

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های سیب ایران با استفاده از نشانگر RAPD

شاهین جهانگیرزاده خیابوی^۱، حسن نور افکن^{۲*} و سیما دامیار^۳

چکیده

جمع‌آوری و ارزیابی ژرمپلاسمها در برنامه‌های اصلاحی درختان میوه دارای نقش اساسی است. نشانگرهای مولکولی متفاوتی برای این نوع ارزیابیها بهکار برده شده‌اند که مارکر RAPD جزء مارکرهای پرکاربرد در مورد شناسایی ژنوتیپ‌ها و ارقام گوناگون سیب میباشد. در این پژوهش تنوع ژنتیکی 23 ژنوتیپ بومی ایران (از سه منطقه آذربایجان، البرز مرکزی و زاگرس مرکزی) و رقم تجاری گرانیاسمیت به عنوان شاهد توسط 11 آغازگر RAPD سری TIB MOLBIOL بررسی شد. تعداد متوسط نوار به ازای هر آغازگر 10/27 بود. تجزیه و تحلیل دادهها با نرمافزار NTSYS با کاربرد ضریب تشابه DICE برای تعیین میزان تشابه انجام شد و دندروگرام به وسیله الگوریتم UPGMA رسم گردید. در حالت کلی، نتایج داده‌های مولکولی، نمونههای هر منطقه را بهطور جداگانه از سایر مناطق جدا کرد. البته برخی نمونههای مناطق در خوشه‌های منطقه‌ای جز منطقه خود قرار گرفتند که این موضوع میتواند به دلیل انتقال ژنوتیپها بین مناطق در زمان گذشته باشد. میزان چند شکلی بهدست آمده در این پژوهش بالا بود (68/62 درصد). بر اساس دادههای مولکولی، دامنه شباهت بین نمونهها از 0/378 تا 0/723 متغیر بود. با توجه به نتایج بهدست آمده میتوان گفت که تنوع ژنتیکی بالایی در ژنوتیپهای سیب مناطق مختلف وجود دارد، ولی تفاوت درون منطقه‌ای جزئی بود. بهطور کلی، بررسی تنوع ژنتیکی نشان داد که مارکر RAPD میتواند در شناسایی نواحی چند شکلی و تخمین فاصله ژنتیکی و مدیریت ژرمپلاسم ژنوتیپها و ارقام سیب مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: سیب، ژرم پلاسم، تنوع ژنتیکی، ضریب تشابه، RAPD.

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۸

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

۲- عضو هیأت علمی گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه، میانه، ایران. مسئول مکاتبات: ۱

۳- کارشناس ارشد موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

جهانگیرزاده خیای و همکاران. ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های سیب ایران با استفاده از...

مقدمه

سیب از خانواده گلسرخیان¹ و جنس مالوس² می‌باشد. جمع‌آوری و ارزیابی ذخایر ژرمپلاسم داخلی و خارجی، اساسی‌ترین مرحله در برنامه‌های به‌نژادی درختان میوه می‌باشد. اصلاح درختان سیب، امروزه با توجه به اهمیت تغذیه سالم و تولید پایدار میوه با کیفیت سیب بیشتر بر پایه ژنهای مقاومت می‌باشد (Crosby et al., 1992). با توجه به این که اکثر واریته‌های سیب به صورت رویشی تکثیر می‌گردند، تنوع ژنتیکی کمی مورد انتظار می‌باشد، اما در مورد ژنوتیپ‌های بومی که حاصل انتخاب ویژگی‌های برتر می‌باشد این تنوع مورد انتظار افزایش می‌یابد، زیرا این ژنوتیپ‌ها اکثراً نتاج بذری می‌باشند. با توجه به موارد فوق، دقت بالا در شناسایی تفاوت‌های ژنتیکی برای برنامه‌های اصلاحی بسیار ضروری است. بررسی این منابع ژنتیکی مهم که با شرایط اقلیمی نامناسب سازگار گشته، می‌تواند به عنوان منابع مقاومت در برنامه‌های به‌نژادی به کار گرفته شود. در سال‌های اخیر با پیشرفت تکنولوژی‌های بررسی ژنتیکی، امکان بررسی تنوع بین جمعیتی خصوصاً در جنس مالوس ممکن گردیده است. تکنیک‌های ملکولی در دسترس، امکان تشخیص ساختارهای ژنتیکی واریته‌هایی را که با یکدیگر ارتباط خویشاوندی نزدیک دارند را محیا نموده است که برخی از این روشها برای مشخص کردن ویژگی‌های ژنتیکی و تنوع گونه مالوس به کار برده شده است (Weeden and Lamb, 1985؛ Nybon and Schaal, 1990؛ Mulcahy et al., 1991؛ Gardiner et al., 1993؛ Dunemann et al., 1994؛ Luis et al., 2001؛ Jahangirzadeh et al., 2013).

