مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2009) ــ المجلد (25) ــ العدد 2 ــ الصفحات: 95-105

استخدام المؤشرات الجزيئية من الـــ DNA لتحديد الجنس كمؤشر مساعد لانتخاب الفستق الحلبي *Pistacia vera* L. في سورية

محمود هيثم السيد [1] و محمد أيمن ديري[2]

الملخص

استخدمت تقنية الـــ RAPD بهدف تحديد مؤشر جزيئي أو مؤشرات جزيئية ترتبط بمـــورث تحديـــد الجنس في النوع ثنائي المسكن من الفستق الحلبي *Pistacia vera*. أُجريت الدراسة علـــى 37 شـــجرة مؤنثة ممثلة 15 صنفاً، وملقحة خلطياً من 21 شجرة مذكرة مجاورة للأشجار المؤنثة المدروسة. جمعـــت الأوراق النباتية من الأشجار المدروسة واستخلصت المادة الوراثية DNA بشكل فردي من كـــل شـــجرة. كما استخلص الـــDNA من 43 بادرة، بعد إنبات بذورها غير المعروفة جنسياً، إذ تم الحصول عليها من السوق المحلية. تم تجريب 151 بادئاً نيكليوتيدياً من تقنيـــة ال RAPD، فـــأظهرت النتـــائج أن البـــادئ OP-O08 هو الوحيد الذي عكس تبايناً بعصابة دناوية ذات وزن جزيئي 930 زوجاً نيكليوتيدياً. وُجـــدت هذه العصابة الدناوية في الأشجار المؤنثة وغابت في الأشجار المذكرة مميزاً الفرد المؤنث عـــن المـــذكر. تبدو هذه العصابة الدناوية 930bp مختلفة عن العصابة 945bp والتي ظهرت باستخدام البـــادئ نفـــسه على أشجار الفستق في كاليفورينا. وُجدت العصابة 930bp في كل الأشجار المؤنثة الـــ 37 وغابت فـــي كل الأشجار المذكرة ال 21 المدروسة. ولتأكيد النتائج اختُبرت 43 بادرة مجهولة الجنس باستخدام البادئ المذكور، وأظهرت النتائج نسبة (1 مؤنث:1 مذكر) مما عزز دقة النتائج إحـــصائياً. يـــستنتج مـــن هـــذه الدراسة أن هذه العصابة الدناوية ترتبط ارتباطاً قوياً مع المورث الذي يحدد الجنس في الفـــستق الحلبـــي *P.vera*. حيث يمكن استخدام هذا المؤشر الجزيئي كمؤشـــر مـــساعد للانتخـــاب Marker assisted selection للتفريق بين أشجار الفستق المؤنثة عن المذكرة وذلك قبل وصول الشجرة إلى طور الإنتاجية في سورية، مما سيوفر الوقت في عمليات التطعيم على الأشجار المذكرة ويزيد إنتاجية بـــساتين الفـــستق الحلبي، مما ينعكس إيجابياً على الاقتصاد الوطني في سورية.

الكلمات المفتاحية: نوع ثنائي المسكن، المؤشرات الجزيئية، تحديد الجـــنس، الفـــستق الحلبي، تقنية RAPD.

[1] قسم هندسة التقانات الحيوية، كلية الهندسة التقنية، جامعة حلب، سورية.
[2] قسم البساتين، كلية الزراعة ، جامعة حلب، سورية.

Use of DNA Marker (s) for Sex Determination as Marker – Assisted Seleclion for *Pistacia vera* L. in Syria

H. Sayed[(1)] and M. A. Deiry[(2)]

ABSTRACT

The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was used to amplify DNA segments, with the objective of finding markers linked to sex determination in the dioecious species, *Pistacia vera.* Fifteen varieties from 37 female parents pollinated by a common male parent and 21 male were studied. DNA was extracted from each tree individually. DNA was also extracted from 43 few-weeks-old *P. vera* seedlings of unknown sex from market. One hundred fifty one different decamer oligonucleotide primers were used to perform DNA amplification, with one of these (OP-O08) producing a 930 bp amplification band that was present only in the female samples and absent in the male samples. This DNA band 930 bp seems to be different than the band of 945 bp which is produced by the same primer on *p.vera* in California. The relationship between band presence and female sex expression was conserved in every individual obtained from the 37 trees. We propose that this band is tightly linked to the gene(s) that control sex determination in pistachio. The OP-O08$_{930}$ RAPD marker could be used in a breeding program to screen the gender of pistachio plants long before they reach reproductive maturity in Syria. Resulting in considerable savings of time and economic resources. In order to verify that assumption we screened 43 additional seedlings with the OP-O08 primer and obtained results consistent with a 1:1 male: female ratio.

