Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849

بناء مؤشرات جزيئية لتمييز عدد من اصناف النخيل العراقية باستخدام تقنية PCR–RFLP

عبدالله صبحي عواد[1] ، عقيل حسين علي العاصي[2] ، جلادت محمد صالح جبرائيل[3]

jjubrael53@jamail.com[1] ,akalassi09@yahoo.com [2]

كلية العلوم / جامعة تكريت / قسم البايولوجي[1,2]

abdalla88bio10@yahoo.com[3]

كلية العلوم / جامعة دهوك / البايولوجي[3]

تاريخ استلام البحث: 29 / 12 / 2014 تاريخ قبول البحث: 8 / 3 / 2015

الملخص

أجريت هذه الدراسة على عشرة أصناف من نخيل التمر العراقية (برحي، خياره حمره، سكري، زهدي، خستاوي، خضراوي، تبرزل، ساير(اسطة عمران)، بريم، مكتوم) لاستنباط بصمة وراثية محدده لصنف معين Fingerprints باستخدام ثلاث بادئات متخصصة ضمن مؤشرات الـSSR ومن ثم استخدام ثلاث انزيمات قاطعة ضمن تقنية PCR–RFLP لبلوغ الهدف. وبعد اجراء تفاعل الـPCR حيث انتجت جميع الاصناف حزمة واحدة وبحجم جزيئي واحد وهي 320bp للموقع *mpdlRD28* و 200bp للمواقع *mpdlRD46* و *mpdlRD01* على التوالي في جميع الاصناف ضمن مؤشرات الـSSR. واعتمدت تقنية PCR–RFLP على استخدام ثلاثة انزيمات قاطعة *HinfI, TaqI, EcoRI* وأظهرت النتائج وجود او عدم وجود مواقع القطع Restriction site بالنسبة للاليلات الهجينة في نخيل التمر.

الكلمات الدالة : نخيل التمر، البصمة الوراثية، الاليلات الهجينة.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849

Constract molecular marker-based for identification some varieties of Iraqi date palm (Phoenix dactylifera L.) by PCR-RFLP.

Abdullah S. Awad[1] , Akeel H. Ali Al-Assie[2] , Jaladet M. Salih. Jubrael[3]

jjubrael53@jamail.com[1] , akalassi09@yahoo.com [2]

[1,2]Tikrit University / College of Sciences / Dept. of Biology

abdalla88bio10@yahoo.com[3]

[3]Duhok University / College of Sciences / Dept. of Biology

Received date : 29 / 12 / 2014 **Accepted date : 8 / 3 / 2015**

ABSTRACT

This study was performed on ten varieties of Iraqi dates palm (Barhi, kiara Hamra, sugary, Zuhdi, Khstawi, Khadrawi, Tbrzel, Sayer (osta omran), Prem, Maktoum) to devise specific DNA finger print for a given class using three specialized primers within the SSR markers and then use three restricted enzymes within PCR-RFLP technique to reach the goal. one band was result from all varieties with molecular size 320bp for mpdIRD28 and 200bp for mpdIRD46 , mpdIRD01 locus respectively after performing the PCR reaction within SSR markers. The PCR-RFLP techniqae was used with three restricted enzymes HinfI, TaqI, EcoRI The results reveals the presence or absence of Restriction sites for hybrid alleles (haplotypes) in date palm.

Key words: *Date-palm, Fingerprints, Haplotypes, PCR-RFLPs.*

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849

1. المقدمة (Introduction)

