اولین همایش ملی گیاهان دارویی،طب سنتی و کشاورزی ارگانیک

همدان دانشکده شهید مفتح ۷ آذر ۱۳۹۳

ارزیابی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های ایرانی سیاه دانه (*Nigella sativa* L.) با استفاده از نشانگرهای SCOT

فرشته بدخشان [*1]، امیر محمد ناجی [2]، علیرضا رضازاده [3] و حمیده اله قلی [4]

[*1] کارشناس ارشد، دانشگاه شاهد — پست الکترونیکی: fe_badakhshan@yahoo.com

[2] عضو هیئت علمی گروه اصلاح نباتات، دانشگاه شاهد — پست الکترونیکی: amnaji1970@yahoo.com

[3] عضو هیئت علمی گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شاهد — پست الکترونیکی: rezazadeh@shahed.ac.ir

[4] کارشناس ارشد، دانشگاه شاهد — پست الکترونیکی: ha.allahgholi@yahoo.com

چکیده

تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم گیاه، تعیین ساختار ژنتیکی و پتانسیل هر گونه گیاهی قبل از انجام هر کار اصلاحی و معرفی ارقام کیفی با عملکرد بالا، امری لازم و ضروری در توسعه استراتژی‌های جمع‌آوری و حفاظت مواد گیاهی به عنوان منابع ژنتیکی می-باشد. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۱۶ توده سیاه دانه ایرانی با استفاده از ۹ آغازگر SCOT مورد ارزیابی قرار گرفت که همگی باندهای تکرارپذیر مناسب تولید کردند. در نتایج حاصل از این تحقیق ۷۳ باند امتیازبندی شد که ۵۲ باند آن چندشکلی را به نمایش گذاشتند. میانگین محتوای چندشکلی اطلاعات (PIC) برای آغازگرهای استفاده شده از حداقل ۰/۱۳۴۸ تا حداکثر ۰/۲۴۴۲ متغیر بود.آغازگر P ۱ بالاترین مقدار PIC (۰/۲۴۴۲) را دارا بود. روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد محاسبه شد و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، ۱۶ توده مورد مطالعه را در ۷ گروه قرار داد که مطابق مناطق جغرافیایی ایران نبود. نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگرهای SCOT به طور مؤثری می‌توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی توده-های سیاه دانه استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: سیاه دانه، گیاه دارویی، تنوع ژنتیکی، نشانگر مولکولی، SCOT