Key words: Dioecy, Molecular markers, Sex determination, *Pistacia vera*, RAPD

[(1)] Faculty of Technological Engineering, Biotechnology Department, Aleppo University, Syria.
[(2)] Faculty of Agriculture, Horticulture Department, Aleppo University, Aleppo, Syria.

المقـــدمـــة

ينتمي جنس الفستق *Pistacia* L. إلى الفصيلة *Anacardiaceae* وتحتـــوي هـــذه العائلـــة علـــى 12 نوعـــاً (Zohary, 1952, Whitehouse, 1957). يعـــد الفـــستق *Pistacia vera* النوع الوحيد الذي تؤكل ثماره، أما بقية الأنواع فهي برية وثمارها غير مأكولة. ولهذا فإن للفستق المأكول *P.vera* أهمية اقتصادية كبيرة على المستوى المحلـــي والدولي على حد سواء، إذ تُعدُّ سورية المنتج الرابع في العالم بعـــد إيـــران والولايـــات المتحدة وتركيا.

للفستق مواطن أصلية أهمها:1- منطقة حوض البحر الأبيض المتوســـط 2- الجـــزء الشرقي من جبال زاغروس. وقد أدخل مؤخراً إلى أمريكا فهو ينمو بشكل جيد في سهول كاليفورنيا وجبالها (FA0. 2000).

تمثل النباتات في الصعيد الجنسي طيفاً واسعًا من أنظمة التربية حيث تبـــدأ بالنظـــام الخنثوي إلى أحادية المسكن ثم إلى ثنائية المسكن، يمثل النظام المخنث 7% من الأنـــواع في حين يمثل النظام ثنائي المسكن 4% من أنواع مغلفات البذور النباتية (Yampolsky and Yampolsky, 1992) وعلى النقيض بالنسبة إلى الحيوانات حيث يمثـــل النظـــام الثنائي المسكن النسبة الكبرى. عادة ما يتحكم في صفة تحديد الجنس مورث واحد أو أكثر من مورث. تمثل صفة ثنائية المسكن صفة مستقلة في العـــائلات والأجنـــاس المختلفـــة (Westergaard, 1958) حيث وجدت آليات مختلفة تنظم هذه الصفة في الأنواع النباتية المختلفة (Irish and Nelson 1989, Durand and Durand 1990).

كما وجد أن نسبة الجنس في العديد من الأنواع النباتية ثنائية المسكن يتحكم بها آليـــل واحد أو أكثر من آليل في موقع واحد أو أكثر (Irish and Nelson, 1989). وجـــدت أمثلة كثيرة تؤكد ذلك في الأنواع التابعة للأجناس الآتية:

Vitis, Spinacia and Mercurialis

حيث درست هذه الأنواع بعمق، وتبين أن تحديد الجنس من الصفات التي يتحكم بهـــا وجود آليلات إضافية أو عوامل بإمكانها تعديل تأثير المـــورث الـــرئيس أو المورثـــات الرئيسة (Durand and Durand, 1990) .

أظهر الفستق الحلبي *P. vera* أنه ثنائي المسكن بالكامل، إذ إن الأزهـــار المؤنثـــة الناضجة لاتحوي أي آثار من الأسدية stamens وأن الأزهار المذكرة الناضجة لاتحوي أي جزء من أجزاء الزهرة المؤنثـــة (Wannan and Quinn, 1991). هـــذا التفريـــق الواضح لأزهار الفستق الحلبي الكامل مورفولوجياً، فضلاً عن كون شجرة الفستق معمرة

perennial دعانا إلى التفكير بدراسة صفة تحديد الجنس لهذه الشجرة المهمة ومن ثم لتحسين أصنافها تربوياً لأهميتها الاقتصادية على المستويين المحلي والدولي.

أصبحت دراسة المؤشرات الجزيئية الدناوية DNA molecular markers المعتمدة على التحليل المباشر لجينوم genome النوع مستخدمة بكثرة لرسم خرائط الارتباط الوراثية، وتشخيص الأمراض، والدراسات التطورية أيضاً. وقد تعكس دراسة تحديد الجنس بهذه الطرائق أهمية على التحسين التربوي لهذه الشجرة المهمة اقتصادياً.

