



## "مقاله پژوهشی"

# شناسایی SNP‌ها در ژن‌های پکتین استراز ۱ و پلی گالاکتوروناز گوجه‌فرنگی

شیرزاد ابراهیمی<sup>۱</sup>, امیرفیاض مقدم<sup>۲</sup>, بابک عبدالهی مندولکانی<sup>۳</sup> و سمانه علیاری<sup>۴</sup>

- 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 مسؤول: ir.(b.abdollahi@urmia.ac.ir)  
 ۴- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه تبریز  
 تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۶  
 تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۰  
 صفحه: ۱۵۷ تا ۱۵۸

### چکیده مبسوط

**مقدمه و هدف:** گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی متعلق به خانواده *Solanaceae* می‌باشد. گوشته بودن میوه از صفات مهم موثر در کیفیت میوه گوجه‌فرنگی بوده و توارث کمی دارد. از جمله ژن‌های دخیل در گوشته بودن میوه گوجه‌فرنگی ژن‌های پکتین استراز ۱ (PEI) و پلی گالاکتوروناز (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 جمیعت جم اوری شده از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی (ایران) و ترکیه در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه کشاورزی ارومیه کشت شد. برای شناسایی SNP‌ها در ژن‌های PG و PEI، 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 PstI و TruI استفاده شد. با توجه به عدم وجود چندشکلی در الگوهای برشی حاصل از هضم آنزیمی، چهار فرد از جمیعت‌های مختلف انتخاب و قطعه تکثیری در این افراد خالص‌سازی و توالی‌یابی شد. بعد از بازیابی قطعه تکثیری هر ژن، شناسایی SNP‌ها با استفاده از هم‌دیفی تووالی‌های هر ژن با نرم‌افزار Clustal Omega انجام گرفت.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج هم‌دیفی، در ژن PEI SNP شناسایی شد که ۷۵ درصد آنها از نوع همجنس با فراوانی ۵۰ درصد G/A, ۲۵ درصد C/T و ۲۵ درصد جهش‌ها از نوع ناهمجنس C/A بود. در ژن PG شش SNP شناسایی شد که ۶۷ درصد آنها از نوع همجنس با فراوانی ۳۳/۳ درصد A/G, ۳۳/۳ درصد T/C و ۳۲/۳ 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 آگرون ژن‌های PEI و PG به ترتیب ۱/۲۲ و ۰/۴۱ است. همچنین فراوانی SNP‌ها در ژن PG کمتر از PEI بود. تعداد کم مشاهده شده در آگرون‌های هر دو ژن نشانگر حفاظت شدگی مناطق کدکننده این ژن‌ها در طول تکامل گوجه‌فرنگی می‌باشد. همچنین 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 گالاکتوروناز، گوشته بودن میوه، گوجه‌فرنگی

**مقدمه**  
**مولکولی، ژن‌های مختلفی در گوشته بودن میوه گوجه‌فرنگی**  
 دخالت دارند، از جمله این ژن‌ها می‌توان به<sup>۱</sup> PG و PEI<sup>۲</sup> اشاره کرد: آنزیم پکتین متیل استراز ۱ (PEI) یا پکتین استراز در گیاهان نقش مهمی در متابولیسم دیواره سلولی در زمان رسیدگی دارد. این آنزیم دی استریفیکاسیون 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<sup>(۲۶)</sup>. مطالعات نشان می‌دهد که بسیاری از فعالیت‌های دیواره سلولی در تعییرات بافت میوه دخیل هستند<sup>(۲۴,۲۴)</sup>. این تعییرات دیواره سلولی شامل فرآیندهایی مانند خشی‌سازی و دی‌پلیمریزاسیون پکتین‌ها می‌باشد<sup>(۵)</sup>. آنزیم پلی گالاکتوروناز (PG) از طریق تجزیه پلی گالاکتورونان موجود در دیواره سلولی به وسیله هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی اسید گالاکتورونیک (جزء کربوهیدراته مهم پکتین) موجب تجزیه پکتین شده و باعث نرمی بافت میوه می‌شود. در واقع بیان ژن PG باعث تجزیه گالاکتورونیک باقی‌مانده در دیواره سلولی می‌شود که یکی از تعییرات مهم پکتین هنگام توسعه میوه است<sup>(۹)</sup>.

