ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحه ۶۸ - ۵۹

شناسایی SNPها در ژن‌های *CYC-B* و *PSY1* دخیل در رنگ میوه گوجه‌فرنگی

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

رقیه ابراهیمی[۱]، بابک عبدالهی مندولکانی*[۲]، مشهید 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 R[1], Abdollahi Mandoulakani B[*2], Henareh M[3]

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

به‌منظور شناسایی تنوع‌های تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphism) در ژن‌های بتا سیکلاز (*CYC-B*) و فیتون سنتاز (*PSY1*) در ۹۳ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی و سه رقم تجاری، قطعاتی به‌طول ۴۰۹ و ۱۰۰۰ جفت‌باز از نواحی کدکننده این دو ژن تکثیر شد. سپس جهت آشکارسازی چندشکلی در نواحی تکثیری این ژن‌ها، هضم قطعات تکثیری با آنزیم‌های برشی *Tru1I* و *PstI* انجام گرفت ولی چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد. بنابراین چهار فرد از جمعیت‌های مختلف (ارومیه، سردشت، ترکیه و بوکان برای ژن *CYC-B*، ارومیه، سردشت، ترکیه و پیرانشهر برای ژن *PSY1*) انتخاب و قطعه تکثیری ژن‌ها در این افراد توالی‌یابی شد. بعد از بازیابی قطعه تکثیری هر ژن، شناسایی SNPها با استفاده از هم‌ردیفی توالی‌های هر ژن با نرم‌افزار Clustal Omega انجام گرفت. 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 آن‌ها 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 به‌ترتیب سه و پنج SNP در ناحیه‌ی اگزون و اینترون قرار داشت. ۶۲/۵ درصد این SNPها از نوع همجنس با فراوانی ۳۷/۵ درصد A/G، ۲۵ درصد T/C و ۳۷/۵ درصد آن‌ها از نوع غیرهمجنس با فراوانی ۲۵ درصد C/G و ۱۲/۵ درصد C/A بود. میانگین تعداد SNPها به ازای هر ۱۰۰ جفت‌باز در قطعه تکثیر شده ژن *CYC-B*، ۰/۴۴ بود در حالی‌که در نواحی اینترونی و اگزونی ژن *PSY1* به‌ترتیب ۱/۲۶ و ۰/۷۱ بود. SNPهای شناسایی شده در این تحقیق می‌تواند در تهیه نقشه‌های ژنتیکی و همچنین شناسایی نشانگرهای عملکردی مرتبط با صفت رنگ میوه در گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

تنوع تک نوکلئوتیدی
رنگ میوه
ژن بتا سیکلاز
ژن فیتون سنتاز
گوجه‌فرنگی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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 Lindbout 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 (۲۰۱٦) کشور ایران با تولید نزدیک به ٦ میلیون و ٤۰۰ 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، خودگشنی، هموزیگوت بودن و کنترل آسان گرده‌افشانی یک نمونه گیاهی عالی برای مطالعات و تحقیقات پایه‌ای می‌باشد. این گیاه دارای ارزش غذایی بالایی می‌باشد. از مواد مغذی مهم گوجه فرنگی می‌توان لیکوپن، بتا کاروتن، فلاونوئیدها، ویتامین‌های A وC 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 (Giovanonni 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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