روشهای قدیمی بررسی تفاوت‌های ژنتیکی که بر اساس تنوع مورفولوژیکی هستند به دلیل آنکه تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند کمتر مورد توجه می‌باشند. اما نشانگرهای مولکولی (DNA و آیزوزایم) فرصت بررسی مستقیم ویژگیها را بدون اثر محیط بر آنها فراهم می‌کنند. کاربرد مارکرهای

آیزوزایم در شناسایی ارقام سیب اگرچه با موفقیت همراه بوده است (Weeden and Lamb 1985) اما نشانگرهای DNA نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی و آیزوزایم فراوان ترند و کل محتوای ژنوم را میتوان با این روش بررسی نمود. والتیلون و همکاران (Watilon et al., 1991) از روش RFLP برای شناسایی کالتیوارها استفاده کردند. نیبون و شال (Nybon and Schaal 1990) نیز از این روش برای شناسایی صفات پدری به ارث رسیده در دانه‌ها استفاده نمودند. اما این روش نیاز به امکانات پیشرفته و خاصی دارد و برای تعداد بالای نمونه مناسب نمی‌باشد (Williams et al., 1990).

امروزه روش RAPD یک روش موثر در بررسی ژنوم سیب می‌باشد. از این نشانگر در بررسی روابط ژنتیکی جنس مالوس (Dunemann et al., 1994) شناسایی کالتیوارهای سیب (Koller et al., 1993؛ Mulcahy et al., 1993) و پایه‌های آن (Autio et al., 1998) و برای آنالیز والدی (Harada et al., 1993؛ Gardiner et al., 1996) استفاده شده است. همچنین لوئیز و همکاران (Luis and et al., 2001) از دو روش RAPD و RFLP برای مشخص نمودن و تخمین میزان شباهت ژنتیکی در میان کالتیوارهای سیب استفاده نمودند.

این بررسی با هدف مشخص کردن میزان تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های سیب بومی ایران از سه منطقه آذربایجان، البرز مرکزی و زاگرس مرکزی و میزان شباهت بین این ژنوتیپها و مقایسه آن با رقم شاهد (گرانی اسمیت) انجام شده است تا با کاهش در زمان برنامه‌های اصلاحی حفاظت از این ژرم پلاسم ارزشمند، ممکن گردد.

مواد و روشها مواد گیاهی

در مجموع 24 نمونه شامل 23 ژنوتیپ بومی سیب ایران (از سه منطقه آذربایجان، البرز مرکزی و زاگرس مرکزی) از کلکسیون موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر و رقم گرانی اسمیت به عنوان شاهد تهیه گردید. (جدول 1). برگهای جوان بالغ و کامل شده به عنوان نمونه، جمع‌آوری شدند و در دمای 80- درجه سلسیوس تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند.