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

**گوجه‌فرنگی** (*Solanum lycopersicum* L.) از تیره Solanaceae و جنس Lycopersicum می‌باشد<sup>(۱۵)</sup>. همچنین منبع با ارزشی از ویتامین‌های A, C و حاوی مواد معدنی بسیاری از جمله کلسیم، آهن، منگنز، روی و پتاسیم و آنتی‌اکسیدان لیکوپین و رنگدانه‌هایی مثل بتاکاروتن می‌باشد<sup>(۲۲)</sup>. لیکوپین از قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار است به همین دلیل در درمان برخی از بیماری‌ها مانند پرسوتات، 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 لیکوپین مصرفی از گوجه‌فرنگی و فرآوردهای آن تأمین می‌شود<sup>(۲۴)</sup>. گوجه‌فرنگی به عنوان گونه مدل برای اصلاح برای مقاومت به بیماری‌ها، نقشه‌یابی ژنتیکی، ایجاد کتابخانه ژنومی و توالی‌یابی ژنومی مطرح می‌باشد<sup>(۲۵)</sup>. همچنین به علت دیلوبیت بودن و اندازه ژنوم کوچکتر (۹۵۰ Mb) به عنوان یک گیاه مرجع در مطالعات نقشه‌یابی مقایسه‌ای استفاده می‌شود<sup>(۱۶)</sup>. کیفیت میوه گوجه‌فرنگی برای مصرف تازه با مجموعه‌ای از ویژگی‌های خارجی (اندازه، رنگ و گوشته) و داخلی (طعم، عطر و بافت) تعیین می‌شود. گوشته بودن میوه گوجه‌فرنگی یکی از صفات مربوط به کیفیت است که توسط چندین ژن کنترل می‌شود<sup>(۸)</sup>. براساس مطالعات ژنتیک

## طراحی آغازگر

ابتدا توالی ناحیه کدکننده دو ژن *PG* و *PEI* 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 *PG* و *PEI*) 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 آکارز ۱/۸ درصد الکتروفورز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام گرفت.

### همضم قطعات تکثیر شده ژن‌های مورد مطالعه

به منظور 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 ژنتوتیپ‌های مورد مطالعه (۹۶ ژنتوتیپ) با استفاده از آنزیمهای فوق الذکر بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده هضم شد. به منظور آشکارسازی قطعات حاصل از برش از الکتروفورز ژل آکارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت یک و نیم ساعت استفاده شد.

### توالی‌بایی

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 *PG* و *PEI* از روش توالی‌بایی استفاده شد. چهار فرد از جمیعت‌هایی با فاصله جغرافیایی دور از هم انتخاب و PCR انجام شد. سپس ۴۰ میکرولیتر از محصول PCR به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال و جهت خالص‌سازی و تعیین توالی به شرکت توپاژن (ایران) ارسال شد. با توجه به اینکه طول قطعه مشاهده شده برای ژن *PG* ۱۳۰۰ جفت باز بود برای قرائت کامل، توالی‌بایی 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* توالی‌بایی از جهت رفت انجام شد. قطعات توالی‌بایی شده بازیابی و سپس نواحی مشترک شناسایی و توالی‌ها BLAST شد. سپس هم‌ردیفی توالی‌ها برای شناسایی SNP با استفاده از نرمافزار Clustal Omega نجام گرفت.

یکی دیگر از مهم‌ترین عوامل برای گوشتی 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 تکثربندهای در گوچه‌فرنگی توسط کلونینگ موضعی شناسایی شده‌اند که اثر مهمنی بر روی رسیدن و بافت میوه دارند (۲۷، ۷، ۱۷). کاهش بیان این ژن‌ها به طور جداگانه اثر کمی روی بافت میوه دارند و باعث تولید میوه‌های کوچکتر می‌شوند (۲۰، ۲).