گوجه‌فرنگی نیازمند روش‌های اصلاحی کارآمد جهت توسعه این ترکیبات می‌باشد و استفاده از نشانگرهای مولکولی برای اصلاح این گیاه ضروری می‌باشد. از جمله نشانگرهای ملکولی که در سال‌های اخیر در علوم گیاهی به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد نشانگرهای مبتنی بر تنوع تک نوکلئوتیدی (SNP[1]) می‌باشد. نشانگرهای SNP، چند شکلی مبتنی بر تفاوت در یک نوکلئوتید می‌باشد که منبع ژنتیکی عمده تغییرات فنوتیپی درون یک گونه است. این نشانگرها هم بارز و دو آللی می‌باشند و فراوانی زیادی در ژنوم یوکاریوت‌ها دارند. کارآیی بالای SNPها به‌دلیل حضور آن‌ها در تمام نواحی ژنوم، اینترون‌ها و همچنین اگزون‌ها می‌باشد و هر فرد متعلق به یک گونه، دارای هزاران SNP می‌باشد. ترکیب این تنوع‌های تک نوکلئوتیدی باعث می‌شود هر فرد دارای فنوتیپ منحصر به فردی باشد. SNPها به‌علت پایداری بیش تر، موتاسیون کمتر و حضور در بیشتر نقاط ژنوم از نشانگرهای ژنتیکی قابل اعتماد به شمار می‌روند (Gupta et al. 2001). با توجه به اهمیت رنگ میوه در کیفیت و بازارپسندی گوجه‌فرنگی و عدم مطالعه SNPها در ژن‌های *CYC-B* و *PSY1* (مسئول رنگ میوه گوجه‌فرنگی)، تحقیقی با هدف شناسایی و مطالعه فراوانی SNPها در این دو ژن در برخی ژنوتیپ‌های محلی گوجه‌فرنگی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۹۳ فرد از ۱۲ جمعیت که از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی و کشور ترکیه جمع‌آوری شده بود به‌همراه سه رقم تجاری استفاده شد (جدول۱). بذور جهت استخراج DNA در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه کشت شد. برای کشت بذور از پیت ماس و گلدان‌های با اندازه متوسط استفاده شد. بعد از رسیدن گیاه به مرحله ٦-٤ برگی نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهان برای استخراج DNA انجام شد. نمونه‌های برگی در نیتروژن مایع منجمد و سپس در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNAی ژنومی از برگ‌های جوان و سبز به روش CTAB[2] 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 ژن‌های *CYC-B* و *PSY1* از پایگاه اطلاعاتی NCBI ذخیره و نواحی اینترونی و اگزونی آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Softberry تعیین شد. آغازگرهای اختصاصی هر ژن (جدول۲) به‌منظور تکثیر قطعاتی با اندازه‌های ٤۰۹ (ژن *CYC-B*) و ۱۰۰۰ (ژن *PSY1*) جفت‌باز از نواحی کدکننده این دو ژن با استفاده از نرم‌افزارهای Fast PCR و Gen Runner طراحی و از نظر وجود ساختارهای ثانویه مثل آغازگر-دایمر و ساختارهای سنجاق‌سری بررسی شد. واکنش‌های PCR با استفاده مسترمیکس لیوفیلیزه (Bioneer، کره جنوبی) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده در ترموسایکلر (Analytik jena، آلمان) انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی‌در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ ثانیه در دمای اتصال مربوط به هر ژن (جدول ۲)، دو دقیقه بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ سانتی‌گراد بود.

[1] Single nucleotide polymorphism
[2] Hexa decyl trimethyl ammonium bromide

[2] Hexa decyl trimethyl ammonium bromide

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

جدول ۱- مناطق جغرافیایی جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

IRMA6	کوچک	Iran-Mahabad	45 40	36 44	IRSR8	کوچک	Iran-Sardasht	45 28	36 17
IRMA7	کوچک	Iran-Mahabad	45 40	36 44	TUIG1	متوسط	Turkey-Iğdır	43 59	39 57
IRMA8	بزرگ	Iran-Mahabad	45 41	36 42	TUIG2	بزرگ	Turkey-Iğdır	43 58	39 59
IRMA9	بزرگ	Iran-Mahabad	45 44	36 48	TUIG3	متوسط	Turkey-Iğdır	43 58	39 59
IRMA10	متوسط	Iran-Mahabad	45 44	36 48	TUIG4	متوسط	Turkey-Iğdır	43 59	40 00
IRQ1	بزرگ	Iran-Qaraziaediin	45 02	38 54	TUIG5	متوسط	Turkey-Iğdır	44 04	40 01
IRQ2	متوسط	Iran-Qaraziaediin	45 02	38 53	TUIG6	بزرگ	Turkey-Iğdır	44 04	40 01
IRQ3	بزرگ	Iran-Qaraziaediin	44 57	38 53	TUIG7	متوسط	Turkey-Iğdır	44 04	40 01
IRQ4	بزرگ	Iran-Qaraziaediin	44 57	38 53	TUIG8	کوچک	Turkey-Iğdır	44 04	40 01
IRQ5	متوسط	Iran-Qaraziaediin	45 02	38 50	TUIG9	کوچک	Turkey-Iğdır	44 04	40 01
IRQ6	بزرگ	Iran-Qaraziaediin	45 02	38 50	TUIG10	متوسط	Turkey-Iğdır	44 01	39 58
IRQ7	متوسط	Iran-Qaraziaediin	45 02	38 50	TUIG11	کوچک	Turkey-Iğdır	44 01	39 58
IRQ8	متوسط	Iran-Qaraziaediin	45 08	38 46	TUIG12	بزرگ	Turkey-Iğdır	44 01	39 58
IRKH1	متوسط	Iran-Khoy	45 12	38 42	TUIG13	خیلی کوچک	Turkey-Iğdır	44 01	39 58
IRKH2	کوچک	Iran-Khoy	44 50	38 34	TUIG14	کوچک	Turkey-Iğdır	44 01	39 52
IRSA1	کوچک	Iran-Salmas	38 10	44 45	Peto Early CH۱	متوسط	Iran	-	-
IRSA2	بزرگ	Iran-Salmas	38 09	44 44	Rio Grande۱*	متوسط	Iran	-	-
IRSR1	خیلی کوچک	Iran-Sardasht	36 12	45 33	H-2274۱	متوسط	Turkey	-	-