استخراج DNA

¹ Rosaceae

² Malus

نواریهای چند شکل غیرمبهم و دارای وضوح بالا در ژل آگارز آغازگرها بر اساس وجود و عدم وجود به صورت صفر و یک نمره دهی شدند. نواریهای نامشخص و دارای وضوح کم که نشانه عدم تکثیر مطلوب به دلایل متفاوت (مانند عدم اتصال صحیح آغازگر یا رقابت جایگاههای اتصال آغازگر و ...) می باشد و همچنین نواریهای یک شکل در این نمره دهی قرار نگرفتند. از کل 11 آغازگر بهکار رفته 113 نواری دارای ویژگیهای مطلوب برای بررسی شناسایی شدند که 77 نواری حالت چند شکل نشان دادند (جدول 2). آغازگر TIBMBC20 با توالی AGCACTGGGG بالاترین تعداد نواری را تولید کرد و همین آغازگر دارای بالاترین تعداد نواری چند شکل بود، اما آغازگر TIBMBD16 با توالی GAACTCCCAG با تولید هفت نواری قابل بررسی دارای حداقل تعداد نواری تکثیری بود. آغازگر TIBMBE08 با توالی GGGAAGCGTC با تولید نه نواری که تماماً حالت چند شکل داشتند بهترین آغازگر از نظر تفکیک نمونهها بود. در بررسی انجام شده روی ارقام گیلاس ایرانی توسط خدیوی و همکاران (Khadivi et al., 2009) که همین آغازگرها بهکار برده شده بود از نظر قدرت تکثیر نتایج مشابهی بهدست آمده بود، بدین معنا که آغازگرهای دارای قدرت تکثیر بالا در گیلاس در گیاه سیب نیز تقریباً قدرت تکثیر بالایی داشتند. متوسط تعداد نواری برای هر آغازگر 10/3 و متوسط تعداد نواری چند شکل برای هر آغازگر هفت نواری بود (جدول 2). آغازگر TIBMBE08 با 100% و کمترین درصد در آغازگرهای TIBMBB17 و TIBMBB05 با 50% مشاهده شد. اطلاعات لازم برای توالی تمام آغازگرهای مورد بررسی، تعداد نواریها تکثیر شده، تعداد نواریهای چند شکل و سایر اطلاعات در جدول 2 ذکر شده است. دندروگرام حاصل از الگوریتم UPGMA بر اساس ماتریکس تشابه دادههای حاصل از این بررسی در شکل یک نشان داده شده است. طبقهبندی مولکولی 23 ژنوتیپ بومی ایران و رقم گرانیاسمیت به عنوان شاهد نشان داد که حداقل میزان

DNA ژنومی از نمونههای برگی جمع آوری شده بر اساس دستورالعمل معرفی شده) توسط شرکت Diversity Arrays Technology Pty Ltd (DART P/L) (<http://www.diversityarrays.com>) استخراج گردید.

تکثیر قطعات DNA

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، 10 آغازگر تصادفی (TIB MOLBIOL, Germany) مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نمونهها در حجم 30 میکرولیتر از ترکیب دو میلی مولار کلرید منیزیم، 0/2 میلی مولار از هر dNTP، یک واحد آنزیم تگ DNA پلیمراز¹، دو میکرولیتر از بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (10 برابر غلظت) بدون کلرید منیزیم و 30 نانوگرم DNA ژنومی از هر نمونه تهیه شد. دناتوره شدن اولیه در 95 درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه انجام شد و در 30 سیکل بعدی پس از دناتوره شدن در 95 درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در دمای 37 درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه انجام شد و مرحله آخری یا مرحله گسترش به مدت دو دقیقه اعمال شد و سپس مرحله گسترش نهایی به مدت هفت دقیقه انجام گردید. سپس نمونهها در دمای چهار درجه سلسیوس تا زمان الکتروفورز نگهداری شدند. از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل i-Cycler برای تکثیر محصولات استفاده گردید.

تجزیه داده‌ها

محصولات تکثیر شده به نسبت پنج میکرولیتر محصول PCR، 3 میکرولیتر بافر بارگذاری و 2 میکرولیتر ژل رد در ژل آگارز 1/2 درصد تحت ولتاژ ثابت 90 ولت به مدت 120 دقیقه تفکیک گردیدند. به نواریهای دارای وضوح مطلوب بر اساس حضور نواری یا عدم حضور نواری یک و صفر داده شد. نرم افزار NTSYS-pc ver. 2.02 برای تخمین شباهت ژنتیکی بر اساس ضریب دایس استفاده شد و ژنوتیپها بر اساس الگوریتم UPGMA گروهبندی شدند.

نتایج و بحث

¹ Taq DNA polymerase

جهانگیرزاده خیاوی و همکاران. ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های سیب ایران با استفاده از...

های منطقه زاگرس مرکزی که یک منطقه کشت و کار محدود این محصول می‌باشد در تشابه 55/5% از دو گروه دیگر ژنوتیپ‌های بومی (البرز مرکزی و آذربایجان) جدا شد و به صورت جداگانه قرار گرفت. اکثر نمونه‌های مورد بررسی منطقه‌های آذربایجان و البرز مرکزی هر کدام در یک خوشه جداگانه قرار گرفتند که جدا شدن آن‌ها در حد تشابه 58/5% رخ داد. البته لازم به ذکر است که نمونه‌های انتخاب شده و مورد بررسی از هر منطقه محدود و دارای تعداد اندکی بود، که شاید اگر این تعداد افزایش می‌یافت برخی نمونه‌ها در خوشه‌های دیگر قرار می‌گرفتند، بهطوری که ژنوتیپ G18 از این منطقه در بین نمونه‌های منطقه آذربایجان قرار داشت یا این که ژنوتیپ G16 از منطقه آذربایجان در بین نمونه‌های البرز مرکزی و بهطور معکوس G1 و G6 از البرز مرکزی در خوشه آذربایجان جای گرفتند (شکل 1).

