

شناسایی SNP ها در ژن های *CYC-B* و *PSY1* دخیل در رنگ میوه

گوجه فرنگی

Identification of SNPs in *CYC-B* and *PSY1* genes responsible for fruit color in tomato

رقیه ابراهیمی^۱، بابک عبدالحی مندولکانی^{۲*}، مشهد هناره^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی، آذربایجان غربی، ارومیه، ایران

Ebrahimi R¹, Abdollahi Mandoulakani B^{*2}, Henareh M³

1- MSc Student of Agricultural Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

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

3- Assistant Professor, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Urmia, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: b.abdollahi@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۸)

چکیده

به منظور شناسایی تنوع های تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphism) در ژن های *CYC-B* و *PSY1* و فیتون سنتاز (*PSY1*) در ۹۳ ژنوتیپ گوجه فرنگی و سه رقم تجاری، قطعاتی به طول ۴۰۹ و ۱۰۰۰ جفت باز از نواحی کدکننده این دو ژن تکثیر شد. سپس جهت آشکارسازی چندشکلی در نواحی تکثیری این ژن ها، هضم قطعات تکثیری با آنزیم های *PstI* و *Tru1I* انجام گرفت ولی چندشکلی بین ژنوتیپ ها مشاهده نشد. بنابراین چهار فرد از جمعیت های مختلف (ارومیه، سردشت، ترکیه و بوکان برای ژن *CYC-B*، ارومیه، سردشت، ترکیه و پیرانشهر برای ژن *PSY1*) انتخاب و قطعه تکثیری ژن ها در این افراد توالی یابی شد. بعد از بازیابی قطعه تکثیری هر ژن، شناسایی SNP ها با استفاده از هم ردیفی توالی های هر ژن با نرم افزار Clustal Omega انجام گرفت. در ژن *CYC-B* هشت SNP شناسایی شد که ۷۵ درصد آن ها از نوع همجنس با فراوانی ۵۰ درصد A/G، ۲۵ درصد T/C و ۲۵ درصد آن ها از نوع غیرهمجنس با فراوانی ۱۲/۵ درصد C/A و ۱۲/۵ درصد G/C بود. در ژن *PSY1* نیز هشت SNP شناسایی شد که به ترتیب سه و پنج SNP در ناحیه ی اگزون و اینترون قرار داشت. ۶۲/۵ درصد این SNP ها از نوع همجنس با فراوانی ۳۷/۵ درصد A/G، ۲۵ درصد T/C و ۳۷/۵ درصد آن ها از نوع غیرهمجنس با فراوانی ۲۵ درصد C/G و ۱۲/۵ درصد C/A بود. میانگین تعداد SNP ها به ازای هر ۱۰۰ جفت باز در قطعه تکثیر شده ژن *CYC-B*، ۰/۴۴ بود در حالی که در نواحی اینترون و اگزونی ژن *PSY1* به ترتیب ۱/۲۶ و ۰/۷۱ بود. SNP های شناسایی شده در این تحقیق می تواند در تهیه نقشه های ژنتیکی و همچنین شناسایی نشانگرهای عملکردی مرتبط با صفت رنگ میوه در گوجه فرنگی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی

تنوع تک نوکلئوتیدی

رنگ میوه

ژن بتا سیکلاز

ژن فیتون سنتاز

گوجه فرنگی

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum Lycopersicum* L.) از خانواده Solanaceae و جنس *Lycopersicon* می‌باشد که شامل بیش از ۳۰۰۰ گونه از گیاهان مهم اقتصادی مثل سیب‌زمینی، توتون، بادمجان و فلفل می‌باشد (Bai and Lindboud 2007). این گیاه یک گونه مدل برای معرفی ژن‌های مهم زراعی در گیاهان دو لپه‌ای می‌باشد (Paduchari et al. 2010). گوجه‌فرنگی رتبه هفتم را در تولید جهانی بعد از ذرت، گندم، سیب‌زمینی، سویا و کاساوا به‌خود اختصاص داده است. براساس آمار فائو (۲۰۱۶) کشور ایران با تولید نزدیک به ۶ میلیون و ۴۰۰ هزار تن گوجه‌فرنگی در سال در رتبه هفتم دنیا قرار دارد و در بین کشورهای خاورمیانه بعد از ترکیه و مصر در رتبه سوم قرار دارد. گوجه‌فرنگی به‌عنوان گیاه مدل در گونه‌های سولاناسه برای مطالعه بیولوژی میوه‌های گوشتی و فرآیندهای رسیدگی میوه انتخاب شده است. همچنین به‌دلیل تنوع فنوتیپی یک الگو مناسب برای تجزیه و تحلیل وزن میوه و مورفولوژی بافت می‌باشد (Klee and Giovannoni 2011) علی‌رغم اینکه اهلی کردن گیاهان باعث کاهش تنوع نوکلئوتیدی آن‌ها می‌شود اما در میوه‌های گوشتی اهلی کردن باعث ایجاد تغییرات فنوتیپی گسترده‌ای می‌شود. وقوع جهش در گونه‌هایی مانند گوجه‌فرنگی، فلفل و خربزه باعث تغییرات عمده در وزن، شکل میوه و رنگ آن شده است (Perin et al. 2002; Monforte et al. 2014). گوجه‌فرنگی به‌دلیل برخی از ویژگی‌های مهم آن مانند ژنوم کوچک، چرخه‌ی زندگی کوتاه، توانایی رشد تحت شرایط کشت مختلف، خودگشتی، هموزیگوت بودن و کنترل آسان گرده‌افشانی یک نمونه گیاهی عالی برای مطالعات تحقیقات پایه‌ای می‌باشد. این گیاه دارای ارزش غذایی بالایی می‌باشد. از مواد مغذی مهم گوجه‌فرنگی می‌توان لیکوپن، بتا کاروتن، فلاونوئیدها، ویتامین‌های A و C و مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید را نام برد. این گیاه همچنین دارای مواد معدنی مختلف مانند کلسیم، فسفر، پتاسیم، فیبر، سدیم و سایر عناصر مفید می‌باشد (Ilic et al. 2011). اسید آسکوربیک موجود در گوجه‌فرنگی نقش مهمی در جلوگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی، سرطان‌های خاص و آب مروارید دارد و از جهش DNA

