

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان	فصل اول کلیات
۶	مقدمه .....	۱ ۱
۸	بیان مسأله و ضرورت انجام تحقیق .....	۴ ۱
۸	اهداف تحقیق .....	۳ ۱
<b>فصل دوم - بررسی منابع</b>		
۹	بادامک .....	۱ ۴
۱۱	تنش خشکی .....	۴ ۴
۱۵	تکنیک cDNA-AFLP .....	۳ ۴
۱۷	واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (Real-Time PCR) .....	۴ ۴
۲۰	مروری بر بررسی‌های انجام شده .....	۵ ۴
<b>فصل سوم مواد و روش‌ها</b>		
۲۶	مواد گیاهی .....	۱ ۴
۲۶	کشت بذور و تهیه درختچه‌ها .....	۱ ۱ ۳
۲۷	تنش خشکی و نمونه‌گیری .....	۴ ۱ ۳
۲۷	استخراج RNA .....	۴ ۴
۲۹	تیمار با آنزیم DNAase I .....	۳ ۴
۲۹	اندازه‌گیری کمیت و کیفیت RNA .....	۴ ۴
۲۹	تعیین کمیت و خلوص RNA به روش اسپکتروفتومتری .....	۱ ۴ ۳
۳۰	تعیین کیفیت RNA توسط ژل آگارز فرمالدئید .....	۴ ۴ ۳
۳۰	سنتز cDNA .....	۵ ۴
۳۰	سنتز رشته اول cDNA .....	۱ ۵ ۳
۳۱	سنتز رشته دوم cDNA .....	۴ ۵ ۳
۳۲	خالص‌سازی cDNA دو رشته‌ای .....	۴ ۵ ۳
۳۳	تعیین کیفیت cDNA دورشته‌ای با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد .....	۴ ۵ ۳
۳۳	تکنیک AFLP .....	۶ ۴
۳۳	برش مضاعف cDNA (هضم مضاعف) .....	۱ ۶ ۳
۳۴	اتصال آداپتورها به قطعات حاصل از هضم .....	۴ ۶ ۳
۳۵	تهیه آداپتورها .....	۱ ۴ ۶ ۳
۳۶	تکثیر مقدماتی .....	۳ ۶ ۳
۳۷	تکثیر انتخابی .....	۴ ۶ ۳
۳۹	الکتروفورز ژل اکریل‌آمید .....	۵ ۶ ۳
۳۹	آماده‌سازی شیشه‌ها .....	۱ ۵ ۶ ۳
۴۰	آماده‌سازی ژل اکریل‌آمید .....	۴ ۵ ۶ ۳
۴۱	الکتروفورز مقدماتی .....	۴ ۵ ۶ ۳

۴۱	رنگ‌آمیزی ژل اکریل‌آمید	۴ ۶
۴۳	جداسازی باندها از ژل اکریل‌آمید	۴ ۷
۴۴	خالص‌سازی باندهای جدا شده از ژل اکریل‌آمید	۴ ۸
۴۴	تکثیر باندهای مورد نظر توسط واکنش PCR	۴ ۹
۴۵	خالص‌سازی فرآورده‌های PCR	۴ ۱۰
۴۶	کلونینگ	۴ ۱۱
۴۶	Ligation	۴ ۱۱ ۱
۴۷	تهیه سلول‌های Competent	۴ ۱۱ ۴
۴۸	ترانسفورماسیون	۴ ۱۱ ۳
۴۹	Colony PCR	۴ ۱۱ ۴
۵۰	استخراج پلاسمید	۴ ۱۱ ۵
۵۲	واکنش PCR پلاسمیدهای استخراج شده	۴ ۱۱ ۶
۵۲	توالی‌یابی	۴ ۱۲
۵۲	تجزیه و تحلیل توالی‌ها در سایت NCBI	۴ ۱۳
۵۳	طراحی پرایمرهای اختصاصی	۴ ۱۴
۵۳	سنتز رشته اول cDNA	۴ ۱۵
۵۴	واکنش PCR گرادیانت پرایمرهای طراحی شده	۴ ۱۶
۵۴	تأیید ژن‌های شناسایی شده مرتبط با تنش خشکی با استفاده از واکنش PCR در زمان واقعی (Rel-Time PCR)	۴ ۱۷
۵۵	ثبت و کدگذاری توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از این بررسی در بانک ژن NCBI	۴ ۱۸

## فصل چهارم نتایج و بحث

۵۶	نتایج	۴ ۱
۵۶	نتایج اندازه‌گیری میزان آب نسبی (RWC) برگ‌ها	۴ ۱ ۱
۵۷	تعیین کمیت و کیفیت RNA ژنومی	۴ ۱ ۴
۵۸	کنترل کیفیت cDNA دورشته‌ای	۴ ۱ ۴
۵۸	کنترل صحت انجام تکثیر پیش انتخابی	۴ ۱ ۴
۵۹	کنترل صحت انجام تکثیر انتخابی	۴ ۱ ۵
۵۹	نتایج ژل اکریل‌آمید	۴ ۱ ۶
۶۱	کنترل تکثیر باندهای مورد نظر توسط واکنش PCR	۴ ۱ ۷
۶۱	کنترل صحت انجام واکنش Ligation	۴ ۱ ۸
۶۲	تأیید کلون‌های نو ترکیب با استفاده از روش Colony PCR	۴ ۱ ۹
۶۳	کنترل پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از واکنش PCR	۴ ۱ ۱۰
۶۳	نتایج توالی‌یابی	۴ ۱ ۱۱
۶۶	نتایج BLAST در سایت NCBI	۴ ۱ ۱۲
۷۲	نتایج روش Quantitative Real Time PCR (QRT-PCR)	۴ ۱ ۱۳
۷۷	کدگذاری توالی‌ها در سایت NCBI	۴ ۱ ۱۴

۷۸	..... بحث ۴ ۴
۷۸	..... نقش ژن Starch synthase VI(SSVI) در تنش خشکی ۴ ۴
۸۰	..... نقش ژن Leucin rich repeat protein (LRR) در تنش خشکی ۴ ۴
۸۲	..... نقش ژن Zeaxanthin epoxidase (ZEAEOX یا ZEP) در تنش خشکی ۴ ۴
۸۵	..... نقش ژن Protein kinase MK5 در تنش خشکی ۴ ۴
۸۷	..... نقش ژن 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase در تنش خشکی ۵ ۴
۹۰	..... نتیجه‌گیری کلی ۳ ۴
۹۱	..... پیشنهادات ۴ ۴
۹۲	..... پیوست شماره ۱ نحوه تهیه بافرها و محلول‌های مورد نیاز
۹۹	..... منابع

## فهرست شکل‌ها

صفحه	عنوان
۱۰	شکل ۴ ۱ بادام وحشی گونه <i>Prunus scoparia</i> .....
۴۳	شکل ۳ ۱ نمونه‌های cDNA بادام وحشی گونه <i>P. Scoparia</i> روی ژل اکریل آمید.....
۵۷	شکل ۴ ۱ اندازه‌گیری میزان آب نسبی (RWC) برگ تحت تنش خشکی در بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> .....
۵۸	شکل ۴ ۲ الگوی الکتروفورزی نمونه‌های RNA استخراج شده از بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> روی ژل آگارز - فرمالدئید.....
۵۸	شکل ۴ ۳ الگوی الکتروفورزی نمونه‌های cDNA دو رشته‌ای سنتز شده از بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.....
۵۹	شکل ۴ ۴ الکتروفورز محصولات تکثیر مقدماتی بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.....
۵۹	شکل ۴ ۵ الکتروفورز محصولات تکثیر انتخابی بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.....
۶۰	شکل ۴ ۶ قطعات حاصل از تکثیر cDNA-AFLP بر روی ژل اکریل آمید.....
۶۱	شکل ۴ ۷ الگوی الکتروفورزی باندهای تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.....
۶۱	شکل ۴ ۸ الگوی الکتروفورزی فراورده‌های واکنش Ligation بر روی ژل آگارز یک درصد.....
۶۲	شکل ۴ ۹ الگوی الکتروفورزی واکنش Colony PCR بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.....
۶۲	شکل ۴ ۱۰ الگوی الکتروفورزی پلاسمیدهای استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد.....
۷۲	شکل ۴ ۱۱ نمودار واکنش PCR در زمان واقعی برای ژن SSVI در بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> .....
۷۲	شکل ۴ ۱۲ نمودار افزایش بروز ژن SSVI در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل در بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> .....
۷۳	شکل ۴ ۱۳ نمودار واکنش PCR در زمان واقعی برای ژن LRR در بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> .....
۷۳	شکل ۴ ۱۴ نمودار افزایش بروز ژن LRR در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل در بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> .....
۷۴	شکل ۴ ۱۵ نمودار واکنش PCR در زمان واقعی برای ژن ZEP در بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> .....
۷۴	شکل ۴ ۱۶ نمودار افزایش بروز ژن ZEP در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل در بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> .....
۷۴	شکل ۴ ۱۷ نمودار واکنش PCR در زمان واقعی برای ژن Protein kinase MK5 در بادام وحشی گونه <i>P. Scoparia</i> .....
۷۵	شکل ۴ ۱۸ نمودار افزایش بروز ژن Protein kinase MK5 در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل در بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> .....
۷۵	شکل ۴ ۱۹ نمودار واکنش PCR در زمان واقعی برای ژن 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase در بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> .....
۷۶	شکل ۴ ۲۰ نمودار افزایش بروز ژن deoxyglucose-6-phosphate phosphatase در شرایط تنش خشکی نسبت به شرایط کنترل در بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> .....
۷۶	شکل ۴ ۲۱ نمودار واکنش PCR در زمان واقعی برای ژن اکتین در بادام وحشی گونه <i>P. scoparia</i> .....

