

اولین کنفرانس بین المللی

ارکیده‌های دارویی و زینتی

محورهای کنفرانس:

➤ اهلی سازی و تکثیر

➤ بیوتکنولوژی و بیولوژی مولکولی

➤ ریزازدیادی و کشت بافت

➤ حفاظت ژنتیکی

➤ فیزیولوژی و فیزیولوژی پس از برداشت

➤ فیتوشیمی و خصوصیات دارویی

➤ صنایع غذایی

➤ اقتصاد و بازاریابی



تاریخ و محل برگزاری کنفرانس: ۲۶ و ۲۷ خرداد ۱۴۰۰ - دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

<https://conf.uok.ac.ir/orchid400/Default.aspx?Lang=fa>

کمیته علمی



دکتر علی اکبر مظفری

دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی،
دانشگاه کردستان، ایران



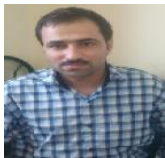
دکتر عبدالباسط قربانی

پژوهشگر گروه بیوسیستماتیک، دانشگاه اوپسالا، سوئد



دکتر شیرین دیانتی

استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی،
پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، ایران



دکتر محمد فتاحی

دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی،
دانشگاه ارومیه، ایران



دکتر نوروز عبدالرزاق طاهر

استاد گروه علوم باغبانی، دانشگاه سلیمانیه، اقلیم
کردستان



دکتر یاور وفایی

استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی،
دانشگاه کردستان، ایران



دکتر محمد باقر رضایی

استاد، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ایران



دکتر پژمان آزادی

استادیار بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی
کشاورزی، ایران



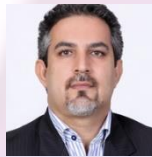
دکتر امیر علی خدامزاده

استادیار آگرواکولوژی، گروه زمین و محیط زیست،
دانشگاه بین المللی فلوریدا، آمریکا



دکتر علی خدوی

دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه
اراک، ایران



دکتر علی بغدادی

استادیار گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم
کشاورزی و غذا، دانشگاه بولونیا، ایتالیا



دکتر فرزاد نظری

استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه
کردستان، ایران



دکتر علی قادری

دکتری تخصصی گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی،
دانشگاه فنی و حرفه‌ای، ایران



کمیته اجرایی



دکتر جلال خورشیدی

استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی،
دانشگاه کردستان، ایران



دکتر یاور وفایی

استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه
کردستان، ایران



مهندس کیوان سبحانی

دانشجوی دکتری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان،
ایران



First section

بخش اول

سخنرانی

صفحه	نویسنده	عنوان
۲	شیرین مرادی	تاثیر منابع کربوهیدرات و ترکیبات آلی مختلف بر جوانه زنی غیر همزیست و تکامل پروتوکورمهای <i>Dactylorhiza umbrosa</i> ثعلب سایه پسند
۱۱	اسعد محمدامینی	مروری بر خواص فیزیکوشیمیایی و عملکردی صمغ ثعلب
۱۸	همایون فرهنگد	پتانسیل های برخی از ارکیدهای ایران برای باغبانی زینتی
۲۵	مهدی رضایی	مروری بر کاربرد برخی فناوری ها در پس از برداشت ارکیده دندروبیوم
۳۴	سعیده رستمی بالان	القاء غده زایی درون شیشه ای <i>Dactylorhiza umbrosa</i> با پیش تیمار تنش اسمزی
۴۱	زهرا مهدوی	اثر طیف های مختلف نور بر درصد جوانه زنی بذرهای مصنوعی ذخیره شده ثعلب خربقی معمولی (<i>Epipactis veratrifolia</i>)
۴۷	مژگان فتاحی	بررسی عوامل موثر بر جوانه زنی غیر همزیست در ثعلب ارغوانی (<i>Orchis mascula</i>)
۵۴	شهلا حسینی	موقعیت سیستماتیکي جنس <i>Corybas</i> در زیر قبیله <i>Acianthinae</i> بر اساس آنالیز توالی های <i>matk</i> در جزیره مالزی

تأثیر منابع کربوهیدرات و ترکیبات آلی مختلف بر جوانه زنی غیر همزیست و تکامل پروتوکورم‌های ثعلب سایه پسند *Dactylorhiza umbrosa*

شیرین مرادی^{۱*}، شیرین دیان‌تی دیلمی^۲

^۱دکتری، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، البرز

^۲استادیار، گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران

Email: shirinmoradi@ut.ac.ir

چکیده

ثعلب سایه پسند، گونه از ارکیدهای خاکروی بومی ایران است که به عنوان گیاه زینتی و دارویی اهمیت خاصی دارد. از اندام زیر زمینی آن ماده ثعلب استخراج می‌شود که در صنعت دارویی و غذایی بسیار با ارزش است. به دلیل برداشت بی رویه و غیر قانونی اندام زیر زمینی آن، این گیاه در معرض انقراض قرار دارد. تکثیر انبوه با روش‌های نوین می‌تواند راه حلی مناسب برای محافظت این گیاه با ارزش از انقراض باشد. بدین منظور در این پژوهش تأثیر دو فاکتور کربوهیدرات (ساکارز، فروکتوز و گلوکز در غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر) و ترکیبات آلی (پیتون و کازئین در دو غلظت صفر و ۲ گرم در لیتر) در محیط فاست به عنوان محیط کشت پایه بر جوانه زنی غیر همزیست و مراحل تکامل پروتوکورمی ثعلب سایه پسند در شرایط تاریکی به دو روش بررسی گردید. اثر تیمارهای قندی، ترکیبات آلی و نیز اثر متقابل این دو بر جوانه زنی غیر همزیست این ارکیده خاکروی معتدله تفاوت معنی داری دارد. نتایج نشان داد که در تیمارهای قندی مختلف اثر کازئین در مراحل مختلف جوانه زنی و رشد پروتوکورم بهتر از پیتون بود. بالاترین درصد جوانه زنی با ۹۸/۰۷٪ درصد در محیط کشت فاست حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز و دو گرم در لیتر کازئین مشاهده شد. پروتوکورم‌های بالغ پس از چهار ماه به محیط کشت برتر حاوی ۰ و ۲ گرم در لیتر ذغال فعال در شرایط نور منتقل شدند. تأثیر مثبت تیمار ذغال فعال ۲ گرم در لیتر در سرعت رشد شاخه و ریشه دانهال‌ها مشاهده شد.

کلمات کلیدی: ارکیده بومی، ارکیده خاکروی معتدله، پروتوکورم، کشت درون شیشه‌ای

مقدمه

خانواده ارکیده یکی از خانواده‌های مهم گیاهی است که در طی حدود یک دهه، تولید برخی گیاهان این خانواده جایگاه و درخشش چشمگیری در صنعت گل و گیاهان زینتی یافته و توانسته است اقتصاد کشورهای تولید کننده خود را متحول سازد.

همه گونه‌های ارکیده در لیست گیاهان در معرض انقراض سازمان CITES قرار دارند و تجارت بین المللی آن‌ها تحت کنترل جهانی بوده و برای صادرات و واردات محصولات آن نیاز به اجازه رسمی می‌باشد. ایران از سال ۱۹۷۶ به CITES پیوسته و تمامی ارکیده‌های ایرانی که اکثراً ارکیده‌های خاکروی معتدله بوده، در لیست اصلی گیاهان در حال انقراض قرار دارند و برداشت، جمع آوری و تجارت محصولات این گونه‌ها غیر قانونی می‌باشد (۶). حدود ۴۶ گونه و زیر گونه از خانواده ارکیده در ایران معرفی شده است که ۳۰ گونه و

زیر گونه از آن غده تولید می کنند که عمدتاً در امتداد کوه های البرز در شمال و کوه های زاگرس در غرب توزیع یافته اند (۱۲ و ۱۳).

ارکیدهای خاکروی مناطق معتدله گروهی از ارکیدها هستند که به عنوان گل های چند ساله ای باغچه ای و با پتاسیل بالا برای تولید گل گلدانی و شاخه بریده و نیز تولید مواد موثره داورپی و صنعتی توانسته اند در سال های اخیر توجه دنیای باغبانی را به خود جلب کنند (۱۱). در آسیا ارکیدهای خاکروی به ثعلب شهرت دارند. ثعلب یه کلمه با ریشه عربی است که به غده های خشک شده ارکیدهای خاکروی گفته می شود. ثعلب به صورت پودری و یا به عنوان شربت مصرف می شود. همچنین در صنایع بستنی سازی، قنادی و تولید نوشیدنی ها کاربرد دارد (۱۷).

قربانی و همکاران، گزارش کردند که هم اکنون غده های شانزده گونه و زیر گونه را در ایران جمع آوری و به صورت غیر قانونی خرید و فروش و صادر می شود. گونه ثعلب سایه پسند با نام علمی *Dactylorhiza umbrosa* یکی از همان شانزده گونه ارکیدهای خاکروی مناطق معتدله بومی ایران است که غده های شاخه ای یا پنجه ای این گیاه برای استخراج ماده ثعلب، بصورت بی رویه از منابع طبیعی جمع آوری می گردند. عصاره غده این گیاه علاوه بر کاربردش به عنوان ثعلب، دارای مواد موثره گوناگون است که در طب سنتی و پزشکی مدرن برای درمان بیماری های مختلف استفاده می شود (۲). این گیاه با قامتی بر افراشته گل آذین های غالباً پر گل و استوانه ای با گل های ارغوانی و بنفش جاذبه زینتی نیز دارد و موسم گل این گیاه اردیبهشت تا خرداد می باشد (۵). در آذربایجان یک کیلوگرم ثعلب خشک گونه های *Dactylorhiza* به طور میانگین از ۹۸۰ عدد غده تولید می شود (۶).

بر اساس برآوردهای ماه های آوریل - ژوئن سال ۲۰۱۳، گزارش شده که در یکی از روستا های استان گلستان در ایران حدود ۲۴/۵ تن غده تازه برداشت شده است. این گیاهان علفی بوده و برداشت غده آن ها موجب نابودی این گیاهان می گردد و نیز برداشت پیش از به دانه رفتن آخرین امید تکثیر این گیاهان را از بین خواهد برد و آن ها را در خطر انقراض قرار می دهد (۶).

مشکل بزرگ در مسیر تکثیر گیاهان خانواده ارکیده، وجود بذره های ریز و فاقد اندوخته غذایی و رویان های ابتدایی نابالغ است که برای جوانه زنی در طبیعت نیازمند همزیستی با قارچ های میکوریزا هستند. این قارچ ها پلی ساکاریدهایی نظیر سلولز و نشاسته را شکسته و به قندهای ساده تبدیل کرده و در اختیار گیاه قرار می دهند به همین سبب منابع کربوهیدراتی و قندها عناصر مهمی هستند که در این زمینه مورد توجه و بررسی قرار گرفتند (۱۶). تحقیقات بیشمار در مورد جوانه زنی غیرهمزیست بذر گونه های مختلف ارکیده در محیط درون شیشه ای صورت گرفته که موجب تجاری شدن تولید برخی از آن ها شده است. تکنیک جوانه زنی غیر همزیست برای اولین بار توسط نودسن در سال ۱۹۱۶ بر روی چند نوع ارکیده انجام شد. از آن زمان تا کنون تحقیقات بیشمار در رابطه با تاثیر عواملی نظیر محیط کشت های مختلف، تنظیم کننده های رشد و غیره بر روی جوانه زنی غیر همزیست صورت گرفته است (۱۶). علی رغم سختی های مربوط به یافتن و استفاده از قارچ های میکوریزای همزیست مناسب، درصد پایین جوانه زنی و نیز وقوع مشکلاتی مانند تنوع در نتاج که از نظر باغبانی مطلوب نیست، همچنان کشت همزیست بذر در شرایط آزمایشگاهی، کارآمدترین راه حل برای این تکثیر این گروه در نظر گرفته می شود. از سوی دیگر با تمام

پیشرفت‌هایی که برای ریزازدیادی و کشت درون شیشه‌ای برای برخی ارکیدهای دارزی گرمسیری بصورت انبوه در سطح تجاری به دست آمد، نتایج اندکی در مورد ارکیدهای خاکروی معتدله حاصل شده است. در نتیجه باتوجه به وجود بازار و تقاضا و با در نظر گرفتن مشکلات عمده و سختی کار، یافتن یک روش مناسب برای تکثیر این نوع از ارکیدها و تسریع و بهبود شرایط جوانه زنی آنها می‌تواند ارزشی بی‌مانند داشته باشد و اهمیت کار را دوچندان نماید (۷).

ثعلب سایه پسند نیز جزء گروه ارکیدهای خاکروی معتدله و از نظر تکثیر جزء گروه سخت کار است، بنابراین در این پژوهش به بررسی روند مراحل جوانه زنی و ادامه رشد پروتوکورم‌ها پرداختیم. برای این منظور تاثیر نوع و غلظت‌های مختلف کربوهیدرات‌ها و نیز ترکیبات آلی مورد آزمایش قرار گرفته است. دستیابی به این هدف اولین و مهمترین گام برای تولید انبوه و حمایت از حیات این گونه با ارزش است. دستیابی به پروتکل مناسب برای تولید انبوه این گیاه، ضمن فراهم سازی امکان کشت و کار انبوه، از برداشت بی‌رویه آن از منابع طبیعی توسط افراد غیر مطلع و سود جو نیز جلوگیری خواهد نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و روش استریل سازی

برای انجام این آزمایش از بذرهای ارکیدهای ثعلب سایه پسند استفاده شد. کپسول‌های رسیده این گونه از روی گیاه در رویشگاه طبیعی جمع‌آوری شدند. بذرهای از درون کپسول‌ها خارج و تا زمان استفاده درون پاکت‌های کاغذی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱). بذرهای به منظور استریل کردن به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ غوطه‌ور شدند، سپس با آب مقطر استریل سه بار و هر بار به مدت دو دقیقه در زیر دستگاه هود لامینار استریل شستشو شدند.

