVMD24 تا ۱۰ آلل در مکان VrZAG64 با ميانگين ۵/۸۶ آلل در والدين و پنج آلل در نتاج و ميانگين ۳/۳۸ آلل موثر در والدين و ۲/۹ آلل در نتاج براي ۱۴ مکان به کار رفته متغير بود (جدول ۳).

---

[1] Meager -۱

[2] Kalinowski -۲

جدول ۲- پارامترهاي به كار رفته در شبيه سازي با برنامه CERVUS و مقادير به كار رفته براي ۲۳ نژادگان انگور.

Table 2. The parameters used in simulation with the CERVUS program and the values used in simulations for 23 grapevine genotype.

پارامترها	parameters	مقادير به كار رفته Value used
تعداد مادر كانديد	Number of candidate mother	7
نسبت مادرهاي كانديد نمونه گيري شده	Proportion of candidate mothers sampled	1
تعداد نر كانديد	Number of candidate males	4
نسبت نرهاي كانديد نمونه گيري شده	Proportion of candidate males sampled	1
نسبت مكان هاي وارد شده	Proportion of loci typed	0.854
نرخ خطاي وارد كردن داده	Rate of typing error	0.01
سطح اطمينان آزاد	Relaxed confidence level	80%
سطح اطمينان محدود	Strict confidence level	95%

تفاوت بين تعداد ميانگين و تعداد موثر آللها به ازاي هر مكان ژني وجود آلل هاي نادر را نشان مي‌دهد كه فقط در يک يا چند نژادگان از والدين وجود داشته و مي توانند به عنوان شاخص‌هايي در ثبت و شناسايي رقم هاي مربوطه و حفظ حقوق بهنژادگر استفاده شوند. يكي از كاربردهاي اصلي نشانگرهاي ريزماهواره در ژنتيک انگور، شناسايي و تمايز بين نژادگان ها مي باشد. بنابراين انتخاب نشانگرهاي متمايزكننده، تعداد نشانگرهاي لازم را براي تمايز دقيق رقم هاي كاهش مي دهد (۳۲). به منظور تعيين كارايي ۱۴ نشانگر ريزماهواره در ۲۳ نمونه مورد مطالعه، محتواي اطلاعات چند شكلی و هتروزيگوسيتي مورد انتظار و مشاهده شده محاسبه شدند (جدول۳).

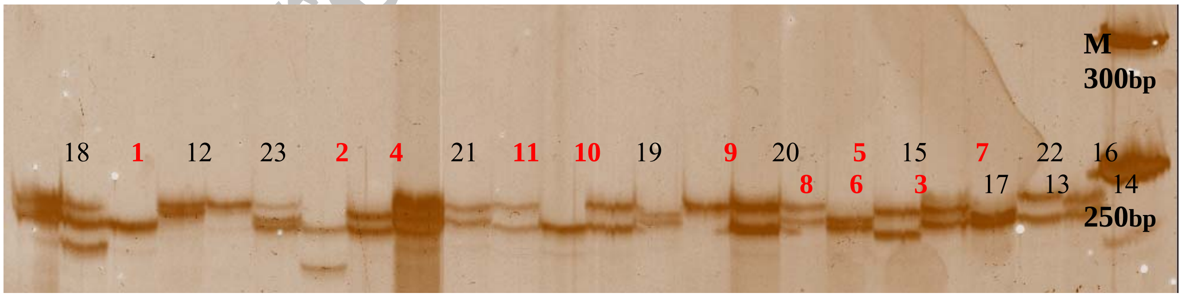

Fig. 1. Illustration of Microsatellite alleles in denature polyacrillamide gel and silver staining for VVMD5 locus. The first column is size marker the weight of each band was showed in front of it.

شكل۱- آللهاي ريزماهواره‌اي مشخص شده روي ژل پلي آكريلاميد ۶% واسرشته ساز و رنگ آميزي نيترات نقره در مكان ژني VVMD5. ستون اول نشانگر اندازه است و وزن هر باند در جلوي آن مشخص شده است.

تنوع ژني يا PIC نيز معيار ديگري در جهت انتخاب بهترين نشانگر است. در نشـانگرهاي مـورد اسـتفاده در اين مطالعه بيشترين مقدار PIC در نشانگرهاي VrZAG64 و VVS2 به ترتيب با ۰/۸۴ و ۰/۸۵ بـراي والـدين و ۰/۸۲ و۰/۷۹ براي نتاج و کمترين آن در نشانگر VVS4 و به ميزان ۰/۴۵ براي والدين و ۰/۳۱ براي نتاج مشاهده گرديد. ميانگين محتواي اطلاعات چند شکل به دست آمـده بـراي والـدين ۰/۷ و بـراي نتـاج ۰/۶۶ بـود (جـدول۳). نشانگرهاي با PIC بالا داراي قدرت تمايز بيشتر خواهند بود. کمترين مقدار هتروزيگوسيتي مشـاهده شـده بـراي والـدين در مکـان هـاي VVMD7و VVS4بـه ميـزان ۰/۴۶ و بيشـترين آن بـه ميـزان ۱۰۰% و در مکـان هـاي VVMD27,VMC4H6وVrZAG64 بود و از ميانگين ۰/۷۷ در بين کل مکان ها برخوردار بودند. کمترين مقدار هتروزيگوسيتي نتاج مربوط به نشـانگر VVS4بـه مقـدار ۰/۳۳ و بيشـترين مقـدار آن مربـوط بـه چهـار نشـانگر VVMD7,VVMD24,VVMD27وVVS2به ميزان ۱۰۰% بود. در صورت انجـام گـرده افشـاني کنتـرل شـده، انگور نيز يک گياه دگربارور محسوب مي شود(۳). بنابراين هدف نهايي اين برنامه بهنژادي نيز توليد نژادگان هاي هتروزيگوت جهت بهره برداري از پديده هتروزيس بوده است. نتايج نشان داد ميـانگين هتروزيگوسـيتي مشـاهده شده در والدين و نتاج اختلاف ناچيزي با ميانگين هتروزيگوسيتي مـورد انتظـار در آنـان داشـت. پـايين‌تـر بـودن هتروزيگوسيتي مشاهده شده از هتروزيگوسيتي مورد انتظار مي تواند به دليل عواملي چون وجود آلل خاموش و يا تلاقي بين افراد مشابه در برنامه بهنژادي مي‌باشد که در نتيجه آن افراد هموزيگوت بيشتر مـي شـوند (۳) ولـي نتايج اين بررسي حاکي از تطابق ايـن دو فـاکتور و در نتيجـه بـالا بـودن افـراد هتروزيگـوت و صـحت آزمـايش، محاسبات و نمونه گيري‌هاي انجام شده در برنامه بهنژادي مي باشد.

