

۲۸۹



۱.۹۹۹۹

۸۷۰۲ / ۱۰ / ۸۷۰۲
۸۸ - ۲۲



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پایه

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی (علوم گیاهی)

عنوان:

بررسی فعالیت و بیان ژن آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در ریحان و ارتباط آن با
میزان فنیل پروپانویدها

نگارش:

محبوبه ضیائی

استاد راهنما:

دکتر مظفر شریفی

اساتید مشاور:

دکتر مهرداد بهمنش

دکتر خدیجه رضوی

کتابخانه اطلاعات مدرک علمی بایز
فهرست اساتید

۱۳۸۸ / ۱ / ۱۳

شهریور ۱۳۸۷

۱۰۹۹۹۹



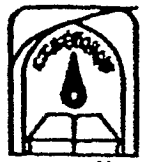
دانشگاه گیلان
دانشکده علوم پایه

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیات داوران نسخه نهایی پایان نامه خانم محبوبه ضیایی رشته زیست شناسی (علوم گیاهی) تحت عنوان: «بررسی فعالیت و بیان ژن آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز در ریحان و ارتباط آن با میزان فنیل پروپانونیدها» از نظر فرم و محتوا بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجه کارشناسی ارشد مورد تأیید قرار دادند.

امضاء	رتبه علمی	نام و نام خانوادگی	اعضای هیات داوران
	استادیار	دکتر مظفر شریقی	۱- استاد راهنما
	استادیار	دکتر مهرداد بهمنش	۲- استاد مشاور
	دانشیار	دکتر فائزه قناتی	۳- استاد ناظر داخلی
	استادیار	دکتر خدیجه رضوی	۴- استاد ناظر خارجی
	دانشیار	دکتر فائزه قناتی	۵- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی



بسمه تعالی

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:
«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده در رشته تربیت مدرس است»
که در سال ۱۳۸۷ در دانشکده علوم تربیتی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم / جناب آقای دکتر محترم سرپرست، مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر هرار کهنسنگ و مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر حکیم شویک از آن دفاع شده است.

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب گبریه میرزایی دانشجوی رشته تربیت مدرس - علوم مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: گبریه میرزایی

تاریخ و امضا:
۱۳۸۷/۱۰/۲۴

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی

دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه:

با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می‌باشد ولی حقوق معنوی پدیدآورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه / رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم‌افزار و یا آثار ویژه حاصل از نتایج پایان‌نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت‌رئیس دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

در حرفه‌ای که، بستید نه اجازه دهید که به بدبختی‌های بی‌حاصل آلوده شوید و نه بگذارید که بعضی محضات تاسف‌بار که برای حرمتی پیش
می‌آید شمار را به یاس و ناامیدی بکشند. در آرایش حاکم بر آزمایه نگاه‌ها و کتابخانه‌ها بتان زندگی کنید. تخت از خود بپرسید: «برای یادگیری و
خودآموزی چه کرده‌ام؟» سپس بچنان که پیشتر می‌روید بپرسید: «برای کشورم چه کرده‌ام؟» و این پرسش را آتقدرا ادامه دهید تا به
این احساس شادی بخش و بهجتان انگیز برسد که شاید سم کوچکی در پیشرفت و اعتلای بشریت داشته‌اید.
اما چه زندگی به تلاش بیایان پاداشی بدهد و یا ندهد، بختی که بر پیمان تلاش‌هایمان نزدیک می‌شویم، هر کدا امان باید حق آزاد داشته باشیم که با
صدای بلند بگوییم «من آنچه در توان داشته‌ام انجام دادم»

لونی پاستور

۱۸۶۵-۱۸۲۲

تقدیم بہ

پدرم، آن بزرگ و شایستہ پرواز

مادرم، آن سنگ صبور و مہربان

و بہ

تمام کسانی کہ دوستان دارم.