محیط کشت و شرایط رشد

براساس منابع و پژوهش‌های پیشین محیط کشت فاست (۴) به عنوان محیط کشت پایه مورد استفاده قرار گرفت (۱). سه نوع قند ساکارز، فروکتوز و گلوکز در دو غلظت ۲۰ و ۳۰ گرم در لیتر در ترکیب با محیط‌های حاوی پپتون و کازئین در غلظت‌های (۰ و ۲ گرم در لیتر) به عنوان تیمار استفاده شدند. pH محیط‌ها بر روی ۵/۵ تنظیم و از ۷ گرم در لیتر آگار برای جامد کردن استفاده شد. محیط‌ها در دمای 21°C به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند و سپس به مقدار ۲۵ میلی لیتر در هر پتری توزیع شدند. پتری‌های حاوی بذر تا زمان تشکیل پروتوکورم‌های نوکدار در دمای 25 ± 1 سانتی‌گراد در شرایط تاریک قرار گرفتند. تعداد بذرهای جوانه زده و پروتوکورم‌های در حال رشد به صورت هفتگی به مدت چهار ماه شمارش شدند.

طرح آماری

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور (قند و ترکیبات آلی) در ۲۱ تیمار، هریک در سه تکرار (سه پتری) و در مجموع ۶۳ پتری در انجام شد که در هر پتری در حدود $50 \pm$ ۶۵۰ بذر وجود داشت. مراحل بذور جوانه زده و تعداد پروتوکورم‌های حاصل از بذر به صورت هفتگی شمارش

شدند. در آخرین داده برداری پروتوکورمها بر اساس شاخص نمو در شش اندازه دسته بندی شدند، که توسط دیانتی و همکاران (۱) ارائه شده است که شامل: مرحله ۱: بذر جوانه نزده، مرحله ۲: جنین متورم شده داخل پوسته، مرحله ۳: پروتوکورم اولیه که از پوسته خارج شده، مرحله ۴: مرحله رشد پروتوکورم و ظهور ریزوئیدها، مرحله ۵: پروتوکورم نوکدار دارای ریزوئید، مرحله ۶: پروتوکورمهای بالغ در مرحله آغاز برگدهی که مستعد تشکیل شاخساره هستند (شکل ۱). در این پژوهش برآورد دو شاخص صورت گرفت. برای درصد جوانه زنی در هر مرحله، تعداد پروتوکورمهای هر مرحله به تعداد کل بذر در هر پتری محاسبه شد. در خصوص شاخص نمو پروتوکورم به منظور برآورد درصد پیشرفت نموی هر تیمار تعداد پروتوکورمهای مرحله چهار تا شش بر تعداد کل بذرهای تقسیم شد. در آزمایشی دیگر به منظور انتقال گیاه به محیط رشد مناسب، پروتوکورمهای بالغ به محیط رشد برتر به عنوان محیط پایه با دو غلظت ۰ و ۲ گرم در لیتر ذغال فعال به عنوان تیمار در سه تکرار و ۱۰ پروتوکورم در هر تکرار کشت شدند. دادهها در نرم افزار SAS 9.1 تجزیه، تحلیل و میانگینها با آزمون دانکن در سطح $\alpha = 0.05$ مقایسه شد.

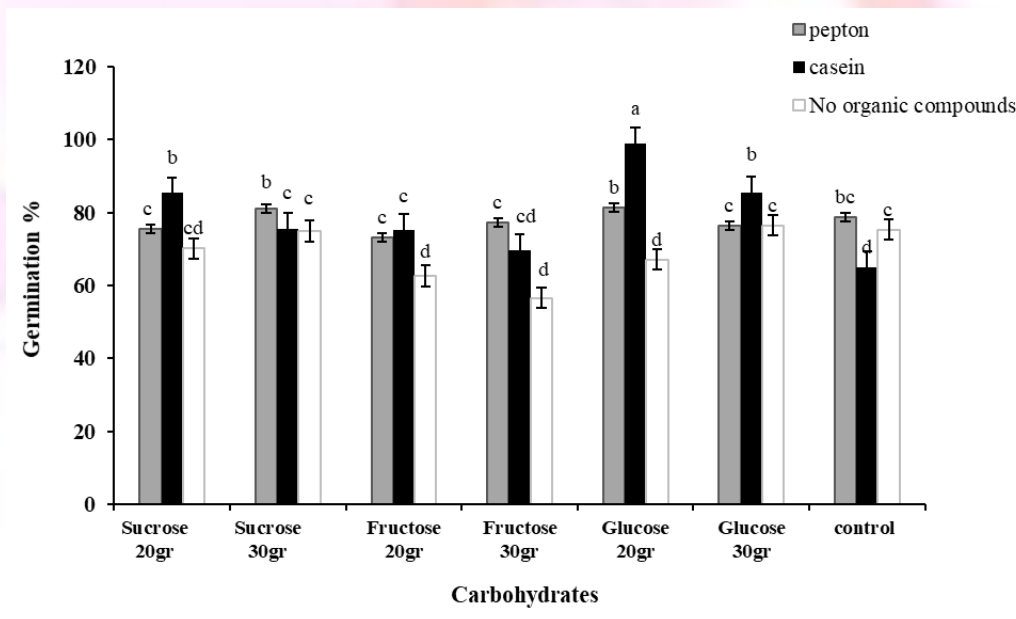
نتایج و بحث

روند جوانه زنی همانطور که در اکثر ارکیدهای خاکروی معتدله گزارش شده ناهمگن بود. اگر چه درصد زیادی از بذرهای در تیمارهای مختلف به مرحله متورم شدن جنین (مرحله ۲) رسیدند، اما این جنینهای متورم شده در برخی تیمارها تا انتهای آزمایش در همان مرحله باقی مانده و رشد نکردند. در برخی دیگر از تیمارها که تیمارهای برتر نیز در این دسته قرار داشتند جنین های متورم تا آخرین مرحله نمو پیش رفتند.

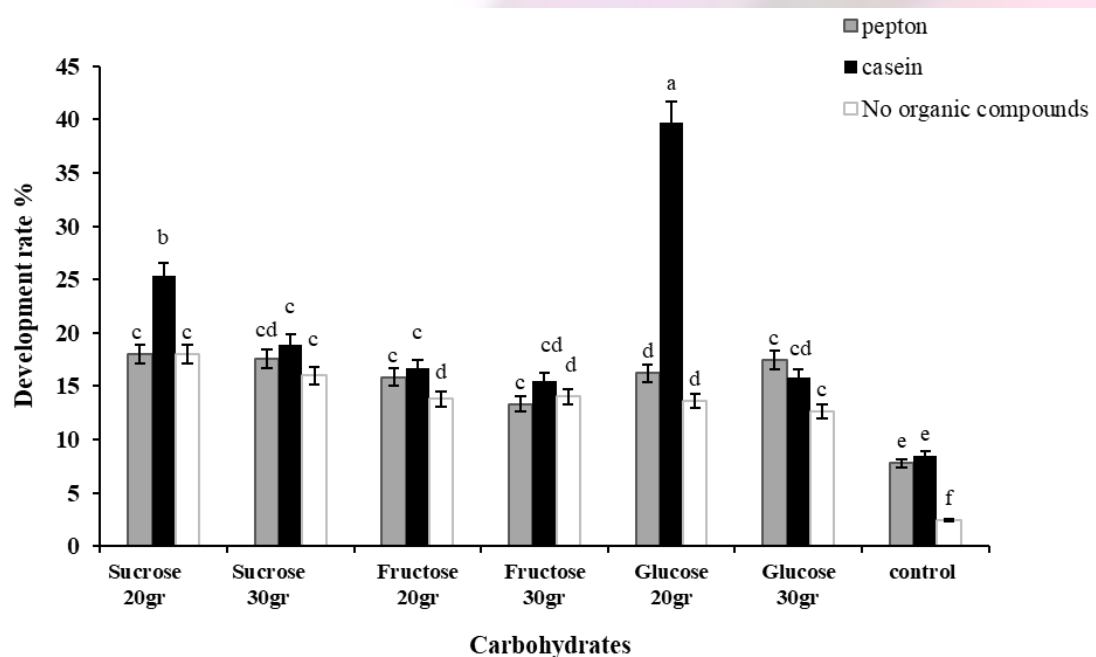
نتایج تفاوت معنی داری را در فاکتورهای مربوط به قند و ماده آلی و نیز اثر مقابل بین آنها نشان داد. در تمامی تیمارهای قندی درصد جوانه زنی در تیمارهای حاوی کازئین بیشتر از تیمارهای بدون ماده آلی و نیز پیتون مشاهده گردید (شکل ۱). همچنین بالاترین درصد جوانه زنی (۹۸/۰۷٪) در تیمار ۲۰ گرم در لیتر گلوکز حاوی کازئین مشاهده شد. کمترین درصد جوانه زنی در تیمار فاقد قند و فاقد ترکیبات آلی ثبت گردید. نکته قابل توجه آن است که با اینکه تمام تیمارهای قندی درصدهای مختلف را به خود اختصاص داده بودند، اما مشاهده بالاترین درصد جوانه زنی را در تیمار حاوی کازئین در تمامی تیمارهای قندی مشترک بود. بی شک کازئین به عنوان بهترین عنصر آلی برای جوانه زنی ارکیده ثعلب سایه پسند می باشد.

در میان تیمارهای قندی تیمار گلوکز در دو نسبت ۲۰ و ۳۰ گر تاثیر بالایی بر روی جوانه زنی بذرهای نشان داد. البته تیمار ساکارز ۲۰ گرم حاوی کازئین نیز نتیجه مشابهی را با گلوکز ۳۰ گرم در لیتر در میزان درصد جوانه زنی داشت. برای انتخاب بهترین تیمار در جوانه زنی ارکیده به دلیل عدم همگن بودن جوانه زنی در این گیاه، شاخص دیگری با عنوان درصد نمو پروتوکورم نیز مورد ارزیابی قرار گرفت، زیرا تنها شروع جوانه زنی در تیمارها مد نظر نبوده بلکه سرعت و کیفیت رشد هدف نهایی ما از این پژوهش است. بدین منظور تعداد پروتوکورمهایی که از مرحله سوم عبور کرده و بالغ شده اند و ریشچه و یا حتی برگ داده اند را شمارش کرده و بر میزان کل بذرهای تقسیم شد. نتایج نشان داد که با ۳۹/۷۳٪ پیشرفت نمو، تیمار ۲۰ گرم در لیتر گلوکز حاوی کازئین بهترین تیمار در جوانه زنی و بلوغ پروتوکورم بود (شکل ۲). همچنین با مقایسه شاخص نمو پروتوکورم در سایر تیمارها می توان به وضوح مشاهده کرد که کازئین در تمامی تیمارهای

قندی تاثیر مثبتی بر روی نمو پروتوکورم داشته است. پس از گلوکز ۲۰ گرم، ساکارز ۲۰ گرم در جایگاه دوم قرار گرفته است.



شکل ۱. تاثیر ترکیبات آلی و تیمارهای مختلف قندی بر درصد جوانه زنی ثعلب سایه پسند.



شکل ۲. تاثیر ترکیبات آلی و تیمارهای مختلف قندی بر درصد نمو پروتوکورم ثعلب سایه پسند.

پروتوکورم های بالغ بعد از چهار ماه به محیط کشت فاست حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز و ۲ گرم در لیتر کازئین به عنوان محیط برتر پایه در دو تیمار ۰ و ۲ گرم در لیتر ذغال فعال منتقل شدند. پس از دو ماه طول گیاه، طول ریشه و تعداد برگ به عنوان صفات تعیین کننده میزان رشد اندازه گیری گردید. نتایج نشان داد

که حضور ذغال فعال در محیط کشت موجب تسریع رشد گیاه شد. بالاترین طول گیاه، بیشترین طول ریشه در تیمار حاوی ذغال فعال مشاهده گردید (جدول ۱). تعداد برگ‌های تفاوت معنی داری نشان نداد.

