فصل‌نامه دانش نوین کشاورزی پایدار - جلد نهم، شماره اول، بهار۱۳۹۲

ارزیابي تنوع ژنتيكي برخي از ژنوتيپ‌های سیب ایران با استفاده از نشانگر RAPD

شاهین جهانگیرزاده خیاوی[1]، حسن نور افکن[2*] و سیما دامیار[3]

چکیده

جمع‌آوری و ارزیابی ژرمپلاسمها در برنامههای اصلاحی درختان میوه دارای نقش اساسی است. نشانگرهاي مولكولی متفاوتی برای این نوع ارزیابیها بهکار برده شدهاند که مارکر RAPD جزء مارکرهای پرکاربرد در مورد شناسایی ژنوتیپ-ها 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 به‌وسیله الگوریتم UPGMA رسم گردید. در حالت کلی، نتایج داده-های مولکولی، نمونههای هر منطقه را بهطور جداگانهای 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 شکلي 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 ژنتیکي بالایی در ژنوتیپهای سیب مناطق مختلف وجود دارد ، ولی تفاوت درون منطقه ای 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.

واژه های 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: ا

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

مقدمه

سیب از خانواده گلسرخیان[1] و جنس مالوس[2] میباشد. جمعآوري و ارزيابي ذخاير ژرمپلاسم داخلي و خارجي، اساسيترين مرحله در برنامه - هاي بهنژادي درختان ميوه مي باشد. 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 می - باشد این تنوع مورد انتظار افزایش میابد ، زیرا این ژنوتیپ - ها اکثراً نتاج بذری می باشند. با توجه به موارد فوق، دقت بالا در شناسایی تفاوت های ژنتیکی برای برنامههای اصلاحی بسیار ضروری است. بررسی این منابع ژنتيكي مهم که با شرایط اقلیمي نامناسب سازگار گشته ، میتواند به عنوان منابع مقاومت در برنامههاي به - نژادي به کار گرفته شود. در سال - های 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 واریته - هایی 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؛ Watilon *et al.*, 1991؛ Dunemann *et al.*, 1994؛ Koller *et al.*, 1993؛ Mulcahy *et al.*, 1996؛ Gardiner *et al.*, 2001 و Luis *et al.*, 2013؛ Jahangirzadeh *et al.*).

روشهای قدیمی بررسی تفاوتهای ژنتیکی که بر اساس تنوع مورفولوژیکی هستند به دلیل آنکه تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می - گیرند کمتر مورد توجه میباشند. اما نشانگرهای مولکولی (DNA و آیزوزایم) فرصت بررسی مستقیم ویژگیها را بدون اثر محیط بر آن ها فراهم میکن ند. 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 دانهالها 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 ژنوتیپ - های 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*

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

تکثیر قطعات DNA

براي انجام واكنش زنجيرهاي پلي - مراز، 10 آغازگر تصادفي (TIB MOLBIOL, Germany) مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واكنش زنجيرهاي پليمراز براي نمونهها در حجم 30 ميكروليتر از تركيب دو ميلي مولار كلريد منيزيم، 0/2 ميلي مولار از هر dNTP، يک واحد آنزيم تگ DNA پليمراز[1]، دو ميكروليتر از بافر واكنش زنجيرهاي پليمراز (10 برابر غلظت) بدون كلريدمنيزيم و 30 نانوگرم DNA ژنومي از هر نمونه تهيه شد. دناتوره شدن اوليه در 95 درجه سلسيوس به مدت سه دقيقه انجام شد و در 30 سيكل بعدي پس از دناتوره شدن در 95 درجه سلسيوس به مدت يک دقيقه، مرحله اتصال در دماي 37 درجه سلسيوس به مدت يک دقيقه انجام شد و مرحله آخر يا مرحله گسترش به مدت دو دقيقه اعمال شد و سپس مرحله گسترش نهايي به مدت هفت دقيقه انجام گرديد. سپس نمونه ها در دماي چهار درجه سلسيوس تا زمان الكتروفورز نگهداري شدند. از دستگاه ترمال سايكلر Bio-Rad مدل i-Cycler براي تكثير محصولات استفاده گرديد.

تجزیه داده‌ها

محصولات تكثير شده به نسبت پنج ميكروليتر محصول PCR، 3 ميكروليتر بافر بارگذاري و 2 ميكروليتر ژل رد در ژل آگارز 1/2 درصد تحت ولتاژ ثابت 90 ولت به مدت 120 دقيقه تفكيک گرديدند. به نوارهاي داراي وضوح مطلوب بر اساس حضور نوار يا عدم حضور نوار يک و صفر داده شد. نرم افزار NTSYS-pc ver. 2.02 براي تخمين شباهت ژنتيكي بر اساس ضريب دايس استفاده شد و ژنوتيپ ها بر اساس الگوريتم UPGMA گروهبندي شدند.