## فهرست جدول‌ها

صفحه	عنوان
۳۰	جدول ۳ ۱ اجزاء واکنش سنتز رشته اول cDNA در مرحله اول
۳۱	جدول ۳ ۲ اجزاء واکنش سنتز رشته اول cDNA در مرحله دوم
۳۲	جدول ۳ ۳ اجزاء واکنش سنتز رشته دوم cDNA
۳۴	جدول ۳ ۴ اجزاء واکنش برش cDNA در تکنیک AFLP (مرحله اول)
۳۴	جدول ۳ ۵ اجزاء واکنش برش cDNA در تکنیک AFLP (مرحله دوم)
۳۵	جدول ۳ ۶ تهیه آداپتور ۵ میکرومولار <i>Pst</i> I
۳۵	جدول ۳ ۷ تهیه آداپتور ۵۰ میکرومولار <i>Mse</i> I
۳۵	جدول ۳ ۸ برنامه PCR تهیه آداپتور
۳۶	جدول ۳ ۹ اجزاء واکنش اتصال آداپتور
۳۷	جدول ۳ ۱۰ اجزاء واکنش تکثیر پیش انتخابی
۳۷	جدول ۳ ۱۱ برنامه PCR برای تکثیر پیش انتخابی
۳۸	جدول ۳ ۱۲ اجزاء واکنش تکثیر انتخابی
۳۸	جدول ۳ ۱۳ توالی جفت آغازگرهای واکنش انتخابی
۳۹	جدول ۳ ۱۴ برنامه PCR برای تکثیر انتخابی
۴۲	جدول ۳ ۱۵ مراحل رنگ‌آمیزی ژل اکریل‌آمید
۴۵	جدول ۳ ۱۶ اجزاء واکنش PCR برای تکثیر باندها
۴۵	جدول ۳ ۱۷ شرایط انجام واکنش PCR برای تکثیر باندها
۴۶	جدول ۳ ۱۸ اجزاء واکنش Ligation
۵۰	جدول ۳ ۱۹ اجزاء واکنش Colony PCR
۵۰	جدول ۳ ۲۰ شرایط انجام واکنش Colony PCR
۵۲	جدول ۳ ۲۱ اجزاء واکنش PCR پلاسمیدهای استخراج شده
۵۳	جدول ۳ ۲۲ پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای واکنش Real-Time PCR
۵۴	جدول ۳ ۲۳ اجزاء واکنش سنتز رشته اول cDNA
۵۴	جدول ۳ ۲۴ اجزاء واکنش PCR گرادیانت پرایمرهای طراحی شده
۵۵	جدول ۳ ۲۵ اجزاء واکنش Real-time PCR
۶۳	جدول ۳ ۱ نتایج حاصل از توالی‌یابی TDFها
۶۷	جدول ۳ ۲ نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل توالی‌ها در سایت NCBI

## فصل اول

### کلیات

#### † † مقدمه

بادام (Almond) با نام علمی *Prunus dulcis* متعلق به خانواده Rosaceae و زیرخانواده Pronoideae گیاهی دیپلوئید و ۱۶ کروموزومی است و هم‌ردیف و خویشاوند نزدیک هلو، شلیل و آلو می‌باشد و می‌تواند با آن‌ها تلقیح شود (کستر و همکاران، ۱۹۹۱). این گیاه عموماً خودناسازگار و از نظر خلوص ژنتیکی ناخالص است. از طرفی یکی از مهمترین محصولات آجیلی عمده جهان بوده و تولید میوه آن ارزش اقتصادی بالایی دارد (چاپچی و همکاران، ۱۳۸۱). گونه‌های وحشی این گیاه در گذشته تا سواحل مدیترانه وجود داشته‌اند (جلیلی مرنندی و حکیمی رضایی، ۱۳۷۷). ارقام اهلی بادام از توده‌های وحشی این گیاه به نام *P. communis* در آسیای مرکزی منشأ گرفته‌اند (کستر و همکاران، ۱۹۹۱). احتمالاً کشت و کار بادام حدود سه هزار سال قبل از میلاد با انتخاب ارقام مغز شیرین ناشی از موتاسیون ارقام وحشی که به طور طبیعی دارای مغز تلخ بوده‌اند، شروع شده است (ایمانی، ۱۳۷۶).

بادام وحشی گونه *Prunus scoparia* متعلق به خانواده Rosaceae، زیرخانواده Pronoideae و جنس *Prunus* درختی خوش‌منظر، سبزرنگ، خزان‌کننده، دارای شاخه‌های فراوان، افراشته، صاف و براق و ساقه‌های ایستا است. ارتفاع این درخت به ۶ متر می‌رسد و مقاوم به شرایط نامساعد محیطی خصوصاً کم‌آبی می‌باشد (ثابتی، ۱۳۸۲ و پویان، ۱۳۸۷). اسپچ، گیاه‌شناس آلمانی گونه‌های بادام را به پنج گروه مختلف تقسیم‌بندی کرد که گونه مورد مطالعه (*P. scoparia* Spach) در گروه دوم (*Spartioides* Spach) قرار دارد (جنیک و مور، ۱۹۹۶). این گونه بومی ایران و منطقه خاورمیانه بوده و دامنه انتشار آن وسیع است. در نواحی استپی و ارتفاعات نیم‌خشک کشور دیده می‌شود. دامنه ارتفاعی رویشگاه این گونه بین ۸۰۰ تا ۲۷۰۰ متر از سطح دریا در خطوط هم‌باران ۱۵۰ تا ۲۵۰ میلی‌متر قرار گرفته است. این گیاه در مناطق کوهستانی ایران در استان‌های فارس، خوزستان، چهارمحال و بختیاری، یزد، مرکزی، سیستان و بلوچستان، کردستان، تهران و

لرستان دیده شده و در انواع مختلف خاک‌ها رشد می‌کند. نام محلی آن در نقاط مختلف ایران، بارشین، بادامک، بادامچه و بادامشک می‌باشد (ثابتی، ۱۳۸۲).

استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی و دستکاری ژن‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به خشکی می‌تواند در اصلاح ارقام متحمل به خشکی مؤثر باشد. روش‌های بیوتکنولوژی به همراه روش‌های کلاسیک در برنامه‌های اصلاحی موجب پیشرفت سریع‌تر و مؤثرتر در معرفی ارقام متحمل به خشکی است و به فهم کنترل ژنتیکی این صفات پیچیده کمک می‌کند. مارکرهای مولکولی امکان ردیابی و شناسایی مکان ژنتیکی ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت را بدون اندازه‌گیری فنوتیپی فراهم می‌کند. بنابراین نیازی به آزمایشات مزرعه‌ای نیست و روند اصلاح نباتات سرعت بیشتری خواهد داشت. با این وجود، هرم‌سازی ژن‌ها و یا وارد کردن ژن به گونه‌های دیگر نیز از طریق روش‌های مولکولی و اطلاعات آن‌ها امکان‌پذیر است. مارکرهای مولکولی یک استراتژی به نام انتخاب بر اساس مارکرها را ارائه می‌کند و استراتژی دیگر مولکولی، کلون کردن ژن‌ها و تکنولوژی انتقال ژن توسط مهندسی ژنتیک است. با استفاده از تکنیک انتقال ژن (ژن‌های تحریک شونده در هنگام استرس) توانسته‌اند تحمل به استرس را در گیاهان ایجاد کنند (دپا و کانادو، ۲۰۰۱).

یکی از روش‌های مهم برای بررسی واکنش گیاهان به تنش‌های محیطی بررسی سطوح بیان ژن می‌باشد. به‌طور معمول چندین روش از قبیل (SAGE) serial analysis of gene expression، cDNA microarray، differential display reverse transcription-polymerase chain reaction (DDRT-PCR) و suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA amplified fragment length polymorphism برای بررسی بیان ژن‌ها وجود دارد. از بین این روش‌ها cDNA-AFLP به‌طور گسترده‌ای برای بررسی تغییرات بیان ژن در زمان بروز تنش‌های محیطی استفاده می‌شود، زیرا روشی ساده، دارای بازده بالا و به اطلاعات قبلی از ژنوم گونه مورد مطالعه نیازی ندارد (اومزوا و همکاران، ۲۰۰۲؛ بایساخ و همکاران، ۲۰۰۶؛ رودریگوئز و همکاران، ۲۰۰۶؛ ریتر و همکاران، ۲۰۰۸ و سی و همکاران، ۲۰۰۹). این روش شامل ۴ مرحله می‌باشد:

۱. سنتز cDNA دو رشته‌ای با استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای poly-dT
  ۲. هضم cDNA مورد مطالعه با دو آنزیم محدود کننده و اتصال لنگرهایی به عنوان آداپتور به انتهای قطعات حاصل
  ۳. تکثیر پیش انتخابی توسط پرایمرهای متناظر با لنگرها
  ۴. تکثیر انتخابی قطعات محدود شده به وسیله گسترش پرایمرها
- و در نهایت رونوشت‌های به‌دست آمده توسط نیترا نقره رنگ‌آمیزی می‌گردند (باچیم و همکاران، ۱۹۹۸).
- نوارهای حاضر در سطح ژل AFLP مشتق شده رونوشت شده (Transcript-Derived Fragments) نامیده می‌گردند. معمولاً TDFهای منحصر به فرد شناسایی شده در ژل اکریل‌آمید، از ژل جدا و توسط واکنش PCR تکثیر می‌گردند. این قطعات در ناقلین مناسب کلون و توالی‌یابی می‌گردند (سگال و همکاران، ۲۰۰۸).