تشکر و قدردانی

حال که به لطف لایزال الهی، مراحل انجام این پژوهش به پایان رسیده است بر خود لازم می دانم که از زحمات استاد گرامی، جناب آقای دکتر مظفر شریفی که هدایت این پایان نامه را بر عهده داشتند و راهنمایی های ارزنده ای برای حل مشکلات علمی و عملی اینجانب ارائه دادند تشکر و قدردانی نمایم.

همچنین از اساتید محترم، جناب آقای دکتر مهرداد بهمنش و سرکار خانم دکتر خدیجه رضوی و سرکار خانم دکتر فائزه قناتی که در مدت انجام این تحقیق با راهنمایی های بی دریغشان مرا یاری دادند و زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را برعهده داشتند کمال تشکر و تقدیر را دارم.

همچنین از سرکار خانم دکتر زرین کمر، جناب آقای دکتر کاظم پور اوصالو و جناب آقای دکتر زارع مایوان به خاطر راهنمایی هایشان سپاسگزاری می کنم.

از بخش آموزش و پژوهش دانشکده علوم پایه قدردانی می کنم.

از گروه زیست شناسی گیاهی، که امکان تحقیق را فراهم نمودند ممنونم.

از سرکار خانم خرمی شاد، مسئول آزمایشگاه علوم گیاهی، سرکار خانم زرنندی مسئول آزمایشگاه بیوشیمی، سرکار خانم دیداری مسئول آزمایشگاه ژنتیک و جناب آقای دکتر لطفی رئیس محترم پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری کمال تشکر را دارم.

کمک های بی دریغ دوست بسیار خوبم خانم الهه روشنی شایسته تشکری بایسته است. همچنین از مساعدت های دوستانم به ویژه خانم ها وثقی، احمدیان، عبدالله زاده، تحصیلی، جوادی، علیزاده، کاشانی نیا و هدایتی بسیار سپاسگزارم و برای همه آرزوی توفیق دارم.

از خانواده صبور و خوبم و به ویژه همسر عزیزم که در تمامی مراحل مرا یاری دادند و در حل مشکلاتم کوشیدند صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می کنم.

چکیده

ریحان (*Ocimum basilicum*)، گیاهی است علفی و یکساله از تیره نعناع که به عنوان یک گیاه دارویی در درمان بیماریهایی چون سردرد، اسهال، سرفه، زگیل، کرم روده و نارسایی های کلیوی در ایران مورد استفاده است. اسانس ریحان به طور عمده شامل ترکیبات فنیل پروپانوییدی است که مسیر بیوسنتز این ترکیبات از مسیر شیکمات می گذرد و مهمترین ترکیبات آنها شامل چاویکول، متیل چاویکول، اوژنول، متیل اوژنول، سینامات و المیسین می باشند. این ترکیبات توسط یک گروه زیمايه ای هدایت و تنظیم می شوند که یکی از زیمايه های کلیدی در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانویدها فنیل آلانین آمونیا لیاژ (PAL) است که اولین زیمايه در مسیر تولید این ترکیبات است و با انجام عمل دامیناسیون اسید آمینه ال-فنیل آلانین را به ترانس سینامیک اسید تبدیل می کند. تا به حال چندین ایزوزیم از این زیمايه در گیاهان معرفی شده است که توسط یک خانواده کوچک چند ژنی بیان می شوند. عوامل مؤثر در بیان زیمايه PAL و در نتیجه تولید ترکیبات فنولی در گیاه شامل سن گیاه، غلظت تنظیم کننده های رشد، استرسها مانند علف کش ها، زخمی شدن بافت ها، مدت زمان تابش نور، پرتوهای UV، دما و سطح نیتروژن و فسفات و... می باشند. در این تحقیق اثر سن گیاه بر روی میزان بیان و فعالیت زیمايه PAL و مقدار اسانس گیاه مورد بررسی قرار گرفت و همچنین ارتباط این زیمايه با مقدار فنیل پروپانویید نهایی در دو کولتیوار سبز و بنفش ریحان ایرانی بررسی شد. این آزمایش از ۱۱ اردیبهشت تا ۳۱ مرداد به طول انجامید و گیاهان در ۵ مرحله از رشد شامل گیاهچه، ابتدا و میانه رشد رویشی، قبل از گلدهی و گلدهی برداشت شدند. فعالیت زیمايه فنیل آلانین آمونیا لیاژ بوسیله اسپکتروفتومتر، بیان این زیمايه به روش RT-PCR و میزان فنیل پروپانویید ها با تکنیک GC-MS اندازه گیری شد. نتایج این بررسی نشان داد که ترکیب اسانس ریحان سبز با ریحان بنفش در مراحل مختلف رشد، تفاوت بارزی دارند اما مشاهده شد که مهمترین ترکیب اسانس هر دو کولتیوار، متیل چاویکول می باشد. بیشترین میزان بیان و فعالیت زیمايه PAL و همچنین بیشترین مقدار متیل چاویکول در هر دو کولتیوار در مرحله پیش گلدهی است و این تشابه روند افزایشی ارتباط مستقیم بین این سه فاکتور (بیان و فعالیت PAL و مقدار متیل چاویکول) را نشان می دهد. در تمام مراحل رشد مقدار بازده اسانس و این سه فاکتور در ریحان بنفش بسیار بیشتر از ریحان سبز گزارش شد.

