ارزیابی اثر سولفات آهن بر رشد و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی ریزنمونه‌های گیاه سیر در شرایط کشت درون شیشه‌ای

پریسا فتحی رضایی*، ماریا محمدنژاد و احمد آقایی

ایران، مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۲۵

چکیده

خواص دارویی سیر (*Allium sativum*) عمدتاً مربوط به آلیسین با اثرات زیستی گسترده، هدف از این مطالعه بررسی اثر سولفات آهن بر رشد، محتوای آلیسین، پروتئین و سیستئین ریز نمونه‌های سیر بود. بخش صفحه پایگاهی حبه‌های سیر پس از ضدعفونی سطحی در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) کشت و پس از یکماه به محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف سولفات آهن به مدت ۱۰ و ۲۰ روز منتقل شدند. در پایان هر بازه زمانی، میزان رشد گیاهچه‌ها و محتوای آلیسین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و مقدار پروتئین و سیستئین به روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. بیشترین میزان آلیسین و پروتئین در هر دو بخش ریشه و اندام هوایی در هر دو بازه زمانی در تیمار ۱۱/۱۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. بیشینه میزان آلیسین و پروتئین به ترتیب در بخش‌های ریشه (۱۶/۶۲ میلی مولار در گرم وزنِ تر) و اندام‌های هوایی (۸ میلی‌گرم در گرم وزنِ تر) گیاهچه‌های تیمار شده به‌وسیله ۱۱/۱۲ میلی‌گرم در لیتر سولفات آهن بعد از بیست روز اندازه‌گیری شد. در تیمار ۵/۵۶ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌دار وزنِ تر و طول ریشه و میزان سیستئین نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد. هم چنین تفاوت معنی‌دار وزنِ تر و طول بخش هوایی در غلظت ۱/۳۹ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با سایر تیمارها اندازه‌گیری شد. با توجه به نقش مهم آلیسین در خواص دارویی سیر، احتمالاً سولفات آهن می‌تواند محرک مناسبی برای افزایش محتوای آلیسین ریزنمونه-های سیر باشد.

واژه های کلیدی: آلیسین، پروتئین، سیر، سیستئین، وزنِ تر

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱-۳۷۲۷۳۰۶۰، پست الکترونیکی: parisafathirezaei@gmail.com

مقدمه

سیر با نام علمی *Allium sativum* گیاهی از راسته مارچوبه‌ای‌ها (Asparagales) و متعلق به خانواده Liliaceae است. سیر گیاهی است سنتی که نه فقط بعنوان چاشنی، بلکه بخاطر داشتن خواص زیستی متنوع از دیرباز مورد استفاده بوده است. سیر بعلت داشتن ترکیبات ارگانوسولفوره در صنایع داروسازی استفاده شده و داروهای زیادی از آن تهیه می‌شود. پژوهش‌های گسترده‌ای در مورد خواص دارویی سیر در حال انجام است. مواد مؤثره سیر شامل دو گروه ترکیبات گوگردی و غیر گوگردی می‌باشند. اثرات دارویی این گیاه مربوط به ترکیبات سولفوردار می‌باشد. ترکیبات عمده حاوی سولفور در سیر سالم از طریق واکنش‌های آنزیمی، دمایی و شیمیایی در هنگام برش یا خرد شدن سیر به تیوسولفینات تبدیل می‌شوند. مهمترین ترکیب شیمیایی سیر اسیدآمینه غیرپروتئینی آلیین (Alliin) می‌باشد که در اثر جویدن، له شدن، برش و عصاره‌گیری، آنزیم آلییناز موجود در آن آزاد و به سرعت باعث لیز شدن آلیین و تبدیل آن به آلیسین (دی آلیل تیو سولفینات) می‌شود (۷ و ۲۲). آلیسین دارای

خواص زیستی و دارویی وسیعی از جمله ضدمیکروبی، ضدسرطانی، ضدفشارخون، ضدآرتریت، تعدیل‌کننده سیستم ایمنی، ضدپیری، سم‌زدایی فلزات سنگین و کاهنده قند و چربی خون می‌باشد (۶ و ۱).

گیاهان و سلول‌های گیاهی پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی به عوامل میکروبی، شیمیایی و فیزیکی به عنوان الیسیتورها نشان می‌دهند. استفاده از الیسیتورها موجب القاء یا افزایش سنتز متابولیت‌های ثانوی به وسیله گیاهان برای حفظ بقاء، مقاومت و رقابت می‌شود (۸). الیسیتورها ترکیباتی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانوی می‌شوند. امروزه با پیشرفت فناوری، روش‌های متعددی برای تولید متابولیت‌های ثانوی مانند استفاده از الیسیتورها به وجود آمده است. الیسیتورها ممکن است با فعال‌سازی ژن‌های برخی از آنزیم‌ها در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را القاء نمایند و موجب تشکیل متابولیت‌های ثانوی شوند. عوامل مختلفی مانند سن گیاه، محیط کشت، غلظت و زمان افزودن الیسیتور به محیط کشت و مدت زمانی که گیاه در معرض الیسیتور قرار می‌گیرد، بر میزان تولید متابولیت‌های ثانوی تأثیر می‌گذارد (۵).

گوگرد در بین عناصر غذایی، پس از نیتروژن، فسفر و پتاسیم، به عنوان چهارمین عنصر غذایی اصلی معرفی و نقش آن در تولید محصولات کشاورزی به خوبی شناخته شده و تأثیر آن در شکل‌گیری اسیدهای آمینه‌ی متیونین و سیستئین، سنتز پروتئین، کلروفیل II و محتوای دانه‌های روغنی به اثبات رسیده است. بطور کلی ترکیبات زیستی حاوی گوگرد، بسیار متنوع می‌باشند، برای مثال گوگرد در ساختار ویتامین‌ها (بیوتین و تیامین)، کوفاکتورها، کوآنزیم‌آ، اسید لیپوئیک، لیپیدهای کلروپلاست، پروتئین‌های خاص (گلوتاردوکسین تیوردوکسین، دی‌سولفید ایزومراز) و بسیاری از متابولیت‌های ثانویه دیده می‌شود. یکی از ویژگی‌های مهم این ترکیبات، تأثیر مستقیم گوگرد در عمل کاتالیزوری و یا فعالیت شیمیایی آنهاست (۲۶).