مقدمه

فلات ایران از اقلیم‌های گوناگونی برخوردار است، به همین دلیل گونه‌های گیاهی متنوعی در آن انتشار دارند. در میان فلور غنی ایران که بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی را در بر می‌گیرد، تعداد بسیاری از آنها را گیاهانی تشکیل می‌دهند که برخی از آنها به سبب دارا بودن خاصیت درمانی، دارویی نامیده می‌شود (زرگری، ۱۳۶۸: ۴۳-۴۴). در بین گیاهان دارویی، جنس *Nigella* از خانواده Ranunculaceae حدود ۸ گونه در ایران دارد. سیاه دانه با نام علمی *Nigella sativa* L. یکی از گونه‌های مهم این خانواده است که به طور طبیعی در نقاط مختلف ایران بعمل می‌آید. سیاه دانه گیاهی دارویی، دولپه، علفی و یکساله می‌باشد که در غرب آسیا و منطقه مدیترانه رشد می‌کند (Mashhadian & Rakhshande, 2005: 47-52). این گیاه یکساله با ساقه‌های ایستاده به ارتفاع ۶۰ تا ۷۰ سانتیمتر است. برگ‌ها دارای بریدگی‌های نخی، برگچه‌های ریز، گل‌های زیبا به رنگ سفید و خاکستری تا آبی با پرچم-های متعدد، کاسبرگ‌هایی به رنگ گلبرگ، میوه به صورت کپسول (غلاف دندانه‌دار) که درون آن تعداد زیادی دانه سیاه و معطر قرار دارد (مجنون حسینی و دوازده امامی، ۱۳۸۶: ۹۴). برای دانه این گیاه خواصی مانند شیرآوری، ضدنفخ، مسهل، ضدصرع، ضد-ویروس، ضدباکتری، ضدتومور، مسکن و کاهش‌دهنده قند خون را ذکر نموده‌اند (Bhat *et al*., 2005: 203-205). تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک بذر و اجرای برنامه به‌نژادی است (فاضلی و چقامیرزا، ۱۳۹۰: ۱۰۴-۹۷). در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های تحسین برانگیزی که در زمینه زیست شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی صورت گرفته، ابزار قدرتمندی را برای پژوهش‌های ژنتیک تفصیلی گیاهان عالی از جمله گیاهان زراعی فراهم کرده‌اند. شاید اساسی ترین و مفیدترین این ابزارها، نشانگرهای DNA باشند که همان تفاوت‌های قابل ثبت ردیف‌های بازی DNA موجود بین دو یا چند نمونه را آشکار می‌نماید (نقوی و همکاران، ۱۳۸۹ : ۳). نشانگر مولکولی SCOT بر اساس تنوع در ناحیه حفظ شده کدون آغاز ATG عمل می‌کند. این نشانگر از نشانگرهای غالب بوده که از جمله مزایای این روش هزینه پایین، سرعت و سهولت اجرا و عدم نیاز به اطلاعات اولیه از ژنوم می‌باشد. از این نشانگر می‌توان در تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی، غربال به روش بالک، شناسایی مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمّی (QTL) و انگشت‌نگاری DNA استفاده کرد (Collard & Mackill, 2009: 86-93). به منظور تعیین تنوع ژنتیکی درانبه، تحقیقی بر روی ۷۳ رقم انبه با استفاده از ۳۴ آغازگر SCOT انجام گردید. در مجموع ۲۷۵ قطعه تکثیری امتیازدهی شدند که از این تعداد ۲۰۳ مکان چندشکلی نشان دادند. در تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA ارقام در چهار گروه قرار گرفتند (Luo *et al*, 2012:1505-1515). در مطالعه‌ای دیگر، ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۳ رقم انبه با استفاده از نشانگرهای SCOT و ISSR مورد بررسی قرار گرفت. ۱۸ آغازگر SCOT و ۱۸ آغازگر ISSR به ترتیب ۱۵۸ و ۱۵۶ نوار با وضوح بالا و تکرارپذیر تولید کردند. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، ۲۳ رقم مورد مطالعه را با استفاده از نشانگرهای SCOT و ISSR به ترتیب در دو و سه گروه بزرگ قرار داد. نتایج نشان داد که نشانگرهای SCOT ابزار مناسبی برای مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام انبه می‌باشند (Luo *et al*, 2010: 1176-1184). گرجی و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۴ رقم سیب زمینی تتراپلوئید و یک جمعیت در حال تفکیک، نشانگرهای SCOT، ISSR و RAPD را مورد استفاده قرار دادند. نتایج نشان داد که چندشکلی آشکار شده توسط آغازگرهای SCOT در مقایسه با نشانگرهای دیگر بیشتر بود و همچنین آنالیز نشانگر SCOT کارایی بهتری در انگشت‌نگاری واریته‌های سیب‌زمینی داشت. در مجموع نتایج این پژوهش