ركزت البحوث السابقة في مجال تحديد الجنس على الدراسات المورفولوجية والفيزيولوجية في الشجرة، لكن مع ظهور التقانات الحيوية الحديثة المعتمدة على دراسة المادة الوراثية في الكائنات، أصبح من الممكن تحديد ارتباط أي صفة وراثية بمؤشرات جزيئية من DNA ترتبط مع هذا الصبغي أو ذاك قريبًا أو بعيدًا عن المورث المسؤول لمنح الصفة المدروسة.

وقد استخدمت هذه المؤشرات الجزيئية الدناوية لتحديد الجنس في الحيوانات: (*Parus major* and *Haematopus ostralegus*, Lessells and Mateman, 1998)

وفي النباتات: مثل الصفصاف *Salix viminalis*, Alstrom Rapaport *et al.,* 1998 والقنب *Cannabis sativa*, Mandolina *el at.*, 1999 والرغل *Atriplex garrettii*, Ruas *et al.,* 1998 والفستق المأكول *Pistacia vera*, Hormaza *et al.,* 1994.

وحتى الآن تفتقر المراجع للدراسات الوراثية على مستوى التقانات الحيوية الجزيئية لتحديد مواقع مورثات الجنس على غالبية الأشجار ثنائية المسكن في سورية، ولاسيما على الفستق الحلبي، لذلك جاء هذا البحث ليؤكد إمكانية استخدام المؤشرات الجزيئية الدناوية DNA markers لتحديد الجنس على أشجار الفستق الحلبي في سورية.

أهداف البحث

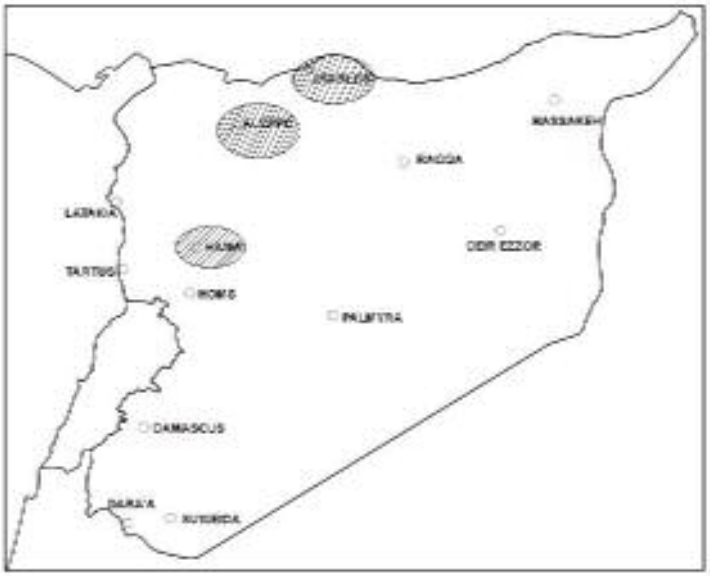
1. تحديد مؤشر أو مؤشرات جزيئية دناوية DNA molecular markers ، يمكن استخدامها كمؤشرات مساعدة لعمليات الانتخاب Marker assisted selection للجنس (مذكر أو مؤنث) في أشجار الفستق الحلبي التي جمعت من بعض المناطق المزروعة في سورية.
2. مقارنة النتائج المحددة للجنس على أشجار الفستق المأكول *Pistacia vera* في أمريكا مع النتائج المدروسة على أشجار الفستق المأكول للنوع نفسه أو الأنواع في سورية.

مواد البحث وطرائقه

المادة النباتية

جمعت عينات ورقية من 37 شجرة مؤنثة و22 شجرة مذكرة من الفستق الحلبي من مناطق بيئية مختلفة في سورية (حماة، جرابلس، حلب) (شكل1، جدول1،2). اعتمد في

جمع العينات على التوزع الطبيعي لهذه الأنواع التي ضمت 15 نوعاً مؤنثاً مزروعاً وبجانبهم 22 شجرة مذكرة، بحيث مثّل هذا الجمع التوزيع الطبيعي لبساتين الفستق الحلبي في المناطق البيئية المذكورة.



الشكل (1) مواقع جمع المادة النباتية لأشجار الفستق الحلبي (المناطق المظللة) والتي تضمنت ثلاثة مواقع (حماة، جرابلس، وحلب) من سورية.