نخيل التمر *Phoenix dactylifera L.* نبات ثنائي المجموعة الكروموسومية (2n=2x=36)، من الفواكه أحادية الفلق Monocotyledon المعمرة ، ثنائية الجنس dioecious اشجار الذكور منفصلة عن الاناث، تنتمي الى العائلة النخيلية Arecaceae [3]. وتشير الادلة المتوفرة في الوقت الحاضر الى ان السومريين هم اول من زرعوا شجرة نخيل التمر، واستعملوا ثمارها كغذاء اساسي وذلك في وادي دجلة والفرات منذ اكثر من اربعة الاف سنة قبل الميلاد، تعد نخلة التمر من اشجار الفاكهة المباركة التي ورد ذكرها في آيات كثيرة من القرآن الكريم، كما تعد مصدراً اقتصادياً كبيراً وغذائياً جيداً، لكون ثمارها غنية بالسكريات والفيتامينات والعناصر المعدنية والطاقة كما انها تدخل في العديد من الصناعات الغذائية، وتدخل اوراقها في الصناعات التقليدية واعلافاً للحيوانات وصناعة الورق وسماداً للتربة [1,2]. تنتشر زراعة نخيل التمر في العراق وبعض مناطق الشرق الاوسط وشمال افريقيا، ويبلغ معدل انتاج العالم من التمور اكثر من 7.5 مليون طن في عام 2009 ، وغطت المساحة المزروعة بنخيل التمر ما يقارب 1.3 مليون هكتار، شكلت دول الشرق الاوسط وشمال افريقيا الأجزاء الاكبر منها [4,5]. ان من المشاكل الأساسية التي تواجه التوسع في زراعة النخيل وإنتاجة الاختلافات الوراثية والبيئية الكبيرة جداً مما يجعل صعوبة التميز بين الاصناف المختلفة في المراحل الاولية، حيث من الصعب تحديد صنف نخيل التمر قبل مرحلة الأثمار، ان سرعة ودقة تحديد صنف معين استحوذ على الكثير من الدراسات البحثية وذلك لتداخل المحتوى الوراثي والمظهري الى حد كبير [6,8]. وخلصت معظم الدراسات على ان الصفات المظهرية لأصناف النخيل قد تشابهت الى حد يصعب الاعتماد عليها كمؤشر مظهري، وعليه توجهت الجهود الى المحتوى الوراثي لها والبحث في مكوناتها من اجل الكشف عن الحدود الفاصلة بين تلك الاصناف [9]. ان علامات النجاح في هذا المجال تزايدت توافقاً مع التقنيات الحديثة المتطورة على الدوام مما افضى الى البحث في المستوى الوراثي وصولاً الى الاختلافات على مستوى قطعة معينة من المادة الوراثية الـDNA ، وكان لتقنيات البيولوجي الجزيئي الاثر الكبير في هذا المجال وخصوصاً تلك التي اعتمدت على كشف التباينات التي تكتنف قطعة محدده من الدنا وذلك مثل مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا RAPD والتي استخدمت في تحليل التنوع الوراثي لأصناف مختلفة من النخيل [10]. ومؤشرات التضاعف للقطع متباينة الطول AFLP التي استخدمت في رسم الخرائط الوراثية وايجاد البصمة الوراثية لبعض اصناف النخيل العراقية [11,7].

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849

ومؤشرات التتابعات القصيرة SSR [13,12]. ومؤشرات تباين اطوال قطع التقييد RFLP التي استخدمت في التمييز بين الذكور والإناث لأشجار النخيل [14]. وعلى الرغم من الفوائد الجمه لكل من المؤشرات اعلاه والنتائج التي حققتها على مر العقدين الماضيين الا انها لم تتمكن من ربط قطعة معينة من الDNA مع اي من الصفات المميزة لكل صنف، وتناغمت اساليب تطوير التقنيات الحديثة المعتمدة على جينات معينة ومحددة لصفة مظهرية لاستثمارها في تحديد الأصناف في المراحل المبكرة من نمو النبات. وعلى هذا النحو استند هذا البحث محاولة لبناء مؤشر وراثي يميز اي صنف عن بقية الاصناف من خلال استخدام عدد من البادئات المتخصصة لعدد من اصناف النخيل العراقية وتحديد التباين الوراثي في مواقعها، واستخدام توليفة من الانزيمات القاطعة مع نواتج البادئات المتخصصة لتعزيز مظاهر التباينات بين تلك الاصناف.