این قرارگرفتن ژنوتیپ‌ها در بین خوشه‌های مناطق دیگر احتمالاً این نکته را بیان میکند که انتقال ژنوتیپ‌های برتر از یک منطقه به منطقه دیگر در گذشته صورت گرفته است و تاییدی بر انجام انتخاب و حفاظت از ژنوتیپ‌های برتر میباشد که نتایج مشابهی در مطالعات ژنوم کلروپلاست سیب توسط جهانگیرزاده و همکاران (Jahangirzadeh *et al.*, 2013) در مورد سیب‌های بومی منطقه آذربایجان و البرز مرکزی به دست آمده است. از طرفی دلیل قرارگیری نمونه‌ها در گروه‌های مخلوط با یکدیگر میتواند به دلیل جریان ژنی باشد (مهاجرت بذرها) که گاهی این مهاجرت سریعتر از حد مورد انتظار می‌باشد (Mohanty *et al.*, 2001) که از دلایل آن میتوان به استفاده از میوه‌های سیب دارای کیفیت پایین بعد از مدتی نگهداری برای مصرف توسط بشر به عنوان خوراک دام اشاره نمود که بذر این میوه‌ها پس از استفاده توسط دامها به صورت فضولات دفع و یا بهدلیل فساد بیش از حد و پایین بودن کیفیت توسط بشر دور ریخته میشوند که این بذور میتوانند رشد کنند و درختان جدید تولید نمایند و از آنجا که این درختان نتیجه تولید بذر در اثر لقاح بودند گاهی

تشابه مابین گرانیاسمیت و ژنوتیپ‌های بومی ایران وجود دارد که مقدار آن حدود 51% میباشد. این جدا شدن ژنوتیپ‌های بومی از گونه شاهد بیانگر یک شباهت ژنتیکی متوسط (حدود 50%) در بین ژنوتیپ‌های بومی مورد بررسی میباشد، اما با این اوصاف همچنان مقدار تنوع بین ژنوتیپ‌ها همچنان قابل توجه می‌باشد. دو ژنوتیپ G13 و G14 در کلاستر فوق‌الذکر دارای بالاترین تشابه بودند، بهطوری که در سطح تشابه 72% که حداکثر حد تشابه به دست آمده توسط این آغازگرها بود از یکدیگر تفکیک نشده بودند. این دو ژنوتیپ در ماتریکس تشابه نیز دارای بالاترین حد تشابه بودند (جدول 3). نکته حاوی اهمیت که از این ماتریکس به دست آمد این بود که ژنوتیپ‌های G13 با G19 و همچنین G5 با G22 نیز مقدار تشابه بالایی داشته و نزدیک به حداکثر میزان تشابه به دست آمده را نشان دادند (به ترتیب 0/718 و 0/721) (جدول 3). از این ماتریکس همچنین استنباط میگردد که دو گونه G23 و گرانیاسمیت دارای حداقل میزان تشابه به مقدار 0/378 می‌باشد و پس از آنها G11 و گرانیاسمیت با مقدار تشابه 0/411 در رتبه دوم از نظر کمترین مقدار تشابه قرار دارد (جدول 3).

در بررسی مشابهی که به وسیله مارکر RAPD توسط آبدبایو و همکاران (Adebayo *et al.*, 2009) در بررسی روابط ژنتیکی جنس‌های بومی مالوس در منطقه جنوب نیجریه صورت گرفت مشاهده گردید که نمونه‌ها در حد تشابه 80% به صورت تکی از یکدیگر تفکیک شده‌اند که در این بررسی نیز جدا شدن نمونه‌ها در سطح نزدیکی به این مقدار (72%) بود که نزدیکی این دو مقدار بیان میکند که از مارکر RAPD میتوان برای شناسایی ژنوتیپ‌های بومی و کالتیوارهای سیب استفاده نمود. در گزارش‌های مشابهی از کاربرد این مارکر در زمینه شناسایی ژنوتیپ‌ها و کالتیوارهای سیب سخن به میان آورده شده است (Koller *et al.*, 1993؛ Mulcahy *et al.*, 1993؛ Zhu *et al.*, 1997؛ Royo and Itoiz, 2004).