از جمله نشانگرهای DNA کارا که امروزه در مطالعات ژنتیکی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند SNP ها می‌باشند. SNP‌ها چندشکلی می‌باشند. چندشکلی می‌باشد در یک نوکلئوتید می‌باشند که منبع ژنتیکی عمده تغییرات فنوتیپی درون یک گونه بشمار می‌رond. نشانگرهای مبتنی بر SNP ها هم بارز و دو آلتی می‌باشند. کارایی بالای SNP‌ها، به دلیل حضور آنها در تمام نواحی ژنوم (اینtron‌ها و همچینیان اگرون‌ها) می‌باشد (۳). 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 SNP ها 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 گوشتی بودن میوه گوچه فرنگی و عدم شناسایی تنوع‌های تک نوکلئوتیدی در این ژن‌ها، هدف از این مطالعه شناسایی SNP‌ها در نواحی اگرونی این ژن‌ها در جمیعت‌های مختلف گوچه فرنگی به روش هم‌ردیفی چندگانه بود.

## مواد و روش‌ها

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

**استخراج DNA ژنومی** DNA ژنومی از برگ‌های جوان و سبز گیاه گوچه فرنگی به روش CTAB استخراج شد. به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA از الکتروفورز ژل آکارز یک درصد و اسپکتوفوتومتری استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات توده‌های گوجه‌فرنگی مورد استفاده در این مطالعه

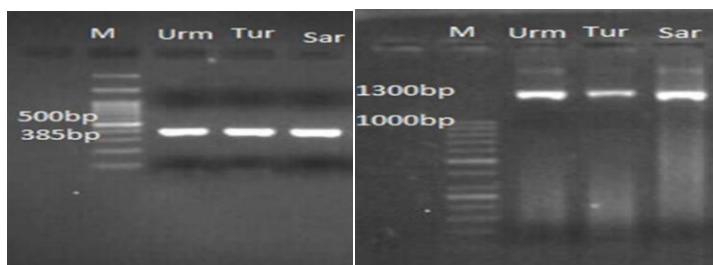
Table 1. Description of the tomato landraces used in the study

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

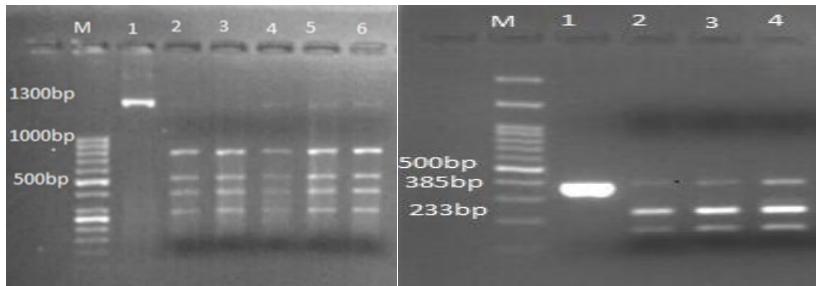
جدول ۲- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن‌های *PG* و *PE1* در گیاه گوجه‌فرنگیTable 2. Characteristics of the primers designed for amplification of *PG* and *PE1* genes in tomato

نام ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر	طول قطعه (جفت باز)
<i>PE1</i>	NM001247222.2	TTCCAGAAATGCCAGCTCGTA (F) GCATAGCTTAGCGGGATCAG (R)	۳۸۵
<i>PG</i>	X04583.1	GGAATAGTATTCTCCTCTC (F) ACATGTTCAGCATTGTTAAA (R)	۱۳۰

انجام گرفت نشان داد که چند جایگاه برشی آنزیم *PstI* در توالی این ژن موجود است ولی بعد از هضم قطعات تکثیری در ۹۶ ژنتوتیپ گوچه‌فرنگی چند شکلی مشاهده نگردید (شکل ۲). قطعات تکثیر شده ژن *PG* در ۹۶ ژنتوتیپ با آنزیم *TruI* 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 ۴۸۰، ۵۶۵ و ۲۴۶ جفت باز تولید شود که بعد از هضم و الکتروفورز پلی‌مورفیسمی مشاهده نشد (شکل ۲) بنابراین از آنزیم *PstI* 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 ژنتوتیپ‌های مختلف گوچه‌فرنگی (به ترتیب M: نشانگر اندازه ۱Kb: Fermentas) ارومیه، Tur: ترکیه، Sar: سرداشت  
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 *TruI* در ژنتوتیپ‌های مختلف گوچه‌فرنگی (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 *TruI* 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 بازه‌های A/G و C/A در این ژن مشاهده شد. بیشترین جهش در نواحی اگزونی مربوط به تبدیل بازه‌های A/G بود (شکل ۳ و جدول ۳).