2. طريقة العمل والمواد (Materials and Methods)

1. جمع العينات

تم جمع العينات من اشجار النخيل في محافظة صلاح الدين مع العلم ان تلك الأشجار كانت عبارة عن اشجار مثمرة تم جلبها سابقا من مناطق زراعة الصنف في العراق، كما موضح في الجدول (1) وتم الاستعانة بالمزارعين ذوي الخبرة معتمدين في التشخيص على شكل الثمار بالدرجة الاولى وعلى الشكل العام للشجرة.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849

جدول (1): أصناف نخيل التمر الداخلة في الدراسة

	الاسم الشائع	منطقة الجمع	الانتشار الجغرافي
1	برحي	صلاح الدين	جميع مناطق زراعة النخيل في العراق
2	خياره حمره	صلاح الدين	منطقة شط العرب
3	سكري	صلاح الدين	من الأصناف النادرة الانتشار في العراق
4	زهدي	صلاح الدين	جميع مناطق زراعة النخيل في العراق
5	خستاوي	صلاح الدين	المنطقة الوسطى من العراق
6	خضراوي	صلاح الدين	منطقة شط العرب بشكل اساسي إضافة لانتشاره في مناطق اخرى من العراق
7	تبرزل	صلاح الدين	منطقة شط العرب
8	ساير(اسطة عمران)	صلاح الدين	منطقة شط العرب
9	بريم	صلاح الدين	منطقة شط العرب بشكل اساسي إضافة لانتشاره في مناطق اخرى من العراق
10	مكتوم	صلاح الدين	منطقة شط العرب

2. عزل الدنا DNA Isolation

تم عزل الـ DNA بأخذ 2 غم من الأوراق الطرية لنخيل التمر *Phoenix dactylifera* باستخدام مادة الـCTAB [15].

(2Xctab=1.4M Nacl, 0.1M tris-Hcl, 20mM EDTA, 2%CTAB, PH=8).

3. تفاعلات الـPCR

اجري التفاعل باستعمال عدة Green Master Mix المجهز من شركة Promega وبحجم نهائي 50µl وباستعمال ثلاث ازواج من البادئات متخصصة *mpdIRD01, mpdIRD46, mpdIRD28* (1x, 0.2 mM DNTPs, 0.625 U Taq polymerase, 2 mM MgCl2, 20 poml Each primer (F, R), 200 ng DNA Template

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849

(Green Master Mix, 2x=). وبأستخدام جهاز المبلمر الحراري Thermocycler ويبرمج الجهاز على (94 م°لمدة 4 دقيقة خلال دورة واحدة و94 م°لمدة 1 دقيقة و60 م°لمدة 1دقيقة و72 م°لمدة 1دقيقة خلال35دورة و72 م°لمدة 6دقيقة خلال دورة واحدة). وبعد الحصول على الحزم المتضاعفة يتم استخدام الانزيمات *HinfI, TaqI, EcoRI* لهضم الحزم الناتجة وعلى درجة حرارة 37 م° باستخدام الحاضنة ولمدة 4 ساعة بعدها تفصل على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%.

4. تقنية الـPCR-RFLP

تعد تقنية PCR-RFLP من التقنيات المعروفة في اجراء التنميط الوراثي وتعتمد هذه التقنية على SNP في تحديد الموقع التعريفي لأنزيم التقييد [17]. او الغائه. تشترط تقنية PCR-RFLP تضخيم قطع الـDNA الهدف ثم بعد ذلك معاملة القطعة المتضخمة بأنزيم تقييد مناسب، وتتميز تقنية PCR-RFLP بقلة تكاليفها وعدم حاجتها الى اجهزة متطورة فضلاً عن سهولة تصميم اختبارها، يمكن ان تستعمل هذه التقنية لأجراء التنميط الوراثي للأفراد بين الانواع interspecific فضلاً عن انها مناسبة لتحديد التباين ضمن النوع الواحد intraspecies variation [18]. واستخدمت في التمييز بين الذكور والاناث لأشجار نخيل التمر من خلال الاختلاف في مواقع التقييد [14]. وكذلك في دراسة وتشخيص والتمييز بين انواع الفطريات *Candida sp.* [19]. وكذلك في التميز بين ثلاث انواع من الفطريات هي *S. cupressi*, *S. Seiridium cardinale, unicorne* التي تسبب مرض السرطان لأنواع من اشجار السرو *Cupressus sp.* الذي يسمى سرطان السرو cypress canker التي لا يمكن التمييز بينها مظهرياً، حيث استخدمت لتقنية PCR-RFLP للتمييز بينها [20].