جدول ۱. تاثیر ذغال فعال بر رشد دانهال های ثعلب سایه پسند

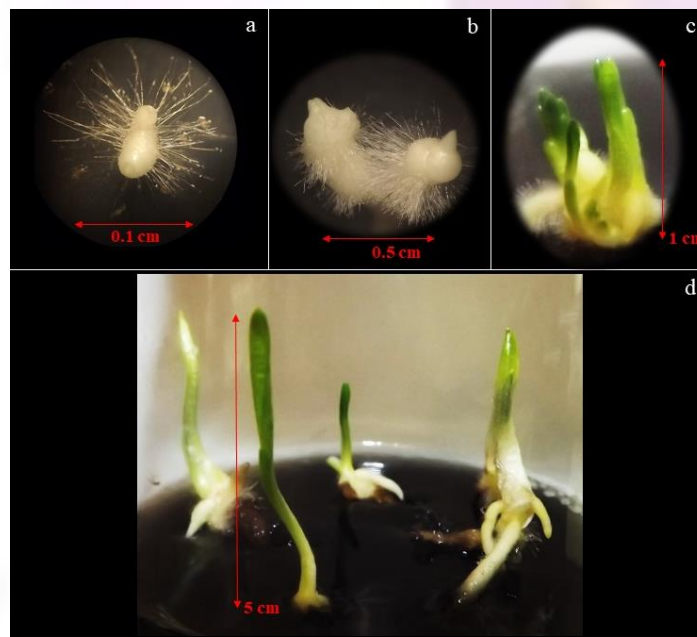
ذغال فعال	تعداد برگ	طول گیاه (سانتی متر)	طول ریشه (سانتی متر)
صفر گرم در لیتر	۱/۲ ^{n.s}	۱/۸۳ ^b	۰/۶۵ ^b
۲ گرم در لیتر	۱/۵ ^{n.s}	۳/۲۴ ^a	۲/۲ ^a
C.V	۴/۵	۶/۳۷	۸/۸

پژوهشگران گزارش نمودند که استفاده از منابع کربوهیدرات (قندها) نسبت به سایر مواد مورد آزمایش تاثیر بیشتری بر درصد جوانه زنی دارد، اما تاثیر نوع قند و مقدار آن بسته به جنس و حتی گونه متفاوت است (۱۶). به عنوان مثال استفاده از قندهای تریلوز و گلوکز را برای جوانه زنی غیر همزیست ارکیده *Dactylorhiza purpurea* بسیار مفید گزارش شده است (۷). در پژوهشی به بررسی جوانه زنی چندین ارکیده بومی پرداخت و مشاهده شده است که بذرها در محیط‌های حاوی ساکارز و گلوکز بهترین جوانه زنی را داشتند (۳). در پژوهشی مبنی بر تاثیر منابع کربوهیدرات بر جوانه زنی غیر همزیست ارکیده خاکروی *Habenaria macroceratitis* قندهای فروکتوز، ساکارز و دکستروز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تفاوت معنی داری نسبت به هم نشان نداد. پژوهشگران ثابت کرده اند از کربوهیدرات‌های ساده مانند گلوکز به تنهایی فرایند جوانه زنی در گونه‌های سرسخت خاکروی معتدله را حمایت می‌کند و استفاده از آنها را توصیه نموده اند (۲ و ۳). گلوکز به عنوان یک قند اولیه مناسب و راحت برای جذب و تسریع جوانه زنی محسوب می‌شود. همچنین بذره‌های برخی از گونه‌های ارکیده نوعی گلیکوپروتئین دارد که در هنگام هیدرولیز گلوکز آزاد می‌کند. مشاهدات در پژوهش حاضر نیز نتایج فوق را تایید نمود. براساس نتایج به دست آمده تیمار قندی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز را می‌توان به عنوان بهترین تیمار قندی برای جوانه زنی و رشد پروتوکورم‌های گونه ثعلب سایه پسند پیشنهاد نمود.

مطالعات قبلی نشان داده که استفاده از نیتروژن‌های آلی علاوه بر تامین مواد معدنی در جوانه زنی و نیز کیفیت و رشد آن‌ها بسیار تاثیر دارد. به عنوان مثال در جوانه زنی غیر همزیست ارکیده *Ophrys sphecodes* کازئین جایگزینی بسیار موثر و کارآمدتر از گلوتامین گزارش شد (۷ و ۱۱). در بررسی تاثیر ترکیبات آلی نظیر پیتون، کازئین و آب نارگیل بر جوانه زنی چند نوع ارکیده خاکروی معتدله شمال اروپا، تیمارها تفاوت معنی دار نشان ندادند، اما مشاهده شد که استفاده از نیتروژن آلی در صد جوانه زنی بذره‌های این گونه‌های مقاوم نسبت به سرما را افزایش می‌دهد (۷). پژوهشگران با مطالعه روی جوانه زنی غیر همزیست ارکیده *Dactylorhiza purpurea* دریافتند که استفاده همزمان از ویتامین تیامین و کازئین برای انگیزش و نمو پروتوکورم‌های حاصل از بذر بسیار مفید هستند (۱۱). نتایج پژوهش ما در تایید گزارشات فوق تاثیر ترکیبات آلی را بر جوانه زنی غیر همزیست ارکیده ثعلب سایه پسند مثبت نشان داد و در بین تیمارها، محیط کشت

حاوی دو گرم در لیتر کازئین بهترین نتیجه را به همراه داشت. اثر متقابل بین تیمار قند و ترکیبات آلی نیز معنی دار و بهترین تیمار با ۳۹/۷۳٪ پیشرفت رشدی مربوط به محیط کشت حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز و دو گرم در لیتر کازئین بود.

ذغال فعال ماده بسیار مفید است که در کشت بافت بسیاری از گیاهان استفاده می‌شود. این ماده به دلیل جذب فنول از قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌ها جلوگیری می‌کند. این خصوصیت در مورد ارکیده که فنل زیادی دارد بسیار موثر است. همچنین در برخی از منابع تاثیر ذغال فعال را در افزایش جذب مواد معدنی و نیز هورمون‌ها گزارش شده است (۸، ۹، ۱۳). در گونه‌های مختلف ارکیده از ذغال فعال در کشت بافت استفاده فراوان شده و تاثیر مثبت آن در رشد گونه‌های مختلف گزارش شده است (۸، ۹، ۱۳). در این پژوهش نیز مشابه پژوهش‌های پیشین تاثیر مثبت ذغال فعال در تولید شاخه و ریشه مشاهده گردید (شکل ۳).



شکل ۳. مراحل مختلف رشد پروتوکورم از مرحله سوم تا دانهال ریشه دار، (a) پروتوکورم در مرحله سوم، (b) پروتوکورم نوکدار مرحله پنجم، (c) دانهال منتقل شده یکماه پس از واكشت، (d) دانهال دو ماه بعد از واكشت

References

1. **Dianati Daylami, S., Kafi, M., Mirmasoumi, M., Mozartian, V., Salami, A. (2013).** Introduce the suitable medium for asymbiotic germination of *Epipactis veratrifolia*. Journal of Crop Improvement (Journal of Agriculture True). 15, 161–177. Retrieved from <https://journals.ut.ac.ir>
2. **Eisenman, S. W., Zaurov, D. E., Struwe, L. (2013).** Medicinal Plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan, Translated by Zaurov, D. E Eisenman, S. W., Yunusov, D. A., and Isaeva, V., Springer. pp: 85.
3. **Ernst, R., J. Arditti, P. L. Healey. (1971).** Carbohydrate physiology of orchid seedlings II: Hydrolysis and effects of oligosaccharides. American Journal of Botany 58: 827–835



4. **Fast, G. (1976).** Möglichkeiten zur Massenvermehrung von *Cypripedium calceolus* und anderen europäischen Wildorchideen. pp. 359-363. In Proceedings of the Eighth World Orchid Conference. German Orchid Society, Frankfurt, Germany.
5. **Ghahraman, A. & Attar, F. (1998).** Iranian plant biodiversity. V 1. Institute of Tehran University Publications and Printing.
6. **Ghorbani, A., Gravendeel, B., Naghibi, F. et al. (2014).** Wild orchid tuber collection in Iran: a wake-up call for conservation. *Biodivers Conserv* 23, 2749–2760
7. **Jorgensen, B. I. & Andersen, T. F. (1998).** Hardy and half-hardy terrestrial orchids as potential new potplants. In: Proceedings of third international symposium on new floriculture crops, *Acta Horticulturae*, 454, International Society for Horticultural Science (ISHS). pp.195-205.
8. **Kima, D.H., Kangb, K.W., Enkhtaivan, G., Jana, U., Sivanesan I. (2019).** Impact of activated charcoal, culture medium strength and thidiazuron on non-symbiotic in vitro seed germination of *Pecteilis radiata* (Thunb.) Raf. *South African Journal of Botany* 124, 144–150.
9. **Pan, M.J., & Staden, J. (1998).** The use of charcoal in in vitro culture—a review. *Plant Growth, Regul.* 26, 155–163.
10. **Mead, J. W., & Bulard, C. (1975).** Effects of Vitamins and Nitrogen Sources on Asymbiotic Germination and Development of *Orchis laxiflora* and *Ophrys sphegodes*. *The New Phytologist*. 74(1), 33-40 (8 pages)
11. **Rännbäck, L.M. (2007).** Propagation, cultivation and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on *Cypripedium* spp., Bachelor project in the Danish-Swedish Horticulture programme, (ISSN 1652-1579).
12. **Renz, J. (1978).** Flora iranica. Part 126: orchidaceae. Naturhistorisches Museum, Vienna
13. **Schippmann, U., Leaman, D.J., Cunningham, A. B. (2006)** A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. In: Bogers RJ, Craker LE, Lange D (eds) *Medicinal and aromatic plants*. Springer, Dordrecht, pp 75–95
14. **Shahsavari, A. (2008).** Flora of Iran. Part 57: orchidaceae. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran
15. **Smith, S. E. (1967).** Carbohydrate translocation in orchid mycorrhizas. *New Phytologist* 66: 371–378
16. **Stewart, S. L. & Kane, M. E. (2010).** Effects of carbohydrate source on the in vitro asymbiotic seed germination of the terrestrial orchid *Habenaria macroceratitis*. *Journal of Plant Nutrition*, 33(8), 1155-1165.
17. **Tamer, C.E., Karaman, B., Copur, O.T. (2006).** A traditional Turkish beverage: salep. *Food Rev Int* 22:43–50.



Effect of carbohydrate source and organic compound on asymbiotic seed germination and protocorm growth improvement of *Dactylorhiza umbrosa*

Shirin Moradi^{1*}, Shirin Dianati Daylami²

¹ Ph.D., Department of Horticulture sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran

² Associate Professor, Department of Horticulture sciences, Aburayhan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran

Email: shirinmoradi@ut.ac.ir

Abstract

Dactylorhiza umbrosa is a species of native terrestrial orchid in Iran that is important as an ornamental and medicinal plant. Salap is extracted from their underground organ, which is very valuable in the pharmaceutical and food industries. This plant is endangered due to the improper harvesting of its underground organs. Mass propagation with new methods can be a good solution to protect this valuable plant from extinction. In this study, different kind of carbohydrate-containing sucrose, fructose, and glucose (0, 20, 30 g/l) and organic compounds containing peptone and casein hydrate (0, 2 g/l) in FAST as a basal medium were examined for their effectiveness in non-symbiotic germination rate and development of an Iranian native orchid species *Dactylorhiza umbrosa* in darkness condition. Results showed that the treatments of carbohydrates, organic compounds, and the interaction between them had a significant effect on germination percentage. Casein has a good effect on embryogenesis in different carbohydrate source treatments. The highest germination with 98.07 % was observed in FAST-medium containing 20 gr/l glucose and 2 g/l casein hydrate. Mature protocorms were transferred to the culture medium containing 0 and 2 g / l activated charcoal under light conditions after four months. The positive effect of treatment with activated charcoal 2 g / l in the rate of growth of shoots and roots of seedlings was observed.

Keywords: In vitro, Native orchids, Protocorm, Terrestrial orchid



مروری بر خواص فیزیوشیمیایی و عملکردی صمغ ثعلب

اسعد محمدامینی*

استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Email: a.mohammadamini@uok.ac.ir

چکیده

صمغ ثعلب متعلق به گلوکومانان‌ها است که در غده‌های گیاه ثعلب از خانواده ارکیده وجود دارد. صمغ ثعلب خواص تغلیظ کنندگی، امولسیفایری، پوشش‌دهی و تولید فیلم داشته که در مواد غذایی و دارویی کاربردهای وسیعی دارد. به دلیل اهمیت این صمغ بومی، در این مقاله خواص ساختاری، رئولوژیک و عملکردی صمغ ثعلب استخراج شده از گونه‌های مختلف ارکیده که تا کنون مورد بررسی قرار گرفته و منتشر شده‌اند، به اختصار مرور شده است.

کلمات کلیدی: خواص رئولوژیک، فیلم، گلوکومانان، نشاسته

مقدمه

هیدروکلوئیدها یا صمغ‌ها ترکیبات پلیمری هستند که در حضور آب به صورت محلول‌های کلوئیدی درآمد و سبب افزایش قوام و ویسکوزیته محلول می‌شوند. هیدروکلوئیدها بسته به خصوصیات و منشأ، ممکن است از بخش‌های مختلف گیاهان استخراج شوند که شامل برگ، غده و دانه می‌باشند. بر همین اساس، ترکیب شیمیایی، ساختار و خواص عملکردی هیدروکلوئیدها گستردگی فراوانی داشته و بنابراین، کاربردهای متفاوتی مانند غلیظ کننده، ژل دهنده، پایدار کننده، امولسیفایر و پوشش دهنده در صنایع مختلف غذایی و دارویی دارند.

ثعلب از خانواده ارکیدها می‌باشد که در نواحی مختلف خاورمیانه، خصوصاً ایران و ترکیه وجود دارد. استان کردستان یکی از مناطق بومی رویش این گیاه است. غده زیرزمینی گیاه ثعلب تحت عنوان صمغ ثعلب از دسته هیدروکلوئیدهای گلوکومانان است که دسته‌ای از هیدروکلوئیدهای خنثی بوده که عمدتاً پلیمرهای با وزن مولکولی بالا از واحدهای گلوکز و مانوز با نسبت‌های مشخص هستند. کاربردهای غذایی ثعلب شامل تولید بستنی سنتی، تهیه یک نوع نوشیدنی لبنی خاص و یک نوع شیرینی ژله‌ای می‌باشد (۱). در کنار استفاده خوراکی، ثعلب دارای خواص درمانی متنوعی مانند کاهش قند خون، رفع مشکلات روده، بهبود سرماخوردگی و سرفه، کاهش کلسترول و چربی خون نیز می‌باشد (۳-۱). در این مقاله، به اختصار خصوصیات صمغ ثعلب و ویژگی‌های عملکردی و کاربردهای آن مرور خواهند شد.

