ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤
صفحه ٥٧٤-٥٦٧

بررسی اثر غلظت‌های مختلف گوگرد بر بیان ژن کدکننده آلیناز در سیر (*Allium sativum* L.) به روش پی سی آر کمی

Study of different sulfur concentrations on Alliinase gene expression profile in some garlic (*Allium sativum* L.) clones with QPCR

علی عمارلو*[1]، کمال کاظمی‌تبار[2]، حمید نجفی‌زرینی[2]

١- استادیار، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی دانشگاه زنجان
٢- به ترتیب دانشیار و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

Ammarellou A*[1], Kazemitabar K[2], Najafi Zarreini H[2]

1. Assistant Professor, Institute of Modern Biological Techniques, University of Zanjan
2. Associate Professor, Assistant Professor, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Ammarellou@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ٩٤/١/٢٢ - تاریخ پذیرش: ٩٤/١١/١٩)

چکیده

در این تحقیق بیان ژن کد کننده آلیناز (All) در غلظت‌های صفر، ٦، ١٢، ١٨، ٢٤ و٦٠ گرم گوگرد عنصری به ازای هر واحد آزمایشی در شرایط گلدانی، در سه کلون سیر در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار بررسی شد. نتایج آنالیز بیان ژن نشان داد که با افزایش غلظت گوگرد از صفر تا ١٨ گرم، از میزان بیان ژن با شیب ملایمی کاسته-شده و سپس در فاصله تیمار ١٨ تا ٢٤ افزایش شدیدی در فعالیت ژن مشاهده شد. در غلظت‌های بسیار بالا (٦٠ گرم) سطح بیان ژن یاد شده به حداقل میزان خود رسید. بالا بودن بیان ژن در شرایط گوگرد کم (تیمار شاهد)، ضرورت مشارکت و حضور پررنگ آلیناز را در بازچرخش آلیل سیستئین سولفوکسید (ACSOs) و نیز دخالت در تشدید فعالیت پروتئین‌های حامل سولفات (STP) که در جذب و تبدیل سولفور به ترکیبات ارگانیک مشارکت دارند را توجیه می‌کند. با تامین سطوح گوگردی در مقیاس ٦ تا ١٨ گرم از ضرورت درگیری این ژن برای جبران کمبود کاسته می‌شود. با افزایش سطوح گوگردی تا ٢٤ گرم، تجمیع ترکیبات گوگردی در واکوئل‌های سلولی به حداکثر مقدار خود می رسد که این خود ارتباط مستقیمی با بیان ژن آلیناز خواهد داشت. افزایش بیش از حد گوگرد می-تواند به سطوح سمیت سلولی نزدیک شده و متابولیسم کلی گیاه را که متابولیسم گوگرد بخشی از آن است تحت تاثیر قرار دهد. با توجه به نقش کلیدی آنزیم آلیناز در میزان تندی سیر، مهندسی ژن مسئول آن می‌تواند در برنامه-های اصلاحی متابولیت‌های سیر حائز اهمیت باشد.

واژه‌های کلیدی

آلیناز
ترکیبات ارگانوسولفور
تندی
سیر
cDNA

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.12.4]