مطالعات مختلف نشان داده است که cDNA-AFLP تکنیکی مناسب برای بررسی ژن‌های مرتبط با تنش خشکی می‌باشد (سانچز و همکاران، ۲۰۰۲؛ دیاب و همکاران، ۲۰۰۴؛ سوپرانو و همکاران، ۲۰۰۷؛ ریتر و

همکاران، ۲۰۰۸؛ سی و همکاران، ۲۰۰۹ و ...). لذا در این بررسی به منظور مطالعه ژن‌های مرتبط با تنش خشکی در بادام وحشی گونه *P. scoparia* از آن استفاده شد.

#### ۴-۱ بیان مسأله و ضرورت انجام تحقیق

درخت بادام به‌عنوان یکی از مقاوم‌ترین درختان به خشکی و گرما در میان میوه‌جات مناطق معتدله محسوب می‌شود و در کشور ایران، قریب ۱۹ گونه آن شناخته شده است که غالباً در نواحی نیمه‌خشک و استپی می‌رویند (ایمانی، ۱۳۷۶). با توجه به این که کشور ایران یکی از کشورهایی است که دارای آب و هوای خشک بوده و کمبود آب در کشاورزی و باغبانی از مسائل بسیار مهم می‌باشد، توسعه کشت و کار ارقام بادام مقاوم به خشکی ضروری است (خاتم‌ساز، ۱۳۷۱ و سرخه، ۱۳۸۴). برای دستیابی به این هدف، شیوه‌های گوناگونی به خدمت گرفته شده است. شناسایی و انتقال ژن‌های القایی در مقابل تنش کم‌آبی و تولید پایه‌های مقاوم در مقابل تنش خشکی، از طریق بکارگیری روش‌های بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌های مقاوم، یکی از این شیوه‌ها می‌باشد. بیوتکنولوژی با تولید ارقام اصلاح شده مقاوم به تنش خشکی از طریق انتقال ژن‌های مقاوم به گونه‌های مختلف که بتوانند در شرایط تنش کم‌آبی رشد و نمو کنند، امکان زیر کشت بردن ده‌ها هزار از اراضی خشک و کم‌آب کشور را فراهم می‌آورد.

#### ۴-۲ اهداف تحقیق

هدف از این پژوهش آزمون فرض صفر زیر می‌باشد:

$H_0$ : در نحوه بروز ژن‌های مسئول تنش خشکی در گیاه بادام وحشی گونه *P. scoparia*، بین حالت شاهد و تنش تفاوتی وجود ندارد.

در این مطالعه سعی شده تا با شناخت ژن‌های مسئول تنش خشکی در بادام وحشی گونه *P. scoparia* با استفاده از روش cDNA-AFLP، زمینه‌ای جهت بهبود تحمل به خشکی و توسعه کشت و کار بادام در ایران فراهم شود. شناسایی و تشخیص این ژن‌ها در آینده زمینه مناسبی را برای تولید ارقام اصلاح شده مقاوم به خشکی، تغییرات ژنتیکی و حتی افزایش مقاومت به خشکی فراهم خواهد ساخت.



## فصل دوم

### بررسی منابع

#### ۴ + بادامک

بادامک که گونه وحشی بادام می‌باشد با نام علمی *Prunus scoparia* متعلق به خانواده Rosaceae، زیرخانواده Pronoideae و جنس *Prunus* درختی خوش‌منظر، سبزرنگ، خزان‌کننده، دارای شاخه‌های فراوان، افراشته، صاف و براق و ساقه‌های ایستا است. ارتفاع این درخت به ۶ متر می‌رسد و مقاوم به شرایط نامساعد محیطی خصوصاً کم‌آبی می‌باشد. برگ‌های آن ساده با گوشوارک زود افت، باریک و نیزه‌ای، به طول ۴۰ و عرض ۷ میلی‌متر با انتهای پهن و دو سطح بدون کرک بوده که در رأس باریک و سرنیزه‌ای می‌شوند و حاشیه برگ‌ها هلالی شکل است. گل‌ها قبل از برگ‌ها ظاهر شده، منظم، منفرد یا دوتایی می‌باشند و قطر آن‌ها بالغ بر ۲۵ میلی‌متر، هیپانتیوم آن‌ها استکانی شکل و رنگ گلبرگ‌ها سفید رنگ است. میوه‌هایش شفت، سبز رنگ، تخم‌مرغی شکل به طول ۲۰ و عرض ۱۲ میلی‌متر و دارای کرک‌های کوتاه و پوسته سخت و صاف به رنگ قهوه‌ای روشن می‌باشد. هسته آن صاف، دارای خطوط شیار کم‌عمق، به رنگ زرد کاهی متمایل به قهوه‌ای و طعم تلخ است. رنگ میوه در حالت نارس سبز رنگ و معمولاً پوشیده از کرک است. در زمان رسیدن قسمت سبز میوه آب خود را از دست می‌دهد و شکاف می‌خورد. ریشه‌هایش دارای رشد سریع عمقی بوده و در زمین‌های سفت به خوبی رشد می‌کنند (ثابتی، ۱۳۸۲ و پویان، ۱۳۸۷).

اسپیچ، گیاه‌شناس آلمانی گونه‌های بادام را به پنج گروه زیر تقسیم‌بندی کرده است:

- ۱ گروه *Euamygdalus* Spach
- ۲ گروه *Spartioides* Spach
- ۳ گروه *Lycioides* Spach
- ۴ گروه *Chameamygdalus*
- ۵ گروه *Leptopus* Spach

گونه مورد مطالعه (*P. scoparia* Spach) در گروه دوم (*Spartioides* Spach) قرار دارد (جنیک و مور، ۱۹۹۶).

نام علمی این گیاه *Prunus scoparia*، نام فارسی آن بخورک، نام محلی آن بادامک، نام فرانسوی آن *ameinlier sauvoge*، نام انگلیسی آن *mountain almond*، نام آلمانی آن *Wilder Mandelbaum* و از تیره رز (*Rosaceae*) می‌باشد (پویان، ۱۳۸۷). گل‌های سفید رنگ بادام وحشی گونه *P. scoparia* معمولاً قبل از ظهور برگ‌ها، در اوایل فروردین ماه ظاهر می‌شوند. میوه آن نیز در خرداد ماه رسیده و قابل جمع‌آوری است (ثابتی، ۱۳۸۲).



شکل ۴ ۱ بادام وحشی گونه *Prunus scoparia*

این گونه بومی ایران و منطقه خاورمیانه بوده و دامنه انتشار آن وسیع است. در نواحی استپی و ارتفاعات نیم‌خشک کشور دیده می‌شود. دامنه ارتفاعی رویشگاه این گونه بین ۸۰۰ تا ۲۷۰۰ متر از سطح دریا در خطوط هم‌باران ۱۵۰ تا ۲۵۰ میلی‌متر قرار گرفته است. این گیاه در مناطق کوهستانی ایران در استان‌های فارس، خوزستان، چهارمحال و بختیاری، یزد، سیستان و بلوچستان، کردستان، تهران، کرمانشاه، خراسان، کرمان، اصفهان، مرکزی و لرستان دیده شده و در انواع مختلف خاک‌ها رشد می‌کند. پایین‌ترین حد ارتفاع آن از سطح دریا در حوالی بندرعباس در ارتفاع ۶۰۰ متری و حد اعلا‌ی آن در شیرکوه یزد و راه‌بر یا راور کرمان در ارتفاع ۲۷۰۰ متری دیده شده است. نام محلی آن در نقاط مختلف ایران بارشین (در استان فارس)، بادامک و بادامچه (در کرج و جهرم)، بایم و بایم‌حرومه (در استان لرستان)، الوک (در جبال البرز) و بادامشک (در طبس) می‌باشد (ثابتی، ۱۳۸۲).

استفاده بیابان‌نشینان از چوب‌های این درختان جهت تهیه سوخت و زغال به تدریج باعث از بین رفتن اکثر رویشگاه‌های این گونه گردیده است. آثار و شواهد این امر را در چاله‌های زغال سوزی اکثر نواحی کوهستانی خشک می‌توان مشاهده کرد (پویان، ۱۳۸۷).

