



"مقاله پژوهشی"

شناسایی SNPها در ژنهای پکتین استراز ۱ و پلی گالاتکتوروناز گوجه‌فرنگی

شیرزاد ابراهیمی^۱، امیرفیاض مقدم^۲، بابک عبدالمهی 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: ۱۴۰۰/۱۰/۶ 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 (*PE1*) 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 *PE1* 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 *PE1* 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 *PE1* و *PG* به ترتیب ۱/۲۲ و ۰/۴۱ است. همچنین فراوانی SNPها در ژن *PG* کمتر از *PE1* 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 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 *PE1* و *PG* اشاره کرد: آنزیم پکتین متیل استراز ۱ (*PE1*) 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 (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 دی‌پلمیریزاسیون پکتین‌ها می‌باشد (۵). آنزیم پلی گالاتکتوروناز (*PG*) از طریق تجزیه پلی‌گالاتکتورونان 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 *PE1* و *PG* از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج و آغازگرهای اختصاصی هر ژن (جدول ۲) با نرم افزار FastPCR طراحی و از نظر وجود ساختارهای ثانویه مثل آغازگر -دایمر و ساختارهای سنجاق سری بررسی شد.

واکنش های PCR

برنامه دمایی PCR به منظور تکثیر قطعات دو ژن مذکور (قطعاتی به طول ۳۸۵ و ۱۳۰۰ جفت باز به ترتیب برای ژن های *PE1* و *PG*) شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ ثانیه در دمای اتصال ۵۹ درجه سانتی گراد برای ژن *PE1* و برای ژن *PG* دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی گراد، دو دقیقه برای گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و گسترش نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ سانتی گراد 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 ژن های مورد مطالعه

به منظور هضم قطعات تکثیر شده دو ژن با آنزیم های *PstI* و *TruI* (Fermentas، آلمان)، ابتدا الگوی برشی و طول قطعات حاصل از برش ژن ها با استفاده از نرم افزار FastPCR پیش بینی شد. سپس قطعات تکثیر شده دو ژن در ژنوتیپ های مورد مطالعه (۹۶ ژنوتیپ) با استفاده از آنزیم های فوق الذکر بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده هضم شد. به منظور آشکارسازی قطعات حاصل از برش از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت یک و نیم ساعت استفاده شد.

توالی یابی

با توجه به اینکه هضم آنزیمی توالی های تکثیری دو ژن در افراد مطالعه شده چندشکلی تولید نکرد، بنابراین برای شناسایی SNP ها در نواحی کدکننده ژن های *PE1* و *PG* از روش توالی یابی استفاده شد. چهار فرد از جمعیت هایی با فاصله جغرافیایی دور از هم انتخاب و PCR انجام شد. سپس ۴۰ میکرولیتر از محصول PCR به تیوپ های ۱/۵ میلی لیتری انتقال و جهت خالص سازی 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، توالی یابی 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 *PE1* توالی یابی از جهت رفت انجام شد. قطعات توالی یابی شده باز یابی و سپس نواحی مشترک شناسایی و توالی ها BLAST شد. سپس هم ردیفی توالی ها برای شناسایی SNP با استفاده از نرم افزار Clustal Omega انجام گرفت.

یکی دیگر از مهم ترین 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 می شود (۲۶). چند جهش تک ژنی در گوجه فرنگی توسط کلونینگ موضعی شناسایی شده اند که اثر مهمی بر روی رسیدن و بافت میوه دارند (۲۷، ۷، ۱۷). کاهش بیان این ژن ها به طور جداگانه اثر کمی روی بافت میوه دارند و باعث تولید میوه های کوچکتر می شوند (۲۰، ۲).

از جمله نشانگرهای DNA کارا که امروزه در مطالعات ژنتیکی بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند SNP ها می باشند. SNP ها چندشکلی مبتنی بر تفاوت در یک نوکلئوتید می باشند که منبع ژنتیکی عمده تغییرات فنوتیپی درون یک گونه بشمار می روند. نشانگرهای مبتنی بر SNP ها هم بارز و دو آلی می باشند. کارایی بالای SNP ها، به دلیل حضور آنها در تمام نواحی ژنوم (اینترون ها و همچنین اکزون ها) می باشد (۱۳). هر فرد متعلق به یک گونه، دارای هزاران SNP می باشد که ترکیب این تنوع ها باعث می شود فنوتیپ هر فرد بصورت منحصر به فرد تظاهر 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 ژن های *PE1* و *PG* در کنترل گوستی بودن میوه گوجه فرنگی و عدم شناسایی تنوع های تک نوکلئوتیدی در این ژن ها، هدف از این مطالعه شناسایی SNP ها در نواحی اکزونی این ژن ها در جمعیت های مختلف گوجه فرنگی به روش هم ردیفی چندگانه بود.

