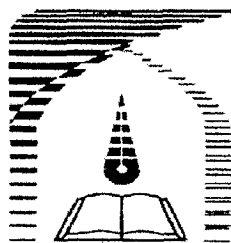




1. ٤٣٧٢

۱۷۹۱/۱۰۱۰۴  
۱۷۹۳۴



دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پایه

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد زیست شناسی (علوم گیاهی)

بررسی کمی و کیفی اسانس و مقایسه بیان ژن چاویکول O-متیل ترانسفراز  
در دو کولتیوار از ریحان ایرانی

نگارش:

ناهید پوربزرگی رودسری

استاد راهنما:

دکتر مظفر شریفی

استاد مشاور:



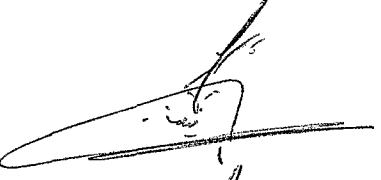


دکتر مهرداد بهمنش

دی ماه ۸۶

۱۰۴۳۷۲

## تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیئت داوران نسخه نهایی پایان نامه خانم ناهید پوربزرگی رشته زیست شناسی (علوم گیاهی) تحت عنوان: «بررسی کمی و کیفی اسانس و مقایسه بیان ژن چاویکول O-متیل ترانسفراز در دو کولتیوار از ریحان ایرانی» 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 هیأت داوران
	استادیار	دکتر مظفر شریفی	۱- استاد راهنما
	استادیار	دکتر مهرداد بهمنش	۲- استاد مشاور
	استادیار	دکتر فائزه قناتی	۳- استاد ناظر داخلی
	دانشیار	دکتر وحید نیکنام	۴- استاد ناظر خارجی
	استادیار	دکتر فائزه قناتی	۵- نماینده تحصیلات تکمیلی



دانشگاه تربیت مدرس  
دانشکده علوم پایه

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 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 زیرشناسی علوم ریاضی است که در سال ۱۳۸۶ در دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکارخانم /جناب آقای دکتر مظفر شیری، مشاوره سرکارخانم /جناب آقای دکتر مهرداد رحمنش و مشاوره سرکار خانم /جناب آقای دکتر \_\_\_\_\_ 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، تادیه 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 ناهدیه پورزری رودسری دانشجوی رشته زیرشناسی علوم ریاضی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی ناهدیه پورزری رودسری  
تاریخ و امضا: ناهدیه پورزری رودسری

۱۳۸۷/۵/۱

## دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی 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 هیات علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان‌نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

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 استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند. 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 حاصل از نتایج پایان‌نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه 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 حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم‌الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.



۸۷/۷/۱۷

تقدیم به

پدر بزرگووارم که "گردنم زیر بار منت اوست"

مادر مهربانم که "دل سراپرده محبت اوست"

و همسر فداکار و عزیزم "زانکه این گوشه جای خلوت اوست"

حال که به لطف لایزال الهی، مراحل انجام این پژوهش به پایان رسیده است بر خود لازم می دانم که از زحمات استاد گرامی، 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 استاد مشاور ارجمندم، آقای دکتر مهرداد بهمنش که در مدت انجام این تحقیق با راهنمایی های بی دریغ خویش مرا یاری دادند کمال تشکر و تقدیر را دارم. از اعضای هیات داوران، سرکار خانم دکتر فائزه قناتی و آقای دکتر وحید نیکنام که زحمت مطالعه این پایان نامه را برعهده داشتند صمیمانه تشکر می کنم. همچنین از سرکار خانم دکتر زرین کمر، آقای دکتر کاظم پور اصلو و خانم دکتر رضوی 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 آقای مهندس ابراهیمی مسئول آزمایشگاه پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی کمال تشکر را دارم. کمک های بی دریغ دوست بسیار خوبم خانم محبوبه ضیایی شایسته تشکری بایسته است. همچنین از مساعدت های دوستانم به ویژه خانم ها وثقی، سیفی، سلطانی، رشیدی رنجبر و آقایان- یوسف زادی، آقای- و نقدی بسیار سپاسگزارم و برای همه آرزوی توفیق دارم. از خانواده ام به ویژه همسر عزیزم که در تمامی مراحل مرا یاری داد و در حل مشکلاتم کوشید صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می کنم.