آهن بخشی از ساختار پروتئین‌های دارای آهن-گوگرد و هم‌چنین پروتئین‌های غیرهم (Non-heme iron proteins) می‌باشد که در طی فتوسنتز، تنفس و تثبیت نیتروژن در گیاه مورد نیاز می‌باشد. نتایج تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که بیوسنتز کلروفیل توسط آهن تنظیم می‌شود و تحت شرایط کمبود آهن، فعالیت فتوسنتزی گیاهان بشدت کاهش می‌یابد. هم چنین فعالیت آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیدازها در چنین شرایطی دستخوش تغییر می‌شود. از این رو تحت شرایط کمبود آهن فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی طبیعی گیاهان دچار اختلال می‌گردد. بنابراین افزودن آهن در محیط کشت گیاهان می‌تواند در بهبود شرایط فیزیولوژیکی آنها مؤثر باشد (۱۹). آهن بعنوان یک عنصر ضروری برای فرآیندهای متابولیک گیاه، برای فرایندهایی مانند سنتز DNA، فتوسنتز و تنفس ضروری بوده و نقش کلیدی در واکنش‌های سوخت و سازی دارد (۱۱).

بهره‌برداری پایدار از توان و ظرفیت منابع طبیعی کشور نیازمند به‌کارگیری روش‌های نوین علمی و سازگار با محیط‌زیست به خصوص در زمینه زیست‌فناوری است. بر همین اساس، در این تحقیق با به کارگیری اصول و روش‌های زیست‌فناوری گیاهی، برای اولین بار اثر سولفات آهن بعنوان منبع گوگرد بر رشد، میزان آلیسین، سیستئین و پروتئین گیاهچه‌های سیر بررسی شد.

مواد و روشها

کشت و آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی و اعمال تیمارها: صفحه پایگاهی (Stem disc) بوته‌های سیر شهرستان آذرشهر (واقع در استان آذربایجان‌شرقی) پس از ضدعفونی سطحی با توئین و محلول هیپوکلریت سدیم ۵۰٪ و الکل اتیلیک ۷۰٪ به‌ترتیب به مدت ۳۰ و ۱۰ دقیقه و شستشو با

آب مقطر استریل در محیط کشت جامد موراشیگ و اسگوک (MS) کشت شدند. به‌منظور بررسی اثر سولفات آهن بر میزان آلیسین گیاهچه‌های سیر، پس از ۴ هفته به محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف سولفات آهن (۱۱/۱۲، ۳۴/ ۸، ۵/۵۶، ۲/۷۸، ۱/۳۹ میلی‌گرم در لیتر) واکشت شدند. قابل ذکر است که میزان سولفات آهن در استوک آن مورد استفاده برای محیط کشت معمول MS، ۵/۵۶ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. در طول مدت زمان کشت، تمامی ریزنمونه‌ها در داخل فیتوترون با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری، در دو بازه زمانی ۱۰ و ۲۰ روز نمونه‌برداری و نمونه‌های جمع‌آوری شده بمنظور انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر نگهداری شدند.

اندازه‌گیری رشد ریزنمونه‌های سیر: قبل از جمع‌آوری، ویژگی‌های مورفولوژیکی نمونه‌ها بررسی شد. میزان وزنِ تر نمونه‌ها با استفاده از ترازو ثبت شد. طول شاخساره و ریشه بر حسب سانتی‌متر و با استفاده از خط‌کش سانتی متری اندازه‌گیری شد.

عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی به منظور بررسی محتوی آلیسین: عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی و بررسی محتوی آلیسین به روش ایبرل انجام شد (۲۴). جهت عصاره‌گیری، یک گرم از بافتِ تر گیاهی ساییده شده و با افزودن ۳۰ میلی‌لیتر آب در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۸۹۸۰ rcf در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. در ادامه ۴۰۰ میکرولیتر از فاز رویی با فاز متحرک به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۲۴۳ rcf در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در انتها محلول رویی به منظور سنجش میزان آلیسین در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بررسی میزان آلیسین نمونه‌های سیر با استفاده از دستگاه HPLC و ستون C_{18} در طول موج ۲۵۴ نانومتر، سرعت جریان حلال ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و فاز متحرک شامل متانول، آب و استونیتریل به نسبت ۹ : ۴۱ : ۵۰ با انجام شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر عصاره‌ی گیاهی به دستگاه تزریق شد. محتوای آلیسین در نمونه‌های مورد بررسی بر اساس زمان بازداری به دست آمده از ترکیب استاندارد و سطح زیر منحنی پیک‌های مربوط به هر نمونه، با استفاده از نمودار استاندارد آلیسین محاسبه شد.

سنجش میزان سیستئین کل: میزان سیستئین محلول کل به روش گایتوند اندازه‌گیری شد (۲۱)، به این صورت که ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی با ۱ میلی‌لیتر اسید پرکلریک ۵٪ بمدت ۶ دقیقه در سونیکاتور قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۸۸۰ rcf سانتریفوژ شده، بعد از اتمام زمان مورد نظر، محلول رویی جمع‌آوری و برای سنجش مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه‌گیری، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی با ۲۰۰ میکرولیتر معرف نین هیدرین و ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از اتمام زمان مورد نظر، سریعاً به حمام آب سرد انتقال داده و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف سیستئین (۱۵ و ۱۰، ۸، ۶، ۴، ۲، ۱ میکروگرم در لیتر) رسم و در نهایت غلظت سیستئین محلول نمونه‌های گیاهی با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میکروگرم بر گرم بافتِ تر گیاهی محاسبه شد.

استخراج پروتئین از گیاهچه‌های سیر: مقدار نیم گرم از بافتِ تر گیاهی در هاون چینی با افزودن ۵۰ میلی‌گرم پلی وینیل پیرولیدن و ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=7) ساییده و با سرعت ۲۸۹۸۰ rcf در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد (۳). سپس فاز رویی در ویال‌های کوچکتر تقسیم و ویال‌ها در

فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به منظور انجام مطالعات بعدی نگهداری شد.

