



"مقاله پژوهشی"

شناسایی SNPها در ژنهای پکتین استراز ۱ و پلی گالاتکتوروناز گوجه‌فرنگی

شیرزاد ابراهیمی^۱، امیرفیاض مقدم^۲، بابک عبدالهی مندولکانی^۳ و سمانه علیاری^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲- دانشیار گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه ارومیه

۳- استاد گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه ارومیه، (نویسنده مسوول: b.abdollahi@urmia.ac.ir)

۴- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۰

صفحه: ۱۴۸ تا ۱۵۷

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی متعلق به خانواده *Solanaceae* می‌باشد. گوشتی بودن میوه از صفات مهم موثر در کیفیت میوه گوجه‌فرنگی بوده و توارث کمی دارد. از جمله ژن‌های دخیل در گوشتی بودن میوه گوجه‌فرنگی ژن‌های پکتین استراز ۱ (*PEI*) و پلی گالاتکتوروناز (*PG*) می‌باشد. با توجه به نقش مهم این ژن‌ها در کیفیت میوه گوجه‌فرنگی، شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در مناطق کدکننده این ژن‌ها برای تولید نشانگرهای عملکردی مرتبط با سفتی میوه ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۹۶ ژنوتیپ از ۱۲ جمعیت جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی (ایران) و ترکیه در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه کشت شد. برای شناسایی SNPها در ژن‌های *PEI* و *PG*، آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار FastPCR برای تکثیر قطعاتی از مناطق کدکننده این ژن‌ها در ۹۶ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی طراحی شد. برای هضم قطعات تکثیر شده دو ژن از آنزیم‌های برشی *TruI* و *PstI* استفاده شد. با توجه به عدم وجود چندشکلی در الگوهای برشی حاصل از هضم آنزیمی، چهار فرد از جمعیت‌های مختلف انتخاب و قطعه تکثیری در این افراد خالص‌سازی و توالی‌یابی شد. بعد از بازیابی قطعه تکثیری هر ژن، شناسایی SNPها با استفاده از همردیفی توالی‌های هر ژن با نرم‌افزار Clustal Omega انجام گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج همردیفی، در ژن *PEI* چهار SNP شناسایی شد که ۷۵ درصد آنها از نوع همجنس با فراوانی ۵۰ درصد A/G، ۲۵ درصد T/C و ۲۵ درصد جهش‌ها از نوع ناهمجنس C/A بود. در ژن *PG* شش SNP شناسایی شد که ۶۶/۷ درصد آنها از نوع همجنس با فراوانی ۳۳/۳ درصد A/G، ۳۳/۳ درصد T/C و ۳۲/۳ درصد جهش‌ها از نوع ناهمجنس با فراوانی ۱۶/۱۶ درصد T/A و ۱۶/۱۶ درصد G/C بود.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین تعداد SNPها در هر ۱۰۰ جفت باز از آگزون ژن‌های *PEI* و *PG* به ترتیب ۱/۲۲ و ۰/۴۱ است. همچنین فراوانی SNPها در ژن *PG* کمتر از *PEI* بود. تعداد کم SNPهای مشاهده شده در آگزون‌های هر دو ژن نشانگر حفاظت شدگی مناطق کدکننده این ژن‌ها در طول تکامل گوجه‌فرنگی می‌باشد. همچنین شناسایی SNPهای شناسایی شده در مطالعه حاضر می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی گوجه‌فرنگی برای معرفی نشانگرهای عملکردی مرتبط با سفتی میوه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تنوع تک نوکلئوتیدی، ژن پکتین استراز ۱، ژن پلی گالاتکتوروناز، گوشتی بودن میوه، گوجه‌فرنگی

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) از تیره‌ی *Solanaceae* و جنس *Lycopersicum* می‌باشد (۱۵). همچنین منبع بار ارزشی از ویتامین‌های A، C و حاوی مواد معدنی بسیاری از جمله کلسیم، آهن، منگنز، روی و پتاسیم و آنتی‌اکسیدان لیکوپن و رنگدانه‌هایی مثل بتاکاروتن می‌باشد (۲۲). لیکوپن از قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار است به همین دلیل در درمان برخی از بیماری‌ها مانند پروستات، قلبی و عروقی، استخوانی، عصبی و نارسایی‌های جنسی مردان بسیار مؤثر است و به دلیل واکنش با انواع رادیکال‌های آزاد از وقوع بیماری‌ها پیشگیری می‌کند. بیش از ۸۵ درصد لیکوپن مصرفی از گوجه‌فرنگی و فرآورده‌های آن تأمین می‌شود (۲۴). گوجه‌فرنگی به عنوان گونه مدل برای اصلاح برای مقاومت به بیماری‌ها، نقشه‌یابی ژنتیکی، ایجاد کتابخانه ژنومی و توالی‌یابی ژنومی مطرح می‌باشد (۲۵). همچنین به علت دیپلوئید بودن و اندازه ژنوم کوچکتر (۹۵۰ Mb) به عنوان یک گیاه مرجع در مطالعات نقشه‌یابی مقایسه‌ای استفاده می‌شود (۱۶). کیفیت میوه گوجه‌فرنگی برای مصرف تازه با مجموعه‌ای از ویژگی‌های خارجی (اندازه، رنگ و گوشتی) و داخلی (طعم، عطر و بافت) تعیین می‌شود. گوشتی بودن میوه گوجه‌فرنگی یکی از صفات مربوط به کیفیت است که توسط چندین ژن کنترل می‌شود (۸). براساس مطالعات ژنتیک

مولکولی، ژن‌های مختلفی در گوشتی بودن میوه گوجه‌فرنگی دخالت دارند، از جمله این ژن‌ها می‌توان به *PEI* و *PG* اشاره کرد: آنزیم پکتین متیل‌استراز ۱ (*PEI*) یا پکتین استراز در گیاهان نقش مهمی در متابولیسم دیواره سلولی در زمان رسیدگی دارد. این آنزیم دی‌استریفیکاسیون پکتین (یک ترکیب اصلی در دیواره سلولی گیاهان) به پکتات و متانول را کاتالیز می‌کند. ژن *PG* در گوجه‌فرنگی محدود به میوه است و هنگام رسیدگی میوه فعال می‌شود (۲۶). مطالعات نشان می‌دهد که بسیاری از فعالیت‌های دیواره سلولی در تغییرات بافت میوه دخیل هستند (۲۴،۴). این تغییرات دیواره سلولی شامل فرآیندهایی مانند خنثی‌سازی و دی‌پلیمریزاسیون پکتین‌ها می‌باشد (۵). آنزیم پلی گالاتکتوروناز (*PG*) از طریق تجزیه پلی گالاتکتورونان موجود در دیواره سلولی به وسیله هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی اسید گالاتکتورونیک (جزء کربوهیدراته مهم پکتین) موجب تجزیه پکتین شده و باعث نرمی بافت میوه می‌شود. در واقع بیان ژن *PG* باعث تجزیه گالاتکتوزیل باقی‌مانده در دیواره سلولی می‌شود که یکی از تغییرات مهم پکتین هنگام توسعه میوه است (۲۳،۱۴،۹).