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

```

PE_Tur      CTGCACAAAGGCAGGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTGGTTCTGTAACA
PE_Urm      CTGCACAAAGGCAGGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTGAGTCTGTAACA
PE_Sar      CTGCACAAAGGCAGGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTGAGTCTGTAACA
PE_Moh      CTGCACAAAGGCAGGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTGAGTCTGTAACA
*****  

PE_Tur      TAATAGCAAGTCGGACCTAGAACCGAGTCTGAAAGAATTCCAAACATATCTTGGTAGGC
PE_Urm      TAATAGCAAGTCGGACCTGGAACCTGGACCTGAAAGAATTCCAAACATATCTTGGTAGGC
PE_Sar      TAATAGCAAGTCGGACCTAGAACCGAGTCTGAAAGAATTCCAAACATATCTTGGTAGGC
PE_Moh      TAATAGCAAGTCGGACCTAGAACCGAGTCTGAAAGAATTCCAAACATATCTTGGTAGGC
*****  

PE_Tur      CATGGAAAAGAATATTCAAGAACTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAATC
PE_Urm      CATGGAAAAGAATATTCAAGAACTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAATC
PE_Sar      CATGGAAAAGAATATTCAAGAACTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAATC
PE_Moh      CATGGAAAAGAATATTCAAGAACTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAATC
*****  

PE_Tur      CAGCGGGTTGGGCCGAGTGGGACGGAGATTTGCGTTGAAGACATTGATTATGGTGAAT
PE_Urm      CAGCGGGTTGGGCTGAGTGGGACGGAGATTTGCGTTGAAGACATTGATTATGGTGAAT
PE_Sar      CAGCGGGTTGGGCTGAGTGGGACGGAGATTTGCGTTGAAGACATTGATTATGGTGAAT
PE_Moh      CAGCGGGTTGGGCTGAGTGGGACGGAGATTTGCGTTGAAGACATTGATTATGGTGAAT
*****  

PE_Tur      TTATGAACAAATGGACCTGGTGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
PE_Urm      TTATGAACAAATGGACCTGGTGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
PE_Sar      TTATGAACAAATGGACCTGGTGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
PE_Moh      TTATGAACAAATGGACCTGGTGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
*****  

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، Moh: مهاباد)،

Tur: ترکیه، Moh: مهاباد)؛ها 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 گوجه‌فرنگیTable 3. Frequency of SNPs identified in *PEI* gene in different tomato populations

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

۲۵ درصد T/C و ۲۵ درصد جهش از نوع ناهمجنس از نوع A/G بود. بیشترین نوع SNP در ناحیه اگزونی از نوع C/A می‌باشد.

ژن *PG* جهش مربوط به تبدیل بازه‌ای G/C, T/C, A/G و T/A مشاهده شد که بیشترین جهش مربوط به تبدیل بازه‌ای A/G و T/C بود (شکل ۴ و جدول ۴).

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

```

PG_Koy      GGAATAGTATTCTCCCTCTCATATTATTGCTTCATCAATTCAACTTGTAGAAGCA
PG_Sar      GGAATAGTATTCTCCCTCTCATATTATTGCTTCATCAATTCAACTTATAGAAGCA
PG_Urm      GGAATAGTATTCTCCCTCTCATATTATTGCTTCATCAATTCAACTTATAGAAGCA
PG_Tur      GGAATAGTATTCTCCCTCTCATATTATTGCTTCATCAATTCAACTTATAGAAGCA
*****  

PG_Koy      ATGTTATTGATGACAATTTATACAAACAAAGTTTGATAATTCTTGAAACAAGAATTTG
PG_Sar      ATGTTATTGATGACAATTTATCTAACAAAGTTTGATAATTCTTGAAACAAGAATTTG
PG_Urm      ATGTTATTGATGACAATTTATCTAACAAAGTTTGATAATTCTTGAAACAAGAATTTG
PG_Tur      ATGTTATTGATGACAATTTATCTAACAAAGTTTGATAATTCTTGAAACAAGAATTTG
*****  

