

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

گوجه‌فرنگی

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

رقیه ابراهیمی^۱، بابک عبدالهی 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 تنوع‌های تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphism) در ژن‌های بتا سیکلاز (*CYC-B*) و فیتون سنتاز (*PSYI*) در ۹۳ ژنوتیپ گوجه‌فرنگی و سه رقم تجاری، قطعاتی به طول 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 *PstI* و *TruII* 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 *PSYI*) 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 *PSYI* نیز هشت SNP شناسایی شد که به ترتیب 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 حالی که در نواحی اینترونی و اگزونی ژن *PSYI* به ترتیب 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

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، 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 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 آنتی‌اکسیدانی زیادی دارد. آنتی‌اکسیدان‌ها قادر به واکنش با رادیکال‌های آزاد می‌باشند و از به‌وجود آمدن بیماری‌ها جلوگیری می‌کنند. لیکوپن از قدرت آنتی‌اکسیدانی 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 ضد عفونی‌کننده و تصفیه‌کننده خون نیز می‌باشد. بیش از ۸۵ درصد لیکوپن مصرفی از گوجه‌فرنگی و فرآورده‌های آن تأمین می‌شود بنابراین این محصول محبوبیت فوق‌العاده‌ای در سال‌های اخیر بدلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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، اسیدبته، 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 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 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 گلدان‌های با اندازه متوسط استفاده شد. بعد از رسیدن گیاه به مرحله ۶-۴ برگگی نمونه‌برداری از برگ‌های گیاهان برای استخراج DNA انجام شد. نمونه‌های برگگی در نیتروژن مایع منجمد و سپس در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNA ژنومی از برگ‌های 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 ژنهای *PSYI* و *CYC-B* از پایگاه اطلاعاتی NCBI ذخیره و نواحی اینترونی و آگزونی آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Softberry تعیین شد. آغازگرهای اختصاصی هر ژن (جدول ۲) به‌منظور تکثیر قطعاتی با اندازه‌های ۴۰۹ (ژن *CYC-B*) و ۱۰۰۰ (ژن *PSYI*) 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 مستر میکس 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 واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ 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.

رسیدگی میوه دارد. ژن *PSYI* اولین مرحله بیوستز کارتوتیوها را کاتالیز می‌کند و باعث تشکیل فیتون می‌شود (Kang et al. 2014). گیاهان دارای ژن *PSYI*، بافت گوشتی زرد رنگ دارند و بیان این ژن در مراحل پایانی رسیدگی میوه گوجه‌فرنگی زیاد می‌شود و تحت کنترل مثبت اتیلن قرار دارد (Gady et al. 2012). در مسیر بیوستز کارتوتیوها 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 اسیدآمینو این ژن بسیار شبیه آنزیم سنتاز کاپسانتین کاپسورین است که باعث تولید زانتوفیل (عامل رنگ قرمز میوه در لفل) می‌شود. در شاخه دیگر بیوستز کارتوتیوها، 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 مولکولی که در سال‌های اخیر در علوم گیاهی به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد نشانگرهای مبتنی بر تنوع تک نوکلئوتیدی (SNP^۱) 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 آلی می‌باشند و فراوانی زیادی در ژنوم یوکاریوت‌ها دارند. کارایی بالای SNPها به دلیل حضور آن‌ها در تمام نواحی ژنوم، اینترون‌ها و همچنین آگزون‌ها 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 بازاریابی گوجه‌فرنگی و عدم مطالعه SNPها در ژنهای *CYC-B* و *PSYI* (مسئول رنگ میوه گوجه‌فرنگی)، تحقیقی با هدف