مقدمه

سیر *Allium sativum* L. از خانواده آلیاسه و بعد از پیاز پرمصرف‌ترین گیاه از جنس *Allium* با تولید جهانی بیش از ۲۲ میلیون تن در سال بوده که میزان تولید و مصرف آن از روندی افزایشی برخوردار است (Chen et al. 2014). در میان گونه‌های شناخته شده این جنس، سیر و پیاز از گونه‌های بسیار معروف با خواص سلامت بخشی بالا و اثرات دارویی می‌باشند (Tocmo et al. 2015) سیر دارای اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانت بوده و کاهنده کلسترول خون می‌باشد (Ovesna et al. 2015). مهمترین کشورهای تولیدکننده سیر دنیا، کشورهای چین، هند، کره جنوبی، مصر و روسیه می‌باشد (Tovar-Soto and Robledo-Paz 2012). ایران رتبه پانزدهم تولید سیر دنیا را داشته و استان‌های زنجان و همدان به طور مشترک رتبه اول تولید سیر ایران را به خود اختصاص داده‌اند (FAOSTAT 2014). اثرات بیولوژیکی سیر به ویژگی‌های ترکیبات ارگانوسولفور نسبت داده می‌شود (Agarwal 1996; Block 1992). سیر دارای حدود ۳۳ نوع ترکیب گوگردی است. از جمله این ترکیبات می‌توان به آلین، آلیسین، آجوئن، آلیل پروپیل سولفید، دی آلیل تری سولفید، سالیل سیستئین، وینیل دی تئین، S-آلیل مرکاپتوسیستئین و ... اشاره کرد. چندین آنزیم از جمله آلیناز (All[1])، پرکسیداز و میروزیناز در سیر حضور دارند. حضور ۱۷ نوع آمینواسید از جمله آرژنین و نیز مواد معدنی شامل سلنیوم، جرمانیوم و تلوریوم ویژگی‌های خاصی به سیر می‌دهد (Newall et al. 1996). آلیسین (دی آلیل تیوسولفات) اولین بار در سال ۱۹٤٤ به عنوان مسئول تندی در سیر شناخته شد (Cavallito and Bailey 1944). آلیسین تا زمانی که بافت سیر دچار صدمه و برش نشده باشد در سیر وجود ندارد اما به محض آسیب و خراش در سیر، آنزیم آلیناز فعال شده و در اثر سوخت و ساز، آلین را به آلیسین تبدیل می‌کند (شکل ۱). آلیسین متعاقبا به دی آلیل سولفید، دی آلیل دی سولفید، دی آلیل تری سولفید، آلیل متیل تری سولفید، دی تئین‌ها و آجوئن تبدیل و تجزیه می‌شود. این تجزیه در دمای اتاق در طی چند ساعت و در حین پخت و پز در عرض چند دقیقه انجام می‌گیرد (Blania and Spangenberg 1991). همان‌گونه که گفته شد پیش ماده عمده و اصلی برای تندی[2] در سیر آلین می‌باشد.

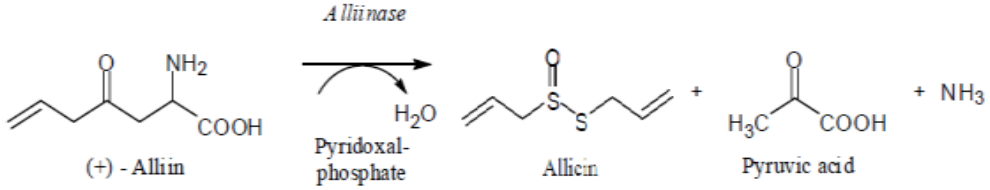
بیوسنتز ترکیبات معطر در آلیوم‌ها نیازمند مقادیر قابل توجهی از گوگرد است. تحقیقات نشان می‌دهد که تندی و رایحه در آلیوم‌ها با میزان سولفور و نیز نیتروژن خاک ارتباط دارد. متابولیسم گوگرد رابطه بسیار نزدیکی با متابولیسم نیتروژن از طریق تولید سیستئین آمینو اسید دارد. مشاهده شده که تغییرات میزان رونویسی چندین ژن در ریشه پیاز با مقادیر سولفات خاک متناسب است (Jones et al. 2004). تفاوت‌های موجود در ژن‌ها و الل‌های هر ژنوم تاثیر خود را در قالب فنوتیپ‌های مختلف موجودات تک سلولی و پرسلولی بر جای می‌گذارند. ولی اغلب سلول‌های یک موجود تفاوت‌های شکلی و فنوتیپی مختلفی را در یک موجود نشان می‌دهند. این امر به دلیل تغییر در توالی DNA ژنوم نبوده بلکه ناشی از بیان متفاوت ژن‌های خاص در مراحل مختلف رشد و نمو سلول‌ها است. در ابتدا روش‌های مرسوم برای مطالعه بیان ژن‌ها، لکه گذاری نورتون بلات[3]، هیبریداسیون در جا[4] و سنجش محافظت در برابر RNase[5] بود. اگرچه هنوز این روش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند اما حساسیت پایین آنها و زمان طولانی از عواملی است که باعث محدودیت کاربرد آنها و رویکرد وسیع محققین زیستی به روش بیان ژن‌ها در زمان واقعی (Real-time PCR) شده‌است. غلظت‌های مختلف گوگرد به عنوان یک تنش غیرزنده در سیر می‌تواند تغییرات مختلفی را در بیان ژن‌های مرتبط ایجاد کند. خاستگاه بو و رایحه در پیاز و سیر، آنزیم آلیناز است. لذا یکی از این ژن‌های کاندید برای مطالعه تغییرات بیان آن، ژن کنترل کننده بیان آلیناز می‌باشد. ماهیت آلیناز اولین بار در سال ۱۹٤۷ معرفی و تشریح شده و اولین بار توالی‌های ژن‌های کد کننده آلیناز در سال ۱۹۹۲ گزارش شد (Druga et al. 2011). وزن مولکولی آنزیم آلیناز در سیر ۵۱٤۵۱ دالتون می‌باشد (Van Damme et al.