تغییرات بافت میوه به طور عمده ناشی از تخریب اجزای دیواره سلولی و تغییرات کوتیکول است. تغییرات دیواره سلولی در هنگام رسیدن میوه به شدت با گوشتی بودن میوه و طول عمر آن ارتباط دارد. علاوه بر ماتریس ساختاری دیواره سلولی،

طراحی آغازگر

ابتدا توالی ناحیه کدکننده دو ژن *PEI* و *PG* از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج و آغازگرهای اختصاصی هر ژن (جدول ۲) با نرم‌افزار FastPCR طراحی و از نظر وجود ساختارهای ثانویه مثل آغازگر -دایمر و ساختارهای سنجاق سری بررسی شد.

واکنش‌های PCR

برنامه دمایی PCR به منظور تکثیر قطعات دو ژن مذکور (قطعاتی به طول ۳۸۵ و ۱۳۰۰ جفت باز به ترتیب برای ژن‌های *PEI* و *PG*) شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ ثانیه در دمای اتصال ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای ژن *PEI* و برای ژن *PG* دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی‌گراد، دو دقیقه برای گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ سانتی‌گراد انجام شد. محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۸ درصد الکتروفورز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام گرفت.

هضم قطعات تکثیر شده ژن‌های مورد مطالعه

به‌منظور هضم قطعات تکثیر شده دو ژن با آنزیم‌های *PstI* و *TruI* (Fermentas، آلمان)، ابتدا الگوی برشی و طول قطعات حاصل از برش ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار FastPCR پیش‌بینی شد. سپس قطعات تکثیر شده دو ژن در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (۹۶ ژنوتیپ) با استفاده از آنزیم‌های فوق‌الذکر بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده هضم شد. به‌منظور آشکارسازی قطعات حاصل از برش از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت یک و نیم ساعت استفاده شد.

توالی‌یابی

با توجه به اینکه هضم آنزیمی توالی‌های تکثیری دو ژن در افراد مطالعه شده چندشکلی تولید نکرد، بنابراین برای شناسایی SNP‌ها در نواحی کدکننده ژن‌های *PEI* و *PG* از روش توالی‌یابی استفاده شد. چهار فرد از جمعیت‌هایی با فاصله جغرافیایی دور از هم انتخاب و PCR انجام شد. سپس ۴۰ میکرولیتر از محصول PCR به تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال و جهت خالص‌سازی و تعیین توالی به شرکت توپازژن (ایران) ارسال شد. با توجه به اینکه طول قطعه مشاهده شده برای ژن *PG* ۱۳۰۰ جفت باز بود برای قرائت کامل، توالی‌یابی از هر دو انتهای قطعات PCR و با استفاده از هر دو آغازگر پیشرو و معکوس که در واکنش PCR استفاده شده بود انجام گرفت. ولی در ژن *PEI* توالی‌یابی از جهت رفت انجام شد. قطعات توالی‌یابی شده باز یابی و سپس نواحی مشترک شناسایی و توالی‌ها BLAST شد. سپس هم‌ردیفی توالی‌ها برای شناسایی SNP با استفاده از نرم‌افزار Clustal Omega انجام گرفت.

یکی دیگر از مهم‌ترین عوامل برای گوستی بودن میوه، فشار اسمزی دیواره سلولی است (۵). فشار اسمزی سلولی بر اساس وضعیت آب در میوه و توزیع آب نسبی داخل سلول و دیواره سلولی کنترل می‌شود (۲۶). چند جهش تک‌ژنی در گوجه‌فرنگی توسط کلونینگ موضعی شناسایی شده‌اند که اثر مهمی بر روی رسیدن و بافت میوه دارند (۱۷، ۲۷). کاهش بیان این ژن‌ها به طور جداگانه اثر کمی روی بافت میوه دارند و باعث تولید میوه‌های کوچکتر می‌شوند (۲، ۲۰).

از جمله نشانگرهای DNA کارا که امروزه در مطالعات ژنتیکی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند SNP‌ها می‌باشند. SNP‌ها چندشکلی مبتنی بر تفاوت در یک نوکلئوتید می‌باشند که منبع ژنتیکی عمده تغییرات فنوتیپی درون یک گونه بشمار می‌روند. نشانگرهای مبتنی بر SNP‌ها هم بارز و دو آلی می‌باشند. کارایی بالای SNP‌ها، به دلیل حضور آنها در تمام نواحی ژنوم (اینترن‌ها و همچنین اگزون‌ها) می‌باشد (۱۳). هر فرد متعلق به یک گونه، دارای هزاران SNP می‌باشد که ترکیب این تنوع‌ها باعث می‌شود فنوتیپ هر فرد بصورت منحصر به فرد ظاهر یابد. به علت پایداری بیشتر، موتاسیون کمتر و حضور SNP‌ها در بیشتر نقاط ژنوم، استفاده از آنها به عنوان نشانگر ژنتیکی در مطالعات گیاهی گسترش زیادی دارد (۹). با توجه به نقش مهم ژن‌های *PEI* و *PG* در کنترل گوستی بودن میوه گوجه‌فرنگی و عدم شناسایی تنوع‌های تک نوکلئوتیدی در این ژن‌ها، هدف از این مطالعه شناسایی SNP‌ها در نواحی اگزونی این ژن‌ها در جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی به روش هم‌ردیفی چندگانه بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۹۶ ژنوتیپ از ۱۲ جمعیت که از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی (ارومیه، اشنویه، پیرانشهر، نقده، بوکان، مهاباد، سلماس، سردشت، میاندواب، قره‌ضیاندین و خوی) و کشور ترکیه جمع‌آوری شده بود استفاده گردید (جدول ۱). بذور جمعیت‌های گوجه‌فرنگی جهت استخراج DNA در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه کشت گردید. بعد از رسیدن گیاهان به مرحله ۶-۴ برگ، نمونه‌برداری از برگ‌های گوجه‌فرنگی برداشت و درون نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی از برگ‌های جوان و سبز گیاه گوجه‌فرنگی به روش CTAB استخراج شد. به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتوفتومتری استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات توده‌های گوجه‌فرنگی مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Description of the tomato landraces used in the study