## چکیده

ریحان با نام علمی *Ocimum basilicum* L. متعلق به یکی از بزرگترین جنس ها در خانواده نعناعیان می باشد. ریحان داروی سنتی است که اسانس آن دارای خواص ضد میکروبی، ضد ویروسی و آنتی اکسیدانی می باشد و کاربرد غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی دارد. بسیاری از اثرات دارویی و زیستی ریحان در ارتباط با ترکیب اسانس آن می باشد. کیفیت و ترکیب اسانس نیز تحت تاثیر عوامل داخلی و خارجی تغییر می کند. در این پژوهش، اثر سن گیاه یا مراحل رشد بر مقدار اسانس، نوع و ترکیب اسانس، ترکیبات فنلی، خواص ضد میکروبی و نیز بیان ژن زیمایه چاویکول 0- متیل ترانسفراز در دو کولتیوار سبز و بنفش ریحان بررسی گردید.

نتایج این بررسی نشان داد که مهمترین ترکیب اسانس ریحان سبز و بنفش، متیل چاویکول می باشد. اگرچه که در ریحان بنفش مقدار آن بیشتر بود. ترکیب اسانس ریحان سبز با ریحان بنفش در مراحل مختلف رشد، تفاوت بارزی داشت. مقدار ترکیبات فنلی کل نیز در مراحل مختلف تغییر یافت و در ریحان سبز و بنفش به طور معنا داری متفاوت بود به طوریکه در مرحله پیش گلدهی ریحان سبز به بیشینه مقدار خود رسید. مقدار کلروفیل a و b، در ریحان سبز و بنفش تغییر معنا داری نداشت. خواص ضد میکروبی اسانس ریحان سبز در مراحل مختلف متفاوت بود و علیه باکتری های گرم مثبت اثر ضد میکروبی بیشتری نشان داد. بررسی بیان ژن زیمایه چاویکول 0- متیل ترانسفراز در ریحان سبز و بنفش در مراحل مختلف رشد نشان داد که بیشترین بیان ژن زیمایه CVOMT در ریحان سبز در مرحله گلدهی است اما در ریحان بنفش تفاوت چشمگیری در مقدار بیان ژن در مراحل مختلف رشد وجود ندارد. همچنین مقدار بیان ژن با مقدار متیل چاویکول در ریحان سبز و بنفش تقریباً "هماهنگ می باشد.

کلمات کلیدی: *Ocimum basilicum* L. ، CVOMT ، اسانس، ریحان، زیمایه چاویکول 0- متیل

ترانسفراز، متیل چاویکول



## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۲	فصل اول: مقدمه.....
۲	۱-۱ تاریخچه.....
۳	۲-۱ مشخصات گیاه شناسی ریحان.....
۴	۳-۱ کشت ریحان.....
۵	۴-۱ کاربرد های ریحان.....
۵	۱-۴-۱ کاربرد های غذایی، آرایشی و بهداشتی.....
۶	۲-۴-۱ کاربرد های دارویی.....
۷	۵-۱ آناتومی ساختار تولید کننده اسانس در ریحان.....
۷	۱-۵-۱ کرک های غده ای صفحه ای.....
۷	۲-۵-۱ کرک های غده ای سپری.....
۹	۶-۱ بیوشیمی تولید اسانس در ریحان.....
۱۰	۱-۶-۱ ترپنوئیدها.....
۱۲	۲-۶-۱ فیل پروپانوئیدها.....
۱۳	۷-۱ ترکیبات فنلی.....
۱۴	۸-۱ بیوستز متیل چاویکول.....
۱۶	۹-۱ زیمایه چاویکول O-متیل ترانسفراز.....
۱۷	۱-۹-۱ مکان های بیوستز متیل چاویکول.....
۱۷	۲-۹-۱ ویژگی های فعالیت زیمایه چاویکول O-متیل ترانسفراز: S-آدنوزیل متیونین در ریحان (SAM:CVOMT).....
۱۸	۳-۹-۱ فراساختار و بررسی های مولکولی زیمایه CVOMT.....
۲۰	۱۰-۱ مروری بر پژوهش های انجام شده.....
۲۲	۱۱-۱ اهداف مورد نظر در این پژوهش.....
<b>فصل دوم: مواد و روشها</b>	
۲۴	۱-۲ کشت و آماده سازی ریحان.....
۲۶	۲-۲ نمونه برداری.....
۲۷	۳-۲ آنالیزهای بیوشیمیایی.....
۲۷	۱-۳-۲ اسانس گیری.....