[1] Alliinase

[2] Pungency
[3] Northern blot
[4] In situ hybridization
[5] RNase protection assay

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.12.4]



شکل ۱- تولید آلیسین، اسید پیرویک و آمونیوم در اثر واکنش آنزیمی آلیناز با آلین

1992). اخیرا دو ژن جدید از این آنزیم در سیرهای وحشی معرفی شده است. ارزیابی بیان ژن آلیناز نشان داده که این آنزیم در مقادیر بسیار بیشتری در پیاز ذخیره‌ای (bulb) نسبت به برگ بیان می‌شود. در برخی از گونه‌های آلیوم حتی این رقم ۷ برابر است (Druga et al. 2011). در ایران تحقیقات متعددی روی اثرات دارویی و ترکیبات بیوشیمیایی سیر انجام شده‌است. تحقیقات پیشین در ایران نشان داده که تنوع قابل توجهی از ویژگی‌های زراعی و مورفولوژیکی و نیز محتوی آلیسین در توده‌های سیر ایران وجود دارد و هیچ ارتباط مشخصی بین مناطق جغرافیایی و تنوع ژنتیکی آنها وجود ندارد (Baggalian et al. 2005, 2006). با همه این گزارش‌های متعدد، تا امروز در خصوص مطالعه بیان ژن‌های مرتبط با گوگرد در توده‌های سیر ایران، گزارش مستندی وجود ندارد. هرچند در خصوص اثر ترکیبات مختلف سیر در خاموش یا روشن شدن ژن‌های مختلف مرتبط با بیماری، تحقیقات بسیاری در سطح جهان انجام شده اما با توجه به نوپا بودن روش آنالیز بیان ژن، در خصوص بیان ژن‌های مرتبط با تنش‌های زیستی و غیرزیستی گزارش‌های بسیار اندکی وجود دارد. از عمده‌ترین کارهای انجام شده می‌توان به مطالعه بیان ژن‌های مرتبط با سرما در ارقام سیر اشاره کرد (Son et al. 2012).