جدول ۳- اطلاعات به دست آمده از ١٤ نشانگر SSR در ۲۳ نژادگان انگور.

Table 3. The information of 14 SSR locus for 23 grapevine genotypes.

ردیف row	شانگرهای ریزماهواره Microsatellite Markers	تعداد آلل Allele number		تعداد آلل موثر Effective allele number		هتروزيگوسيتي مورد انتظار (He) Heterozigosity expected		هتروزيگوسيتي مشاهده شده (Ho) Heterozigosity observed		محتواي اطلاعات چند شکل (PIC) Polymorphic information content	
		والدین (P)	نتاج (O)	والدین (P)	نتاج (O)	والدین Parents	نتاج Offspring	والدین (P)	نتاج (O)	والدین (P)	نتاج (O)
1	VVMD5	6	6	3.95	3.37	0.81	0.78	0.64	1	0.75	0.7
2	VVMD7	5	4	2.46	3.13	0.84	0.76	0.46	0.5	0.77	0.68
3	VVMD14	7	5	4.35	2.96	0.84	0.74	0.82	0.67	0.77	0.66
4	VVMD24	3	3	2.24	2.25	0.65	0.65	0.55	1	0.55	0.56
5	VVMD25	5	5	2.8	4.03	0.73	0.82	0.64	0.83	0.64	0.75
6	VVMD27	6	5	4.03	3.64	0.82	0.79	1	1	0.75	0.73
7	VVMD36	5	5	3.22	3.47	0.77	0.79	0.91	0.75	0.69	0.71
8	VVS2	9	7	6.62	4.78	0.91	0.85	0.82	1	0.85	0.79
9	VVS4	4	2	1.82	1.44	0.52	0.39	0.64	0.33	0.45	0.31
10	VMC4G6	6	3	2.55	1.95	0.68	0.58	0.64	0.5	0.61	0.49
11	VMC4H6	7	6	4.26	3.23	0.83	0.76	1	0.83	0.77	0.69
12	VMC4A1	5	5	3.36	4.41	0.87	0.84	0.91	0.67	0.70	0.77
13	VrZAG64	10	9	6.1	5.65	0.89	0.88	1	0.75	0.84	0.82
14	VrZAG21	4	3	3.66	2.07	0.64	0.63	0.82	0.83	0.73	0.52
میانگین	Mean	5.86	5	3.38	2.9	0.76	0.73	0.77	0.76	0.7	0.66

رويكرد حذف

نتايج ماتريس تشابه حاصل از ضريب تشابه دايس[1] نشان داد همه نژادگان‌ها و نتاج به جز در مورد رقم هاي پدري ‘بيدانه سفيد’ و ‘بيدانه قرمز’ از يكديگر تفكيك شده و با يكديگر تشابه ندارند (جدول٤). فتاحي مقدم و همكاران (٥) نيز به وجود پروفيل مشابه در ده مكان ريزماهواره‌اي به كار رفته توسط آن ها روي رقم هاي ‘بيدانه سفيد’ و ‘بيدانه قرمز’ و ناتواني نشانگر ريزماهواره در تشخيص تنوع جهش‌هاي رنگ حبه در انگور اشاره نموده‌اند. سفك و همكاران (٣١) و لوپز و همكاران (٢١) نيز گروه هايي از رقم ها با پروفيل ريز ماهواره‌اي مشابه ولي رنگ حبه متفاوت گزارش نمودند.

بيشترين تشابه بين والدين پدري با نتاج ٧٢/. مربوط به ‘ياقوتي’ و نژادگان K_{67} و بيشترين تشابه بين والدين مادري با نتاج به ميزان ٠/٦٥ مربوط به رقم ‘علي بابا’ و سه نژادگان S_{54}، S_{55} و S_{40} بود و با توجه به نتايج فوق مي‌توان نتيجه‌گيري كرد كه در بين جمعيت والدين، خود گرده‌افشاني رخ نداده و نتاج حاصل از تلاقي كنترل شده به دست آمده‌اند. فتاحي مقدم و همكاران (٥) نيز فاصله كمتر از ٠/٣٠(تشابه بالاي ٠/٧٠) براساس گروه بندي حاصل از تجزيه خوشه‌اي و برخورداري از فراواني نژادگاني(١:٢:١) براي يك مكان تك ژني هم بارز را ملاك خود گشني قرار داده‌اند. در اين بررسي بيشترين تشابه نتاج با يكديگر ٠/٨٦ و مربوط به نژادگان‌هاي S_{54} و S_{55} بود كه به احتمال برادر و خواهر تني بودند.