مواد و روش ها

در این تحقیق ۹۶ ژنوتیپ از ۱۲ جمعیت که از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی (ارومیه، اشنویه، پیرانشهر، نقده، بوکان، مهاباد، سلماس، سردشت، میاندواب، قره ضیاءالدین و خوی) و کشور ترکیه جمع آوری شده بود استفاده گردید (جدول ۱). بذور جمعیت های گوجه فرنگی جهت استخراج DNA در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه کشت گردید. بعد از رسیدن گیاهان به مرحله ۴-۶ برگ، نمونه برداری از برگ های گوجه فرنگی برداشت و درون نیتروژن مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شد.

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی از برگ های جوان و سبز گیاه گوجه فرنگی 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 گوجه فرنگی مورد استفاده در این مطالعه

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

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

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

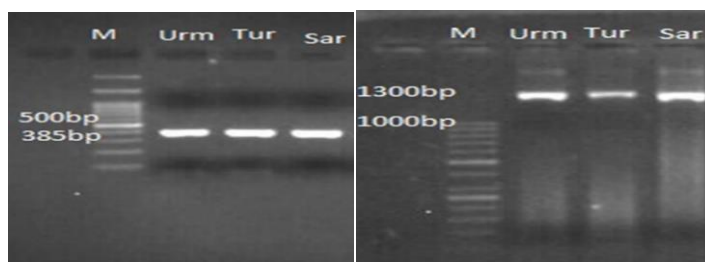
طول قطعه (جفت باز)	توالی آغازگر	شماره دسترسی	نام ژن
۳۸۵	TTCCAGAAATGCCAGCTCGTA (F) GCATAGCTTTAGCGGGATCAG (R)	NM001247222.2	<i>PE1</i>
۱۳۰۰	GGAATAGTATTCTCTCTCTC (F) ACATGTTCAGCATTGTATAA (R)	X04583.1	<i>PG</i>

نتایج و بحث

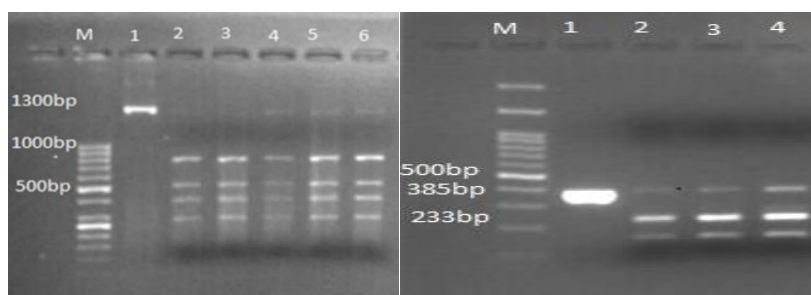
تکثیر قطعات ژنی و هضم آنزیمی

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 پلی‌مورفسمی 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.

به‌منظور 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 *PE1* تکثیر شد (شکل ۱). سپس قطعات تکثیری ژن *PE1* 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 باز تولید شود که بعد از برش با این آنزیم پلی‌مورفسمی مشاهده نشد. بنابراین، قطعات تکثیری ژن *PE1* با آنزیم *Pst1* نیز هضم شد. با بررسی‌هایی که روی توالی این ژن با نرم‌افزار FastPCR



شکل ۱- تکثیر ژن‌های *PG* (سمت راست) و *PE1* (سمت چپ) به‌ترتیب به اندازه‌های ۳۸۵ و ۱۳۰۰ جفت باز در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی (به‌ترتیب M: نشانگر اندازه ۱Kb (Fermentas، آلمان)، Urm: ارومیه، Tur: ترکیه، Sar: سردشت)
Figure 1. Amplified fragments of the *PG* (left) and *PE1* (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 *PE1* (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 *PE1* 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 *PE1* (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 *PE1* gene, M: 1Kb DNA ladder, lane 1: no digestion, lane 2-4: digested fragments)