نشان داد که نشانگرهای ISSR، SCOT و RAPD به طور موثری می‌توانند برای مطالعه تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و واریته‌های سیب زمینی استفاده شوند (Gorji *et al*, 2011: 226-227). همچنین تنوع ژنتیکی ۲۰ توده بادام زمینی با استفاده از نشانگر SCOT نشان داده است که نشانگر مولکولی به کار گرفته شده علاوه بر مناسب بودن برای مطالعه انگشت نگاری در ارقام زراعی این گیاه جهت شناسایی تنوع ژنتیکی و روابط بین گونه‌ای با اهمیت است (Xiong *et al*, 2011:3487-3494). با وجود اینکه سیاه دانه یکی از گیاهان دارویی پرمصرف بازار جهانی در درمان بیماری‌ها و صنایع غذایی محسوب می شود، اما در کشور ما اطلاعات کافی در زمینه توده‌های بومی موجود در کشور وجود نداشته و کشت زراعی آن هنوز متداول نشده است (سلامتی و زینلی، ۱۳۹۱: ۲۱۴-۲۰۱). بنابراین بررسی تنوع توده‌های بومی، تفکیک و طبقه‌بندی آنها می‌تواند کمک مؤثری در روند اصلاحی این گیاه به حساب آید. لذا این تحقیق نیز با به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های سیاه دانه و تعیین میزان چندشکلی با استفاده از آغازگرهای نشانگر SCOT انجام شد تا از بین آنها آغازگرهایی با کارایی بالا در ارزیابی تنوع ژنتیکی سیاه دانه معرفی شوند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ۱۶ توده ایرانی سیاه دانه (*Nigella sativa* L.) می‌باشد که از مناطق مختلف ایران با اقلیم‌های متفاوت جمع‌آوری شده‌اند(جدول۱). DNA ژنومی از بافت برگ گیاهچه‌های رشد یافته در گلدان و در مرحله ۴-۳ برگی با استفاده از روش Doyle and Doyle (1990) با اندکی تغییرات استخراج شد. نمونه‌های DNA استخراج شده جهت ارزیابی دقیق کمی و کیفی با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد سنجش قرار گرفتند و رقیق سازی لازم با توجه به غلظت هر نمونه جهت استفاده در واکنش‌های PCR انجام شد. در این بررسی از ۹ آغازگر SCOT جهت تکثیر DNA ژنومی استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۴/۵ میکرولیتر PCR master با غلظت X ۲، سه میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰ نانو گرم در میکرولیتر و ۲/۵ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰µM به همراه یک قطره روغن مینرال برای جلوگیری از تبخیر انجام گرفت. واکنش‌های PCR با دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad iCycler, USA) با برنامه PCR شامل مراحل، واسرشته‌سازی[۱] اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، در ادامه ۴۰ چرخه به صورت واسرشته سازی به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال[۲] آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر(جدول ۲) و مرحله توسعه[۳] رشته جدید به مدت ۱/۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت توسعه نهایی به مدت ۶ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس محصولات تکثیر یافته واکنش زنجیره‌ای با استفاده از ژل آگارز ۱/۸ ٪ الکتروفورز شد. رنگ آمیزی ژل با GELRED و عکس‌برداری توسط دستگاه ژل داک انجام شد. مقایسه ژنوتیپ‌ها بر اساس حضور و عدم حضور قطعه تکثیرشده بوسیله SCOT انجام شد. بدین صورت که عدد (۱) برای حضور قطعه و عدد (۰) برای عدم حضور قطعه تکثیرشده در نظر گرفته شد و برای تشکیل ماتریس داده‌های خام، سطرها به ژنوتیپ‌ها و ستون‌ها به نوارها اختصاص یافت. تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی و رسم دندوگرام با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc 2.2 بر

۱- Denaturation
۲- Annealing
۳- Extension

اساس ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از روش UPGMA انجام شد. در این مطالعه شاخص نشانگری (MI[۴]) و میانگین محتوای چندشکل (PIC[۵]) نیز برای آغازگرها محاسبه گردید.

جدول (۱) محل جمع‌آوری و کد نمونه‌های سیاه دانه مورد استفاده در این مطالعه

کد نمونه	محل جمع آوری
N ۱-۵	کرمانشاه
N ۶-۱۰	مرکزی (اراک)
N ۱۱-۱۵	کرمان (رابر)
N ۱۶-۲۰	مازندران (چالوس)
N۲۱-۲۵	خراسان جنوبی (طبس)
N۲۶-۳۰	خراسان جنوبی (فردوس)
N۳۱-۳۵	خراسان رضوی (قوچان)
N۳۶-۴۰	کردستان (بانه)
N۴۱-۴۵	خوزستان (اهواز)
N ۴۶ -۵۰	شمال
N ۵۱-۵۵	گلستان (گرگان)
N ۵۶-۶۰	فارس (آباده)
N ۶۱-۶۵	خراسان جنوبی (اسفندیار)
N ۶۶-۷۰	اصفهان
N۷۱-۷۵	خوزستان
N۷۶-۸۰	نامشخص