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849

3. النتائج والمناقشة (Result and Discussion)

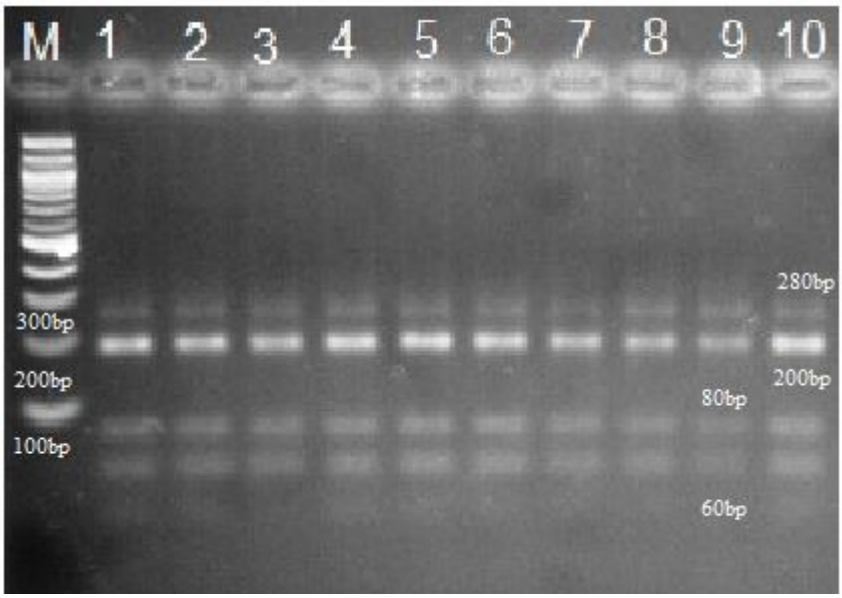
اظهرت نتائج مؤشرات الـSSR في الازواج الثلاثة للبادئات حزمة واحدة في جميع الأصناف المدروسة [16] الجدول(2).

جدول (2): البادئات المستخدمة في الدراسة

Locus	Primer sequences 5´-3´	Size bp
mpdIRD28	F:GAAACGGTATCGGGATGATG R:TTAACGACGCCGTTTCCT	320
mpdIRD46	F:ATGGGTCCATTGGAGGAACT R:GACGGAGACCTTGACTGCTC	200
mpdIRD01	F:CTCGGAAGGGTATGGACAAA R:TTGCCTTCGACGTGGTAGTA	200

من خلال معاملة نواتج الـPCR بالأنزيمات القاطعة حيث انتج الانزيم القاطع *HinfI* اربعة حزم بحجم جزيئي 60,80,200,280bp في جميع اصناف النخيل المدروسة الشكل (1) مع نواتج البادئ *mpdIRD28* وهذا الانزيم يعمل على القطع تتابعات معينة G↓ATC ومن خلال هذا الانزيم يمكن التمييز من وجود او عدم وجود مواقع التعريف للأنزيم القاطع على الاليلات الهجينة حيث يعمل على تقطيع الاليلات الهجينة المفردة haplotype ومن النتيجة يلاحظ وجود الاليل الهجين في هذا البادئ *mpdIRD28*، وقد وجد [21] ان نخيل التمر التونسية تحتوي نوعين من الاليلات الهجينة المفردة haplotype التي تم الكشف عنها من خلال وجود المواقع التعريفية للأنزيم *HinfI* واليلات غير هجينة لا تحتوي مواقع تعريفية للأنزيم.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849



