

بررسی ژن‌های احتمالی کنترل‌کننده جنسیت در نخل

خرما (*Phoenix dactylifera* L.) با استفاده از نشانگرهای دی.ان.ا

با آغازگرهای اختیاری

مهرنوش پورنبی^{۱*}، خلیل عالمی سعید^۲، محمد حسین دانشور^۳، عزیز تراهی^۴
۱، ۲ و ۳- به ترتیب کارشناس ارشد، استادیار و دانشیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی
رامین (اهواز)

۴- کارشناس ارشد باغبانی مرکز تحقیقات میوه‌های گرمسیری استان خوزستان (اهواز)

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_pournabi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۹)

چکیده

نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.)، گیاهی تک‌لپه، دو پایه و با عمر طولانی است که از نظر اقتصادی از اهمیت بالایی در کشور ایران برخوردار است. از آن‌جا که باردهی این گیاه پس از ۵ سال آغاز می‌گردد، تعیین جنسیت آن در مراحل اولیه‌ی رشد در سرعت بخشیدن به برنامه‌های اصلاحی و در هنگام احداث نخلستان بسیار مهم می‌باشد بر این اساس برنامه‌ریزی برای انتخاب نخل خرما، مقاوم و پرمحصول احتیاج به شناسایی نشانگرهای مولکولی دارد. در این تحقیق از نشانگرهای دی.ان.ا از ۱۶ آغازگر اختیاری ۹ تا ۲۱ بازی برای تکثیر دی.ان.ا الگو استفاده شد. از ۳۰ رقم نخل خرما (۲۰ رقم نر و ۱۰ رقم ماده) استفاده شد. دو توده ژنومی در دو میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری تهیه گردید. آغازگرهای HB9، OPO08، A12 و K1 فقط در مخلوط دی.ان.ا ارقام نر تولید باند نمودند و در توده‌ی ماده هیچ باندهایی از این ۴ آغازگر رویت نشد. آغازگرهای HB12، HB7 و 814 فقط در مخلوط دی.ان.ا ارقام ماده تولید باند کردند سپس آغازگرهای HB9، OPO08، A12 و K1 در ۲۰ رقم نر آزمایش شدند که از این میان فقط سه آغازگر HB9، OPO08 و K1 در تمامی ارقام نر به ترتیب باند مشترک ۳۵۰، ۱۱۰۰ و ۴۵۰ جفت‌بازی تولید نمودند. سه آغازگر HB12، HB7 و 814 هر یک به‌طور مجزا بر روی ۱۰ رقم ماده آزمایش شدند و فقط HB7 در تمامی ارقام ماده باند مشترک ۷۰۰ جفت‌بازی تولید کرد. ثبات این باندها در تکرارهای مختلف و ارقامی که از نظر ژنتیکی از هم دور بودند قابلیت آن‌ها را در تعیین جنسیت نخل خرما ثابت کرد.

واژه‌های کلیدی

آغازگر اختیاری،
تعیین جنسیت،
نخل خرما،
نشانگرهای مولکولی.

مقدمه

نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) گیاهی تک لپه، دوپایه و با عمر طولانی است که از اهمیت اقتصادی بالایی در کشور ایران برخوردار است (۱). تعیین جنسیت، گلدهی و میوه‌دهی در این درختان کند بوده و در اواخر سال پنجم رشد نر یا ماده بودن آن‌ها محرز می‌گردد. بنابراین برای انتخاب نخل خرماهای مفید و تعیین جنسیت آن‌ها در سنین اولیه رشد جهت احداث نخلستان‌ها به استفاده از نشانگرهای مولکولی احتیاج است (۹).