ژن *PE1*، 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 *PE1* بر اساس نتایج همردیفی بین توالی نمونه‌های انتخابی جمعیت‌های ارومیه، ترکیه، سردشت و مهاباد در نواحی اگزونی

```

PE_Tur      CTGCACAAGGCAGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTCTGGTTCTGTAACA
PE_Urm      CTGCACAAGGCAGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTCTGGTTCTGTAACA
PE_Sar      CTGCACAAGGCAGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTCTGGTTCTGTAACA
PE_Moh      CTGCACAAGGCAGGACGGACCCAAATCAGGCCACGGGGACATCAATTCTGGTTCTGTAACA
*****
PE_Tur      TAATAGCAAGTTCGGACCTAGAACCAGTCTCTGAAAGAATTCCCAACATATCTTGGTAGGC
PE_Urm      TAATAGCAAGTTCGGACCTAGAACCAGTCTCTGAAAGAATTCCCAACATATCTTGGTAGGC
PE_Sar      TAATAGCAAGTTCGGACCTAGAACCAGTCTCTGAAAGAATTCCCAACATATCTTGGTAGGC
PE_Moh      TAATAGCAAGTTCGGACCTAGAACCAGTCTCTGAAAGAATTCCCAACATATCTTGGTAGGC
*****
PE_Tur      CATGGAAGAATATTCAAGAACTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAATC
PE_Urm      CATGGAAGAATATTCAAGAACTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAATC
PE_Sar      CATGGAAGAATATTCAAGAACTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAATC
PE_Moh      CATGGAAGAATATTCAAGAACTGTAGTGATGGAATCATACTTAGGTGGTCTCATTAATC
*****
PE_Tur      CAGCGGGTTGGGCGGAGTGGGACGGAGATTTTGCCTTGAAGACATTGTATTATGGTGAAT
PE_Urm      CAGCGGGTTGGGCTGAGTGGGACGGAGATTTTGCCTTGAAGACATTGTATTATGGTGAAT
PE_Sar      CAGCGGGTTGGGCTGAGTGGGACGGAGATTTTGCCTTGAAGACATTGTATTATGGTGAAT
PE_Moh      CAGCGGGTTGGGCTGAGTGGGACGGAGATTTTGCCTTGAAGACATTGTATTATGGTGAAT
*****
PE_Tur      TTATGAACAATGGACCTGGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
PE_Urm      TTATGAACAATGGACCTGGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
PE_Sar      TTATGAACAATGGACCTGGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
PE_Moh      TTATGAACAATGGACCTGGTCTGGTACTAGTAAGCGTGTCAAGTGGCCTGGTTATCATG
*****
PE_Tur      TCATTACTGATCCCGCTAAAGCTATGCAA
PE_Urm      TCATTACTGATCCCGCTAAAGCTATGCAA
PE_Sar      TCATTACTGATCCCGCTAAAGCTATGCAA
PE_Moh      TCATTACTGATCCCGCTAAAGCTATGCAA
*****

```

شکل ۳- هم‌ردیفی چندگانه توالی نواحی اگزونی ژن *PE1* 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 *PE1* 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 *PE1* در جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی

Table 3. Frequency of SNPs identified in *PE1* gene in different tomato populations

درصد SNP	تعداد SNP	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 C/A بود. بیشترین نوع SNP در ناحیه اگزونی 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).