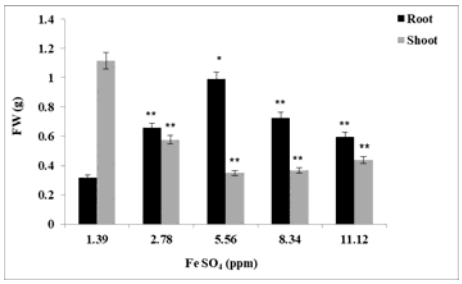
سنجش پروتئین محلول کل: میزان پروتئین محلول کل در این بررسی به روش بردفورد تعیین شد (۱۸). به این ترتیب که میزان ۲۵ میکرولیتر از عصاره پروتئینی با ۷۵۰ میکرو لیتر معرف بردفورد (1X) مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها، در طول موج ۵۹۵ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر اندازه-گیری شد. غلظت پروتئین محلول نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی (BSA=Bovine Serum Albumin) بر حسب میلی گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

آنالیز آماری: به منظور مقایسه نتایج به‌دست آمده و تعیین اهمیت تفاوت‌های مشاهده شده در آزمایشات از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۹) استفاده شد. رسم نمودارها به وسیله Microsoft Excel انجام گرفت. جهت تفسیر نتایج و تعیین تفاوت‌های بین گروه‌های آزمایش از آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) استفاده شد. نتایج آزمایش‌ها به صورت Mean±S.D. ارائه و نتایج آنالیزهای آماری با مقدار P کوچک‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

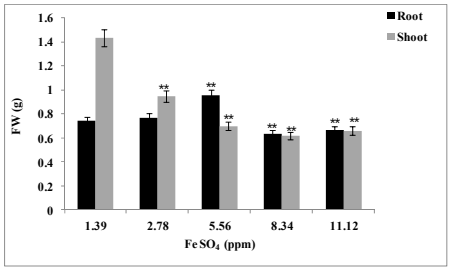
نتایج

اثر تیمارهای مختلف بر رشد ریز نمونه‌های سیر: بر اساس نتایج حاصل (شکل ۱- الف) در گیاهانی که بمدت ۱۰ روز با غلظت‌های مختلف سولفات آهن تیمار شده بودند در بخش ریشه با افزایش غلظت، افزایش وزن تر تا غلظت ۶/۵۶ میلی‌گرم در لیتر (۰/۹۹ گرم) مشاهده شد که بعد از این غلظت میزان وزنِ تر روند کاهشی داشت. میزان وزن تر در غلظت ۱۱/۱۲ میلی‌گرم در لیتر تقریباً مشابه غلظت ۲/۷۸ میلی‌گرم در لیتر بود. در مقابل در بخش هوایی نمونه‌ها نتایج عکس مشاهده شد. به این ترتیب که بیشترین میزان وزنِ تر در غلظت ۱/۳۹ میلی‌گرم در لیتر (۱/۱۵ گرم) مشاهده شد که با افزایش غلظت روند نزولی داشت. الگوی مشاهده شده در مورد رابطه وزنِ تر با غلظت سولفات آهن در نمونه‌های تیمار شده به مدت ۲۰ روز نیز مشابه نمونه‌های تیمار شده بمدت ۱۰ روز بود که بیشترین میزان وزنِ تر ریشه و اندام هوایی به ترتیب برابر با ۰/۹۸ و ۱/۴۳ گرم بود (شکل ۱- ب).

الف

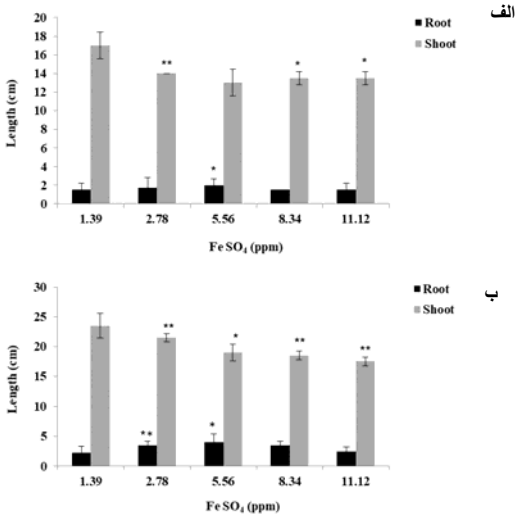


ب

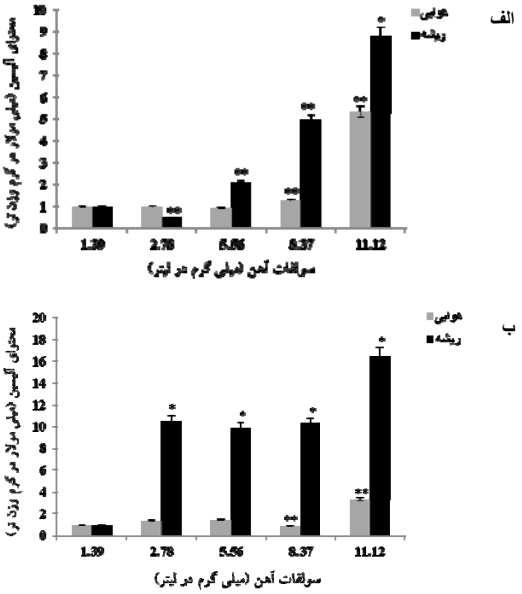


شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف سولفات آهن بر وزنِ تر گیاهچه‌ها. وزنِ تر ریشه و اندام هوایی ۱۰ روز بعد از اعمال تیمار (الف) وزنِ تر ریشه و اندام هوایی ۲۰ روز بعد از اعمال تیمار (ب). داده‌های نمایش داده شده میانگین داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزاست. نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار با: * ۰/۰۱ >p و ** ۰/۰۰۱ >p است که با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey بدست آمده است.

بر اساس نتایج بدست آمده، بیشترین میزان طول ریشه در تیمار ۵/۵۶ میلی‌گرم در لیتر در بازه زمانی ۱۰ و ۲۰ روز به ترتیب ۲ و ۴ سانتی‌متر و طول بخش هوایی در تیمار ۱/۳۹ میلی‌گرم در لیتر در بازه زمانی ۱۰ و ۲۰ روز به ترتیب ۱۷ و ۲۳/۵ سانتی‌متر مشاهده شد (شکل ۲- الف و ب).



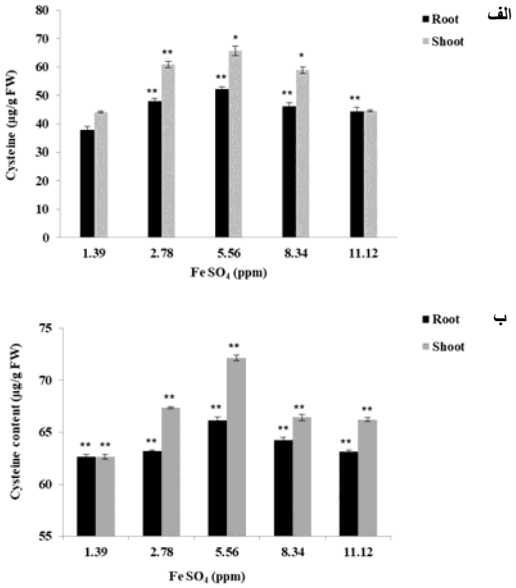
شکل ۲ – اثر غلظت¬های مختلف سولفات آهن بر طول ریشه و اندام هوایی گیاهچه¬های سیر. طول اندام هوایی و ریشه ۱۰ روز بعد از اعمال تیمار (الف) طول اندام هوایی و ریشه ۲۰ روز بعد از اعمال تیمار (ب). داده¬های نمایش داده¬ شده میانگین داده¬های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزاست. نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار با: * $p<۰/۰۱$ و ** $p<۰/۰۰۱$ است که با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey بدست آمده است.