بکارگیری نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده‌ترین روش دستیابی به اطلاعات ژنتیکی است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگر اختیاری^۱ یکی از این نشانگرهاست که به خوبی تفاوت‌های موجود در دی.ان.ای الگو را آشکار می‌کند. این نشانگرها برای ارزیابی و تجزیه‌ی پیوستگی‌های بین نشانگرها و ژن‌ها در گونه‌های گیاهی مختلف به‌طور مؤثری به‌کار رفته‌است (۳). یکی دیگر از ساده‌ترین و کم هزینه‌ترین نشانگرها، نشانگر رپید می‌باشد که نیاز به مقدار کم دی.ان.ای (۵-۲۵ ng) داشته و هم‌چنین امکان غربال سریع و مؤثر توالی دی.ان.ای، براساس چند شکلی در بسیاری از مکان‌های ژنی را فراهم می‌نماید (۲). تفاوت این نشانگر با نشانگرهای ا.پی-پی.سی.آر در تعداد واحدهای نوکلئوتیدی تشکیل دهنده آن‌ها می‌باشد (در نشانگرهای ا.پی-پی.سی.آر تعداد واحدهای نوکلئوتیدی بین ۲۰-۱۰۰ mer متغیر است درحالی‌که در نشانگر رپید این تعداد از ۱۰ mer بیش‌تر نیست). یکی از کاربردهای این نوع از نشانگرها در شناسایی نوع جنسیت گیاهان است که به‌ویژه در گیاهان باغی که جنسیت بر میزان و کیفیت میوه تأثیر می‌گذارد، بسیار مفید می‌باشند. هرمزا و همکاران (۱۹۹۴)، با استفاده از ۱۴ رقم پسته و ۷۰۰ آغازگر الیگونوکلوئیدی اقدام به شناسایی نشانگر رپید پیوسته با تعیین جنسیت پسته نمودند در میان آن‌ها آغازگر OPO08 باند ۹۴۵ جفت بازی که فقط در توده‌ی ماده رویت شده بود تولید کرد. این باند در تک‌تک ارقام (۱۴ رقم) به‌طور مجزا امتحان شد و به عنوان نشانگر رپیدی که می‌تواند در تعیین جنسیت گیاه پسته کارآمد باشد معرفی گردید.

احسان‌پور و همکاران (۲۰۰۸)، چهار رقم ماده پسته شامل ارقام اکبری، احمد آقایی، فندق، کله قوچی و ۴ رقم نر که از باغ اردستان اصفهان برداشت شده بودند را بوسیله‌ی ۹ نشانگر آی.اس.اس.آر^۲ بررسی کردند که در این میان دو نشانگر با توالی‌های (AC)CG و (AC)TA قادر بودند فقط در گیاهان ماده تولید باندهای دی.ان.ا کنند و بدین صورت ارقام ماده از نر را شناسایی کردند.

گانگوپادهای و همکاران (۲۰۰۷) بر روی شناسایی ژن تعیین جنسیت در پاپایا^۳ در مراحل پیش از گلدهی بوسیله‌ی نشانگرهای رپید و آی.اس.اس.آر کار کردند که آغازگر آی.اس.اس.آر^۴ (GACA) توانست ژن جنسیت در پاپایا را با تولید باند خاص در ارقام ماده آشکار کند.

بخیت و همکاران (۲۰۰۸) ذخیره‌ی بیوشیمیایی و نشانگرهای مولکولی را در شناسایی جنسیت نخل خرماهای تمایز یافته‌ی بدست آمده از کشت درون شیشه‌ای را بررسی کردند. از نظر بیوشیمیایی آنزیم‌های فسفاتاز و گلوتامات اکسالوآستات تفاوت بسیاری را بین نر و ماده نشان دادند ولیکن در تجزیه نشانگر رپید ارتباط کمی بین جنسیت‌ها پیدا شد و نتایج بررسی تشابه ژنتیکی آن‌ها نتوانست پیوستگی با جنسیت یا تخمین نوع جنسیت را در کلون‌های ناشناخته مشخص کند. گرچه یونیس و همکاران (۲۰۰۸) اعلام کردند که ۵ آغازگر HB9, HB12, HB10, HB9, HB12 و 814 قادر به تشخیص جنسیت نر هستند ولی بررسی آن‌ها فقط روی سه رقم نخل خرما مصری صورت گرفته بود که از قابلیت اعتماد چندانی برخوردار نبود و بایستی در ارقام متعدد و غیر خویشاوند با ارقام مورد بررسی آن‌ها نیز آزمایش می‌شد. علاوه بر این‌ها نشانگر مناسبی برای تشخیص ارقام ماده نیز تا کنون معرفی نشده است. در همین راستا تحقیق حاضر با هدف شناسایی نشانگرهای دی.ان.ا ژن تعیین جنسیت در نخل خرما طراحی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی برگچه‌های حاصل از برگ‌های تازه مرکز تاج درخت نخل که از ۳۰ کلون موجود در مؤسسه تحقیقات میوه‌های

