

بر همزدگی تفرق بر اثر جهش در ژن های خانواده VIN7 در آراییدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*)

بتول حسین پور^{۱*}، منصور امیدی^۱، بهمن یزدی صمدی^۱، زهرا خدارحم پور^۲ و رامین یادگاری^۳

۱- دانشجوی دکتری، استادا، استاد، اصلاح نباتات گرایش ژنتیک مولکولی و مهندسی

ژنتیک، گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر

۳- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشگاه آریزونا

* نویسنده مسئول مکاتبات، آدرس الکترونیک: bhosseinpour@ut.ac.ir

چکیده

یکی از روش های تنظیم بیان ژن ها تغییرات پس از ترجمه هیستون ها بوسیله هیستون استیلازاها و داستیلازاها می باشد. استیلاسیون باعث افزایش رونویسی و داستیلاسیون منجر به خاموشی ژن می شود. ثابت شده است که بازدارنده-پار *Sin3* در پستانداران که دارای دامین PAH2 می باشند در داستیلاسیون نقش دارند. در ژنوم آراییدوپسیس پیش بینی شده است که خانواده کوچک سه عضوی *VIN7* دارای دامین های مشابه PAH2 می باشند. بنابراین در این آزمایش با استفاده از ژنتیک مستقیم نحوه عمل این ژن ها تجزیه گردید به طوریکه فقط در ژنوتیپ *VIN7L2 (+/-)*; *VIN7L1 (-/-)*; *VIN7 (-/-)* حدود شش درصد عدم تشکیل بذر دیده شد. بررسی نتاج حاصل از تلاقی های متقابل با گیاه تیپ وحشی و خودگشتی این ژنوتیپ نشان داد که سلول های جنسی حاوی سه همدیف T-DNA می توانند بطور ناقص از طریق والد نر و ماده به نسل بعد منتقل شوند و هم چنین نسبت ۲ *VIN7 (-/-)*; *VIN7L1 (-/-)*; *VIN7L2 (+/+)* : *VIN7 (-/-)*; *VIN7L1 (-/-)*; *VIN7L2 (+/-)* در نتاج حاصل از خودگشتی *VIN7 (+/-)*; *VIN7L1 (-/-)*; *VIN7 (-/-)* بدست آمد. مطالعه الگوی بیان ژن با استفاده از ساختار های پروتئین - GFP نشان داد هر سه ژن در یاخته های اولیه تخمک و میکروسپورها بیان می شوند. ژن *VIN7* علاوه بر این دو اندام فقط در ناحیه طویل شونده ریشه علامت GFP را نشان داد. *VIN7L1* در گلبرگ ها، جنین ها و ناحیه طویل شونده ریشه و *V7L2* در تمام گیاه بیان می شوند. با توجه به شباهت الگوی بیان ژن ها و نبود یک گیاه موتانت خالص سه گانه، به نظر می رسد این ژن ها برای مراحل مختلف نموی مورد نیاز می باشند.

واژه های کلیدی

آراییدوپسیس،

VIN7،

استیلاسیون،

الگوی بیان

مقدمه

طی نمو موجودات زنده چند سلولی با فعال سازی یا خاموش سازی برنامه های رونویسی متفاوت و مشخص تمایز صورت می گیرد و وضعیت حاصل بطور پایدار طی تقسیمات سلولی بعدی باید حفظ شود. مدل دهی کروماتین نقش مهمی در تنظیم وضعیت کروماتین و حفظ آن ایفا می کند، فرایندی که توارث اپی ژنتیک نامیده می شود. چندین روش برای تغییر ساختار کروماتین وجود دارد.