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن‌های *CYC-B* و *PSY1* در گیاه گوجه‌فرنگی

ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر	اندازه محصول (جفت باز)	دمای اتصال
CYC-B	KP233168.1	F: GCTTTTATAGGGTCCCAGTTCCAC R: CCCTTTTCCCAATCCCAGTCCCA	٤٠٩	٦١
PSY1	M84744.1	F: CGGTCTGCTATTTTGGCTACTC R: GTATCGGACAAAGCACCATCG	٤٢٥	٥٨

پس از تکثیر قطعات، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و باندهای مربوط به هر ژن شناسایی شد. به‌منظور هضم قطعات تکثیر شده دو ژن با آنزیم‌های *Pst1* و *Tru1* (Fermentas، آلمان) ابتدا الگوی برشی و طول قطعات حاصل از برش با استفاده از نرم‌افزار Fast PCR پیش‌بینی شد. سپس قطعات تکثیر شده دو ژن در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (۹٦ ژنوتیپ) با استفاده از آنزیم‌های فوق‌الذکر بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده هضم شد. به‌منظور آشکارسازی قطعات حاصل از برش از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۵ به مدت یک و نیم ساعت استفاده شد.

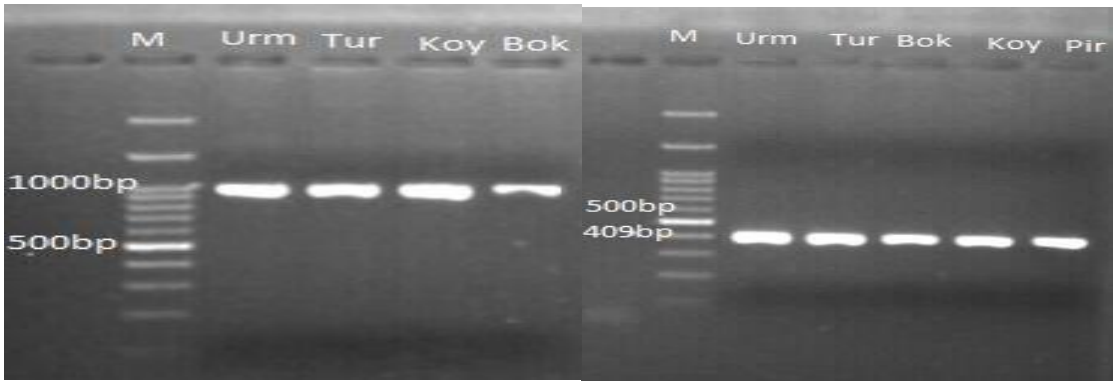
با توجه به این که هضم آنزیمی توالی‌های تکثیری دو ژن در افراد مطالعه شده چند شکلی تولید نکرد لذا جهت شناسایی SNPها در نواحی کدکننده ژن‌های *CYC-B* و *PSY1* از روش توالی‌یابی استفاده شد. بدین ترتیب که برای ژن *CYC-B* چهار فرد از جمعیت‌های ارومیه، سردشت، ترکیه و بوکان و برای ژن *PSY1* چهار فرد از جمعیت‌های ارومیه، سردشت، ترکیه و پیرانشهر انتخاب و بعد از انجام PCR، حدود ٤٠ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه روی ژل آگارز ۱/۵ با ولتاژ ۸۰ تفکیک شد. سپس محصول هر ژن با استفاده از کیت خالص‌سازی (Qiagen، آمریکا) از ژل تخلیص و جهت توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست (تهران،