استخلاص المادة الوراثيةDNA

استخلصت المادة الوراثية DNA، من الأوراق النباتية للأشجار المدروسة التي جُمعت العينات الورقية منها. استخلصت الـ DNA بطريقة الـCTAB (Saghai – Maroof *et al.*, 1984) مع بعض التعديلات حسب (Sayed *et al.*, 2002).

الجدول (1) عدد الأصناف المدروسة من الفستق الحلبي، مبيناً مواقع الجمع، عدد الأصناف في كل موقع، عدد الأشجار المذكرة والمؤنثة في كل موقع جمع.

مواقع الجمع	عدد الأصناف	عدد الأشجار المؤنثة	عدد الأشجار المذكرة
حماه	14	26	12
جرابلس	3	9	6
حلب	2	2	8
المجموع	19	37	26

الجدول (2) الأسماء المحلية لأصناف الفستق الحلبي المدروسة، عدد الأشجار المؤنثة من كــل صنف، فضلاً عن مواقع الجمع الثلاثة في سورية.

الاسم المحلي	عدد الأشجار المؤنثة	مواقع الجمع
عاشوري أبيض	3	حماة
مراوحي متأخر	1	حماة
مراوحي عادي	4	حماة
عاشوري أبو شوكة	3	حماة
عليمي	2	حماة
بياضي (جلب أبيض)	2	حماة
ناب الجمل متأخر	1	حماة
لسان الطير	1	حماة
بندوقي	1	حماة
أبو ريحة	1	حماة
جلب أحمر	2	حماة
ناب الجمل عادي	2	حماة
باتوري	1	حماة
قراحي	2	حماة
عاشوري أبو شوكة	4	جرابلس
عنتابي	4	جرابلس
عاشوري أبيض	1	جرابلس
عاشوري أبيض	1	حلب
عاشوري أبو شوكة	1	حلب
المجموع	37	

تقنية الــ RAPD وتفاعل الــ PCR

اســتخدمت تقنيــة (RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*,1990) لتحديد الجنس، حيث استخدم المؤشر الجزيئــي OP- O08 لتمييز الجنس المذكر عن المؤنث. تم تضخيم المادة الوراثية من DNA باستخدام تقانــة التفاعل السلسلي البــوليميرازي (PCR: Polymerase Chain Reaction) تبعــاً لـــ (Haley *et al.,* 1993, 1994). تألف مزيج التفاعــل 25µl مــن 50ng مــن المــادة الوراثية DNA,25ng من البادئ، 200µM كل من (dATP,dGTP,dTTP&dCTP)، فضلاً عــن 2.5U مــن أنــزيم البــوليميراز DNA Taq polymerase تبعــاً لـــ (Sayed *et al.*, 2002).

وضع مزيج التفاعل في جهاز الـ PCR على البرنامج الآتي: 94 ºC مدة 4 دقائق ثم مرر بـ 40 دورة على 94 ºC مدة 30 ثانية، 36ºC مدة 1 دقيقة، 72 ºC مدة 2 دقيقة وأخيراً 72 ºC مدة 5 دقائق.