در یکی از این روشها تغییرات پس از ترجمه روی پروتئین های هیستونی توسط هیستون استیلازها، داستیلازها و متیل ترانسفرازها صورت می گیرد و بدین طریق دامین های^۱ کروموزومی مشخص برای اتصال کمپلکس های پروتئینی متصل شونده به کروماتین مهیا می شوند. استیلاسیون اتصال بین هیستون و DNA را ضعیف کرده و با ممکن ساختن اتصال پروتئین های برومودامین باعث رونویسی می شوند (۱). برخلاف هیستون استیلازها که فعال کننده-یار^۲ های رونویسی هستند (۲)، بسیاری از بازدارنده-یار^۳ها فعالیت داستیلاسیون هیستون دارند (۱۷). کمپلکس کورپرسور Sin3 که حداقل از ده زیر واحد ساخته شده است یکی از مهمترین کمپلکس های بازدارنده-یار است که در سلول های پستانداران شناخته شده است و دارای اثرات منفی روی رونویسی ژن از طریق فعالیت آنزیم های هیستون داستیلاز می باشد (۷). کورپرسور Sin3 نقش دوگانه دارد: اول، بعنوان یک سکوی مولکولی برای جور شدن کمپلکس و دوم، بعنوان یک آداپتور ملکولی یا پلی بین هیستون داستیلازها و یک گروه بزرگ از فاکتورهای رونویسی متصل شونده به DNA و کروماتین عمل می نماید (۱۶). میان کنش ها بواسطه یک یا چند ناحیه از شش ناحیه موجود در Sin3 صورت می گیرد. این شش ناحیه در موجودات مختلف از مخمر تا انسان حفاظت شده است و شامل چهار کپی ناکامل PAH^۴ دامین

می باشد. کپی دوم به نام PAH2 جایگاهی برای میان کنش با چندین فاکتور از جمله اعضای خانواده Mad (۱۲) می باشد. در گیاهان نیز هیپراستیلایسیون با فعالیت ژن همبستگی دارد. هیپراستیلایسیون H3 و H4 در راه انداز ژن پلاستوسیائین^۵ نخودفرنگی به نام *PetE* باعث افزایش رونویسی *PetE* می شود (۴۳). ژنوم آراییدوپسیس حداقل ۱۲ هیستون استیلاز و ۱۷ هیستون داستیلاز کد می کند (۱۴). برای مثال GCN5 آراییدوپسیس فعالیت هیستون استیلازی دارد و می تواند با پروتئین ADA2 آراییدوپسیس (همولوگ پروتئین ADA مخمر، یکی از اعضای کمپلکس GCN5/HAT مخمر) میان کنش نشان دهد و احتمالاً یک زیر واحد از کمپلکس می باشد که بیان ژن *COR*^۶ را تنظیم می کند (۱۸ و ۱۹). با جستجو در ژنوم آراییدوپسیس برای ژن های دارای دامین PAH، یک خانواده کوچک شامل سه ژن At1g16520، At4g15545، At1g56080 مشخص گردید. بیان cDNA هر یک از ژن ها تحت پروموتور 35S CaMV فنوتیپی شبیه فنوتیپ ژن *vin* (Vernalization Insensitive) نشان داد و بنابراین این ژن *VIN7* نامیده شده است (نتایج چاپ نشده است). بنابراین با فرض احتمال وجود اضافات ژنتیکی^۷ میان ژن های این خانواده و با توجه به ماهیت آزمایش افزایش بیان^۸، در این مطالعه، T-DNA لاین های مربوط به تمام اعضای این خانواده ژنی تهیه گردید و با تلاقی های متقابل ترکیبات ژنوتیپی مختلف بین این سه ژن بدست آمد تا فنوتیپ احتمالی حاصل از جهش در این خانواده ژنی بررسی گردد. هم چنین الگوی بیان هر ژن با ساخت ساختار های پروتئین GFP^۹ در اندام های مختلف گیاه آراییدوپسیس تعیین گردید.