روش حذف و بررسي فواصل ژنتيكي از روش هاي ساده تجزيه والديني به شمار مي روند و در آن ها نژادگان والدين كانديد بر طبق نژادگان نتاج مقايسه شده و در نهايت یک والد از ميان سايرين جدا شده و بقيه حذف مي شود. اما در صورتي كه یک جفت شدن ناجور و يا هرگونه اشتباهي مثل آلودگي، حذف آلل حين يادداشت برداري، لغزش آنزيم پلي‌مراز، آلل‌هاي خاموش يا اشتباه فرد كاربر رخ دهد، نژادگان ديگري به عنوان والد معرفي مي‌گردد(١٩). نتايج به دست آمده از به كارگيري مكان‌هاي آغازگري مشابه، با دستگاه‌هاي تمام اتوماتيک، در مورد رقم هاي پدري ‘بيدانه سفيد’ و ‘بيدانه قرمز’ به وجود پروفيل ژنتيكي ١٠٠% مشابه اشاره دارد(٥)، اما در اين مطالعه كه رنگ آميزي ژل و يادداشت برداري نتايج به صورت دستي انجام گرديده، تشابه آن ها، ٠/٩٦ برآورد گرديد كه به نظر مي رسد ٠/٠٤ اختلاف موجود مربوط به اشتباه در حين يادداشت برداري داده‌ها مي باشد. بنابراين رويكردي لازم است تا افزون بر دقت بيشتر از سازوكار مناسبي جهت ردیابي خطاها و ارائه حد اطمينان برخوردار باشد. چرا كه در شرايط حذف يك مورد جورشدن اشتباهي كافي است تا يك والد كانديد حذف گردد. در اين گونه شرايط رويكردهاي مبتني بر درست نمايي به عنوان راه هاي جبران نقصان مجموعه داده ها از قبيل كمبود تنوع ژنتيكي، اشتباه در امتياز دهي، جهش، آلل هاي خاموش يا نمونه هاي ناقص به كار مي روند (١٨).

براي انجام تجزيه اسامي نتاج مورد نظر و اسامي والدين كانديد در اختيار برنامه قرار داده شد. برنامه درست‌نمايي هر یک از والدين كانديد يا جفت آن ها را براي والد بودن در مورد تک تک نتاج محاسبه نمود و مقدار اطمينان از والد بودن شبيه‌ترين كانديد (جفت كانديد) با توجه به سطح بحراني LOD يا دلتاي شبيه سازي برآورد گرديد. نتايج به صورت مقايسه موفقيت به دست آمده در انتساب والدين نسبت به آنچه در مرحله شبيه سازي پيش بيني شده بود در جدول ٥ ارائه شده است. مقدار انتساب در روش جفت والديني ٦٧% بود و ٣٣% نتاج ارجاع داده نشدند. مقدار انتساب در روش تجزيه والد مادري ١٠٠% و در روش تجزيه پدري ٧٥% بود (جدول ٥).

---

[1] Dice

جدول ۴- ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه دایس.

Table 4 . The similarity matrix based on Dice similarity coefficient.

	‘Rajabi’ ‘رجبي’	‘Ghezel’ ‘قزل’	‘Sultana’ ‘بی‌دانه سفيد’	R84	K67	R80	B98	‘Askari’ ‘عسكري’	I21	S54	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	‘Red-Sultana’ ‘بی‌دانه قرمز’	S55	‘Tabarze’ ‘تبرزه’	‘Alhaghi’ ‘الحقي’	S40	‘Alibaba’ ‘علی بابا’	K93	‘Muscat’ ‘موسكات’	I73	‘Dizmary’ ‘ديزماري’	L125	A119
‘Rajabi’ ‘رجبي’	1.00																						
‘Ghezel’ ‘قزل’	0.19	1.00																					
‘Sultana’ ‘بی‌دانه سفيد’	0.19	0.33	1.00																				
R84	0.20	0.28	0.41	1.00																			
K67	0.07	0.36	0.64	0.59	1.00																		
R80	0.28	0.43	0.50	0.74	0.62	1.00																	
B98	0.33	0.21	0.41	0.07	0.22	0.15	1.00																
‘Askari’ ‘عسكري’	0.20	0.34	0.55	0.57	0.44	0.59	0.21	1.00															
I21	0.39	0.47	0.40	0.14	0.29	0.29	0.48	0.41	1.00														
S54	0.13	0.47	0.40	0.41	0.50	0.29	0.21	0.28	0.60	1.00													
‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	0.00	0.36	0.57	0.30	0.69	0.31	0.22	0.44	0.57	0.57	1.00												

‘Red-Sultana’ ‘بی‌دانه قرمز’	0.19	0.33	0.96	0.41	0.64	0.50	0.41	0.55	0.40	0.40	0.57	1.00											
S55	0.07	0.43	0.43	0.37	0.54	0.31	0.30	0.37	0.64	0.86	0.62	0.43	1.00										
‘Tabarze’ ‘تبرزه’	0.27	0.21	0.34	0.21	0.15	0.30	0.43	0.21	0.28	0.14	0.22	0.34	0.15	1.00									
‘Alhaghi’ ‘الحقي’	0.13	0.33	0.60	0.55	0.57	0.43	0.28	0.41	0.33	0.60	0.36	0.60	0.57	0.14	1.00								
S40	0.13	0.39	0.39	0.40	0.55	0.28	0.20	0.40	0.52	0.77	0.55	0.39	0.76	0.00	0.65	1.00							
‘Alibaba’ ‘علي بابا’	0.20	0.41	0.48	0.57	0.67	0.52	0.21	0.36	0.48	0.76	0.44	0.48	0.74	0.14	0.69	0.67	1.00						
K93	0.07	0.41	0.48	0.43	0.44	0.52	0.21	0.64	0.34	0.41	0.44	0.48	0.44	0.29	0.34	0.33	0.36	1.00					
‘Muscat’ ‘موسکات’	0.39	0.33	0.20	0.28	0.14	0.29	0.28	0.28	0.33	0.33	0.07	0.20	0.36	0.34	0.27	0.26	0.28	0.41	1.00				
I73	0.56	0.19	0.32	0.13	0.21	0.21	0.60	0.33	0.58	0.26	0.28	0.32	0.34	0.27	0.19	0.25	0.33	0.13	0.32	1.00			
‘Dizmary’ ‘ديزماري’	0.34	0.29	0.36	0.37	0.31	0.46	0.22	0.52	0.14	0.21	0.15	0.36	0.15	0.30	0.21	0.28	0.22	0.44	0.36	0.28	1.00		
L125	0.39	0.33	0.60	0.34	0.36	0.36	0.28	0.34	0.33	0.40	0.36	0.60	0.29	0.14	0.33	0.39	0.41	0.34	0.27	0.45	0.36	1.00	
A119	0.32	0.33	0.33	0.41	0.29	0.43	0.21	0.48	0.33	0.27	0.29	0.33	0.29	0.21	0.27	0.32	0.21	0.48	0.60	0.39	0.43	0.53	1.00