ناشی از تنش اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (Lutsenko et al. 2002). واکنش اکسیداسیونی به‌دلیل ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب تخریب بیومولکول‌های اساسی سلول‌ها نظیر پروتئین‌ها، چربی‌ها و DNA می‌گردد و یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده بیماری‌های مزمن مانند سرطان می‌باشد. لیکوپن به واسطه داشتن پیوندهای دوگانه مزدوج متعدد توانایی آنتی اکسیدانی زیادی دارد. آنتی اکسیدان‌ها قادر به واکنش با رادیکال‌های آزاد می‌باشند و از به‌وجود آمدن بیماری‌ها جلوگیری می‌کنند. لیکوپن از قدرت آنتی اکسیدانی بالاتری برخوردار است به‌همین دلیل در درمان برخی از بیماری‌ها مانند پروستات، قلبی و عروقی، استخوانی، عصبی و نارسایی‌های جنسی مردان بسیار مؤثر است. همچنین لیکوپن ضدعفونی کننده و تصفیه کننده خون نیز می‌باشد. بیش از ۸۵ درصد لیکوپن مصرفی از گوجه‌فرنگی و فرآورده‌های آن تأمین می‌شود بنابراین این محصول محبوبیت فوق العاده‌ای در سال‌های اخیر بدلیل فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی لیکوپن به‌دست آورده است (Wu et al. 2011). به‌همین دلیل افزایش عملکرد، بهبود شکل، اندازه و کیفیت میوه مانند رنگ، بافت و سفتی میوه، میزان قند، اسیدیته، مواد جامد محلول، لیکوپن و بتاکاروتن از جمله اهداف مهم اصلاحی در گوجه‌فرنگی به‌شمار می‌آید. با توجه به این‌که تولید و مصرف گوجه‌فرنگی در حال افزایش است بنابراین نیاز به تحقیقات گسترده‌ای جهت تولید محصول بیشتر در واحد سطح و کیفیت میوه آن جهت افزایش میزان سفتی میوه، افزایش ماندگاری و افزایش رنگیزه‌هایی که در بهبود کیفیت رنگ و گوشتی بودن میوه مؤثر هستند وجود دارد. در رسیدگی میوه شماری از تغییرات متابولیکی و فیزیولوژیکی حضور دارند که نتایج این تغییرات در رنگ، بافت، گل، عطر و مواد مغذی بروز پیدا می‌کنند (Giovannoni 2007). بیوسنتز کارتنوئیدها هنگام توسعه میوه، رنگ آن را مشخص می‌کند. رنگ میوه گوجه‌فرنگی در بازار پسندی میوه نقش مهمی دارد و از اهداف مهم اصلاحی می‌باشد. بیان ژن‌هایی مانند بتاسیکلاز (*CYC-B*) و فیتون سنتاز (*PSY1*) باعث ایجاد رنگ قرمز در گوجه‌فرنگی می‌شود. رنگ میوه گوجه‌فرنگی بستگی به انباشتگی کارتنوئیدها و فلاونوئیدها هنگام

شناسایی و مطالعه فراوانی SNP ها در این دو ژن در برخی ژنوتیپ های محلی گوجه فرنگی انجام گرفت.

مواد و روش ها

در این تحقیق ۹۳ فرد از ۱۲ جمعیت که از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی و کشور ترکیه جمع آوری شده بود به همراه سه رقم تجاری استفاده شد (جدول ۱). بذور جهت استخراج DNA در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه کشت شد. برای کشت بذور از پیت ماس و گلدان های با اندازه متوسط استفاده شد. بعد از رسیدن گیاه به مرحله ۶-۴ برگگی نمونه برداری از برگ های گیاهان برای استخراج DNA انجام شد. نمونه های برگگی در نیتروژن مایع منجمد و سپس در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. DNA ژنومی از برگ های جوان و سبز به روش CTAB^۲ استخراج شد (De Masi et al. 2006). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتوفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین شد. سپس توالی نواحی کدکننده ژن های *PSY1* و *CYC-B* از پایگاه اطلاعاتی NCBI ذخیره و نواحی ایترونی و اگزونی آن ها با استفاده از نرم افزار Softberry تعیین شد. آغازگرهای اختصاصی هر ژن (جدول ۲) به منظور تکثیر قطعاتی با اندازه های ۴۰۹ (ژن *CYC-B*) و ۱۰۰۰ (ژن *PSY1*) جفت باز از نواحی کدکننده این دو ژن با استفاده از نرم افزارهای Fast PCR و Gen Runner طراحی و از نظر وجود ساختارهای ثانویه مثل آغازگر-دایمر و ساختارهای سنجاق سری بررسی شد. واکنش های PCR با استفاده مستر میکس لیوفیلیزه (Bioneer، کره جنوبی) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده در ترموسایکلر (Analytik jena، آلمان) انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ ثانیه در دمای اتصال مربوط به هر ژن (جدول ۲)، دو دقیقه بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ سانتی گراد بود.

رسیدگی میوه دارد. ژن *PSY1* اولین مرحله بیوسنتز کارتنوئیدها را کاتالیز می کند و باعث تشکیل فیتون می شود (Kang et al. 2014). گیاهان دارای ژن *PSY1* بافت گوشتی زرد رنگ دارند و بیان این ژن در مراحل پایانی رسیدگی میوه گوجه فرنگی زیاد می شود و تحت کنترل مثبت اتیلن قرار دارد (Gady et al. 2012). در مسیر بیوسنتز کارتنوئیدها در گیاهان، لیکوپن در دو شاخه به بتاکاروتن و سیگما کاروتن ها تبدیل می شود. در مسیر یکی از این شاخه ها ژن *CYC-B* لیکوپن را به بتاکاروتن کاتالیز می کند. توالی اسید آمینه این ژن بسیار شبیه آنزیم سنتاز کاپسانتین کاپسورین است که باعث تولید زانتوفیل (عامل رنگ قرمز میوه در فلفل) می شود. در شاخه دیگر بیوسنتز کارتنوئیدها، آنزیم لیکوپن سیگما سیکلاز، با اضافه کردن سیگما به لیکوپن باعث تولید سیگما کاروتن می شود (Ronen et al. 2000).