⁵. Plastocyanin

⁶. Cold Regulated

⁷. redundancy

⁸. Overexpression

⁹. Green Fluorescent Protein

¹. Domain

². Coactivator

³. Corepressor

⁴. Paired Amphipatic Helix

مواد و روش ها

مواد گیاهی و شرایط رشد

جهت جوانه زنی، بذور گیاهان آرابیدوپسیس با هیپوکلیت سدیم تجارتي (آب ژاول ۰.۵٪) به مدت ده دقیقه ضد عفونی و پس از شستشو با آب استریل، روی محیط کشت حاوی یک دوم املاح موراشیک و اسکوگ (موراشیک و اسکوگ، ۱۹۶۲)، ۰.۰۵٪ MES، ۰.۵٪ سوکروز و ۰.۴٪ فیتوآگار کشت گردیدند. پس از دو روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد، بذور به اتاقک های رشد با دمای ۲۳-۲۲ درجه سانتی گراد و با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۲۲ درجه سانتی گراد و شدت نور ۱۲۰-۱۵۰ میکرومول بر مترمربع ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی (۱۹ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. گیاهچه های ده روزه به خاک انتقال داده شدند.

تعیین ژنوتیپ

T-DNA لاین های مربوط به هر ژن از دانشگاه ویسکانسین آمریکا آزمایشگاه دکتر آماسینو^{۱۰} تهیه گردید که شامل لاین های vin7 (SALK_017279); vin7L1 (SAIL_394_E05); vin7L2 (SALK_106270) بود.

وجود T-DNA در توالی هر یک از ژن ها توسط یک آغازگر اختصاصی ژن و یک آغازگر اختصاصی T-DNA تعیین گردید. جفت آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر ژن تیپ وحشی و ژن جهش یافته هر ژن در جدول زیر آمده است:

ژن	جفت آغازگر اختصاصی ژن جهت تکثیر همردیف تیپ وحشی	جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر همردیف جهش یافته
VIN7	مستقیم 5'- TCAACAACCTGGATTGTTCGTG -3' معکوس 5'- ACCAGCTAGATTTTCGAGCTCC -3'	LBa1: 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3' مستقیم 5'- TCAACAACCTGGATTGTTCGTG -3'
VIN7L1	مستقیم 5'- GAACTCTTTCCCATCAATCCG -3' معکوس 5'- AACCTCTCCGACGAGATTCTC -3'	5'- GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCT TCC-3' SAIL1 معکوس 5'- AACCTCTCCGACGAGATTCTC -3'
VIN7L2	مستقیم 5'- CAACACTCCGCTTTTCTGTTC -3' معکوس 5'- GATCTTGAATTGATTGTGTTTGG -3'	LBa1: 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3' مستقیم 5'- CAACACTCCGCTTTTCTGTTC -3'

تایید وجود T-DNA در هر ژن

برای هر یک از سه ژن یک لاین موتانت انتخاب و پس از انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز با آغازگر اختصاصی ژن و T-DNA، محصول با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (QIAquick Kit) خالص و توالی یابی با آغازگر اختصاصی T-DNA صورت گرفت.

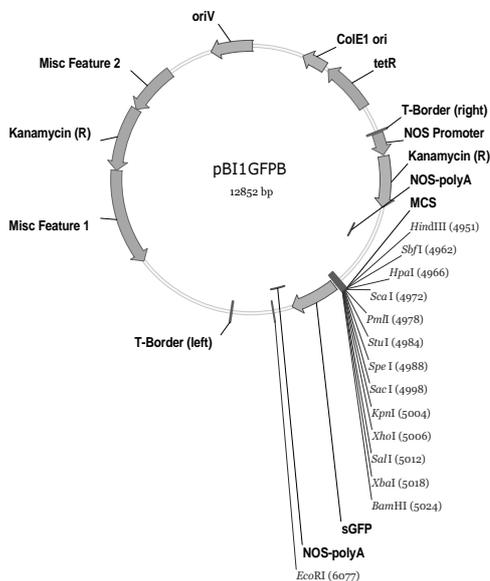
انجام تلاقی های مناسب برای بدست آوردن ترکیبات ژنتیکی مختلف

با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز موتانت های خالص و ناخالص ساده مربوط به هر ژن شناسایی شدند و با تلاقی های متناوب، گیاهان ناخالص و خالص دوگانه و سه گانه بین سه ژن جهت تعیین فنوتیپ شناسایی شدند.