کلمات کلیدی: ریحان (*Ocimum basilicum* L.)، زیمايه فنیل آلانین آمونیا لیاژ (PAL)، فنیل پروپانویید ها، متیل چاویکول

فهرست مطالب

۱	فصل اول
۲	مقدمه
۳	۱-۱ تاریخچه
۳	۲-۱ مشخصات گیاه شناسی ریحان
۵	۳-۱ اکولوژی
۶	۴-۱ کشت ریحان
۷	۵-۱ کاربرد های ریحان
۷	۱-۵-۱ کاربرد های غذایی، آرایشی و بهداشتی
۸	۲-۵-۱ کاربرد های دارویی
۹	۶-۱ آناتومی ساختار تولید کننده اسانس در ریحان
۱۰	۱-۶-۱ کرک های غده ای کلاهک دار
۱۰	۲-۶-۱ کرک های غده ای سپری
۱۲	۷-۱ ترکیبات فنولی و اسانس ریحان
۱۴	۱-۷-۱ ترپنوئیدها
۱۶	۲-۷-۱ فنیل پروپانوئیدها
۱۸	۸-۱ زیمایه فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)
۲۰	۱-۸-۱ عوامل مؤثر بر زیمایه فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)
۲۱	۲-۸-۱ فراساختار و بررسی های مولکولی ایزوزیم های فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)
۲۲	۹-۱ مروری بر پژوهشهای انجام شده
۲۴	۱۰-۱ اهداف مورد نظر در این پژوهش
۲۵	فصل دوم
۲۶	مواد و روشها
۲۶	۱-۲ کشت و آماده سازی دو کولتیوار سبز و بنفش از ریحان
۲۶	۱-۱-۲ تهیه محلول غذایی هوگلند
۲۸	۲-۲ برداشت نمونه های گیاهی
۲۹	۳-۲ تعیین فعالیت زیمایه فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)
۲۹	۱-۳-۲ روش استخراج پروتئین
۲۹	۲-۳-۲ تعیین غلظت پروتئین
۳۰	۳-۳-۲ روش سنجش فعالیت زیمایه
۳۱	۴-۳-۲ اندازه گیری فعالیت زیمایه (PAL)
۳۲	۴-۲ بررسی های مولکولی
۳۲	۱-۴-۲ محلول ها و بافرها
۳۲	۱-۱-۴-۲ محلول ها و بافر های مورد استفاده در استخراج Total RNA
۳۲	۱-۱-۴-۲ آب دیونیزه تیمار شده با DEPC (Diethylpyrocarbonate)
۳۲	۲-۱-۴-۲ طرز تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز

۳۲ تهیه بافر الکتروفورز TBE (5X)
۳۲ تهیه محلول اتیدیوم برماید (10 mg/ml)
۳۳ تهیه بافر سنگین کننده
۳۳ استخراج Total RNA از برگ ریحان
۳۵ الکتروفورز ژل آگارز
۳۶ واکنش رونویسی معکوس
۳۷ طراحی آغازگر
۳۹ PCR آماده سازی آغازگرهای
۳۹ PCR واکنش
۳۹ PCR طراحی واکنش
۴۱ بررسی و تهیه عکس از ژل آگارز
۴۱ تعیین توالی ژن PAL
۴۱ باز یابی قطعه DNA خارجی (باند مربوط به PAL) از روی ژل آگارز
۴۲ Ligation واکنش
۴۳ انتقال پلاسمید به باکتری های Ecoli-DH5α
۴۳ محیط کشت باکتری (LB)
۴۴ روش آماده سازی Competent cells از باکتری های Ecoli-DH5α
۴۴ انتقال پلاسمید به Competent cells
۴۵ Clony PCR
۴۵ استخراج پلاسمید
۴۷ Digestion
۴۸ تجزیه و تحلیل آماری
۴۹ فصل سوم
۵۰ نتایج
۵۰ ۱-۳ مقدار متیل چاویکول موجود در گرم وزن خشک ریحان سبز
۵۱ ۲-۳ مقدار متیل چاویکول موجود در گرم وزن خشک ریحان بنفش
۵۲ ۳-۳ مقایسه مقدار متیل چاویکول در مراحل مختلف رشد در ریحان سبز و بنفش
۵۳ ۴-۳ فعالیت زیمایه فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در مراحل مختلف رشد ریحان سبز
۵۴ ۵-۳ فعالیت زیمایه فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در مراحل مختلف رشد ریحان بنفش
۵۴ ۶-۳ مقایسه میزان فعالیت زیمایه فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در مراحل مختلف رشد در دو کولتیوار ریحان سبز و بنفش
۵۵ ۷-۳ نتایج بررسی های مولکولی در مراحل مختلف رشد ریحان سبز و بنفش
۵۶ ۱-۷-۳ استخراج RNA و سنتز cDND از بافت برگ گیاه ریحان
۵۷ ۲-۷-۳ تعیین دمای مناسب Annealing برای توپولین و فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)
۵۸ ۳-۷-۳ تعیین توالی نوکلئوتیدی توپولین و فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) به روش کلونینگ
۶۳ ۴-۷-۳ بررسی میزان بیان PAL به روش Semi quantitative- RT-PCR در ریحان سبز
۶۴ ۵-۷-۳ بررسی میزان بیان PAL به روش Semi quantitative- RT-PCR در ریحان بنفش

۶-۷-۳ مقایسه میزان بیان ژن فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در مراحل مختلف رشد در دو کولتیوار ریحان سبز	
و بنفش.....	۶۵
۸-۳ مقایسه روند تغییرات میزان بیان و فعالیت زیمایه فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در مراحل مختلف رشد	
دو کولتیوار ریحان سبز و بنفش و ارتباط آن با مقدار متیل چاویکول نهایی.....	۶۶
فصل چهارم.....	۶۸
بحث و نتیجه گیری.....	۶۹
پیشنهادها.....	۷۵
منابع.....	۷۶
ضمائم.....	۸۸

فهرست جداول

جدول ۱-۲	مواد مورد نیاز برای تهیه محلول هوگلند (Hoagland and Arnon 1938)	۲۷
جدول ۲-۲	مشخصات مورفولوژیک نمونه های گیاهی در مراحل مختلف برداشت	۲۸
جدول ۳-۲	طریقه آماده سازی محلولها برای ساخت cDNA	۳۷
جدول ۴-۲	توالی نوکلئوتیدی آغازگر ها	۳۸
جدول ۵-۲	طریقه آماده سازی محلولها برای واکنش PCR	۴۰
جدول ۶-۲	شرایط واکنش PCR	۴۰
جدول ۷-۲	طریقه ساخت محلولها در واکنش Ligation	۴۳
جدول ۸-۲	طریقه ساخت محلولها در واکنش Digestion	۴۸