گوجه فرنگی نیازمند روش های اصلاحی کارآمد جهت توسعه این ترکیبات می باشد و استفاده از نشانگرهای مولکولی برای اصلاح این گیاه ضروری می باشد. از جمله نشانگرهای مولکولی که در سال های اخیر در علوم گیاهی به طور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرد نشانگرهای مبتنی بر تنوع تک نوکلئوتیدی (SNP^۱) می باشد. نشانگرهای SNP، چند شکلی مبتنی بر تفاوت در یک نوکلئوتید می باشد که منبع ژنتیکی عمده تغییرات فنوتیپی درون یک گونه است. این نشانگرها هم بارز و دو آلی می باشند و فراوانی زیادی در ژنوم یوکاریوت ها دارند. کارایی بالای SNP ها به دلیل حضور آن ها در تمام نواحی ژنوم، ایترون ها و همچنین اگزون ها می باشد و هر فرد متعلق به یک گونه، دارای هزاران SNP می باشد. ترکیب این تنوع های تک نوکلئوتیدی باعث می شود هر فرد دارای فنوتیپ منحصر به فردی باشد. SNP ها به علت پایداری بیش تر، موتاسیون کمتر و حضور در بیشتر نقاط ژنوم از نشانگرهای ژنتیکی قابل اعتماد به شمار می روند (Gupta et al. 2001). با توجه به اهمیت رنگ میوه در کیفیت و بازاری پسندی گوجه فرنگی و عدم مطالعه SNP ها در ژن های *CYC-B* و *PSY1* (مسئول رنگ میوه گوجه فرنگی)، تحقیقی با هدف

² Hexa decyl trimethyl ammonium bromide

¹ Single nucleotide polymorphism

² Hexa decyl trimethyl ammonium bromide

جدول ۱- مناطق جغرافیایی جمعیت های مختلف گوجه فرنگی

کد	اندازه میوه	منطقه	طول جغرافیایی (° ')	عرض جغرافیایی (° ')	کد	اندازه میوه	منطقه	طول جغرافیایی (° ')	عرض جغرافیایی (° ')
IRU1	بزرگ	Iran-Urmia	45 14	37 32	IRO1	متوسط	Iran-Oshnavieh	45 07	37 09
IRU2	بزرگ	Iran-Urmia	45 13	37 30	IRO2	کوچک	Iran-Oshnavieh	45 07	37 09
IRU3	بزرگ	Iran-Urmia	45 13	37 30	IRO3	متوسط	Iran-Oshnavieh	45 06	37 02
IRU4	بزرگ	Iran-Urmia	45 13	37 26	IRO4	متوسط	Iran-Oshnavieh	45 06	37 02
IRU5	بزرگ	Iran-Urmia	45 08	37 30	IRO5	بزرگ	Iran-Oshnavieh	45 08	36 59
IRU6	متوسط	Iran-Urmia	45 11	37 23	IRO6	خیلی کوچک	Iran-Oshnavieh	45 07	37 12
IRU7	بزرگ	Iran-Urmia	45 11	37 23	IRP1	بزرگ	Iran-Piranshahr	45 19	36 47
IRU8	متوسط	Iran-Urmia	45 13	37 29	IRP2	بزرگ	Iran-Piranshahr	45 19	36 47
IRU10	متوسط	Iran-Urmia	45 09	37 23	IRP3	متوسط	Iran-Piranshahr	45 12	36 51
IRU11	بزرگ	Iran-Urmia	45 05	37 26	IRP4	متوسط	Iran-Piranshahr	45 14	36 49
IRU12	بزرگ	Iran-Urmia	45 05	37 26	IRP5	متوسط	Iran-Piranshahr	45 07	36 37
IRU13	متوسط	Iran-Urmia	44 58	37 52	IRP6	متوسط	Iran-Piranshahr	45 07	36 37
IRU14	متوسط	Iran-Urmia	45 02	37 51	IRP7	متوسط	Iran-Piranshahr	45 05	36 48
IRU15	متوسط	Iran-Urmia	45 02	37 51	IRP8	کوچک	Iran-Piranshahr	45 11	36 42
IRU16	متوسط	Iran-Urmia	45 01	37 50	IRP9	بزرگ	Iran-Piranshahr	45 11	36 42
IRU18	بزرگ	Iran-Urmia	45 02	37 59	IRP10	کوچک	Iran-Piranshahr	45 13	36 39
IRU19	متوسط	Iran-Urmia	44 59	37 57	IRN1	کوچک	Iran-Naghadeh	45 30	37 00
IRU20	متوسط	Iran-Urmia	44 58	37 58	IRN2	کوچک	Iran-Naghadeh	45 15	36 59
IRU21	بزرگ	Iran-Urmia	45 03	37 43	IRMI1	متوسط	Iran-Miandoab	46 01	36 55
IRU22	بزرگ	Iran-Urmia	45 02	37 37	IRMI2	بزرگ	Iran-Miandoab	46 01	36 55
IRU23	خیلی کوچک	Iran-Urmia	44 51	37 25	IRMI3	متوسط	Iran-Miandoab	46 10	36 56
IRU24	بزرگ	Iran-Urmia	45 10	37 42	IRMI4	متوسط	Iran-Miandoab	46 10	36 56
IRU25	متوسط	Iran-Urmia	45 10	37 42	IRMI5	متوسط	Iran-Miandoab	46 08	37 00
IRU26	متوسط	Iran-Urmia	45 03	37 41	IRMI6	کوچک	Iran-Miandoab	46 08	36 59

ادامه جدول ۱

کد	اندازه میوه	منطقه	طول جغرافیایی (° ')	عرض جغرافیایی (° ')	کد	اندازه میوه	منطقه	طول جغرافیایی (° ')	عرض جغرافیایی (° ')
IRMI7	کوچک	Iran-Miandoab	46 08	36 59	IRSR2	خیلی کوچک	Iran-Sardasht	45 30	36 16
IRB	متوسط	Iran-Bokan	46 13	36 34	IRSR3	کوچک	Iran-Sardasht	45 30	36 16
IRMA1	متوسط	Iran-Mahabad	45 47	36 56	IRSR4	خیلی کوچک	Iran-Sardasht	45 30	36 04
IRMA2	بزرگ	Iran-Mahabad	45 48	36 52	IRSR5	کوچک	Iran-Sardasht	45 30	36 04
IRMA4	متوسط	Iran-Mahabad	45 45	36 50	IRSR6	کوچک	Iran-Sardasht	45 30	36 04
IRMA5	کوچک	Iran-Mahabad	45 41	36 42	IRSR7	متوسط	Iran-Sardasht	45 30	36 04