استخراج و خالص‌سازی

استخراج صمغ ثعلب عموماً طی مراحل ساده‌ای شامل تمییز کردن مقدماتی، حرارت دادن به منظور غیرفعال نمودن آنزیم‌ها و کمک به جداسازی پوست خارجی، خشک کردن و آسیاب نمودن انجام می‌شود (۱، ۲، ۴). گئورگیادیس و همکاران (۲۰۱۲) به سه روش مختلف صمغ ثعلب را استخراج نمودند. گزارش

شده که مواد استخراج شده در بافر و عامل چلاته کننده دارای بار منفی بوده‌اند به طوری که مورد اول دارای اجزای با وزن مولکولی ۱۲-۶۰۰ kDa بوده و تنها در غلظت‌های بیشتر از ۰/۷٪ سبب پایداری امولسیون می‌شود اما نوع دوم، دارای وزن مولکولی حدود ۵۰ kDa بوده و هیچ اثری بر پایداری امولسیون نداشته است. نوع استخراج شده با قلیا دارای وزن مولکولی بسیار کمی بوده و اثر امولسیون کنندگی نداشته است (۵).

در خصوص خالص سازی صمغ ثعلب، گزارش شده که بیشترین مقدار گلوکومانان و کمترین ناخالصی توسط تیمار با اتانول ۴۰٪ حاصل شده به طوری که نسبت گلوکومانان به نشاسته از ۱/۵ به ۳/۵ افزایش یافته است. ویسکوزیته ذاتی و خواص ویسکوالاستیک آن افزایش یافته و ویسکوزیته ظاهری این نمونه حدود ۵ برابر بیشتر از صمغ ناخالص بوده است (۶). کورت و کاهیا اوغلو (۲۰۱۷) اثر دماهای مختلف استخراج بر خواص ساختاری صمغ ثعلب را بررسی کرده و گزارش نمودند که در تمام شرایط، خالص سازی سبب کم شدن مقدار پروتئین و وزن مولکولی شده است. بیشترین اثر خالص سازی در دمای ۲۵ °C بوده که بالاترین پایداری حرارتی را داشته است (۷). در تحقیقی دیگر، گزارش شده که صمغ استخراجی در دمای ۲۵ درجه بیشترین میزان گلوکومانان (۹۵٪) و کمترین نشاسته (۳٪) را داشته که در نتیجه بالاترین مقدار ویسکوزیته ظاهری، ویسکوزیته ذاتی و ویسکوالاستیسیته حاصل شده است. همچنین، به دلیل ماهیت خنثی صمغ، قندها و نمک‌ها اثری بر ویسکوزیته ظاهری نداشته و در pH برابر ۹، رفتار ژلی در محلول صمغ ظاهر شده است (۸). در مطالعه‌ای دیگر، استخراج صمغ ثعلب با استفاده از فراصوت انجام شده که صمغ استخراجی عمدتاً از مانوز و گلوکز تشکیل شده و دارای قدرت احیاء کنندگی و آنتی اکسیدانی هستند (۹).

ترکیب و ساختار شیمیایی

ترکیب شیمیایی صمغ ثعلب بسیار متنوع بوده و کاملاً وابسته به گونه، منطقه جغرافیایی رویش، شرایط اقلیمی و زمان جمع‌آوری است (۱۰). بخش اصلی غده گیاه ثعلب را گلوکومانان تشکیل می‌دهد (حدود ۷ تا ۶۱٪) که به همراه آن ممکن است ۱ تا ۳۶٪ نشاسته، ۰/۵ تا ۱٪ مواد نیتروژنی و ۰/۲ تا ۰/۶٪ خاکستر نیز وجود داشته باشد (۴-۱، ۱۰). گلوکومانان ثعلب دارای یک زنجیره خطی با شاخه‌های جانبی بسیار کمی از گلوکز و مانوز با نسبت ۱ به ۳/۸ است که با پیوندهای (۴→۱)-β متصل شده و گالاکتوز در کربن شماره ۶ استخلاف شده است (۳، ۱۱، ۱۲). فرهوش و ریاضی (۲۰۰۱) دو گونه ثعلب بومی ایران را مورد بررسی قرار داده و گزارش نمودند که صمغ ثعلب پنجه‌ای مقدار گلوکومانان بیشتر (۵۸٪) و نشاسته کمتر (۱/۶۷٪) نسبت به ثعلب قله‌ای (به ترتیب ۲۲٪ و ۶/۱۵٪) داشته است (۲).

خواص رئولوژیک

ویسکوزیته صمغ ثعلب، یک شاخص کیفی مهم محسوب می‌شود که عمدتاً مربوط به میزان گلوکومانان و نشاسته آن است. در محلول‌های غلیظ صمغ ثعلب، رفتار سودوپلاستیک گزارش شده است که در عمده هیدروکلوئیدها مشاهده می‌شود. همچنین مشخص شده که با افزایش غلظت محلول صمغ از ۰/۲ به ۰/۵٪، سودوپلاستیسیته و ویسکوزیته ظاهری صمغ افزایش یافته و سودوپلاستیسیته ثعلب پنجه‌ای نسبت به قله‌ای بیشتر بوده است. همچنین، مشخص شده که محلول‌های غلیظ ثعلب (۰/۶٪) رفتار وابسته به زمان از خود نشان می‌دهند (۲، ۱۳). بررسی ویسکوزیته ظاهری ۱۰ گونه مختلف صمغ ثعلب در غلظت ۰/۱٪ مشخص نمود

که مقدار آن در دمای 25°C در محدوده $6/40$ تا 148 سانتی پواز قرار دارد، به طوری که هر چه مقدار گلوکومانان بیشتر و نشاسته کمتر باشد، ویسکوزیته بالاتر بوده است (۴). همچنین، مشخص شده که غلظت های مختلف شیرین کننده های مصنوعی بر ویسکوزیته ذاتی ثعلب اثر معنی داری نداشته اند (۱۴). بررسی خواص رئولوژیک صمغ ثعلب گونه آناتولیکا با $41/6\%$ نشاسته و $18/5\%$ گلوکومانان طی حرارت دهی تا 95°C و سرد کردن آن تا 35°C نشان داده که با بیشتر شدن غلظت صمغ، ویسکوزیته آغازین و حداکثر افزایش یافته و دمای مربوط به پیک ویسکوزیته بالاتر از 94°C بوده که بیانگر نقش بارز نشاسته در قوام دهی محلول است (۱۰). چنین گزارش شده که صمغ ثعلبی که گروه های استیل آن حذف شده، ویسکوزیته ظاهری و سودوپلاستیسیته کمتری نسبت به صمغ طبیعی دارد. صمغ های با درجه حذف استیل ۹۰ و 100% در غلظت های به ترتیب $0/75$ و 1% ایجاد ژل نموده و قدرت ژل با افزایش غلظت بیشتر شده است. در اثر حذف گروه های استیل، حلالیت صمغ در آب کاهش یافته ولی پایداری حرارتی بهبود یافته است (۱۵).

خواص عملکردی

بررسی غلظت های $0/4$ تا 1% صمغ ثعلب در فرمولاسیون بستنی مشخص نموده که مخلوط بستنی خاصیت سودوپلاستیک داشته و ویسکوزیته ظاهری با افزایش غلظت صمغ بیشتر می شود (۱۶). غلظت های $0/5$ تا $1/5\%$ صمغ ثعلب در مخلوط بستنی خواص وابسته به زمان ضعیفی ایجاد نموده که با کاهش غلظت صمغ، مقدار آن کمتر شده است. همچنین، رفتار سودوپلاستیک در این مخلوط مشاهده شده است (۱۷). استفاده از صمغ ثعلب پنجه ای در بستنی نرم به مقدار $0/3$ تا $0/5\%$ نشان داده که خواص کیفی بستنی چندان قابل قبول نبوده است (۱۸).

فروغی نیا و همکاران (۱۳۸۶) گزارش کردند که صمغ ثعلب در غلظت $0/4\%$ سبب جلوگیری از جداسازی فازی در دوغ و تشکیل رسوب شده است اما در ترکیب با صمغ های کتیرا و گوار، تأثیر چندان در پایداری سازی نداشته است (۱۹). بررسی اثر افزودن $0/7\%$ صمغ ثعلب بر دسر لبنی حاوی انجیر مشخص نموده که ویسکوزیته و قابلیت نگهداری آب افزایش یافته است (۲۰). قرایی و همکاران (۱۳۹۲) اشاره نمودند که با افزودن $0/5\%$ ثعلب، سفتی و قابلیت جویدن نان بربری بهبود یافته و بیاتی به تعویق افتاده است (۲۱). نتایج یک تحقیق دیگر نشان داد که افزودن 5% صمغ ثعلب، جذب آب و مقاومت به کشش خمیر نان تافتون را افزایش داده در حالی که کشش پذیری را کمتر نموده است. همچنین، سفتی مغز نان کاهش یافته و از سرعت بیاتی نیز کاسته شده است (۲۲).

قابلیت تشکیل فیلم صمغ ثعلب در غلظت $1/5\%$ به همراه گلیسرول در مقایسه با صمغ خرنوب و گوار بررسی شده است. بر اساس نتایج، گزارش شده که محلول فیلم ثعلب خواص ویسکوالاستیک مشابهی با صمغ خرنوب داشته ولی ممانعت کنندگی فیلم ثعلب در مقابل اکسیژن و بخار آب بهتر بوده است. علی رغم حلالیت در آب بالا (93%)، فیلم صمغ ثعلب خواص مکانیکی مناسبی داشته است (۱۱). با بررسی غلظت ۱ تا 3% ثعلب برای تولید فیلم خوراکی مشخص شده که با افزایش غلظت از ۱ به 2% ، مقدار نفوذ پذیری به بخار آب فیلم کاهش داشته و با افزودن گلیسرول و افزایش غلظت صمغ، علیرغم افزایش حلالیت فیلم، قدرت کششی و کشش پذیری فیلم بهبود یافته است (۲۳). همچنین، این محققین گزارش نمودند که حضور اسید



استثنا یک در مقادیر کمتر از ۲۰٪ سبب بهبود خواص ممانعت کنندگی بخار آب و اکسیژن فیلم ثعلب شده است (۲۴). با بررسی فیلم صمغ ثعلب پنجه‌ای حاوی عصاره پونه مشخص شده که فیلم‌ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بوده و می‌توان از آن به عنوان بسته‌بندی فعال استفاده نمود (۱۲). بررسی اثر حذف گروه‌های استیل صمغ ثعلب و وجود گلیسرول بر خواص فیزیکوشیمیایی فیلم آن نشان داده که حذف کامل گروه‌های استیل سبب کاهش حلالیت در آب حتی در حضور گلیسرول می‌شود. مقدار نفوذپذیری به بخار آب فیلم صمغ بدون گروه استیل به مقدار قابل توجهی کاهش نشان داده در حالی که قدرت مکانیکی و مقاومت حرارتی فیلم افزایش یافته است (۲۵).

طبق نتایج یک تحقیق، مشخص شده که صمغ ثعلب در غلظت ۳/۵٪ و pH برابر ۳ بیشترین مقدار پایداری را در سس مایونز کم چرب طی ۱۵ روز نگهداری ایجاد کرده است (۲۶). همچنین، گزارش شده که مؤثرترین پوشش برای کاهش جذب روغن خلال سیب‌زمینی طی سرخ کردن، دارای غلظت ۱/۵٪ ثعلب بوده که حداکثر کاهش جذب روغن (۲۹٪) را ایجاد کرده است (۲۷). همچنین، پوشش‌دهی میگو توسط صمغ ثعلب نیز سبب کاهش جذب روغن طی سرخ کردن شده است (۲۸). اخیراً، گزارش شده که پوشش دادن توت فرنگی توسط صمغ ثعلب سبب بهبود خواص فیزیکوشیمیایی، حسی و میکروبی شده و عمر ماندگاری آن را تا ۲۰ روز افزایش داده است (۲۹).

جمع‌بندی

صمغ ثعلب که از دسته گلوکومانان‌ها می‌باشد، بسته به ترکیب شیمیایی و گونه‌ای که از آن استخراج شده دارای خواص فیزیکوشیمیایی، رئولوژیک و عملکردی متنوعی است. با توجه به استخراج ساده و دارا بودن خواص مناسب در سیستم‌های غذایی و دارویی، توجه زیادی به این هیدروکلوئید در گذشته وجود داشته اما متأسفانه برداشت بی‌رویه و غیر اصولی آن به دلیل قیمت بالا و عدم امکان کشت آن به صورت تجاری سبب کمبود شدید منابع آن شده که به نوبه خود استفاده از آن را محدود نموده است. از طرفی، متغیر بودن ترکیب شیمیایی صمغ در کنار شناخت کم از ساختار آن، سبب شده که این منبع گرانبها کمتر مورد توجه صنایع غذایی قرار بگیرد.

Reference

1. Tamer, C., Karaman, B., Utku Copur, O. (2006). A traditional Turkish beverage: Salep. Food Reviews International, 22, 43-50.
2. Farhoosh, R., & Riazi, A. (2007). A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature. Food Hydrocolloids, 21, 660-666.
3. Tamer, C.E., Omeroglu, P.Y., Utku Copur, O. (2019). Chapter 15: Functional and traditional nonalcoholic beverages in Turkey. In: Non-alcoholic beverages, Grumezescu, A.M., and Holban, A.M., (Eds.). Elsevier, pp. 483-521.
4. Tekinsen, K.K., & Guner, A. (2010). Chemical composition and physicochemical properties of tubera salep produced from some *Orchidaceae* species. Food Chemistry, 121, 468-471.
5. Georgiadis, N., Ritzoulis, C., Charchari, E., Koukiotis, C., Tsiptsias, C., Vasiliadou, C. (2012). Isolation, characterization and emulsion stabilizing properties of polysaccharides from orchid roots (salep). Food Hydrocolloids, 28, 68-74.