جدول (۲) شماره، توالی و دمای اتصال آغازگرها در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شده در این مطالعه

شماره آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)
$P_۱$	۵'-AACCATGGCTACCACCAC-۳'	۶۰/۸
$P_۲$	۵'-CCATGGCTACCACCGCCA-۳'	۶۳
$P_۳$	۵'-CAACAATGGCTACCACCC-۳'	۵۹
$P_٤$	۵'-ACGACATGGCGACCATCG-۳'	۶۰/۸
$P_۵$	۵'-CAACAATGGCTACCACGC-۳'	۵۴
$P_۶$	۵'-CAACAATGGCTACCACGG-۳'	۵۶/۱

۴- Marker Index
۵- Polymorphism Ingormation Content

$P_۷$	۵'-CCATGGCTACCACCGGCC-۳'	۶۲/۲
$P_۸$	۵'-CATGGCTACCACCGGCCC-۳'	۶۴/۳
$P_۹$	۵'-CCATGGCTACCACCGCAG-۳'	۵۸/۵

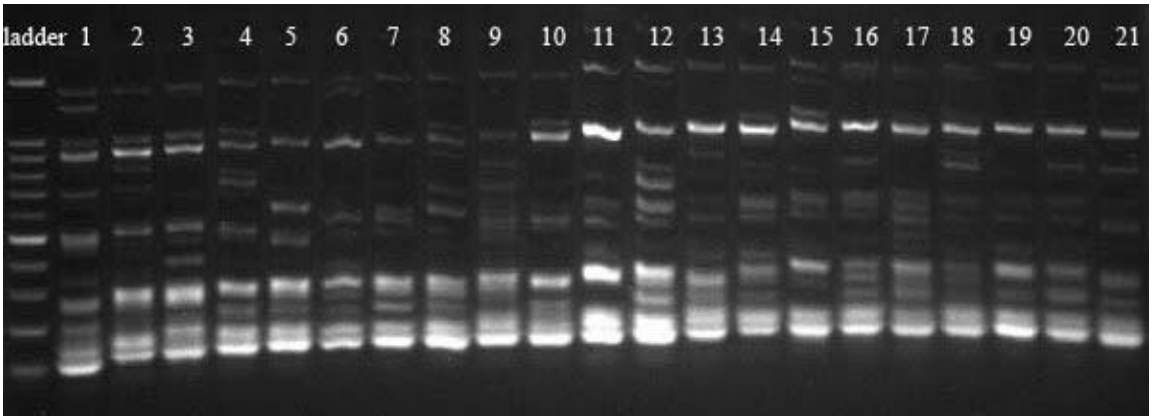
نتایج و بحث

در این پژوهش، تنوع ژنتیکی توده‌های بومی سیاه دانه جمع‌آوری شده از استان‌های کرمانشاه، مرکزی، کرمان، مازندران، خراسان جنوبی، خراسان رضوی، کردستان، خوزستان، گلستان، فارس، اصفهان با استفاده از ۹ آغازگر SCOT مورد بررسی قرار گرفت که همگی باندهای واضح و چندشکل را تولید کردند. در مجموع ۷۳ باند امتیازدهی شد که ۵۲ باند چندشکل بودند. تعداد باندها برای هر آغازگر از ۷ تا ۱۰ متفاوت بود. آغازگر $P_۴$ با تعداد ۱۰ باند و بعد از آن، آغازگرهای $P_۵$ و $P_۹$ با تعداد ۸ باند بیشترین تعداد باند و آغازگرهای $P_۳$ و $P_۷$ و $P_۸$ با تعداد ۷ باند کمترین تعداد را داشتند. نتایج