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱ الف ، تصویر گونه ریحان سبز ب ، تصویر گونه ریحان بنفش ۷
- شکل ۲-۱ داروی گیاهی ریحان ۹
- شکل ۳-۱ تصاویر SEM از کرکهای غده ای سپری (سمت راست) و کلاهیک دار (سمت چپ) شکل سطح زیرین برگهای جوان ریحان (Gang et al. 2001) ۱۱
- شکل ۴-۱ فراوانی اعمال فیزیولوژیک متفاوت موجود در غدد ترشحی سپری شکل ریحان ۱۲
- شکل ۵-۱ مسیر موالونات و مسیر غیر موالونات در بیوسنتز ایزوپنتنیل پیروفسفات (Dubay et al. 2003) ۱۵
- شکل ۶-۱ مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها (Dubay et al. 2003) ۱۶
- شکل ۷-۱ مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدها، تولید متیل اوژنول و متیل چاویکول (Gang et al. 2001) ۱۸
- شکل ۸-۱ عمل زیمايه PAL و تبدیل اسید آمینه L- فنیل آلانین به یون آمونیوم و ترانس سینامیک اسید ۲۰
- شکل ۱-۲ ناحیه تکثیر شده ژن PAL ۳۸
- شکل ۲-۲ نقشه وکتور کلونینگ pTZ57R/T ۴۳
- شکل ۱-۳ تغییرات درصد متیل چاویکول در مراحل مختلف رشد ریحان سبز ۵۱
- شکل ۲-۳ تغییرات درصد متیل چاویکول در مراحل مختلف رشد ریحان بنفش ۵۲
- شکل ۳-۳ مقایسه درصد تغییرات مقدار متیل چاویکول در مراحل مختلف رشد ریحان سبز و بنفش ۵۲
- شکل ۴-۳ میزان تغییرات فعالیت آنزیم PAL در مراحل مختلف رشد ریحان سبز ۵۳
- شکل ۵-۳ میزان تغییرات فعالیت آنزیم PAL در مراحل مختلف رشد ریحان بنفش ۵۴
- شکل ۶-۳ مقایسه میزان تغییرات فعالیت آنزیم PAL در مراحل مختلف رشد ریحان سبز و بنفش ۵۵
- شکل ۷-۳ طرح الکتروفورز برای تست کیفیت RNA ۵۶
- شکل ۸-۳ تعیین بهترین غلظت cDNA برای کار به روش RT-PCR با استفاده از PCR یا پرایمرهای توبولین ۵۶
- شکل ۹-۳ طرح الکتروفورزی تعیین دمای مناسب Annealing ۵۷
- شکل ۱۰-۳ مراحل انجام کلونینگ قطعه حاصل از PCR برای ژن فنیل آلانین آمونیا لیا (PAL) ۵۹
- شکل ۱۱-۳ مراحل انجام کلونینگ قطعه حاصل از PCR برای ژن توبولین ۶۰
- شکل ۱۲-۳ همردیفی توالی فنیل آلانین آمونیا لیا (PAL) ریحان ۶۱
- شکل ۱۳-۳ همردیفی ژن توبولین ریحان ۶۲
- شکل ۱۴-۳ بررسی بیان ژن در مراحل مختلف رشد ریحان سبز ۶۳
- شکل ۱۵-۳ بررسی بیان ژن در مراحل مختلف رشد ریحان بنفش ۶۴
- شکل ۱۶-۳ مقایسه میزان بیان ژن PAL در مراحل مختلف رشد ریحان سبز و بنفش ۶۵
- شکل ۱۷-۳ مقایسه روند تغییرات میزان بیان و فعالیت زیمايه فنیل آلانین آمونیا لیا (PAL) در مراحل مختلف رشد دوکولتیوار ریحان سبز و بنفش و ارتباط آن با مقدار متیل چاویکول ۶۷