6. Kurt, A., & Kahyaoglu, T. (2015). Rheological properties and structural characterization of salep improved by ethanol treatment. *Carbohydrate Polymers*, 133, 654-661.
7. Kurt, A., & Kahyaoglu, T. (2017). Purification of glucomannan from salep: Part 2. Structural characterization. *Carbohydrate Polymers*, 169, 406-416.
8. Kurt, A., & Kahyaoglu, T. (2017). Purification of glucomannan from salep: Part 1. Detailed rheological characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 168, 138-146.
9. Nuerxiati, R., Abuduwaili, A., Mutailifu, P., Wubulikasimu, A., Rustamova, N., Jingxue, C., Aisa, H.A., Yili, A. (2019). Optimization of ultrasonic-assisted extraction, characterization and biological activities of polysaccharides from *Orchis chusua* D. Don (Salep). *International Journal of Biological Macromolecules*, 141, 431-443.
10. Bulut-Solak, B., Alonso-Miravalles, L., O'Mahony, J.A. (2017). Composition, morphology and pasting properties of *Orchis anatolica* tuber gum. *Food Hydrocolloids*, 69, 483-490.
11. Kurt, A., & Kahyaoglu, T. (2014). Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan. *Carbohydrate Polymers*, 104, 50-58.
12. Ekrami, M., Emam-Djomeh, Z., Ghoreishy, S.A., Najari, Z., Shakoury, N. (2019). Characterization of a high-performance edible film based on Salep mucilage functionalized with pennyroyal (*Mentha pulegium*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 529-537.
13. Razavi, S.M.A., & Karazhiyan, H. (2009). Flow properties and thixotropy of selected hydrocolloids: Experimental and modeling studies. *Food Hydrocolloids*, 23, 908-912.
14. Vahid, S., Hossein, J., Mohammad, S.Y. (2011). A comparison of various models for obtaining the intrinsic viscosity of salep gum and sweeteners mixture in dilute solutions. *International Food Research Journal*, 18(4), 1457-1462.
15. Kurt, A., & Kahyaoglu, T. (2017). Gelation and structural characteristics of deacetylated salep glucomannan. *Food Hydrocolloids*, 69, 255-263.
16. Kaya, S., & Tekin, A.R. (2001). The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix. *Journal of Food Engineering*, 47, 59-62.
17. Kus, S., Altan, A., Kaya, A. (2005). Rheological behavior and time-dependent characterization of ice cream mix with different salep content. *Journal of Texture Studies*, 36, 273-288.
18. Bahramparvar, M., Haddad Khodaparast, M.H., Razavi, S.M.A., (2009). The effect of *Lallemantia royleana* (Balangu) seed, palmate-tuber salep and carboxymethylcellulose gums on the physicochemical and sensory properties of typical soft ice cream. *International Journal of Dairy Technology*, 62(4), 571-576.
۱۹. فروغی‌نیا، س؛ عباسی، س؛ حمیدی اصفهانی، ز؛ ۱۳۸۶. تأثیر افزودن تکی و ترکیبی صمغ های کتیرا، ثعلب و گوار در پایداری سازی دوغ. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال دوم، شماره ۲، ۱۵-۲۵.
20. Ayar, A., Sert, D., Akbulut, M. (2009). Effect of salep as a hydrocolloid on storage stability of 'Incir Uyutması' dessert. *Food Hydrocolloids*, 23, 62-71.
۲۱. قرایی، ز؛ عزیزی، م.ح؛ برزگر، م؛ حسینی پنجکی، س.م؛ ۱۳۹۲. بررسی ویژگی های رئولوژیکی و حسی نان بربری تولید شده از خمیر منجمد حاوی صمغ های کتیرا و ثعلب. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال هشتم، شماره ۳، ۱۳۷-۱۴۴.
22. Sahari, M.A., Mohammadi, R., Hamidi Esfahani, Z. (2014). Rheological and quality characteristics of Taftoon bread as affected by salep and persian gums. *International Journal of Food Science*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/813286>.

29. **Emamifar, A., Ghaderi, Z., Ghaderi, N. (2019).** Effect of salep-based edible coating enriched with grape seed extract on postharvest shelf life of fresh strawberries. *Journal of Food Safety*, <https://doi.org/10.1111/jfs.12710>.



A review on physicochemical and functional properties of salep gum

Asaad Mohammad Amini*

Assistant Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture,
University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

E-mail: a.mohammadamini@uok.ac.ir

۱۷

Abstract

Salep gum belongs to glucomannans which exists in the lumps of salep from *Orchidacea* family. Salep gum exhibit thickening, emulsifying, coating, and film forming characteristics with diverse applications in food and pharmaceuticals. Due to the importance of this endemic gum, some structural, rheological, and functional properties of salep gum extracted from different genera of Orchids which have been investigated and published to date, are summarized in this paper.

Keywords: Film, Glucomannan, Rheological properties, Starch

پتانسیل های برخی از ارکیدهای ایران برای باغبانی زینتی

همایون فرهمند^{۱*}، فرزاد نظری^۲

۱- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، سنندج، ایران

Email: homayoun.farahmand@gmail.com

چکیده

ارکیدها به دلیل عمر طولانی گل‌ها، تنوع رنگ و برخی از دیگر ویژگی های زیباشناختی، از گل های محبوب گلدانی یا بریدنی در بازار جهانی گیاهان زینتی می باشند. افزون بر کاربرد زینتی ارکیدها، برخی از جنس ها و گونه های وحشی آنها کاربردهای دارویی و غذایی دارند. تیره ارکیدسانان در ایران دارای ۴۶ گونه و زیرگونه در ۱۷ تا ۱۸ جنس است. جنس های *Cephalanthera*, *Ophrys*, *Orchis*, *Dactylorhiza* و *Epipactis* از مهمترین جنس های ارکید (ثعلب) در ایران هستند. بر اساس ویژگی های ظاهری، به نظر می رسد برخی از گونه های بومی ارکید مانند *Dactylorhiza umbrosa*, *Comperia comperiana*, *Orchis coriophora* (*Anacamptis coriophora*), *Limodorum abortivum*, *Himantoglossum affine* و *Ophrys sphegodes* دارای پتانسیل زینتی برای باغبانی زینتی از جمله فضای سبز می باشند. گونه های یاد شده و شمار دیگری از ارکیدهای ایران برای اهدافی مانند سبدهای آویز و گیاه گلدانی نیز سودمند می باشند. چشم اندازهای طبیعی ارکیدها نیز از دیدگاه اکوتوریسم و گردشگری مهم است. تغییرات آب و هوایی، خشکسالی، چرای بی رویه، آتش سوزی، عدم حفاظت موثر و به ویژه برداشت غیر قانونی و قاچاق غده ها، از عوامل تهدید کننده ارکیدهای رویشگاه های ایران هستند. بنابراین، حفظ رویشگاه ها و جلوگیری از برداشت غیر قانونی به ویژه در مورد گونه های در معرض انقراض باید در اولویت قرار گیرد. در گام های بعدی، روش های افزایش آنها با تاکید بر ریزافزایی باید بهینه سازی شود و سرانجام ویژگی های زینتی و دارویی آنها برای امکان اهلی سازی و کاربردهای گوناگون باغبانی، ارزیابی شود.

کلمات کلیدی: ارکید (سالمه)، فضای سبز، اکوتوریسم

معرفی تیره ارکیدسانان

تیره ارکیدسانان^۱، یکی از بزرگ ترین و متنوع ترین تیره های گیاهی دولپه ای، دارای ۷۶۳ جنس و بیش از ۲۸۰۰۰ گونه است که در رویشگاه های گوناگونی از مناطق گرمسیری تا کوهستانی مرتفع، دیده می شوند و تنها در مناطق قطبی و بیابان ها نمی رویند. گیاهان تیره ارکیدسانان از دیدگاه زینتی، دارویی، صنعتی، نوشابه ای و صنایع عطر، آرایشی و بهداشتی اهمیت فراوانی دارند (۱، ۸، ۱۳، ۱۷ و ۱۸). یکی از مهمترین ارکیدهای گلدانی *Phalaenopsis* می باشد و از ارکید های بریدنی *Dendrobium*, *Cymbidium* و *Oncidium* و *Vanda* را می توان نام برد. گیاهان تیره ارکیدسانان بیش از هر گروه گیاهی دیگر مد نظر دانشمندان و طبیعت دوستان است (۲۰).

اهمیت و ارزش ارکیدها

¹ Orchidaceae

ارکیدها به دلیل تنوع رنگ، اندازه، شکل، بافت و عطر گل، بیشتر از دیدگاه زینتی مورد توجه هستند و بخشی چشمگیر از صنعت گلکاری را به خود اختصاص می دهند، به طوری که تخمین زده می شود که نزدیک به ۱۰ درصد تجارت گل های بریده را تشکیل می دهند. ارکیدها به صورت گلدانی، سبد آویز و به ویژه به دلیل عمر گلجایی طولانی، برای گل بریده بسیار ارزشمند هستند (۱۴ و ۱۹). برای نمونه، عمر گلجایی در ارقام مختلف جنس *Cymbidium*، از ۲۲ روز تا ۵۳ روز متفاوت است. بیش از ۱۰۰۰۰۰ دورگه از ارکید به شیوه های بهنژادی تولید شده اند که ارزش بسیار فراوانی از دیدگاه باغبانی دارند (۲).

دوسوم ارکیدهای جهان اپی فیت^۱ و سنگ زی^۲ هستند و بقیه خاکزی^۳ می باشند (۲۲). ارکیدهای غده ای زمین زی یا خاکزی، به دلیل ویژگی های دارویی، از گذشته های بسیار دور برای درمان بیماری های گوناگونی به کار رفته اند و همچنین به عنوان مکمل های غذایی نیز در بسیاری از مناطق جهان مورد استفاده بوده و در سال های گذشته تجارت قاچاق آنها افزایش یافته است (۳ و ۱۱). برای نمونه، در تانزانیا، زامبیا و مالاوی، غده های ارکیدها برای تهیه خوراکی به نام Chikanda مصرف می شود. در شرق مدیترانه (به ویژه ترکیه)، غده های خشک شده ارکیدها با نام Salep شناخته می شود و این پودر برای تهیه بستنی، شیرینی و نوشابه ها استفاده می شود. در حال حاضر نیز کشور اصلی مصرف کننده Salep، ترکیه است که بیش از ۹۰٪ ارکیدهای غده ای در ترکیه برای تهیه همین پودر برداشت می شوند. تخمین زده می شود که برای تهیه ۳۰ تن Salep، نیاز به از بین بردن ۴۰ تا ۵۰ میلیون ارکید است (۳ و ۱۱).

ارکیدهای ایران

تیره ارکیدسانان در ایران دارای ۴۶ گونه و زیرگونه است که ۶۵٪ آنها تولید غده می کنند که برای تهیه Salep مناسب هستند. ارکیدهای ایران در رویشگاه های گوناگونی از جنگل های هیرکانی و جنگل های بلوط تا علف زارهای آلپاین مرطوب دیده می شوند که به طور عمده در طول سلسله کوه های البرز و در شمال و کوه های زاگرس در غرب پراکندگی دارند (۱۱، ۱۵ و ۲۱). ارکیدهای ایران بیشتر در مناطق شمالی و غربی کشور و به ویژه در نواحی غربی پراکنده هستند. برخی از گونه ها و جنس های تیره ارکیدسانان در ایران انحصاری محسوب می شوند. ارکیدهای ایران افزون بر ارزش زیبایی شناختی و دارویی، از دیدگاه اکوتوریزم نیز ارزش فراوانی دارند.

بسیاری از گیاهان سوخوار (پیازی) ایران به دلیل چرای بی رویه و نامناسب، خشکسالی های پی در پی، برداشت غیر قانونی و قاچاق، فعالیت های معدنی در جنگل ها و مراتع و نیز عدم برخورد جدی سازمان ها و ارگان های مربوطه، در معرض تهدید و برخی از آنها در معرض خطر انقراض می باشند (۵). جنس ها و گونه های ارکید نیز از جمله گیاهان زمین رستی^۴ هستند که در معرض فرسایش ژنتیکی و خطر انقراض قرار دارند. با توجه به این که دامنه پراکنش و سطح رویشگاه های جنس ها و گونه های ارکیدهای ایران محدود بوده و بیشتر به مناطق ویژه ای در غرب و شمال کشور محدود می شوند، حفاظت بیشتری نیاز دارند و باید به طور جدی مورد توجه و حمایت دولتی و مردمی قرار گیرند. در بیشتر مناطق رویشگاهی ارکیدها به ویژه

¹ Epiphytes

² Lithophytes

³ Terrestrial

⁴ Geophyte

غرب کشور، وضعیت اقتصادی مناسب نیست و به دلیل نبود شرایط اشتغال پایدار، افراد گرایش به درآمدزایی به شیوه قاچاق پیدا می کنند که فروش غیر قانونی غده های ارکید، یکی از همین موارد قاچاق است. بنابراین، باید در این زمینه نیز راهکارهایی در نظر گرفته شود تا زمینه برای اشتغال افراد فراهم گردد و گونه های گیاهی نیز از دستبرد و قاچاق در امان باشند.