PG_Koy      CTCATGATTTCAGCTTATCTTATTGAGCAAAAATTGAAAGCAACAAATAATA
PG_Sar      CTCATGATTTCAGCTTATCTTATTGAGCAAAAATTGAAAGCAACAAATAATA
PG_Urm      CTCATGATTTCAGCTTATCTTATTGAGCAAAAATTGAAAGCAACAAATAATA
PG_Tur      CTCATGATTTCAGCTTATCTTATTGAGCAAAAATTGAAAGCAACAAATAATA
*****  

PG_Koy      TTGACAAGGTGATAAAAATTGGGATTAAAGTGAATTATACTIAGCTTGGAGCTAAGG
PG_Sar      TTGACAAGGTGATAAAAATTGGGATTAAAGTGAATTATACTIAGCTTGGAGCTAAGG
PG_Urm      TTGACAAGGTGATAAAAATTGGGATTAAAGTGAATTATACTIAGCTTGGAGCTAAGG
PG_Tur      TTGACAAGGTGATAAAAATTGGGATTAAAGTGAATTATACTIAGCTTGGAGCTAAGG
*****  

PG_Koy      GTGATGGAAAAACATATGATAATTGCAATTGAGCAGCATGGAAATGAGCATGTTCAT
PG_Sar      GTGATGGAAAAACATATGATAATTGCAATTGAGCAGCATGGAAATGAGCATGTTCAT
PG_Urm      GTGATGGAAAAACATATGATAATTGCAATTGAGCAGCATGGAAATGAGCATGTTCAT
PG_Tur      GTGATGGAAAAACATATGATAATTGCAATTGAGCAGCATGGAAATGAGCATGTTCAT
*****  

PG_Koy      CTAGAACACCTGTCAATTGGGTCCCTAAAAACAAGAAATTCACTTCAAGCAAATCA
PG_Sar      CTAGAACACCTGTCAATTGGGTCCCTAAAAACAAGAAATTCACTTCAAGCAAATCA
PG_Urm      CTAGAACACCTGTCAATTGGGTCCCTAAAAACAAGAAATTCACTTCAAGCAAATCA
PG_Tur      CTAGAACACCTGTCAATTGGGTCCCTAAAAACAAGAAATTCACTTCAAGCAAATCA
*****  

PG_Koy      CCTTTTCAGGTCCATGCAGATCTTCAATTCTGAGAAAGATTGGATCCTTAGAACGAT
PG_Sar      CCTTTTCAGGTCCATGCAGATCTTCAATTCTGAGAAAGATTGGATCCTTAGAACGAT
PG_Urm      CCTTTTCAGGTCCATGCAGATCTTCAATTCTGAGAAAGATTGGATCCTTAGAACGAT
PG_Tur      CCTTTTCAGGTCCATGCAGATCTTCAATTCTGAGAAAGATTGGATCCTTAGAACGAT
*****  

PG_Koy      CTTGCAAAATAAAATAACTGCAGGATGCACCAACGCCCTAACCTCTGGA
PG_Sar      CTTGCAAAATAAAATAACTGCAGGATGCACCAACGCCCTAACCTCTGGA
PG_Urm      CTTGCAAAATAAAATAACTGCAGGATGCACCAACGCCCTAACCTCTGGA
PG_Tur      CTTGCAAAATAAAATAACTGCAGGATGCACCAACGCCCTAACCTCTGGA
*****  

PG_Koy      ATTGCAAAATTGAAAGTGAATAATCTAAAGAGTAAAATGCACAACAAATTCATATCA
PG_Sar      ATTGCAAAATTGAAAGTGAATAATCTAAAGAGTAAAATGCACAACAAATTCATATCA
PG_Urm      ATTGCAAAATTGAAAGTGAATAATCTAAAGAGTAAAATGCACAACAAATTCATATCA
PG_Tur      ATTGCAAAATTGAAAGTGAATAATCTAAAGAGTAAAATGCACAACAAATTCATATCA
*****  