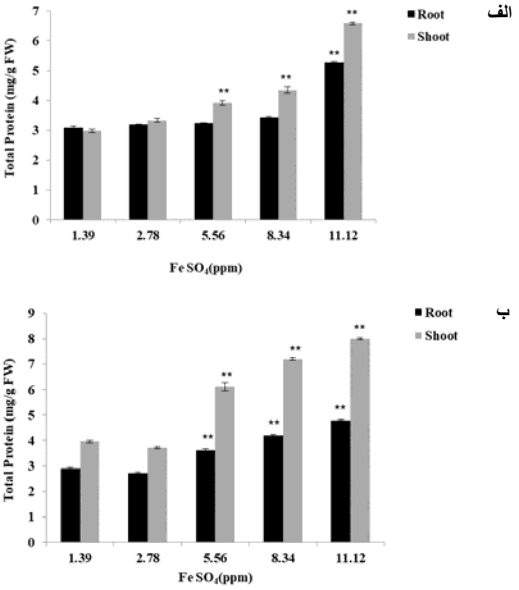
شکل ۳ – اثر غلظت‌های مختلف سولفات آهن بر میزان آلیسین گیاهچه‌های سیر. میزان آلیسین بخش هوایی و ریشه ۱۰ روز بعد از اعمال تیمار (الف) میزان آلیسین ریشه و بخش هوایی ۲۰ روز بعد از اعمال تیمار (ب). داده‌های نمایش داده شده میانگین داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزاست. نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار با: * $p<۰/۰۱$ و ** $p<۰/۰۰۱$ است که با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey بدست آمده است.

تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات آهن بر میزان تولید آلیسین: میزان آلیسین نمونه‌های مورد بررسی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با استفاده از استاندارد آلیسین مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). بیشترین میزان آلیسین در هر دو بخش ریشه و اندام هوایی در بازه زمانی ۱۰ و ۲۰ روز در غلظت ۱۱/۱۲ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب (۸/۸ و ۵/۳ میلی‌مولار در گرم وزنِ تر) و (۱۶/۴ و ۳/۳ میلی‌مولار در گرم وزنِ تر) اندازه‌گیری شد (شکل ۳– الف و ب). شایان ذکر است که این روند صعودی در کروماتوگرام مربوط به بخش ریشه چشمگیرتر بود. افزایش میزان آلیسین بخش هوایی با افزایش غلظت تیمار کند بود.

تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات آهن بر میزان سیستئین: بر اساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان اسید آمینه سیستئین، بیشترین میزان این اسید آمینه در غلظت ۵/۵۶ میلی‌گرم در لیتر در هر دو بازه زمانی ثبت شد. مقادیر اندازه‌گیری شده در بخش‌های ریشه و اندام هوایی در مدت زمان ۱۰ و ۲۰ روز به ترتیب (۶۶ و ۷۲ میکروگرم در گرم وزنِ تر) و (۵۲ و ۶۵ میکروگرم در گرم وزنِ تر) بود (شکل ۴– الف و ب). مقادیر اندازه‌گیری شده در تمام غلظت‌ها برای اندام هوایی بیشتر از مقادیر بخش ریشه بود. میزان سیستئین نمونه‌ها در مدت زمان ۱۰ روز بطور معنی-داری بیشتر از ۲۰ روز بود.



شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف سولفات آهن بر میزان سیستئین گیاهچه‌ها. **میزان سیستئین** ریشه و اندام هوایی ۱۰ روز بعد از اعمال تیمار الف) میزان سیستئین ریشه و اندام هوایی ۲۰ روز بعد از اعمال تیمار (ب). داده‌های نمایش داده شده میانگین داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزاست. نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار با: ** $p< ۰/۰۰۱$ است که با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey بدست آمده است.



شکل۵- اثر غلظت‌های مختلف سولفات آهن بر میزان پروتئین کل گیاهچه‌ها. میزان پروتئین کل ریشه و اندام هوایی ۱۰ روز بعد از اعمال تیمار الف) میزان پروتئین کل ریشه و اندام هوایی ۲۰ روز بعد از اعمال تیمار (ب). داده‌های نمایش داده شده میانگین داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار آزمایش مجزاست. نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار با: ** $p< ۰/۰۰۱$ است که با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey بدست آمده است.

تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات آهن بر میزان پروتئین محلول کل: بر اساس نتایج حاصل از سنجش میزان پروتئین کل به روش بردفورد در گیاهانی که پس از ۱۰ روز تیمار با غلظت‌های مختلف سولفات آهن جمع‌آوری شده بودند (شکل ۵- الف) میزان پروتئین محلول کل در بخش ریشه (۵/۲ میلی‌گرم در گرم وزنِ تر) و اندام هوایی (۶/۵ میلی‌گرم در گرم وزنِ تر) گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت ۱۱/۱۲ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری نسبت به سایر غلظت‌ها نشان داد. علاوه بر این، در گیاهانی که بعد از ۲۰ روز تیمار جمع‌آوری شده بودند (شکل ۵- ب) در بخش ریشه (۴/۸ میلی‌گرم در گرم وزنِ تر) و اندام هوایی (۸ میلی‌گرم در گرم وزنِ تر) بیشینه میزان پروتئین کل در غلظت ۱۱/۱۲ میلی‌گرم در لیتر سولفات آهن اندازه-گیری شد.

بحث

با توجه به عقیم بودن گل‌ها و عدم امکان تولید بذر سیر، کشت این گیاه از طریق کشت سیر و به طریقه غیرجنسی انجام می‌شود که از این طریق گیاهان حاصل آلوده به ویروس می‌باشند. ابزارهای زیست‌فناوری مانند ریزازدیادی مریستم، تنوع سوماکلونال و ترانسفورماسیون ژنتیکی برای تکثیر و نگهداری سیر استفاده می‌شود لذا بخش عمده مطالعات انجام شده در زمینه افزایش میزان تولید کالوس گیاه سیر در کشور متمرکز شده است (۲۷).

