مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و دو - بهار ۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی تنوع ژنتیکی مامیران کبیر (Chelidonium majus) با استفاده از نشان گر ISSR در ایران

معصومه حسنی [*۱]، علیرضا بابائی [۱]، کبری مسلم خانی [۲]

۱-گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

۲-موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

چکیده:

سابقه و هدف: گیاه مامیران کبیر یکی از ذخایر مهم دارویی در دنیا محسوب می شود. از آن جایی که تنوع ژنتیکی این گیاه در مطالعه های جهانی بررسی نشده، لذا در تحقیق حاضر تنوع ژنتیکی ۱۴ اکوتیپ مامیران کبیر با استفاده از نشان گرهای مولکولی ISSR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: استخراج DNA از نمونه های برگی جوان با استفاده از روش CTAB انجام شد. محصولات ISSR براساس حضور (۱) و غیاب (۰) در هر پرایمر امتیازدهی شدند. برای ارزیابی شباهت ژنتیکی میان نمونه ها از تجزیه خوشه ای با روش Jaccard استفاده گردید.

یافته ها: آغازگر (CA)۸G بیش ترین چند شکلی (۹۲/۸) را در بین آغازگرها تولید کرد. کم ترین شباهت ژنتیکی ۰/۱۶ بین دو نمونه مامیران شیرگاه (C۱۶) و سیاه کلاه (C۳۰) دیده شد. تجزیه خوشه ای داده های مولکولی، نمونه ها را در ۷ شاخه، دسته بندی کرد.

نتیجه گیری: نتایج گروه بندی تجزیه کلاستر تا حد زیادی عدم ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان می دهد. به نظر می رسد این امکان وجود دارد که یک نمونه از یک منطقه جغرافیایی به منطقه دیگر مهاجرت کرده باشد و از منشاء اولیه خود فاصله گرفته باشد.

کلمات کلیدی: *Chelidonium majus*، نشان گر ISSR، تنوع ژنتیکی، پرایمر

مقدمه:

مامیران کبیر با نام علمی *Chelidonium majus* گیاهی است دگرگشن و از تیره Papaveraceae که پراکندگی آن در خاورمیانه محدود به ایران و ترکیه است. محل رویش آن در ایران نواحی شمال و شمال شرقی کشور (گیلان، گلستان و مازندران) می باشد. این گیاه دارویی بسیار ارزشمند در بازار کشورهای مختلف از سال ۱۹۹۶ به عنوان محصول شفابخش ثبت شده است و از جمله موارد مصرف آن می توان درمان بیماری هایی هم چون عفونت، اگزما، سرطان پوست و جلوگیری از تشکیل سنگ کلیه را نام برد (۲۱، ۱۰، ۱۸). تا کنون بر روی جنبه های بیوشیمیایی و دارویی مامیران مطالعه های متعددی صورت گرفته است ولی جنبه مولکولی آن کم تر مورد بررسی قرار گرفته است. تنوع ژنتیکی شرط اولیه برنامه های اصلاحی بوده و انجام گزینش به وجود تنوع ژنتیکی مطلوب در صفت مورد بررسی، وابسته است. از آن جایی که این نوع تنوع قابلیت انتقال به نتاج را دارد، بنابراین در اصلاح نباتات از اهمیت زیادی برخوردار می باشد (۱۶). تنوع آب و هوا و شرایط اکولوژیک باعث تنوع و غنای گیاهان دارویی در سراسر ایران شده است. لزوم تحقیقات همه جانبه و بهره برداری صحیح از این گیاهان، به ویژه در زمانی که استفاده جهان از گیاهان دارویی شتاب بیش تری گرفته ، بسیار ضروری است (۳). بنابراین برنامه ریزی اصولی برای توسعه فعالیت ها در بخش گیاهان دارویی تنها با بررسی دقیق وضعیت موجود، شناخت پتانسیل ها و خاستگاه اصلی گونه های موجود در کشور امکان پذیر است (۳). امروزه جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های حفاظت شده علاوه بر شیوه‌های مبتنی بر نشان گرهای سیتوژنتیک، از ابزارها و نشان گرهای نوین مولکولی از جمله نشان گرهای DNA استفاده می‌شود. لذا میزان چند شکلی به دست آمده از این نشان گرهای ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت ها و درک تفاوت های ژنتیکی بین آن ها محسوب می شود (۹). محدودیت های اصلی این روش ها، تکرارپذیری اندک RAPD، هزینه بالای AFLP و نیاز به شناخت توالی های پیرامونی برای توسعه پرایمرهای اختصاصی گونه ها برای چند شکلیSSR است. ISSR-PCR تکنیکی است که بر اغلب این محدودیت ها غلبه