جدول۵- نتايج حاصل از انجام تجزيه‌اي والديني با داده‌هاي واقعي.

Table 5. The results of parentage analysis with true data.

سطح اطمينان Confidence level	تجزيه براي والد مادر Maternity analysis				تجزيه براي جفت والدين Parent pair analysis				تجزيه براي والد پدر Paternity analysis			
	درصد انتساب Assignment %		تعداد انتساب Assignments		درصد انتساب Assignment %		تعداد انتساب Assignments		درصد انتساب Assignment %		تعداد انتساب Assignments	
	Expected	Observed	Expected	Observed	Expected	Observed	Expected	Observed	Expected	Observed	Expected	Observed
Strict 95%	100%	100 %	12	12	100%	67%	12	8	100%	75%	12	9
Relaxed 80%	100%	100 %	12	12	100%	67%	12	8	100%	75%	12	9
Unassigned انتساب انجام نشده	0%	0%	0	0	0%	33%	0	4	0%	25%	0	3
Total مجموع	100%	100 %	12	12	100%	100%	12	12	100%	100%	12	12

شناسايي والد مادري

هر والد مادري و نتاج آن در ١٤ مكان ريز ماهواره مورد مقايسه قرار گرفتند. جور شدن اشتباه، دست كم يک بار براي نژادگان نتاج R_{84}، S_{55} و S_{54} و والد آن ها و بيشترين ۵ بار در مورد نژادگان B_{98} و والد آن بود. امتياز LOD جفت والد مادر- نتاج نيز برآورد گرديد كه كمترين آن ۹- و مربوط به والد مادري رجبي و نژادگان I_{73} و بيشترين آن ۱/۷۵ مربوط به والد مادري علي بابا و نژادگان K_{67} بود. در بين مقادير LOD محاسبه شده مقادير مثبت و منفي وجود داشت. هرچند مقادير منفي احتمال والد نبودن را رد مي‌كند، اما حاكي از احتمال پايين براي والد بودن و نيز وقوع جورشدن اشتباهي در آن مورد مي‌باشد. در بين مقاديرLOD محاسبه شده براي والدين مادري، مقدار صفر كه حاكي از احتمال يكسان براي والد بودن و نبودن است مشاهده نگرديد و اين تجزيه در مورد تمام افراد از سطح احتمال معني داري برخوردار بود.

شناسايي والد پدري

نتايج حاصل از تجزيه داده ها به‌منظور شناسايي والد پدري در جدول ٦ آورده شده است. مقادير بحراني LOD مربوط به بيدانه سفيد و قرمز صفر برآورد گرديده است كه نشان مي دهد اين برنامه به خاطر تشابه نزديک به ۱۰۰% پروفيل ژنتيكي آن ها، حاصل از نشانگر ريزماهواره، قادر نخواهد بود بين اين دو والد براي نتاج خاصي تفاوت قائل شود و احتمال والد بودن و نبودن آنها براي هر يک از نتاج مورد نظر يكسان است. اما همان طور كه از نام اين دو والد نيز پيداست از لحاظ رنگ ميوه با يكديگر متفاوت مي‌باشند. اونز (٢٦) ضمن اشاره به نامشخص بودن ژنتيک توارث و چگونگي كنترل رنگ حبه يا همان توليد آنتوسيانين در انگور به مداركي اشاره نمود كه حاكي از كنترل ژنتيكي مرحله آغازين توليد آنتوسيانين حبه هاي انگور گونه وينيفرا توسط يک مكان غالب بوده و ميوه‌هاي سبز رنگ (سفيد)، شكل مغلوب آن مي‌باشند. بنابراين با توجه به اين موضوع، در صورت خالص و مغلوب بودن نژادگان والد مادري در مكان ژني رنگ حبه و حضور آنتوسيانين در حبه‌هاي نتاج مربوط به والدين بيدانه سفيد و قرمز مي‌توان والد پدري بيدانه قرمز را به عنوان والد پدري نتاج داراي حبه هاي

قرمز معرفي نمود. به احتمال از اين موضوع بتوان در تفکيک والد بيدانه سفيد و قرمز براي نتاج K_{67} باحبه به طور کامل قرمز ونتاج L_{125} و B_{98} باحبه سفيد بهره گرفت.