یکی از نتایج مهم در این بررسی جدا شدن نمونه‌های هر منطقه از نمونه‌های مناطق دیگر بود. نمونه -

فصلنامه دانش نوین کشاورزی پایدار - جلد نهم، شماره اول، بهار ۱۳۹۲

دارای کیفیت برتری از باقی ژنوتیپها میشوند که آن ها را کشاورزان نگهداری کرده و گاهی به عنوان ژنوتیپ مناسب در یک منطقه مطرح میشوند.

از آن جا که مارکر RAPD دارای قابلیت تکرارپذیری کمی می باشد، کاربرد مجدد این آغازگرها ممکن است به نتایج متفاوتی منجر گردد. با این حال در این بررسی با توجه به این که در انتخاب نوارها سعی شد نوارهای دارای وضوح بالا انتخاب شوند، این وضوح میتواند دلیل بر قدرت اتصال بالا و دقیق آغازگر به جایگاه خود باشد.

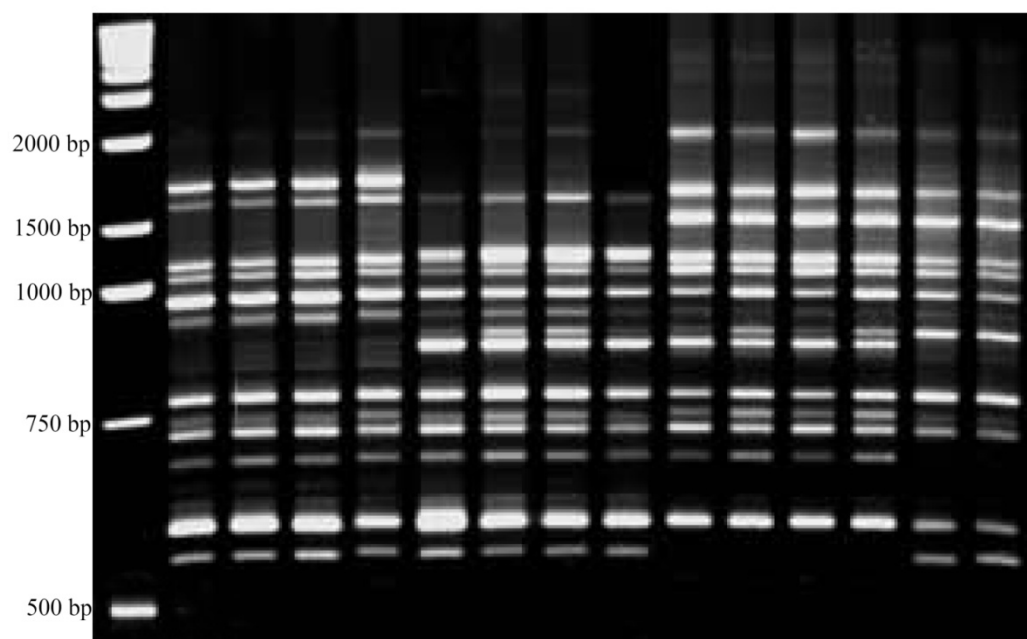
در مجموع بر اساس این مطالعه مشخص شد که نشانگر RAPD برای تفکیک اولیه نمونه ها مناسب بوده و می توان به آن به عنوان یک نشانگر مطلوب نگریست. خصوصاً اگر یک آغازگر چندین بار بکار رود و نتیجه کلی این تکرارها مدنظر قرار گیرد تا نقاطی که در تمام تکرارها تکثیر گشته اند برای بررسی استفاده گردد. با این حال با توجه به این که این نشانگر دارای تکرارپذیری نمی باشد، بهتر است در زمانی که تعداد نمونه ها به شدت بالا و محدودیت اقتصادی و زمانی وجود دارد ابتدا از این نشانگر برای تفکیک اولیه نمونه ها استفاده شود و سپس نمونه های تفکیک شده توسط یک نشانگر قوی تر مانند SSR و AFLP بصورت دقیق بررسی و انگشت نگاری گردند.

جهانگیرزاده خیای و همکاران. ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های سیب ایران با استفاده از...