مسئول نویسنده: بیوتکنولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

پست الکترونیکی: masomehhassani@yahoo.com

تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۱۰/۲۵

تاریخ پذیرش : ۱۳۹۴/۴/۱۶

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.12.7]

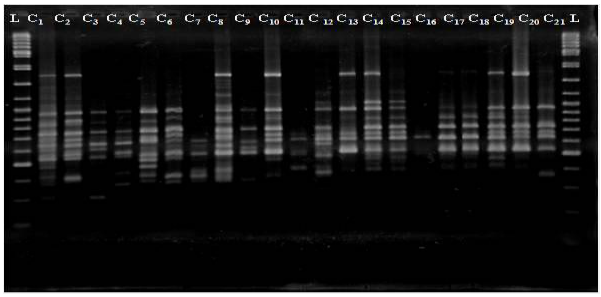
می کند (۸). این تکنیک برای اولین بار توسط زیتکوویچ[1] و همکاران در سال ۱۹۹۴ معرفی شد (۲۷). ISSR از نشان گرهای غالب و مبتنی بر PCR بوده و به وسیله واکنش زنجیره ای پلی مراز در حضور یک آغازگر مکمل با یک توالی ریزماهواره در ژنوم تکثیر می شود (۱۱). این نشان گر به دلیل فراوانی مناطق تکرار شونده در ژنوم، چند شکلی بیش تری را نسبت به آغازگرهای RAPD نشان داده و باندهای حاصله اطلاعات بیش تری را از ژنوم، در اختیار قرار می دهند. از نشان گرهای ISSR به عنوان روشی برای شناسایی ژنوتیپ ها و هم چنین مطالعه تنوع ژنتیکی گونه های گیاهی مختلف از جمله ۴ جنس از خانواده خشخاش (۱۷)، تاج خروس (۲۵)، آرتمیزیا (۲۲)، خربزه (۲۴)، هندوانه (۲۳) و ... استفاده شده است.

مواد و روش ها:

مواد گیاهی برای مطالعه این بخش شامل ۳۹ نمونه از ۱۴ منطقه در استان های مازندران (جهان زار، کاسگرمحله، ندر، امین آباد، ساروکلا، ساری، شیرگاه و هزارچم)، گیلان (سیاهکلا، لاهیجان و حاجی آباد) و گلستان (علی آباد، گرگان و کردکوی) بود. با توجه به این که در این زمینه مطالعه ها چندانی صورت نگرفته، انتخاب تکنیک مناسب استخراج DNA امری بدیهی است. به منظور استخراج DNA ژنومی این گیاه سه روش دارت (۲۰)، دلاپورتا (۱۴) و CTAB (۱۲) مورد بررسی قرار گرفت. از دستگاه اسپکتروفوتومتر به منظور اندازه گیری غلظت و از جذب اشعه ماوراء بنفش برای بررسی خلوص و کیفیت DNA حاصل، استفاده شد (۱). روش CTAB با کمی تغییرهای ، از نظر کیفیت و غلظت DNA، نسبت به دو روش دیگر برتری داشت؛ بنابراین استخراج DNA ژنومی با استفاده از این روش انجام شد. میزان مواد مصرفی در هر واکنش با توجه به نوع آغازگر از طریق بهینه سازی شرایط PCR تعیین گردید. اجزای واکنش PCR برای حجم ۲۵ میکرولیتر شامل بافرPCR ۱X (۲/۵ µl)، DNA (ng ۱۰۰)، کلرید منیزیم (۳ Mm)، آغازگر (۰/۸ Pmol)، dNTP (۰/۶ Mm) و آنزیم Taq پلیمراز (۱ unit) بود. چرخه PCR به شرح زیر انجام گرفت: یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۷ چرخه واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۰-۶۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۱۵ ثانیه، مرحله بسط به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد. به منظور آشکارسازی چند شکلی بین نمونه ها از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۲ درصد استفاده و سپس در محلول اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد. در این تحقیق، ۱۲ آغازگر ISSR مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی چند شکلی بین توده ها حضور و عدم حضور هر باند با اعداد یک و صفر مشخص گردید و از برنامه Ecxel برای وارد کردن داده های مولکولی استفاده شد. نتایج حاصل از این آغازگرها با استفاده از نرم افزار(NTSYS Ver. ۲.۰۲) بر اساس تجزیه خوشه ای بین افراد با استفاده از ضریب تشابه دایس به عنوان معیار مقایسه و روش فاصله میانگین ها UPGMA[2] انجام گرفت و به صورت دندروگرام ترسیم گردید. هم چنین نرم افزار GeneAlex برای محاسبه تجزیه واریانس مولکولی و تجزیه به مختصات اصلی استفاده شد.