² Inter simple sequence repeat (ISSR)

³ Carica papaya

¹ Arbitrary primed-PCR (AP-PCR)

گرمسیری استان خوزستان و منطقه کهنوج جیرفت شامل ۲۰ رقم نر (سمساولی، غنامی، وردی، جارویس، نرهای شماره ۱-۱۱، سبز پرک، نر خارجی ۱، نر خارجی ۲، سبز غنامی و سرخ غنامی) و ۱۰ رقم ماده (استعمران، برحی، بریم، دیری، مضافتی، حلاوی، آلمهتری، دگلت‌نور، زاهدی و مجول) تهیه شدند.

استخراج دی.ان.ای به روش CTAB انجام شد (۳). کیفیت دی.ان.ای نمونه‌ها در ژل آگارز یک درصد و کمیت آن‌ها با استفاده از دستگاه بیوفتومتر اندازه‌گیری گردید.

تهیه توده‌های نر و ماده

دو توده مجزا یکی فقط از دی.ان.ای تمامی ارقام نر و دیگری فقط از دی.ان.ای تمامی ارقام ماده در دو میکروتیوب تهیه شد (از هر نمونه ۵ نانوگرم در میکرولیتر برداشت شد).

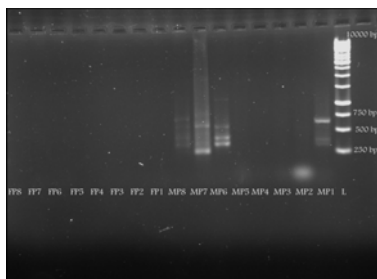
تجزیه ریپد و ا.پی-پی.سی.آر

نشانگرها به‌وسیله ۱۶ آغازگر شامل ۸ آغازگر ریپد و ۸ آغازگر ا.پی-پی.سی.آر که قبلاً مورد استفاده قرار گرفته بودند (جدول شماره ۱) تجزیه شدند. ترکیبات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل: ۰/۸ واحد آنزیم تک پلیمرز، ۰/۱mM dNTPs، ۲۵pmol آغازگر، ۲/۵mL بافر ۱۰X دی.ان.ای تک پلیمرز و ۵۰ng ژنوم

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش

منبع	نام گیاه در آزمایشات قبلی	جنسیت گیاه در آزمایشات قبلی (اندازه باند تولید شده)	GC%	توالی	تعداد باز	نام آغازگر	کد
۱۱	خرما	♂ (۱۰۱۰ bp)	۵۵	GACCACAGCCTC GAGAACAT	۲۰	HB ₁₀	A
۱۱	خرما	♂ (۳۷۵ bp)	۷۲/۷۳	(CAC) ₃ GC	۱۱	HB ₁₂	B
۱۱	خرما	♂ (۳۴۰ bp)	۷۱/۴۳	GGGCTTGGGCCG CGACAGCTA	۲۱	HB ₉	C
۶	پاپایا	♀ (*)	۵۰	(GACA) ₄	۱۶	HB ₆	D
۱۱	خرما	♂ (۵۹۰ bp)	۵۰	(CT) ₈ TG	۱۸	814	E
۵	پسته	♀ (۲۴۰۰ bp)	۵۵/۵۶	(AC) ₈ CG	۱۸	HB ₇	F
۱۱	خرما	♂ (۹۲۰ bp)	۵۴	(CT) ₈ AC	۱۸	844A	G
۵	پسته	♀ (۲۵۰۰-۲۵۰ bp)	۴۴/۴۴	(AC) ₈ TA	۱۸	HB ₈	H
۱۱	خرما	♂ (۳۷۰ bp) و ♀ (۷۵۰ bp)	۳۲	TCGGCGATAG	۱۰	A12	1
۴	خرما	♂ (۵۰۰ bp) و ♀ (۴۰۰ bp)	۳۴	CCCTACCGAC	۱۰	K3	2
۶	<i>C. cirinalis</i>	♂ (۶۸۶ bp)	۳۲	GTTTCGCTCC	۱۰	OPB01	3
۴	خرما	♂ (۲۰۰ bp) و ♀ (۴۰۰ و ۷۰۰ bp)	۳۰	TCGTTCCGC	۹	K4	4
۱۱	خرما	♀ (۴۹۰ bp)	۳۲	GTGATCGCAG	۱۰	A10	5
۷	پسته	♀ (۹۴۵ bp)	۳۲	CCTCCAGTGT	۱۰	OPO08	6
۴	خرما	♀ (۱۰۰۰ bp)	۳۴	TGGCGACCTG	۱۰	K1	7
۱۱	خرما	♂ (۶۷۵ bp) و ♀ (۸۰۰ bp)	۳۲	GGTCTACACC	۱۰	D10	8