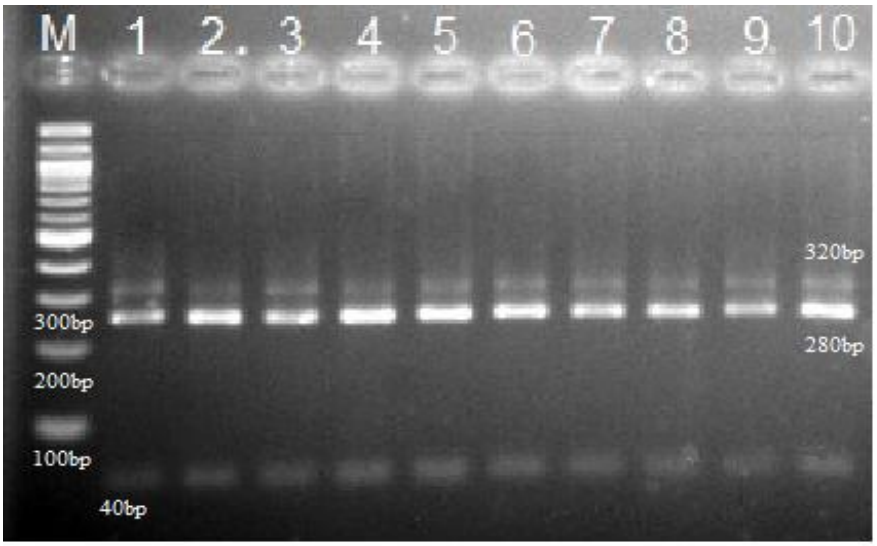
شكل(1): يمثل ناتج ترحيل الPCR–RFLP للبادئ *mpdIRD28* بواسطة انزيم *Hinf I* لعينات النخيل على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% (M الدليل الحجمي)

1–برحي2–خياره حمره3–سكري4–زهدي5–خستاوي 6–خضراوي7–تبرزل

8–ساير(اسطه عمران)9–بريم10–مكتوم)

واستخدم الانزيم *TaqI* الذي يعمل على قطع التتابع CGA⬇T للكشف عن وجود او عدم وجود طفرة في مواقع القطع بالنسبة للبادئات المستخدمة، وقد وجد [21] ان نخيل التمر التونسية تحتوي نوعين من الاليلات الهجينة المفردة haplotype التي تم الكشف عنها من خلال وجود المواقع التعريفية للأنزيم *TaqI* واليلات غير هجينة لا تحتوي مواقع تعريفية للأنزيم، وفي هذه الدراسة انتج ثلاث حزم في جميع الاصناف المدروسة وبأحجام جزيئية 40, 280, 320bp الشكل (2) مع نواتج البادئ *mpdIRD28* الذي احتوى اليلات هجينة haplotype.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849



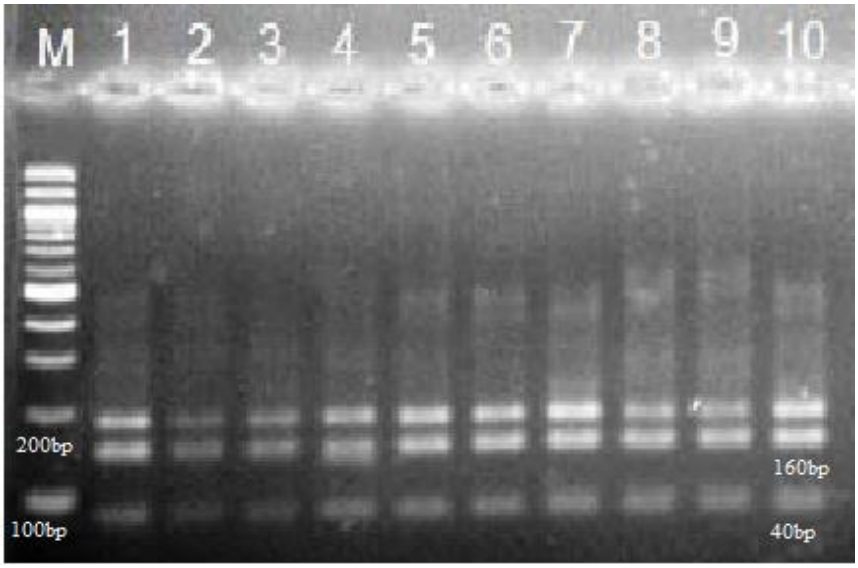
شكل(2): يمثل ناتج ترحيل الPCR–RFLP للبادئ *mpdlRD28* بواسطة انزيم *Taq I*