شناسايي جفت والدين

در اين قسمت از تجزيه تعدادي از سطوح معني‌دار نشدند، به استثناء يک مورد که مربوط به ياقوتي و نژادگان B_{98} بود ساير موارد مربوط به والد پدري بيدانه سفيد و قرمز(با ضريب تشابه ۰/۹۶) بودند. در اين موارد سطح اطمينان معني‌دار نشد. بالاترين تعداد جور شدن اشتباهي نيز به ۹ مورد افزايش يافت. مقايسه بين مقادير انتساب انجام شده توسط سه تجزيه مجزاي والديني (پدري، مادري و جفت والدي با جنسيت مشخص والدين) در جدول۷ ارائه شده است. مقدار انتساب در روش جفت والديني ٦٧% بوده و ۳۳% نتاج (٤ نژادگان از ۱۲ نژادگان) به والد مشخصي ارجاع داده نشده‌اند. در حالي‌که مقدار انتساب در روش تجزيه والد مادري ۱۰۰% بوده و تعداد نژادگان ارجاع داده نشده صفر بود، در روش تجزيه پدري اين مقدار ۷۵% و تعداد نژادگان ارجاع داده نشده ۲۵% (۳نژادگان از ۱۲ نژادگان) است (جدول ٥). با توجه به اين که امتياز LOD بيانگر لگاريتم طبيعي درست‌نمايي يک والد خاص به مقدار درست‌نمايي يک والد تصادفي مي‌باشد، از اين رو روشي که برنامه والد تصادفي مورد نظر را بهتر تشخيص داده باشد، امتياز LOD بيشتري دارد. بنابراين مي‌توان با مقايسه مقادير LOD حاصل از روش‌هاي مختلف تجزيه والديني موجود در برنامه، از LOD بيشتر به عنوان ملاکي جهت انتخاب والد اصلي و واقعي استفاده نمود. دي وسچي استراز و همکاران (۱۳) نيز با به کارگيري رويکردهاي انتساب مبتني بر درست‌نمايي موفق به انجام تجزيه والديني براي پنج هزار نژادگان انگور يک مجموعه حاوي۷٥۰۰ نژادگان گرديدند و اظهار داشتند که استفاده از رويکردهاي انتساب مبتني بر درست‌نمايي، بر خلاف روش هاي ديگر، محدوديتي براي تعداد نمونه مورد بررسي نداشته و به اطلاعات قبلي از شجره افراد نيز نيازي ندارد.

نتيجه گيري نهايي

بنا بر نتايج به دست آمده رويکردهاي انتساب مبتني بر درست نمايي و نرم افزار CERVUS 3.0 به خوبي قادر به جبران نقصان مجموعه داده ها در زمينه کمبود تنوع ژنتيکي، اشتباه در امتيازدهي، جهش، آلل‌هاي نول يا نقص نمونه‌ها بوده و همچنين قادر به تعيين والدين مي‌باشد (شکل۲). از بين سه روش تجزيه بکار رفته، حالتي که داراي بالاترين LOD بود ملاک تصميم‌گيري قرار داده شد و پس از مقايسه نتايج، والدين نهايي نتاج به صورت جدول ۸ معرفي گرديدند. در مورد والد مادري نژادگان‌هاي B_{98} و I_{21}، امتياز LOD منفي بود. هرچند امتياز LOD منفي حاکي از احتمال کم براي والد بودن است ولي اين احتمال را منتفي نمي‌داند، منفي شدن امتياز LOD در اين جا مي‌تواند به دليل مشترک بودن آلل‌ها بين والدين و نتاج آنها باشد که به خاطر شباهت ژنتيکي والدين به يکديگر به وجود مي‌آيد. با توجه به منشأ جغرافيايي مشترک رقم هاي والديني (‘رجبي’، ‘تبرزه’ و ‘قزل’)، احتمال برخورداري از اجداد با زمينه ژنتيکي مشترک بين آنها وجود دارد. در اين گونه موارد هر دو کانديد مشابه به عنوان والد معرفي مي‌گردند. از نتايج اين گونه موارد که دو والد با تفاوت ظاهري مشخص از لحاظ ژنتيکي الگوي مشابهي نشان مي‌دهند، مي‌توان براي بهبود تلاقي برگشتي و جلوگيري از پسرفت ژنتيکي نتاج در برنامه‌هاي بهنژادي بعدي استفاده نمود.

جدول ٦- نتايج حاصل از تجزيه جهت شناسايي والد پدري.

Table 6. The results of paternity analysis.

سطح اطمينان جفتي Pair confidence	سطح بالاي Pair top LOD	امتياز جفتي Pair LOD score	تعدا د جفت شدن ناجور Pair loci mismatching	شناسه والد پدري Candidate father ID	احتمال حذف نشدن والد اول First non-exclusion probability	تعداد مکان Loci typed	شناسه نتاج Offspring ID
95% *	1.96	1.96	0	‘Askari’ ‘عسکري’	4.53E-03	14	R84
95% ^{ns}	0	1.51	1	‘Sultana’ ‘بيدانه سفيد’	5.71E-03	14	K67
95% ^{ns}	0	1.51	1	‘Red-Sultana’ ‘بيدانه قرمز’	5.71E-03	14	K67
95% *	1.71	1.71	2	‘Askari’ ‘عسکري’	6.88E-04	14	R80
95% ^{ns}	0	-3.61	4	‘Sultana’ ‘بيدانه سفيد’	1.63E-04	14	B98
95% ^{ns}	0	-3.61	4	‘Red-Sultana’ ‘بيدانه قرمز’	1.63E-04	14	B98
95% *	-0.03	-0.03	2	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	2.49E-03	14	I21
95% *	0.42	0.42	2	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	1.56E-02	14	S54
95% *	0.54	0.54	2	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	9.94E-03	14	S55
95% *	3.21	3.21	2	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	1.36E-03	14	S40
95% *	0.5	0.5	1	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	3.04E-03	14	K93
95% *	-0.24	-2.42	6	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	1.04E-04	14	I73
95% ^{ns}	0	0.28	2	‘Sultana’ ‘بيدانه سفيد’	1.51E-03	14	L125
95% ^{ns}	0	0.28	2	‘Red-Sultana’ ‘بيدانه قرمز’	1.51E-03	14	L125
95% *	-2.17	-2.17	4	‘Askari’ ‘عسکري’	9.00E-04	14	A119

*: معني‌دار شده Significant

ns: معني‌دار نشده Non significant

نتايج نشان داد استفاده از نرم افزار CERVUS در مورد نژادگان هاي S_{54} و S_{40} که از لحاظ والد پدري مشابه بوده و خواهر و برادر ناتني[1] بودند به خوبي عمل کرده و ضمن معرفي والد پدري آن ها با امتيازLOD مثبت، در مورد والد مادري آن ها نيز با محاسبه امتياز LOD مثبت نتايج قابل اطميناني به دست آمد (شکل۳).