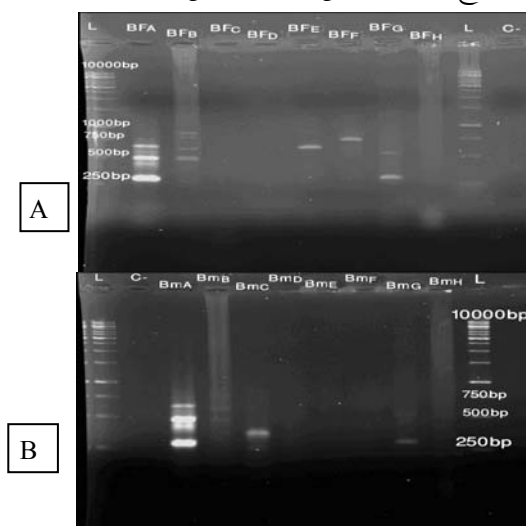
در حالی که آغازگرهای HB12 و 814 در گزارش قبلی، در ارقام نر خرما تولید باند کرده بودند ولی ظاهراً در ارقام ماده باندی تولید نکرده بودند (۱۱) به دلیل همین وضعیت مشکوک تصمیم گرفته شد جزء آغازگرهایی قرار گیرند که برای ادامه کار انتخاب شده و نتیجه‌گیری از آن‌ها به بررسی‌های تفصیلی در تک تک ارقام ماده موکول گردید. آغازگر HB7 که قبلاً گزارش شده بود قادر به تشخیص جنس ماده پسته است (۵) نیز برای ادامه کار انتخاب شد.



شکل ۲- آزمایش نشانگرهای رپید A12, K3, OPB01, K4, A10, OPO08, D10 و K1 (P1 to P8) بر روی هر دو توده نر (M) و ماده (F) L: سایز مارکر یک کیلو بازی

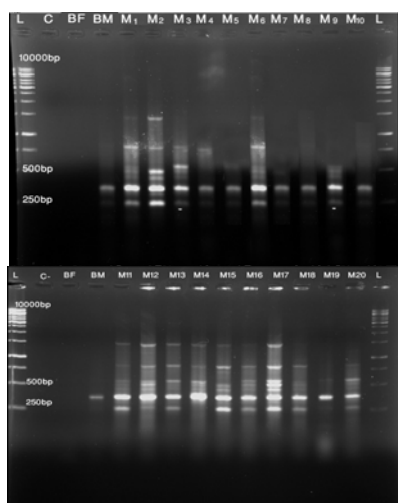
همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود از میان نشانگرهای رپید، آغازگرهای A10, K3, OPB01 و K4 هیچ‌یک در توده‌های نر و ماده ارقام خرما باند تولید نمودند. آغازگر OPB01 بنا به گزارش گانگوپادهیای و همکاران (۲۰۰۷)، در ارقام نر *Cycas* *circinalis* تولید باند ۶۸۶ جفت‌بازی کرده‌است که در مورد عدم باندهی این آغازگر نیز می‌توان گفت که هیچ جایگاه مکملی در خرما ندارد که نشان‌دهنده فاصله ژنومی این گیاه با خرما است. بخیت و همکاران (۲۰۰۸) از جنین‌های بذری خرما که از میوه‌های نرسیده و رسیده واریته زغلول تهیه کرده بودند به‌عنوان ریز نمونه در کشت بافت استفاده نموده و گزارش کرده بودند که آغازگر K3 در جنین‌های بذری نر باند ۵۰۰ جفت‌بازی و در جنین‌های بذری ماده باند ۴۰۰ جفت‌بازی تولید نموده است. همچنین آغازگر K4 در جنین‌های بذری نر خرما تولید باند ۲۰۰ جفت‌بازی و در جنین‌های بذری ماده باندهای ۴۰۰ و ۷۰۰ جفت‌بازی تولید نموده‌است. عدم تشکیل باند در توده‌های ارقام نر و ماده در این تحقیق و همچنین وجودشان در جنین‌های بذری نر و ماده آزمایش بخیت و همکاران (۲۰۰۸) را باید ناشی از روابط