نتایج و بحث

نوارهاي چند شكل غيرمبهم و داراي وضوح بالا در ژل آگارز آغازگرها بر اساس وجود و عدم وجود به صورت صفر و يک نمره دهي شدند. نوارهاي نامشخص و داراي وضوح كم كه نشانه عدم تكثير مطلوب به دلايل متفاوت (مانند عدم اتصال صحيح آغازگر يا رقابت جايگاههاي اتصال آغازگر و ...) مي باشد و همچنين نوارهاي يک شكل در اين نمره دهي قرار نگرفتند. از كل 11 آغازگر بهكار رفته 113 نوار داراي ويژگي‌هاي مطلوب براي بررسي شناسايي شدند كه 77 نوار حالت چند شكل نشان دادند (جدول 2). آغازگر TIBMBC20 با توالي AGCACTGGGG بالاترين تعداد نوار را توليد كرد و همين آغازگر داراي بالاترين تعداد نوار چند شكل بود ، اما آغازگر TIBMBD16 با توالي GAACTCCCAG با توليد هفت نوار قابل بررسي داراي حداقل تعداد نوار تكثيري بود. آغازگر TIBMBE08 با توالي GGGAAGCGTC با توليد نه نوار كه تماماً حالت چند شكل داشتند بهترين آغازگر از نظر تفكيک نمونهها بود. در بررسي انجام شده روي ارقام گيلاس ايراني توسط خديوي و همكاران (Khadivi *et al.*, 2009) كه همين آغازگرها بهكار برده شده بود از نظر قدرت تكثير نتايج مشابهي بهدست آمده بود، بدين معنا كه آغازگرهاي داراي قدرت تكثير بالا در گيلاس در گياه سيب نيز تقريباً قدرت تكثير بالايي داشتند. متوسط تعداد نوار براي هر آغازگر 10/3 و متوسط تعداد نوار چند شكل براي هر آغازگر هفت نوار بود (جدول 2). بالاترين در صد چند شكلي در آغازگر TIBMBE08 با 100% و كمترين درصد در آغازگرهاي TIBMBB17 و TIBMBB05 با 50% مشاهد شد.

اطلاعات لازم براي توالي تمام آغازگرهاي مورد بررسي، تعداد نوارها تكثير شده، تعداد نوارهاي چند شكل و ساير اطلاعات در جدول 2 ذكر شده است.

دندروگرام حاصل از الگوريتم UPGMA بر اساس ماتريكس تشابه دادههاي حاصل از اين بررسي در شكل يک نشان داده شده است. طبقهبندي مولكولي 23 ژنوتيپ بومي ايران و رقم گرانياسميت به عنوان شاهد نشان داد كه حداقل ميزان

[1] Taq DNA polymerase

تشابه مابین گرانیاسمیت و ژنوتیپ - های بومی ایران وجود دارد که مقدار آن حدود 51% میباشد. این جدا شدن ژنوتیپهای بومی از نمونه شاهد بیانگر یک شباهت ژنتیکی متوسط (حدود 50%) در بین ژنوتیپ - های بومی مورد بررسی میباشد ، اما با این اوصاف همچنان مقدار تنوع بین ژنوتیپها همچنان قابل توجه می- باشد. دو ژنوتیپ G13 و G14 در کلاستر فوقالذکر دارای بالاترین تشابه بودند، بطوری 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 (0/723) (جدول 3). نکته حا یز اهمیت که از این ماتریکس بهدست آمد این بود که ژنوتیپ های G13 با G19 و هم‌چنین G5 با G22 نیز مقدار تشابه بالایی داشته و نزدیک به حداکثر میزان تشابه بهدست آمده را نشان دادند (به ترتیب 0/718 و 0/721) (جدول 3). از این ماتریکس هم‌چنین استنباط میگردد که دو نمونه G23 و گرانیاسمیت دارای حداقل میزان تشبه به مقدار 0/378 می- باشد و پس از آنها G11 و گرانی- اسمیت با مقدار تشابه 0/411 در رتبه دوم از نظر کمترین مقدار تشابه قرار دارد (جدول 3).

در بررسی مشابهی که ب ه 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% بهصورت تکی از یکدیگر تفکیک شدهاند که در این بررسی نیز جدا شدن نمونهها در سطح ی نزدیک 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 و Royo and Itoiz, 2004).

یکی از نتایج مهم در این بررسی جدا شدن نمونههای هر منطقه از نمونههای مناطق دیگر بود. نمونه - 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 آن ها 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 میافت 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 بهصورت فضولات دفع و یا بهدلیل فساد بیش از حد و پایین بودن کیفیت توسط بشر دور ریخته میشدند که این بذور میتوانستند رشد کنند و درختان جدید تولید نمایند و از آنجا که این درختان نتیجه تولید بذر در اثر لقاح بودند گاهی