تحقیقات جامعی لازم است تا الگوهای دقیق‌تری از بیان ژن آلیناز درک شود (Druga et al. 2011). این گزارش اولین مطالعه روی تغییرات بیان ژن آلیناز در مواجهه با غلظت‌های مختلف گوگرد در سطح بیان ژن با استفاده از RT-Real time PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سه کلون سیر (T1، T2 و T3) که از میان ۲۰ توده سیر کشور به روش سنجش اسپکتروفتومتری تندی (Ketter and Randle 1998)، غربال شده بودند (Ammarellou et al. 2014) برای کشت در گلدان‌های حاوی غلظت‌های مختلف گوگرد انتخاب شدند. با توجه به عدم حلالیت گوگرد عنصری در آب و خاک، مقادیر صفر، ٦، ١٢، ١٨، ٢٤ و ٦٠ گرم گوگرد عنصری توزین و همراه با باکتری تیوباسیلوس به گلدان‌های فوق که حاوی ۱۰ کیلو خاک (خاک زراعی: ماسه و کود دامی به ترتیب به نسبت ۱:۱:۲) بود اضافه شده و کاملا مخلوط شد. یک ماه اجازه داده شد تا فرایند اکسیداسیون میکروبی خاک کامل شود. در طول یک ماه هر هفته ضمن آبیاری، خاک گلدان‌ها در رطوبت مناسب زیر و رو شده تا حداکثر شرایط بهینه برای اکسیداسیون گوگرد توسط باکتری‌های تیوباسیلوس فراهم شود (Fallah et al. 2010). سپس سیرچه‌های سه کلون تند بو ، متوسط و کم بوی مورد مطالعه در عمق ۵ سانتی‌متری در سه تکرار کشت شد. در انتهای فصل رشد، بوته‌ها برداشت و سیرچه‌های آنها جهت استخراج mRNA و مطالعات بیان ژن بکار رفت.

استخراج mRNA

مراحل استخراج mRNA با استفاده از کیت Ribo Spin Plant که از شرکت GeneAll Oguem-dong, Songpa-gu, Seoul, Korea تهیه شده بود انجام شد. بدین منظور ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت تر سیر (بخش مریستمی وسط حبه و برگ‌های اولیه) توزین شده و سپس در هاون استریل شده، با افزودن نیتروژن مایع، پودر و سپس به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال یافت. با استفاده از دستورالعمل موجود در کیت، RNA گیاه در غلظت‌های مختلف گوگرد استخراج شد. تمامی نمونه‌ها جهت تست کمیت و کیفیت RNA نانودراپ شده و روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند.

تولید cDNA

با استفاده از کیت cDNA تهیه شده از شرکت Thermo کشور کره

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.12.4]

جدول ۱- مشخصات توالی‌های آغازگر ژن مورد مطالعه آلیناز (All) و کنترل داخلی(آکتین)

نام ژن	توالی رفت (´۳ -´۵)	توالی برگشت (´۳ -´۵)
All	TGGTGAAAACGCAGAAAGG	CATTCACACTTCACCCATGC
Actin	CCTAACCGAGCGAGGCTACAT	GGAAAAGCACTTCTGGGCACC

جنوبی، نسبت به سنتزcDNA از نمونه های RNA اقدام شد. به این منظور، دو میکرولیتر از RNA کل با غلظت ۰/۱ تا ۵ نانوگرم با یک میکرولیتر از آغازگر(dt) Oligo مخلوط شده و توسط آب فاقد نوکلئاز به حجم ۱۲ میکرولیتر رسید. جهت اتصال آغازگر Oligo (dt) به الگو، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵°C در دستگاه PCR قرار داده شدند. به میزان چهار میکرولیتر از بافر Reaction 5x، یک میکرولیتر از Ribolock RNase Inhibitor، دو میکرولیتر از dNTP mix، و یک میکرولیتر از آنزیم Revert Aidm-RT به هر یک از نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها مخلوط و میکروفیوژ شدند. نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ °C در دستگاه PCR انکوبه شدند. به منظور غیر فعال‌سازی آنزیم RT به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C این عمل انجام شد.

طراحی آغازگر

برای طراحی آغازگر ابتدا از سایت NCBI توالی ژن مورد نظر (All) جستجو شد و سپس با استفاده از (نرم‌افزار CLC Main Workbench) میزان هم‌ردیفی توالی‌ها بررسی و ناحیه‌ای که بیشترین تطابق را داشت انتخاب شد. در مرحله بعد با استفاده از نرم‌افزار Primer3، توالی‌های پیشنهادی برای توالی رفت و توالی برگشت آغازگر بدست آمد. در گام بعدی با استفاده از نرم-افزار mfold، ساختار فضایی آغازگر بررسی شده و همچنین میزان ΔG آغازگر که نباید از قدر مطلق دو بیشتر باشد مقایسه شد. درمرحله بعدی با استفاده از نرم‌افزار Fast PCR کیفیت آغازگرها بررسی شده و در گام آخر با ورود به سایت NCBI نسبت به بلاست کردن توالی پیشنهادی و مشخص کردن گونه‌های مرتبط اقدام شد (جدول ۱).