اگرچه برداشت و فروش غده های ارکید در ایران بدون مجوز غیرقانونی است و ایران نیز از امضاکنندگان کنوانسیون تجارت بین المللی گونه های در معرض خطر انقراض^۱ است، اما متأسفانه به دلیل شرایط بسیار بد اقتصادی و عدم اشتغال در سال های اخیر و نبود درآمد پایدار، غده های ارکید از ایران به صورت قاچاق به کشورهای مانند ترکیه، پاکستان و هند توسط برخی از افراد فروخته می شود. مرکز اصلی فروش این غده ها کشور ترکیه است که برای استفاده در بستنی، شیرینی و نوشیدنی ها به کار می روند (۱۰ و ۱۱).

تخمین زده می شود که سالانه بین ۵/۵ تا ۱/۶ تن غده ارکید از ایران به ترکیه صادر می شود (۳). همچنین، گزارش شده است که در سال ۲۰۱۳، بین ۷ تا ۱۱ میلیون غده ارکید از استان های گلستان و آذربایجان برداشت شده است. بیش از ۱۹ گونه و زیرگونه مورد برداشت قرار گرفته که در لیست کنوانسیون تجارت بین المللی گونه های در معرض خطر انقراض قرار دارند و بسیاری از آنها در معرض خطر هستند و در برخی از مناطق منقرض شده اند (۱۱). برداشت غده های ارکیدها در غرب ایران یک خطر جدی است و باید همه روش های پیشگیرانه و محافظتی برای جلوگیری از برداشت غیر قانونی انجام شود (۹ و ۱۱).

مطالعات میدانی و آزمایشگاهی کاملی روی تیره ارکیدسانان در ایران انجام نشده است و اطلاعات چندانی در مورد شرایط اکولوژیک و پتانسیل استفاده پایدار از آنها در دسترس نیست (۱۱). جوانه زنی بذر در برخی از گونه های ارکید بسیار پیچیده است و گرده افشانی در آنها توسط حشرات گرده افشان ویژه انجام می شود (۱۱ و ۲۰). برای نمونه، در جنس *Ophrys*، شرایط پیچیده تر نیز هست و گرده افشانی به شدت وابسته به گرده افشان ها و جوانه زدن بذر وابسته به قارچ های میکوریز است. بنابر این، هرگونه دخالت در رویشگاه ها و به هم خوردن این روابط بین ارکیدها و گرده افشان ها و میکوریز، سبب کاهش توان تکثیر و افزایش احتمال نابودی این گیاهان می شود (۱۱).

ارکیدهای ایران که برخی از آنها انحصاری نیز می باشند، ارزش فراوانی از دیدگاه اکولوژیک، باغبانی و صنعت گردشگری دارند. برخی از جنس ها و گونه ها از دیدگاه زیباشناختی اهمیت فراوانی دارند و همچنین به عنوان ژرم پلاسما برای اهداف بهنژادی و نیز تجاری سازی منابع گیاهی، بسیار ارزشمندی می باشند.

ایجاد کلکسیون ارکیدهای ایران در شمال یا غرب کشور و ترجیحاً در غرب کشور که شمار بیشتری از ارکیدها دیده می شوند، می تواند از جنبه حفظ ذخایر ژرم پلاسما، آموزشی، پژوهشی و نیز اکوتوریزم ارزشمند باشد. اگرچه ممکن است همه جنس ها و گونه های ارکیدهای ایران از دیدگاه زینتی مد نظر نباشند و در مقایسه با برخی از ارکیدهای مشهور دنیا مانند *Phalaenopsis*، *Cymbidium* و *Cattleya*، از ارزش زیباشناختی کمتری برخوردار باشند، اما از نظر داشتن برخی از ژن های متحمل به تنش های زیستی و غیر زیستی اهمیت فراوانی دارند و می توانند در برنامه های بهنژادی و مهندسی ژنتیک استفاده شوند.

¹ Convention of International Trade in Endangered Species (CITES)

برخی از گونه‌های بومی ارکید مانند *Comperia comperiana*, *Dactylorhiza umbrosa*, *Orchis coriophora* (*Anacamptis coriophora*), *Limodorum abortivum*, *Himantoglossum affine* و *Ophrys sphegodes* دارای پتانسیل زینتی برای کشت در فضای سبز می باشند.

برای حفاظت مؤثر ارکیدها و جلوگیری از نابودی آنها، لازم است یک سری پژوهش‌های پایه‌ای به ویژه در زمینه فنولوژی و تنوع ژنتیکی و نیز روش‌های تکثیر آنها انجام شود (۶). خوشبختانه در سال‌های اخیر پژوهش‌های خوبی روی ارکیدهای ایران انجام شده است. بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جنس‌های ارکید غرب کشور با کاربرد نشانگرهای مولکولی و نیز ویژگی‌های بذرها و جوانه زنی آنها، از موضوعاتی بوده است که در برخی از دانشگاه‌های کشور و به ویژه دانشگاه کردستان و با همکاری برخی از پژوهشگران خارجی انجام شده است (۴، ۷، ۸، ۱۱، ۱۲ و ۲۳). انجام این پژوهش‌ها و تکمیل اطلاعات پایه‌ای مورد نیاز، زمینه را برای استفاده تجاری و پایدار از ارکیدهای ایران فراهم می‌کند.

برگزاری "اولین کنفرانس بین المللی ارکیدهای دارویی و زینتی" در تاریخ ۲۶ و ۲۷ خرداد سال جاری در دانشگاه کردستان نیز فرصت بسیار مناسبی برای همه افراد علاقه مند (به ویژه پژوهشگران دانشگاهی و غیر دانشگاهی) به ارکیدهای ایران است تا با بحث و تبادل نظر بتوانند اولویت‌های پژوهشی و برنامه‌های حفاظتی را برای ارکیدهای کشور، تعیین کنند.

راهکارهای پیشنهادی برای حفظ و گسترش ارکیدهای ایران

- ۱- درگیری مسئولانه تر وزارتخانه‌های محیط زیست، میراث طبیعی و گردشگری و سازمان جنگل‌ها و مراتع و تلاش برای تصویب قوانین بسیار سختگیرانه و جریمه‌های سنگین برای قاچاقچیان مواد گیاهی.
- ۲- درگیری مسئولانه‌تر وزارت دادگستری و پیگیری پرونده‌های افراد متهم به برداشت و فروش غیرقانونی مواد گیاهی از جمله غده ارکیدها.
- ۳- ایجاد یک کلکسیون در غرب کشور برای جمع‌آوری ارکیدها و نگهداری آنها در شرایط مناسب.
- ۴- بررسی روش‌های سنتی افزایش ارکیدها و بهینه کردن روش‌های جنسی و رویشی و نیز روش‌های درون شیشه‌ای به ویژه در مورد گونه‌هایی که در معرض انقراض هستند. بررسی جوانه زنی بذر ارکیدها به روش درون شیشه‌ای.
- ۵- مطالعه رویشگاهی ارکیدهای ایران و شناسایی روابط همزیستی آنها (به ویژه قارچ‌های همزیست با آنها) برای برنامه‌های اهلی‌سازی و تجاری‌سازی.
- ۵- کاربرد روش‌های زیست فناوری برای تکمیل مطالعات رویشگاهی و پایه‌ای اولیه.
- ۶- انجام پژوهش‌های لازم در دانشگاه‌ها و مراکز پژوهشی در زمینه‌های گوناگون مانند مطالعات فنولوژی، بهنژادی، انتقال ژن، و... برای ایجاد بانک اطلاعاتی در این زمینه.
- ۷- بررسی شرایط کشت برخی از گونه‌هایی که دارای جمعیت بزرگ تری هستند و تولید غده در آنها می‌تواند برای بومیان، درآمد ایجاد کند.
- ۸- استفاده کامل از پوشش رسانه‌ای (دیداری، شنیداری و نوشتاری - هم حقیقی و هم مجازی) برای افزایش آگاهی مردم و فرهنگ‌سازی در زمینه ارزش گونه‌های بومی ارکید و امکان انقراض کامل آنها.



References

1. **Bozyl, M. E. & Bozyl E. M. (2020).** Ethnomedicinal uses of Orchidaceae Taxa in Turkish traditional medicine. *International Research Journal of Biological Sciences*, 9: 52-63.
2. **Cardoso, J. C., Zanello C. A., Chen J. T. (2020).** An overview of orchid protocorm-like bodies: mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 985; doi:10.3390/ijms21030985.
3. **De Boer, H.J., Ghorbani, A., Manzanilla, V., Raclariu, A.C., Kreziou, A., Ounjai, S., Osathanunkul, M., Gravendeel, B. (2017).** DNA metabarcoding of orchid-derived products reveals widespread illegal orchid trade. *Proc. R. Soc. B* 284: 20171182.
4. **Dianati Daylami, S., Kafi, M., Salami, S.A. (2016).** Improvement of asymbiotic germination of *Epipactis veratrifolia*. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 48:73-83.
5. **Farahmand, H. & Nazari, F. (2015).** Environmental and Anthropogenic pressures on geophytes of Iran and the possible protection strategies: a review. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 2:111-132.
6. **Fay, M. F. (2018).** Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Botanical studies*, 59:16.
7. **Gholami, S., Vafae, Y., Nazari, F., Ghorbani, A. (2020).** Molecular characterization of endangered Iranian terrestrial orchids using ISSR markers and association with floral and tuber-related phenotypic traits. *Physiol. Mol. Biol. Plants*.
8. **Gholami, S., Vafae, Y., Nazari, F., Ghorbani, A. (2021).** Exploring genetic variations in threatened medicinal orchids using start codon targeted (SCoT) polymorphism and marker association with seed morphometric traits. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, <https://doi.org/10.1007/s12298-021-00978-4>
9. **Ghorbani, A., Gravendeel, B., Naghibi F., de Boer, H. (2014a).** Wild orchid tuber collection in Iran: a wake-up call for conservation. *Biodiversity and Conservation*, 23:2749–2760.
10. **Ghorbani, A., Gravendeel, B., Selliah, S., Zarre, S., de Boer, H. (2017).** DNA barcoding of tuberous Orchidoideae: a resource for identification of orchids used in Salep. *Molecular Ecology Resources*, 17, 342–352.
11. **Ghorbani, A., Gravendeel, B., Zarre, S., de Boer, H. (2014b).** Illegal wild collection and international trade of CITES-listed territorial orchid tubers in Iran. *TRAFIC Bulletin*, 26:52-58.
12. **Kaki, A., Vafae, Y., Khadivi, A. (2020).** Genetic variation of *Anacamptis coriophora*, *Dactylorhiza umbrosa*, *Himantoglossum affine*, *Orchis mascula*, and *Ophrys schulzei* in the western parts of Iran. *Industrial Crops & Products*, 156 (2020) 112854.
13. **Kasulo, V., Mwabumba, L., Cry, M. (2009).** A review of edible orchids in Malawi. *Journal of Horticulture and Forestry*, 1: 133-139.
14. **Khuraijam, J. S., Sharma, S. C., Roy R. K. (2017).** Orchids: potential ornamental crop in North India. *International Journal of Horticultural & Crop Science Research*, 7:1-8.
15. **Kreutz, K., & Spencer, J., (2011).** In the footsteps of Renz: orchids. *Iran J. Hardy Orchid Soc.* 8: 12–24.
16. **Lepcha, A., Khade, S.D., Roy, T. (2020).** Economics of Flower Cultivation with Special Reference to Orchid in Hilly Areas of West Bengal. *Economic Affairs*, Vol. 65, No. 3, pp. 395-400.
17. **Pant, B. (2013).** Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. *African Journal of Plant Science*, 7: 448-467.
18. **Pinheiro, L.R., Carregosa Rabbani, A. R., Cruz da Silva, A.V., da Silva Ledo, A., Garcia Pereira, K. L., Cardamone Diniz, L. E. (2012).** Genetic diversity and



- population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. Plant Systematics and Evolution, 298, pages 1815–1825.
19. **Ramya, M., Jang, S., An, H. R., Lee, S.Y., Park, P. H. (2020).** Volatile organic compounds from orchids: from synthesis and function to gene regulation. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 1160.
 20. **Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersakova, J. Tesitelova, T. (2015).** Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. Annals of Botany, 116: 391–402.
 21. **Renz, J. (1978).** Flora Iranica. Part 126: orchidaceae. Naturhistorisches Museum, Vienna.
 22. **Swarts, N. D., & Dixon K. W. (2009).** Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. Annals of Botany 104: 543–556.
 23. **Vafae, Y., Mohammadia, G., Nazaria, F., Fatahia, M., Kakia, A., Gholamia, S., Ghorbanic, A., Khadivi, A. (2021).** Phenotypic characterization and seed-micromorphology diversity of the threatened terrestrial orchids: implications for conservation. South African Journal of Botany 137: 386-398.
 24. **Youssef, S., Galalaey, A., Mahmood, A., Mahdi H., Vela, E. (2019).** Wild orchids of the Kurdistan Region areas: a scientific window on the unexpected nature of the North-Wester Zagros. HAL- 02048904.