همان‌گونه که شکل ۱ نشان می‌دهد آغازگر HB10 (A) با ۴ باند ۲۵۰ تا ۷۰۰ جفت‌بازی و آغازگر 844A (G) با تولید ۳ باند ۲۵۰-۶۰۰ جفت‌بازی هم در مخلوط نمونه‌های ماده و هم در مخلوط نمونه‌های نر باند تولید کردند. آغازگر HB6 (D) که قبلاً برای تشخیص جنسیت ماده در پاپایا (۶) گزارش شده بود و آغازگر HB8 (H) که قبلاً قادر به تشخیص جنسیت ماده در پسته گزارش شده بود (۵) نتوانستند هیچ باندهی در خرما تولید کنند این نشان می‌دهد که این دو آغازگر آی.اس.آر هیچ جایگاه مکملی در خرما ندارند که نشان‌دهنده فاصله ژنومی این دو گیاه با خرما است. بنابراین آغازگرهای HB10 و 844A به‌علت اینکه باندهای حاصل از آن‌ها قادر به تشخیص پایه‌های نر از ماده نیستند و آغازگرهای HB6 و HB8 به‌علت اینکه هیچ باندهی تولید نکردند از ادامه کار کنار گذاشته شدند. اما آغازگر HB9 (C) فقط در مخلوط دی.ان.ا نمونه‌های نر باند داد (شکل ۱). این آغازگر آی.اس.آر که قبلاً در ارقام نر نیز توانسته بود باند ۳۴۰ جفت‌بازی بدهد (۱۱) به عنوان آغازگر مناسب تشخیص جنسیت نر برای ادامه کار انتخاب گردید. آغازگر HB12 (B) و آغازگرهای آی.اس.آر 814 (E) و HB7 (F) فقط در مخلوط دی.ان.ا نمونه‌های ماده باند تشکیل دادند ولی در مخلوط دی.ان.ا نمونه‌های نر هیچ باندهی تشکیل ندادند (شکل ۱ و ۲).

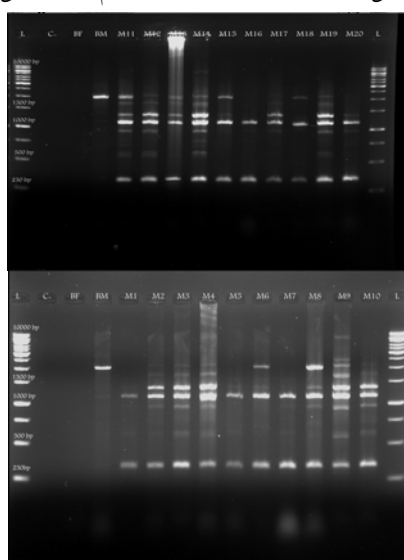


شکل ۱- باندهای تولید شده از ۸ آغازگر (A-H) در توده ماده (شکل A با نشانه F) و در توده نر (شکل B با نشانه m). L: سایز مارکر یک کیلو بازی، C-: کنترل آب، که آغازگرهای B, E و F (HB12, 814 و HB7) فقط در توده ماده (BFB, BFE و BFF) و آغازگر C (HB9) فقط در توده نر (BmC) باند تولید نمودند.

آغازگر OPO08 دو باند ۳۵۰ و ۱۰۰ جفت‌بازی تولید نمود که قضاوت درباره آن احتیاج به بررسی‌های بیشتری دارد (شکل ۵). آغازگر K1 که در آزمایش بخت و همکاران (۲۰۰۸)، در کلون‌های ماده تولید باند ۱۰۰۰ جفت‌بازی نموده بود در این تحقیق در ارقام نر مورد مطالعه باند مشترک ۴۵۰ جفت بازی نمود (شکل ۶) که نشان می‌دهد بسته به رقم و واریته این آغازگر که دارای جایگاه ژنومی در کروموزوم نخل خرما است، متفاوت عمل می‌کند و نمی‌تواند به‌عنوان یک نشانگر جنسیت در خرما بکار گرفته شود.