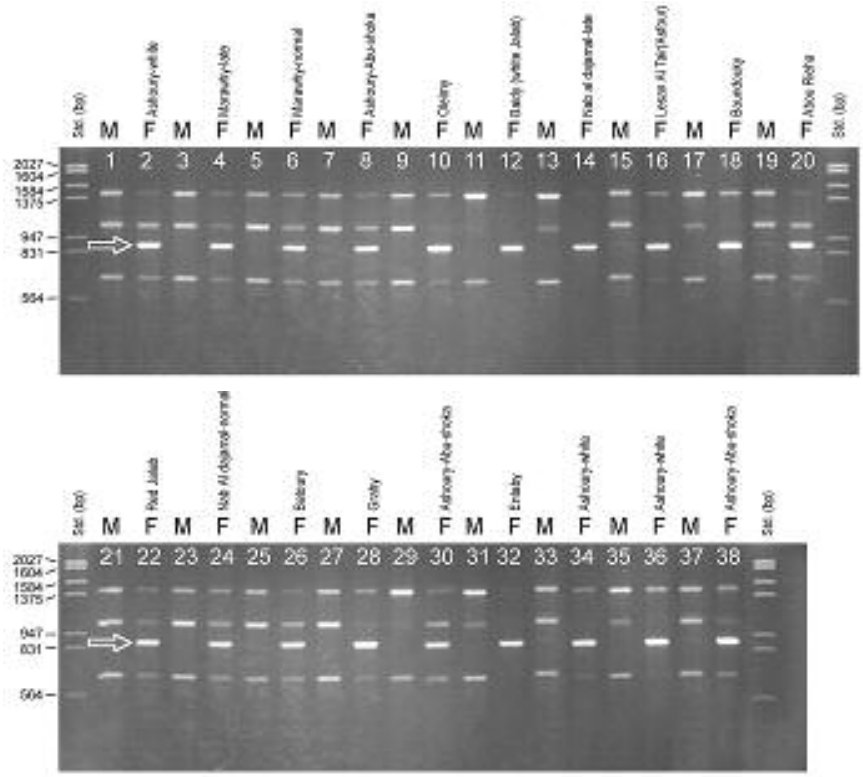
حللت نتيجة التفاعل على هلامة من الأغاروز 2% باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي وذلك مدة خمس ساعات على 100 فولط وباستخدام وسط 1xTBE واق، ثم لونت الجل (الهلامة) باستخدام محلول ايثديوم بروماید مدة 30 دقيقة، وصورت باستخدام جهاز التصوير الخاص تحت الأشعة فوق البنفسجية UV.

النتائج والمناقشة

جُرّب151 بادئاً نيكليوتيدياً من البادئات المخصصة لتقنية الـ RAPD، وكان عدد العصابات الدناوية DNA bands الكلية الناتجة حوالي 1157 عصابة أي نحو 7 عصابات دناوية لكل بادئ بالمتوسط. لكن لم تتمكن سوى عصابة دناوية واحدة من البادئ OP-O08 ذات الحجم 930 bp زوجاً نيوكليوتيدياً من التمييز بين الجنسين المذكر والمؤنث لهذه الشجرة (الشكل 2).

أظهرت النتائج أن استخدام البادئ OP-O08 (CCTCCAGTGT) يمكنه من تمييز جنس شجرة الفستق الحلبي بوضوح، وأن قطعة الـ DNA المكاثرة بهذا البادئ موجودة في النبات المؤنث وغير موجودة في النبات المذكر (الشكل 2).

ولتحديد هل هذا البادئ OP-O08 يمكن تطبيقه كمؤشر جزيئي لتمييز الجنس في أشجار الفستق الحلبي *Pistacia vera* في سورية. استخدم هذا البادئ لتمييز الجنس بشكل فردي على 15 صنفاً مؤنثاً و22 صنفاً أو شجرة مذكرة، وكانت النتيجة هي وجود عصابة تراوح وزنها الجزيئي مابين 900-930 زوجاً نيكليوتيدياً في كل الأفراد المؤنثة وعدم وجودها في كل الأفراد المذكرة، دون وجود أية حالة استثنائية. كما أنه لتأكيد هذه النتيجة ولتطبيقها عملياً تم الحصول على بذور فستق حلبي من السوق المحلية المبيعة للطعام وبعد زراعتها في ظروف متحكم بها تم الحصول على 43 بادرة مجهولة الجنس. تمت غربلة هذه البادرات بالبادئ OP-O08 فكانت نسبة الانعزال في هذه البذور 21 ذكراً لعدم وجود العصابة 930 زوجاً نيكليوتيدياً و22 فرداً مؤنثاً تميز بوجود العصابة 930 زوجاً نيكليوتيدياً (21 سلبياً: 22 إيجابياً). وهذه النسبة من الانعزال تؤكد نسبة الانعزال الطبيعية الواجب الحصول عليها إحصائياً أي مؤنث (1):(1) مذكر، وهي نسبة الانعزال المتوقعة على مستوى البيضة الملحقة في أصناف الفستق ثنائية المسكن، إذ إن مربع كاي (χ^2 , $P<0.05$ ، df =1) وذلك إذا افترضنا أن توريث هذه الصفة مانـدلياً، يتحكم بها مورث واحد لتحديد الجنس.



الشكل (2) العصابات الدناوية الناتجة من المؤشر الجزيئي OP-O08 مـــع 15 صـــنف مـــن الفستق الحلبي في سورية.