فصل اول: مقدمه

تاریخچه

مشخصات گیاه شناسی ریحان

اکولوژی

کشت ریحان

کاربرد های ریحان

آناتومی ساختار تولید کننده اسانس در ریحان

ترکیبات فنولی و اسانس ریحان

زیمایه فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)

مروری بر پژوهشهای انجام شده

وابستگی شدید کشورمان به واردات مواد اولیه دارویی و خروج مقادیر زیادی ارز حاصل از صادرات نفت خام جهت خرید دارو لزوم توجه جدی به استعدادها و توانمندی‌های موجود در زمینه‌های تولید، بهره برداری و فرآوری محصولات دارویی گیاهی را آشکار می‌کند. به همین دلیل و نیز به جهت اجتناب و یا کاهش اثرات سوء ناشی از مصرف روز افزون داروهای شیمیایی، گرایش جهانی و رویکرد عمومی به استفاده از گیاهان دارویی رو به افزایش است. در کشور ما هم به دلیل سابقه دیرینه در طب سنتی و گیاه درمانی این امر بیش از پیش احساس می‌شود (امید بیگی ۱۳۷۹). زیرا یکی از مشکلات بزرگ طب جدید پدیده خود ایمنی است که بر اثر مصرف مداوم و بی رویه برخی داروها در ویروس‌ها و میکروبه‌ها ایجاد می‌شود و تأثیر این داروها را ضعیف و حتی خنثی می‌سازد و در نتیجه باعث افزایش روی آوردن به انواع قویتری از آنها می‌شود. در ضمن مصرف طولانی مدت برخی داروهای شیمیایی عوارض خاصی از خود به جای می‌گذارد که گاه از خود بیماری نیز خطرناکتر است زیرا داروهای شیمیایی با تقلید از فرمول‌های گیاهی ولی به صورت مصنوعی در آزمایشگاه داروسازی تهیه می‌شوند. دیده شده در صورتی که برخی از انواع ترکیبات موجود در گیاهان که در آزمایشگاه به صورت خالص تهیه می‌شوند اگر همراه با سایر ترکیبات موجود در گیاه به مصرف برسند عوارض جانبی آنها از بین رفته و تنها اثرات مفید آن در فرد آشکار می‌شود (زارع زاده و همکاران ۱۳۸۱). شناخت گیاهان دارویی و استفاده دارویی یا صنعتی از ترکیبات موجود در آنها از قدیم مورد توجه محققین زیادی قرار گرفته است. گیاه ریحان از خانواده نعناعیان از قدیم الایام به عنوان یک گیاه دارویی در درمان بسیاری از بیماریها مورد توجه بوده است و با بررسی‌های انجام شده اسانس این گیاه و مخصوصا ترکیبات فنیل پروپانوئیدی نماینده صفت دارویی برای این گیاه شده است.

۱-۱ تاریخچه

ریحان یکی از گیاهان دارویی است که به لحاظ دارا بودن مقدار زیادی اسانس در اندامهای رویشی کاربرد دارویی داشته و در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. نام گونه ریحان از *basileus* یونانی، به معنی پادشاه، گرفته شده است زیرا قصر پادشاهان یونان باستان را با اسانس این گیاه معطر می‌کردند از این رو، نام گونه مذکور (*Basilicum*) از کلمه پادشاه مشتق شده است. نام جنس آن نیز از *okimon* یونانی به معنی خوشبو و معطر گرفته شده است. مصریان قدیم مخلوطی از ریحان و نوعی صمغ را برای خشنودی خدایان خود به کار می‌بردند و مردگان را با آن مومیایی می‌کردند. در ایران و مالزی ریحان را برای احترام روی قبرها می‌کاشتند. در روم و یونان قدیم ریحان نشانه ای از دشمنی بوده است. در اروپای شمالی، عاشقان شاخه های ریحان را به نشانه صداقت و وفاداری هدیه می‌دادند (امید بیگی ۱۳۷۹، Bais et al. 2000). در بخش های بعدی ضمن معرفی گیاه ریحان و مسیرهای متابولیکی که منجر به تولید ترکیبات دارویی موثره آن می‌شوند پیشینه تحقیقات انجام شده و همچنین لزوم بررسی های ملکولی در رابطه با مسیرهای بیوسنتز متابولیت های ثانویه ریحان مطرح می‌گردد.