The Potentials of some Iranian Orchids for Ornamental Horticulture

Homayoun Farahmand^{1*}, Farzad Nazari²

¹ Associate Professor, Department of Horticulture Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

² Assistant Professor, Department of Horticulture Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Email: homayoun.farahmand@gmail.com

۲۴

Abstract

Due to flower longevity, diversity and some other aesthetic features, orchids are among popular pot and cut plants in the world market of ornamental plants. One of the most famous pot orchids is *Phalaenopsis* and some cut orchids could be listed as *Vanda*, *Oncidium*, *Dendrobium* and *Cymbidium*. In addition to ornamental use, some genera and species of orchids have valuable medicinal and nutritional properties. The orchidaceae family in Iran includes 46 species and subspecies in 17-18 genera. *Dactylorhiza*, *Orchis*, *Ophrys*, *Cephalanthera* and *Epipactis* are the most important orchids in Iran. Based on visual characteristics, it appears that some orchids such as *Dactylorhiza umbrosa*, *Comperia comperiana*, *Himantoglossum affine*, *Limodorum abortivum*, *Orchis coriophora* (*Anacamptis coriophora*) and *Ophrys sphegodes* are suitable for landscape use. These orchids and some other ones are also candidates for hanging baskets and potted plants, as well. The natural landscapes of orchids are also important from ecotourism perspective. Climate change, droughts, heavy grazing, fire, lack of efficient conservation and particularly illegal tuber harvesting, are the main factors threatening orchids naturally grown in Iranian habitats. The protection of natural habitats and prevention of illegal tuber harvesting, should take first priority especially for more endangered species. Propagation methods with particularly micropropagation should also be optimized as the next step and finally their aesthetic and medicinal values must be evaluated for domestication possibility and horticultural diverse goals.

Keywords: Iran, Ornamental horticulture, Orchids (salmeh)



مروری بر کاربرد برخی فناوری‌ها در پس از برداشت ارکیده دندروبیوم

مهسا آقاجانیپور^۱، مهدی رضایی^{۱*}

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

Email: Rezaei.mahdi@ut.ac.ir

۲۵

چکیده

صادرات در مسیرهای طولانی باعث کاهش کیفیت گل‌های شاخه بریده به دلیل صرف زمان زیاد برای انتقال آن‌ها می‌گردد، عمر پس از برداشت بالا در گلهای شاخه بریده رضایت مشتری را در پی دارد. حساسیت به اتیلن در دندروبیوم‌های شاخه بریده از برخی جنس‌های ارکیده کمتر است و به عنوان عامل محدود کننده در پس از برداشت آن شناخته نمی‌شود. در این مطالعه ما برخی از فناوری‌های مورد استفاده در پس از برداشت ارکیده دندروبیوم را مانند اتمسفر کنترل شده مورد بررسی قرار دادیم و در انتها چشم اندازی از کاربرد این فناوری‌ها در آینده ارائه می‌کنیم.

کلمات کلیدی: اتمسفر کنترل شده، ارکیده دندروبیوم، پس از برداشت، نانو فناوری

مقدمه

ارکیده‌ها یکی از بزرگترین گیاهان گلدار در قلمرو گیاهان هستند و بین ۲۰۰۰۰ تا ۳۵۰۰۰۰ گونه دارند، در ۵ زیر خانواده تقسیم بندی می‌شوند و تاکنون در این ۵ زیر خانواده به ترتیب ۱۶ گونه در زیر خانواده *Apostasioideae*، ۱۵۵ گونه در زیر خانواده *Cypripedioideae*، ۲۴۹ گونه در زیر خانواده *Vanilloideae*، ۴۷۰۴ گونه در زیر خانواده *Orchidoideae*، ۱۹۷۸۵ گونه نیز در زیر خانواده *Epidendroideae* و در مجموع ۲۴۹۱۰ زیر خانواده شناخته شده است (۴). جنس‌های زیر از لحاظ تجاری از اهمیت بسیار زیادی برخوردار هستند و معمولاً توسط دمای پایین و فتوپریود کوتاه به گلدهی تحریک می‌شوند و این جنس‌ها شامل: کاتلیا، سیمبیدیوم، دندروبیوم، میلونیوپسیس، فالانوپسیس و زیگوپتالوم هستند و اطلاعات مربوط به رشد رویشی و القا گلدهی در آن‌ها به صورت خلاصه در جدول ۱ آورده شده است. دندروبیوم (شکل ۱) یک ارکیده سیمپودیال با تنوع بسیار زیاد در شکل، اندازه، ساقه، برگ و زیستگاه است و بیش از ۱۰۰۰ گونه از این جنس در سراسر جهان پراکنده شده است (۱۵). صادرات گل‌های شاخه بریده حمل و نقل از راه دور را در پی دارد و با افزایش فاصله و زمان حمل و نقل، کیفیت گل‌های شاخه بریده کاهش می‌یابد و این نقش برجسته مطالعات پس از برداشت را نشان می‌دهد، پس از برداشت در ارکیده‌های شاخه بریده مانند سایر گیاهان به عوامل مختلفی بستگی دارد به طور معمول عمر پس از برداشت در جنس‌های مختلف ارکیده متفاوت است، در هیبریدهای سیمبیدیوم ۲۰ تا ۵۵ روز، هیبریدهای کاتلیا ۱۰ تا ۲۰ روز، هیبریدهای فالانوپسیس ۲۵ تا ۳۰ روز و در هیبریدهای دندروبیوم ۱۴ تا ۲۱ روز می‌باشد، ارکیده دندروبیوم معمولاً وقتی که تمامی گل‌های آن به جز جوانه انتهایی باز شود برداشت می‌شود. شاخص برداشت در ارکیده فالانوپسیس باز شدن کامل گل‌ها است و در سایر جنس‌ها هم متفاوت می‌باشد، یک شاخه بریده ارکیده مطلوب باید حداقل ۸ شکوفه استاندارد در هر شاخه، دوسوم شاخه از گل پوشیده، گل‌ها دارای بافت محکم و رنگ براق، حداقل قطر پایه شاخه ۱۰ میلتر، ساقه محکم و گل‌های یکنواختی

داشته باشد (۶). ارکیده دندروبیوم نسبت به فالانوپسیس و وندا حساسیت کمتری به اتیلن دارد (۵). فاکتورهای اثر گذار بر عمر پس از برداشت به سه دسته قبل از برداشت (ژنتیک، محیطی (دما، نور، رطوبت)، فصل، کربن دی اکسید، حشرات و مرحله بلوغ) برداشت (زمان، روش برداشت، سطح برداشت) و پس از برداشت (دما، رطوبت و روابط آبی) تقسیم بندی می شود (۷).

جدول ۱. دما و فتوپریود مربوط به دوره رشد رویشی و گلدهی در برخی از جنس های ارکیده (۱۰)

جنس	رشد رویشی		القا گلدهی	
	دما	فتوپریود ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	بیشترین شدت نور	دما
کاتلیا	۲۷-۳۲ روز ۲۴-۲۹ شب	روز کوتاه	۳۰۰-۶۰۰	۱۲-۱۶
سیمبیدیوم	۲۵-۳۰	بی تفاوت	۳۶۰-۶۰۰	۲۰-۲۶ روز ۱۰-۱۴ شب
دندروبیوم	۲۴-۳۰	بی پاسخ	۴۸۰-۷۲۰	۱۰-۱۳
دندروبیوم - فالانوپسیس	۲۴-۳۰	بی پاسخ	۴۸۰-۷۲۰	۱۸
میلوتنوپسیس	۲۰-۲۳	روز بلند	۱۵۰-۳۰۰	۱۱-۱۴
فالانوپسیس	۲۷-۳۰	بی تفاوت	۲۴۰-۴۰۰	۱۱-۱۴
زیگوپتالوم	۲۲-۲۶	روز بلند	۳۰۰-۵۰۰	۱۱-۱۴



شکل ۱. هیبرید *Dendrobium cruentum*

تأثیر اتمسفر کنترل شده بر روی عمر پس از برداشت ارکیده دندروبیوم

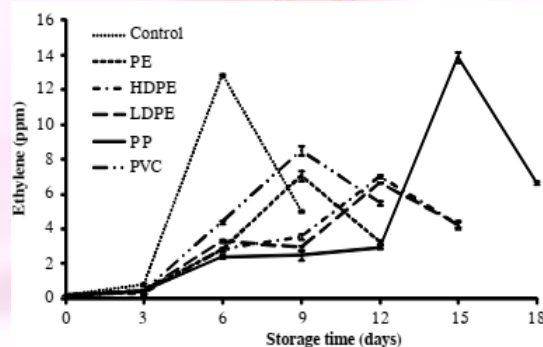
اتمسفر کنترل شده همراه با فیلم های بسته بندی با توجه به انتخابی بودن این فیلم ها اثرات مطلوبی را بر پس از برداشت محصولات باغبانی دارد در مطالعه بیم یونگ و همکاران اثر اتمسفر کنترل شده در

فیلم‌های PE^1 ، $HDPE^2$ ، $LHPE^3$ ، PVC^4 ، PP^5 را بر روی کیفیت و عمر شاخه بریده دندروبیوم ارزیابی شد در این آزمایش ارکیدها در جعبه مقوایی با فیلم‌های مورد نظر بسته بندی شدند و در دمای ۱۳ درجه و رطوبت نسبی ۹۵٪ قرار گرفتند. همه فیلم‌ها باعث کاهش از دست دادن وزن، میزان تنفس، تولید اتیلن و محتوای آنتوسیانین گل ارکیده شدند و در کل بهترین فیلم، پلی پروپیلن با عمر ۱۸ روز در مقابل شاهد با عمر ۸ روز بود (شکل ۲). بیشترین کاهش وزن مربوط به شاهد (بدون اتمسفر کنترل شده) و کمترین مربوط به فیلم PP بود و در مورد نرخ تنفس باید گفت که تفاوت زیادی دیده نشد اما در مورد تولید اتیلن در روز ۱۵ ام بیشترین تولید اتیلن مربوط به فیلم PP و کمترین مربوط به فیلم $LDPE$ بود و همچنین در روز ۱۵ ام بیشترین غلظت دی اکسید کربن مربوط به فیلم PP بود، خاصیت نیمه نفوذپذیر بودن این غشاهای باعث عمل انتخابی شده و اکسیژن کاهش و دی اکسید کربن افزایش می‌یابد و این می‌تواند اتیلن را کاهش دهد (شکل ۳) اما با توجه به افزایش اتیلن در فیلم PP و سالم ماندن گل‌ها می‌توان نتیجه گرفت که دندروبیوم به اتیلن حساسیت ندارد (۱۸). بسته بندی با فیلم‌ها باعث کاهش اکسیژن و افزایش دی اکسید کربن می‌شود و می‌توان حتی این اتمسفر را از ابتدا تنظیم کرد، تیمار دمای پایین همراه با اتمسفر کنترل شده به صورت معمول برای افزایش عمر پس از برداشت گل‌های شاخه بریده مورد استفاده قرار می‌گیرد کاربرد دی اکسید کربن بالا و اکسیژن پایین می‌تواند عمر شاخه بریده دندروبیوم را افزایش دهد و همچنین یکسری تغییرات بیوشیمیایی را ایجاد می‌کند، در تحقیقات پونسری در سال ۲۰۲۱ استفاده از این تیمار و قرار دادن شاخه بریده‌های دندروبیوم در دمای ۱۳ درجه و رطوبت نسبی ۹۵٪ نتایج زیر حاصل شد، در اتمسفر با ۵٪ دی اکسید کربن و ۲٪ اکسیژن بیشترین عمر شاخه بریده حدود ۲۸.۳۳ روز در مقابل شاهد ۱۱.۶۷ روز بود و همچنین به حفظ محتوای آنتوسیانین کل کمک می‌کند در حالی که کاهش وزن تازه، میزان تنفس، تولید اتیلن، تخریب پروتئین و فعالیت پروتئاز را کاهش می‌دهد، در شکل ۴ می‌توان تفاوت این تیمار با شاهد را به وضوح دید (۱۳).



شکل ۲. اثر بسته بندی با اتمسفر کنترل شده.

- ^۱ پلی اتیلن
- ^۲ پلی اتیلن نازک
- ^۳ پلی اتیلن ضخیم
- ^۴ پلی ونیل کلراید
- ^۵ پلی پروپیلن



شکل ۳. تولید اتیلن در فیلم‌های مختلف گل شاخه بریده دندروبیوم در روز ۱۵ ام.

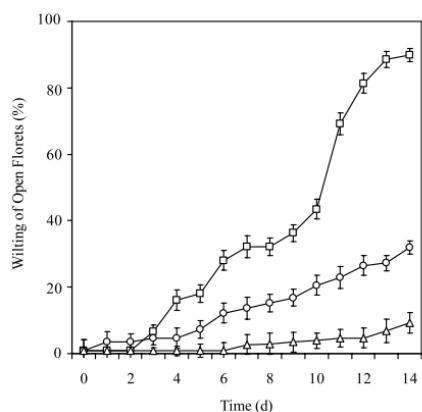


شکل ۴. سمت راست تیمار دی اکسید کربن ۵٪ و اکسیژن ۲٪ و سمت چپ بدون تیمار (شاهد) در روز ۲۵ ام.