لعينات النخيل على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%(M الدليل الحجمي) 1–برحي 2–خياره

حمره 3–سكري4–زهدي5–خستاوي 6–خضراوي7–تبرزل 8–ساير (اسطه عمران)–

9بريم10–مكتوم)

وثلاث حزم في جميع الاصناف المدروسة وبأحجام جزيئية 200, 160, 40bp الشكل (3) مع نواتج البادئ *mpdlRD46* الذي احتوى اليلات هجينة، وانتج حزمة واحدة في جميع الاصناف المدروسة بحجم جزيئي 200bp الجدول (3) مع نواتج البادئ *mpdlRD01* الذي لم يحتوي على موقع تعريفي للأنزيم وبالتالي احتوت جميع هذه الاصناف على اليلات متشابهة.



Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849

شكل(3): يمثل ناتج ترحيل الـPCR-RFLP للبادئ *mpdIRD46* بواسطة انزيم *Taq I* لعينات النخيل على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%(M الدليل الحجمي)

1-برحي 2-خياره حمره 3-سكري4-زهدي5-خستاوي 6-خضراوي7-تبرزل

8-ساير (اسطه عمران)9-بريم10-مكتوم)

واستخدم الانزيم *EcoRI* لأول مرة للكشف عن وجود او عدم وجود طفرة في مواقع القطع بالنسبة للبادئات المستخدمة والذي يقطع التتابع G⬇AATTC فوجد ان هذا الانزيم لم يتعرف على اي موقع تعريفي للقطع بالنسبة للبادئات المستخدمة علماً انه قد يوجد هذا الموقع في اصناف اخرى وانتج حزمة واحدة بحجم جزيئي 320bp الجدول (3) مع نواتج البادئ *mpdIRD28*، وحزمة واحدة بحجم جزيئي 200bp الجدول (3) مع نواتج البادئ *mpdIRD46* و البادئ *mpdIRD01*.

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849

جدول(3): خصائص عملية هضم البادئات باستخدام انزيمات التقييد

البادئ × الانزيم	عدد الحزم لكل عينة	حجم الحزم bp
Hinf I × mpdlRD28	**4**	**60,80,200,280**
Taq I × mpdlRD28	**3**	**40,280,320**
EcoR I × mpdlRD28	**1**	**320**
Taq I × mpdlRD46	**3**	**40,160,200**
EcoR I × mpdlRD46	**1**	**200**
Taq I × mpdlRD01	**1**	**200**
EcoR I × mpdlRD01	**1**	**200**

ولتفسير التشابه في نمط التقطيع بالنسبة للأصناف المدروسة هو ان الصفات التي تعبر عنها هذه الجينات المستخدمة في الدراسة محكومة بعدد كبير من الاليلات وان عدد معين منها هو الذي يتحكم في ظهور الصفة لذلك ظهرت الاليلات الاساسية التي تتحكم في الصفة في جميع الاصناف المدروسة والذي ادى الى التشابه في نمط التقطيع على الرغم من اختلاف الاليلات الثانوية ضمن العينة الواحدة لنفس الصفة، كما ان الاليلات المتجاورة والتي عادة ما تورث سوية والتي تسمى بالنمط الهجين المفرد haplotype وان احتمال توريث الاليلات متقاربان سوية يحدد عبر قياس توازن الارتباط الذي هو الفرق بين عدد مرات ظهورهما معاً في الكروموسوم وبين عدد المرات المتوقع تكرار كل منهما، هذا الامر مهم عندما يكون احد الاليلات من بين المجموعة نافعاً جداً، اذ ان الانتخاب الطبيعي يكون في جانب الصفة، والذي قد يسبب مسحاً انتقائياً selective sweep ، فتصبح الاليلات من النوع المنفرد haplotype شائعة في المجتمع [22]. او انه خلال عملية تكوين الاتحادات الجديدة Recombination التي تسمح بتفريق الاليلات الموجودة على نفس شريط الدنا، وبما ان معدل هذه الاتحادات الجديدة منخفض (تقريباً تحدث مرتين في كل كروموسوم في كل جيل) فأن الجينات التي تتموضع في مواقع متقاربه على الكروموسوم ينخفض احتمال تفرقتها، حيث كلما تقل المسافة بينها يرتفع احتمال