من الأعلى إلى الأسفل، ومن اليسار إلى اليمين العينات من 1−28 تمثل 14 صنفاً جمعت من منطقة حماه، من 29−34 تمثل 3 أصناف جمعت من منطقة جرابلس، من 35−38 تمثل صنفين جمعت من منطقة حلب. ترمز M إلى المذكر وF إلى المؤنث. العصابة الدناوية التي تميز الجنس مشاراً إليها بسهم ووزنها الجزيئي نحو 930bp زوجاً نيوكليوتيدياً.

وبهذا نستنتج أنه تم إيجاد مؤشر جزيئي على مستوى DNA مرتبط بمورث تحديـــد الجنس في أشجار الفستق الحلبي، هذا المؤشر يمكن استخدامه لغربلة كل بادرات الفستق الحلبي قبل زراعتها.

إن التوصل إلى عصابة دناوية تميز الجنس في الفستق قد تفتح الأفــق نحـــو عـــزل المورث المسؤول عن تحديد الجنس وتنسيله مخبرياً.

هذه النتائج قد تكون واعدة في المستقبل القريب وهذا ما تم في جنس Bracale *et al.,* (*Asparagus*، 1991) باستخدام تقنية الــ RFLP. إن استخدام تقنية الــ RAPD لهـــا بعض الميزات مقارنة مع الــRFLP من الناحية العملية، إذ إنها تحتاج إلى كمية قليلة من الــ DNA، سهلة التطبيق، تكاليفها منخفضة، ولكن من عيوبها ظهور عـــدة عـــصابات

دناوية مرافقة وأن حساسيتها للإعادة والحصول على النتيجة نفسها أقل من بقية التقانات الجزيئية، إذ يصعب الحصول على النتائج ذاتها إلا بتطبيق ظروف التفاعل كلها من كميات مواد تفاعل وبرنامج PCR. ولكن النتائج المتحصل عليها في هذا البحث كانت ثابتة النتائج بتكرارها عدة مرات.

ومع تطور التقانات الحيوية الجزيئية أصبح من الممكن تطوير هذه العصابات الدناوية DNA bands الناتجة عن تقنية الـ RAPD إلا أن تكون متاحة بطريقة تقنية جزيئية أخرى تسمى SCAR(Sequence Characterized Amplified Regions, Michelmore *et al.,* 1991)، وعندئذ سيمكن الحصول على عصابة واحدة في الأفراد المؤنثة في حين أن الأفراد المذكرة لن تحوي على أية عصابة. تتميز تقنية الـ SCAR بأن حساسيتها عالية حيث يمكن تطبيقها في أي مكان والحصول على النتيجة بدقة عالية. وهذا ما نحاول تجريبه في الوقت الحالي، وقد يستغرق زمناً إذ إن حالات النجاح في ذلك معدودة، فإذا تمكننا من ذلك فسوف يكون سبقاً في مجال تحديد الجنس على الفستق الحلبي.

إن تطبيق تقنية الـ RAPD من قبل الباحثين للكشف عن مؤشر يساعد في تحديد الجنس في الفستق Hormaza *et al.,* 1994 في كاليفورنيا وذلك بغربلة 700 بادئ نيكليوتيدي من الـ RAPD فلم يتمكنوا إلا بالحصول على عصابة دناوية واحدة للبادئ نفسه ولكن كانت العصابة ذات حجم 945 زوجاً نيكليوتيدياً. أما في هذا البحث وبعد غربلة 151 بادئاً نيكليوتيدياً من الـ RAPD فلم نتمكن من الحصول إلا على عصابة واحدة تميز الذكر عن الأنثى وذلك باستخدام البادئ نفسه، ولكن كان حجم العصابات مختلفاً في بعض الأصناف نحو 930 زوجاً نيكليوتيدياً. يمكن أن نستنتج من ذلك أن الموقع الذي تم تحديده وإكثاره في الحالتين متشابهاً وقد يكون الموقع نفسه إذ إن البادئ له التسلسل النيكليوتيدي نفسه في الحالتين، والمنطقة الجينومية المضخمة متشابهة بنسبة تزيد على 95%. فالعصابة الدناوية التي تشير إلى وجود مورث تحديد الجنس هي المنطقة نفسها المدروسة في الحالتين، وإن طول مورث تحديد الجنس ليس طويلاً وقد يدل على أن المؤشر الجزيئي المحدد بهذه الدراسة قد يدل على موقع واحد أو عدة مورثات ولكنها في المنطقة نفسها وعلى الصبغي نفسه. وعلى الأرجح فإن عدم وجود كلا العصابتين 945 و930 زوجاً نيكليوتيدياً في الشجرة المدروسة نفسها قد يدل على أن مورث تحديد الجنس في الفستق الحلبي هو مورث رئيسي واحد. ولتأكيد هذه النتائج فإن البحث جارٍ للإجابة عن المزيد من الاحتمالات التي تفسر وجود مورث أو مورثات تحديد الجنس في النباتات ثنائية المسكن، وسيفتح الباب أمام بحوث أخرى في مجال البيولوجيا الجزيئية لتحديد الأصناف ثنائية المسكن باستخدام التقانات الحيوية. ولكن نتائج هذا البحث كافية على الصعيد الاقتصادي لاستخدامها قبل زراعة الشتول في البساتين، إذ إن معرفة جنس الشتلة سيلغي عملية التطعيم المتأخر أو قلع الأشجار المذكرة بعد عدة سنوات، عندما تزهر الشجرة ويعرف جنسها، مما يسهم إيجابياً بإدارة بنوك الأصول الوراثية، كما أنه يخفض تكلفة إنتاج الشتول، والعمليات الزراعية في بساتين الفستق الحلبي.