۱-۲ مشخصات گیاه شناسی ریحان

ریحان یک گیاه مهم دارویی از خانواده نعنائیان (*Lamiaceae*) است. نام علمی آن *Ocimum basilicum* ($2n=48$) می‌باشد (امید بیگی ۱۳۷۹). گیاهی یکساله و علفی است که تنوع زیادی در سطح مورفولوژی و ترکیبات ثانویه و مخصوصا اسانس دارد (Telci et al. 2006) و بین ۵۰ تا ۱۵۰ گونه علفی و بوته ای دارد و حتی در برخی از منابع به بیش از ۱۵۰ گونه نیز اشاره شده است به همین سبب یکی از بزرگترین جنس ها در خانواده نعنائیان به شمار می‌رود که در میان آنها *O.basilicum* مهمترین گونه اقتصادی است (زرگری ۱۳۷۲). منشا این گیاه هند، ایران و پاکستان

گزارش شده است (امید بیگی ۱۳۷۹). جنس *Ocimum* شامل گونه های متعددی است که مهمترین آنها در زیر آورده شده است.

Ocimum basilicum, Ocimum gratissimum, Ocimum canum,
Ocimum sanctum, Ocimum carnose

گونه *Ocimum basilicum* بیش از ۶۰ واریته دارد مهمترین آنها عبارتند از: *minima, glabratum, album, darkopal* (امید بیگی ۱۳۷۹، زرگری ۱۳۷۲).

ریشه ریحان مستقیم و مخروطی شکل است. طول ریشه بین ۱۰ تا ۱۶ سانتی متر می باشد و انشعابهای فراوانی دارد. ساقه چهار گوش و مستقیم است و انشعابهای کم و بیش فراوانی دارد. ارتفاع این گیاه متفاوت است و به شرایط اقلیمی محل رویش گیاه بستگی دارد و بین ۴۰ تا ۶۰ سانتی متر می باشد. برگها پهن به رنگ سبز و کناره های آن صاف و فاقد دندان است. برگها به صورت متقابل بر روی ساقه قرار می گیرند. گلها کوچک و به رنگ سفید یا صورتی روشن است که به صورت مجتمع در چرخه های ۶ گلی واقع در انتهای ساقه های اصلی و فرعی ظاهر می شوند و سنبله هایی ناپیوسته را تشکیل می دهند. در هر چرخه ۱۷ تا ۱۸ گل قرار می گیرد. کاسه گل، تخم مرغی یا استکانی شکل است، ۵ دندانه دارد و همراه با میوه فندقه رشد می کند. دانه آن سیاه رنگ یا قهوه ای تیره است (امید بیگی ۱۳۷۹، قهرمان ۱۳۷۳، زرگری ۱۳۷۲). در سیستماتیک مدرن به دلیل وجود گرده های شش شیری و توالی های rbcL در ریحان، این گیاه تک نیا شناخته می شود (چود و همکاران ۱۳۸۲). بخش رویشی ریحان حاوی اسانس است. مقدار اسانس با توجه به شرایط اقلیمی محل رویش متفاوت و بین ۰/۵ تا ۱/۵ درصد است. ترکیبات تشکیل دهنده اسانس نیز متفاوت است و بر اساس نوع ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس کموتایپ های مختلفی از ریحان وجود دارند که به شرح زیر می باشند:

- کموتایپ‌های مربوط به نواحی اروپایی که ترکیب عمدهٔ اسانس، لینالول و متیل چاویکول است.

- کموتایپ‌های مربوط به نواحی گرمسیری مثل هند و پاکستان که اسانس غنی از متیل سینامات است.