۲۷.....	۲-۳-۲	آنالیز اسانس.....
۲۸.....	۳-۳-۲	سنجش ترکیبات فنلی کل.....
۲۸.....	۱-۳-۳-۲	تهیه محلول استاندارد گالیک اسید.....
۲۸.....	۲-۳-۳-۲	استخراج و سنجش ترکیبات فنلی کل.....
۲۹.....	۴-۳-۲	اندازه گیری کلروفیل برگ.....
۲۹.....	۴-۲	بررسی فعالیت های ضد میکروبی ریحان.....
۲۹.....	۱-۴-۲	سویه های میکروبی.....
۲۹.....	۲-۴-۲	تهیه محیط کشت.....
۳۰.....	۳-۴-۲	تعیین خاصیت ضد میکروبی اسانس.....
۳۱.....	۴-۴-۲	تعیین کمترین غلظت بازدارنده (MIC).....
۳۱.....	۵-۴-۲	ضد عفونی کردن وسایل و محیط آزمایش.....
۳۲.....	۵-۲	بررسی های مولکولی.....
۳۲.....	۱-۵-۲	محلول ها و بافرها.....
۳۲.....	۱-۱-۵-۲	تهیه محلول EDTA.....
۳۲.....	۲-۱-۵-۲	تهیه محلول Tris.....
۳۲.....	۳-۱-۵-۲	آب دیونیزه تیمار شده با DEPC.....
۳۲.....	۲-۵-۲	طرز تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز.....
۳۲.....	۱-۲-۵-۲	تهیه بافر الکتروفورز TBE (5x).....
۳۳.....	۲-۲-۵-۲	تهیه محلول اتیدیوم برماید.....
۳۳.....	۳-۲-۵-۲	تهیه بافر سنگین کننده.....
۳۳.....	۳-۵-۲	استخراج Total RNA از برگ ریحان.....
۳۴.....	۴-۵-۲	الکتروفورز ژل آگارز.....
۳۵.....	۵-۵-۲	واکنش رونویسی معکوس.....
۳۶.....	۶-۵-۲	طراحی آغازگر.....
۳۸.....	۷-۵-۲	آماده سازی آغازگرهای PCR.....
۳۸.....	۸-۵-۲	واکنش PCR.....
۳۸.....	۱-۸-۵-۲	طراحی واکنش PCR.....
۴۰.....	۲-۸-۵-۲	عکسبرداری از ژل آگارز.....
۴۰.....	۹-۵-۲	تعیین توالی ژن CVOMT.....

۶-۲ تجزیه و تحلیل آماری..... ۴۰

### فصل سوم: نتایج

- ۱-۳ نتایج بررسی های بیوشیمیایی در مراحل مختلف رشد ریحان سبز و بنفش..... ۴۲
- ۱-۱-۳ بررسی کمی اسانس ها (بازده اسانس)..... ۴۲
- ۲-۱-۳ بررسی کیفی (جداسازی و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ها)..... ۴۳
- ۳-۱-۳ مقایسه درصد ترکیبات اصلی اسانس ریحان سبز در مراحل مختلف رشد..... ۵۳
- ۴-۱-۳ مقایسه درصد ترکیبات اصلی اسانس ریحان بنفش در مراحل مختلف رشد..... ۶۲
- ۵-۱-۳ مقایسه مقدار متیل چاویکول در مراحل رشد ریحان سبز و بنفش..... ۶۳
- ۶-۱-۳ مقایسه مقدار متیل چاویکول موجود در اسانس وزن خشک..... ۶۴
- ۷-۱-۳ ترکیبات فنلی کل..... ۶۵
- ۸-۱-۳ مقدار کلروفیل a و b..... ۶۶
- ۲-۳ فعالیت ضد میکروبی اسانس ریحان سبز در مراحل مختلف رشد..... ۶۷
- ۳-۳ نتایج بررسی های مولکولی..... ۶۹
- ۱-۳-۳ تعیین دمای مناسب Anneling..... ۶۹
- ۲-۳-۳ تکثیر ژن CVOMT..... ۷۰
- ۳-۳-۳ تعیین توالی..... ۷۵