36 17	45 28	Iran-Sardasht	کوچک	IRSR8	36 44	45 40	Iran-Mahabad	کوچک	IRMA6
39 57	43 59	Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG1	36 44	45 40	Iran-Mahabad	کوچک	IRMA7
39 59	43 58	Turkey-Iğdır	بزرگ	TUIG2	36 42	45 41	Iran-Mahabad	بزرگ	IRMA8
39 59	43 58	Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG3	36 48	45 44	Iran-Mahabad	بزرگ	IRMA9
40 00	43 59	Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG4	36 48	45 44	Iran-Mahabad	متوسط	IRMA10
40 01	44 04	Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG5	38 54	45 02	Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ1
40 01	44 04	Turkey-Iğdır	بزرگ	TUIG6	38 53	45 02	Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ2
40 01	44 04	Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG7	38 53	44 57	Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ3
40 01	44 04	Turkey-Iğdır	کوچک	TUIG8	38 53	44 57	Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ4
40 01	44 04	Turkey-Iğdır	کوچک	TUIG9	38 50	45 02	Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ5
39 58	44 01	Turkey-Iğdır	متوسط	TUIG10	38 50	45 02	Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ6
39 58	44 01	Turkey-Iğdır	کوچک	TUIG11	38 50	45 02	Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ7
39 58	44 01	Turkey-Iğdır	بزرگ	TUIG12	38 46	45 08	Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ8
39 58	44 01	Turkey-Iğdır	خیلی کوچک	TUIG13	38 42	45 12	Iran-Khoy	متوسط	IRKH1
39 52	44 01	Turkey-Iğdır	کوچک	TUIG14	38 34	44 50	Iran-Khoy	کوچک	IRKH2
-	-	Iran	متوسط	Peto Early CH ^۱	44 45	38 10	Iran-Salmas	کوچک	IRSA1
-	-	Iran	متوسط	Rio Grande ^۱ *	44 44	38 09	Iran-Salmas	بزرگ	IRSA2
-	-	Turkey	متوسط	H-2274 ^۱	45 33	36 12	Iran-Sardasht	خیلی کوچک	IRSR1

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن های *PSY1* و *CYC-B* در گیاه گوجه فرنگی

ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر	اندازه محصول (جفت باز)	دمای اتصال
<i>CYC-B</i>	KP233168.1	F: GCTTTTATAGGGTCCCAGTTCCAC R: CCCTTTTCCCAATCCCAGTCCCA	۴۰۹	۶۱
<i>PSY1</i>	M84744.1	F: CGGTCTGCTATTTTGGCTACTC R: GTATCGGACAAAGCACCATCG	۴۲۵	۵۸

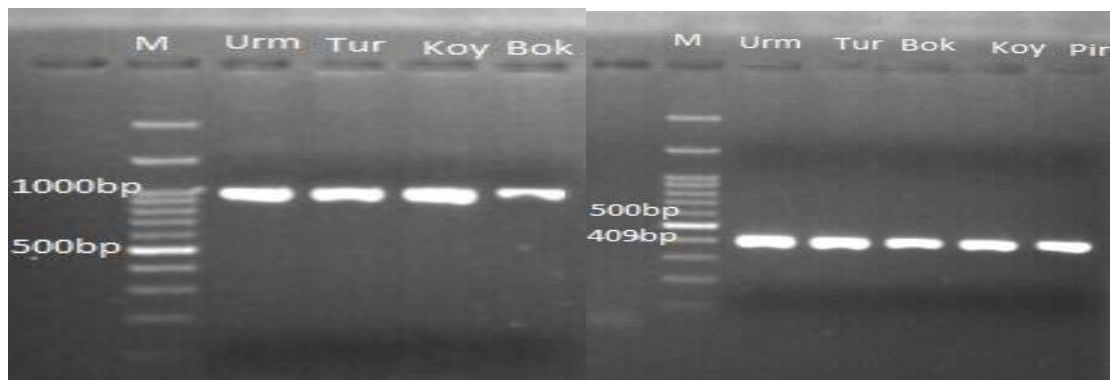
پس از تکثیر قطعات، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و باندهای مربوط به هر ژن شناسایی شد. به منظور هضم قطعات تکثیر شده دو ژن با آنزیم های *Pst1* و *Tru1* (Fermentas، آلمان) ابتدا الگوی برشی و طول قطعات حاصل از برش با استفاده از نرم افزار Fast PCR پیش بینی شد. سپس قطعات تکثیر شده دو ژن در 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 ۸۵ به مدت یک و نیم ساعت استفاده شد.

با توجه به این که هضم آنزیمی توالی های تکثیری دو ژن در افراد مطالعه شده چند شکلی تولید نکرد لذا جهت شناسایی SNP ها در نواحی کدکننده ژن های *PSY1* و *CYC-B* از روش توالی یابی استفاده شد. بدین ترتیب که برای ژن *CYC-B* چهار فرد از جمعیت های ارومیه، سردشت، ترکیه و بوکان و برای ژن *PSY1* چهار فرد از جمعیت های ارومیه، سردشت، ترکیه و پیرانشهر انتخاب و بعد از انجام PCR، حدود ۴۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه روی ژل آگارز ۱/۵ با ولتاژ ۸۰ تفکیک شد. سپس محصول هر ژن با استفاده از کیت خلص سازی (Qiagen، آمریکا) از ژل تخلیص و جهت توالی یابی به شرکت تکاپوزیست (تهران،

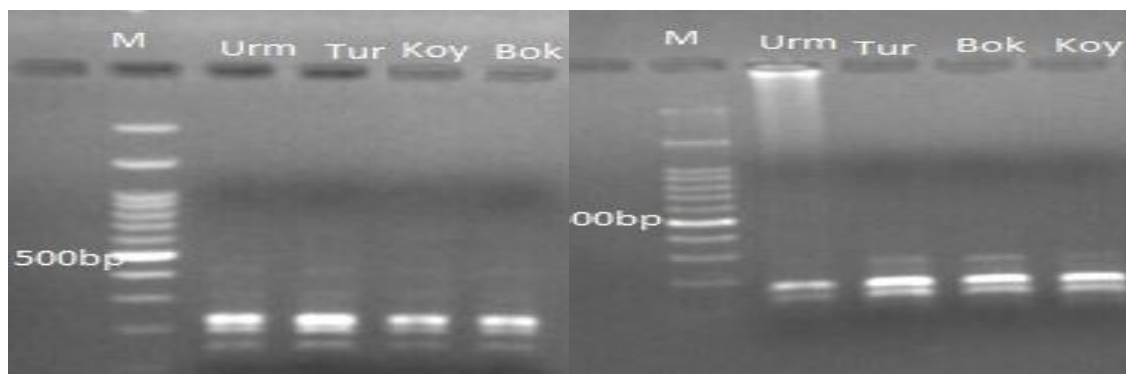
نتایج و بحث

تکثیر و هضم قطعات ژنی: هضم قطعات تکثیری در ژن های مورد مطالعه بین ۹۶ ژنوتیپ با آنزیم *Pst1* چند شکلی نشان نداد. همچنین هضم قطعات تکثیر شده دو ژن با آنزیم *Tru1* در ژن *CYC-B* قطعاتی به طول ۹۳، ۱۱۲ و ۱۸۱، و در ژن *PSY1* قطعاتی به طول ۲۲۱ و ۱۸۳ جفت باز تولید کرد. ولی بعد از هضم و الکتروفورز چندشکلی بین ژنوتیپ ها مشاهده نشد (شکل ۱ و ۲).