PG_Koy      AATTGAGTCATGCACTAATGTTGAGCTCAAATTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
PG_Sar      AATTGAGTCATGCACTAATGTTGAGCTCAAATTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
PG_Urm      AATTGAGTCATGCACTAATGTTGAGCTCAAATTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
PG_Tur      AATTGAGTCATGCACTAATGTTGAGCTCAAATTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
*****  

PG_Tur      AATTGAGTCATGCACTAATGTTGAGCTCAAATTGATGATCAATGCTTCAGCAAAGA
*****  

PG_Koy      GCCCAAATAACTGATGGAGTCCATGTATAACTCAATATTCAAATATCTGATACTA
PG_Sar      GCCCAAATAACTGATGGAGTCCATGTATAACTCAATATTCAAATATCTGATACTA
PG_Urm      GCCCAAATAACTGATGGAGTCCATGTATAACTCAATATTCAAATATCTGATACTA
PG_Tur      GCCCAAATAACTGATGGAGTCCATGTATAACTCAATATTCAAATATCTGATACTA
*****  

PG_Koy      TTATGGAACAGGTGATGTTGATTTCATTGTTGTTCTGGAATCTCAAATGTGCAAGGCCA
PG_Sar      TTATGGAACAGGTGATGTTGATTTCATTGTTGTTCTGGAATCTCAAATGTGCAAGGCCA
PG_Urm      TTATGGAACAGGTGATGTTGATTTCATTGTTGTTCTGGAATCTCAAATGTGCAAGGCCA
PG_Tur      TTATGGAACAGGTGATGTTGATTTCATTGTTGTTCTGGAATCTCAAATGTGCAAGGCCA
*****  

PG_Koy      CAAATATTACTGGGTCCAGGTCTGGTATAAGTATTGGAAAGCTTAGGATCTGGAAATT
PG_Sar      CAAATATTACTGGGTCCAGGTCTGGTATAAGTATTGGAAAGCTTAGGATCTGGAAATT
PG_Urm      CAAATATTACTGGGTCCAGGTCTGGTATAAGTATTGGAAAGCTTAGGATCTGGAAATT
PG_Tur      CAAATATTACTGGGTCCAGGTCTGGTATAAGTATTGGAAAGCTTAGGATCTGGAAATT
*****  

PG_Koy      CAGAACGCTTATGGTCTAATGTTACTGTAATTGAGCCAAAATTCTGGTGCAGGCCAAAATG
PG_Sar      CAGAACGCTTATGGTCTAATGTTACTGTAATTGAGCCAAAATTCTGGTGCAGGCCAAAATG
PG_Urm      CAGAACGCTTATGGTCTAATGTTACTGTAATTGAGCCAAAATTCTGGTGCAGGCCAAAATG
PG_Tur      CAGAACGCTTATGGTCTAATGTTACTGTAATTGAGCCAAAATTCTGGTGCAGGCCAAAATG
*****  

PG_Koy      GAGTTAGGACTAAGACTGGCAGGGAGGTCTGGCACAGCTAGCAACATCAAATTCTGGA
PG_Sar      GAGTTAGGACTAAGACTGGCAGGGAGGTCTGGCACAGCTAGCAACATCAAATTCTGGA
PG_Urm      GAGTTAGGACTAAGACTGGCAGGGAGGTCTGGCACAGCTAGCAACATCAAATTCTGGA
PG_Tur      GAGTTAGGACTAAGACTGGCAGGGAGGTCTGGCACAGCTAGCAACATCAAATTCTGGA
*****  

PG_Koy      ATGTTGAAATGCAAGACGTTAAGTATCCCATAATTTATAGACCAAAACTATTGTGATCGAG
PG_Sar      ATGTTGAAATGCAAGACGTTAAGTATCCCATAATTTATAGACCAAAACTATTGTGATCGAG
PG_Urm      ATGTTGAAATGCAAGACGTTAAGTATCCCATAATTTATAGACCAAAACTATTGTGATCGAG
PG_Tur      ATGTTGAAATGCAAGACGTTAAGTATCCCATAATTCATAGACCAAAACTATTGTGATCGAG
*****  