در ژن *PE1* 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      GGAATAGTATTCTCCTTCTCATTATTATTTTGGCTTCATCAATTTCAACTTGTAGAAGCA
PG_Sar      GGAATAGTATTCTCCTTCTCATTATTATTTTGGCTTCATCAATTTCAACTTATAGAAGCA
PG_Urm      GGAATAGTATTCTCCTTCTCATTATTATTTTGGCTTCATCAATTTCAACTTATAGAAGCA
PG_Tur      GGAATAGTATTCTCCTTCTCATTATTATTTTGGCTTCATCAATTTCAACTTATAGAAGCA
*****
PG_Koy      ATGTTATTGATGACAATTTATACAAAACAAGTTTATGATAATATTCTTGAACAAGAATTTG
PG_Sar      ATGTTATTGATGACAATTTATTCAAAACAAGTTTATGATAATATTCTTGAACAAGAATTTG
PG_Urm      ATGTTATTGATGACAATTTATTCAAAACAAGTTTATGATAATATTCTTGAACAAGAATTTG
PG_Tur      ATGTTATTGATGACAATTTATTCAAAACAAGTTTATGATAATATTCTTGAACAAGAATTTG
*****
PG_Koy      CTCATGATTTTCAAGCTTATCTTTCTTATTGAGCAAAAATATTGAAAGCAACAATAATA
PG_Sar      CTCATGATTTTCAAGCTTATCTTTCTTATTGAGCAAAAATATTGAAAGCAACAATAATA
PG_Urm      CTCATGATTTTCAAGCTTATCTTTCTTATTGAGCAAAAATATTGAAAGCAACAATAATA
PG_Tur      CTCATGATTTTCAAGCTTATCTTTCTTATTGAGCAAAAATATTGAAAGCAACAATAATA
*****
PG_Koy      TTGACAAGGTTGATAAAAAATGGGATTAAAGTGATTAAATATACTTAGCTTTGGAGCTAAGG
PG_Sar      TTGACAAGGTTGATAAAAAATGGGATTAAAGTGATTAAATATACTTAGCTTTGGAGCTAAGG
PG_Urm      TTGACAAGGTTGATAAAAAATGGGATTAAAGTGATTAAATATACTTAGCTTTGGAGCTAAGG
PG_Tur      TTGACAAGGTTGATAAAAAATGGGATTAAAGTGATTAAATGTACTTAGCTTTGGAGCTAAGG
*****
PG_Koy      GTGATGGA AAAACATATGATAATATTGCAATTTGAGCAAGCATGGAATGAAGCATGTTTCA
PG_Sar      GTGATGGA AAAACATATGATAATATTGCAATTTGAGCAAGCATGGAATGAAGCATGTTTCA
PG_Urm      GTGATGGA AAAACATATGATAATATTGCAATTTGAGCAAGCATGGAATGAAGCATGTTTCA
PG_Tur      GTGATGGA AAAACATATGATAATATTGCAATTTGAGCAAGCATGGAATGAAGCATGTTTCA
*****
PG_Koy      CTAGAACACCTGTTCAATTTGTGGTTCCTAAAAACAAGAATTATCTTCTCAAGCAAAATCA
PG_Sar      CTAGAACACCTGTTCAATTTGTGGTTCCTAAAAACAAGAATTATCTTCTCAAGCAAAATCA
PG_Urm      CTAGAACACCTGTTCAATTTGTGGTTCCTAAAAACAAGAATTATCTTCTCAAGCAAAATCA
PG_Tur      CTAGAACACCTGTTCAATTTGTGGTTCCTAAAAACAAGAATTATCTTCTCAAGCAAAATCA
*****
PG_Koy      CCTTTTCAGGTCCATGCAGATCTTCTATTTCAGTAAAGATTTTGGATCCTTAGAAGCAT
PG_Sar      CCTTTTCAGGTCCATGCAGATCTTCTATTTCAGTAAAGATTTTGGATCCTTAGAAGCAT
PG_Urm      CCTTTTCAGGTCCATGCAGATCTTCTATTTCAGTAAAGATTTTGGATCCTTAGAAGCAT
PG_Tur      CCTTTTCAGGTCCATGCAGATCTTCTATTTCAGTAAAGATTTTGGATCCTTAGAAGCAT
*****
PG_Koy      CTTGCAAAATAAATAAATCACTGCCATGCAGGGATGCACCAACGGCCTTAACCTTCTGGA
PG_Sar      CTTGCAAAATAAATAAATCACTGCCATGCAGGGATGCACCAACGGCCTTAACCTTCTGGA
PG_Urm      CTTGCAAAATAAATAAATCACTGCCATGCAGGGATGCACCAACGGCCTTAACCTTCTGGA
PG_Tur      CTTGCAAAATAAATAAATCACTGCCATGCAGGGATGCACCAACGGCCTTAACCTTCTGGA
*****
PG_Koy      ATTGCAAAAATTTGAAAGTGAATAATCTAAAGAGTAAAAATGCACAACAATTCATATCA
PG_Sar      ATTGCAAAAATTTGAAAGTGAATAATCTAAAGAGTAAAAATGCACAACAATTCATATCA
PG_Urm      ATTGCAAAAATTTGAAAGTGAATAATCTAAAGAGTAAAAATGCACAACAATTCATATCA
PG_Tur      ATTGCAAAAATTTGAAAGTGAATAATCTAAAGAGTAAAAATGCACAACAATTCATATCA