¹⁰. Amasino

آنالیز تفرق

علامت GFP بین طول موج ۵۰۰ تا ۵۳۰ نانومتر با استفاده از لیزر آرگون در طول موج ۴۸۸ نانومتر ردیابی شد.



شکل ۱- ناقل pBI1GFPB

برای آنالیز خودگشنی، ژنوتیپ $Vin7^{-/-}$; $Vin7L1^{-/-}$; $Vin7L2^{+/-}$ خود گرده افشان و بذور F_1 حاصل برداشت شدند. بذور نتاج روی محیط کشت بدون آنتی بیوتیک کشت شدند و پس از جوانه زنی و انتقال به خاک ژنوتیپ آنها از طریق واکنش زنجیره ای پلی مرز تعیین گردید. برای بررسی تلاقی های متقابل، ژنوتیپ مذکور با گیاه تیپ وحشی (اکوتیپ Columbia-0) تلاقی مستقیم و معکوس داده شد و بذور حاصل جمع آوری گردید. F_1 حاصل روی محیط کشت بدون آنتی بیوتیک کشت و ژنوتیپ نتاج از طریق واکنش زنجیره ای پلی مرز تعیین گردید.

ساخت و مطالعه ساختارهای بیانی Protein-GFP:

قسمتی از ناحیه ژنومی بالادست کدون آغاز به علاوه ناحیه کد کننده هر ژن انتخاب شد (۳۰۹۱- باز از بالادست کدون آغاز ژن $VIN7$ ، ۲۸۲۶- باز از بالادست کدون آغاز ژن $VIN7L1$ ، ۲۹۹۱- باز از بالادست کدون آغاز ژن $VIN7L2$). با استفاده از آغازگرهای طراحی شده جایگاه های برشی خاص به انتهای هر ژن اضافه و هر یک از ژن ها در جایگاه همسانه سازی پلاسمید pBI1GFPB (شکل یک) کلون گردید به طوری که DNA ژنومی $VIN7$ بین دو جایگاه برشی $SbfI/XbaI$ ، $VIN7L1$ بین $SacI/SalI$ و $VIN7L2$ بین $SacI/BamHI$ همسانه شد. ناحیه کد کننده پس از توالی یابی، ساختارهای حاصل با استفاده از سویه GV3101 pMP90 باکتری آگرو^۱ (۱۱) به گیاهان آرابیدوپسیس اکوتیپ Columbia-0 به روش استاندارد غوطه ور کردن گل آذین (۵) منتقل شدند. بذور T_1 پس از ضدعفونی روی محیط کشت حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین کشت و گیاهچه های مقاوم پس از ده روز به خاک منتقل شدند. الگوی بیان هر ژن با آنالیز ده گیاه تراریخت نسل T_1 و T_2 گزارش گردید. برای تعیین الگوی بیان ژن، بافت های مختلف گیاهان تراریخت زیر میکروسکوپ اپی فلورسنس (Zeiss) آنالیز شدند و

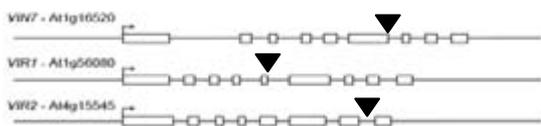
نتایج

آنالیز بیان ژن در مراحل مختلف نمو

بیان ژن $VIN7$: بیان ژن در ناحیه طویل شونده ریشه (شکل ۲-ز)، بساک و سلول های میکروسپور (شکل ۲-ج و ر؛ ۵-الف) به طور قوی مشاهده گردید. بیان فقط به میکروسپورهای درون کیسه تتراد محدود نبود بلکه پس از آزاد سازی سلول های میکروسپور بیان ژن وجود داشت. علامت GFP در سلول گرده (شکل ۲-د) و جنین دیده نشد. در اطراف مریستم بیان قوی ژن در برگ های جوان اولیه دیده شد (شکل ۲-ژ) اما در برگ های بزرگتر علامتی ردیابی نگردید. در اندام های زایشی، علامت GFP در یاخته های اولیه تخمک (شکل ۲-الف و ب) مشاهده گردید اما در مراحل پیشرفته تر بیانی نداشت.