منطقه	اندازه میوه	کد	منطقه	اندازه میوه	کد
Iran-Miandoab	کوچک	IRMI7	Iran-Urmia	بزرگ	IRU1
Iran-Bokan	متوسط	IRB	Iran-Urmia	بزرگ	IRU2
Iran-Mahabad	متوسط	IRMA1	Iran-Urmia	بزرگ	IRU3
Iran-Mahabad	بزرگ	IRMA2	Iran-Urmia	بزرگ	IRU4
Iran-Mahabad	متوسط	IRMA4	Iran-Urmia	بزرگ	IRU5
Iran-Mahabad	کوچک	IRMA5	Iran-Urmia	متوسط	IRU6
Iran-Mahabad	کوچک	IRMA6	Iran-Urmia	بزرگ	IRU7
Iran-Mahabad	کوچک	IRMA7	Iran-Urmia	متوسط	IRU8
Iran-Mahabad	بزرگ	IRMA8	Iran-Urmia	متوسط	IRU10
Iran-Mahabad	بزرگ	IRMA9	Iran-Urmia	بزرگ	IRU11
Iran-Mahabad	متوسط	IRMA10	Iran-Urmia	بزرگ	IRU12
Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ1	Iran-Urmia	متوسط	IRU13
Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ2	Iran-Urmia	متوسط	IRU14
Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ3	Iran-Urmia	متوسط	IRU15
Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ4	Iran-Urmia	متوسط	IRU16
Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ5	Iran-Urmia	بزرگ	IRU18
Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ6	Iran-Urmia	متوسط	IRU19
Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ7	Iran-Urmia	متوسط	IRU20
Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ8	Iran-Urmia	بزرگ	IRU21
Iran-Khoy	متوسط	IRKH1	Iran-Urmia	بزرگ	IRU22
Iran-Khoy	کوچک	IRKH2	Iran-Urmia	خیلی بزرگ	IRU23
Iran-Salmas	کوچک	IRSA1	Iran-Urmia	بزرگ	IRU24
Iran-Salmas	بزرگ	IRSA2	Iran-Urmia	متوسط	IRU25
Iran-Sardasht	خیلی کوچک	IRSR1	Iran-Urmia	متوسط	IRU26
Iran-Sardasht	خیلی کوچک	IRSR2	Iran-Oshnavieh	متوسط	IRO1
Iran-Sardasht	کوچک	IRSR3	Iran-Oshnavieh	کوچک	IRO2
Iran-Sardasht	خیلی کوچک	IRSR4	Iran-Oshnavieh	متوسط	IRO3
Iran-Sardasht	کوچک	IRSR5	Iran-Oshnavieh	متوسط	IRO4
Iran-Sardasht	کوچک	IRSR6	Iran-Oshnavieh	بزرگ	IRO5
Iran-Sardasht	متوسط	IRSR7	Iran-Oshnavieh	خیلی بزرگ	IRO6
Iran-Sardasht	کوچک	IRSR8	Iran-Piranshahr	بزرگ	IRP1
Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG1	Iran-Piranshahr	بزرگ	IRP2
Turkey-Iğdır	بزرگ	TUIG2	Iran-Piranshahr	متوسط	IRP3
Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG3	Iran-Piranshahr	متوسط	IRP4
Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG4	Iran-Piranshahr	متوسط	IRP5
Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG5	Iran-Piranshahr	متوسط	IRP6
Turkey-Iğdır	بزرگ	TUIG6	Iran-Piranshahr	متوسط	IRP7
Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG7	Iran-Piranshahr	کوچک	IRP8
Turkey-Iğdır	کوچک	TUIG8	Iran-Piranshahr	بزرگ	IRP9
Turkey-Iğdır	کوچک	TUIG9	Iran-Piranshahr	کوچک	IRP10
Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG10	Iran-Naghadeh	کوچک	IRN1
Turkey-Iğdır	کوچک	TUIG11	Iran-Naghadeh	کوچک	IRN2
Turkey-Iğdır	بزرگ	TUIG12	Iran-Miandoab	متوسط	IRMI1
Turkey-Iğdır	خیلی کوچک	TUIG13	Iran-Miandoab	بزرگ	IRMI2
Turkey-Iğdır	کوچک	TUIG14	Iran-Miandoab	متوسط	IRMI3
Iran	متوسط	Peto Early CH	Iran-Miandoab	متوسط	IRMI4
Iran	متوسط	Rio Grande	Iran-Miandoab	متوسط	IRMI5
Turkey	متوسط	H-2274	Iran-Miandoab	کوچک	IRMI6

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژنهای *PG* و *PEI* در گیاه گوجه‌فرنگیTable 2. Characteristics of the primers designed for amplification of *PG* and *PEI* genes in tomato

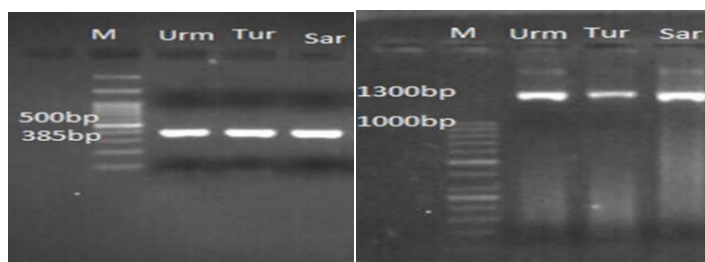
نام ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر	طول قطعه (جفت باز)
<i>PEI</i>	NM001247222.2	TTCCAGAAATGCCAGCTCGTA (F) GCATAGCTTTAGCGGGATCAG (R)	۳۸۵
<i>PG</i>	X04583.1	GGAATAGTATTCTCCTTCTC (F) ACATGTTTCAGCATTGTAA (R)	۱۳۰۰

نتایج و بحث

تکثیر قطعات ژنی و هضم آنزیمی

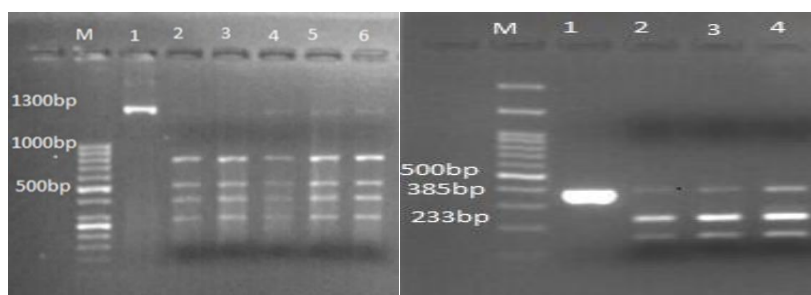
به منظور بررسی الگوی برشی آنزیمی و شناسایی تنوع تک نوکلئوتیدی، قطعاتی از نواحی کد کننده این ژن‌ها به طول ۳۸۵ جفت باز از ژن *PG* و ۱۳۰۰ جفت باز از ژن *PEI* تکثیر شد (شکل ۱). سپس قطعات تکثیری ژن *PEI* برای ۹۶ ژنوتیپ با آنزیم *Tru1* برش داده شد. پیش‌بینی‌هایی که توسط نرم‌افزار FastPCR شده بود نشان می‌داد که باید قطعاتی به طول ۲۳۳ و ۱۳۱ جفت بازی تولید شود که بعد از برش با این آنزیم پلی‌مورفیسمی مشاهده نشد. بنابراین، قطعات تکثیری ژن *PEI* با آنزیم *Pst1* نیز هضم شد. با بررسی‌هایی که روی توالی این ژن با نرم‌افزار FastPCR