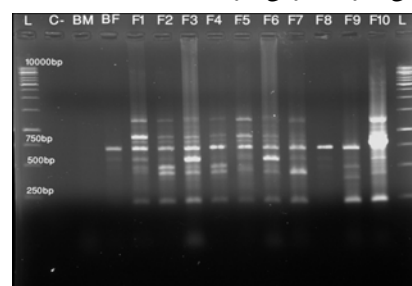
شکل ۴- آزمایش آغازگر HB9 بر روی بیست رقم نر (M1 تا M20). چاهک‌های L، C-، BM و BF به‌ترتیب سایز مارکر ۱ Kb، شاهد آب، مخلوط نرها و مخلوط ماده‌ها را نشان می‌دهد. باند ۳۵۰ جفت بازی در ۲۰ رقم ماده دیده می‌شود.



شکل ۵- آزمایش آغازگر OPO08 بر روی ۲۰ رقم نر (M1 to M20) چاهک‌های L، C-، BM و BF به‌ترتیب سایز مارکر ۱ Kb، شاهد آب، مخلوط نرها و مخلوط ماده‌ها را نشان می‌دهد. باندهای ۳۵۰ و ۱۱۰۰ جفت بازی در ۲۰ رقم ماده دیده می‌شود.

خویشاوندی موجود بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی آن‌ها دانست ولی در تعیین جنسیت ارزشی ندارند چرا که فقط از یک نوع رقم واریته زغلول استفاده نموده بود و تنوع ارقام در تحقیق ایشان وجود نداشت. آغازگر A10 بنا به گزارش یونیس و همکاران (۲۰۰۸)، در ارقام ماده ساکوتی، برتمودا، مالکابی و داگانا تولید باند ۴۹۰ جفت‌بازی نموده در حالی‌که در ارقام مورد بررسی در تحقیق حاضر باندهای تولید نکرد که دلیل آن را نیز می‌توان وجود روابط خویشاوندی بین ارقام مذکور در تحقیق آن‌ها ذکر کرد.

نتایج آزمایش آغازگرهای کاندید بر روی تک تک ارقام توانایی تولید باند ۴ آغازگر کاندید ا.پی.پی.سی. آر (HB7، HB9، HB12 و 814) و ۴ آغازگر کاندید رپید (A12، OPO08، K1 و D10) بر روی تک تک ارقام مورد بررسی با دماهای اتصال بهینه آن‌ها آزمایش شدند. آغازگرهای HB12 و 814 به‌علت این‌که در بعضی ارقام ماده باند مشترک تولید نکردند، از ادامه کار حذف شدند. از بین این آغازگرها تنها ۲ آغازگر، آغازگر HB7 در تعیین جنسیت ارقام ماده (شکل ۳) و آغازگر HB9 در تعیین جنسیت ارقام نر (شکل ۴) مؤثر بودند. آغازگر HB7 به طول ۱۸ باز در تمامی ارقام ماده یک باند مشترک ۷۰۰ جفت‌بازی تولید نمود (شکل ۳) که در هر سه مرحله تکرار آزمایش بدون هیچ تغییری این باند در تمامی ارقام ماده دیده شد و می‌توان آن را باند شاخص مادگی خرما معرفی کرد.



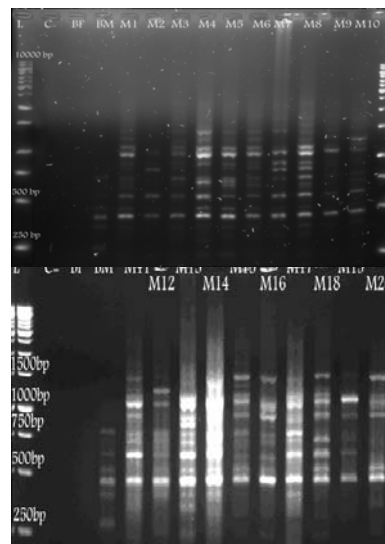
شکل ۳- تکثیر باندهای آغازگر HB7 بر روی ده رقم ماده (F1 تا F10). چاهک‌های L، C-، BM و BF به‌ترتیب سایز مارکر ۱ Kb، شاهد آب، مخلوط نرها و مخلوط ماده‌ها را نشان می‌دهد. باند ۷۰۰ جفت بازی در ۱۰ رقم ماده دیده می‌شود.