*****
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      TTAATGGAACAGGTGATGATTGTAATTTCAATTTGTTTCTGGATCTCAAATGTGCGAGGCCA
PG_Sar      TTAATGGAACAGGTGATGATTGTAATTTCAATTTGTTTCTGGATCTCAAATGTGCGAGGCCA
PG_Urm      TTAATGGAACAGGTGATGATTGTAATTTCAATTTGTTTCTGGATCTCAAATGTGCGAGGCCA
PG_Tur      TTAATGGAACAGGTGATGATTGTAATTTCAATTTGTTTCTGGATCTCAAATGTGCGAGGCCA
*****
PG_Koy      CAAATATTACTTGTGGTCCAGGTGATGTTAAGTATTGGAAGCTTAGGATCTGGAATTT
PG_Sar      CAAATATTACTTGTGGTCCAGGTGATGTTAAGTATTGGAAGCTTAGGATCTGGAATTT
PG_Urm      CAAATATTACTTGTGGTCCAGGTGATGTTAAGTATTGGAAGCTTAGGATCTGGAATTT
PG_Tur      CAAATATTACTTGTGGTCCAGGTGATGTTAAGTATTGGAAGCTTAGGATCTGGAATTT
*****
PG_Koy      CAGAAGCTTATGTTGTTAATGTTACTGTAATGAAGCCAAAATTATCGGTGCCGAAAATG
PG_Sar      CAGAAGCTTATGTTGTTAATGTTACTGTAATGAAGCCAAAATTATCGGTGCCGAAAATG
PG_Urm      CAGAAGCTTATGTTGTTAATGTTACTGTAATGAAGCCAAAATTATCGGTGCCGAAAATG
PG_Tur      CAGAAGCTTATGTTGTTAATGTTACTGTAATGAAGCCAAAATTATCGGTGCCGAAAATG
*****
PG_Koy      GAGTTAGGATCAAGACTTGGCAGGGAGGATCTGGACAAGCTAGCAACATCAAATTTCTGA
PG_Sar      GAGTTAGGATCAAGACTTGGCAGGGAGGATCTGGACAAGCTAGCAACATCAAATTTCTGA
PG_Urm      GAGTTAGGATCAAGACTTGGCAGGGAGGATCTGGACAAGCTAGCAACATCAAATTTCTGA
PG_Tur      GAGTTAGGATCAAGACTTGGCAGGGAGGATCTGGACAAGCTAGCAACATCAAATTTCTGA
*****
PG_Koy      ATGTGGAATGCAAGACGTTAAGTATCCCATAAATTATAGACCAAAACTATTGTGATCGAG
PG_Sar      ATGTGGAATGCAAGACGTTAAGTATCCCATAAATTATAGACCAAAACTATTGTGATCGAG
PG_Urm      ATGTGGAATGCAAGACGTTAAGTATCCCATAAATTATAGACCAAAACTATTGTGATCGAG
PG_Tur      ATGTGGAATGCAAGACGTTAAGTATCCCATAAATTATAGACCAAAACTATTGTGATCGAG
*****
PG_Koy      TTGAACCATGTATACAACAGTTTTCAGCAGTTCAAGTGAAAAATGTGGTGTATGAGAATA
PG_Sar      TTGAACCATGTATACAACAGTTTTCAGCAGTTCAAGTGAAAAATGTGGTGTATGAGAATA
PG_Urm      TTGAACCATGTATACAACAGTTTTCAGCAGTTCAAGTGAAAAATGTGGTGTATGAGAATA
PG_Tur      TTGAACCATGTATACAACAGTTTTCAGCAGTTCAAGTGAAAAATGTGGTGTATGAGAATA
*****
PG_Koy      TCAAGGGCACAAGTGCAACAAAGGTGGCCATAAAAATTTGATTGCGACACAACTTTCCAT
PG_Sar      TCAAGGGCACAAGTGCAACAAAGGTGGCCATAAAAATTTGATTGCGACACAACTTTCCAT
PG_Urm      TCAAGGGCACAAGTGCAACAAAGGTGGCCATAAAAATTTGATTGCGACACAACTTTCCAT
PG_Tur      TCAAGGGCACAAGTGCAACAAAGGTGGCCATAAAAATTTGATTGCGACACAACTTTCCAT
*****
PG_Koy      CTGAAGGAATTATAATGGAGAATATAAATTTAGTAGGGGAAAGTGAAAAACCATCAGAGG
PG_Sar      CTGAAGGAATTATAATGGAGAATATAAATTTAGTAGGGGAAAGTGAAAAACCATCAGAGG
PG_Urm      CTGAAGGAATTATAATGGAGAATATAAATTTAGTAGGGGAAAGTGAAAAACCATCAGAGG
PG_Tur      CTGAAGGAATTATAATGGAGAATATAAATTTAGTAGGGGAAAGTGAAAAACCATCAGAGG
*****
PG_Koy      CTACGTGCAAAAATGTCCATTTTAAACATGCTGAACATGT
PG_Sar      CTACGTGCAAAAATGTCCATTTTAAACATGCTGAACATGT
PG_Urm      CTACGTGCAAAAATGTCCATTTTAAACATGCTGAACATGT
PG_Tur      CTACGTGCAAAAATGTCCATTTTAAACATGCTGAACATGT
*****

```

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 SNP های شناسایی شده در ژن PG در جمعیت های مختلف گوجه فرنگی