^۲ Hexa decyl trimethyl ammonium bromide

^۱ Single nucleotide polymorphism

^۲ Hexa decyl trimethyl ammonium bromide

جدول ۱- مناطق جغرافیایی جمعیت‌های مختلف گوجه‌فرنگی

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

ادامه جدول ۱

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

36	17	45	28	Iran-Sardasht	کوچک	IRSR8	36	44	45	40	Iran-Mahabad	کوچک	IRMA6
39	57	43	59	Turkey-Iğdir	متوسط	TUIG1	36	44	45	40	Iran-Mahabad	کوچک	IRMA7
39	59	43	58	Turkey-Iğdir	بزرگ	TUIG2	36	42	45	41	Iran-Mahabad	بزرگ	IRMA8
39	59	43	58	Turkey-Iğdir	متوسط	TUIG3	36	48	45	44	Iran-Mahabad	بزرگ	IRMA9
40	00	43	59	Turkey-Iğdir	متوسط	TUIG4	36	48	45	44	Iran-Mahabad	متوسط	IRMA10
40	01	44	04	Turkey-Iğdir	متوسط	TUIG5	38	54	45	02	Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ1
40	01	44	04	Turkey-Iğdir	بزرگ	TUIG6	38	53	45	02	Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ2
40	01	44	04	Turkey-Iğdir	متوسط	TUIG7	38	53	44	57	Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ3
40	01	44	04	Turkey-Iğdir	کوچک	TUIG8	38	53	44	57	Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ4
40	01	44	04	Turkey-Iğdir	کوچک	TUIG9	38	50	45	02	Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ5
39	58	44	01	Turkey-Iğdir	متوسط	TUIG10	38	50	45	02	Iran-Qaraziaediin	بزرگ	IRQ6
39	58	44	01	Turkey-Iğdir	کوچک	TUIG11	38	50	45	02	Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ7
39	58	44	01	Turkey-Iğdir	بزرگ	TUIG12	38	46	45	08	Iran-Qaraziaediin	متوسط	IRQ8
39	58	44	01	Turkey-Iğdir	خیلی کوچک	TUIG13	38	42	45	12	Iran-Khoy	متوسط	IRKH1
39	52	44	01	Turkey-Iğdir	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 ژنهای *PSYI* و *CYC-B* در گیاه گوجه‌فرنگی

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

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 *PSYI* و *CYC-B* از روش توالی‌یابی استفاده شد. بدین ترتیب که برای ژن *CYC-B* چهار فرد از جمعیت‌های ارومیه، سردشت، ترکیه و بوکان و برای ژن *PSYI* چهار فرد از جمعیت‌های 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 خالص‌سازی (Qiagen، آمریکا) از ژل تخلیص و جهت توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست (تهران،

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 *PstI* و *TruI* (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 (۹۶ ژنوتیپ) با استفاده از آنزیم‌های فوق‌الذکر بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده هضم شد. به‌منظور آشکارسازی قطعات حاصل از برش از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۵ به مدت یک و نیم ساعت استفاده شد.