آغازگر HB9 نیز توانایی تولید باند مشترک ۳۵۰ جفت‌بازی (شکل ۴) را در هر ۲۰ رقم نر مورد بررسی اثبات کرد. از آنجایی که این باند در هر سه تکرار در ۲۰ رقم که خویشاوندی چندانی با هم ندارند دیده شد با اطمینان می‌توان این باند را باند شاخص نرینگی معرفی کرد.

بررسی نتایج حاصل از تعیین جنسیت ارقام مورد مطالعه و نتایج حاصل از تحقیقات قبل نشان دادند که فقط آغازگرهای HB7 و HB9 را می‌توان با اطمینان به صورت آغازگرهای اختیاری به ترتیب در تعیین جنسیت ماده و نر نخل خرما بکار گرفت.

سپاسگزاری

نویسندگان از ریاست محترم مرکز تحقیقات میوه‌های گرمسیری استان خوزستان جناب آقای دکتر رهنما و مسئولین و کارشناس آزمایشگاه مرکزی دانشگاه رامین خوزستان خصوصاً سرکار خانم صدر به خاطر حمایت‌ها و کمک‌های بی‌دریغشان کمال تشکر را دارند.



شکل ۶- آزمایش آغازگر K1 بر روی ۲۰ رقم نر (M1 to M20) چاهک‌های L، C- ، BM و BF به ترتیب ساین مارکر ۱ Kb، شاهد آب، مخلوط نرها و مخلوط ماده‌ها را نشان می‌دهد. ۳۵۰ جفت‌بازی در ۲۰ رقم ماده دیده می‌شود.

منابع

۱. داوسن و. ه. و (۱۳۷۰) تولید و مراقبت خرما. ترجمه: سنگدل ر، انتشارات سازمان ترویج کشاورزی.
۲. نقوی م. ر، قره‌یاضی ب و حسینی سالکده ق (۱۳۸۴) نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران.
3. Ahmed A A A, Soliman S S and Elsayed E H (2006) Molecular identification of some Egyptian date palm males by females varieties (Phoenix dactylifera L.) using DNA markers. App. Sci. Res. 2(5): 270-275.
4. Bakheet S A, Taha H S, Hanafy M S and Solliman M E (2008) Morphogenesis of Sexual embryos of date palm cultured in vitro and early Identification of sex type. App. Sci. Res. 4(4): 345-352, 208.
5. Ehsanpour A A, Tavassoli M and Arab L (2008) Sex determination of Pistacia vera L. Malays. Appl. Biol. 37(2): 25-28.
6. Gangopadhyay G, Roy S K, Ghose K, Podar R, Bandyopadhyay T, Basu D and Mukherjee k k (2007) Sex

- detection of carica papaya and cycas circinalis in preflowering stage by ISSR and RAPD. Current sci., 92(4): 524-526.
7. Hormoza J I, Dollo L and polito V S (1994) Identification of a RAPD Marker linked to sex determination in pistacia vera using bulked segregant analysis. Theor. Appl. Genet. 89(1): 9-13.
 8. Kafkas S, Cetiner M S and perl-Treves R (2007) RAPD markers linked to sex in the genus Pistacia. www. Ciheam. Org/om/pdf/c56/ 251-255.
 9. Ouenzar B, Hartmann C, Rode A and Benslimane A (1998) Date palm DNA mini-preparation with out liquid nitrogen. Plant mol. Biol. Rep., 16: 263-269.
 10. Shirkot P, Sharma D R and Mohapatra T (2002) Molecular identification of sex in Actinidia deliciosa var. deliciosa by RAPD markers. Sci. Hort., 94(2002): 33-39.
 11. Yonis R A A, Ismail O M and Soliman S S (2008) Identification of sex- specific DNA markers for date palm phoenix doctylifera L. using RAPD and ISSR techniques. Journal of Agri. and Biol. Sci., 4(4): 278-284