PG_Koy      TTGAACCATGTATAACACAGTTTCAAGCAGTCAGTGAAGGATGTTGTTGATGAGAATA
PG_Sar      TTGAACCATGTATAACACAGTTTCAAGCAGTCAGTGAAGGATGTTGTTGATGAGAATA
PG_Urm      TTGAACCATGTATAACACAGTTTCAAGCAGTCAGTGAAGGATGTTGTTGATGAGAATA
PG_Tur      TTGAACCATGTATAACACAGTTTCAAGCAGTCAGTGAAGGATGTTGTTGATGAGAATA
*****  

PG_Koy      TCAAGGGCACAAGTGCACAAAGGTGGCATAAAAATTGATGTCAGCACAAACTTCCAT
PG_Sar      TCAAGGGCACAAGTGCACAAAGGTGGCATAAAAATTGATGTCAGCACAAACTTCCAT
PG_Urm      TCAAGGGCACAAGTGCACAAAGGTGGCATAAAAATTGATGTCAGCACAAACTTCCAT
PG_Tur      TCAAGGGCACAAGTGCACAAAGGTGGCATAAAAATTGATGTCAGCACAAACTTCCAT
*****  

PG_Koy      CTGAAGGAATTATAATGGGAAATAAAATTAGTAGGGGAAAGTGGAAAACCACATCAGAGG
PG_Sar      CTGAAGGAATTATAATGGGAAATAAAATTAGTAGGGGAAAGTGGAAAACCACATCAGAGG
PG_Urm      CTGAAGGAATTATAATGGGAAATAAAATTAGTAGGGGAAAGTGGAAAACCACATCAGAGG
PG_Tur      CTGAAGGAATTATAATGGGAAATAAAATTAGTAGGGGAAAGTGGAAAACCACATCAGAGG
*****  