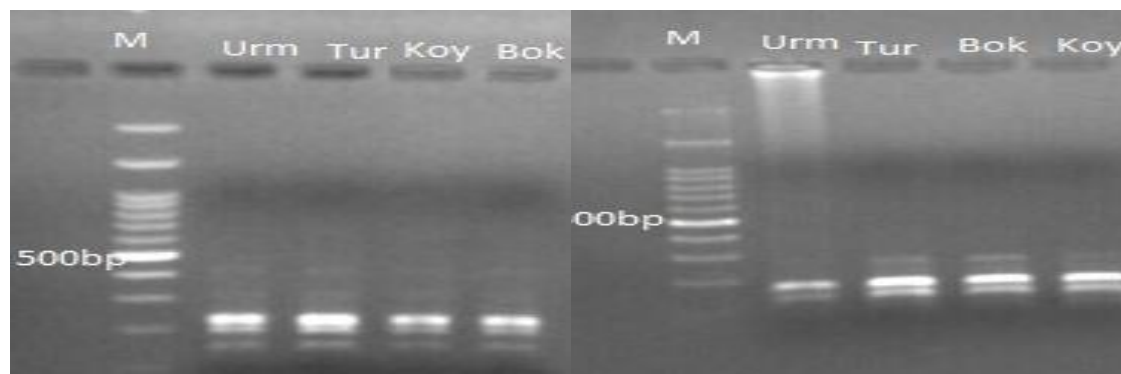
نتایج و بحث

تکثیر و هضم قطعات ژنی: هضم قطعات تکثیری در ژن های مورد مطالعه بین ۹۶ ژنوتیپ با آنزیم *PstI* چند شکلی نشان نداد. همچنین هضم قطعات تکثیر شده دو ژن با آنزیم *TruI* 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 باز یابی 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 *TruI* 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      GACAAATACCTCACATATGTTTGTAGTGCTTGGTAATATAAAACCTTTTCTTTTATGAGA
*****
CYC_Urm      AAGTTCACCGAGAATAATTTCTATTTGTGGCATAACTAGTATATAGTACAGATTGACAA
CYC_Sar      AAGTTCACCGAGAATAATTTCTATTTGTGGCATAACTAGTATATAGTACAGATTGACAA
CYC_Tur      AAGTTCACCGAGAATAATTTCTATTTGTGGCATAACTAGTATATAGTACAGATTGACAA
CYC_Bok      AAGTTCACCGAGAATAATTTCTATTTGTGGCATAACTAGTATATAGTACAGATTGACAA
*****
CYC_Urm      GAATTTAATTTGTCAGTTGGGCACATGAACAATTTTCCTCAAAGTTGTAGAAAGTACCTTT
CYC_Sar      GAATTTAATTTGTCAGTTGGGCACATGAACAATTTTCCTCAAAGTTGTAGAAAGTACCTTT
CYC_Tur      GAATTTAATTTGTCAGTTGGGCACATGAACAATTTTCCTCAAAGTTGTAGAAAGTACCTTT
CYC_Bok      GAATTTAATTTGTCAGTTGGGCACATGAACAATTTTCCTCAAAGTTGTAGAAAGTACCTTT
*****
CYC_Urm      TCATTTTCTGTGCACCGAAAATTATTTATAATTGAAATTAACCCGAATGAGCTGCAAGA
CYC_Sar      TCATTTTCTGTGCACCGAAAATTATTTATAATTGAAATTAACCCGAATGAGCTGCAAGA
CYC_Tur      TCATTTTCTGTGCACCGAAAATTATTTATAATTGAAATTAACCCGAATGAGCTGCAAGA
CYC_Bok      TCATTTTCTGTGCACCGAAAATTATTTATAATTGAAATTAACCCGAATGAGCTGCAAGA
*****
CYC_Urm      TTCAAGTCGAATTTCAAAGAATTGACCAAGAAAAAATTCAAAAATATCCCCACCCTT
CYC_Sar      TTCAAGTCGAATTTCAAAGAATTGACCAAGAAAAAATTCAAAAATATCCCCACCCTT
CYC_Tur      TTCAAGTCGAATTTCAAAGAATTGACCAAGAAAAAATTCAAAAATATCCCCACCCTT
CYC_Bok      TTCAAGTCGAATTTCAAAGAATTGACCAAGAAAAAATTCAAAAATATCCCCACCCTT
*****
CYC_Urm      ACCAAACACATCCTAAAGTGAAGTATAGACTGGGACTGGGATTGGGAAAAAGGA
CYC_Sar      ACCAAACACATCCTAAAGTGAAGTATAGACTGGGACTGGGATTGGGAAAAAGGA
CYC_Tur      ACCAAACACATCCTAAAGTGAAGTATAGACTGGGACTGGGATTGGGAAAAAGGA
CYC_Bok      ACCAAACACATCCTAAAGTGAAGTATAGACTGGGACTGGGATTGGGAAAAAGG-
*****

```

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 SNPها 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

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، ۰/۴۴ تنوع تک نوکلئوتیدی شناسایی شد و نسبت جهش‌های همجنس به ناهمجنس ۳:۱ بود.

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

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

از کل SNPهای 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 اینترونی 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 *PSYI* در نواحی اینترونی و اگزونی به ازای هر ۱۰۰ جفت‌باز، به ترتیب ۲۶/۱ و ۰/۷۱ SNP شناسایی شد.