بدست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول سه آمده است.PIC توانایی جداسازی و تفکیک نشانگر بر اساس تعداد و آلل‌های جایگاه نشانگر و فراوانی آنها در مجموعه نمونه برداری است که هرچه میزان آن بالاتر باشد نمایانگر قدرت تمایز بیشتر نشانگر می‌باشد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی برای آغازگرهای استفاده شده از حداقل ۰/۱۳۴۸ تا حداکثر ۰/۲۴۴۲ متغیر بود. بالاترین میزان چندشکلی مربوط به آغازگر $P_۱$ و معادل ۰/۲۴۴۲ بود. آغازگر $P_۵$ با کمترین میزان چندشکلی توانائی خوبی برای جداسازی ژنوتیپ‌ها نداشت. شاخص نشانگری (MI) یک معیار برای تعیین کارایی نشانگر در تخمین چندشکلی می‌باشد. در پژوهشی، دامنه شاخص محتوی چندشکلی ۳۹ اکوتیپ سیاه دانه با استفاده از ۲۰ آغازگر SCOT از ۰/۰۶۵۷ تا ۰/۲۲۶ متغیر بود (میرزایی، ۱۳۹۲: ۱). در این مطالعه شاخص نشانگری (MI) آغازگرها بین ۰/۱۸ تا ۲/۳۹ متغیر بود. بیشترین مقدار شاخص نشانگر متعلق به آغازگر $P_۴$ بود که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگر در مقایسه با سایر آغازگرهاست.

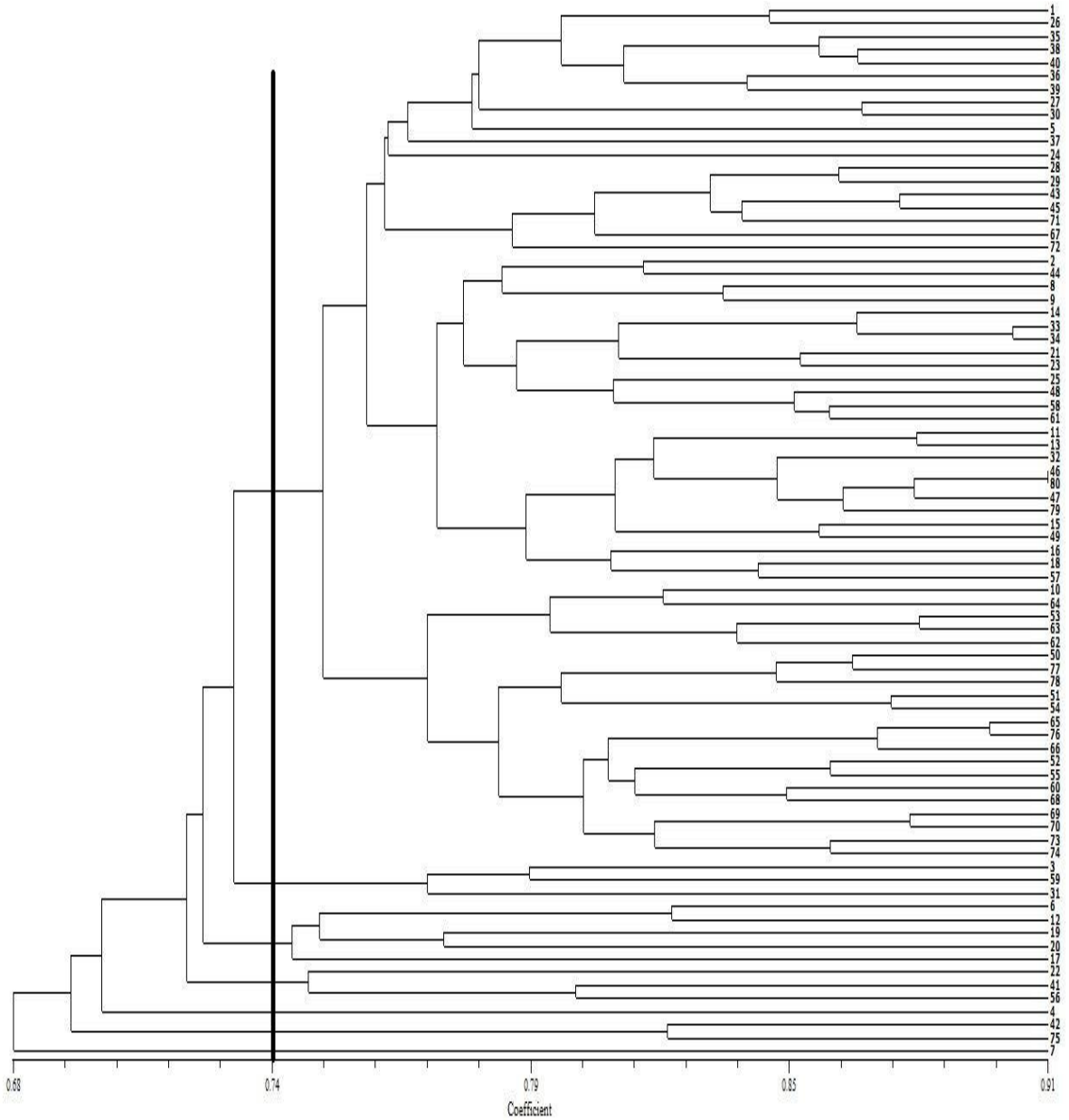
جدول (۳) درصد چندشکلی، تعداد مکان‌های تکثیرشده چندشکل، محتوای اطلاعات چندشکل و شاخص نشانگری در مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۶ توده سیاه دانه