در میوه آن ترکیبات شیمیایی آمیگدالین، دیاستاز (سیناپتاز) و آلدئید بنزوئیک وجود دارد و از میوه‌های آن روغن بادام تهیه می‌شود. مصرف آن بدون فراوری معمول نبوده و خوردن آن به دلیل وجود آمیگدالین

خطرناک است. هسته آن دارای طعم تلخ بوده و بعد از شیرین کردن مصرف خوراکی دارد. از هسته‌های شیرین شده آن در تهیه تنقلات و شیرینی‌پزی استفاده می‌شود. از دم کرده پوست این درخت برای معالجه سرفه، برونشیت، ناراحتی‌های تنفسی، ورم سینه و ریه استفاده می‌شود. دم کرده برگ این گیاه مسکن درد است. از روغن آن برای درمان میگرن، سردرد، سیاه سرفه، رماتیسم درد، ناراحتی‌های قلبی و تنگی نفس استفاده می‌شود. همچنین، استفاده از روغن آن بر روی پوست در از بین بردن لکه‌ها و چین و چروک پوستی و درمان ترک پوستی ناشی از سرما کاربرد دارد.

صمغی که از این درخت استخراج می‌شود در رنگ‌های قرمز، زرد و نارنجی مشاهده می‌شود. از این صمغ در صنایع داروسازی برای تحریک اشتها، خرد کردن سنگ مثانه و درمان دندان درد استفاده می‌شود. همچنین این صمغ در صنعت نساجی برای آهار پارچه، در صنایع آرایشی و غذایی به عنوان عامل امولسیون کننده و سوسپانسیون کننده و در صنایع کاغذ سازی، تولید چسب، لیتوگرافی و جوهر سازی نیز کاربرد دارد (تابتی، ۱۳۸۲ و پویان، ۱۳۸۷).

## ۴۴ تنش خشکی

گیاهان حدود ۴۰۰ میلیون سال است که از زمان ترک دریاها و سکنی گزیدن در خشکی‌های کره زمین همواره با تنش رطوبتی مواجه هستند. هنگامی که تنش خشکی روی می‌دهد، گیاهان همیشه مجبور بوده‌اند که آن را تحمل نموده یا چرخه زندگی‌شان را جهت دوری جستن از آن تنظیم نمایند. لذا در تکامل گیاهان خشکی‌زی، نیاز آن‌ها به جستجو، جذب، انتقال و نگهداری آب به عنوان یک نیروی عمده محرک عمل کرده است. مکانیسم‌های متضمن مقاومت به خشکی که در چنین دوره زمانی طولانی به وجود آمده‌اند، فراوان بوده و هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند (بلوم و سولیوان، ۱۹۸۶). مکانیسم‌های متفاوتی برای مقاومت به خشکی در گیاهان وجود دارد. این مکانیسم‌ها به ۳ گروه تقسیم می‌شوند:

### ۱. فرار از خشکی

ارقام حساس به خشکی در محیط‌های خشک از دوره خشکی فرار می‌کنند. دوره رشدی کوتاه و بلوغ زودرس از ویژگی‌های مهم مکانیسم فرار از خشکی است (بلوم، ۱۹۹۸). گیاهانی که از مکانیسم فرار برای مقابله با خشکی استفاده می‌کنند قدرت و توانایی بالایی برای تکمیل دوره زندگی از نظر فیزیولوژیکی قبل از فرا رسیدن خشکی پایان فصل دارند. استراتژی فرار در واقع وارد شدن موفقیت‌آمیز گیاه در فاز زایشی و تولید محصول قابل قبول، قبل از سایر ژنوتیپ‌ها می‌باشد. به طور طبیعی، تکمیل سیکل زندگی گیاه در مدت کوتاه با سرعت بالای رشد و قدرت تبادل بیشتر هوا با گیاه و استفاده ماکزیمم از منابع موجود مثل رطوبت خاک، مواد غذایی و حداکثر تثبیت کربن در گیاه همراه است. قابلیت و توانایی انتقال مواد ذخیره‌ای برای تولید میوه و داشتن عملکرد قابل قبول گیاه را قادر می‌سازد تا به استرس خشکی متحمل شود. جالب این‌جاست که هنگام استرس خشکی قدرت انتقال این مواد در گیاه افزایش می‌یابد (چاوز و همکاران، ۲۰۰۳).

### ۲. اجتناب از پسابدگی

قابلیت گیاه از نظر نگهداری بیلان مناسب آب و آماس، حتی در شرایط بروز تنش را، اجتناب از پسابدگی یا اجتناب از تنش خشکی می‌نامند (صباغ پور، ۱۳۸۵). تمام مکانیسم‌هایی که گیاه را قادر

می‌سازند صرف‌نظر از خشکی هوا و خاک مقدار مناسبی آب در بافت‌های خود داشته باشد، پسابیدگی را به تأخیر می‌اندازند. این امر از طریق افزایش جذب آب از خاک، کاهش تلفات آب (افزایش زودهنگام و مؤثر مقاومت در برابر انتشار و کاهش سطح تعرق‌کننده)، توانایی زیاد در انتقال و هدایت آب و ذخیره‌سازی آب حاصل می‌شود. این مکانیسم‌های اجتناب از پسابیدگی در مورفولوژی گیاه منعکس می‌شوند (جانگ و لارسون، ۱۹۷۲). در این مکانیسم گیاه مقدار زیادی آب را در بافت‌هایش نگه می‌دارد و وقتی در معرض تنش قرار گیرد، می‌تواند از آن اجتناب کند. مکانیسم اجتناب از پسابیدگی بر پایه حساسیت روزنه‌ها و کاهش تبخیر و تعرق استوار است که موجب بالا رفتن عملکرد می‌شود. (مهلاشمی و همکاران، ۱۹۸۳)

### ۳. تحمل پسابیدگی

توانایی سلول به ادامه سوخت و ساز در سطح پتانسیل آبی کم، تحمل به پسابیدگی خوانده می‌شود. تحمل نسبت به پسابیدگی یک توانایی خاص گونه‌ای است که در آن پروتوپلاسم می‌تواند تلفات شدید آب را تحمل کند. در واقع تحمل به پسابیدگی، آخرین خط دفاعی یک بوته بر ضد کمبود آب می‌باشد، به عبارت دیگر گیاه ممکن است با وجود رطوبت داخلی کم زنده بماند، این مکانیسم مقاومت به خشکی را تحمل می‌نامند و گیاهی که دارای این مکانیسم باشد، قادر است که با تأمین رطوبت، مجدداً بهبود یافته و رشد کند (سرمدنیا و کوچکی، ۱۳۶۶).

هنگامی که گیاه واقعاً در معرض پتانسیل آب کم قرار گیرد، می‌تواند از طریق تخفیف تنش‌های واقعی، خشکی را تحمل نماید. گیاه برای کاهش اثرات تنش می‌تواند با سازگاری نسبت به خشکی، پتانسیل آب خود را علی‌رغم شرایط خشک، در سطح بالایی نگه دارد. بنابراین قادر به حفظ آماس سلولی و رشد بوده و از ایجاد تنش ثانویه و صدمات مستقیم و غیرمستقیم متابولیکی ناشی از پسابیدگی جلوگیری می‌کند. ساده‌ترین روش جلوگیری از صدمه حاصل از خشکی، مقاومت نسبت به پسابیدگی است. این مقاومت ترجیحاً باید به میزانی باشد که آماس سلولی را حفظ و حداقل از تخریب سلول در کاهش آماس جلوگیری نماید. فشار اسمزی داخلی زیاد که در اثر تجمع مقادیر کافی املاح ایجاد می‌شود، به همراه سازگاری مورفولوژیکی در اجتناب از اثرات خطرناک آب کشیدگی داخلی مؤثر است. ظاهراً این امر باعث می‌شود که پلاسما سلول‌ها به تنهایی خشکی بیشتری را تحمل نمایند. این سلول‌ها می‌توانند آماس خود را حفظ نموده و تحت تنش خشکی نیز به رشد خود ادامه دهند (صباغ پور، ۱۳۸۵).

در بسیاری از موارد علت اصلی سازگاری برگ به شرایط خشک، به لحاظ ضخیم شدن دیواره سلولی می‌باشد که از پژمردگی برگ یا تخریب جلوگیری می‌کند. تحمل به پسابیدگی به توانایی سلول در نگهداری غشاء سلول در شرایط نرمال و جلوگیری از تغییر ماهیت پروتئین بستگی دارد. مواد محلول از جمله قندها، اسیدهای آمینه و ترکیبات آمونیم موجب حفظ غشاء و آنزیم‌ها از خسارت پسابیدگی می‌شوند (گاف، ۱۹۸۰). گیاهان در مقابل تنش‌های مختلف از جمله خشکی، عکس‌العمل‌هایی خواهند داشت که باعث سازگاری این ارقام به تنش خشکی می‌شود. تنش خشکی موجب ایجاد پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه خواهد شد. این پاسخ‌ها به دو گروه کوتاه مدت و بلند مدت تقسیم می‌شوند.