Kirkuk University Journal /Scientific Studies (KUJSS)
Volume 10, Issue 4, December 2015 , p.p(134-148)
ISSN 1992 – 0849

توريثها سوياً، وهذه الظاهرة تعرف بالارتباط الجيني genetic linkage [23]. وكذلك نتيجة الظروف البيئية السائدة في منطقة الزراعة والتي تؤثر في الانتخاب الطبيعي الذي يحدث بسبب التدخل البيئي او بسبب قيام المزارعين بانتخاب اصناف معينة على اساس نوع الثمرة والاهمية الاقتصادية يؤثر على التنوع الوراثي حيث ان الانتخاب الطبيعي يعزز التكيف للظروف المحلية مؤدي الى خلق تباينات جديدة التي تغير التكرارات الاليلية [24].

المصادر (References)

[1] عبد الجبار، البكر، ***نخلة التمر ماضيها وحاضرها والجديد في زراعتها وصناعتها وتجارتها***. (1972)، مطبعة العاني، بغداد، العراق.

[2] ضياء احمد، الطعين، صباح حسن طارش البراك، منتهى عبد الزهرة عاتي ، **دراسة الصفات الطبيعية والكيميائية والإنزيمية لثمار النخيل صنف الهلالي *Phoenix dactylifera* L. cv .Hilalli** ، مجلة ديالى للعلوم الزراعية: 2، (2013)، (5)، 203-212ص.

[3] S.Barrow, ***Amonograph of (Phoenix dactylifera L.) (palmae:coryphoideae) Kew Bull***, 53 (1998), pp.(513-575).

[4] FAO. (2011). FAOSTAT agriculture.

[5] M.H. Abass, ***Microbial contaminants of date palm(Phoenix dactylifera L.) in Iraqi tissue culture laboratories***, Emirates Journal of Food and Agriculture: 25 (2013), (11), pp. (875-882).

[6] M. A. Elhoumaizi, M. Saaidi, A. Oihabi and C. Cilas, ***Phenotypic diversity of date-palm cultivars (Phoenix dactylifera L.) from Morocco***, Genetic Resources and Crop Evolution: 49 (2002), pp.(483-490).

[7] H.S.M. Khierallah, S.M. Bader, M. Baum and A. Hamwieh, ***Assessment of genetic diversity for some Iraqi date palm(phoenix dactylifera L.) using AFLP markers***, African Journal of Biotechnology: 136, (2011), (4), pp. (282-287).

[8] E.Askari and N.S. Al-khalifah, ***Molecular phylogeny of date palm (phoenix dactylifera L.) cultivars from saudi Arabia by DNA fingerprinting,***Theoretical and Applied Genetics :107, (2003), pp. (1266-1270).

[9] H. Hamza, M. Elbekkay, M. A. Ben Abederrahim and A. Ferchichi Ali, ***Molecular and morphological analyses of date palm (phoenix dactylifera L.) subpopulations in southern Tunisia***, Spanish Journal of Agricultural Research: 9, (2011), (2), pp. (484-493).

[10] M. Marsafari and A.A. Mehrabi, ***Molecular identification and genetic diversity of Iranian date palm (phoenix dactylifera L.) cultivars using ISSR and RAPD markers***, Australian Journal of Crop Science: 7, (2013), (8), pp. (1160-1166).