بیان ژن $VIN7L1$: بیان ژن در گیاه بالغ ردیابی گردید بطوریکه علامت GFP در بافت های اطراف تخمک ها مراحل اولیه نمو تخمک ها (شکل ۳-الف و ب)، جنین ها (شکل ۳-ز)،

¹. *Agrobacterium tumefaciens*



شکل ۶- محل قرارگیری T-DNA در هر یک از ژن ها با فلش نشان داده شده است. جعبه های سفید رنگ نشان دهنده آگرون ها و خط نماینده اینترون می باشد.

تجزیه ژنتیکی و فنوتیپی:

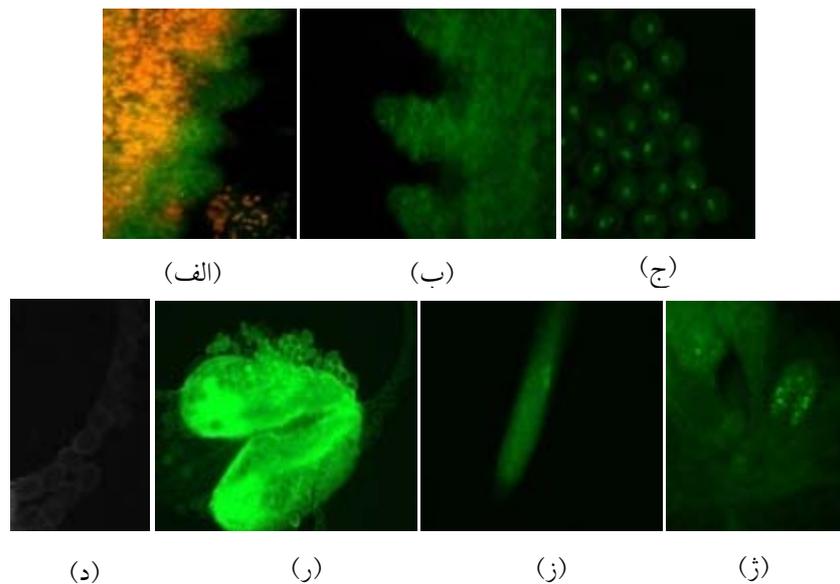
طی مطالعه فنوتیپی گیاهان خالص و ناخالص ساده و دو گانه میان همردیف های T-DNA فنوتیپی مشاهده نشد. در میان نتاج یک والد هتروزیکوس سه گانه فقط ژنوتیپ $VIN7 (-/-)$; $VIN7L1 (-/-)$; $VIN7L2 (+/-)$ های $VIN7 (+/-)$ و $VIN7 (-/-)$; $VIN7L1 (+/-)$; $VIN7L2 (-/-)$ $VIN7 (-/-)$; $VIN7L1 (-/-)$; $VIN7L2 (-/-)$ (و $VIN7L1 (-/-)$; $VIN7L2 (-/-)$ $VIN7L2 (-/-)$) پیدا نشد. با آنالیز فنوتیپی غلاف های ژنوتیپ $VIN7 (-/-)$; $VIN7L1 (-/-)$; $VIN7L2 (+/-)$ حدود شش درصد عدم تشکیل بذر در مقایسه با $VIN7 (-/-)$; $VIN7L1 (-/-)$; $VIN7L2 (+/+)$ صد نتاج F1 نسبت ۲ $VIN7 (-/-)$; $VIN7L1 (-/-)$; $VIN7L2 (+/+)$: $VIN7 (-/-)$; $VIN7L1 (-/-)$; $VIN7L2 (+/+)$ در میان نتاج، ژنوتیپ $VIN7 (-/-)$; $VIN7L1 (-/-)$; $VIN7L2 (-/-)$ مشاهده نشد بنابراین تلاقی های متقابل میان ژنوتیپ $VIN7 (+/-)$; $VIN7L1 (-/-)$; $VIN7L2 (+/-)$ و گیاه تیپ وحشی صورت گرفت تا میزان انتقال سلول جنسی $vin7$; $vin711$; $vin712$ مشخص گردد (جدول ۱).