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

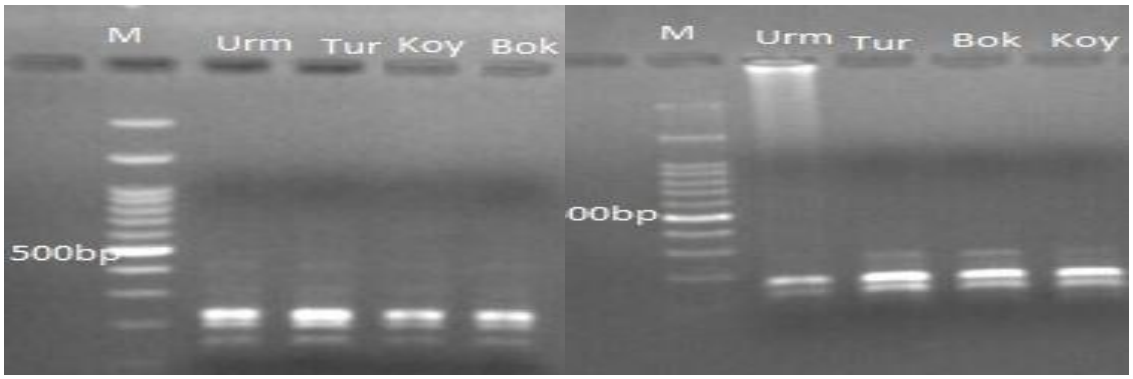
ایران) ارسال شد. با توجه به اینکه طول قطعه تکثیری در ژن *PSY1* ۱۰۰۰ جفت‌باز بود برای قرائت کامل، توالی‌یابی با استفاده از هر دو آغازگر پیشرو و معکوس صورت گرفت ولی در ژن *CYC-B* با طول قطعه ٤٠٩ جفت‌بازی تنها از آغازگر پیشرو جهت توالی‌یابی استفاده شد. برای اطمینان از صحت قطعات توالی‌یابی شده، ابتدا توالی‌ها در برابر ژنوم گوجه‌فرنگی بلاست شد و نواحی مشترک توالی‌های پیشرو و معکوس هر قطعه شناسایی و توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Fast PCR بازیابی شد. سپس هم‌ردیفی چندگانه بین توالی‌های مربوط به هر ژن توسط نرم‌افزار Clustal Omega جهت شناسایی SNPها انجام گرفت.

نتایج و بحث

تکثیر و هضم قطعات ژنی: هضم قطعات تکثیری در ژن‌های مورد مطالعه بین ۹٦ 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 جفت‌باز تولید کرد. ولی بعد از هضم و الکتروفورز چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱- قطعات تکثیر شده ژن‌های *CYC-B* (سمت راست) و *PSY1* (سمت چپ) به‌ترتیب با اندازه‌های ٤٠٩ و ۱۰۰۰ جفت‌باز در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی (چاهک‌ها به‌ترتیب M: نشانگر 1Kb (Fermentas، آلمان) ۱: ارومیه ۲: ترکیه ۳: بوکان ٤: خوی ٥: پیرانشهر (ژن *CYC-B*) و ۱: ارومیه ۲: ترکیه ۳: خوی ٤: بوکان (ژن *PSY1*)



شکل ۲- هضم آنزیمی قطعات تکثیر شده ژن‌های *CYC-B* (سمت راست) و *PSY1* (سمت چپ) با آنزیم برشی *Tru1* در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی(چاهک‌ها به‌ترتیب M: نشانگر 1Kb (Fermentas، آلمان) ۱: ارومیه ۲: ترکیه ۳: بوکان ٤: خوی (ژن *CYC-B*) و ۱: ارومیه ۲: ترکیه ۳: خوی ٤: بوکان (ژن *PSY1*)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]



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)

شناسایی SNPها 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، ۰/٤٤ تنوع تک نوکلئوتیدی شناسایی شد و نسبت جهش‌های همجنس به ناهمجنس ۳:۱ بود.