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 ناهمجنس با فراوانی یکسان ناشی از تبدیلات G/C و A/C بود. در ژن ژرماکین 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 ناهمجنس 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 و G/A) شناسایی شد که بیشترین نوع SNP ها از نوع همجنس بود (۱). در تحقیق حاضر نیز در نواحی اگزونی ژن *PE1* چهار SNP و ژن *PG* شش SNP از نوع A/G و T/C مشاهده گردید. پیشنهاد می شود از SNP های شناسایی شده در این تحقیق در برنامه های اصلاح گوجه فرنگی برای تهیه نقشه های ژنتیکی با وضوح بالا، انتخاب ژنومی، نقشه یابی ارتباطی و مطالعه تکامل جمعیت استفاده شود. همچنین ارتباط بین SNP های 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 (بوژه صفت گوشتی بودن میوه) در پیشبرد موثر و تسهیل برنامه های 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.

نتیجه گیری کلی

بطور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در نواحی اگزونی ژن *PE1* میانگین تعداد SNP ها 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 ژن ها از نوع تبدیلی های همجنس G/A و C/T بود. در کل در توالی های بررسی شده این دو ژن، فراوانی SNP ها در ژن *PG* نسبت به *PE1* کمتر بود. همچنین تنوع های تک نوکلئوتیدی در نواحی اگزونی ژن های مورد مطالعه کم بود که نشانگر محفوظ بودن نواحی کدکننده این ژن ها در طول تکامل گوجه فرنگی می باشد.

در ژن *PG* شش SNP در نواحی اگزونی شناسایی شد. نسبت جهش های همجنس به ناهمجنس ۲:۱ بود بطوریکه ۶۶/۷ درصد جهش ها از نوع همجنس با فراوانی ۳۳/۳ درصد A/G، 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 می باشد. بیشترین نوع SNP در ناحیه اگزونی از نوع A/G و T/C می باشد. 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 *PE1* 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 تحقیقی 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 *PE1* SNP های کمتری مشاهده گردید. در مطالعه SNP های موجود در EST های دو رقم MU_{۱۶} و UPV ۹۶ 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 SNP های ناشی از جهش همجنس با فراوانی یکسان A/G و C/T و ۳۲ درصد ناشی از جهش ناهمجنس با فراوانی یکسان ناشی از تبدیلات A/T، A/C، G/T و C/G بود. در مطالعه SNP ها در دو ژن کلیدی دخیل در شکل میوه (*SUN* و *OVATE*) در ۹۶ ژنوتیپ گوجه فرنگی، در ژن *SUN* ۸۰ درصد SNP ها از نوع همجنس با فراوانی ۳۰ درصد G/A و ۵۰ درصد C/T و ۲۰ درصد جهش ناهمجنس از نوع G/T بود. در همین مطالعه در ژن *OVATE*، ۸۰ درصد جهش ها از نوع همجنس با فراوانی ۴۰ درصد A/G، ۴۰ درصد T/C و ۲۰ درصد جهش از نوع ناهمجنس (T/G) بود (۱۴). در تحقیق حاضر نیز در ژن *PG*، ۶۶/۷ درصد جهش ها از نوع همجنس با فراوانی ۳۳/۳ درصد A/G، 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 جهش ها از نوع همجنس با فراوانی ۵۰ درصد A/G، ۲۵ درصد T/C و ۲۵ درصد جهش ها از نوع ناهمجنس (C/A) بود. در مطالعه ۶۰ ژنوتیپ در گیاه ریحان نیز، در ژن لینالول سینتاز 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

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 (*PE1*) 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 (*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% 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