- کموتایپ‌های مربوط به نواحی رونیون مثل تایلند که اسانس حاوی مقدار زیادی متیل چاویکول است (Simon et al. 1999, Vernin et al. 1984, Telci et al. 2006).

و بر اساس منابع موجود اسانس کموتایپ‌های ریحان ایرانی غنی از ترکیبات متیل چاویکول، لینانول، سیترال، اوژنول و متیل سینامات می‌باشد (Sajjadi 2006).

۳-۱ اکولوژی

ریحان گیاهی است روز بلند و حساس به سرما که به خوبی در خاک‌های مرطوب و با زهکشی مناسب و در نور کامل خورشید و هوای گرم رشد می‌کند. ریحان قادر به تحمل تنش خشکی نمی‌باشد. گزارش شده که ریحان در خاکهایی با بافت متوسط با مقادیر فراوان ترکیبات هموسی رشد می‌کند. رویش ریحان در محدودهٔ pH بین ۵/۵ تا ۷/۲ است. pH مناسب برای آن ۶/۴ می‌باشد. با توجه به پتانسیل بالای ریحان در جذب عناصر سدیم و پتاسیم نیاز ریحان به پتاس فراوان، گزارش شده است (امید بیگی ۱۳۷۹، Davis 1997). ریحان به طور طبیعی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری رشد می‌کند مخصوصاً در مناطق آسیا، آفریقا، آمریکای مرکزی و جنوبی مشاهده می‌شود (Labra et al. 2004). ریحان در ایران فقط یک گونه به نام *Ocimum basilicum* دارد که در کرمان، آذربایجان و خراسان از آن نام برده اند (قهرمان ۱۳۷۳).

۴-۱ کشت ریحان

کشت ریحان نیازمند آبیاری فراوان، هوای گرم و نور کافی است. دمای مناسب برای جوانه زنی بذر ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی گراد می باشد. بذر ها بعد از ۸-۱۴ روز در محیط یا ۱۴ تا ۲۰ روز در گلخانه جوانه می زنند. درصد جوانه زنی ریحان بین ۸۰ تا ۹۵٪ می باشد. همچنین، زمان مناسب برای کشت آن در اوایل فصل بهار است و این گیاه به سرما بسیار حساس است. در طول رویش به آب کافی نیاز دارد به طوری که از بدو سبز شدن بذر تا برداشت پیکر رویشی به ۵۰۰ تا ۵۵۰ میلی متر آبیاری نیاز دارد. ریحان در طول رویش به ۱۵۰۰ ساعت روشنایی نیاز دارد. همچنین به مواد و عناصر غذایی کافی نیازمند است. خاک مناسب برای کاشت ریحان، خاکهای با بافت متوسط یا خاکهای لوم شنی با مقادیر فراوان ترکیبات هوموسی همراه با (۶/۴ pH) است. نیاز ریحان به پتاس بسیار زیاد است و در تحقیقی مشخص شد که کود پتاسه باعث افزایش طول گیاه، افزایش سرشاخه ها و بالا رفتن راندمان محصول می شود (امید بیگی ۱۳۷۹ ، Davis 1997).

کولتیوار های ریحان در رنگ برگ (سبز یا بنفش)، رنگ گل (سفید، قرمز یا بنفش)، اسانس (طیف وسیعی از ترکیبات فنلی و ترکیبات طبیعی از قبیل پلی فنل هایی چون فلاونوئیدها و آنتوسیانین ها) تنوع دارند (Sajjadi 2006, Simon et al. 1999) (شکل ۱-۱). کشت اعضای تیره نعناع از قبیل نعناع، مریم گلی، پونه کوهی، آویشن، ریحان و... بیشتر به منظور بهره برداری از ترکیبات فنلیک و اسانسی در سطوح وسیعی در کشورهای فرانسه، آمریکا (کالیفرنیا)، اندونزی، مراکش، اسپانیا، مصر، پاکستان و شمال آفریقا انجام می شود (امید بیگی ۱۳۷۹ ، Lewinsohn et al. 2000).