شماره آغازگر	تعداد مکان-های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چندشکل	درصد چندشکلی	PIC	MI
$P_۱$	۸	۷	۰/۸۷	۰/۲۴۴۲	۱/۴۸
$P_۲$	۸	۶	۰/۷۵	۰/۲۱۴۶	۰/۹۶
;$P_۳$	۷	۵	۰/۷۱	۰/۱۴۱۹	۰/۵۰
$P_۴$	۱۰	۱۰	۱	۰/۲۳۹۷	۲/۳۹
$P_۵$	۹	۵	۰/۵۵	۰/۱۳۴۸	۰/۳۷

$P_۶$	۸	۴	۰/۵۰	۰/۱۵۵۴	۰/۳۱
$P_۷$	۷	۳	۰/۴۲	۰/۱۴۶۳	۰/۱۸
$P_۸$	۷	۶	۰/۸۵	۰/۱۷۸۴	۰/۹۰
$P_۹$	۹	۶	۰/۶۶	۰/۱۵۳۲	۰/۶۰
مجموع	۷۳	۵۲	۶/۳۱	۰/۱۷۸۷	۷/۶۹



شکل(۱) الگوی باندی SCOT با استفاده از آغازگر P ۹



شکل (۲) دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۸۰ ژنوتیپ سیاه دانه مورد مطالعه

جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، از روش‌های مختلف استفاده شد و در نهایت تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد انتخاب شد. گروه‌بندی بر این اساس با ترسیم خط برش در فاصله ۰/۷۴ ، ۱۶ توده مورد مطالعه را در ۷ گروه قرار داد که اکثر ژنوتیپ‌ها در گروه اول قرار داشتند که شامل ۶۵ نمونه از بین ۸۰ نمونه جمع شده بود. به منظور بررسی راحت‌تر، گروه اول به سه زیر گروه "الف" تا "ج" تقسیم شد که برخی از ژنوتیپ‌های گروه اول شامل ژنوتیپ‌های کرمانشاه(n۱)، فردوس(n۲۶)،