علیرغم برهمکنش‌های بسیار دو عنصر آهن و گوگرد، در ارتباط با اثرات آهن بر میزان تولید ترکیبات گوگردی نظیر سیستئین و آلیسین در گیاهان، اطلاعات چندانی وجود ندارد. به همین دلیل، تحقیق حاضر جهت ارزیابی اثرات

ترکیب سولفات آهن بر میزان تولید ترکیبات گوگردی سیستئین و آلیسین در گیاه سیر انجام شده است.

مطالعات انجام شده به خوبی نشان داده‌اند که عوامل محیطی قادرند تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی را تحت تأثیر قرار دهند. به عنوان نمونه، در شرایط محدودیت عناصر غذایی، میزان متابولیت‌های فاقد نیتروژن نظیر اسیدهای فنولیک، لیگنین، تانن‌ها و آنتوسیانین‌ها که از مسیر شیکیمات تولید می‌شوند، در گیاهان چوبی افزایش می‌یابد. این افزایش در محتوای متابولیت‌های ثانویه کربن-دار، عموماً در شرایط محیطی خاصی ایجاد می‌شود که تجمع کربوهیدرات‌های غیر ساختاری بیشتر می‌گردد. مطالعات نشان داده است که در شرایط افزایش دی‌اکسید کربن اتمسفری، میزان کربوهیدرات‌های غیر ساختاری افزایش یافته و این شرایط به نوبه خود موجب تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (۱۷).

در تحقیقی بیدشکی و همکاران اثر متیل‌جاسمونات و ایندول ۳-بوتیریک اسید (IBA) را بر رشد، پارامترهای بیوشیمیایی و میزان آلیسین سیر تحت تنش خشکی در مزرعه بررسی کردند (۱۵). بررسی اثر اسید سالیسیلیک، ایندول ۳-بوتیریک اسید و تنش خشکی بر رشد و محتوای آلیسین سیر در مزرعه نشان داد که ترکیب متیل جاسمونات و IBA بدون تنش خشکی بر رشد و میزان آلیسین بسیار مؤثر بود اما تحت تنش خشکی فقط متیل جاسمونات مؤثر بود (۱۴). در مطالعه‌ای دیگر این گروه اثر اسید سالیسیلیک و خشکی را بر پارامترهای رشد و میزان آلیسین بررسی نمودند که تحت تیمار اسید سالیسیلک ۰/۵ میلی‌مولار میزان آلیسین بیشتر از تیمار اسید سالیسیلک و خشکی بود (۱۳). برخی از مطالعات نیز تأثیر شرایط محیطی بر میزان محتوای آلیسین را اثبات کرده است. برای مثال مشخص شده است که میزان آلیسین سیر نگهداری شده در مقایسه با سیر تازه برداشت شده بیشتر است و همچنین در ارتباط با تأثیر رطوبت و درجه حرارت مشخص شده است که دمای پایین محیط (۶-۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) و رطوبت بالا باعث افزایش چشمگیر میزان آلیسین می‌شود. طبق گزارش‌های انجام شده، دلیل این افزایش فعالیت حداکثری آنزیم گاما-گلوتامیل ترانس پپتیداز (آنزیم مرحله‌ی نهایی تشکیل آلیین) در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد است (۳۵). در پژوهشی هوگس و همکاران مریستم حبه‌های سیر را در محیط کشت موراشیک و اسکوگ واجد هورمون‌های نفتالین و اسید استیک کشت نمودند سپس مسیرهای بیوسنتز آلیسین را با افزودن حدواسط‌ها به محیط کشت کالوس‌های تمایز نیافته سیر بررسی نمودند. بر اساس نتایج بررسی آنها بافت‌های کشت شده سیر توانایی سنتز آلئین از آلیل تیول و ترکیبات سیستئین مانند آلیل سیستئین را داشتند (۲۳). تشکیل آلیسین از طریق اکسیداسیون اس-آلیل‌سیستئین در نمونه‌های سیر کشت شده در شرایط کشت درون شیشه‌ای گزارش شده است (۳۲). در مطالعه-ای بر روی ۲۴ واریته سیر جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران که با استفاده از اسید فرمیک، متانول و آب عصاره-گیری شده بودند، میزان آلیسین اندازه‌گیری شده به روش HPLC در تمام اکوتیپ‌های بررسی‌شده بیشتر از استانداردهای بین‌المللی (۴/۵ میلی‌گرم بر گرم وزنِ تر) گزارش شده است (۱۰). در مطالعه‌ای آرنولت و همکاران (۲۰۰۳) حبه‌های سیر کاشته شده در مزرعه را تحت تأثیر غلظت‌های مختلف سولفات‌کلسیم قرار دادند و بیشترین میزان آلیسین را در تیمار ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار سولفات کلسیم گزارش نمودند. هم چنین برای اولین بار روش HPLC سریع و ساده‌ای را برای سنجش همزمان آلیین، داکسی‌آلیین، آلیسین و دی‌پپتیدهای پیش‌ساز دیگر در سیر ارائه نمودند (۹).

در بررسی اثر گوگرد (ترکیبی از سولفات پتاسیم، سولفات منیزیوم و اسید سولفوریک) بر گیاه *Allium roseum* L. از گونه‌های بومی آفریقای شمالی در مزرعه، افزایش قابل توجه میزان آلیسین و فنول کل مشاهده شد اما میزان کربوهیدرات‌های احیا شده در بالاترین غلظت کاهش یافت

(۲۵). در تحقیقی زینالی و مرادی (۲۰۱۵) تأثیر محلول-پاشی اسید هومیک و آمونیوم سولفات به تنهایی و با هم را در مزرعه بر گیاه سیر بررسی نمودند. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه آنها میزان آلیسین را از ۴/۷۹ میلی‌گرم در گرم به ۵/۴۱ میلی‌گرم در گرم وزنِ تر در تیمار سولفات آمونیوم ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار رسید. تیمار اسید هومیک با غلظت ۳ گرم در لیتر میزان آلیسین از ۴/۷۹ میلی‌گرم در گرم به ۵/۳۱ میلی‌گرم در گرم افزایش یافت. میزان آلیسین در اندرکنش این دو تیمار با غلظت‌های ذکر شده ۵/۶۱ میلی‌گرم در گرم اندازه‌گیری شد (۳۸).