نتایج

از کل ۱۵۸ نوار تولید شده به وسیله ۱۲ آغازگر، ۲۸ نوار یک شکل و ۱۳۰ نوار چند شکل بودند که اندازه این نوارها در محدوده ۳۰۰۰- ۲۰۰ جفت باز متغیر بود. تعداد نوار های چند شکل حاصل از آغازگرهای ISSR در بین توده ها از ۶ تا ۱۹ نوار متغیر بود که بیان گر قدرت متفاوت آغازگرها در شناسایی چند شکلی در نمونه های مورد بررسی است. آغازگر (CT)RG۸ (P۹) با ۲۰ نوار بیش ترین و آغازگر (CA)GGGC۸ (P۱۰) با ۷ نوار، کم ترین تعداد نوار را در بین آغازگرها تولید کرد. آغازگر (CA)G۸ (P۱) بیش ترین میزان چند شکلی، ۹۲/۸ درصد، (شکل ۱) و آغازگر (AC)YT۸ (P۵) و (GA)C۸ (P۴) کم ترین میزان چند شکلی، ۵۴/۵ درصد را نشان دادند. برای هر آغازگر به طور متوسط ۱۰/۸۳ مکان چند شکل محاسبه گردید. تمام آغازگرهای مورد استفاده، چند شکلی خوبی با میانگین ۰/۳۴ نشان دادند که بیش ترین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) مربوط به آغازگر P۳ (TCC)RY۵ با میزان ۰/۴۲۵ بود. شاخص نشان گری (MI) برای آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه، بین ۰/۲۸۶ برای آغازگر P۵ (AC)YT۸ و ۵/۳۹ برای آغازگر P۱۱ (AG)T۸ محاسبه گردید (جدول ۱).



شکل ۱- الگوی باندی ISSR در برخی از نمونه ها با استفاده از آغازگر (CA)G۸ بر روی ژل آگارز ۲٪ (L: Ladder ™ mix)

1 Zietkiewicz

2 Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.12.7]

آغازگر	کد آغازگر	تعداد کل باند	تعداد باند چند شکل	PIC	MI
۸G(CA)	P۱	۱٤	۱۳	۰/۳۲٥	۳/۷۰٥
۸R*C(CT)	P۲	۱۱	۸	۰/۳۱۹	۱/۸۲۰
*٥RY(TCC)	P۳	۱۳	۱۲	۰/٤۲٥	٤/۳۲٤
۸C(GA)	P٤	۱۱	٦	۰/۲٤٤	۰/۷٥۸
۸YT(AC)	P٥	۱۱	٦	۰/۱۳۰	۰/۲۸٦
۸YC(GA)	P٦	۱۰	۸	۰/۲٦۷	۱/٦۰۲
۸YT(AG)	P۷	۱۲	۱۱	۰/۲۳۸	۲/۲۲٥
۸G(TG)	P۸	۱۸	۱٦	۰/۳٥٥	٤/۲۹۹
۸RG(CT)	P۹	۲۰	۱۸	۰/۲۷٦	٤/٥۰٥
۸(GGGC(CA	P۱۰	۷	٦	۰/۱۸٦	۰/٦۹۷
۸T(AG)	P۱۱	۱۸	۱٦	۰/۳۹۷	٥/۳۹۰
۸YG(AC)	P۱۲	۱٥	۱۱	۰/۳٥٦	۲/۳۲۰