در پاسخ کوتاه مدت سیگنال‌هایی از ریشه به برگ و درون سلول‌ها فرستاده می‌شود و موجب بیان ژن‌های پاسخ دهنده به شرایط تنش می‌شود. در برگ‌ها سیگنال‌ها از ریشه دریافت می‌شوند، روزنه‌ها بسته شده و آسیمیلاسیون کربن کاهش می‌یابد. همچنین استرس‌های مختلف از طریق برگ نیز احساس می‌شوند

و ژن‌های پاسخ دهنده بیان می‌شوند. مریستم مرکزی نیز سیگنال‌های ریشه را دریافت و شناسایی می‌کند و ژن‌های پاسخ دهنده در آن بیان و از رشد جلوگیری می‌شود. در ساقه علاوه بر این که سیگنال‌ها از ریشه به سمت برگ انتقال داده می‌شوند، تغییر در پتانسیل اسمزی درون آوندها ایجاد می‌شود. در ریشه علاوه بر فرستادن سیگنال توسط سلول‌ها ژن‌های پاسخ دهنده فعال شده و تنظیم اسمزی در گیاه انجام می‌شود (شینوزاکی و شینوزاکی، ۱۹۹۹).

در پاسخ بلند مدت زمانی که استرس آهسته ولی طولانی است، رشد اندام هوایی کم می‌شود، سطح تبخیر و تعرق کاهش پیدا می‌کند، ژن‌های پاسخ دهنده فعال می‌شوند و آسیمیلاسیون متابولیک‌ها و تنظیم اسمزی در اندام هوایی انجام می‌شود. در ریشه‌ها افزایش حجم پدید می‌آید و نسبت حجم ریشه به اندام هوایی افزایش می‌یابد. سطح جذب ریشه افزایش پیدا می‌کند و آماس سلول‌های ریشه حفظ می‌گردد (سرمدنیا و کوچکی، ۱۳۶۹).

گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی مختلف از جمله خشکی، عکس‌العمل نشان می‌دهند تا قادر به بقا و ادامه حیات شوند. در واقع سلول‌ها به محض دریافت سیگنال‌های تنش، سلسله واکنش‌های دفاعی را آغاز می‌کنند. کم شدن پتانسیل آب بافتی، سبب کاهش رشد سلولی، سنتز پروتئین‌ها و کاهش تقسیم سلولی می‌شود. غلظت آنزیم‌های هیدرولیز کننده افزایش یافته و پلیمرهای ذخیره‌ای قندی را به واحدهای کوچکتر می‌شکنند تا پتانسیل اسمزی را کاهش و پتانسیل فشاری را افزایش دهند؛ اما با ادامه تنش، هورمون اسید آبسزیک (ABA) تولید، روزه‌ها بسته، جذب  $CO_2$  نقصان و فتوسنتز کاهش می‌یابد و به دنبال آن و با شدت یافتن تنش در مراحل بعدی منجر به سنتز اسیدآمینو پرولین می‌شود. به‌طور کلی تنش خشکی موجب ایجاد پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در گیاه خواهد شد (شینوزاکی و شینوزاکی، ۱۹۹۹).

هر چند گیاهان به علائم محیطی مختلف، به روش‌های متفاوتی پاسخ می‌دهند، اما به‌طور کلی فرایندهای متوالی مشترکی در تمامی آن‌ها وجود دارد. این فرایندها که طی سه مرحله صورت می‌گیرند عبارت‌اند از:

۱. دریافت علائم محیطی (بیوفیزیکی یا یونی) به وسیله گیرنده‌های مخصوص یا سیستم‌های حس کننده علامت.

۲. انتقال علائم به وسیله یک زنجیره فرایندهایی که یا مستقیم بر روی متابولیسم اثر می‌کنند و یا به وسیله تغییر بروز ژن عمل می‌کنند.

۳. ایجاد یک پاسخ فیزیولوژیکی که موجب می‌شود فنوتیپ برای محیط موجود مناسب‌تر شود (بسرا و بسرا، ۱۹۹۷)

پژوهشگران بر این فرض هستند که شناسایی ژن‌هایی که در شرایط تنش بیان می‌شوند به روشن شدن پدیده‌های متابولیک منجر می‌شود که گیاهان را از اثرات خشکی محافظت می‌کنند. روش‌های جداسازی cDNA مختلف برای تشخیص ژن‌هایی که در خلال دوره کم آبی تنظیم می‌شوند، استفاده می‌شود. این جداسازی‌ها پژوهشگران را قادر می‌سازند که بسیاری از ژن‌ها را تشخیص داده و جدا سازند. پژوهش‌هایی برای تعیین این‌که چگونه پروتئین‌هایی که توسط این ژن‌ها کد می‌شوند در خلال تنش عمل می‌کنند، در حال انجام است.

ژن‌های مختلف القایی در تنش خشکی شناسایی شده‌اند و چگونگی عمل آن‌ها از طریق شناسایی توالی‌ها و همولوژی آن با پروتئین‌های شناخته شده، قابل پیش‌بینی است. در پاسخ به تنش سرما، شوری و خشکی

برخی مکانیسم‌های مشترک وجود دارد. ژن‌هایی که در طی تنش خشکی تحریک می‌شوند، نه تنها مسئول حفاظت سلول‌ها از کمبود آب هستند (به وسیله تولید پروتئین‌های مهم متابولیکی) بلکه در نقش تنظیم‌کننده برای انتقال سیگنال در تنش خشکی نیز مهم هستند. این ژن‌ها در دو گروه طبقه‌بندی می‌شوند. گروه اول (Functional proteins) شامل پروتئین‌هایی هستند که احتمالاً در تحمل به تنش خشکی نقش دارند. مثل محافظ‌ها، پروتئین‌های ضد یخ‌زدگی، پروتئین‌های متصل شونده به mRNA، آنزیم‌های کلیدی برای بیوسنتز اسمولیت‌ها، پروتئین‌های تنظیم‌کننده فعالیت کانال‌های آب، انتقال دهنده‌های پرولین و قند، آنزیم‌های سم زدایی و انواع پروتئازها. گروه دوم پروتئین‌ها که به عنوان پروتئین‌های تنظیم‌کننده (Regulatory proteins) شناخته می‌شوند، در تنظیم سیگنال‌های انتقال دهنده و بیان ژن‌های پاسخ دهنده به تنش نقش دارند. پروتئین‌های کیناز، فاکتورهای انتقال دهنده و آنزیم‌هایی که در متابولیسم فسفولیپیدها نقش دارند جزء این گروه هستند (میری، ۱۳۸۴).

به‌طور کلی هورمون‌ها نقش مهمی در تعیین پاسخ رشد گیاه در برابر تغییرات محیطی دارند. همچنین در تنظیم رشد ساقه و ریشه در شرایط خشکی اهمیت ویژه‌ای دارند. به عنوان مثال در مواجهه با تنش‌های مختلف از جمله تنش خشکی یا غرقابی میزان هورمون اتیلن در گیاه افزایش یافته و موجب کاهش رشد و ریزش برگ‌ها و میوه‌ها می‌گردد و امکان سازگاری گیاه با شرایط خشکی را فراهم می‌کند. اما در این زمینه هورمون آبسزیک اسید (ABA) مهمترین نقش را در جلوگیری از رشد شاخساره و حفظ رشد ریشه در پتانسیل پایین آب خاک دارا می‌باشد (بلوم . همکاران، ۱۹۸۹).

بسیاری از تولیدات ژنی که در واکنش به تنش رطوبت القا می‌شوند، در سطح نسخه‌برداری تنظیم می‌گردند. بسیاری از ژن‌های القا شده توسط تنش به وسیله ABA تنظیم می‌شوند، که یک هورمون گیاهی است که در پاسخ به کم‌آبی و دمای پایین افزایش می‌یابد. ABA در بروز چندین واکنش به تنش آبی نقش دارد، که مهمترین آن‌ها بسته شدن روزنه و القای بیان ژنی می‌باشد. برای روشن ساختن این‌که گیاهانی مانند آرابیدوپسیس، ذرت و سیب‌زمینی برای بیان بسیاری از ژن‌های القا شده تحت تنش کم‌آبی نیاز به افزایش غلظت ABA دارند، از موتانت‌های بیوسنتز ABA استفاده شده است.

مشخص شده که تعدادی از ژن‌هایی که در بیان ژن‌های القا شده توسط ABA شرکت دارند، در وقایع فسفوریلاسیون و دفسفوریلاسیون مشمول در انتقال سیگنال‌های ABA شرکت دارند. ژن‌های ABI1 و ABI2 که در موتانت‌های غیرحساس ABA در آرابیدوپسیس مشاهده شده، به نظر می‌رسد که پروتئین فسفاتازها را کد می‌کنند. ABI1 در بسته شدن روزنه و القا ژن‌های خاص نقش دارد. همین‌طور در تنظیم بیان ژن مسئول ABA که یک تریوزین کیناز است نیز فعال است. به علاوه ABA و شرایط آزمایشی که باعث کمبود آب سلولی می‌شود دیگر انواع کینازها را القا می‌کنند.

به دلیل اینکه ABA تمام ژن‌هایی که توسط تنش القا می‌شوند را تنظیم نمی‌کند، دیگر سیگنال‌ها نیز بایستی در واکنش به تنش کم‌آبی نقش داشته باشند. به‌علاوه چندین ژن گفته شده، بسیاری از ژن‌ها که توسط تنش رطوبت القا می‌شوند، برای بیان خود نیاز به ABA ندارند و احتمالاً توسط مسیرهای سیگنالی مجزا یا برهم‌کنش آن‌ها کنترل می‌شوند (میری، ۱۳۸۴).