مطالعات پیشین نشان داده است که بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه نه تنها تحت کنترل عوامل ژنتیکی است بلکه به شدت تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد. تغذیه گیاهان با عناصر مغذی نیز به عنوان یکی از این متغیرهای محیطی می‌تواند میزان تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار دهد. کربوهیدرات‌ها منبع انرژی و تأمین‌کننده اسکلت کربنی برای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند. فرآیندهایی نظیر تثبیت دی‌اکسید کربن فتوسنتزی و میزان متابولیت‌های اولیه، جزء عواملی هستند که در ارتباط با تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند. با توجه به اینکه عنصر آهن در فرآیند فتوسنتز و تنفس نوری و نیز فعال‌سازی بسیاری از آنزیم‌ها دخالت دارد، لذا تصور می-شود نقش این عنصر در تحت تأثیر قرار دادن میزان تولید متابولیت‌های ثانویه بسیار زیاد باشد. بنابراین، اعمال تغییرات غلظت آهن در محیط کشت نیز به عنوان یکی از متغیرهای محیطی می‌تواند تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر ترکیب آلیسین در گیاهان دارویی را تحت تأثیر قرار دهد. اگرچه عنصر آهن یکی از فراوان‌ترین عناصر موجود در پوسته زمین می‌باشد، با این وجود، میزان در دسترس بودن آن برای گیاهان در خاک‌های قلیایی و آهکی به دلیل رسوب آهن به شدت کاهش می‌یابد. عنصر آهن یکی از عناصر ضروری برای رشد گیاهان محسوب می‌شود زیرا نقش‌های مهمی در فرآیندهای متابولیسمی مانند فتوسنتز، تنفس و بیوسنتز DNA ایفاء می‌نماید. از سوی دیگر، آهن کوفاکتور بسیاری از آنزیم‌ها در گیاهان است. آهن در سلول‌های گیاهی در بسیاری از موارد برهمکنش‌های زیادی با عنصر گوگرد دارد که از آن جمله می‌توان به کمپلکس‌های آهن–گوگرد اشاره نمود (۲۰). تقریباً ۸۰ درصد آهن در سلول‌های فتوسنتزی گیاهان در بیوسنتز سیتوکروم‌ها و ترکیباتی نظیر کلروفیل و اجزای سیستم انتقال الکترون فتوسنتزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به همین دلیل آهن نقش بسیار مهمی در فعالیت فتوسنتزی گیاهان و در نتیجه عملکرد آنها دارد. با توجه به ویژگی-های اکسایش–کاهش (ردوکس) آهن و توانایی آن در ایجاد کمپلکس با بسیاری از لیگاندها و نیز مشارکت در ساختار بسیاری از ناقل‌های زنجیره الکترون و آنزیم‌ها، این عنصر نقش حیاتی در متابولیسم گیاهان ایفاء می‌نماید (۳۴). با توجه به اهمیت عنصر آهن در فتوسنتز گیاهان، احتمالاً بتوان یکی از دلایل افزایش متابولیت ثانویه آلیسین در گیاه سیر در تحقیق حاضر را به افزایش غلظت کربوهیدرات‌های غیر ساختاری در این گیاه نسبت داد.

بررسی منابع مرتبط با اثر آهن بر شاخص‌های رشد و میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی مختلف نشان می‌دهند که نتایج این تحقیقات بسیار ضد و نقیض می‌باشد (۳۷).

فراوانی آهن در زمین نزدیک به میزان اکسیژن در اتمسفر می‌باشد، با این حال، در دسترس بودن زیستی آهن به دلیل حلالیت پایین آن در حضور اکسیژن به شدت کاهش می-یابد. در خاک‌ها، آهن تشکیل کمپلکس‌هایی غیر متحرک با فسفات‌ها و سایر اجزای خاک می‌دهد و بدین ترتیب موجب کاهش عملکرد گیاهان و کاهش ارزش تغذیه‌ای آنها می‌گردد. کمبود آهن یکی از شایع‌ترین دلایل کاهش رشد و عملکرد گیاهان در سراسر جهان می‌باشد. گوگرد در محیط کشت به شکل سولفات توسط گیاهان جذب می‌شود. این عنصر بخش مهم تشکیل‌دهنده تمامی پروتئین‌های گیاهی و برخی فیتوهورمون‌ها می‌باشد. گوگرد

توسط برخی از گیاهان مانند خانواده پیازیان جهت تولید ترکیبات فرّار مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۱).

غلظت و میزان آلیسین کل در گیاه با افزایش وزن خشک گیاه به دلیل افزایش غلظت آهن، بیشتر شده است. افزایش غلظت آهن موجب افزایش غلظت کربوهیدرات‌ها شده و در نتیجه احتمالاً موجب تحریک متابولیسم ثانویه شده است.

ترکیب آجوئن می‌تواند به مقدار زیاد صرفاً توسط یک بازآرایی پایدار در ساختار آلیسین تولید شود. در نتیجه شرایط محیطی می‌تواند میزان آجوئن در گیاه سیر را به شدت تحت تأثیر قرار دهد. از جمله Naznin و همکاران در سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۵ میلادی دریافته‌اند که افزایش میزان اکسیژن محلول در منطقه ریشه گیاه سیر و نیز افزایش میزان غلظت دی‌اکسید کربن اتمسفری در همین گیاه موجب افزایش تولید آجوئن می‌گردد (۳۱).

گزارش شده است مصرف گوگرد همراه با آهن و روی باعث افزایش زیست‌توده، عملکرد دانه و جذب عناصر غذایی نیتروژن، فسفر، پتاسیم، گوگرد، آهن و روی در آفتابگردان می‌شود (۳۳). درصد پروتئین به تغذیهٔ گیاه بستگی دارد و تحت تأثیر تیمارهای کودی قرار می‌گیرد و استفاده از کودهای کم‌مصرف باعث افزایش پروتئین می‌شود. آهن در سنتز پروتئین دخالت دارد و از طریق افزایش فرودوکسین، باعث افزایش احیای نیترات و تبدیل هیدرات‌های کربن به پروتئین می‌شود (۲۸). نشان داده است که افزایش غلظت آهن در محیط پونه کوهی سبب کاهش زیست‌توده می‌شود. با این وجود هنوز اطلاعات اندکی در رابطه با نقش آهن در تولید متابولیت‌های ثانویه وجود دارد (۳۶). در شرایط سمیت آهن، عدم خنثی شدن رادیکال‌های اکسیژن و باقیماندن پر اکسید هیدروژن در گیاه منجر به واکنش فنتون و هابر–وایس (Fenton Haber-Weiss reaction) می‌گردد که در ازای آن رادیکال خطرناک هیدروکسیل تولید می‌شود که می‌تواند به صورت پی‌درپی انواع درشت‌مولکول‌های زیستی از جمله لیپیدها و پروتئین‌ها را ناپایدار کند. نتیجه تنش اکسیداتیو ناشی از سمیت آهن در گیاهان کاهش میزان پروتئین‌ها، قندهای محلول، کلروفیل و صدمات برگشت‌ناپذیر به غشای زیستی و اسیدهای نوکلئیک است که توسط بسیاری از محققان گزارش شده است (۱۱ و ۱۶).