---

[1] Half sib

جدول ۷- مقايسه امتياز LOD در سه روش تجزيه مادري، پدري و جفت والديني.

Table 7. Comparison between triple method of analysis for maternity, paternity and parent pair within LOD score.

تجزيه مادري maternity			تجزيه پدري paternity			تجزيه جفت والدي parent pair				
شناسه نتاج Offspring ID	امتياز LOD	والد مادري Maternal parent	شناسه نتاج Offspring ID	امتياز LOD	والد پدري Paternal parent	شناسه نتاج Offspring ID	امتياز LOD	والد پدري Paternal parent	امتياز LOD	والد مادري Maternal parent
R_{84}	-3.75	‘Alibaba’ ‘علي بابا’	R_{84}	1.96	‘Askari’ ‘عسكري’	R_{84}	2.47	‘Askari’ ‘عسكري’	-3.79	‘Alibaba’ ‘علي بابا’
K_{67}	1.75	‘Alibaba’ ‘علي بابا’	K_{67}	1.51	‘Sultana’ ‘بيدانه سفيد’	K_{67}	-0.08	‘Sultana’ ‘بيدانه سفيد’	1.75	‘Alibaba’ ‘علي بابا’
R_{80}	-0.01	‘Alhaghi’ ‘الحقي’	K_{67}	1.51	‘Red-Sultana’ ‘بيدانه قرمز’	K_{67}	-0.08	’Red-Sultana’ ‘بيدانه قرمز’	1.75	‘Alibaba’ ‘علي بابا’
B_{98}	-0.013	‘Tabarze’ ‘تبرزه’	R_{80}	1.71	‘Askari’ ‘عسكري’	R_{80}	-3.85	‘Sultana’ ‘بيدانه سفيد’	-0.01	‘Muscat’ ‘موسكات’
I_{21}	-0.011	‘Ghezel’ ‘قزل’	B_{98}	-3.61	‘Sultana’ ‘بيدانه سفيد’	R_{80}	-3.85	‘Red-Sultana’ ‘بيدانه قرمز’	-0.015	‘Muscat’ ‘موسكات’
S_{54}	-1.26	‘Alhaghi’ ‘الحقي’	B_{98}	-3.61	‘Red-Sultana’ ‘بيدانه قرمز’	B_{98}	-0.02	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	-0.019	‘Rajabi’ ‘رجبي’
S_{55}	0.33	‘Alibaba’ ‘علي بابا’	I_{21}	-0.003	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	I_{21}	-5.33	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	-0.013	‘Rajabi’ ‘رجبي’
S_{40}	-4.33	‘Alhaghi’ ‘الحقي’	S_{54}	0.42	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	S_{54}	-5.26	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	-2.97	‘Alibaba’ ‘علي بابا’
K_{93}	-0.84	‘dizmary’ ‘ديزماري’	S_{55}	0.54	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	S_{55}	-5.1	Yaghuti’ ‘ياقوتي’	0.33	‘Alibaba’ ‘علي بابا’
I_{73}	-9	‘Rajabi’ ‘رجبي’	S_{40}	3.21	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	S_{40}	-1.6	‘Yaghuti’ ‘ياقوتي’	-4.33	‘Alhaghi’ ‘الحقي’
L_{125}	-0.11	‘Rajabi’ ‘رجبي’	K_{93}	0.5	‘Askari’ ‘عسكري’	K_{93}	-7.29	‘Sultana’ ‘ بيدانه سفيد’	-0.84	‘Dizmary’ ‘ديزماري’

Table 7 continued

ادامه جدول ۷

A_{119}	-0.11	‘Muscat’ ‘موسکات’	I_{73}	-2.42	‘Yaghuti’ ‘یاقوتي’	K_{93}	-7.29	‘Red-Sultana’ ‘بیدانه قرمز’	-0.84	‘Dizmary’ ‘دیزماري’
			L_{125}	0.28	‘Sultana’ ‘بیدانه سفید’	I_{73}	-0.21	‘Yaghuti’ ‘یاقوتي’	-9	‘رجبي’ ‘Rajabi’
			L_{125}	0.28	‘Red-Sultana’ ‘بیدانه قرمز’	L_{125}	-5.4	‘Sultana’ ‘بیدانه سفید’	-0.11	‘رجبي’ ‘Rajabi’
			A_{119}	-2.17	‘Askari’ ‘عسکري’	L_{125}	0.28	‘Red-Sultana’ ‘بیدانه قرمز’	-0.114	‘رجبي’ ‘Rajabi’
						A_{119}	-2.17	‘Askari’ ‘عسکري’	-0.266	‘Alibaba’ ‘علي بابا’

جدول ۸- نتایج حاصل از مقایسه سه روش شناسایي والدیني براي چهار نژادگان برتر.

Table 8. Results from comparison between three parentage methods for 4 superior genotypes.