شناسایی SNPها در قطعه تکثیر شده ژن *PSY1*: بعد از تکثیر قطعه مورد نظر در ژن *PSY1* در ۹٦ 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 اینترونی ۳۹٦ جفت بازی در این ژن شد.

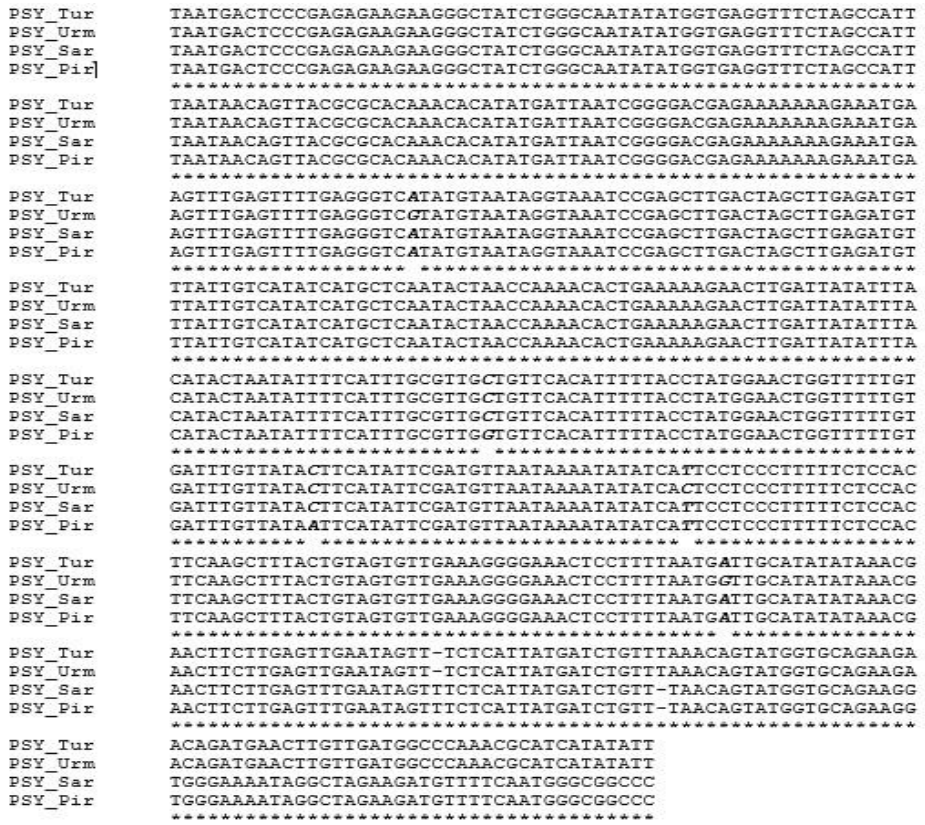
هم‌ردیفی بین توالی قطعه تکثیری ژن *PSY1* در جمعیت‌های ارومیه، ترکیه، سردشت و پیرانشهر در نواحی اینترونی (شکل٤) و اگزونی (شکل۵) منجر به شناسایی هشت SNP شد که پنج SNP در ناحیه اینترونی و سه SNP در ناحیه اگزونی مشاهده شد.

جدول ۳- فراوانی SNPها در قطعه تکثیری ژن *CYC-B* در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی

نوع SNP	SNP فراوانی	درصد SNP
A/G	٤	۵۰
C/A	۱	۵/۱۲
T/C	۲	۲۵
G/C	۱	۱۲/۵

از کل SNPهای شناسایی شده، ٦۲/۵ 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 ٤). بیشترین نوع جهش‌ها در ناحیه اینترونی از نوع جهش‌های همجنس بود. دلیل فراوانی کم تعداد SNP در ناحیه اگزونی احتمالاً به‌علت کمبود جهش در ناحیه کدکننده ژنی و محفوظ بودن آن در طول تکامل گیاه می‌باشد (Bhardwaj et al. 2016). در ژن *PSY1* در نواحی اینترونی و اگزونی به ازای هر ۱۰۰ جفت‌باز، به‌ترتیب ۲٦/۱ و ۰/۷۱ SNP شناسایی شد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]



شکل ٤- هم‌ردیفی چندگانه توالی ناحیه اینترونی ژن *PSY1* در چهار ژنوتیپ از جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی (Urm: ارومیه، Sar: سردشت، Tur: ترکیه، Pir: پیرانشهر)