با توجه به این که عنصر آهن در ساختار کلروفیل نقش مستقیمی ندارد اما وجود آهن کافی سبب بهبود کلروفیل‌سازی در گیاه می‌گردد و وضعیت کلروفیل گیاه می‌تواند در میزان فتوسنتز تأثیر گذار باشد (۲). گزراش شده است که محلول پاشی آهن، روی و منگنز به تنهایی یا به صورت اختلاط باهم دیگر باعث افزایش محصول پنبه می‌شود که این افزایش ناشی از افزایش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید برگ و همچنین ارتفاع گیاه است (۴).

در مطالعه انجام شده توسط Misra و Sharma (۱۹۹۱) در ارتباط با اثر آهن بر گیاه نعناع ژاپنی (*Mentha arvensis*)، غلظت‌های متوسط آهن (۵/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) موجب افزایش میزان وزن خشک و تر، میزان اسانس و ترکیب منتول شد (۲۹).

در تحقیق دیگری، کاربرد برگی مقادیر بالای آهن موجب افزایش تولید و عملکرد اسانس گیاه علف لیمو (*Cymbopogon citratus*) شد (۳۷). در گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) کاربرد برگی ترکیب کلاته شده آهن به صورت Fe-DTPA هیچ اثر معنی‌داری بر افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه نداشت. البته این تحقیق در شرایط کم‌آبی صورت گرفته و احتمالاً عدم تأثیر ترکیب آهن اعمال شده در ارتباط با کاهش فعالیت‌های متابولیسمی گیاه در شرایط تنش خشکی بوده است (۳۰). با این حال، افزودن ترکیب Fe-EDTA به محلول غذایی گیاه نعناع در شرایط کشت هیدروپونیک موجب افزایش اسانس این گیاه شد (۳۷).

ترکیبات موجود در عصاره گیاه سیر از جمله آلیسین، آلیل سیستئین و آلیل دی‌سولفید دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. لذا نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که الیسیتور غیرزیستی سولفات آهن توانایی بهبود عملکرد و نیز کیفیت ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی (ترکیب آلیسین) گیاه دارویی سیر را دارا می‌باشد و می‌توان از این راهکار در تولید گیاهان سیر دارای مقادیر بالای ترکیبات دارویی و نیز کربوهیدرات‌ها و سایر ترکیبات تغذیه‌ای استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر بیشترین میزان آلیسین و پروتئین در هر دو بخش ریشه و اندام هوایی در هر دو بازه زمانی در تیمار ۱۱/۱۲ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در تیمار ۵/۵۶ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌دار وزنِ تر و طول ریشه و میزان سیستئین نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد. هم چنین تفاوت معنی‌دار وزنِ تر و طول بخش هوایی در غلظت ۱/۳۹ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با سایر تیمارها اندازه‌گیری شد. در مجموع می توان گفت تیمار سولفات آهن از یک سو به عنوان منبع گوگرد و از سویی دیگر آهن بعنوان محرک سنتز پروتئین و کلروفیل، به احتمال می‌تواند عامل مؤثری در افزایش میزان آلیسین و در نهایت خواص دارویی گیاه سیر باشد.

منابع

۱- بکائیان، م.، فرازمند، ر.، کی‌قبادی، س.، سعیدی، س. ۱۳۹۴. بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی سیر (*Allium sativum*) بر روی سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به آنتی بیوتیک-های مختلف. جلد ۲۸، شماره ۱، صفحه ۴۱-۳۴.

۲- حمزه پور، ن.، ملکوتی، م.ج.، مجیدی، ع. ۱۳۸۹. برهم‌کنش عناصر روی، آهن و منگنز در اندام‌های مختلف گندم. مجله‌ی پژوهش-های خاک (علوم خاک و آب). الف، جلد ۲۴، شماره ۱، صفحه ۸-۱.

۳- فتحی رضایی، پ.، راکعی، ا. ۱۳۹۶. بررسی اثر ساکارز بر میزان تولید تروپان آلکالوئیدها و چندین پارامتر بیوشیمیایی گیاه تاتوره در شرایط کشت درون شیشه‌ای. دوره ۳۰، شماره ۴، صفحه ۵۷۱-۵۵۸.

۴- نوری حسینی، س.م.، ذبیحی، ح.م.، رمضانی مقدم، م.ر. ۱۳۹۳. پاسخ عملکرد و اجزای عملکرد پنبه به مصرف خاکی و محلول پاشی عناصر غذایی آهن و روی. مجله پژوهش‌های پنبه ایران. جلد ۲، شماره ۲، صفحه ۵۷-۴۳.

5- Ajungla, L., Patil, P., Barmukh, R. and Nikam, T. (2009). Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. Indian journal of biotechnology 8:317-322.

6- Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. The Journal of nutrition 136(3): 716S-725S.

7- Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S. and Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. The Journal of nutrition 131(3): 955S-962S.

8- Angelova, Z., S. Georgiev and Roos, W. (2006). Elicitation of plants. Biotechnology & Biotechnological Equipment 20(2): 72-83.

9- Arnault, I., Christidès, J.-P. Mandon, N., Haffner, T., Kahane, R. and Auger, J. (2003). High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. Journal of Chromatography A 991(1): 69-75.

10- Baghalian, K., Ziai, S. A., Naghavi, M. R., Badi, H. N., and Khalighi, A. (2005). Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (Allium sativum L.) ecotypes. Scientia Horticulturae 103(2): 155-166.

11- Barberon, M., Zelazny, E., Robert, S., Conéjéro, G., Curie, C., Friml, J., and Vert, G. (2011). Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(32): E450-E458.

12- Bhattacharjee, S. (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. Current Science: 1113-1121.

13- Bideshki, A. and Arvin, M. (2010). Effect of salicylic acid (SA) and drought stress on growth, bulb yield and allicin content of garlic (*Allium sativum*) in field. Plant Ecophysiol 2: 73-79.

14- Bideshki, A., Arvin, M. and Darini, M. (2013). Interactive effects of Indole-3-butyric acid (IBA) and salicylic acid (SA) on growth parameters, bulb yield and allicin contents of garlic (*Allium sativum*) under drought stress in field. International Journal of Agronomy and Plant Production 4(2): 271-279.