*** Y= C یا T و * R= G یا A**

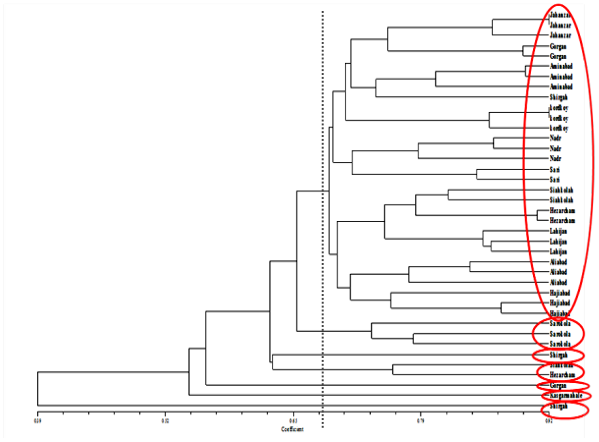
جدول ۱- نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی ۱۴ اکوتیپ مامیران کبیر با استفاده از ۱۲ نشان گر ISSR

تعیین رابطه ژنتیکی افراد

کم ترین شباهت ژنتیکی ۰/۱۶ بین دو نمونه شیرگاه (C16) و سیاه کلاه (C30) و بیش ترین شباهت ۰/۸۵ بین نمونه های جهانزار (C1) و (C2) مشاهده شد. بر اساس دندروگرام ترسیم شده و در سطح تشابه ۰/۶۷۸ ، نمونه های مورد بررسی در ۷ گروه تقسیم بندی شدند (شکل ۲). نتایج گروه بندی تجزیه کلاستر تا حد زیادی عدم ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان می دهد؛ به طوری که نمونه های جمع آوری شده در یک استان یا شهر در بسیاری از موارد در گروه ها یا زیر گروه های جداگانه قرار گرفته اند که این امر بیانگر تفاوت ژنتیکی بالای این نمونه ها می باشد. به منظور بررسی تنوع درون و بین اکوتیپ ها نمونه ها بر اساس ۳ اکوتیپ مازندران، گلستان و گیلان مورد ارزیابی قرار گرفتند. مجموع مربعات به دست آمده از تجزیه واریانس برای هر اکوتیپ میزان تنوع درون اکوتیپ ها را نشان داد. با توجه به جدول ۲ مشاهده می شود که واریانس درون اکوتیپ ها (۹۱ درصد) به مراتب بیش تر از واریانس بین اکوتیپ ها (۹ درصد) است.

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	درصد واریانس کل
بین اکوتیپ ها	۲	۴۶/۷۷*	۹
درون اکوتیپ ها	۳۵	۲۱/۱۰۴	۹۱
کل	۳۷		

جدول ۲- تجزیه واریانس مولکولی توده های مامیران



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده حاصل از نشان گرهای ISSR با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد برای ۱۴ اکوتیپ مامیران کبیر

بحث

اطلاع از روابط ژنتیکی در گیاه دارویی مامیران، برای بهره وری موفق و پایدار از تنوع ژنتیکی موجود امری ضروری است. نتایج این تحقیق نشان داد که سطح تنوع ژنتیکی توده های مامیران کبیر در حد بسیار مطلوب و هم سو با نتایج کارولان و همکاران بود (۱۳). به نحوی که گیاهان بررسی شده از نظر ژنتیکی در گروه های مختلف قرار گرفتند. هم چنین مشخص شد که نشان گر ISSR می تواند با موفقیت، تنوع ژنتیکی را در توده های مامیران ایران نشان دهد و از آن به عنوان ابزاری مناسب جهت بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شود (۱۷، ۷، ۲).

نتایج این تحقیق نشان داد بین تنوع ژنتیکی و موقعیت جغرافیایی ارتباط معنی داری وجود ندارد. اما در تحقیق غنوی و همکاران بین تنوع فیتوشیمیایی و موقعیت جغرافیایی ارتباط قابل توجهی مشاهده شد (۴). با توجه به نتایج حاصله نمونه های جمع آوری شده از ۱۴ منطقه جغرافیایی مختلف در ایران از تنوع درون جمعیتی بالاتری در مقایسه با تنوع بین جمعیتی برخوردار بود؛ این امر می تواند به این دلیل باشد که گرده ها و بذرها به راحتی با باد پراکنده می شوند و می توانند جریان ژنی بین جمعیت ها را تسهیل کنند. البته شایان ذکر است چند ساله بودن این گیاه در حفظ نسبی ژنوتیپ های قدیمی آن موثر است (۱۷). هم چنین وجود تنوع درون جمعیتی می تواند به دلیل وجود خرد اقلیم ها در مناطق جمع آوری بوده و ضرورت نمونه گیری گسترده تر از مناطق جمع آوری را نشان می دهد.