### فصل چهارم:

- بحث..... ۷۶
- پیشنهادها..... ۸۶
- فهرست منابع..... ۸۷
- ضمائم..... ۹۴

## فهرست جدول ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱ ویژگی های فنیل پروپانوئید ۵-۰ متیل ترانسفرازها در ریحان.....	۱۸
جدول ۱-۲ مواد مورد نیاز برای تهیه محلول هوگلند تغییر یافته.....	۲۵
جدول ۲-۲ مشخصات مورفولوژیک گیاهان.....	۲۶
جدول ۳-۲ مشخصات باکتری های استاندارد مورد استفاده در بررسی های ضد میکروبی.....	۳۰
جدول ۱-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان سبز در مرحله ۱۰ برگی.....	۴۳
جدول ۲-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان سبز در مرحله ۵۰ برگی.....	۴۵
جدول ۳-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان سبز در مرحله پیش گلدهی.....	۴۸
جدول ۴-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان سبز در مرحله گلدهی.....	۵۰
جدول ۵-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان بنفش در مرحله ۱۰ برگی.....	۵۴
جدول ۶-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان بنفش در مرحله ۵۰ برگی.....	۵۷
جدول ۷-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان بنفش در مرحله پیش گلدهی.....	۵۸
جدول ۸-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان بنفش در مرحله گلدهی.....	۶۰
جدول ۹-۳ فعالیت ضد میکروبی اسانس ریحان سبز در مراحل مختلف رشد.....	۶۷

## فهرست شکل ها

صفحه	عنوان
	<b>فصل اول: کلیات</b>
۵.....	شکل ۱-۱ تصویر گونه ریحان سبز ( Sweet Basil )
۵.....	شکل ۲-۱ تصویر گونه ریحان بنفش.....
۷.....	شکل ۳-۱ داروی گیاهی ریحان.....
۸.....	شکل ۴-۱ ریخت شناسی غدد ترشحي Peltate و Capitata در ریحان.....
۹.....	شکل ۵-۱ فراوانی اعمال فیزیولوژیک متفاوت موجود در غدد ترشحي Peltate ریحان.....
۱۱.....	شکل ۶-۱ مسیر موالونات و مسیر غیر موالونات در بیوستنز ایزوپتنتیل پیروفسفات.....
۱۲.....	شکل ۷-۱ مسیر بیوستنزی ترینوئیدها در ریحان.....
۱۳.....	شکل ۸-۱ مسیر بیوستنز فنیل پروپانوئیدها در ریحان.....
۱۴.....	شکل ۹-۱ مشخصات متیل چاویکول.....
۱۶.....	شکل ۱۰-۱ مسیر بیوستنز متیل چاویکول و مقایسه آن با متیل اوژنول.....
۱۶.....	شکل ۱۱-۱ متیلاسیون چاویکول به وسیله زیمايه چاویکول 0- متیل ترانسفراز.....
۱۹.....	شکل ۱۲-۱ ترتیب توالی نوکلئوتید های زیمايه CVOMT.....
۱۹.....	شکل ۱۳-۱ ترتیب توالی اسید آمینه زیمايه CVOMT.....
۲۰.....	شکل ۱۴-۱ ساختار سه بعدی از جایگاه فعال زیر واحد های زیمايه CVOMT ریحان.....
	<b>فصل دوم: مواد و روشها</b>
۳۷.....	شکل ۱-۲ ناحیه تکثیر شده ژن CVOMT.....
۳۸.....	شکل ۲-۲ انطباق نوکلئوتید های زیمايه های CVOMT و EOMT.....
	<b>فصل سوم: نتایج</b>
	شکل ۱-۳ درصد تغییرات بازده اسانس در مراحل مختلف رشد ریحان سبز و بنفش بر اساس وزن خشک گیاه.....
۴۲.....	شکل ۲-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان سبز در مرحله ۱۰ برگی.....
۴۵.....	شکل ۳-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان سبز در مرحله ۵۰ برگی.....
۴۷.....	شکل ۴-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان سبز در مرحله پیش گلدهی.....
۵۰.....	شکل ۵-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان سبز در مرحله گلدهی.....
۵۲.....	شکل ۶-۳ مقایسه ترکیبات اصلی اسانس ریحان سبز در مراحل مختلف رشد.....
۵۳.....	شکل ۷-۳ درصد ترکیبات اسانس ریحان بنفش در مرحله ۱۰ برگی.....