انجام Real-time PCR

واکنش تکثیر PCR کمی با حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر sybr، یک میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول بود که با آب دوبار تقطیر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش‌های PCR مطابق دستورالعمل کیت به این شرح انجام شد: مرحله واسرشته‌سازی اولیه شامل ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ چرخه واسرشته‌سازی در ۹۵ °C، ۵۵°C برای اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه برای بسط و در پایان ۷۲ °C برای ۱۰ دقیقه. به منظور بررسی صحت تکثیر از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. تکثیر با استفاده از کیت سایبرگرین شرکت Thermo و دستگاه Biorad انجام شد.

پس از اتمام آزمایش، بعد از رسم خط تری شولد، مقادیر C_t (Cycle threshold) حاصل از نمودارهای تکثیر از نرم‌افزار Rotor gene به محیط Excel انتقال داده شد و پس از مرتب‌سازی در محیط .Gen Ex، داده‌ها بر اساس تغییرات بیان ژن خانه‌دار (کنترل داخلی) آکتین مطابق فرمول $۲^{-(\Delta CT\ Target-\ \Delta CT\ Actin)}$ نرمال شده و سپس با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS مورد مقایسات آماری و رسم نمودار قرار گرفت.

نتایج و بحث

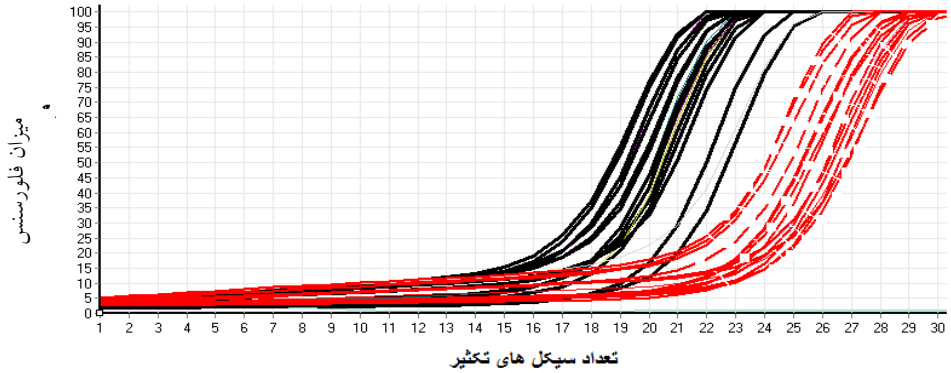
منحنی تکثیر ژن کد کننده آلیناز(All) به همراه ژن کنترل داخلی آکتین در شکل شماره ٤ نشان داده شده‌است. نکته جالب توجه در این تکثیر آن بود که برخلاف اغلب آزمایشات Real-time PCR که عموما ژن خانه‌دار زودتر از ژن اصلی وارد تکثیر می-شود، آلیناز با فاصله قابل توجهی زودتر از آکتین تکثیر یافته که این نشان‌دهنده بیان بالای این ژن در سیر می‌باشد. آنالیز منحنی ذوب ژن نشان داد که تکثیر فاقد هرگونه تکثیر ناشی از پرایمر دایمر بوده و کاملا اختصاصی ژن مورد مطالعه است (شکل ۵). محصول حاصل از تکثیر به کمک آغازگر طراحی شده در ژل الکتروفورزی آگارز تشکیل یک باند اختصاصی در محدوده bp ۲۰۰ داد که تکثیر اختصاصی برای ژن مورد مطالعه را به اثبات رساند (شکل٦).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.12.4]