جدول 1- اسامی ارقام و ژنوتیپ‌های سیب مورد بررسی در این پژوهش و محل جمع‌آوری آنها

Table1. Apple genotype used in this study and their origin

origin	Sample name	S/N	origin	Sample name	S/N
Central Alborz	Golab Damavand	G13	Central Alborz	T3	G1
Central Alborz	Golab paize	G14	Azerbaijan	Azerbaijan7	G2
Central Zagros	Tarh Golab Araak	G15	Central Zagros	SBA	G3
Azerbaijan	Azerbaijan14	G16	Azerbaijan	ME 4	G4
Azerbaijan	Boomi Meshkin Shahr	G17	Azerbaijan	Mahali Beyghi Urmia	G5
Central Zagros	Shahre Kord8	G18	Central Alborz	Ferdos	G6
Central Alborz	Golab Nemati	G19	Azerbaijan	Beyghi	G7
Central Zagros	Torsh Kermanshah	G20	Azerbaijan	ME 3	G8
Central Zagros	Ghermez1	G21	Central Alborz	Shahrod10	G9
Azerbaijan	Azerbaijan6	G22	Central Alborz	Shahrod19	G10
Central Zagros	Tabestane Zod Ras Oghlid	G23	Azerbaijan	Ghara Yarpagh	G11
Australia	Granny Smith	GRANNY	Azerbaijan	Khan Almasi	G12



شکل 1- الگوی RAPD بدست آمده از آغازگر TIBMBD-17. برخی نمونهها نشان داده شده است. به ترتیب نمونه های جدول 1 از چپ به راست از G1 تا G14. چاهک اول سایزمارکر 1kb می باشد.

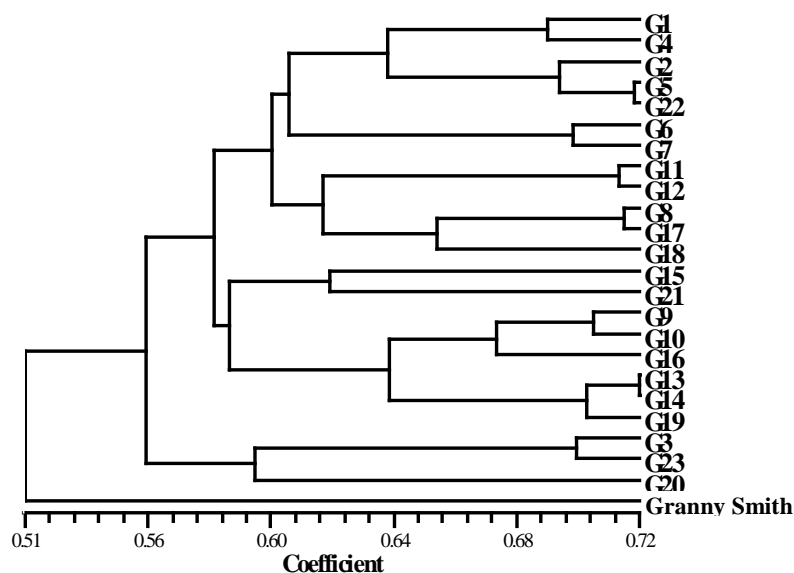
Figure 1. RAPD patterns resulted from amplification with primer TIBMBD-17. Some samples were shown. From the left, sample G1 to G14 according to the table 1. First line was ladder 1kb.

جهانگیرزاده خیایوی و همکاران. ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های سیب ایران با استفاده از...

جدول 3- آغازگرهای RAPD مورد استفاده برای تعیین تنوع ژنتیکی 23 ژنوتیپ سیب بومی ایران و یک رقم تجاری و درصد چندشکلی حاصل از آنها

Table 3. List of the primers showing polymorphism on 23 Iranian apple genotype and a comertial cultivar and their degree of polymorphism

primer	Sequence 5` to 3`	Total of bands (a)	Polymorphic bands (b)	polymorphic % (b/a×100)
TIBMBA-06	GGACGACCGT	8	5	62.50
TIBMBA-08	CCACAGCCGA	10	7	70.00
TIBMBC-20	AGCACTGGGG	15	10	66.67
TIBMBD-16	GAACTCCCAG	7	4	57.14
TIBMBA-20	GAGCGCTACC	12	9	75.00
TIBMBA-05	GGGCCGAACA	10	5	50.00
TIBMBD-17	GTTCGCTCCC	8	6	75.00
TIBMBA-17	ACACCGTGCC	14	7	50.00
TIBMBC-04	CCACGTGCCA	11	9	81.82
TIBMBA-08	GGGAAGCGTC	9	9	100.00
TIBMBC-12	CCTCCACCAG	9	6	66.67
Total	--	113	77	--
Mean.	--	10.27	7.00	68.14