شکل ٥- هم‌ردیفی چندگانه توالی ناحیه اگزونی ژن *PSY1* در چهار ژنوتیپ از جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی (Urm: ارومیه، Sar: سردشت، Tur:ترکیه، Pir: پیرانشهر)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

جدول ٤- فراوانی SNPهای شناسایی شده در قطعه تکثیری ژن *PSY1* در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی

نوع SNP	تعداد در اگزون	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 واریته‌های وحشی و اهلی گوجه‌فرنگی، ۸۹۷۸ SNP با استفاده از روش توالی‌یابی نسل بعد و توالی‌های EST شناسایی شد که از این تعداد، ۵۷۲ SNP در مناطق پروموتوری قرار داشتند و جهش‌های همجنس ۱/۷۵ برابر بیشتر از جهش‌های ناهمجنس بودند. همچنین در بین جهش‌های 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 آن‌ها در نواحی پروموتوری قرار داشت و بیشترین نوع جهش‌ها از نوع همجنس بودند. همچنین در تحقیق دیگری چهار SNP در منطقه پروموتور ژن *CYC-B* شناسایی شد که با رنگ نارنجی میوه گوجه‌فرنگی مرتبط بود (Hwang et al. 2016). در بررسی وجود SNPها در ژن‌های *SUN* و *OVATE* (دخیل در شکل میوه گوجه‌فرنگی) در ارقام محلی گوجه‌فرنگی، به‌ترتیب ۱۰ و ۵ SNP شناسایی شد. در ژن *SUN* ۸۰ درصد SNPهای همجنس از نوع A/G و T/C و ۲۰ درصد SNPهای ناهمجنس از نوع T/G بود. در ژن *OVATE* ۸۰ درصد جهش‌های 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 اگزونی بود. ٦٢/٥ درصد جهش‌ها از نوع همجنس با فراوانی ۳۷/۵ درصد A/G، ۲۵ درصد T/C و ۳۷/۵ درصد جهش‌ها از نوع ناهمجنس با فراوانی ۲۵ درصد C/G و ۱۲/۵ درصد C/A بود. همچنین در تحقیق حاضر نیز تعداد جهش‌های همجنس در این دو ژن بیشتر از جهش‌های ناهمجنس بود به‌طوری‌که بیشترین نوع جهش‌ها در هر دو ژن از نوع A/G و T/C بودند به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تعداد SNPها در نواحی اینترونی بیشتر از نواحی اگزونی می‌باشد. همچنین بیشترین نوع جهش‌ها در ناحیه اینترونی از نوع جهش‌های همجنس بود. میانگین تعداد SNPها به ازای هر ۱۰۰ جفت‌باز در قطعه تکثیر شده ژن *CYC-B*، ۰/٤٤ بود در حالی‌که در نواحی اینترونی و اگزونی ژن *PSY1* به‌ترتیب ۱/۲٦ و ۰/۷۱ بود. در تحقیقی با بررسی بیش از ۱۵ لاین گوجه‌فرنگی با استفاده از روش توالی‌یابی مجدد قطعات تکثیری، ۵۵ SNP شناسایی شد که ۲۹ SNP در ناحیه اینترونی و ۲٦ SNP در ناحیه اگزونی بود. دلیل فراوانی کم تعداد SNP در ناحیه اگزونی احتمالا به‌علت کمبود جهش در ناحیه کد کننده ژنی و محفوظ بودن آن در طول تکامل گیاه می‌باشد (Joanne and Angela 2005). پیشنهاد می‌شود از SNPها شناسایی شده در این تحقیق برای اشباع نقشه‌های ژنتیکی و طبقه‌بندی ژرم پلاسم گوجه‌فرنگی استفاده شود. همچنین می‌توان از آن‌ها در مطالعات مکانی‌یابی ارتباطی برای معرفی نشانگرهای عملکردی مرتبط با رنگ میوه استفاده کرد. استفاده از این نشانگرهای عملکردی در تسریع و تسهیل برنامه‌های اصلاحی رنگ میوه گوجه‌فرنگی بسیار مؤثر خواهد بود.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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, Hassed 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, Giovinazzo 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 *Lycopresicon esculentum Microtom*. British Biotechnology Journal 3:53-60.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]