ایران) ارسال شد. با توجه به اینکه طول قطعه تکثیری در ژن *PSY1* ۱۰۰۰ جفت باز بود برای قرائت کامل، توالی یابی با استفاده از هر دو آغازگر پیشرو و معکوس صورت گرفت ولی در ژن *CYC-B* با طول قطعه ۴۰۹ جفت بازی تنها از آغازگر پیشرو جهت توالی یابی استفاده شد. برای اطمینان از صحت قطعات توالی یابی شده، ابتدا توالی ها در برابر ژنوم گوجه فرنگی بلاست شد و نواحی مشترک توالی های پیشرو و معکوس هر قطعه شناسایی و توالی ها با استفاده از نرم افزار Fast PCR بازایی شد. سپس هم ردیفی چندگانه بین توالی های مربوط به هر ژن توسط نرم افزار Clustal Omega جهت شناسایی SNP ها انجام گرفت.



شکل ۱- قطعات تکثیر شده ژن های *CYC-B* (سمت راست) و *PSY1* (سمت چپ) به ترتیب با اندازه های ۴۰۹ و ۱۰۰۰ جفت باز در ژنوتیپ های مختلف گوجه فرنگی (چاهک ها به ترتیب M: نشانگر 1Kb (Fermentas، آلمان) ۱: ارومیه ۲: ترکیه ۳: بوکان ۴: خوی ۵: پیرانشهر (ژن *CYC-B*) و ۱: ارومیه ۲: ترکیه ۳: خوی ۴: بوکان (ژن *PSY1*)



شکل ۲- هضم آنزیمی قطعات تکثیر شده ژن های *CYC-B* (سمت راست) و *PSY1* (سمت چپ) با آنزیم *Tru1* در ژنوتیپ های مختلف گوجه فرنگی (چاهک ها به ترتیب M: نشانگر 1Kb (Fermentas، آلمان) ۱: ارومیه ۲: ترکیه ۳: بوکان ۴: خوی (ژن *CYC-B*) و ۱: ارومیه ۲: ترکیه ۳: خوی ۴: بوکان (ژن *PSY1*)

```

CYC_Urm      GACAATACCTCACATATATTTGTTAGTGCTTGGTAATATAAAACCTTTTCTTTTATGAGA
CYC_Sar      GACAATACCTCACATATATTTGTTAGTGCTTGGTAATATAAAACCTTTTCTTTTATGAGA
CYC_Tur      GACAATACCTCACATATATTTGTTAGTGCTTGGTAATATAAAACCTTTTCTTTTATGAGA
CYC_Bok      GACAATACCTCACATATATTTGTTAGTGCTTGGTAATATAAAACCTTTTCTTTTATGAGA
*****
CYC_Urm      AAGTTCACCGAGAATAATTTTCTATTTGTGGCATAACTAGTATATAGTACAGATTGACAA
CYC_Sar      AAGTTCACCGAGAATAATTTTCTATTTGTGGCATAACTAGTATATAGTACAGATTGACAA
CYC_Tur      AAGTTCACCGAGAATAATTTTCTATTTGTGGCATAACTAGTATATAGTACAGATTGACAA
CYC_Bok      AAGTTCACCGAGAATAATTTTCTATTTGTGGCATAACTAGTATATAGTACAGATTGACAA
*****
CYC_Urm      GAATTTAATTTGTCAGTTGGGCACATGAACAAATTTTCCTCAAAGTTGTAGAAAGTACCTT
CYC_Sar      GAATTTAATTTGTCAGTTGGGCACATGAACAAATTTTCCTCAAAGTTGTAGAAAGTACCTT
CYC_Tur      GAATTTAATTTGTCAGTTGGGCACATGAACAAATTTTCCTCAAAGTTGTAGAAAGTACCTT
CYC_Bok      GAATTTAATTTGTCAGTTGGGCACATGAACAAATTTTCCTCAAAGTTGTAGAAAGTACCTT
*****
CYC_Urm      TCATTTTCTTGTCCCGAAAATTATTTATAATTGAAATTAACCCGAATGAGCTGCAAGA
CYC_Sar      TCATTTTCTTGTCCCGAAAATTATTTATAATTGAAATTAACCCGAATGAGCTGCAAGA
CYC_Tur      TCATTTTCTTGTCCCGAAAATTATTTATAATTGAAATTAACCCGAATGAGCTGCAAGA
CYC_Bok      TCATTTTCTTGTCCCGAAAATTATTTATAATTGAAATTAACCCGAATGAGCTGCAAGA
*****
CYC_Urm      TTCAAGTCGAATTTCAAAGAATTGACCAAGAAAAAATTCAAAAATATCCCCACCCCT
CYC_Sar      TTCAAGTCGAATTTCAAAGAATTGACCAAGAAAAAATTCAAAAATATCCCCACCCCT
CYC_Tur      TTCAAGTCGAATTTCAAAGAATTGACCAAGAAAAAATTCAAAAATATCCCCACCCCT
CYC_Bok      TTCAAGTCGAATTTCAAAGAATTGACCAAGAAAAAATTCAAAAATATCCCCACCCCT
*****
CYC_Urm      ACCAAACACATCCTAAAGTGAAGGTATAGACTGGGACTGGGATTGGGAAAAAGGA
CYC_Sar      ACCAAACACATCCTAAAGTGAAGGTATAGACTGGGACTGGGATTGGGAAAAAGGA
CYC_Tur      ACCAAACACATCCTAAAGTGAAGGTATAGACTGGGACTGGGATTGGGAAAAAGGA
CYC_Bok      ACCAAACACATCCTAAAGTGAAGGTATAGACTGGGACTGGGATTGGGAAAAAGGA-
*****