REFERENCES

Alstrom-Rapaport C, Lascoux M, Wang YC, Roberts G, Tuskan GA. (1998). Identification of a RAPD marker linked to sex determination in the basket willow (*Salix viminalis* L.). Journal of Heredity 89: 44-49

Bracale M, Caporali E, Galli MG, Longo C, Mlarziani-Longo G, Rossi G, Spada A, Soave C, Falavigna A, Rafaldi F, Maestri E, Restivo FM, Tassi F. (1991). Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. Plant Sci 80:67-77

Durand R, and Durand, B. (1990). Sexual determination and sexual differentiation. Crit Rev Plant Sci 9:295—316

FAO. (2000). FAO web page. (http://www.fao.org)

Haley SD, Afanador LK, Miklas PN, Starely JR, Kelly JD. (1994). Heterogeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic Lines for RAPD marker localization. Theor Appl Genet 88: 337-342

Haley SD, Miklas PN, Stavely JR, Byrum J, Kelly JD. (1993). Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. Theor Appl Genet 86:505—512

Hormaza JI, Dollo L, Polito VS. (1994). Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. Theor Appl Genet 89:9-13

Irish EE, and Nelson T. (1989). Sex determination in monoecious and dioecious plants. Plant Cell 1:737—744

Lessells, CM, and Mateman AC. (1998). Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Mol. Ecol. 7:187-195

Mandolino G, Carboni A, Forapani S, Faeti V, Ranalli P. (1999). Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.). Theoret Appl Genet 98: 86–92

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RY. (1991). Identification of mark-ers linked to disease resistance genes by bulked segregant anal-ysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc Nati Acad Sci USA, 88:9828—9832

Ruas CF, Fairbanks DJ, Evans RP, Stutz HC, Andersen WR, Ruas PM. (1998). Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex garettii* (Chenopodiaceae). American Journal of Botany 85: 162-167

Saghai Maroof MA, Soliman KM, Jorgenson RA, Allard RW. (1984). Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc Natl Acad Sci USA 81:8014-8018

Sayed H., Backes G, Kayyal H, Yahyaoui A, Ceccarelli S, Grando S, Jahoor A, Baum M. (2004). New molecular markers linked to qualitative and quantitative powdery mildew and scald resistance genes in barley for dry areas, Euphytica, 135:225-228

Sayed H., Kayyal H, Ramsey L, Ceccarelli S, Baum M. (2002). Segregation distortion in doubled haploid lines of barley (*Hordeum vulgare* L.) detected by simple sequence repeat (SSR). Euphytica, 225:265-272

Wannan and Quinn. (1991). Floral structure and evolution in the *Anacardiaceae*. Bot J Linn Soc 107:349-385

Westergaard N. (1958). The mechanism of sex determination in dioecious flowering plants. Adv Gehet 9:217-281

Whitehouse WE. (1957). The pistachio nut- A new crop for the western United States. Econ. Bot., 11(4):281-321

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18(22) 6531-6535

Yampolsky C, Yampolsky H. (1992). Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. Bibl Genet 3:1-62

Zohary M. (1952). A monographical study of the genus *Pistacia*. Palestine Journal of Botany, Jerusalem Series, 5(1): 187-228

Received	**2007/12/30**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2008/06/13**	**قبول البحث للنشر**