گلبرگ ها (شکل ۳-ژ و ۵-ب) دیده شد. بیان ژن در سلول های میکروسپور دیده شد (شکل ۳-د،ر) اما در گرده ها علامت GFP ردیابی نشد. در میان سه ژن، فقط ترانسژن $VIN7L1$ در مراحل اولیه نمو آندوسپرم علامت GFP را نشان داد (شکل ۴-ج). در گیاهچه های ۸ روزه در تمام قسمت های گیاه بیان وجود داشت، در حالیکه در گیاهچه های ۱۵ روزه بیان فقط به ناحیه طویل شدن ریشه مثل $VIN7$ محدود می شد (شکل ۳-س).

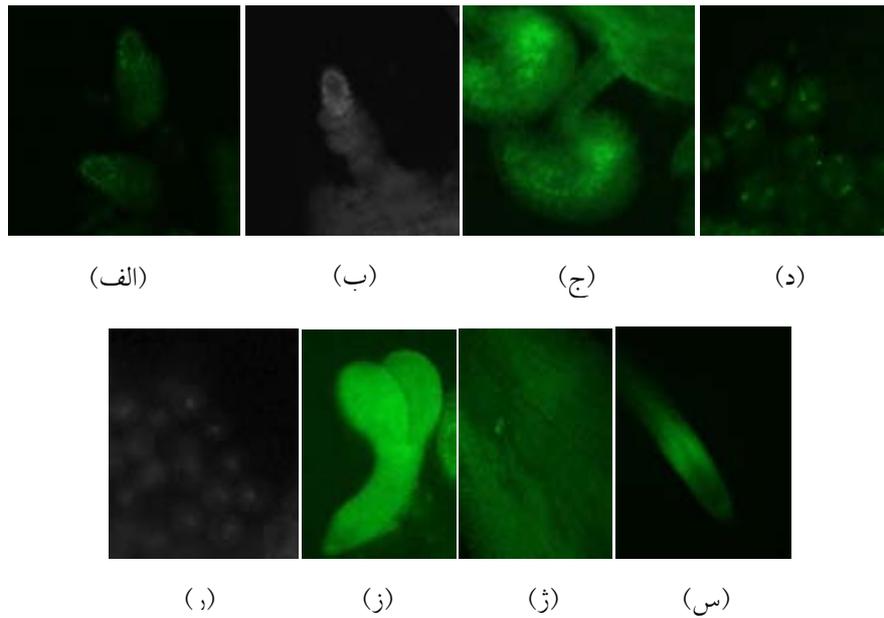
بیان ژن $VIN7L2$: علامت GFP در اندام های رویشی اعم از برگ های اولیه، ساقه، مریستم، برگ ها، گلبرگ ها؛ بساک و سلول های میکروسپور (شکل ۴-ج) و هم چنین در ریشه ها و پوسته بذر دیده شد. در اندام های زایشی بیان ژن نیز در مراحل مختلف گل دهی ارزیابی شد به طوریکه بیان ژن در تمام مراحل نمو گامتوفیت ماده در بافت اطراف کیسه جنینی و در یاخته های اولیه تخمک (شکل ۴-الف) دیده شد. درون کیسه جنینی (شکل ۴-ب و ۵-ج) و هم چنین بعد از لقاح در آندوسپرم بیان ژن دیده نشد. طی مراحل نمو جنین، بیان ژن تا مرحله اژدری شکل نبود اما پس از آن در جنین های اژدری شکل و لپه ای (شکل ۴-د) علامت GFP ردیابی گردید. بیان در بساک و سلول های میکروسپور شبیه دو ژن دیگر بود (شکل ۴-ج). در مقایسه با الگوی بیان دو ژن دیگر، بیان $V7L2$ در تمام قسمت های گیاهچه و گیاه بالغ به جز گرده دیده شد.