شکل 2- نمودار حاصل از داده‌های مارکر RAPD مربوط به 23 ژنوتیپ سیب بومی ایران و رقم تجاری گرانی اسمیت مورد آزمایش به روش UPGMA (شماره ارقام مطابق جدول 1)

Figure 2. UPGMA dendrogram of 23 Iranian apple genotype and Granny Smith cultivar based on RAPD primers (Numbers represent cultivars according to Table 1)

جدول ۴- ضرایب تشابه حاصل از داده‌های نشانگر RAPD بین ۲۳ ژنوتیپ سیب بومی ایران و رقم گرانی اسمیت
 Table 4. Similarity coefficients among 23 Iranian apple genotypes and Granny Smith cultivar based on RAPD primers

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20	G21	G22	G23	Granny Smith	
G1	1.000																								
G2	0.684	1.000																							
G3	0.564	0.514	1.000																						
G4	0.691	0.597	0.582	1.000																					
G5	0.650	0.684	0.538	0.617	1.000																				
G6	0.585	0.641	0.475	0.554	0.610	1.000																			
G7	0.487	0.622	0.500	0.658	0.641	0.700	1.000																		
G8	0.564	0.649	0.474	0.532	0.615	0.600	0.605	1.000																	
G9	0.600	0.605	0.487	0.642	0.600	0.537	0.564	0.615	1.000																
G10	0.659	0.615	0.550	0.506	0.610	0.571	0.525	0.550	0.707	1.000															
G11	0.641	0.568	0.553	0.506	0.641	0.600	0.553	0.553	0.615	0.625	1.000														
G12	0.675	0.608	0.568	0.571	0.602	0.635	0.543	0.593	0.651	0.588	0.716	1.000													
G13	0.675	0.579	0.538	0.568	0.625	0.585	0.436	0.538	0.675	0.683	0.615	0.627	1.000												
G14	0.602	0.608	0.593	0.571	0.578	0.588	0.519	0.519	0.578	0.659	0.543	0.605	0.723	1.000											
G15	0.550	0.526	0.513	0.494	0.475	0.610	0.615	0.538	0.550	0.561	0.590	0.627	0.600	0.627	1.000										
G16	0.591	0.548	0.651	0.607	0.591	0.556	0.605	0.581	0.659	0.689	0.581	0.659	0.591	0.659	0.591	1.000									
G17	0.575	0.658	0.513	0.543	0.575	0.683	0.564	0.718	0.600	0.537	0.667	0.651	0.550	0.506	0.625	0.682	1.000								
G18	0.605	0.611	0.486	0.571	0.553	0.538	0.595	0.676	0.553	0.487	0.568	0.658	0.553	0.456	0.553	0.619	0.632	1.000							
G19	0.615	0.541	0.553	0.557	0.590	0.525	0.447	0.579	0.615	0.650	0.579	0.617	0.718	0.691	0.513	0.628	0.564	0.568	1.000						
G20	0.494	0.519	0.658	0.561	0.519	0.506	0.532	0.532	0.568	0.506	0.532	0.571	0.543	0.524	0.519	0.652	0.617	0.468	0.506	1.000					
G21	0.519	0.519	0.608	0.537	0.593	0.554	0.608	0.532	0.568	0.651	0.582	0.619	0.543	0.524	0.617	0.607	0.543	0.597	0.658	0.537	1.000				
G22	0.651	0.707	0.643	0.621	0.721	0.591	0.643	0.643	0.605	0.591	0.643	0.652	0.674	0.629	0.628	0.596	0.581	0.610	0.595	0.552	0.621	1.000			
G23	0.582	0.587	0.701	0.525	0.582	0.568	0.519	0.519	0.506	0.494	0.649	0.659	0.658	0.659	0.582	0.598	0.608	0.560	0.597	0.525	0.500	0.659	1.000		
Granny Smith	0.533	0.563	0.493	0.632	0.587	0.494	0.548	0.548	0.453	0.519	0.411	0.487	0.480	0.513	0.507	0.530	0.427	0.535	0.493	0.526	0.617	0.378	1.000		

جهانگیرزاده خیاوی و همکاران. ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های سیب ایران با استفاده از...