انجام گرفت نشان داد که چند جایگاه برشی آنزیم *Pst1* در توالی این ژن موجود است ولی بعد از هضم قطعات تکثیری در ۹۶ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی چند شکلی مشاهده نگردید (شکل ۲). قطعات تکثیر شده ژن *PG* در ۹۶ ژنوتیپ با آنزیم *Tru1* هضم شد. پیش‌بینی الگوی برشی حاصل از آنزیم در توالی ژن *PG* که با بررسی این توالی با نرم‌افزار FastPCR انجام شده بود نشان داد که باید قطعاتی به طول ۵۶۵، ۴۸۰ و ۲۴۶ جفت باز تولید شود که بعد از هضم و الکتروفورز پلی‌مورفیسمی مشاهده نشد (شکل ۲) بنابراین از آنزیم *Pst1* استفاده شد. با بررسی‌هایی که روی توالی این ژن با نرم‌افزار FastPCR انجام گرفت نشان داد که جایگاه برشی برای این آنزیم در توالی وجود ندارد.



شکل ۱- تکثیر ژن‌های *PG* (سمت راست) و *PEI* (سمت چپ) به ترتیب به اندازه‌های ۳۸۵ و ۱۳۰۰ جفت باز در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی (به ترتیب M: نشانگر اندازه ۱Kb (Fermentas، آلمان)، Urm: ارومیه، Tur: ترکیه، Sar: سردشت

Figure 1. Amplified fragments of the *PG* (left) and *PEI* (right) genes with the length of 385 and 1300bp, respectively, in different tomato genotypes (Lanes, M: 1Kb DNA ladder (Fermentas, Germany), Urm: Urmia, Tur: Turkey, Sar: Sardasht



شکل ۲- هضم آنزیمی قطعات تکثیری ژن *PEI* (سمت راست) و *PG* (سمت چپ) با آنزیم *Tru1* در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی (در ژن *PG* به ترتیب M: نشانگر اندازه ۱Kb، چاهک یک: بدون برش با آنزیم، چاهک دو تا شش: برش با آنزیم) و (در ژن *PEI* به ترتیب M: نشانگر اندازه ۱kb، چاهک یک: بدون برش با آنزیم و چاهک‌های دو تا چهار: برش با آنزیم)

Figure 2. Enzymatic digestion of amplified fragments of *PEI* (right) and *PG* (left) genes using *Tru1* enzyme in different tomato genotypes (in *PG* gene, M: 1Kb DNA ladder, lane 1: no digestion, lane 2-6: Digested fragments) and (in *PEI* gene, M: 1Kb DNA ladder, lane 1: no digestion, lane 2-4: digested fragments)

ژن *PEI*، جهش مربوط به بازهای A/G، T/C و C/A در این ژن مشاهده شد. بیشترین جهش در نواحی اگزونی مربوط به تبدیل بازهای A/G بود (شکل ۳ و جدول ۳).

همردیفی توالی‌ها و شناسایی SNPها در ژن *PEI* بر اساس نتایج همردیفی بین توالی نمونه‌های انتخابی جمعیت‌های ارومیه، ترکیه، سردشت و مهاباد در نواحی اگزونی

```

PE_Tur      CTGCACAAGGCAGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTGCGTTCTGTAAACA
PE_Urm      CTGCACAAGGCAGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTGAGTTCTGTAAACA
PE_Sar      CTGCACAAGGCAGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTGAGTTCTGTAAACA
PE_Moh      CTGCACAAGGCAGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTGAGTTCTGTAAACA
*****
PE_Tur      TAATAGCAAGTTCGGACCTAGAACCAGTCCCTGAAAGAATTCCCAACATATCTTGGTAGGC
PE_Urm      TAATAGCAAGTTCGGACCTGGAACCAGTCCCTGAAAGAATTCCCAACATATCTTGGTAGGC
PE_Sar      TAATAGCAAGTTCGGACCTAGAACCAGTCCCTGAAAGAATTCCCAACATATCTTGGTAGGC
PE_Moh      TAATAGCAAGTTCGGACCTAGAACCAGTCCCTGAAAGAATTCCCAACATATCTTGGTAGGC
*****
PE_Tur      CATGGAAGAATATTCAAGAAGTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAAATC
PE_Urm      CATGGAAGAATATTCAAGAAGTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAAATC
PE_Sar      CATGGAAGAATATTCAAGAAGTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAAATC
PE_Moh      CATGGAAGAATATTCAAGAAGTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAAATC
*****
PE_Tur      CAGCGGGTGGGCGGAGTGGGACGGAGATTTGCGTTGAAGACATTTGATTATGGTGAAT
PE_Urm      CAGCGGGTGGGCGTGGTGGGACGGAGATTTGCGTTGAAGACATTTGATTATGGTGAAT
PE_Sar      CAGCGGGTGGGCGTGGTGGGACGGAGATTTGCGTTGAAGACATTTGATTATGGTGAAT
PE_Moh      CAGCGGGTGGGCGTGGTGGGACGGAGATTTGCGTTGAAGACATTTGATTATGGTGAAT
*****
PE_Tur      TTATGAACAATGGACCTGGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
PE_Urm      TTATGAACAATGGACCTGGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
PE_Sar      TTATGAACAATGGACCTGGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
PE_Moh      TTATGAACAATGGACCTGGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
*****
PE_Tur      TCATTACTGATCCCGCTAAAGCTATGCAA
PE_Urm      TCATTACTGATCCCGCTAAAGCTATGCAA
PE_Sar      TCATTACTGATCCCGCTAAAGCTATGAAA
PE_Moh      TCATTACTGATCCCGCTAAAGCTATGCAA
*****

```

شکل ۳- هم‌ردیفی چندگانه توالی نواحی اگزونی ژن *PEI* در چهار جمعیت مختلف گوجه‌فرنگی (Urm: ارومیه، Sar: سردشت، Tur: ترکیه، Moh: مهاباد)، (SNPها به صورت پر رنگ و ایتالیک مشخص شده‌اند)

Figure 3. Multiple alignment of exon region of *PEI* gene in four different tomato populations (Urm: Urmia, Sar: Sardasht, Tur: Turkey, Moh: Mahabad), (SNPs are marked in bold and italic)

جدول ۳ - فراوانی SNPهای شناسایی شده در ژن *PEI* در جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی

Table 3. Frequency of SNPs identified in *PEI* gene in different tomato populations

درصد SNP	تعداد SNP	نوع SNP
۵۰	۲	A/G
۲۵	۱	C/A
۲۵	۱	T/C

در ژن *PEI* چهار SNP در ناحیه اگزونی شناسایی شد. نسبت جهش‌های همجنس به ناهمجنس ۳:۱ بود بطوریکه ۷۵ درصد جهش‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۵۰ درصد A/G، هم‌ردیفی و شناسایی SNPها در ژن *PG* بر اساس نتایج هم‌ردیفی بین توالی نمونه‌های انتخابی جمعیت‌های ارومیه، ترکیه، سردشت و مهاباد در نواحی اگزونی