```

PSY_Tur      TAATGACTCCCGAGAGAAGAAGGGCTATCTGGGCAATATATGGTGAGGTTTCTAGCCATT
PSY_Urm      TAATGACTCCCGAGAGAAGAAGGGCTATCTGGGCAATATATGGTGAGGTTTCTAGCCATT
PSY_Sar      TAATGACTCCCGAGAGAAGAAGGGCTATCTGGGCAATATATGGTGAGGTTTCTAGCCATT
PSY_Pir]     TAATGACTCCCGAGAGAAGAAGGGCTATCTGGGCAATATATGGTGAGGTTTCTAGCCATT
*****
PSY_Tur      TAATAACAGTTACGCGCACAAACACATATGATTAATCGGGGACGAGAAAAAAGAAATGA
PSY_Urm      TAATAACAGTTACGCGCACAAACACATATGATTAATCGGGGACGAGAAAAAAGAAATGA
PSY_Sar      TAATAACAGTTACGCGCACAAACACATATGATTAATCGGGGACGAGAAAAAAGAAATGA
PSY_Pir      TAATAACAGTTACGCGCACAAACACATATGATTAATCGGGGACGAGAAAAAAGAAATGA
*****
PSY_Tur      AGTTTGAGTTTTGAGGGTCCATATGTAATAGGTAATCCGAGCTTGACTAGCTTGAGATGT
PSY_Urm      AGTTTGAGTTTTGAGGGTCCATATGTAATAGGTAATCCGAGCTTGACTAGCTTGAGATGT
PSY_Sar      AGTTTGAGTTTTGAGGGTCCATATGTAATAGGTAATCCGAGCTTGACTAGCTTGAGATGT
PSY_Pir      AGTTTGAGTTTTGAGGGTCCATATGTAATAGGTAATCCGAGCTTGACTAGCTTGAGATGT
*****
PSY_Tur      TTATTGTCATATCATGCTCAATACTAACC AAAACACTGAAAAAGAACTTGATTATATTTA
PSY_Urm      TTATTGTCATATCATGCTCAATACTAACC AAAACACTGAAAAAGAACTTGATTATATTTA
PSY_Sar      TTATTGTCATATCATGCTCAATACTAACC AAAACACTGAAAAAGAACTTGATTATATTTA
PSY_Pir      TTATTGTCATATCATGCTCAATACTAACC AAAACACTGAAAAAGAACTTGATTATATTTA
*****
PSY_Tur      CATACTAATATTTTCATTTCGCTTGCCTTGCATTTTACCTATGGAACCTGGTTTTTGT
PSY_Urm      CATACTAATATTTTCATTTCGCTTGCCTTGCATTTTACCTATGGAACCTGGTTTTTGT
PSY_Sar      CATACTAATATTTTCATTTCGCTTGCCTTGCATTTTACCTATGGAACCTGGTTTTTGT
PSY_Pir      CATACTAATATTTTCATTTCGCTTGCCTTGCATTTTACCTATGGAACCTGGTTTTTGT
*****
PSY_Tur      GATTGTTTACTTCATATTCGATGTTAATAAATAATATCATTCCTCCCTTTTCTCCAC
PSY_Urm      GATTGTTTACTTCATATTCGATGTTAATAAATAATATCATTCCTCCCTTTTCTCCAC
PSY_Sar      GATTGTTTACTTCATATTCGATGTTAATAAATAATATCATTCCTCCCTTTTCTCCAC
PSY_Pir      GATTGTTTACTTCATATTCGATGTTAATAAATAATATCATTCCTCCCTTTTCTCCAC
*****
PSY_Tur      TTCAAGCTTTACTGTAGTGTGARAGGGGAAACTCCTTTAATGATTGCATATATAAACG
PSY_Urm      TTCAAGCTTTACTGTAGTGTGARAGGGGAAACTCCTTTAATGATTGCATATATAAACG
PSY_Sar      TTCAAGCTTTACTGTAGTGTGARAGGGGAAACTCCTTTAATGATTGCATATATAAACG
PSY_Pir      TTCAAGCTTTACTGTAGTGTGARAGGGGAAACTCCTTTAATGATTGCATATATAAACG
*****
PSY_Tur      AACTTCTTGAGTTGAATAGTT-TCTCATTATGATCTGTTTAAACAGTATGGTGCAGAAGA
PSY_Urm      AACTTCTTGAGTTGAATAGTT-TCTCATTATGATCTGTTTAAACAGTATGGTGCAGAAGA
PSY_Sar      AACTTCTTGAGTTGAATAGTT-TCTCATTATGATCTGTT-TAACAGTATGGTGCAGAAGG
PSY_Pir      AACTTCTTGAGTTGAATAGTTTCTCATTATGATCTGTT-TAACAGTATGGTGCAGAAGG
*****
PSY_Tur      ACAGATGAACCTTGTTGATGGCCAAACGCATCATATATT
PSY_Urm      ACAGATGAACCTTGTTGATGGCCAAACGCATCATATATT
PSY_Sar      TGGGAAAATAGGCTAGAAAGATGTTTTCATGGCGGCC
PSY_Pir      TGGGAAAATAGGCTAGAAAGATGTTTTCATGGCGGCC
*****

```

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