قوچان(n۳۵)، اراک (n۹)، بانه (n۳۷)، کرمان(n۱۱)، گرگان (n۵۱) بود. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های کرمانشاه (n۳)، آباده (n۵۹)، قوچان (n۳۱) بود. در گروه سوم ژنوتیپ‌های اراک (n۶)، کرمان(n۱۲)، چالوس(n۱۹،n۲۰ و n۱۷)، در گروه چهارم ژنوتیپ‌های طبس (n۲۲)، اهواز (n۴۱)، آباده (n۵۶) قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های اهواز (n۴۲)، خوزستان (n۷۳) گروه ششم را تشکیل دادند و ژنوتیپ‌های کرمانشاه (n۴)و اراک (n۷) به ترتیب گروه‌های پنجم و هفتم را تشکیل دادند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد در شکل ۲ آورده شده است. با توجه به منطقه جغرافیایی توده‌ها و مقایسه آن با دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، تطابق مطلوبی بین فاصله ژنتیکی بعضی توده‌ها و پراکنش جغرافیایی آنها مشاهده نگردید. به عبارتی واقع شدن توده‌هایی با منشأ جغرافیایی متفاوت از همدیگر در یک گروه تطابق آشکاری بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی را نشان نمی‌دهد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که جدایی جغرافیایی تنها عامل بوجود آورنده تنوع ژنتیکی نمی‌باشد و عواملی مانند مهاجرت‌ها و نقل و انتقال‌ها از یک نقطه به نقطه دیگر می‌توانند موجب پراکنش آنها شوند. در مجموع، با توجه به اینکه آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق چندشکلی قابل قبولی را نشان دادند، می‌توان در مطالعات آینده روی این گیاه و حتی سایر گیاهان دارویی از آنها استفاده کرد.

نتیجه گیری

اطلاع از روابط ژنتیکی برای بهره‌وری موثق و پایدار از تنوع ژنتیکی موجود در گیاه سیاه دانه ضروری است. نتایج این تحقیق نشان داد که سطح تنوع ژنتیکی توده‌های سیاه دانه در حد بسیار مطلوب بود. همچنین نتایج گروه‌بندی تجزیه کلاستر تا حد زیادی عدم ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان داد.

فهرست منابع

زرگری، ع. ۱۳۶۸. گیاهان دارویی، تهران، جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران.

سلامتی، م.ا. و زینلی، ح. (۱۳۹۱). بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های سیاه دانه (*Nigella sativa* L.) با استفاده از صفات مورفولوژی و زراعی، فصلنامه ی علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۹(۱): ۲۰۱-۲۱۴.

فاضلی، ف. و چقامیرزا، ک. (۱۳۹۰). بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های نخود زراعی بومی ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR، ژنتیک نوین، ۶(۲): ۹۷-۱۰۴.

مجنون حسینی، ن و دوازده امامی، س. (۱۳۸۶). زراعت و تولید برخی گیاهان دارویی و ادویه‌ای، انتشارات دانشگاه تهران.

میرزایی، خ.، (۱۳۹۲)؛ بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های سیاه دانه ایرانی (*Nigella sativa* L.) با استفاده از نشانگر SCoT، قادر میرزاقادری و هدیه بدخشان، سنندج، دانشگاه کردستان.

نقوی، م.، قره‌یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. (۱۳۸۹). نشانگرهای مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران.

Bhat, S.A., Thenua, O.V.S. Shivakumar, B.G. & Malik. J.K. (2005). Performance of summer green gram (*Vigna radiate Wilczek*) as influenced by biofertilizers and phosphorus nutrition. Haryana Journal of Agronomy, 21(2): 203-205.

Collard, B. C., & Mackill, D. J. (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant molecular biology reporter, 27(1), 86-93.

Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem bull, 19, 11-15.

Gorji, A. M., Poczai, P., Polgar, Z., & Taller, J. (2011). Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. American journal of potato research, 88(3), 226-237.

Luo, C., He, X. H., Chen, H., Hu, Y., & Ou, S. J. (2012). Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L.: revealed through SCoT analysis. Genetic Resources and Crop Evolution, 59(7), 1505-1515.

Luo, C., He, X. H., Chen, H., Ou, S. J., & Gao, M. P. (2010). Analysis of diversity and relationships among cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers. Biochemical systematics and Ecology, 38(6), 1176-1184.

Mashhadian, N.& Rakhshande H. (2005). Antibacterial and antifungal effects of *Nigella sativa* extracts against *S. aureus, P. aeroginosa and C. albicans*. Pakistan Journal of Medicine Sciences, 21(1): 47-52.

Xiong, F., Zhong, R., Han, Z., Jiang, J., He, L., Zhuang, W., & Tang, R. (2011). Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes. Molecular biology reports, 38(5), 3487-3494.