	رویکرد انتساب مبتني بردرست نمایي Likelihood based assignment				نتیجه نهایي براي جفت والدین معرفي شده Final result For parent pair
	پدري father(F)	مادري mother(M)	جفت والد Parent pair		
	پدر(F)	مادر(M)	پدر(F)	مادر(M)	پدر(F)مادر × (M)
B_{98}	‘بیدانه سفید’(قرمز) ‘Sultana’ (‘Red-S.’)	‘تبرزه’ ‘Tabarze’	‘یاقوتي’ ‘Yaghuti’	‘رجبي’ ‘Rajabi’	(‘بیدانه سفید’ یا ‘قرمز’) × (‘رجبي’ یا ‘تبرزه’) (‘Sultana’ or ‘Red- S’.)×(‘Rajabi’ or ‘Tabarze’)
LOD	-3.61	-0.13	-0.229	-0.197	
I_{21}	‘یاقوتي’ ‘Yaghuti’	‘قزل’ ‘Ghezel’	‘یاقوتي’ ‘Yaghuti’	‘رجبي’ ‘Rajabi’	(‘یاقوتي’) × (‘رجبي’ یا ‘قزل’) (‘Ghezl’ or ‘Rajabi’)×(‘Yaghuti’)
LOD	-0.034	-0.115	-5.33	-0.135	
S_{54}	‘یاقوتي’ ‘Yaghuti’	‘الحقي’ ‘Alhaghi’	‘یاقوتي’ ‘Yaghuti’	‘علي بابا’ ‘Alibaba’	(‘یاقوتي’) × (‘علي بابا’) (‘Alibaba‘)×(‘Yaghuti’)
LOD	0.42	-1.26	-5.26	2.97	
S_{40}	‘یاقوتي’ ‘Yaghuti’	‘الحقي’ ‘Alhaghi’	‘یاقوتي’ ‘Yaghuti’	‘الحقي’ ‘Alhaghi’	(‘یاقوتي’) × (‘الحقي’) (‘Alhaghi‘)×(‘Yaghuti’)
LOD	3.21	-4.33	-1.6	4.33	

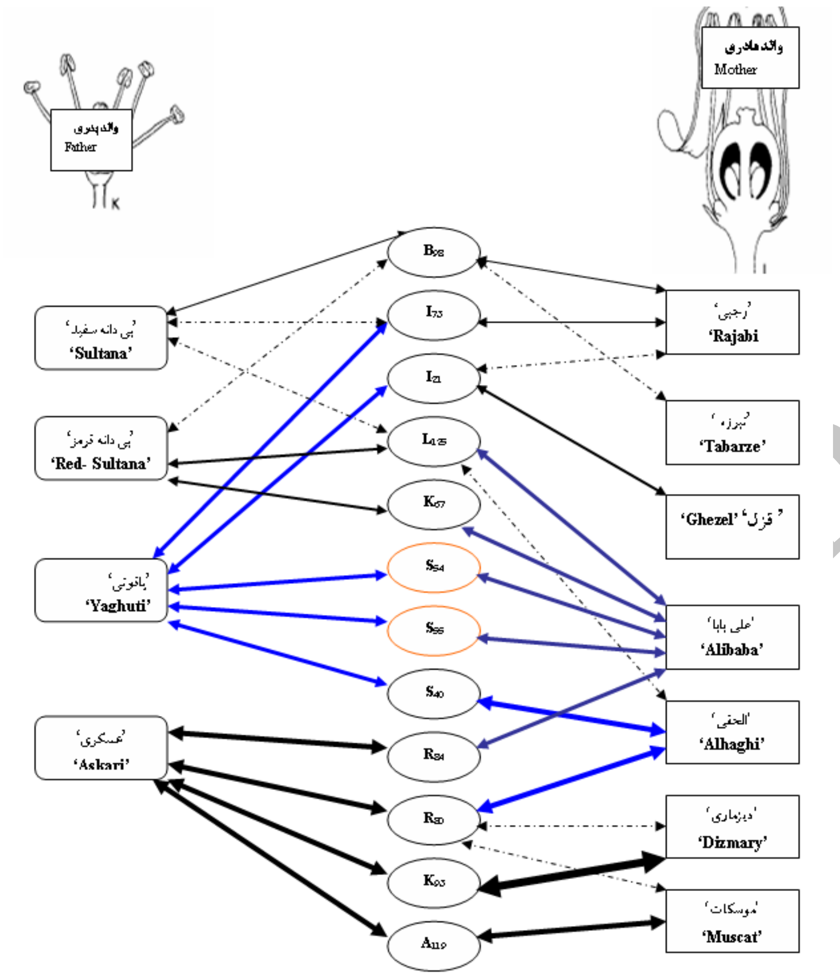

Fig. 2. The results of parentage analysis for 4 father, 7 mother parents and 12 superior progenies. Bold flash showes categorical results and dot flash showes fractional results.

شكل ۲- نتايج حاصل از تجزيه والديني ٤ والد پدري،۷ والد مادري و ۱۲ نژادگان نتاج برتر در انگور پيكـان هـاى پر نتايج قطعي و پيكان هاى نقطه چين نتايج جزئي را نشان مي دهد.

REFERENCES

منابع

۱. دولتي بانه، ح. ۱۳۸٦. ارزيابي تنوع برخي رقم هاي انگور استان آذربايجان غربـي. رسـاله دكتـري علـوم باغباني، دانشكده كشاورزي دانشگاه تبريز.

۲. رمضاني، ا .۱۳۸۵. تعيين تنوع ژنتيكي رقـم هـاي انگـور بـا اسـتفاده از نشـانگر ريزمـاهواره. پايـان نامـه كارشناسي ارشد، دانشكده فني و مهندسي دانشگاه بين‌المللي امام خميني(ره).

۳. عـالي پنـاه، ل.، ح. حجـت، ب. قـره ياضـي، م. غلامـي، ا. محمـدي و ج. نجفـي.۱۳۸۵. تعيـين تنـوع ژنتيكـي انگورهاي استان فارس و خراسان با استفاده از نشانگرهاي ريز ماهواره. مجله علـوم كشـاورزي ايـران ۳۷ :۵۱۷-۵۲۷.

٤. عرفاني مقدم، ج.، ع. عبادي، م. ر. فتاحي مقدم و م. حدادي نژاد.١٣٨٧. معرفي نژادگان هاي بيدانه به دست آمده از تلاقي برخي رقم هاي بيدانه و دانه‌دار انگور. مجله علوم كشاورزي ايران ٤١٩-٤٠٩: ٣٩.