مطالعه مکانیسم‌های مولکولی در پاسخ به تنش‌های مختلف و تحمل گیاه به این تنش‌ها چند سالی است که آغاز شده است. تعداد زیادی ژن که نقش تنظیمی در تنش خشکی داشته‌اند، در بسیاری از گیاهان

شناسایی شده‌اند. مطالعات نشان می‌دهد که از زمان دریافت تنش تا بیان ژن در گیاه مسیرهای مختلفی برای انتقال سیگنال وجود دارد. به نظر می‌رسد که حداقل چهار فاکتور رونویسی در تنظیم بیان ژن‌های تحریک شونده (القایی) از خشکی وجود دارد. دو تا از این فاکتورها پاسخ دهنده به ABA و دو تای دیگر از این فاکتورها مستقل از ABA است. برخی از ژن‌ها به سرعت تحت تنش تحریک می‌شوند (۱۰ دقیقه) با این وجود برخی ژن‌های دیگر به کندی و در طی چند ساعت تحریک می‌شوند که موجب تجمع ABA (در داخل گیاه) می‌شود. تعداد زیادی ژن برای فاکتورهای مختلف رونویسی به وسیله تنش خشکی تحریک شده‌اند که احتمالاً در تنظیم بیان آهسته ژن‌ها که وظیفه آن‌ها ایجاد تحمل و یا سازگاری به تنش می‌باشد، نقش دارند (رای و تاکاب، ۲۰۰۶).

استفاده از روش‌های بیوتکنولوژی و دستکاری ژن‌های کنترل کننده صفات مرتبط با تحمل به خشکی می‌تواند در اصلاح ارقام متحمل به خشکی مؤثر باشد. روش‌های بیوتکنولوژی به همراه روش‌های کلاسیک در برنامه‌های اصلاحی موجب پیشرفت سریع‌تر و مؤثرتر در معرفی ارقام متحمل به خشکی شده است و به فهم کنترل ژنتیکی این صفات پیچیده کمک می‌کند. مارکرهای مولکولی امکان ردیابی و شناسایی مکان ژنتیکی ژن‌های کنترل کننده مقاومت را بدون اندازه‌گیری فنوتیپی فراهم می‌کنند. بنابراین نیازی به آزمایشات مزرعه‌ای نیست و روند اصلاح نباتات سرعت بیشتری خواهد داشت. با این وجود، هرم‌سازی ژن‌ها و یا وارد کردن ژن به گونه‌های دیگر نیز از طریق روش‌های مولکولی و اطلاعات آن‌ها امکان‌پذیر است. مارکرهای مولکولی یک استراتژی به نام انتخاب بر اساس مارکرها را ارائه می‌کنند و استراتژی دیگر مولکولی کلون کردن ژن‌ها و تکنولوژی انتقال ژن توسط مهندسی ژنتیک است. با استفاده از تکنیک انتقال ژن (ژن‌های تحریک شونده در هنگام تنش) توانسته‌اند تحمل به تنش را در گیاهان ایجاد کنند (دپا و کانادو، ۲۰۰۱ و صباغ‌پور، ۱۳۸۵).

#### ۴ ۴ تکنیک cDNA-AFLP

پاسخ‌های بیولوژیکی و برنامه‌ریزی‌های رشدی توسط تنظیم دقیق بروز ژن‌ها کنترل می‌شوند. به منظور رسیدن به بینشی کامل در مورد این فرایندها، لازم است که الگوی بروز ژن‌ها مطالعه شود. بررسی الگوی بروز ژن‌ها ابزار مهمی برای شناخت پاسخ‌های گیاه به شرایط محیطی می‌باشد. امروزه روش‌های مولکولی متفاوتی برای شناسایی و کلون ژن‌های با بروز متفاوت در دسترس می‌باشد. ژنومیکس کارکردی (Functional genomic) به عنوان ابزاری برای تشخیص و خالص‌سازی ژن‌های درگیر در تحمل تنش‌های غیر زیستی به کار می‌رود (لنگراید و همکاران، ۲۰۰۶). این ابزار شامل روش‌های مولکولی متفاوتی برای شناسایی و کلون ژن‌های بروز یافته می‌باشد. از بین روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون نوکلئیک اسیدها، تکنولوژی میکروآرای (microarray) نقش زیادی را در ژنتیک مولکولی خصوصاً واکنش گیاهان به تنش ایفا کرده است (چائو و همکاران، ۲۰۰۵؛ گولایک و همکاران، ۲۰۰۵ و کیم و ون‌آرنیم، ۲۰۰۶). تکنولوژی میکروآرای، نیاز به هزینه زیادی دارد و به دلیل حساسیت کم آن در آشکارسازی رونوشت‌های تظاهر یافته کمیاب و سختی تشخیص رونوشت‌ها از ژن‌های همولوگ، سودمندی کمی دارد (سوپرانو و همکاران، ۲۰۰۷).

روش‌هایی که به منظور رسیدن به تکثیر انتخابی cDNA، بر پایه PCR شکل گرفته‌اند شامل روش‌های RNA-fingerprinting by arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) معرفی شده توسط ولش و همکاران

(۱۹۹۲) و differential display (DD/RT-PCR) معرفی شده توسط لیانگ و پاردی (۱۹۹۲) می‌باشند. تمامی این روش‌ها به انگشت‌نگاری از RNA دلالت دارند. استفاده از این روش‌ها مشکلاتی از قبیل تکرارپذیری، سختی نمایش پیام‌های بسیار کمیاب و تولید نسخه‌های کاذب را محدود می‌کنند (بور و همکاران، ۱۹۹۴). چنین مشکلاتی اصولاً ناشی از استفاده از الیگونوکلوئوتیدهای تصادفی به عنوان پرایمر در واکنش PCR و دماهای اتصال نسبتاً پایین لازم برای تولید فراورده‌های تکثیر می‌باشد. تا به امروز تلاش‌های زیادی به منظور تغییرات متنوعی از قبیل بهبود در طراحی پرایمر (زائو و همکاران، ۱۹۹۵ و دیاچنکو و همکاران، ۱۹۹۶) و ساخت روش‌های متنوع با استفاده از انگشت‌نگاری DNA (ایوانوا و بلیاوسکی، ۱۹۹۵ و کاتو، ۱۹۹۶) صورت گرفته است، اما به هر حال همه این روش‌ها هنوز هم مشکلاتی از قبیل تکرارپذیری و عدم اطمینان در تشخیص قطعات خاص را دارا می‌باشد (باچیم و همکاران، ۱۹۹۸). روش cDNA-AFLP (باچیم و همکاران، ۱۹۹۶) تا حد زیادی بر این مشکلات غلبه کرده و امکان تشخیص باندها را به صورت سریع و ساده فراهم می‌کند. علاوه بر این، در این روش امکان غربال‌گری سیستماتیک همه رونوشت‌ها در یک سیستم بیولوژیکی با استفاده از مقدار کم مواد در شروع واکنش امکان‌پذیر است (باچیم و همکاران، ۱۹۹۸). روش cDNA-AFLP، یک روش تکرارپذیر مناسب برای آشکارسازی رونوشت‌های با تظاهر متمایز است و شامل مراحل زیر می‌باشد:

الف ساختن cDNA دو رشته‌ای با استفاده از الیگونوکلوئوتید پلی dT

ب ایجاد الگوی اولیه از طریق برش با دو آنزیم محدود کننده و اتصال قلاب‌ها به انتهای آن‌ها

ج تکثیر قبل از مرحله تکثیر اصلی به کمک آغازگرهایی که بر اساس نواحی قلاب (لنجر) طراحی شده‌اند.

د تکثیر اصلی با آغازگرهایی که یک یا دو باز اختصاصی دارند. یکی از این آغازگرها نشاندار است تا محصول قابل رؤیت باشد.

این روش به دلیل تکرارپذیری و حساسیت و از طرفی به علت تطابق خوب با روش لکه‌گذاری نورترن، به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). فیلیپس و واسیل (۲۰۰۱) بیان نمودند که روش cDNA-AFLP یک روش با کاربرد فراوان در انگشت‌نگاری ژنتیکی می‌باشد، زیرا روشی ساده، دارای بازده بالا و به اطلاعات قبلی از ژنوم گونه مورد مطالعه نیازی ندارد.

از بین روش‌های بررسی بروز ژنوم به صورت گسترده که بر پایه PCR و جداسازی بر روی ژل استواراند، روش چند شکلی طولی قطعات تکثیر یافته یا cDNA-AFLP بهترین روش می‌باشد. استفاده از روش cDNA-AFLP مشکلاتی را که در روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون وجود داشت، حل کرد. این روش نیاز به اطلاعات زیادی از ژنوم مورد مطالعه ندارد و تکرارپذیری و حساسیت بالاتری نسبت به تکنولوژی میکروآرای دارد (ریجانز و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج cDNA-AFLP به خوبی با نتایج نورترن بلات (Northern blot)، PCR در زمان واقعی کمی (Q-PCR) و آنالیزهای میکروآرای همبستگی دارد (دانسون و همکاران، ۲۰۰۲؛ آرووا و همکاران، ۲۰۰۳ و برین و همکاران، ۲۰۰۳). روش cDNA-AFLP، روشی در دسترس و آسان برای بررسی الگوی بیان ژن‌ها، خصوصاً برای موجوداتی با اطلاعات ژنومی کم می‌باشد (ویلستک و همکاران، ۲۰۰۶).