۲۵ درصد T/C و ۲۵ درصد جهش از نوع ناهمجنس از نوع A/G می‌باشد. ژن *PG* جهش مربوط به تبدیل بازهای A/G، T/C، G/C و T/A مشاهده شد که بیشترین جهش مربوط به تبدیل بازهای A/G و T/C بود (شکل ۴ و جدول ۴).

```

PG_Koy      GGAATAGTATTCTCCTTCTCATTATTATTTTTGCTTTCATCAATTTCAACTTGTAGAAGCA
PG_Sar      GGAATAGTATTCTCCTTCTCATTATTATTTTTGCTTTCATCAATTTCAACTTGTAGAAGCA
PG_Urm      GGAATAGTATTCTCCTTCTCATTATTATTTTTGCTTTCATCAATTTCAACTTGTAGAAGCA
PG_Tur      GGAATAGTATTCTCCTTCTCATTATTATTTTTGCTTTCATCAATTTCAACTTGTAGAAGCA
*****
PG_Koy      ATGTTATTGATGACAATTTATACAAACAAGTTTATGATAATATTCTTGAACAAGAATTG
PG_Sar      ATGTTATTGATGACAATTTATACAAACAAGTTTATGATAATATTCTTGAACAAGAATTG
PG_Urm      ATGTTATTGATGACAATTTATACAAACAAGTTTATGATAATATTCTTGAACAAGAATTG
PG_Tur      ATGTTATTGATGACAATTTATACAAACAAGTTTATGATAATATTCTTGAACAAGAATTG
*****
PG_Koy      CTCATGATTTTCAAGCTTATCTTTCTTATTGAGCAAAAATATTGAAAGCAACAATAATA
PG_Sar      CTCATGATTTTCAAGCTTATCTTTCTTATTGAGCAAAAATATTGAAAGCAACAATAATA
PG_Urm      CTCATGATTTTCAAGCTTATCTTTCTTATTGAGCAAAAATATTGAAAGCAACAATAATA
PG_Tur      CTCATGATTTTCAAGCTTATCTTTCTTATTGAGCAAAAATATTGAAAGCAACAATAATA
*****
PG_Koy      TTGACAAGGTTGATAAAAATGGGATTAAGTGATTAATATACTTAGCTTTGGAGCTAAGG
PG_Sar      TTGACAAGGTTGATAAAAATGGGATTAAGTGATTAATATACTTAGCTTTGGAGCTAAGG
PG_Urm      TTGACAAGGTTGATAAAAATGGGATTAAGTGATTAATATACTTAGCTTTGGAGCTAAGG
PG_Tur      TTGACAAGGTTGATAAAAATGGGATTAAGTGATTAATATACTTAGCTTTGGAGCTAAGG
*****
PG_Koy      GTGATGGAARAACATATGATAATATTGCATTTGAGCAAGCATGGAATGAAGCATGTTTCA
PG_Sar      GTGATGGAARAACATATGATAATATTGCATTTGAGCAAGCATGGAATGAAGCATGTTTCA
PG_Urm      GTGATGGAARAACATATGATAATATTGCATTTGAGCAAGCATGGAATGAAGCATGTTTCA
PG_Tur      GTGATGGAARAACATATGATAATATTGCATTTGAGCAAGCATGGAATGAAGCATGTTTCA
*****
PG_Koy      CTAGAACACCTGTTCAATTTGTGGTTCCTAAAAACAAGAAATATCTTCTCAAGCAAAATCA
PG_Sar      CTAGAACACCTGTTCAATTTGTGGTTCCTAAAAACAAGAAATATCTTCTCAAGCAAAATCA
PG_Urm      CTAGAACACCTGTTCAATTTGTGGTTCCTAAAAACAAGAAATATCTTCTCAAGCAAAATCA
PG_Tur      CTAGAACACCTGTTCAATTTGTGGTTCCTAAAAACAAGAAATATCTTCTCAAGCAAAATCA
*****
PG_Koy      CCTTTTCAGGTCATGCAGATCTTCTATTTCAGTAAAGATTTTGGATCCTTAGAAGCAT
PG_Sar      CCTTTTCAGGTCATGCAGATCTTCTATTTCAGTAAAGATTTTGGATCCTTAGAAGCAT
PG_Urm      CCTTTTCAGGTCATGCAGATCTTCTATTTCAGTAAAGATTTTGGATCCTTAGAAGCAT
PG_Tur      CCTTTTCAGGTCATGCAGATCTTCTATTTCAGTAAAGATTTTGGATCCTTAGAAGCAT
*****
PG_Koy      CTTGCAAAAATAAATAAATCACTGCCATGCAGGGATGCACCAACGGCCTTAACCTTCTGGA
PG_Sar      CTTGCAAAAATAAATAAATCACTGCCATGCAGGGATGCACCAACGGCCTTAACCTTCTGGA
PG_Urm      CTTGCAAAAATAAATAAATCACTGCCATGCAGGGATGCACCAACGGCCTTAACCTTCTGGA
PG_Tur      CTTGCAAAAATAAATAAATCACTGCCATGCAGGGATGCACCAACGGCCTTAACCTTCTGGA
*****
PG_Koy      ATTGCAAAAATTTGAAAGTGAATAATCTAAGAGTAAAATGCACAACAATTCATATCA
PG_Sar      ATTGCAAAAATTTGAAAGTGAATAATCTAAGAGTAAAATGCACAACAATTCATATCA
PG_Urm      ATTGCAAAAATTTGAAAGTGAATAATCTAAGAGTAAAATGCACAACAATTCATATCA
PG_Tur      ATTGCAAAAATTTGAAAGTGAATAATCTAAGAGTAAAATGCACAACAATTCATATCA
*****
PG_Koy      AATTTGAGTCATGCACTAATGTTGTAGCTTCAAATTTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
PG_Sar      AATTTGAGTCATGCACTAATGTTGTAGCTTCAAATTTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
PG_Urm      AATTTGAGTCATGCACTAATGTTGTAGCTTCAAATTTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