15- Bideshki, A. and Arvin, M. J. (2013). Interactive effects of methyl jasmonate (MJ) and indole-3 butyric acid (IBA) on growth and bio chemical parameters, bulb and allicin yield of garlic (*Allium sativum* L.) under drought stress in Iran. International Journal of Agriculture 3(2): 349.

16- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of botany 91(2): 179-194.

17- Booker, F. L. (2000). Influence of carbon dioxide enrichment, ozone and nitrogen fertilization on cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf and root composition. Plant, Cell and Environment 23: 573-583.

18- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72(1-2): 248-254.

19- Chakraborty, B., Singh, P. N., Shukla, A. and Mishra, D. S. (2012). Physiological and biochemical adjustment of iron chlorosis affected low-chill peach cultivars supplied with different iron sources. Physiology and Molecular Biology of Plants 18(2): 141-148.

20- Forieri, I., Wirtz, M., Hell, R. (2013). Toward new perspectives on the interaction of iron and sulfur metabolism in plants. Frontiers in Plant Science, 4, 357: 1-5.

21- Gaitonde, M. (1967). A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. Biochemical Journal 104(2): 627.

22- Hacıseferoğulları, H., Özcan, M., Demir, F., and Çalışır, S. (2005). Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum* L.). Journal of Food engineering 68(4): 463-469.

23- Hughes, J., Tregova, A., Tomsett, A., Jones, M., Cosstick, R. and Collin, H. (2005). Synthesis of the flavour precursor, alliin, in garlic tissue cultures. Phytochemistry 66(2): 187-194.

24- Iberl, B., Winkler, G. and Knobloch, K. (1990). Products of allicin transformation: ajoenes and dithiins, characterization and their determination by HPLC. Planta Medica 56(02): 202-211.

25- Imen, A., Najjaa, H. and Neffati, M. (2013). Influence of sulfur fertilization on S-containing, phenolic, and carbohydrate metabolites in rosy garlic (*Allium roseum* L.): a wild edible species in North Africa. European Food Research and Technology 237(4): 521-527.

26- Jamal, A., Moon, Y.-S. and Zainul Abdin, M. (2010). Sulphur-a general overview and interaction with nitrogen. Australian Journal of Crop Science 4(7): 523.

27- Kamenetsky, R. and Rabinowitch, H. D. (2006). The genus Allium: A developmental and horticultural analysis. Horticultural Reviews 32: 329-378.

28- Malakouti, M. and Tehrani, M. (1999). Effects of micronutrients on the yield and quality of agricultural products (micro nutrients with macro effects). Tarbiat Modares University publication, Iran.

29- Misra, A. and Sharma, S. (1991). Critical concentration of iron in relation to essential oil yield and quality parameters of Japanese mint. Soil Sci. Plant Nutr. 37 (2), 185-190.

30- Moretti, M. D. L., Peana, A. T. Passino, G. S., Bazzoni, A. and Solinas, V. (1998). Effects of iron on yield and composition of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. Journal of Essential Oil Research, 10: 43-49.

31- Naznin, M. T., Kitaya, Y., Shibuya, T., Endo, R., Hirai, H., and Lefsrud, M. G. (2015). Ground based study on culturing garlic as a source of vegetable food and medicine in space-growth and ajoene accumulation in garlic plants cultured with different CO2 regimes. Biological Sciences in Space, Vol. 29, 1-7.

32- Ohsumi, C., Hayashi, T. and Sano, K. (1993). Formation of alliin in the culture tissues of *Allium sativum*. Oxidation of S-allyl-L-cysteine. Phytochemistry 33(1): 107-111.

33- Ravi, S., Channal, H., Hebsur, N., and Dharmatti, P. (2010). Effect of sulphur, zinc and iron nutrition on growth, yield, nutrient uptake and quality of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Karnataka Journal of Agricultural Sciences 21(3).

34- Rout, G. R. and Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. Reviews in Agricultural Science, 3:1-24.

35- Sukkaew, P. and Tira-umphon, A. (2012). Effects of storage conditions on Allicin content in garlic (*Allium sativum*). VI International Symposium on Edible Alliaceae 969.

36- Yeritsyan, N. and Economakis, C. (2001). Effect of nutrient solution's iron concentration on growth and essential oil content of oregano plants grown in solution culture. International Conference on Medicinal and Aromatic Plants. Possibilities and Limitations of Medicinal and Aromatic Plant 576.

37- Yeritsyan, N. and Economakis, C (2002). Effect of nutrient solution's iron concentration on growth and essential oil content of oregano plants grown in solution culture. Proc. Int. Conf. on MAP, Acta Hort. 576, ISHS.

38- Zeinali, A. and Moradi, P. (2015). The Effects of Humic Acid and Ammonium Sulfate Foliar Spraying and Their Interaction Effects on the Qualitative and Quantitative Yield of Native Garlic (*Allium sativum* L.) J. Appl. Environ. Biol. Sci. 4(12S): 205-211.

Evaluation of the effect of iron sulfate on growth and some biochemical parameters of garlic plantlets under in vitro culture condition

Fathi Rezaei P., Mohammadnezhad M. and Aghaee A.

Dept. of Biology, Faculty of Basic Science, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

Abstract

Allicin as the best-known active compound of garlic *(Allium sativum)* has a vast variety of biological effects. The effect of iron sulfate was evaluated on allicin, cysteine, growth and protein contents of *Allium sativum* explants. Garlic bulbs were surface-sterilized and cultured on Murashige and Skoog (MS) medium for 1 month then transferred to the medium supplemented with different concentrations of iron sulfate for 10 and 20 day periods. At the end, shoot and root samples were gathered and fresh weighted and length of plantlets measured. Allicin content was determined by HPLC method, cysteine and total protein contents were determined by spectrophotometry. The highest amount of allicin and protein was observed for 11.12 mg/L treatment of root and shoot at both endpoints. The maximum content of allicin and protein were determined respectively on the root (16.62 mM/g FW) and shoot (8 mg/g FW) of 11.12 mg/L-treated explants after 20 days. On 5.56 mg/L-treated explants, a significant increase of fresh weight and length of root and cysteine content were observed in comparison with other treatments. In addition, on the shoot of 1.39 mg/L-treated explants, a significant difference in fresh weight and length were measured compared with the other treatments. Because of the important role of allicin on medicinal features of *Allium sativum*, probably iron sulfate could be a good elicitor for the elevation of allicin content of garlic explants.

Key words: Allicin, cysteine, fresh weight, garlic, protein