[11] J.M.S. Jubrael, S.M. Udupa and M. Baum, ***Assessment of AFLP based genetic relationships among date palm (phoenix dactylifera L.) varietes of Iraq***, Journal of the American Society for Horticultural Science: 130, (2005), pp. (442-447).

[12] Y. Zhao, R. Williams, C. S. Prakash and G. He, ***Identification and characterization of gene-based SSR markers in date palm (phoenix dactylifera L.)***, BMC plant Biology: 237, (2013), (12), pp. (1-8).

[13] K. Elmeer, H. Sarwath, J. Malek, M. Baum and A. Hamwieh, ***New microsatellite markers assessment of genetic diversity in date palm (phoenix dactylifera L.)***, Springer: 1, (2011), pp. (91-97).

[14] M.E. AL-Mahmoud, E.K. AL-Dous, E.K. AL-Azwani and J.A. Malek, ***DNA based assays to distinguish date palm (Arecaceae) gender***, American Journal of Botany: (2012), pp. (7-10).

[15] Q.X. Huang, X.C. Wang, H. Kong, Y.L. Guo and A.P. Guo, ***An efficient DNA isolation method for tropical plants,*** African Journal of Biotechnology: 12, (2013), (19), pp. (2727-2732).

[16] F. Aberlenc-Bertossi, K. Castillo, C. Tranchant-Dubreuil, E. Cherif, M. Ballardini, S. Abdoulkader, M. Gros-Balthazard, N. Chabrillange, S. Santoni, A. Mercuri and J.C. Pintaud, ***In silico mining of microsatellites coding sequences of the date palm (Arecaceae) genome***, characterization, and transferability, Plant sciences: 2, (2014), (1), pp. (1300058).

[17] S. Narayanan, ***Applications of restriction fragment length polymor-phism,*** Annals of Clinical and Laboratory Scince:21, (1991), (4), pp. (291-296).

[18] S. Sankar, M. Ramamurthy, and B . Nandagopal , ***An appraisal of PCR-based technology in the detection of Mycobacterium tuber-culosis***, Molecular Diagnosis and Therapy: 15, (2011), (1), pp. (1-11).

[19] S.H. Mirhendi, P. Kordbacheh, B. Kazemi, S. Samiei, M. Pezeshki, and M.R. Khorramizadeh. ***A PCR-RFLP Method to Identification of the Important Opportunistic Fungi***: *Candida* Species, (*Cryptococcus neoformans*), (*Aspergillus famigatus*) and (*Fusarium solani*), Iranian Journal of Public Health: 30, (2001), (4), pp. (103-106).

[20] P. Krokene, I. Barnes, B.D. Wingfield and M.J. Wingfield, ***A PCR-RFLP based diagnostic technique to rapidly identify (Seiridium species) causing cypress canker***, Mycologia: 96, (2004), (6), pp. (1352-1354).

[21] S. Hela, Z. Salwa, O.M.S. Ali, R. Abdelmajid, M. Mohamed and T. Mokhtar, ***Genetic polymorphism of plastid DNA in Tunisian date palm germplasm (phoenix dactylifera L.) detected with PCR-RFLP***, Genetic Resources and Crop Evolution: 51, (2004), pp. (479-487).

[22] N.H. Barton, Genetic hitchhiking. ***Philosophical Transaction of the Royal Society of London***, Biologic Sciences: 355, (2000), (1403), pp. (1553-1562).

[23] S. Lien, J. Szyda, B. Schechinger, G. Rappold, and N . Arnheim, ***Evidence for heterogenetity in recombination in the human pseudoautosomal region: high resolution analysis by sperm typing and radiation-hybrid mapping***, American Journal of Human Genetics: 66, (2000), (2), pp. (66-557).

[24] W.J. Ewent, ***Mathematical population Genetic***. 2nd ed. Springer, (2004), New York.

المؤلف

عبدالله صبحي عواد: بكالوريوس علوم حياة / نبات-2012 / ماجستير علوم حياة / نبات / بايلوجي جزيئي.