PG_Tur      AATTTGAGTCATGCACTAATGTTGTAGCTTCAAATTTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
*****
PG_Koy      AATTTGAGTCATGCACTAATGTTGTAGCTTCAAATTTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
PG_Sar      AATTTGAGTCATGCACTAATGTTGTAGCTTCAAATTTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
PG_Urm      AATTTGAGTCATGCACTAATGTTGTAGCTTCAAATTTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
PG_Tur      AATTTGAGTCATGCACTAATGTTGTAGCTTCAAATTTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
*****
PG_Koy      TTATTGGAACAGGTGATGATTGATTTCAATTTGTTTCTGGATCTCAAATGTGCGAGCCA
PG_Sar      TTATTGGAACAGGTGATGATTGATTTCAATTTGTTTCTGGATCTCAAATGTGCGAGCCA
PG_Urm      TTATTGGAACAGGTGATGATTGATTTCAATTTGTTTCTGGATCTCAAATGTGCGAGCCA
PG_Tur      TTATTGGAACAGGTGATGATTGATTTCAATTTGTTTCTGGATCTCAAATGTGCGAGCCA
*****
PG_Koy      CAAATATTACTTGTGGTCCAGGTCATGGTATAAGTATTGGAAGCTTAGGATCTGGAATTT
PG_Sar      CAAATATTACTTGTGGTCCAGGTCATGGTATAAGTATTGGAAGCTTAGGATCTGGAATTT
PG_Urm      CAAATATTACTTGTGGTCCAGGTCATGGTATAAGTATTGGAAGCTTAGGATCTGGAATTT
PG_Tur      CAAATATTACTTGTGGTCCAGGTCATGGTATAAGTATTGGAAGCTTAGGATCTGGAATTT
*****
PG_Koy      CAGAAGCTTATGTGTCTAATGTTACTGTAAATGAAGCCAAAATTTCTGGTCCGAAAATG
PG_Sar      CAGAAGCTTATGTGTCTAATGTTACTGTAAATGAAGCCAAAATTTCTGGTCCGAAAATG
PG_Urm      CAGAAGCTTATGTGTCTAATGTTACTGTAAATGAAGCCAAAATTTCTGGTCCGAAAATG
PG_Tur      CAGAAGCTTATGTGTCTAATGTTACTGTAAATGAAGCCAAAATTTCTGGTCCGAAAATG
*****
PG_Koy      GAGTTAGGATCAAGACTTGGCAGGGAGGATCTGGACAAGCTAGCAACATCAAATTTCTGA
PG_Sar      GAGTTAGGATCAAGACTTGGCAGGGAGGATCTGGACAAGCTAGCAACATCAAATTTCTGA
PG_Urm      GAGTTAGGATCAAGACTTGGCAGGGAGGATCTGGACAAGCTAGCAACATCAAATTTCTGA
PG_Tur      GAGTTAGGATCAAGACTTGGCAGGGAGGATCTGGACAAGCTAGCAACATCAAATTTCTGA
*****
PG_Koy      ATGTGGAAATGCAAGACGTTAAGTATCCATAATATATAGACAAAACCTATTGTGATCGAG
PG_Sar      ATGTGGAAATGCAAGACGTTAAGTATCCATAATATATAGACAAAACCTATTGTGATCGAG
PG_Urm      ATGTGGAAATGCAAGACGTTAAGTATCCATAATATATAGACAAAACCTATTGTGATCGAG
PG_Tur      ATGTGGAAATGCAAGACGTTAAGTATCCATAATATATAGACAAAACCTATTGTGATCGAG
*****
PG_Koy      TTGAACCATGTATAACAACAGTTTTT CAGCAGTTCAAGTGAAAAATGTGGTGTATGAGAATA
PG_Sar      TTGAACCATGTATAACAACAGTTTTT CAGCAGTTCAAGTGAAAAATGTGGTGTATGAGAATA
PG_Urm      TTGAACCATGTATAACAACAGTTTTT CAGCAGTTCAAGTGAAAAATGTGGTGTATGAGAATA
PG_Tur      TTGAACCATGTATAACAACAGTTTTT CAGCAGTTCAAGTGAAAAATGTGGTGTATGAGAATA
*****
PG_Koy      TCAAGGGCACAAGTGCAACAAAGGTGGCCATAAAATTTGATTGAGCACAACCTTTCCAT
PG_Sar      TCAAGGGCACAAGTGCAACAAAGGTGGCCATAAAATTTGATTGAGCACAACCTTTCCAT
PG_Urm      TCAAGGGCACAAGTGCAACAAAGGTGGCCATAAAATTTGATTGAGCACAACCTTTCCAT
PG_Tur      TCAAGGGCACAAGTGCAACAAAGGTGGCCATAAAATTTGATTGAGCACAACCTTTCCAT
*****
PG_Koy      CTGAAGGAATTATAATGGAGAATATAAATTTAGTAGGGGAAAGTGGAAAACCATCAGAGG
PG_Sar      CTGAAGGAATTATAATGGAGAATATAAATTTAGTAGGGGAAAGTGGAAAACCATCAGAGG
PG_Urm      CTGAAGGAATTATAATGGAGAATATAAATTTAGTAGGGGAAAGTGGAAAACCATCAGAGG
PG_Tur      CTGAAGGAATTATAATGGAGAATATAAATTTAGTAGGGGAAAGTGGAAAACCATCAGAGG
*****
PG_Koy      CTACGTGCAAAAATGTCCATTTTAAACRAATGCTGAACATGT
PG_Sar      CTACGTGCAAAAATGTCCATTTTAAACRAATGCTGAACATGT
PG_Urm      CTACGTGCAAAAATGTCCATTTTAAACRAATGCTGAACATGT
PG_Tur      CTACGTGCAAAAATGTCCATTTTAAACRAATGCTGAACATGT
*****