- شکل ۳-۸ درصد ترکیبات اسانس ریحان بنفش در مرحله ۵۰ برگی..... ۵۸
- شکل ۳-۹ درصد ترکیبات اسانس ریحان بنفش در مرحله پیش گلدهی..... ۵۹
- شکل ۳-۱۰ درصد ترکیبات اسانس ریحان بنفش در مرحله گلدهی..... ۶۱
- شکل ۳-۱۱ مقایسه ترکیبات اصلی اسانس ریحان بنفش در مراحل مختلف رشد..... ۶۲
- شکل ۳-۱۲ مقایسه درصد متیل چاویکول موجود در مراحل مختلف رشد ریحان سبز و بنفش..... ۶۳
- شکل ۳-۱۳ مقایسه درصد متیل چاویکول موجود در اسانس وزن خشک ریحان سبز و بنفش..... ۶۴
- شکل ۳-۱۴ مقایسه میزان ترکیبات فنولی کل در مراحل رشد ریحان سبز و بنفش..... ۶۵
- شکل ۳-۱۵ مقدار کلروفیل a و b در مراحل مختلف رشد ریحان سبز و بنفش..... ۶۶
- شکل ۳-۱۶ هاله عدم رشد باکتری به mm در حضور اسانس ریحان سبز..... ۶۸
- شکل ۳-۱۷ کمترین غلظت بازدارنده اسانس (MIC) در حضور باکتری ها به mg/ml..... ۶۸
- شکل ۳-۱۸ طرح الکتروفورزی تعیین دمای مناسب Annealing..... ۶۹
- شکل ۳-۱۹ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن CVOMT و توبولین در ریحان سبز در مراحل مختلف رشد..... ۷۱
- شکل ۳-۲۰ مقایسه مقدار کمی بیان ژن CVOMT در مراحل مختلف رشد ریحان سبز..... ۷۲
- شکل ۳-۲۱ مقایسه مقدار کمی بیان ژن CVOMT در مراحل مختلف رشد ریحان بنفش..... ۷۲
- شکل ۳-۲۲ طرح الکتروفورزی محصول PCR ژن CVOMT و توبولین در ریحان بنفش در مراحل مختلف رشد..... ۷۳
- شکل ۳-۲۳ مقایسه مقادیر کمی بیان ژن CVOMT در مراحل مختلف رشد ریحان سبز و بنفش..... ۷۴
- شکل ۳-۲۴ مقایسه مقدار متیل چاویکول در مراحل مختلف رشد ریحان سبز و بنفش..... ۷۴
- شکل ۳-۲۵ کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی بخش تکثیر شده ژن CVOMT..... ۷۵

## فهرست ضمائم

صفحه	عنوان
۹۴	ضمیمه الف-۱: کروماتوگرام آنالیز اسانس ریحان سبز در مرحله ۱۰ برگی
۹۵	ضمیمه الف-۲: کروماتوگرام آنالیز اسانس ریحان سبز در مرحله ۵۰ برگی
۹۶	ضمیمه الف-۳: کروماتوگرام آنالیز اسانس ریحان سبز در مرحله پیش گلدهی
۹۷	ضمیمه الف-۴: کروماتوگرام آنالیز اسانس ریحان سبز در مرحله گلدهی
۹۸	ضمیمه ب-۱: کروماتوگرام آنالیز اسانس ریحان بنفش در مرحله ۱۰ برگی
۹۹	ضمیمه ب-۲: کروماتوگرام آنالیز اسانس ریحان بنفش در مرحله ۵۰ برگی
۱۰۰	ضمیمه ب-۳: کروماتوگرام آنالیز اسانس ریحان بنفش در مرحله پیش گلدهی
۱۰۱	ضمیمه ب-۴: کروماتوگرام آنالیز اسانس ریحان بنفش در مرحله گلدهی