```

PSY_Tur      TCTATGATGTGGTTTTGAGGCAGGCAGCCTTGGTGAAGAGGCAACTGAGATCTACCAATG
PSY_Urm      TCTATGATGTGGTTTTGAGGCAGGCAGCCTTGGTGAAGAGGCAACTGAGATCTACCAATG
PSY_Sar      TCTATGATGTGGTTTTGAGGCAGGCAGCCTTGGTGAAGAGGCAACTGAGATCTACCAATG
PSY_Pir      TCTATGATGTGGTTTTGAGGCAGGCAGCCTTGGTGAAGAGGCAACTGAGATCTACCAATG
*****
PSY_Tur      AGTTAGAAGTGAAGCCGGATATACCTATTCCGGGGAATTTGGGCTTGTTGAGTGAAGCAT
PSY_Urm      AGTTAGAAGTGAAGCCGGATATACCTATTCCGGGGAATTTGGGCTTGTTGAGTGAAGCAT
PSY_Sar      AGTTAGAAGTGAAGCCGGATATACCTATTCCGGGGAATTTGGGCTTGTTGAGTGAAGCAT
PSY_Pir      AGTTAGAAGTGAAGCCGGATATACCTATTCCGGGGAATTTGGGCTTGTTGAGTGAAGCAT
*****
PSY_Tur      ATGATAGGTGTGGTGAAGTATGTGCAGAGTATGCAAAGACGTTTAACTTAGGTTAGCTTC
PSY_Urm      ATGATAGGTGTGGTGAAGTATGTGCAGAGTATGCAAAGACGTTTAACTTAGGTTAGCTTC
PSY_Sar      ATGATAGGTGTGGTGAAGTATGTGCAGAGTATGCAAAGACGTTTAACTTAGGTTAGCTTC
PSY_Pir      ATGATAGGTGTGGTGAAGTATGTGCAGAGTATGCAAAGACGTTTAACTTAGGTTAGCTTC
*****
PSY_Tur      TTCAATCTATTCATTTCGTTTACCAAATATTATTTGGTAAGCACTAATTATGAATATATAT
PSY_Urm      TTCAATCTATTCATTTCGTTTACCAAATATTATTTGGTAAGCACTAATTATGAATATATAT
PSY_Sar      TTCAATCTATTCATTTCGTTTACCAAATATTATTTGGTAAGCACTAATTATGAATATATAT
PSY_Pir      TTCAATCTATTCATTTCGTTTACCAAATATTATTTGGTAAGCACTAATTATGAATATATAT
*****
PSY_Tur      ATGTTTCATGTTATTGATGAAGACAAAATTTGATCTTTGTTTGTATTTCAGGAACATATGC
PSY_Urm      ATGTTTCATGTTATTGATGAAGACAAAATTTGATCTTTGTTTGTATTTCAGGAACATATGC
PSY_Sar      ATGTTTCATGTTATTGATGAAGACAAAATTTGATCTTTGTTTGTATTTCAGGAACATATGC
PSY_Pir      ATGTTTCATGTTATTGATGAAGACAAAATTTGATCTTTGTTTGTATTTCAGGAACATATGC
*****

```

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 SNPهای شناسایی شده در قطعه تکثیری ژن *PSYI* در ژنوتیپ‌های مختلف گوجه‌فرنگی

نوع SNP	تعداد در آزمون	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

همجنس در این دو ژن بیشتر از جهش‌های ناهمجنس بود به طوری که بیشترین نوع جهش‌ها در هر دو ژن از نوع A/G و T/C بودند به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تعداد SNPها در نواحی اینترون بیشتر از نواحی آگزونی می‌باشد. همچنین بیشترین نوع جهش‌ها در ناحیه اینترون از نوع جهش‌های همجنس بود. میانگین تعداد SNPها به ازای هر ۱۰۰ جفت‌باز در قطعه تکثیر شده ژن *CYC-B*، ۰/۴۴ بود در حالی که در نواحی اینترون و آگزونی ژن *PSYI* به ترتیب ۱/۲۶ و ۰/۷۱ بود. در تحقیقی با بررسی بیش از ۱۵ لاین گوجه‌فرنگی با استفاده از روش توالی‌یابی مجدد قطعات تکثیر، ۵۵ SNP شناسایی شد که ۲۹ SNP در ناحیه اینترون 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 می‌باشد (Joanne and Angela 2005). پیشنهاد می‌شود از SNPها شناسایی شده در این تحقیق برای اشباع نقشه‌های ژنتیکی و طبقه‌بندی ژرم پلاسما 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.

در مطالعه وارسته‌های 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، به ترتیب 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 *PSYI*، ۸ SNP شناسایی شدند که ۵ SNP در ناحیه اینترون و ۳ SNP در ناحیه آگزونی بود. ۶۲/۵ 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

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, Giovanazzo 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.