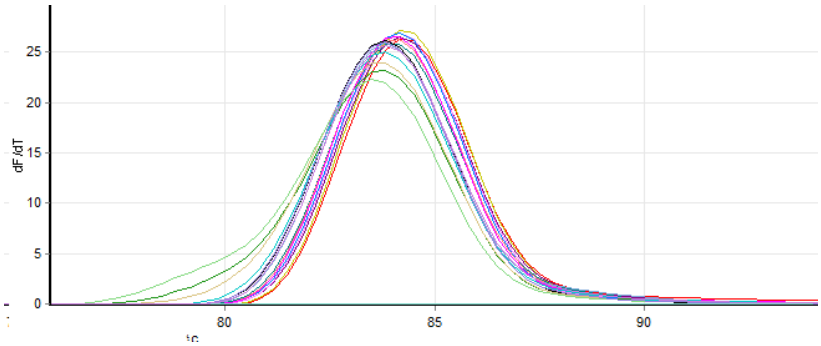
شکل۳- سیرهای برداشت شده در تیمارهای مختلف گوگردی



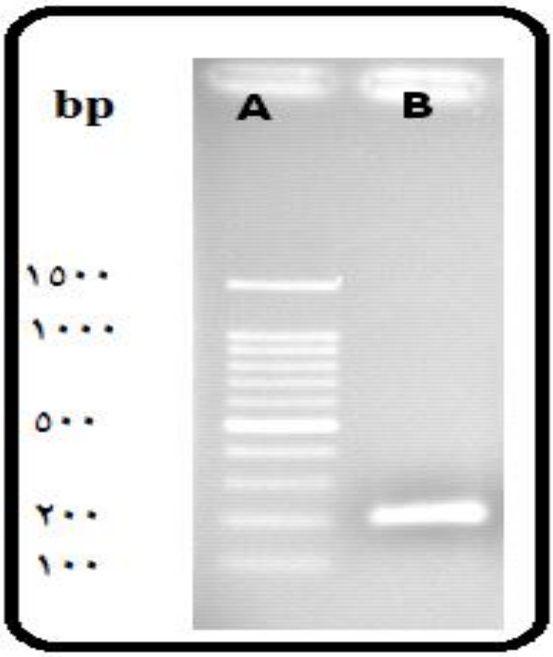
شکل٤- منحنی تکثیر ژن آلیناز (رنگ سیاه- ممتد) همراه با ژن کنترل داخلی (قرمز- منقطع).

بررسی و مقایسه سطح بیان ژن در گیاهان مورد مطالعه که در غلظت‌های مختلف گوگرد عنصری در طول یک فصل زراعی (۱۳۹۳-۱۳۹۲) رشد یافته بودند (شکل ۷) نشان داد که با افزایش سطح گوگرد از تیمار صفر تا تیمار ۱۸، با شیب ملایمی از میزان بیان ژن کد کننده آلیناز کاسته شده و این کاهش در غلظت ۱۸ گرم گوگرد متوقف شد. با ادامه افزایش سطح گوگرد عنصری از ۱۸ تا ٢٤ میزان بیان ژن مورد مطالعه به طور صعودی افزایش یافت. در غلظت ٦٠ گرم گوگرد که حالت بیشینه و حدود ۲/۵ برابر غلظت ٢٤ می‌باشد میزان بیان ژن با کاهش قابل توجهی مواجهه شده و به حداقل میزان خود رسید. این الگوی تغییرات در بیان ژن کد کننده آلیناز در هر سه کولتیوار (T1، T2 و T3) تقریبا یکسان بوده و نشانگر پایداری الگوی بیان ژن در پاسخ به غلظت‌های مختلف گوگرد عنصری می‌باشد (شکل ۷). رایحه و تندی در آلیوم‌ها می‌تواند بوسیله کولتیوار و شرایط رشدی تغییر کند (Bedford 1984). یک فاکتور محیطی عمده که رایحه را در خانواده آلیوم تحت تاثیر قرار می‌دهد، میزان تامین گوگرد (Sulfur supply) است که گوگرد در دسترس بالا عموما موجب تشدید رایحه می‌شود (Randle et al. 1993). نتایج بررسی بیان ژن کد کننده آلیناز در این مطالعه که در تیمار شاهد فعالیت و حضور نسبتا بالایی دارد و با افزایش تامین گوگرد از بیان آن کاسته می‌شود با گزارشات مرتبط با آزمایشات بیوشیمیایی تغییرات آلیناز با تامین گوگرد در پیاز مطابقت دارد. گزارشات اخیر محققین روی رفتار آلیناز در پاسخ به تیمارهای گوگردی حاکی از پاسخ معکوس آلیناز به تامین گوگرد دارد. بر طبق این گزارشات فعالیت آلیناز در محیط‌های حاوی گوگرد کم ۱/۳ تا ۱/۷ برابر بیش از محیط‌های رشد دارای گوگرد کافی بوده‌است(Lewandowska and Sirko 2008). لذا در شرایط کمبود گوگرد، فعالیت فاکتورهایی که در جذب و تبدیل سولفور به ترکیبات ارگانیک دخالت دارند برانگیخته می‌شود و با تامین گوگرد این فعالیت تا سطح مشخصی به طور موقت کاهش یافته و به عبارتی دوره استراحت موقت برای این عوامل کلیدی است.