```

شکل ۴- هم‌ردیفی چندگانه توالی نواحی اگزونی ژن *PG* در چهار جمعیت مختلف گوجه‌فرنگی (Urm: ارومیه، Sar: سردشت، Tur: ترکیه، Koy: خوی)، (SNPها به صورت پررنگ و ایتالیک مشخص شده است)

Figure 4. Multiple alignment of exon region of *PG* gene in four different tomato populations (Urm: Urmia, Sar: Sardasht, Tur: Turkey, Koy: Khoy), (SNPs are marked in bold and italic)

جدول ۴- فراوانی SNPهای شناسایی شده در ژن *PG* در جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی
Table 4. Frequency of SNPs identified in *PG* gene in different tomato populations

درصد SNP	تعداد SNP	نوع SNP
۳۳/۳۳	۲	A/G
۱۶/۱۶	۱	T/A
۳۳/۳۳	۲	T/C
۱۶/۱۶	۱	G/C

درصد آنها از نوع ناهمجس با فراوانی یکسان ناشی از تبدیلات G/C و A/C بود. در ژن ژرماکرین D سینتاز از ۲۸ SNP شناسایی شده، هفت SNP در ناحیه اگزونی و ۲۱ SNP در ناحیه اینترونی مشاهده شد که ۶۷/۸۵ درصد آن از نوع همجنس با فراوانی ۳۵/۷۱ درصد G/A و ۳۲/۱۴ درصد C/T و ۳۲/۱۵ درصد جهش از نوع ناهمجس با ۷/۱۴ درصد T/A، ۱۴/۲۸ درصد G/C و ۱۰/۷۳ درصد C/A بود (۳). در بررسی دیگری در ۸۰ فرد از ۸ توده در گیاه ریحان، شش SNP در ژن اوژنول-O-متیل ترانسفراز مشاهده شد که از نوع A/G و T/C بود. در ژن چاویکول-O-متیل ترانسفراز، ۱۲ SNP (A/T، G/C، C/T، G/A) شناسایی شد که بیشترین نوع SNPها از نوع همجنس بود (۱). در تحقیق حاضر نیز در نواحی اگزونی ژن *PEI* چهار SNP و ژن *PG* شش SNP از نوع A/G و T/C مشاهده گردید. پیشنهاد می شود از SNPهای شناسایی شده در این تحقیق در برنامه‌های اصلاح گوجه‌فرنگی برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی با وضوح بالا، انتخاب ژنومی، نقشه یابی ارتباطی و مطالعه تکامل جمعیت استفاده شود. همچنین ارتباط بین SNPهای شناسایی شده در این مطالعه و گوشتی بودن میوه گوجه فرنگی به منظور معرفی نشانگرهای عملکردی بررسی شود. شناسایی نشانگرهای عملکردی برای صفات مرتبط با کیفیت میوه (بویژه صفت گوشتی بودن میوه) در پیشبرد موثر و تسهیل برنامه‌های اصلاحی گزینش به کمک نشانگر در گوجه فرنگی بسیار موثر خواهد بود. البته در ادامه تحقیق حاضر برای مطالعه کامل این دو خانواده ژنی در گوجه فرنگی در نظر است مطالعه بیوانفورماتیکی و آنالیز *In silico* دو خانواده ژنی نیز انجام گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

بطور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در نواحی اگزونی ژن *PEI* میانگین تعداد SNPها به ازای هر ۱۰۰ جفت باز، ۱/۲۲ بود. همچنین در ژن *PG* به ازای هر ۱۰۰ جفت باز بطور میانگین ۰/۴۱ SNP در نواحی اگزونی شناسایی شد. بیشترین تعداد تنوع های تک نوکلئوتیدی در این ژن‌ها از نوع تبدیلهای همجنس G/A و C/T بود. در کل در توالی‌های بررسی شده این دو ژن، فراوانی SNPها در ژن *PG* نسبت به *PEI* کمتر بود. همچنین تنوع‌های تک نوکلئوتیدی در نواحی اگزونی ژن‌های مورد مطالعه کم بود که نشانگر محفوظ بودن نواحی کدکننده این ژن‌ها در طول تکامل گوجه فرنگی می‌باشد.

در ژن *PG* شش SNP در نواحی اگزونی شناسایی شد. نسبت جهش‌های همجنس به ناهمجس ۲:۱ بود بطوریکه ۶۶/۷ درصد جهش‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۳۳/۳ درصد A/G، ۳۳/۳ درصد T/C و ۳۲/۳ درصد جهش از نوع ناهمجس با فراوانی ۱۶/۱۶ درصد T/A و ۱۶/۱۶ درصد از نوع G/C می‌باشد. بیشترین نوع SNP در ناحیه اگزونی از نوع A/G و T/C می‌باشد. در کل در توالی ژن *PG* به ازای هر ۱۰۰ جفت باز بطور میانگین ۰/۴۱ SNP در ناحیه اگزونی مشاهده شد. در حالیکه در کل توالی ژن *PEI* به ازای هر ۱۰۰ جفت باز بطور میانگین ۱/۲۲ SNP در ناحیه اگزونی شناسایی گردید. دلیل فراوانی کم تعداد SNP در ناحیه اگزونی احتمال به علت کمبود جهش در ناحیه کد کننده ژنی و محفوظ بودن آن در طول تکامل گیاه می باشد (۱). در تحقیق با بررسی بیش از ۱۵ لاین گوجه فرنگی با استفاده از روش توالی یابی مجدد قطعات تکثیر، ۵۵ SNP شناسایی شد که ۲۹ SNP در ناحیه اینترونی و ۲۶ SNP در ناحیه اگزونی بود (۱۱). در تحقیق حاضر نیز در ناحیه اگزونی دو ژن *PG* و *PEI* SNPهای کمتری مشاهده گردید. در مطالعه SNPهای موجود در ESTهای دو رقم MU_{16} و UPV_{96} گیاه کدوی تخمه کاغذی (*Cucurbita pepo* L.) با استفاده از تکنولوژی Roch ۴۵۴ حدود ۱۹۹۸۰ SNP گزارش شد که از این تعداد ۶۸ درصد مربوط به SNPهای ناشی از جهش همجنس با فراوانی یکسان A/G و C/T و ۳۲ درصد ناشی از جهش ناهمجس با فراوانی یکسان ناشی از تبدیلات A/T، A/C، G/T و C/G بود. در مطالعه SNPها در دو ژن کلیدی دخیل در شکل میوه (*SUN* و *OVATE*) در ۹۶ ژنوتیپ گوجه فرنگی، در ژن *SUN* ۸۰ درصد SNPها از نوع همجنس با فراوانی ۳۰ درصد G/A و ۵۰ درصد C/T و ۲۰ درصد جهش ناهمجس از نوع G/T بود. در همین مطالعه در ژن *OVATE*، ۸۰ درصد جهش‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۴۰ درصد A/G، ۴۰ درصد T/C و ۲۰ درصد جهش از نوع ناهمجس (T/G) بود (۱۴). در تحقیق حاضر نیز در ژن *PG*، ۶۶/۷ درصد جهش‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۳۳/۳ درصد A/G، ۳۳/۳ درصد T/C و ۳۲/۳ درصد جهش از نوع ناهمجس با فراوانی ۱۶/۱۶ درصد T/A و ۱۶/۱۶ درصد از نوع G/C بود. در ژن *PEI* که ۷۵ درصد جهش‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۵۰ درصد A/G، ۲۵ درصد T/C و ۲۵ درصد جهش‌ها از نوع ناهمجس (C/A) بود. در مطالعه ۶۰ ژنوتیپ در گیاه ریحان نیز، در ژن لینالول سینتاز از ۹ SNP شناسایی شده، به ترتیب چهار و پنج SNP در نواحی اینترونی و اگزونی مشاهده شد که ۷۷/۷۸ درصد آنها از نوع همجنس با فراوانی ۴۴/۴۴ درصد A/G و ۳۳/۳۳ درصد T/C و ۲/۲۲