```

شکل ۳- هم‌ردیفی چندگانه توالی تکثیری ژن *CYC-B* در ژنوتیپ‌های مربوط به جمعیت‌های ارومیه، سردشت، ترکیه و بوکان گوجه‌فرنگی (Urm: ارومیه، Sar: سردشت، Tur: ترکیه، Bok: بوکان)

جدول ۳- فراوانی SNP ها در قطعه تکثیری ژن *CYC-B* در ژنوتیپ‌های

مختلف گوجه‌فرنگی		
درصد SNP	SNP فراوانی	نوع SNP
۵۰	۴	A/G
۵/۱۲	۱	C/A
۲۵	۲	T/C
۱۲/۵	۱	G/C

از کل SNP های شناسایی شده، ۶۲/۵ درصد از نوع همجنس با فراوانی ۳۷/۵ درصد A/G، ۲۵ درصد T/C، و ۳۷/۵ درصد از نوع ناهمجنس با فراوانی ۲۵ درصد C/G و ۱۲/۵ درصد C/A بود (جدول ۴). بیشترین نوع جهش‌ها در ناحیه ایترونی از نوع جهش‌های همجنس بود. دلیل فراوانی کم تعداد SNP در ناحیه اگزونی احتمالاً به علت کمبود جهش در ناحیه کدکننده ژنی و محفوظ بودن آن در طول تکامل گیاه می‌باشد (Bhardwaj et al. 2016). در ژن *PSY1* در نواحی ایترونی و اگزونی به ازای هر ۱۰۰ جفت‌باز، به ترتیب ۲۶/۱ و ۰/۷۱ SNP شناسایی شد.

شناسایی SNP ها در ژن *CYC-B*: بر اساس نتایج هم‌ردیفی بین توالی نمونه‌های انتخابی جمعیت‌های ارومیه، سردشت، ترکیه و بوکان (شکل ۳)، در ژن *CYC-B* هشت SNP شناسایی شد که ۷۵ درصد آن‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۵۰ درصد A/G، ۲۵ درصد T/C و ۲۵ درصد از نوع ناهمجنس با فراوانی ۱۲/۵ درصد C/A و ۱۲/۵ درصد G/C بود (جدول ۳). بیشترین نوع جهش مربوط به بازهای T/C و A/G بود. همچنین در قطعه تکثیر شده ژن *CYC-B* به ازای هر ۱۰۰ جفت‌باز، ۰/۴۴ تنوع تک نوکلئوتیدی شناسایی شد و نسبت جهش‌های همجنس به ناهمجنس ۳:۱ بود.

شناسایی SNP ها در قطعه تکثیر شده ژن *PSY1*: بعد از تکثیر قطعه مورد نظر در ژن *PSY1* در ۹۶ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی و الکتروفورز قطعات تکثیری، بر خلاف انتظار باندی به طول ۱۰۰۰ جفت باز مشاهده شد. توالی‌یابی و بررسی توالی قطعات تکثیری این ژن توسط نرم‌افزار Softberry منجر به شناسایی یک ناحیه ایترونی ۳۹۶ جفت بازی در این ژن شد.

هم‌ردیفی بین توالی قطعه تکثیری ژن *PSY1* در جمعیت‌های ارومیه، ترکیه، سردشت و پیرانشهر در نواحی ایترونی (شکل ۴) و اگزونی (شکل ۵) منجر به شناسایی هشت SNP شد که پنج SNP در ناحیه ایترونی و سه SNP در ناحیه اگزونی مشاهده شد.

PSY_Tur TAATGACTCCCGAGAGAAGAAGGGCTATCTGGGCAATATATGGTGAGGTTTCTAGCCATT
 PSY_Urm TAATGACTCCCGAGAGAAGAAGGGCTATCTGGGCAATATATGGTGAGGTTTCTAGCCATT
 PSY_Sar TAATGACTCCCGAGAGAAGAAGGGCTATCTGGGCAATATATGGTGAGGTTTCTAGCCATT
 PSY_Pir] TAATGACTCCCGAGAGAAGAAGGGCTATCTGGGCAATATATGGTGAGGTTTCTAGCCATT

 PSY_Tur TAATAACAGTTACGCGCACAAACACATATGATTAAATCGGGGACGAGAAAAAGAAATGA
 PSY_Urm TAATAACAGTTACGCGCACAAACACATATGATTAAATCGGGGACGAGAAAAAGAAATGA
 PSY_Sar TAATAACAGTTACGCGCACAAACACATATGATTAAATCGGGGACGAGAAAAAGAAATGA
 PSY_Pir TAATAACAGTTACGCGCACAAACACATATGATTAAATCGGGGACGAGAAAAAGAAATGA

 PSY_Tur AGTTTGAGTTTGGAGGTCATATGTAATAGGTAATCCGAGCTTGACTAGCTTGAGATGT
 PSY_Urm AGTTTGAGTTTGGAGGTCATATGTAATAGGTAATCCGAGCTTGACTAGCTTGAGATGT
 PSY_Sar AGTTTGAGTTTGGAGGTCATATGTAATAGGTAATCCGAGCTTGACTAGCTTGAGATGT
 PSY_Pir AGTTTGAGTTTGGAGGTCATATGTAATAGGTAATCCGAGCTTGACTAGCTTGAGATGT

 PSY_Tur TTATTGTCATATCATGCTCAATACTAACCACAAACACTGAAAAAGAACTTGATTATATTTA
 PSY_Urm TTATTGTCATATCATGCTCAATACTAACCACAAACACTGAAAAAGAACTTGATTATATTTA
 PSY_Sar TTATTGTCATATCATGCTCAATACTAACCACAAACACTGAAAAAGAACTTGATTATATTTA
 PSY_Pir TTATTGTCATATCATGCTCAATACTAACCACAAACACTGAAAAAGAACTTGATTATATTTA

 PSY_Tur CATACTAATATTTTCATTGCGTTGCTGTTTACATTTTACCTATGGAACCTGGTTTTTGT
 PSY_Urm CATACTAATATTTTCATTGCGTTGCTGTTTACATTTTACCTATGGAACCTGGTTTTTGT
 PSY_Sar CATACTAATATTTTCATTGCGTTGCTGTTTACATTTTACCTATGGAACCTGGTTTTTGT
 PSY_Pir CATACTAATATTTTCATTGCGTTGCTGTTTACATTTTACCTATGGAACCTGGTTTTTGT