٥. فتاحي مقدم، م. ر.، ذ. زماني، ع. عبادي، ب. قره ياضي، ش. ا. ملنباكر.١٣٨١. توارث آلل هاي مكان هاي ژني ريزماهواره (ميكروساتلايت) در جمعيت حاصل از تلاقي انگور رقم هاي بيدانه قرمز × موسكات هامبورگ. مجله علوم و فنون باغباني ايران٥٠-٣٧: ٣.

6. Bassam. B., J.G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 196:80-83.
7. Bowers, J.E., G.S. Dangl, R. Vignani and C.P. Meredith. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape *(Vitis vinifera* L.). Genome 39:628–633.
8. Bowers, J.E., and C.P. Meredith. 1997. The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. Nat. Genet. 16:84–87.
9. Bowers J., J.M. Boursiquot, P. This, K. Chu, H. Johansson and C.P. Meredith. 1999. Historical genetics: the parentage of Chardonnay, Gamay and other wine grapes of northeastern France. Science 285:1562–1565.
10. Chakraborty. R, T.R. Meagher and P.E. Smouse. 1988. Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected proportion of offspring with unambiguous paternity. Genetics 118: 527–536.
11. Cipriani. G., G. Frazza, E. Peterlunger and R. Testolin. 1994. Grapevine fingerprinting using microsatellite repeats. Vitis 33:211–215.
12. Di Gaspero, G., G. Cipriani., M.T. Marrazzo, D. Andreetta, M.J. Prado Castro, E. Peterlinger, R. Testolin, 2005. Isolation of (AC) n-microsatellites in *Vitis vinifera* L. and analysis of genetic background in grapevines under marker assisted selection. Mol. Breed. 15:11–20.
13. Di Vecchi Staraz, M., M. Boselli, S. Gerber, V. Laucou, T. Lacombe, P. This and D. Vares. 2007. Famoz: A software for large scale parentage analysis in *Vitis vinifera* L. species. Acta Hort. 754: 79- 83.
14. Ellstrand, N.C. 1984. Multiple paternity within the fruits of the wild radish, *Raphanus sativus*. Amer. Natu. 123:819– 828.
15. Fatahi, R., A. Ebadi., N. Bassil., S.A. Mehlenbacher and Z. Zamani. 2003. Characterization of Iranian grape cultivars using microsatellite markers. Vitis 42:185-192.
16. Galet, P. 1964. Varieties and vineyards of France. Dehan, Montpellier (in French).
17. Hanken J. and P.W. Sherman. 1981. Multiple paternity in Belding’s ground squirrel litters. Science 212: 351–353.
18. Jones, A. and W. Ardren. 2003. Methods of parentage analysis in natural populations Mol. Ecol. 12:2511– 2523.
19. Kalinowski, S., M. Taper, and T. Marshal. 2007. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol. Ecol. 16: 1099–1106.

20. Laurentin H. 2009. Data analysis for molecular characterization of Genet. Resour. Crop Evol. 56:277–292.
21. Lopes, MS., K.M. Sefc, E. Eiras Dias, H. Steinkellner, M. Laimer da Câmara Machado and A. da Câmara Machado. 1999. The use of microsatellites for germplasm management in a Portuguese grapevine collection. Theor. Appl. Genet. 99:733–739.
22. Meagher, T.R. 1986. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. I. Identification of most-likely male parents. Amer. Natu. 128:199–215.
23. Meagher, T.R. and E.A. Thompson. 1986. The relationship between single and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. Theor. Popul. Biol. 29:87–106.
24. Milkman, R. and R.R. Zeitler. 1974. Concurrent multiple paternity in natural and laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. Genetics 78: 1191–1193
25. Neff, B.D., J. Repka and M.R. Gross 2001. A bayesian framework for parentage analysis: the value of genetic and other biological data. Theor. Popul. Biol. 59:315–331.
26. Owens, C.L .2008. Grapes. In: J.F. Hancock, (ed.), Temperate Fruit Crop Breeding Germplasm to Genomics Temperate Fruit Crop Breeding. Springer Science 197-234.
27. Pena, S.D.J. and R. Chakraborty. 1994. Paternity testing in the DNA era. Trends in Genetics 10:204–209.
28. Riaz, S., E. Keith G.S. Dangl, J.M. Boursiquot and C.P. Meredith. 2002. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated wine grape cultivars. J Amer. Soc. Hort. Sci. 127:508–514.
29. Riaz, S., A. Doligez, R.J. Henry and M.A. Walker, 2007. Grapes. In: Kole, C. (ed.), Fruits and Nuts (Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Vol 4). Heidelberg, Germany, Springer-Verlag. 63-94.
30. Sefc, K.M., H. Steinkellner, H.W. Wagner, J. Glössl and F. Regner. 1997. Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevines. Vitis. 36:179–183.
31. Sefc K.M., F. Regner, J. Glössl and H. Steinkellner. 1998. Genotyping of grapevine and rootstock cultivars using microsatellite markers. Vitis 37:15–20.
32. Sefc, K.M., M.S. Lopes, F. Lefort, R. Botta, K.A. Roubelakis-Angelakis, J. Ibanez, I. Pejic, H.W. Wagner, J. Glössl and H. Steinkellner. 2000. Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. Theor. Appl. Genet. 100:498–505.
33. Thomas, M.R., and N.S. Scott. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence tagged sites (STSs). Theor. Appl. Genet. 86:985–990.
34. Thomas. M.R., P. Cain and N.S. Scott. 1994. DNA typing of grapevines: a universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. Plant Mol Biol. 25: 939–949.

35. Vouillamoz, J.F., D. Maigre and C.P. Meredith. 2004. Identity and parentage of two alpine grape cultivars from Switzer-land (*Vitis vinifera* L. Lafnetscha and Himbertscha). Vitis 43:81–87.