منابع

1. Aizi, M. and B. Abdollahi Mandoulakani. 2017. Identification of SNPs in exonic regions of eugenol O-methyl transferase and chavicol O-methyl transferase genes in basil. *Agricultural Biotechnology Journal*, 10(1): 117-105 (In Persian).
2. Alexander, L. and D. Grierson. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2039-2055.
3. Aliyari, S. and B. Abdollahi Mandoulakani. 2020. SNP discovery in exon and intron regions of Linalool synthase and Germacrene D synthase genes in basil. *Journal of Plant Research*, 33(3): 566-578 (In Persian).
4. Bennett, A.B. and J.M. Labavitch. 2008. Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. *Plant Science*, 175: 130-136.
5. Brummell, D.A. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33: 103-119.
6. Brummell, D.A. and M.H. Harpster. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 47: 311-340.
7. Eriksson, E.M., A. Bovy, K. Manning, L. Harrison, J. Andrews, J. De Silva, G.A. Tucker and G.B. Seymour. 2004. Effect of the colorless non-ripening mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 136: 4184-4197.
8. Foroud, G.N., S.J. Mousavizadeh, V. Akbarpour and K. Mashayekhi. 2021. Fruit heritability and the effect of pollen on fruit set of some tomato (*Solanum esculentum* Mill.) accessions. *Journal of Crop Breeding*, 13(39): 77-86 (In Persian).
9. Gross, K.C. and C.E. Sams. 1984. Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry*, 23: 2457-2461.
10. Heid, I.M., E. Boes, A.M. Muller, B. Kollerits, C. Lamina, S. Coassin, C. Gieger, A. Doring, N. Kloop and R. Frikke-Schmidt. 2008. Genome-wide association analysis of high-density lipoprotein cholesterol in the population-based KORA Study sheds new light on intergenic regions. *Circulation Cardiovascular Genetics*, 1: 10-20.
11. Huang, X., X. Wei, T. Sang, Q. Zhao, Q. Feng, Y. Zhao, C. Li, C. Zhu, T. Lu and Z. Zhang. 2010. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nature Genetics*, 42: 961-967.
12. Joanne, A.L. and M.B. Angela. 2005. Tomato SNP discovery by EST mining and resequencing. *Molecular Breeding*, 16: 343-349.
13. Kaczkowski, J. 2003. Structure, function and metabolism of plant cell wall. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25: 287-305.
14. Khademian, R., N.A. Babaeian Jelodar, S.M. Khayam Nekouie, M. Mardi, B. Nakhoda. 2016. Designing specific primers to study single nucleotide diversity (SNP) of genes and to determine their performance. *Journal of Crop Breeding*, 7(16): 130-138 (In Persian).
15. Khezerloo S. and B. Abdollahi Mandoulakani. 2021. Studying SNPs in *SUN* and *OVATE* genes responsible for fruit shape in tomato. *Journal of Horticultural Science*, 35(2): 169-182 (In Persian).
16. Kim, J., K.C. Gross and T. Solomos. 1991. Galactose metabolism and ethylene production during development and ripening of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 1: 67-80.
17. Kochakinezhad, H., G.H. Peyvast Kashi, A. Olfati and J. Asadi. 2012. A comparison of organic and chemical fertilizer for tomato production. *Journal of Organic Systems*, 7(2): 14-25 (In Persian).
18. Ku, H., T. Vision, J. Liu and S. Tanksly. 2000. Comparing sequenced segments of the tomato and Arabidopsis genomes: Large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 9121-9126.
19. Manning, K., M. Tör, M. Poole, Y. Hong, A.J. Thompson, G.J. King, J.J. Giovannoni and G.B. Seymour. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics*, 38: 948-952.
20. Micheli, F. 2001. Pectin methyl esterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6: 414-419.
21. Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 266-277.
22. Powell, A.L.T., M.S. Kalamaki, P.A. Kurien, S. Gurrieri and A.B. Bennett. 2003. Simultaneous transgenic suppression of *LePG* and *LeExp1* influences fruit texture and juice viscosity in a fresh market tomato variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7450-7455.
23. Rose, J.K.C. and A.B. Bennett. 1999. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science*, 4: 176-183.
24. Saleem, M.Y., M. Asghar, Q. Iqbal, A. Rahman and M. Akram. 2013. Diallel analysis of yield and some yield components in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 45(4): 1247-1250.

25. Seymour, G.B. and K.C. Gross. 1996. Cell wall disassembly and fruit softening. *Postharvest News and Information*, 7: 45-52.
26. Shi, J. and M. Maguer. 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1): 1-42.
27. The Tomato Genome Consortium. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485: 635-641.
28. Themmen, A.P.N., G.A. Tucker and D. Grierson. 1982. *Plant Physiology*, 69: 122-124
29. Vrebalov, J., D. Ruezinsky, V. Padmanabhan, R. White, D. Medrano, R. Drake, W. Schuch and J. Giovannoni. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus. *Science*, 296: 343-346.
30. Yang, W., X. Bai, C. Eaton and E. Kamoun. 2004. Discovery of single nucleotide polymorphisms in *Lycopersicon esculentum* by computer aided analysis of expressed sequenced tags. *Molecular Breeding*, 14: 21-34.

Identification of SNPs in Pectin Esterase 1 (*PEI*) and Polygalacturonase (*PG*) Genes of Tomato

Shirzad Ebrahimi¹, Amir Fayyaz Moghaddam², Babak Abdollahi Mandoulakani³ and Samaneh Aliyari⁴

1- Graduated M.Sc. Student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University

2- Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University

3- Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University,

(Corresponding author: b.abdollahi@urmia.ac.ir)

4- Ph.D. Student, Department of Plant Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

Received: 27 December, 2021

Accepted: 3 April, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most important crops belonging to the Solanaceae family. The fruit fleshiness is one of the important traits affecting the quality of tomato fruit which quantitatively inherited. Pectin esterase 1 (*PEI*) and polygalacturonase (*PG*) are two important genes involved in fruit fleshiness of tomato. Given the important role of these genes in tomato fruit quality, the identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the coding regions of these genes may be necessary to produce functional markers associated with fruit firmness.

Material and Methods: In this study, 96 genotypes from 12 populations collected from different regions of West Azerbaijan Province (Iran) and Turkey were grown in the research greenhouse of the Faculty of Agriculture, Urmia University. To identify SNPs in *PEI* and *PG* genes, specific primers were designed using FastPCR software to amplify fragments of coding regions of these genes in 96 tomato genotypes. PstI and TruI enzymes were used to digest the amplified fragments of the two genes. Due to the lack of polymorphisms in the digested patterns of the enzymes used, four individuals from different populations were selected and their amplified fragments were purified and sequenced. After the retrieval of the sequenced fragments, SNPs were identified using multiple alignments of the sequences of each gene using Clustal Omega.

Results: Four SNPs were identified in *PEI*, of which 75% was transition with a frequency of 50% A/G, 25% T/C, and 25% of the mutations were transversion (C/A). In *PG* gene, six SNPs were identified, 66.7% of which was transition with a frequency of 33.3% A/G and 33.3% T/C, while 32.3% of mutations was transversion with a frequency of 16.16% T/A and 16.16% G/C.

Conclusion: In general, the results of the present study showed that the mean number of SNPs per 100 bp of exons of *PEI* and *PG* is 1.22 and 0.41, respectively. Also, the frequency of SNPs in *PG* gene was less than that of *PEI*. The low number of SNPs observed in the exons of both genes indicates the conserved status of the coding regions of these genes during tomato evolution. Also, identified SNPs in the current investigation could be used in tomato breeding programs for production of functional markers associated with fruit firmness.

Keywords: Fruit fleshiness, Single nucleotide diversity, Pectin esterase 1 gene, Polygalacturonase gene, Tomato