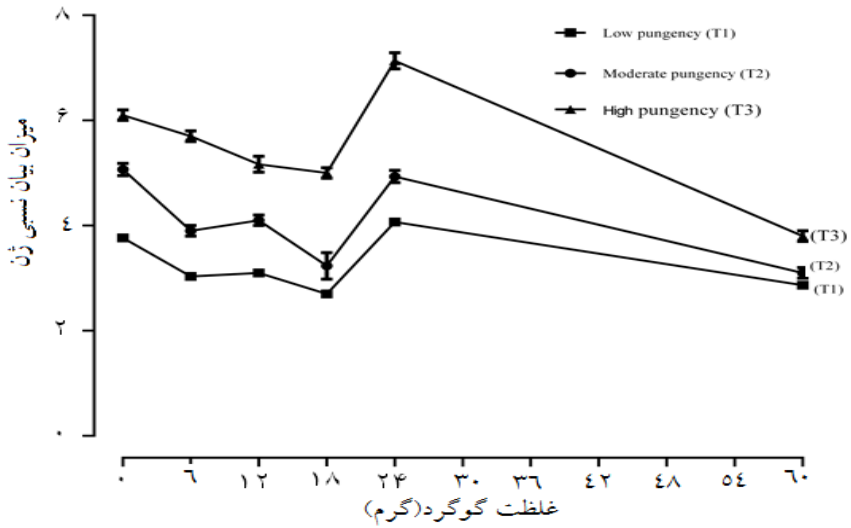
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.12.4]



شکل۵- منحنی ذوب ژن کد کننده آلیناز که فاقد هرگونه شکل پرایمردایمر می باشد.



شکل٦- تصویر الکتروفورزی محصول PCR ژن آلیناز در ژل به طول ۲۰۰ جفت باز. A) نشانگر مولکولی در محدوده ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز؛ B) محصول PCR حاصل از ژن آلیناز.



شکل۷- تغییرات بیان ژن آلیناز در غلظت‌های مختلف گوگرد در سه کلون T1، T2 و T3

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.12.4]

با تداوم غلظت گوگرد از مقیاس ۱۸ تا ۲٤ گرم، با توجه به تاثیرات متعدد این غلظت‌های جذب شده در سیستم‌های بیولوژیکی پیچیده گیاه و احیانا تجمع سوبستراهای رایحه، میزان بیان ژن کد کننده آلیناز بطور ناگهانی و شدید افزایش دارد. بدیهی است که در غلظت‌های بیش از نیاز به گوگرد و فراتر از آستانه جذب و متابولیسم، دو رخداد امکان وقوع دارد: الف) تشکیل کلات‌ها و رسوب‌های غیرسیال که هم ممکن است موجب شوری خاک شده و متابولیسم کلی گیاه را کاهش و مختل کند و به عبارتی موجب سمیت شود و ب) ایجاد ترکیباتی که امکان جذب گوگرد را برای گیاه محدود سازند و یا دسترسی سایر عناصر کلیدی مانند نیتروژن و فسفر و نیز متابولیسم کربوهیدرات را تحت‌تاثیر قرار دهند که برآیند این تداخلات موجب کاهش محسوس بیان ژن کد کننده آلیناز خواهد شد.