مقایسه الگوی بیان ژن در ده گیاه تراریخته، نشان داد که بیان هر سه ژن بصورت اسپوروفتیک کنترل می شود. تایید وجود T-DNA در ژن ها: وجود T-DNA با توالی یابی تایید شد به طوریکه T-DNA در دو ژن $vin7$ و $vin712$ در آگرون و در $vin711$ در اینترون قرار داشت (شکل ۶).

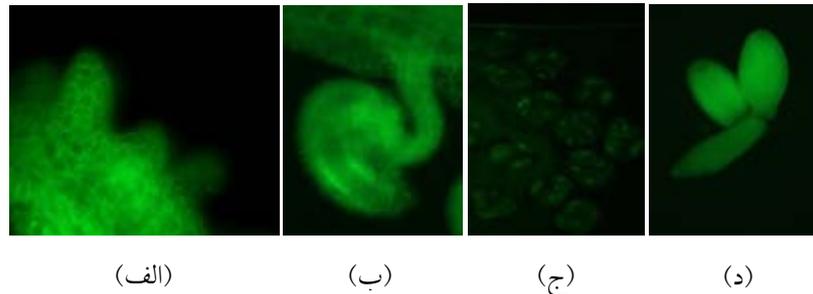
نوع تلاقی	تعداد نتاج دارای همردیف <i>vin7</i>	تعداد نتاج دارای ژنوتیپ <i>VIN7L2(+/-)</i>	تعداد نتاج دارای همردیف <i>VIN7</i>	تعداد کل نتاج	درصد راندمان انتقال (۸)
♀ <i>VIN7 (-/-)</i> ; <i>VIN7L1 (-/-)</i> ; <i>VIN7L2 (+/-)</i> × Wild Type ♂	۵۸	۱۱	-	۵۸	%۲۲
♂ <i>VIN7 (-/-)</i> ; <i>VIN7L1 (-/-)</i> ; <i>VIN7L2 (+/-)</i> × Wild Type ♀	-	۱۰	۴۲	۴۲	%۳۱

جدول ۱- محاسبه میزان انتقال سلول جنسی *vin7*; *vin711*; *vin712* از طریق والد نر و ماد

شکل ۲- بیان *VIN7:GFP* طی نمو در گیاهان تراریخته. الف) یاخته های اولیه تخمک در مرحله ۹ گلدهی (۱۵). ب) یاخته های اولیه تخمک در مرحله ۱۱ گلدهی. ج) سلول های میکروسپور. د) سلول های گرده. ر) بساک. ز) ریشه در گیاهچه های ۱۵ روزه. ژ) برگچه جوان در اطراف مریستم انتهایی گیاهچه ۱۵ روزه.



شکل ۳- بیان VIN7L1:GFP طی نمو در گیاهان تراریخته. الف) یاخته های اولیه تخمک در مرحله ۱۱ گلدهی (۱۵). ب) یاخته های اولیه تخمک در اوایل مرحله ۱۲ گلدهی. ج) تخمک در مرحله ۱۲C. د) کیسه تتراد. ر) سلول های میکرواسپور. ز) جنین مرحله لپه ای (۱۰).



شکل ۴- بیان VIN7L2:GFP طی نمو در گیاهان تراریخته. الف) یاخته های اولیه تخمک در مرحله ۹ گلدهی. ب) یاخته های اولیه تخمک در مرحله ۱۲C گلدهی. ج) جنین مرحله لپه ای. د) کیسه تتراد.