 PSY_Tur GATTGTTTATACTTCATATTCGATGTTAATAAATATATCATTCCTCCCTTTTCTCCAC
 PSY_Urm GATTGTTTATACTTCATATTCGATGTTAATAAATATATCATTCCTCCCTTTTCTCCAC
 PSY_Sar GATTGTTTATACTTCATATTCGATGTTAATAAATATATCATTCCTCCCTTTTCTCCAC
 PSY_Pir GATTGTTTATACTTCATATTCGATGTTAATAAATATATCATTCCTCCCTTTTCTCCAC

 PSY_Tur TTCAAGCTTTACTGTAGTGTGAAAGGGGAAACTCCTTTTAAATGATTGCATATATAAACG
 PSY_Urm TTCAAGCTTTACTGTAGTGTGAAAGGGGAAACTCCTTTTAAATGATTGCATATATAAACG
 PSY_Sar TTCAAGCTTTACTGTAGTGTGAAAGGGGAAACTCCTTTTAAATGATTGCATATATAAACG
 PSY_Pir TTCAAGCTTTACTGTAGTGTGAAAGGGGAAACTCCTTTTAAATGATTGCATATATAAACG

 PSY_Tur AACTTCTTGAGTTGAATAGTT-TCTCATTATGATCTGTTTAAACAGTATGGTGCAGAAGA
 PSY_Urm AACTTCTTGAGTTGAATAGTT-TCTCATTATGATCTGTTTAAACAGTATGGTGCAGAAGA
 PSY_Sar AACTTCTTGAGTTGAATAGTT-TCTCATTATGATCTGTT-TAACAGTATGGTGCAGAAGG
 PSY_Pir AACTTCTTGAGTTGAATAGTTTCTCATTATGATCTGTT-TAACAGTATGGTGCAGAAGG

 PSY_Tur ACAGATGAACCTTGTGATGGCCCAACGCATCATATATT
 PSY_Urm ACAGATGAACCTTGTGATGGCCCAACGCATCATATATT
 PSY_Sar TGGGAAAATAGGCTAGAAGATGTTTCAATGGGCGGCC
 PSY_Pir TGGGAAAATAGGCTAGAAGATGTTTCAATGGGCGGCC

شکل ۴- هم‌ردیفی چندگانه توالی ناحیه اینترونی ژن *PSY1* در چهار ژنوتیپ از جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی (Urm: ارومیه، Sar: سردشت، Tur: ترکیه، Pir: بیرانشهر)

PSY_Tur TCTATGATGTGGTTTTGGAGGCAGGCAGCCTTGGTGAAGAGGCAACTGAGATCTACCAATG
 PSY_Urm TCTATGATGTGGTTTTGGAGGCAGGCAGCCTTGGTGAAGAGGCAACTGAGATCTACCAATG
 PSY_Sar TCTATGATGTGGTTTTGGAGGCAGGCAGCCTTGGTGAAGAGGCAACTGAGATCTACCAATG
 PSY_Pir TCTATGATGTGGTTTTGGAGGCAGGCAGCCTTGGTGAAGAGGCAACTGAGATCTACCAATG

 PSY_Tur AGTTAGAAGTGAAGCCGGATATACCTATTCCGGGGAATTTGGGCTTGTGAGTGAAGCAT
 PSY_Urm AGTTAGAAGTGAAGCCGGATATACCTATTCCGGGGAATTTGGGCTTGTGAGTGAAGCAT
 PSY_Sar AGTTAGAAGTGAAGCCGGATATACCTATTCCGGGGAATTTGGGCTTGTGAGTGAAGCAT
 PSY_Pir AGTTAGAAGTGAAGCCGGATATACCTATTCCGGGGAATTTGGGCTTGTGAGTGAAGCAT

 PSY_Tur ATGATAGGTGTGGTGAAGTATGTCAGAGTATGCAAAGACGTTTAACTTAGGTTAGCTTC
 PSY_Urm ATGATAGGTGTGGTGAAGTATGTCAGAGTATGCAAAGACGTTTAACTTAGGTTAGCTTC
 PSY_Sar ATGATAGGTGTGGTGAAGTATGTCAGAGTATGCAAAGACGTTTAACTTAGGTTAGCTTC
 PSY_Pir ATGATAGGTGTGGTGAAGTATGTCAGAGTATGCAAAGACGTTTAACTTAGGTTAGCTTC

 PSY_Tur TTCAATCTATTTCATTGTTTACCAAATATTATTGGTAAGCACTAATTATGAATATATAT
 PSY_Urm TTCAATCTATTTCATTGTTTACCAAATATTATTGGTAAGCACTAATTATGAATATATAT
 PSY_Sar TTCAATCTATTTCATTGTTTACCAAATATTATTGGTAAGCACTAATTATGAATATATAT
 PSY_Pir TTCAATCTATTTCATTGTTTACCAAATATTATTGGTAAGCACTAATTATGAATATATAT

 PSY_Tur ATGTTTCATGTTATTGATGAAGACAAAATTTGATCTTTGTTTGTGTTTATTCAGGAACATATGC
 PSY_Urm ATGTTTCATGTTATTGATGAAGACAAAATTTGATCTTTGTTTGTGTTTATTCAGGAACATATGC
 PSY_Sar ATGTTTCATGTTATTGATGAAGACAAAATTTGATCTTTGTTTGTGTTTATTCAGGAACATATGC
 PSY_Pir ATGTTTCATGTTATTGATGAAGACAAAATTTGATCTTTGTTTGTGTTTATTCAGGAACATATGC

شکل ۵- هم‌ردیفی چندگانه توالی ناحیه اگزونی ژن *PSY1* در چهار ژنوتیپ از جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی (Urm: ارومیه، Sar: سردشت، Tur: ترکیه، Pir: بیرانشهر)

جدول ۴- فراوانی SNP های شناسایی شده در قطعه تکثیری ژن *PSY1* در ژنوتیپ های مختلف گوجه فرنگی

نوع SNP	تعداد در آگرون	تعداد در اینترون	تعداد کل SNP	درصد SNP
A/C	۰	۱	۱	۱۲/۵
C/T	۱	۱	۲	۲۵
G/A	۱	۲	۳	۳۷/۵
G/C	۱	۱	۲	۲۵