## فصل اول :

### کلیات



## مقدمه

وابستگی شدید کشورمان به واردات مواد اولیه دارویی و خروج مقادیر زیادی ارز حاصل از صادرات نفت خام لزوم توجه جدی به استعدادها و توانمندی های موجود در زمینه های تولید، بهره برداری و فرآوری محصولات دارویی گیاهی را آشکار می کند. 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 می شود (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 ویروس ها و میکروبها ایجاد می شود و تاثیر این داروها را ضعیف و حتی خنثی می سازد و در نتیجه باعث افزایش روی آوردن به انواع قویتری از آنها می شود. در ضمن مصرف طولانی مدت برخی داروهای شیمیایی عوارض خاصی از خود به جای می گذارد که گاه از خود بسیاری نیز خطرناکتر است زیرا داروهای شیمیایی با تقلید از فرمول های گیاهی ولی به صورت مصنوعی در آزمایشگاه داروسازی تهیه می شود. دیده شده در صورتی که برخی از انواع ترکیبات موجود در گیاهان که در آزمایشگاه به صورت خالص تهیه می شوند 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 می شود (زارع زاده و همکاران ۱۳۸۴). شناخت گیاهان دارویی و استفاده دارویی یا صنعتی از ترکیبات موجود در آنها از قدیم مورد توجه محققین زیادی قرار گرفته 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 می گرفته است. نام گونه ریحان از basileus یونانی، به معنی پادشاه، گرفته شده است زیرا قصر پادشاهان یونان باستان را با اسانس

این گیاه معطر می کردند 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 خوشنودی خدایان خود به کار می بردند و مردگان را با آن مومیایی می کردند. در ایران و مالزی ریحان را برای احترام روی قبرها می کاشتند. در مصر زنان روی مکان های استراحت خودشان ریحان را می پراکندند. 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 می دادند (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 می شوند پیشینه تحقیقات انجام شده و همچنین لزوم بررسی های ملکولی در رابطه با مسیرهای بیوستز متابولیت های ثانویه ریحان مطرح می گردد.

## ۱-۲ مشخصات گیاه شناسی ریحان

ریحان یک گیاه مهم دارویی از خانواده نعنائیان ( *lamiaceae* ) است. نام علمی آن *Ocimum basilicum* L. (  $2n=48$  ) می باشد (امید بیگی ۱۳۷۹). گیاهی یکساله و علفی است که بین ۵۰ تا ۱۵۰ گونه علفی و بوته ای دارد حتی در برخی منابع به بیش از ۱۵۰ گونه نیز اشاره شده است به همین سبب یکی از بزرگترین جنس ها در خانواده نعنائیان به شمار می رود (زرگری ۱۳۷۲). منشا این گیاه هند و ایران گزارش شده است. جنس *Ocimum* شامل گونه های متعددی است که مهمترین آنها در زیر آورده شده است.

*Ocimum basilicum*, *Ocimum gratissimum*, *Ocimum canum*, *Ocimum sanctum*,  
*Ocimum carnosum*

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. ریشه 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 است. برگها پهن به رنگ سبز و کناره های آن صاف و فاقد دندانه 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 شیاری و توالی های rbcL در ریحان، تک نیا شناخته می شود (جود 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 این اساس ۳ نوع اسانس قابل تشخیص است.

- اسانس ریحان اروپایی: حاوی ۵۰ تا ۵۵ درصد متیل چاویکول و ۴۰ تا ۴۵ درصد لینالول است.

- اسانس ریحان افریقایی: این ریحان در مقایسه با ریحان اروپایی برگهای بزرگتری دارد. اسانس این ریحان محتوی ۵۵ تا ۷۰ درصد متیل چاویکول و ۳۰ تا ۴۵ درصد کامفور است.

- اسانس ریحان هندی: حاوی ۸۰ تا ۹۵ درصد متیل چاویکول است. از ترکیبات دیگر اسانس می توان اوژنول، ژرانیول و سینئول را نام برد (امید بیگی ۱۳۷۹، Simon et al. 1999).