ارتباط میان نشان گرهای ISSR و نواحی رمزکننده و غیر رمزکننده ژنوم در این امر بی تاثیر نیست؛ در واقع نشان گرهای فیتوشیمیایی فقط به نواحی رمزکننده ژنوم مرتبط می باشند در حالی که ممکن است آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش،

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.12.7]

مناطق غیر رمزکننده را نیز تکثیر نمایند. البته جنبه های بیوشیمیایی سنتز متابولیت های ثانویه علاوه بر ژنتیک گیاه به مرحله رشدی، تاکسونومی، موقعیت جغرافیایی و فصل نیز وابسته است (۱۹). در مطالعه حاضر آغازگر مبتنی بر تکرار دو نوکلئوتیدی CA ((CA)8G بیش ترین چند شکلی را نسبت به آغازگرهای دیگر نشان داد و از قدرت تفکیک و چند شکلی یش تری نسبت به آغازگرهایی با دیگر تکرارهای دو یا سه نوکلئوتیدی برخوردار است که با نتایج ردی و همکاران مطابقت داشت (۲۶). در واقع توسعه چند شکلی بنا بر طبیعت پرایمر و توالی تکرارها در پرایمر مورد استفاده تغییر می کند (۲۶). در تحقیقات صورت گرفته روی گیاهان دیگر نیز آغازگر مبتنی بر تکرار دو نوکلئوتیدی CA به عنوان مناسب ترین آغازگر برای مطالعه ها در بررسی تنوع ژنتیکی معرفی شده است (۱۷، ۶، ۵). نتایج به دست آمده در این پژوهش، حاکی از تنوع بالایی در میان نمونه های مامیران کبیر است که به علت تنوع اقلیمی در ایران و هم چنین تکثیر جنسی توسط بذر و دگرگرده افشانی در این گیاه قابل توجیه خواهد بود.

نتیجه گیری

از آن جا که تا کنون تنوع ژنتیکی گیاه مامیران کبیر مورد مطالعه قرار نگرفته است؛ نتایج این تحقیق می تواند به عنوان نقطه عطف مهم در برنامه های اصلاحی و به نژادی مطرح باشد و می توان از آن در تولید هیبریدهای با عمل کرد بالاتر و خصوصیات فیتوشیمیایی مناسب تر بهره جست.

سپاسگزاری

از کلیه کسانی که در جهت پیش برد این پژوهش ما را یاری نمودند، به ویژه جناب آقای دکتر میرزایی و سرکار خانم نصیری کمال تشکر و قدردانی را دارم.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.12.7]

منابع:

۱. براون، ت. آ.، کلون سازی ژن و بررسی DNA. ترجمه: قاسمیان، ع.، مرادپور، ز.، چاپ اول، انتشارات خسروی با هم کاری نشر دیباچ. ۱۳۹۰. تهران. ص .۴۵

۲. رحیم ملک، م.، خرمی، م.، غریبی، ش.، زینلی بادی، ح.، طالبی، م.، بررسی تنوع ژنتیکی برخی از نمونه های جمعیتی *Mentha spicata* L. و روابط آن با دو گونه *M. piperata* L. و *M. longifolia* (L.) Huds. با استفاده از نشان گرهای ISSR و مورفولوژیک. مجله علوم و فنون باغبانی ایران. ۲۰۱۴. جلد ۱۳، ۱: ۱۱۵ تا ۱۲۶.

۳. سفیدکن، ف.، برنامه راهبردی تحقیقات گیاهان دارویی، ۱۳۸۷. تهران، موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع.

۴. غنوی، ز.، بابائی، ع.، قاسم پور، ع.، ۱۳۹۱. مقایسه آلکالوئیدهای ریشه گیاه مامیران کبیر در شمال ایران با کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج.

۵. فابریکی اورنگ، ص.، شمس بخش، م.، جلالی جواران، م.، احمدی، ج.، بررسی تنوع ژنتیکی توده های بومی خربزه ایرانی (*Cucumis melo.* L) با استفاده از نشان گرهای ملکولی بین ریزماهواره ای (ISSR). ۲۰۰۹. مجله زیست شناسی ایران، سال بیست و دوم، شماره ۲.

۶. موسوی، س. م.، احمدی، ج.، سفیدکن، ف.، مطالعه تنوع ژنتیکی توده های گل راعی (*Hypericum perforatum* L.) ایران با استفاده از نشان گرهای بین ریزماهواره ای. دو فصلنامه تحقیق ها ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۲۰۱۲. سال بیستم، شماره 1.