اختصاصی بودن و حساسیت بالای روش cDNA-AFLP اجازه آشکارسازی ژن‌هایی که حتی در سطح کم بروز می‌نمایند و شناسایی توالی‌های همولوگ را به ما می‌دهد (برین و همکاران، ۲۰۰۳). این روش به



صورت گسترده‌ای به منظور شناسایی ژن‌هایی که بروز آن‌ها در حالت کنترل و تنش متفاوت می‌باشد، استفاده می‌شود. حساسیت بالای این روش، امکان شناسایی رونوشت‌های کمیاب را امکان‌پذیر می‌کند (فکومرا و همکاران، ۲۰۰۳).

باند‌های حاضر در سطح ژل AFLP مشتق شده رونوشت شده (TDFs) نامیده می‌گردند. معمولاً TDFهای منحصر به فرد شناسایی شده در ژل اکریل‌آمید، از ژل جدا و توسط واکنش PCR تکثیر می‌گردند. این قطعات در ناقلین مناسب کلون و توالی‌یابی می‌گردند (سگال و همکاران، ۲۰۰۸).

#### ۴ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (Real-Time PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (Real-Time PCR) آخرین PCR اصلاح شده می‌باشد که در سال ۱۹۹۲ توسط هیگوچی و همکارانش ایجاد شد. این روش کیفیت دقیق اسیدهای نوکلئیک اختصاصی در یک مخلوط پیچیده را میسر ساخته، که در صورتیکه مواد اولیه در شروع واکنش حداقل باشند نیز صادق است. این تکنولوژی با استفاده از نور فلورسنت بر روی توالی هدف تکثیر یافته عمل می‌نماید. سرعت رسیدن به سطح آستانه به مقدار مواد حاضر در شروع واکنش بستگی دارد (فراگا و همکاران، ۲۰۰۸). اساس تمامی سیستم‌های PCR در زمان واقعی بر آشکارسازی و تعیین کمیت با استفاده از نشانگرهای فلورسنت استوار می‌باشد. در واقع میزان افزایش سیگنال‌های فلورسنت با مقدار محصول PCR در یک واکنش، در تناسب مستقیم است (آلمیدا و همکاران، ۲۰۰۴).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی روشی قدرتمند با حساسیت بالا برای تعیین کیفیت اسیدهای نوکلئیک می‌باشد. این روش دارای پتانسیل بالایی برای آنالیز بیان ژن‌ها در تحقیقات است. PCR در زمان واقعی نتایج را سریع، صحیح و دقیق نشان می‌دهد. همچنین در این روش جمع‌آوری اطلاعات همان‌طور که واکنش در حال انجام است، صورت می‌گیرد که بسیار صحیح است. PCR در زمان واقعی برای ارزیابی کمی DNA و RNA به متدهای آزمایشگاهی بعد از واکنش نیاز ندارد (بوستین و همکاران، ۲۰۰۵).

در واقع می‌توان گفت روش PCR در زمان واقعی، روشی جدید، بسیار دقیق و حساس است و میزان افزایش محصول را طی فاز نمایی (Exponential) واکنش اندازه‌گیری می‌کند. این تکنیک بسیار سریع‌تر از روش‌های معمول است و اطلاعات را با همان سرعتی که پروسه‌های تکثیر در حال انجام است، تهیه می‌کند (زیرا فقط در این فاز است که تکثیر به شدت در حال انجام است). و هم‌زمان می‌توان نتیجه را روی یک گراف مشاهده نمود و نیازی به استفاده از ژل آگارز نیست (دوراک، ۲۰۰۶).

یکی از نکات قابل توجه در روش PCR در زمان واقعی تکامل کارایی و آنالیزهای آماری و ریاضی داده‌های به دست آمده از این روش می‌باشد. بدین منظور مولر و همکاران (۲۰۰۲) مطالعه خود را بر ارزیابی ریاضی داده‌های به دست آمده از روش PCR در زمان واقعی، محاسبه نتایج نهایی و آنالیزهای آماری متمرکز نمودند.

روش PCR در زمان واقعی تداومی از مجموعه سیگنال‌های فلورسنت در یک یا تعداد بیشتری واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز در بیش از یک سیکل می‌باشد. چندین راه برای تحقیق در مورد تغییرات یک سلول در حین فرآیند بیولوژیکی وجود دارد. یکی از این روش‌ها جستجوی تغییرات سطوح رونوشت سلولی است، که ممکن است در پروتئین‌های مرتبط با آن تغییر نشان دهد. در این مورد از روش واکنش زنجیره‌ای

پلی‌مراز در زمان واقعی کمی (Quantitative Real-Time PCR) یا Q-RT PCR برای ایجاد اطلاعات مورد نیاز استفاده می‌گردد. Q-RT PCR تبدیلی از سیگنال‌های فلورسنت از هر واکنش به ارزش عددی برای هر نمونه و یک روش برای بیان ژن به صورت کمی است. کمی بودن سطوح بیان ژن، موارد ارزشمندی را در مورد کاربرد ژن ابلاغ می‌کند، سطوح بیان یک ژن منفرد را در حالت بیولوژیکی تعریف شده آشکار می‌سازد و تغییرات در سطوح بیان ژن در پاسخ به محرک بیولوژیکی خاصی را نمایان می‌سازد. همچنین در تعیین فراوانی ویروس‌ها، آشکارسازی پاتوژن‌ها، تعیین ژنوتیپ‌ها، ارزیابی کمی بیان ژن‌ها، کنترل کیفی مواد و تأثیر معالجه‌ای داروها کاربرد دارد (فراگا و همکاران، ۲۰۰۸). Q-RT PCR بسیار حساس‌تر و سریع‌تر از PCR معمولی بوده و همزمان با طی شدن مراحل تکثیر اطلاعات را نمایش می‌دهد (مولر و همکاران، ۲۰۰۲).

دو اصل مهم که در بدست آوردن نتایج PCR در زمان واقعی مؤثراند عبارتند از: فعالیت اگزونوکلازای Taq polymerase که در جهت ۳' ۵' صورت می‌گیرد و ساختمان کاوشگرهای الیگونوکلوئیدی دو برجسیبی. امروزه از روش‌های متفاوتی برای آشکارسازی در این روش استفاده می‌شود که عبارتند از: Taq SYBR Green I و Hybridization Probe، Molecular Beacon، Scorpion، Hydrolysis or Man Probe Fluorescence که تمامی این روش‌ها بر اساس آشکارسازی نور فلورسنت و تشدید آن از طریق انتقال انرژی (Resonance Energy Transfer) یا FRET استوار می‌باشند. افزایش در میزان نور فلورسنت به طور مستقیم به افزایش در تکثیر و تولید طی واکنش PCR بستگی دارد (آلمیدا و همکاران، ۲۰۰۴). مولکول‌های فلورسنت نور را به صورت فوتون جذب می‌کنند که با یک طول موج باریک از نور همراه است. طول موجی که در آن رنگ حداکثر نور را جذب می‌کند طول موج تحریک برای آن مولکول نامیده می‌شود. اساس کار به این شکل است که هنگامی که یک رنگ دارای انرژی بالا در مجاورت با یک رنگ با انرژی پایین قرار می‌گیرد، امکان انتقال انرژی از بالا به پایین وجود دارد. Taq DNA Polymerase دارای فعالیت اگزونوکلازای ۳' ۵' می‌باشد که این مورد به همراه FRET (تشدید کننده فلورسنت از طریق انتقال انرژی) امکان آشکار کردن فرآورده‌های تکثیر PCR در زمان واقعی را فراهم می‌سازند. فعالیت اگزونوکلازای ۳' ۵' آنزیم، برای حذف موانع پایین دست ناحیه تکثیر شونده در حال رشد عمل می‌نماید (فراگا و همکاران، ۲۰۰۸).

FRET به دو مولکول احتیاج دارد که بتوانند با یک دیگر به طور متقابل اثر کنند، که حداقل یکی از آن‌ها باید قابلیت فلورسنتی داشته باشد. در ترکیب فلورسنت، یک مولکول بخشنده و مولکول دوم پذیرنده نام دارد. در حین FRET رنگ فلورسنت بخشنده با یک منبع نوری اضافه نزدیک طول موج تحریک بهینه برانگیخته می‌گردد و سپس نور ساطع در یک طول موج بلندتر تغییر مکان می‌یابد. نور ساطع شده مولکول پذیرنده را برانگیخته می‌کند. مولکول پذیرنده انرژی ساطع شده را از رنگ بخشنده جذب می‌کند که به طور مؤثری سیگنال بخشنده را دفع می‌کند. طول موج ساطع شده توسط رنگ بخشنده، باید نزدیک جذب ماکزیمم مولکول پذیرنده باشد. مولکول پذیرنده می‌تواند ساطع کننده نور باشد یا نباشد. اگر نور توسط مولکول پذیرنده ساطع گردد، بیشتر حرکت می‌کند و طول موج بلندتری از آن توسط مولکول بخشنده ساطع می‌گردد. سیگنال پذیرنده توسط ابزار PCR در زمان واقعی آشکارسازی می‌گردد ولی به عنوان یک سیگنال گزارشگر توسط نرم افزار ضبط نمی‌شود. سه دسته از مولکول‌های فلورسنت در PCR در زمان واقعی وجود دارد. اولین مورد رنگ بخشنده می‌باشد و معمولاً به عنوان گزارشگر از آن نام می‌برند. سیگنال فلورسنت از گزارشگر یکی از مواردی است که در جریان آزمایش به صورت هشدار دهنده عمل می‌کند. دومین مولکول