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

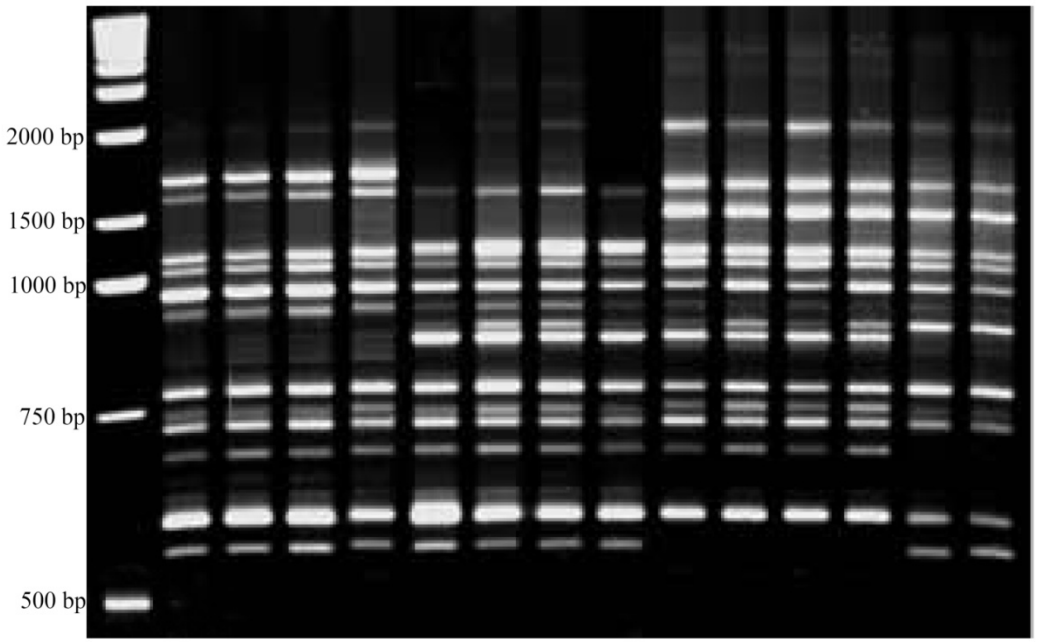
از آن جا که مارکر RAPD دارای قابلیت تکرارپذیری کمی می - باشد، کاربرد مجدد این آغازگرها ممکن است به نتایج متفاوتی منجر گردد. با این حال در این بررسی با توجه به این که در انتخاب نوارها سعی شد نوارهای دارای وضوح بالا انتخاب شوند، این وضوح میتواند دلیل بر قدرت اتصال بالا و دقیق آغازگر به جایگاه خود باشد.

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 نمی‌باشد، 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.

جدول1- اسامي ارقام و ژنوتيپهاي سيب مورد بررسي در اين پژوهش و محل جمع‌آوري 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**
Austrailia	Granny Smith	GRANNY	Azerbaijan	Khan Almasi	**G12**



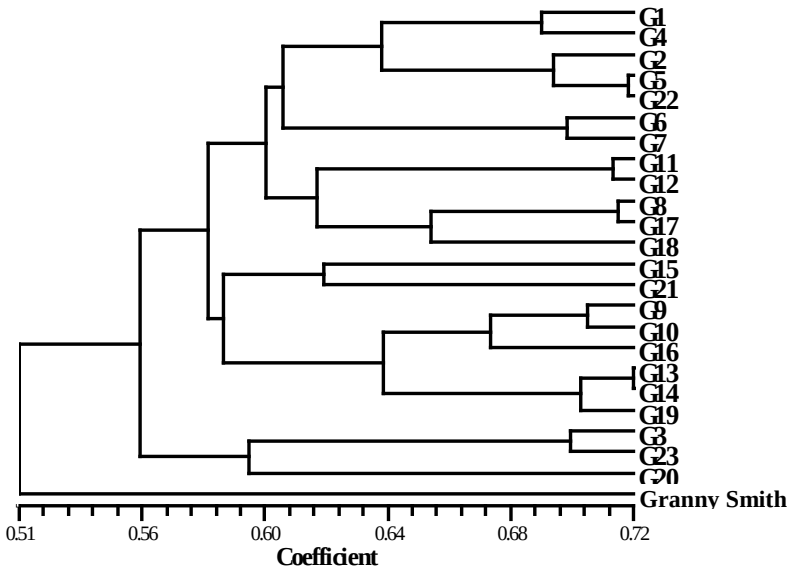
شکل 1- الگوی RAPD بدست آمده از آغازگر TIBMBD-17. برخی نمونهها نشان داده شده است. به‌ترتیب نمونه‌های جدول 1 از چپ به راست از G1 تا G14. چاهک اول سایزمارکر 1kb می باشد.

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.

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
TIBMBB-05	GGGCCGAACA	10	5	50.00
TIBMBD-17	GTTCGCTCCC	8	6	75.00
TIBMBB-17	ACACCGTGCC	14	7	50.00
TIBMBC-04	CCACGTGCCA	11	9	81.82
TIBMBE-08	GGGAAGCGTC	9	9	100.00
TIBMBC-12	CCTCCACCAG	9	6	66.67
Total	--	113	77	--
Mean.	--	10.27	7.00	68.14



شکل2- 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 ٤- 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	0.526	0.617	0.378	1.000

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, Gessier 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.