شکل ۵- بافت های متفاوت گیاه تیپ وحشی زیر میکروسکوپ اپی فلورسنس به عنوان شاهد منفی. الف) بساک و گرده گیاه تیپ وحشی. ب) گلبرگ گیاه تیپ وحشی. ج) یاخته های اولیه تخمک گیاه تیپ وحشی در اوایل مرحله ۱۲C گلدهی.

transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735–

6- Dannenberg JH, David G, Zhong S, van der Torre J, Wong WH, Depinho RA (2005) mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev.* 19: 1581–1595.

7-Fleischer TC, Yun UJ, Ayer DE (2003) Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex. *Mol. Cell. Biol.* 23: 3456–3467.

8-Howden R, Park SK, Moore JM, Orme J, Grossniklaus U, Twell D (1998) Selection of T-DNA-tagged male and female gameto-phytic mutants by segregation distortion in *Arabidopsis*. *Genetics* 149:621–631.

9-Hsieh TF, Fischer RL (2005) Biology of chromatin dynamics. *Annual Review of Plant Biology.* 56: 327-51.

10-Ju'rgens G, Mayer U (1994) *Arabidopsis*. In: Bard JBL (ed) *Embryos, color atlas of development*. Wolfe, London, pp 7–21.

11-Koncz C, Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204:383–396.

12-McArthur, GA, Laherty CD, Queva C, Hurlin PJ, Loo L, James L, Grandori, C, Gallant P, Shiio Y, Hokanson WC, et al. (1998) The Mad protein family links transcriptional repression to cell differentiation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63: 423–433.

13-Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.

بازدارنده- یار mSin3 در پستانداران باعث داستیلایسیون می شوند؟ داده های حاصل از تلاقی های متقابل و نسبت های ژنتیکی نشان می دهد که برای بدست آوردن حداقل یک ژنوتیپ موتانت خالص سه گانه، نیاز به جستجو در میان تعداد زیادی از نتاج F1 می باشد. با وجود این ژنوتیپ می توان به نقش واقعی این سه ژن پی برد و به این سوال جواب داد که آیا واقعا در فرایند بهاره سازی دخیل می باشند یا نه. در غیر این صورت پیشنهاد می شود تا با مطالعه درون شیشه یا در محل مثل رسوبدهی ایمونولوژیکی کروماتین روابط احتمالی آنها با ژن های شناخته شده در مسیر ورنالیزاسیون مطالعه گردد.

منابع

1-Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51:786–94.

2-Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, et al. (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84:843–51.

3-Chua YL, Brown AP, Gray JC (2001) Targeted histone acetylation and altered nuclease accessibility over short regions of the pea plastocyanin gene. *Plant Cell* 13:599–612.

4-Chua YL, Watson LA, Gray JC (2003) The transcriptional enhancer of the pea plastocyanin gene associates with the nuclear matrix and regulates gene expression through histone acetylation. *Plant Cell* 15:1468–79.

5-Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated

- 14-Pandey R, Muller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, et al. (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 30:5036–55.
- 15-Robinson-Beers K, Pruitt RE, Gasser CS (1992) Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *Plant Cell* 4:1237–1249.
- 16- Silverstein RA, Ekwall K (2005) Sin3: A flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr. Genet.* 47: 1–17.
- 17-Stockinger EJ, Mao Y, Regier MK, Triezenberg SJ, Thomashow MF (2001) Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in *Arabidopsis* and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression. *Nucleic Acids Res.* 29:1524–33.
- 18-Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272:408–11.
- 19-Vlachonasis KE, Thomashow MF, Triezenberg SJ (2003) Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect *Arabidopsis* growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 15:626–38.
- 20-Walters JL (1962) Megasporogenesis and Gametophyte Selection in *Paeonia californica*. *American Journal of Botany*, 49: (7)787-794.
- 21-Yadegari R, Drews GN (2004) Female gametophyte development. *Plant Cell* 16(Suppl):S133–S141.
- 22-Yuan HE, Radhakrishnan I (2008) Solution NMR studies of apo-mSin3A and -mSin3B reveal that the PAH1 and PAH2 domains are structurally independent. *Protein Science* 17:1–5.