PG_Koy      CTACGTGCAAAATGTCCATTAAACATGCTGAACATGT
PG_Sar      CTACGTGCAAAATGTCCATTAAACATGCTGAACATGT
PG_Urm      CTACGTGCAAAATGTCCATTAAACATGCTGAACATGT
PG_Tur      CTACGTGCAAAATGTCCATTAAACATGCTGAACATGT
*****
```

شکل ۴- هم‌دیفی چندگانه توالی نواحی اکرونی ژن *PG* در چهار جمعیت مختلف گوجه‌فرنگی (Urm: ارومیه، Sar: خوشی، Koy: کوی، Tur: ترکیه)؛ سردشت، Sar به صورت پرنگ 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 گوجه‌فرنگیTable 4. Frequency of SNPs identified in *PG* gene in different tomato populations

SNP درصد	SNP تعداد	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 ناهمجنس با فراوانی یکسان ناشی از تبدیلات G/C و A/C بود. در ژن ژرماتکرین D سیستاز 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 ۷/۱۴ درصد جهش از نوع ناهمجنس با ۱۵/۳۳ درصد A/T, ۱۰/۷۳ G/C و ۱۰/۱۰ درصد C/A بود (۳). در بررسی دیگری در ۸۰ فرد از ۸ توode 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 (G/A, C/T, G/C, A/T) شناسایی شد که بیشترین نوع SNP‌ها از نوع همجنس بود (۱). در تحقیق حاضر نیز در نواحی اگزونی ژن *PE1* و ژن *PG* شش SNP *PE1* مشاهده گردید. پیشنهاد می‌شود از این نوع A/G و T/C از نوع A/G و A/G گام بهتر است. همچنین ارتباط بین SNP‌ها در شناسایی شده در این تحقیق در برنامه‌های اصلاح انتخاب ژنومی، نقشه یابی ارتباطی و مطالعه تکامل جمعیت استفاده شود. همچنین گوشتی بودن میوه گوجه فرنگی به مطالعه 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 *PE1* 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 *PE1* کمتر بود. همچنین تنوع های تک نوکلئوتیدی در نواحی اگزونی ژن‌های مورد مطالعه کم بود که نشانگر محفوظ بودن نواحی کدکننده این ژنهای در طول تکامل گوجه فرنگی می‌باشد.

در ژن *PG* شش SNP در نواحی اگزونی شناسایی شد. نسبت جهش‌های همجنس به ناهمجنس ۲:۱ بود بطوریکه ۶۶/۷ درصد جهش‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۳۳/۳ درصد A/G و ۳۲/۳ درصد T/C و ۳۲/۳ درصد جهش از نوع ناهمجنس 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 نواحی اگزونی مشاهده شد. در حالیکه در کل توالی ژن *PE1* به ازای هر ۱۰۰ جفت باز بطور میانگین ۱/۲۲ SNP در نواحی اگزونی شناسایی گردید. دلیل فراوانی کم تعداد SNP در نواحی اگزونی احتمال به علت کمبود جهش در ناحیه کد کننده ژنی و محفوظ بودن آن در طول تکامل گیاه می‌باشد (۱). در تحقیقی با بررسی بیش از ۱۵ لاینگوجه فرنگی با استفاده از روش توالی یابی مجدد قطعات تکشیری، SNP ۵۵ شناسایی شد که ۲۹ در SNP ۲۶ در ناحیه اینترونی و ۲۶ در ناحیه اگزونی بود (۱۱). در تحقیق حاضر نیز در نواحی اگزونی دو ژن *PG* و *PE1* در مطالعه های SNP میانگین ۰/۴۱ (Cucurbita pepo L.) با استفاده از تکنولوژی *UPV* ۶۶ MU وجود دارد. تخمه کاغذی (Cucurbita pepo L.) در تعداد ۱۹۹۸۰ SNP ۴۵۴ Roch ۴۵۴ گزارش شد که از این تعداد ۶۸ درصد مربوط به ژنهای ناشی از جهش همجنس با فراوانی یکسان A/G و ۳۲ C/T درصد ناشی از جهش ناهمجنس با فراوانی یکسان A/C A/T C/G و G/T بود. در مطالعه های SNP ۶۶ در شکل میوه (OVATE و SUN) در ۹۶ ژنوتیپ گوجه فرنگی، در ژن SUN ۸۰ درصد ژنهای از نوع همجنس با فراوانی ۰/۳۰ درصد G/A و ۰/۵۰ درصد C/T و ۰/۲۰ G/T بود. در همین مطالعه در ژن ناهمجنس از نوع G/T درصد جهش در ژن Ovate ۸۰ درصد جهش‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۰/۴۰ درصد A/G و ۰/۴۰ درصد T/C و ۰/۲۰ درصد جهش از نوع ناهمجنس (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 و ۳۳/۳ درصد T/C و ۳۲/۳ درصد جهش از نوع ناهمجنس با فراوانی ۱۶/۱۶ درصد T/A و ۱۶/۱۶ درصد از نوع G/C بود. در ژن PE1 که ۷۵ درصد جهش‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۰/۵۰ درصد A/G و ۰/۲۵ درصد T/C و ۰/۲۵ درصد جهش‌ها از نوع ناهمجنس (C/A) بود. در مطالعه ۶۰ ژنوتیپ در گیاه ریحان نیز، در ژن لینالول سیستاز از نه 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

- 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).
- 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.
- 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).
- 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.
- Brummell, D.A. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. Functional Plant Biology, 33: 103-119.
- 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.
- 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.
- 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).
- 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.
- Heid, I.M., E. Boes, A.M. Muller, B. Kollerits, C. Lamina, S. Coassini, 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.
- 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.
- Joanne, A.L. and M.B. Angela. 2005. Tomato SNP discovery by EST mining and resequencing. Molecular Breeding, 16: 343-349.
- Kaczkowski, J. 2003. Structure, function and metabolism of plant cell wall. Acta Physiologae Plantarum, 25: 287-305.
- 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).
- 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).
- 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.
- 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).
- 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.
- 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.
- Micheli, F. 2001. Pectin methyl esterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. Trends in Plant Science, 6: 414-419.
- Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. Current Opinion in Plant Biology, 11: 266-277.
- 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.
- 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.
- 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. Themen, 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 (*PE1*) and Polygalacturonase (*PG*) Genes of Tomato

Shirzad Ebrahimi<sup>1</sup>, Amir Fayyaz Moghaddam<sup>2</sup>, Babak Abdollahi Mandoulakani<sup>3</sup> and Samaneh Aliyari<sup>4</sup>

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 (*PE1*) 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 *PE1* 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 *PE1*, 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 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 *PE1* and *PG* is 1.22 and 0.41, respectively. Also, the frequency of SNPs in *PG* gene was less than that of *PE1*. 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