پذیرنده یا خاموش کننده نام دارد و مسئول دفع ابتدائی سیگنال گزارشگر است. آخرین گروه نیز رنگ مرجع می باشد (دوراک، ۲۰۰۶). امروزه در ساده ترین و اقتصادی ترین حالت، یکی از نشانگرها یا گزارشگرهای مورد استفاده، مولکول کاوشگر SYBR Green I می باشد که به مولکول DNA دو رشته ای متصل می شود. SYBR Green I دارای رنگ فلورسنتی است که زمانی که به فرم آزادش در محیط وجود دارد این رنگ غیر قابل مشاهده می باشد، اما زمانی که با DNA دو رشته ای باند می دهد شروع به انتشار نور فلورسنت می کند. این رنگ از ساده ترین و اقتصادی ترین رنگ ها و دارای حساسیت بالا بوده، می تواند با هر جفت پرایمر و برای هر DNA الگو به کار رود و به عبارتی حالت میان جای رونده دارد. از مزایای این رنگ می توان ارزان بودن، استفاده آسان و حساسیت بالا را نام برد. از معایب استفاده از این رنگ نیز می توان به باند دادن با هر مولکول DNA دو رشته ای در مخلوط واکنش، مثل پرایمر دایمر و نیز سایر محصولات غیر اختصاصی واکنش اشاره کرد، که این امر منجر به برآورد بیش از حد غلظت محصول می شود. همچنین اختصاصی بودن این روش نیز کمتر است (فراگا و همکاران، ۲۰۰۸).

شدت تشعشع نور فلورسنت با سیکل های تکثیر رابطه مستقیم پیدا می کند. سه ترکیب اصلی در هر ابزار PCR در زمان واقعی وجود دارد: ۱. منبع نور که حدود رنگ های گزارشگر را تعیین می کند. ۲. سیستم آشکارسازی، که حدود طیفی و حساسیت هر آزمایش را تعیین می سازد. ۳. مکانیسم دماپای یا ترموسایکلینگ تعیین سرعت که در آن یک آزمایش می تواند انجام شود (آلمیدا و همکاران، ۲۰۰۴).

طراحی پرایمر بهینه برای تکثیر کارآمد توالی مطلوب، در واکنش PCR در زمان واقعی ضروری است. یک واکنش PCR در زمان واقعی موفق به توانایی تکثیر محصولات کوتاه وابسته است (کوچکتر از ۳۰۰ bp و به طور ایده آل ۴۰۰-۱۰۰ bp). رعایت چندین نکته باعث بهینه ساختن طراحی پرایمر می شود که شامل حذف جفت شدن پرایمرها براساس توالی مکمل بین پرایمرها یا پرایمر دایمر (primer dimer) و هماهنگی دمای اتصال محصول PCR می باشد. همچنین چندین نکته در رابطه با طراحی پرایمر مناسب برای واکنش PCR در زمان واقعی وجود دارد که به طور خلاصه ذکر می گردد: طول بین ۴۰۰-۱۰۰ جفت باز داشته باشد. مکان های پیوستن پرایمر نباید دارای ساختار ثانویه بزرگی باشد. جفت پرایمرها نباید مکمل خودشان یا همدیگر باشند. جفت های پرایمری باید دارای نسبت تقریباً مساوی از GC (بین ۴۰-۷۰ درصد) باشند و دمای اتصال مساوی داشته باشند. پس از طراحی و ساخت پرایمرها، دمای اتصال آن ها نیز باید بهینه گردد، که می تواند توسط آنالیز دمای گرادیانت (متغیر) آزمون گردد (مولر و همکاران، ۲۰۰۲).

غلظت پرایمرهای مورد استفاده نیز بسیار مهم است. افزایش غلظت پرایمر می تواند باعث افزایش آشکارسازی محصولات PCR گردد، ولی غلظت های پرایمر بسیار زیاد موجب ایجاد تولیدات غیر اختصاصی مثل پرایمر دایمر می گردد. پرایمرهای طراحی شده باید بین ۱۸ تا ۳۰ جفت باز طول داشته باشند و تا حد امکان انتهای ۳' آن فاقد باز تیمین باشد (زیرا موجب جفت شدن اشتباه می گردد). و ترجیحاً متشکل از بازهای گوانین و سیتوزین باشد تا کارایی ساخت پرایمر بالا رود. همچنین لازم است از تشکیل ساختار سنجاق سری بزرگ جلوگیری گردد (بوستین و همکاران، ۲۰۰۵).

در کلیه روشهای PCR در زمان واقعی برای محاسبه مقدار افزایش نور فلورسنت که نتیجه مستقیم تکثیر DNA است، از نرم افزارهای کامپیوتری استفاده می شود که بر مبنای فرمول زیر مقدار افزایش تابش فلورسنت محاسبه می شود:

- $R_n = R_n^+ - R_n^-$
- $R_n$  : میزان افزایش تابش فلورسنت در سیکل  $n$  ام.
- $R_n^+$ : میزان تابش نور فلورسنت در زمان مورد نظر.
- $R_n^-$ : انتشار نور فلورسنت در اولین مرحله واکنش.

نرم افزارهای کامپیوتری نقشه تکثیر را با استفاده از داده‌های انتشار فلورسنت که در طی واکنش PCR جمع‌آوری می‌شود، تهیه می‌کنند. مقدار  $R_n$  در واقع نشان دهنده تعداد سیکل‌های واکنش نیز می‌باشد. در طی سیکل‌های اولیه تکثیر، مقدار  $R_n$  از خط آستانه (Threshold Line) بیشتر نمی‌شود. بنابراین، میزان تابش فلورسنت دریافتی بسیار کم است. خط آستانه، سطح تشخیص یا نقطه‌ای است که در آن شدت فلورسنت یک واکنش بیشتر از زمینه می‌شود. خط آستانه در فاز نمایی تکثیر قرار می‌گیرد (مولر و همکاران، ۲۰۰۲).

در دهه گذشته واکنش PCR در زمان واقعی به‌طور وسیعی به عنوان ابزاری دقیق در تعیین کیفیت توالی‌های خاص کاربرد داشته است. امروزه برای تعیین فراوانی ویروس‌ها، ارزیابی کمی بیان ژن‌ها، تأثیر معالجه‌ای داروها، آشکارسازی پاتوژن‌ها و تعیین ژنوتیپ‌ها از روش PCR در زمان واقعی استفاده زیادی شده است. این روش در ژنوتیپ‌یابی، تعیین کیفیت در عوامل بیماری‌زایی و دست‌یابی به تعدادی از کپی ژن در بافت سرطانی به کار رفته است. با این وجود بیشترین استفاده از این تکنولوژی در مطالعه سطح بیان ژن به همراه استفاده از فرآیند رونویسی معکوس می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده که می‌توان با ترکیب دو روش (تحت عنوان *real-time RT PCR*) سطوح رونوشت RNA را به طور کیفی نیز اندازه‌گیری نمود (فراگا و همکاران، ۲۰۰۸).

#### ۴-۵- مروری بر بررسی‌های انجام شده

در زمینه پیشینه استفاده از روش *cDNA-AFLP* بر روی گونه‌های وحشی بادام منابع زیادی در دسترس نمی‌باشد. بنابراین سعی شده است که به نزدیکترین موارد در ارتباط با این موضوع اشاره گردد.

باچیم و همکاران (۱۹۹۸) به بررسی میان‌کنش بین پارامترهای مختلف در تکنیک *cDNA-AFLP* (چند شکلی طولی قطعات تکثیر شده) پرداختند. آن‌ها اثر تعداد چرخه‌های PCR و میزان رقیق بودن الگوها در قطعات به دست آمده از رونویسی (TDF) را بررسی کرده و استفاده از مهره‌های مغناطیسی برای سنتز *cDNA* و اثر غلظت  $MgCl_2$  را در طی تکثیر مورد آزمون قرار دادند. در نهایت آن‌ها موفق به کشف روشی از تکنیک *cDNA-AFLP* با استفاده از TDFهایی با ترکیب و اندازه متفاوت شدند. بدین ترتیب توانستند TDFهای مشابهی را از یک نسخه منفرد در سلول پیدا کنند. همچنین مشخص کردند که رابطه‌ای بین غلظت TDFهای کشف شده و اندازه قطعات وجود ندارد.

کامپالانس و همکاران (۲۰۰۰) به منظور شناسایی مکانیسم‌های مسئول تنش خشکی، با استفاده از روش *cDNA-AFLP* چندین ژن که در هنگام تنش خشکی در بادام (*Prunus amygdalus*) بروز می‌یافتند را بررسی نمودند. آن‌ها با استفاده از این تکنیک نسخه‌هایی را که در جنین‌های بالغ جمع شده بود، شناسایی و گیاهچه‌ها را در محیط *in vitro* تنش خشکی دادند و یا با آبسزیک اسید تیمار نمودند. نورترن معکوس