### ۳-۱ کشت ریحان

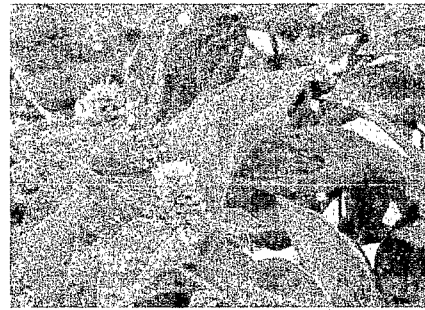
کشت ریحان نیازمند آبیاری فراوان، هوای گرم و نور کافی است. دمای مناسب برای جوانه زنی بذر ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی گراد می باشد. بذرها بعد از ۸-۱۴ روز در محیط یا ۱۴ تا ۲۰ روز در گلخانه جوانه می زنند. درصد جوانه زنی ریحان بین ۸۰ تا ۹۵٪ می باشد. این گیاه به سرما بسیار حساس است. در طول رویش به آب کافی نیاز دارد به طوری که از بدو سبز شدن بذر تا برداشت پیکر رویشی به ۵۰۰ تا ۵۵۰ میلی متر آبیاری نیاز دارد. ریحان تنش خشکی را تحمل نمی کند. 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 pH ۶/۴ است. نیاز ریحان به پتاس بسیار زیاد است (امید بیگی ۱۳۷۹، Davis 1997).

کولتیوار های ریحان در رنگ برگ (سبز، بنفش)، رنگ گل (سفید، قرمز، 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 و شکل ۲-۱). برای تولید تجاری ریحان با رایحه جذاب و طعم مطلوب، ریحان دارای برگ سبز تیره یا بنفش بهتر می باشد

(Davis 1997). ریحان به طور طبیعی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا، آفریقا، آمریکای مرکزی و جنوبی می روید (Labra et al. 2004). البته به منظور تولید اسانس در سطوح وسیعی در کشورهای فرانسه، آمریکا (کالیفرنیا)، اندونزی، مراکش، اسپانیا، مصر، پاکستان و شمال آفریقا کشت می شود (امید بیگی ۱۳۷۹). ریحان در ایران فقط یک گونه به نام *Ocimum basilicum* دارد که در کرمان، آذربایجان، خراسان و نواحی تهران از آن نام برده اند و در تمام نقاط ایران نیز کاشته می شود (قهرمان ۱۳۷۳).



شکل ۱-۲ تصویر گونه ریحان بنفش



شکل ۱-۱ تصویر گونه ریحان سبز ( Sweet Basil )

## ۴-۱ کاربرد های ریحان

### ۱-۴-۱ کاربرد های غذایی، آرایشی و بهداشتی

ریحان سبزی خوراکی است و برگهای تازه و خشک شده آن به عنوان طعم دهنده و خوشبو کننده به بسیاری از غذاها اضافه می شود (Labra et al. 2004, Simon et al. 1999). یک اونس، معادل با ۲۸/۳۵۰ گرم از برگ تازه ریحان است که ۱۲ کالری انرژی، ۰/۹ گرم پروتئین، ۰/۳ گرم چربی، ۲ گرم کربوهیدرات، ۰/۹۱ میلی گرم کلسیم، ۰/۳ میلی گرم آهن، ۱۲/۳۸۰ واحد ویتامین A و ۸ میلی گرم ویتامین C دارد (Bais et al. 2000). اسانس ریحان به عنوان ادویه در شیرینی پزی، سالاد، نوشیدنی های غیر الکلی و بستنی و نیز در کارخانجات عطر سازی و محصولات دهانی و دندان نظیر خمیر دندان و دهان شویه ها کاربرد دارد (Labra et al. 2004). ریحان منبع ترکیبات حلقوی و اسانس است که دافع حشرات بوده و عملکرد ضد انگلی، ضدباکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی و آنتی اکسیدانی دارد (Juliani & Simon 2002, Labra et al. 2004, Lewinsohn et al. 2000). در صنایع آرایشی و بهداشتی نیز استفاده می شود (امید بیگی ۱۳۷۹). امروزه از اسانس ها در صنایع رنگ سازی، نفت خام، استخراج معدن، کارخانجات مواد شیمیایی، آرایشی، بهداشتی، مواد غذایی به عنوان طعم دهنده و خوشبو کننده و نیز در درمان بیماریها (Aromatherapy) استفاده می شود (Rangahau 2001, Sangwan et al. 2001).