۷. نصیری، ع.، میرزایی اصل، ا.، دلجو، ع.، آقایی زاده، م.، ۲۰۱۱. تنوع ژنتیکی برخی ارقام تجاری چغندرقند و نمونه های ایرانی زیر گونه چغندر ماریتیما با استفاده از نشان گرهای مولکولی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

۸. وین، د. د.، نشان گرهای مولکولی در ژنتیک گیاهی و بیوتکنولوژی، ترجمه: بی همتا، م. ر.، ناصریان خیابانی، ب.، زمانی، م. ج.، تهران. ۱۳۸۸. انتشارات دانشگاه تهران.

9. Bagheri, A., Darbandi, A., Malboobi, M. A., Practical applications of Plant Molecular Biology. Ferdowsi Mashad University Publications2002 .; 122-124.

10. Barenes, J., Anderson, L., Phillipson, D. Herbal Medicines: A Guide for Healthcare. Pharmaceutical Press, London2007 ., 136-145.

11. Bornet, B. and Branchard, M., Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) marker: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter, 2001. 19: 209-215.

12. Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Horloff, H. J., Sandal, N. N., Marcker, K.A., Lankhorst, R. M., Salentijn, E. M., Lange, W., Stiekema, W.J., Wyss, V., Grundler, F. M., and Jung, C., Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugarbeet. Science. 1997275. : 832-834.

13. Carolan, J. C. Hook, I. I. Chase, M.W. Kaedereit, J. W. Hodkinson. T. R. Phylogenetics of Papaver and Related Genera Based on DNA Sequences from ITS Nuclear Ribosomal DNA and Plastid trnL Intron and trnL–F Intergenic Spacers. Annals of Botany 2006.. 98: 141–155.

14. Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., A plant DNAminipreparation: Version II. Plant Mol. Bio. Rep 1983..1 , 14: 19-21

15. Ghareyazi, B., The application of DNA markers in plant breeding. Proceedings of the Fourth Conference on Agronomy and Plant Breeding. Sanati Isfahan University1998 .. 42(2): 328-381.

16. Gurkok, T., Kaymak, E., Boztepe, G., Koyuncu, M., Parmaksiz, I., Molecular characterization of the genus Papaver section Oxytona using ISSR markers online. journals. tubitak. gov. 2013.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.12.7]

17. Im, S. G., Yoo, S. H., Jeon, D. J., Cho. H. J., Choi, J. Y., Paik1, S., Min Park, Y. Chelidonium majus-Induced Acute Hepatitis., Ewha Medical Journal. 2014;37(1): 60-63.

18. Jakovljevic, Z. D., Stankovic, S. M., Topuzovice, D. M., Seasonal variability of Chelidonium majus. Secondary metabolites content and Antioxidant activity Excli Journal. 2013. 12: 260- 268.

19. James, K., Extracting DNA from plants for DArT. Department of Botany, The Natural History Museum, 2005. London

20. Jancorne, P., Vandewalle, F., Assessment report on *Chelidonium majus* L. herba. European Medicines Agency Science Medicies Health. 2011.

21. Kour, B., Kour, G., Kaul, S., and Dhar, M. K., In Vitro Mass Multiplication and Assessment of Genetic Stability of In Vitro Raised Artemisia absinthium L. Plants Using ISSR and SSAP Molecular Markers, Advances in Botany. 2014. http://dx.doi.org/10.1155/2014/727020

22. Levi, A., and Claude, T. E., ISSR and AFLP markers differs among American watermelon cultivars with limited genetic diversity. HortScience, 2004. 129 (4): 553- 558.

23. Paris, H. S., Yonash, N., Portony, V., Mozes- Dauble, N., Tzuri, G., and Katzir, N., Assesment of genetic relationship in *Cucurbita pepo* using DNA markers. Teor. Apple. Genet. 2003. 106: 971- 978.

24. Raut, V. R.; Dodake, S. S; Chimote, V. P., Evaluation of genetic diversity in grain amaranth (Amaranthus hypochondriacus) at molecular level using ISSR markers. Indian Journal of Agricultural Biochemistry. 2014. Vol. 27 No. 1 pp. 60-65.

25. Reddy, P. M., Sarla, N., and Siddiq, E.A., Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica. 2002.128 : 9–17.

26. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D., Genom fingerprinting by inter simple sequence repeat (ISSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. 1994. 20:176-18

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.22.12.7]