در مطالعه واریته های وحشی و اهلی گوجه فرنگی، ۸۹۷۸ SNP با استفاده از روش توالی یابی نسل بعد و توالی های EST شناسایی شد که از این تعداد، ۵۷۲ SNP در مناطق پروموتوری قرار داشتند و جهش های همجنس ۱/۷۵ برابر بیشتر از جهش های ناهمجنس بودند. همچنین در بین جهش های ناهمجنس، فراوانی $A/T + C/G$ بیشتر از $C/A + T/G$ بود (Bhardwaj et al. 2016). در تحقیق حاضر نیز در ژن *CYC-B* هشت SNP شناسایی شدند که بیشتر آن ها در نواحی پروموتوری قرار داشت و بیشترین نوع جهش ها از نوع همجنس بودند. همچنین در تحقیق دیگری چهار SNP در منطقه پروموتور ژن *CYC-B* شناسایی شد که با رنگ نارنجی میوه گوجه فرنگی مرتبط بود (Hwang et al. 2016). در بررسی وجود SNP ها در ژن های *SUN* و *OVATE* (دخیل در شکل میوه گوجه فرنگی) در ارقام محلی گوجه فرنگی، به ترتیب ۱۰ و ۵ SNP شناسایی شد. در ژن *SUN* ۸۰ درصد SNP های همجنس از نوع A/G و T/C و ۲۰ درصد SNP های ناهمجنس از نوع T/G بود. در ژن *OVATE* ۸۰ درصد جهش های همجنس از نوع G/A و C/T و ۲۰ درصد ناهمجنس از نوع G/T بود (Khezerloo and Abdollahi Mandoulakani 2021). در تحقیق حاضر نیز در ژن *PSY1*، ۸ SNP شناسایی شدند که ۵ SNP در ناحیه اینترونی و ۳ SNP در ناحیه آگزونی بود. ۶۲/۵ درصد جهش ها از نوع همجنس با فراوانی ۳۷/۵ درصد A/G ، ۲۵ درصد T/C و ۳۷/۵ درصد جهش ها از نوع ناهمجنس با فراوانی ۲۵ درصد C/G و ۱۲/۵ درصد C/A بود. همچنین در تحقیق حاضر نیز تعداد جهش های

همجنس در این دو ژن بیشتر از جهش های ناهمجنس بود به طوری که بیشترین نوع جهش ها در هر دو ژن از نوع A/G و T/C بودند به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تعداد SNP ها در نواحی اینترونی بیشتر از نواحی آگزونی می باشد. همچنین بیشترین نوع جهش ها در ناحیه اینترونی از نوع جهش های همجنس بود. میانگین تعداد SNP ها به ازای هر ۱۰۰ جفت باز در قطعه تکثیر شده ژن *CYC-B*، ۰/۴۴ بود در حالی که در نواحی اینترونی و آگزونی ژن *PSY1* به ترتیب ۱/۲۶ و ۰/۷۱ بود. در تحقیقی با بررسی بیش از ۱۵ لاین گوجه فرنگی با استفاده از روش توالی یابی مجدد قطعات تکثیری، ۵۵ SNP شناسایی شد که ۲۹ SNP در ناحیه اینترونی و ۲۶ SNP در ناحیه آگزونی بود. دلیل فراوانی کم تعداد SNP در ناحیه آگزونی احتمالاً به علت کمبود جهش در ناحیه کد کننده ژنی و محفوظ بودن آن در طول تکامل گیاه می باشد (Joanne and Angela 2005). پیشنهاد می شود از SNP ها شناسایی شده در این تحقیق برای اشباع نقشه های ژنتیکی و طبقه بندی ژرم پلاس گوجه فرنگی استفاده شود. همچنین می توان از آن ها در مطالعات مکانی یابی ارتباطی برای معرفی نشانگرهای عملکردی مرتبط با رنگ میوه استفاده کرد. استفاده از این نشانگرهای عملکردی در تسریع و تسهیل برنامه های اصلاحی رنگ میوه گوجه فرنگی بسیار مؤثر خواهد بود.

منابع

- Bai Y, Lindhot P (2007) Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future. *Annals of Botany* 100:1085-1094.
- Bhardwaj A, Vikram Dhar Y, Asif MH, Bag SK (2016) In Silico identification of SNP diversity in cultivated and wild tomato species: insight from molecular simulations *Scientific Reports* 6:38715.
- De Masi L, Castaldo D, Galano G, Minasi P, Laratta B (2006) Genotyping of fig (*Ficus carica* L.) via RAPD markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:22-35.
- FAO website, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. 2016
- Gady AL, Vriezen WH, Van de Wal MH, Huang P, Bovy AG, Visser RG, Bachem CW (2012) Induced point mutations in the phytoene synthase 1 gene cause differences in carotenoid content during tomato fruit ripening. *Molecular Breeding* 29:801-812.
- Giovannoni JJ (2007) Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology* 10:283-289.
- Gupta PK, Roy JK, Prasad M (2001) Single nucleotide polymorphisms A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science* 80:524-535.
- Hwang I, Kim Y, Han J, Nou IS (2016) Orange colour is associated with CYC-B expression in tomato fleshy fruit. *Molecular Breeding* 36:1-10.
- Ilic D, Forbes KM, Hasset C (2011) Lycopene for the prevention of prostate cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 11:CD008007.
- Joanne AL, Angela MB (2005) Tomato SNP discovery by EST mining and resequencing. *Molecular Breeding* 16:343-349.
- Kang B, Gu Q, Tian P, Xiao L, Cao H, Yang W (2014). A chimeric transcript containing Psy1 and a potential mRNA is associated with yellow flesh colour in tomato accession PI 114490. *Planta* 240:1011-1021.
- Khezerloo S, Abdollahi Mandoulakani B (2021). Identification of SNPs in SUN and OVATE genes responsible for fruit shape in tomato. *Journal of Horticultural Science* 10:117-105. (In Farsi).
- Klee HJ, Giovannoni JJ (2011) Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review Genetics* 45:41-59.
- Lutsenko EA, Carcamo JM, Golde DW (2002) Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 277:16895-16899.
- Paduchari P, Gohokar S, Thamke B, Subhas M (2010) Transgenic tomatoes. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* 2:69-72.
- Périn C, Hagen LS, Giovinozzo N, Besombes D, Dogimont C, Pitrat M (2002) Genetic control of fruit shape acts prior to anthesis in melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 266:933-941.
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J (2000) An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold colour mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:11102-11107.
- Wu Z, Sun S, Wang F, Guo D (2011) Establishment of regeneration and transformation system of *Lycopersicon esculentum* *Microtom*. *British Biotechnology Journal* 3:53-60.