منابع

Agarwal KC (1996) Therapeutic actions of garlic constituents. Medicinal Research Reviews 16:111-124.

Ammarellou A, Kazemitabar K and Najafi HZ (2014) Evaluation of morphophysiological and biochemical of some garlic ecotypes in North and North West of Iran. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants 3:10-18. (In Farsi).

Baggalian K, Ziaei C, Nagavi M, Nagdi B (2004) Evaluation of Iranian garlic ecotypes. Journal of Medicinal Plants 13:50-59 (In Farsi).

Bedford LV (1984) Dry matter and pungency tests on British grown onions. Journal of the National Institute of Agricultural Botany 16:58-61.

Block E (1992) The organosulphur chemistry of the genus Allium: implications for the organic chemistry of sulphur. Angewandte Chemie International Edition in English 31:1135-1178.

Blania G, Spangenberg B (1991) Formation of allicin from dried garlic (*Allium sativum*): a simple HPTLC method for simultaneous determination of allicin and ajoene in dried garlic and garlic preparations. Planta Medica 57:371-375.

Cavallito CJ, Bailey JH (1944) Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial action. Journal of the American Chemical Society 66:1950-1951.

Chen S, Chen W, Shen X, Yang Y, Qi F, Liu Yan, Meng HC-VG (2014) Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum* L.) by simple sequence repeat and inter simple sequence repeat analysis and agro-morphological traits. Analytical Biochemistry 2: 260-267.

Druga B, Suteu D, Rosca-Casian Parvu M, Dragos N (2011) Two Novel Alliin Lyase (Alliinase) Genes from Twisted-Leaf Garlic (*Allium obliquum*) and Mountain Garlic (*Allium senescens* ssp. montanum). Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 39:293-298

FAOSTAT data. http://apps.fao.org/default.htm (Access June 12th, 2014).

Fallah A, Besharati H, Khosravi H (2010) Soil Microbiology. Ayizh puplications: Tehran, Iran. Second Edition, 136p. (Translated in Persian).

Jones MG, Hughes J, Tregova A, Milne J, Tomsett AB, Collin HA (2004) Biosynthesis of the flavor precursors of onion and garlic. Journal of Experimental Botany 55:1903-1918.

Ketter CAT, Randle WM (1998) Pungency assessment in onions, S.J. Karcher, (ed). Proceeding of the 19 workshop / Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE) 177-196.

Lewandowska M, Sirko A (2008) Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress. Acta Biochimica Polonica 55: 457-471.

Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD (1996) Pharmaceutical Press; London, Herbal medicines: a guide for health-care professionals, vol. ix. p. 296.

Ovesna J, Mitrova K, Kucera L (2015) Garlic (*A. sativum*) alliinase gene family polymorphism reflects bolting types and cysteine sulphoxides content. Bio Medical Central Genetics 16:53-63.

Van Damme JM, Smeets K, Torrekens S, Van Leuven F, Peumansi WJ (1992) Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species. European Journal of Biochemistry 209:751-757.

Randle WM, Bussard ML (1993) Pungency and sugars of short-day onions as affected by sulfur nutrition. Journal of the American Society for Horticultural Science 118:766-770.

Robledo-Paz A, Tovar-Soto HM (2012) Biotechnological Tools for Garlic Propagation and Improvement. book edited by Eddy C. Agbo, ISBN 978-953-51-0096-6

Son Jae-Han, Kyong-Cheul Park, Sung-Il Lee, Haeng-Hoon Kim, Jong-Hwa Kim, Sun-Hyung Kim, Nam-Soo Kim (2012) Isolation of cold-responsive genes from garlic, *Allium sativum*. Genes and Genomics 34: 93-101.

Tocmo R, Liang D, Lin Y, Huang D (2015) Chemical and biochemical mechanisms underlying the cardioprotective roles of dietary organopolysulfides. Frontiers in Nutrition, 2: 1-18 .

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.12.4]