References

- Adebayo OL, Bola O, Opeyemi W, Gloria M, Temitope OO (2009) Phylogenetic and genomic relationships in the genus *Malus* based on RAPDs. *African Journal of Biotechnology* 15: 3387-3391.
- Autio WR, Schupp JR, Ferree DC, Glavin R, Mulcahy DL (1998) Application of RAPDs to DNA extracted from apple rootstocks. *Hort Science* 33: 333-335.
- Crosby JA, Janick J, Pecknold PC, Korban SS, O'Connor PA, Ries SM, Goffreda S, Voordeckers A (1992) Breeding apple for scab resistance. *Acta Horticulturae* 317: 43-70.
- Deverno, LL, Charest PJ, Bonen L (1994) Mitochondrial DNA variation in somatic embryogenic cultures of *Larix*. *Theoretical and Applied Genetics* 88: 727-732.
- Duneman F, Kahnau R, Schmidt H (1994) Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD fingerprinting of cultivars and wild species. *Plant Breeding* 113: 150-159.
- Erturk U, Akcay MA (2010) Genetic variability in accessions of 'Amasya' apple cultivar using RAPD markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 38 (3): 239-245.
- Gardiner SE, Bassett HCM, Madie C, Noition DAM (1996) Isozyme, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers to deduce a putative parent for the 'Braeburn' apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 121: 996-1001.
- Gygax, M, Gianfranceschi L, Liebhard R, Kellerhals M, Gessler C, Patocchi A (2004) Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata* Jackii. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1702-1709.
- Harada T, Maksukawa K, Sato T, Ishikawa Niizeki R, Saito KM (1993) DNA-RAPD detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphytica* 65: 87-91.
- Hemmat, M, Weeden NF, Manganaris AG, Lawson DM (1994) Molecular marker linkage map for apple. *Journal of Heredity* 85: 4-11.
- Jahangirzadeh khiavi SH, Zamani Z, Mardi M, Fatahi Moghaddam M (2013) Evaluation of chloroplast relationship between some apple genotype from Azerbaijan of Iran and their comparison with other local genotypes, cultivars and rootstocks. *African Journal of Agricultural Research* 8(1): 106-112.
- Khadivi khob A, Zamani Z, Bouzari N, Fatahi Moghaddam MR (2009) Evaluation of genetic diversity in some Iranian sweet cherry cultivars using some morphological characteristics and RAPD markers. *Seed and plant Improvement Journal* 25(1): 195- 209. [In Persian with English Abstract]
- Koller BA, Lehmann J, Modermott M, Gessler C (1993) Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 6-7.
- Lavi U, Cregan P, Schaap T, Hillel J (1994) Application of DNA markers for identification and breeding of perennial fruit crops. In: Janick J (ED.), *Plant breeding reviews*. John Wiley and Sons, Inc, New York. pp. 195-226.
- Liebhard R, Koller B, Gianfranceschi L, Gessler C (2003). Creating a saturated reference map for the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1497-1508.
- Luis G, Cabrita L, Oliveira CM, Leitao JM (2001) Comparing RAPD and AFL analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars. *Euphytica* 119: 250-270
- Mohanty A, Martín JP, Aguinagalde I (2001) Chloroplast DNA study in wild populations and some cultivars of *Prunus avium* L. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 112-117
- Mulcahy DL, Cresti M, Sansavini S, Douglas GC, Linskens HF, Mulcahy GB, Vignani R, Pancaldi M (1993) The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genomes. *Scientia Horticulturae* 54: 89-96.
- Nybon H, Schaal BA (1990) DNA 'fingerprints' applied to paternity analysis in apples (*Malus x domestica*). *Theoretical and Applied Genetics* 79: 763- 768.
- Rohlf FJ (2008) NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.2. Exeter Software, Setauket, New York.
- Royo JB, Itoiz R (2004) Evaluation of the discriminance capacity of RAPD, isoenzymes and morphologic markers in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and the congruence among classifications. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 153-160.
- Watilon B, Druart P, Du Jardin P, kettmann R, Boxus P, Burny A (1991) Use of random cDNA probes to detect restriction fragment length polymorphisms among apple clones. *Scientia Horticulturae* 46: 235-243.
- Weeden NF, Lamb RC (1985) Identification of apple cultivars by isoenzyme phenotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 110: 509-515
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18: 6531-6535.

- Williams, JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 218: 704-740.
- Zhou ZQ, Li YN (2000) The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 353-357.
- Zhu SL, Manfredi P, Monti LM, Rao R (1997) RAPD markers useful for the identification of the 'Annurca' apple variety and its sport 'Rossa Del Sud'. *Advances in Horticultural Science* 11: 120-122.