اثر تیمار مواد شیمیایی در پس از برداشت ارکیده دندروبیوم

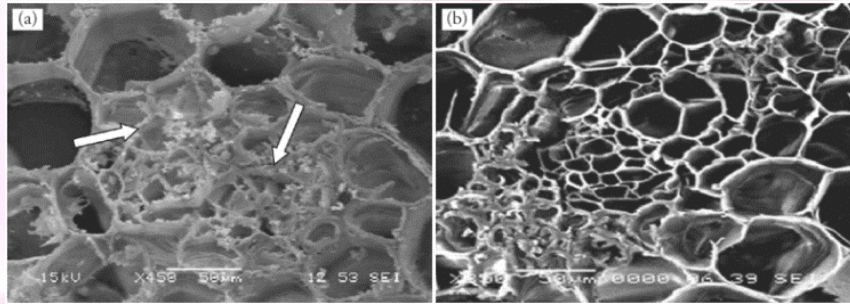
تیمار کیتوزان بر جنس دندروبیوم توانست باعث افزایش باز شدن گلچه‌ها و طول گل آذین شود اما تاثیری بر روی عمر شاخه بریده نداشت (۱۷). در آزمایشی کاربرد ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۸-هیدروکسی کوئینولین سیترات و سوکروز ۳٪ بهترین تیمار برای حفظ جذب آب، وزن تر و درصد زیاد جوانه باز شده در هر شاخه بود (۳). محققین اثر نیترات نقره را بر روی عمر پس از برداشت ارکیده دندروبیوم گونه *Popaduor* بررسی کردند و متوجه شدند که محلول پاشی نیترات نقره قبل از برداشت اثری بر افزایش عمر شاخه بریده ندارد و نیترات نقره نمی‌تواند از سنتز اتیلن جلوگیری کند البته استفاده از نیترات نقره از تئو سولفات نقره بهتر می‌تواند عمر شاخه بریده دندروبیوم را افزایش دهد که به علت خاصیت آنتی میکروبی آن است ولی برای افزایش بیشتر عمر پس از برداشت مصرف نیترات نقره همراه گلوکز و ۸-هیدروکسی کوئینولین سولفات توصیه می‌شود. در مورد خاصیت آنتی باکتریال باید گفت که باکتری باسیلوس بیشترین حضور را در محلول گلجای دارد و احتمال حضور اروینیا و پزودومانس بسیار کم می‌باشد و در تیمارهای ترکیبی نیترات نقره با گلوکز و ۸-هیدروکسی کوئینولین سولفات دیده نشد. در تیمارهای گلوکز همراه نیترات نقره و ۸-هیدروکسی کوئینولین سولفات همراه نیترات نقره حضور باسیلوس مشاهده شد ولی در تیمار گلوکز و نیترات نقره و ۸-هیدروکسی کوئینولین هیچ نوع باکتری‌ای دیده نشد و به طور قابل توجهی عمر شاخه بریده به ۵۱ روز رسید (۹). در مورد اتیلن باید گفت هیچ ارتباطی بین افزایش سطح اتیلن و عمر شاخه بریده دیده نشد و نتایج حاصل از کار روی هیبرید *Popaduor* در تحقیقات کتسا در سال ۱۹۹۴ و نتایج تحقیقات گول در سال ۱۹۸۵ بر روی گونه دندروبیوم به نام *Jacquelyn* یکسان بود (۸). یکی از مواردی که بر عمر پس از برداشت ارکیده دندروبیوم اثر گذار است میزان حساسیت آن به اتیلن می‌باشد در تحقیق الماسی و همکاران در سال

۲۰۱۲ تعداد ۶ هیبرید بررسی شد و میزان حساسیت آن‌ها به اتیلن سنجیده شد و در مقایسه با سایر مطالعات متوجه نقش برجسته ژنوتیپ در حساسیت به اتیلن دندربیوم شاخه بریده می‌شویم (۱). به عنوان مثال طبق مطالعه یودی و همکاران بر روی *Suree White* و *Suree Peach 115* بدین صورت بود، تیمار شاهد ارکیدهایی با ۴۰٪ باز شدگی گلها در نظر گرفته شد و برای هر هیبرید در سه سطح ۲۵٪، ۵۰٪ و ۷۵٪ گلها برداشت صورت گرفت و در آب مقطر و دمای ۲۵ درجه قرار گرفتند و این آزمایش نشان داد که عمر پس از برداشت در رقم *Suree White* در هیچ کدام متفاوت نبود و در رقم *Suree Peach 115* با بیشترین عمر که حدود ۱۰ روز بود و تاکید بر اثر ژنوتیپ دارد (۱۹). در نتایج تحقیقات کتسا در سال ۱۹۵۵ مشخص شد میزان تولید اتیلن در گلچه‌های باز به نسبت گلچه‌های نیمه باز و جوانه به ترتیب کمتر است (۹). محققین علم پس از برداشت همواره به دنبال یافتن راه‌هایی برای افزایش عمر پس از برداشت محصولات هستند یکی از این راه‌ها استفاده از ¹-MCP است و می‌تواند تاثیر خوبی داشته باشد حتی تیمار آن قبل کاربرد خارجی اتیلن اثر مطلوبی دارد و می‌تواند اثر اتیلن را کاهش دهد (۱۶). آمینواکسی استیک اسید و قندها بر روی عمر پس از برداشت گل آذین با جوانه‌های گل و گل‌های باز ارکیده دندربیوم اثر گذار است محققین رقم *Jew Yuay Tew* بررسی کردند و متوجه شدند، گلوکز و ساکارز به تنهایی و آمینواکسی استیک اسید به تنهایی بر روی عمر پس از برداشت اثری ندارند ولی استفاده همزمان اثر قابل توجهی دارد. این تیمارها باز شدن جوانه را تسریع و باعث تاخیر در پیری گل‌های باز شده می‌شود (شکل ۵). کاربرد آمینواکسی استیک اسید pH محلول گلجای را تا ۳ کاهش داده اما به مرور زمان این pH قلیایی می‌شود در صورتی که اضافه کردن ۴٪ گلوکز باعث ثابت ماندن pH روی ۳ تا روز ۲۰ ام می‌شود (۱۴). و این ثابت بودن pH به کنترل رشد باکتری و مسدود نشدن آوندها در محلول گلجای کمک کرده که در شکل شماره ۶ می‌توانید تصویر میکروسکوپی این وضعیت را مشاهده کنید.



شکل ۵. اثر تیمارهای آب مقطر (مربع)، ۰/۵ میلی مولار امینو اکسی (دایره) و ۰/۵ میلی مولار امینو اکسی و ۴٪ گلوکز (مثلث) بر میزان پژمردگی در طول نگهداری (روز) قابل مشاهده است که تیمار ۰/۵ میلی مولار امینو اکسی و ۴٪ گلوکز (مثلث) کمترین میزان پژمردگی را به دنبال داشت.

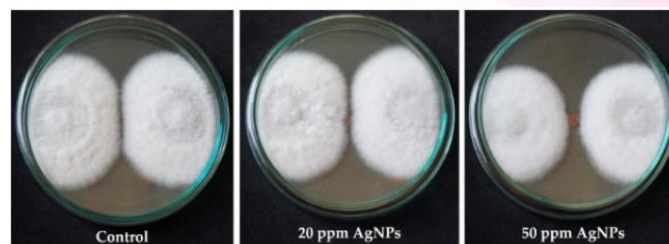
^۱ متیل سیکلو پروپان



شکل ۶. در مطالعه الماسی و همکاران ۲۰۱۵ استفاده از 1-MCP و آب دارای ازن به میزان ۵ میلیگرم بر لیتر و مطالعه آن بر روی عمر پس از برداشت ارکیده دندروبیوم انجام شد که طبق شکل اثر بسیار خوب آن بر جلوگیری از رشد کلونی‌های باکتری در مقطع عرضی از ساقه قابل مشاهده است، a شاهد و b تیمار شده (۲).

اثر تیمار مواد نانو بر عمر پس از برداشت ارکیده دندروبیوم

به طور کلی چندین روش برای بهبود صفات پس از برداشت وجود دارد، بسیاری از آن‌ها از مواد شیمیایی برای جلوگیری از بیوسنتز اتیلن و رشد باکتری استفاده می‌کنند، استفاده از فناوری نانو در صنعت کشاورزی در دهه گذشته به دلیل توانایی زیاد آن در حال افزایش است. استفاده از نانو ذرات نقره باعث افزایش بازدارنده‌های اتیلن و عوامل ضد میکروبی در بسته بندی و افزایش عمر پس از برداشت محصولات باغبانی می‌شود. البته اثرات پس از برداشت به غلظت ذرات نانو، اندازه آن‌ها، مدت انکوباسیون و نوع ژنوتیپ گیاهی بستگی دارد اما به طور کلی نانو ذرات نقره باعث کاهش تولید اتیلن با کاهش سطح رونویسی ژن‌های بیوسنتز اتیلن و مهار رشد باکتری‌ها از طریق فعالیت ضد میکروبی شده و مقرون به صرفه بوده و می‌تواند نگرانی‌های زیست محیطی را کاهش دهد (۱۱). در مطالعه ناکرات ۲۰۱۹ از ذرات نانو نقره به عنوان پوشش ضد قارچ در کاغذ بسته بندی برای کنترل رشد *Colletotrichum gloeosporioides* در گل‌های شاخه بریده دندروبیوم در طی جریان بسته بندی برای مبارزه با بیماری گال سیاه استفاده شده که اثر مثبتی داشت (شکل ۷) (۱۲).



شکل ۷. اثر غلظت‌های مختلف $AgNO_3$ بر رشد *Colletotrichum gloeosporioides* (۱۲).

نتیجه گیری و چشم انداز آینده

فناوری‌هایی چون اتمسفر کنترل شده، مواد شیمیایی و نانو فناوری در پس از برداشت کاربرد زیادی یافته و توانسته به تولید محصولات باغبانی کمک قابل توجهی کند و عمر پس از برداشت این محصولات به ویژه گل‌های شاخه بریده‌ای چون دندروبیوم، البته این فناوری‌ها هر کدام قابل ارتقا و استفاده بهینه هستند می‌توان گفت استفاده از اتمسفر کنترل شده همراه با فیلم‌های مختلف بسته بندی و همچنین همراه با تیمار



دمای پایین و تیمارهای تکمیلی عمر پس از برداشت را بسیار افزایش می‌دهد و همچنین در آینده نیاز به مواد شیمیایی طبیعت دوست و استفاده از مواد نانو با پایه گیاهی مانند نانو مواد ساخته شده با عصاره گیاهان که طبیعت دوستی بیشتری دارد بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد همچنین با توجه به اهمیت زیاد ژنوتیپ در پس از برداشت دندروبیوم این نیاز احساس می‌شود که ژنوتیپ های مختلف مورد تحقیق قرار بگیرند و برای افزایش عمر پس از برداشت آن‌ها مطالعات بیشتری صورت بگیرد.

References

1. **Almasi, P., Mohamed, M. T. M., Ahmad, S. H., Kadir, J., Mirshekari, A. (2012).** Postharvest responses of cut Dendrobium orchids to exogenous ethylene. *African Journal of Biotechnology*, 11(16), 3895-3902.
2. **Almasi, P., Mohamed, M. T. M., Anwar, P., Ahmad, S. H., Kadir, J. (2015).** Responses of Dendrobium 'darrenn glory' and Mokara 'calypso jumbo' orchids to 1-methylcyclopropene and aqueous ozone postharvest treatments. *Bragantia*, (AHEAD), 0-0.
3. **Auty, Y., Singh, A., Patel, G. (2015).** Optimization of harvest stage and improvement in the post harvest life of Orchid (Dendrobium) cut spikes with vase solution treatments. *BIOINFOLET-A Quarterly Journal of Life Sciences*, 12(4a), 823-827.
4. **Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K. W., Barrett, R. L. (2003).** Orchid conservation: a global perspective. *Orchid conservation*, 124.
5. **Dai, J., & Paull, R. E. (1991).** Effect of water status on Dendrobium flower spray postharvest life. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(3), 491-496.
6. **De, L. C., Vij, S. P., Medhi, R. P. (2014).** Post-harvest physiology and technology in orchids. *Journal of Horticulture*, 1(102), 2376-0354.
7. **Gupta, J., & Dubey, R. K. (2018).** Factors affecting post-harvest life of flower crops. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 7, 548-557.
8. **Ketsa, S., & Thampitakorn, F. (1995).** Characteristics of ethylene production of Dendrobium orchid flowers. In *VI International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants* 405 (pp. 253-263).
9. **Ketsa, S., Piyasaengthong, Y., Prathuangwong, S. (1995).** Mode of action of AgNO₃ in maximizing vase life of Dendrobium 'Pompadour' flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 5(1-2), 109-117.
10. **Lopez, R. G., & Runkle, E. S. (2005).** Environmental physiology of growth and flowering of orchids. *HortScience*, 40(7), 1969-1973.
11. **Naing, A. H., & Kim, C. K. (2020).** Application of nano-silver particles to control the postharvest biology of cut flowers: A review. *Scientia Horticulturae*, 270, 109463.
12. **Nokkrut, B. O., Pisuttipiched, S., Khantayanuwong, S., Puangsin, B. (2019).** Silver Nanoparticle-Based Paper Packaging to Combat Black Anther Disease in Orchid Flowers. *Coatings*, 9(1), 40.
13. **Poonsri, W. (2021).** Effects of high CO₂ and low O₂ on biochemical changes in cut Dendrobium orchids. *Heliyon*, 7(2), e06126.
14. **Rattanawisalanon, C., Ketsa, S., van Doorn, W. G. (2003).** Effect of aminooxyacetic acid and sugars on the vase life of Dendrobium flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 29(1), 93-100.
15. **Thammasiri, K. (2016).** Thai orchid genetic resources and their improvement. *Horticulturae*, 2(3), 9.



16. **Uthaichay, N., Ketsa, S., van Doorn, W. G. (2007).** 1-MCP pretreatment prevents bud and flower abscission in *Dendrobium* orchids. *Postharvest Biology and Technology*, 43(3), 374-380.
17. **Uthairatanakij, A., Teixeira da Silva, J. A., Obsuwan, K. (2007).** Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Science and Biotechnology*, 1(1), 1-5.
18. **Yimyong, W., & Soni, P. (2014).** Effects of modified atmosphere packaging on quality of cut *Dendrobium* orchid. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 12(1), 408-411.
19. **Yoodee, S., Chanjirakul, K., Obsuwan, K., Seraypheap, K. (2012).** Effect of different maturity stages on the display-life of cut *Dendrobium* orchids. In *International Conference on Quality Management in Supply Chains of Ornamentals QMSCO2012* 970 (pp. 251-254).



An Overview of the Application of Some Technologies in Post-Harvesting of Dendrobium Orchids

Mahsa Aghajanpour¹, Mahdi Rezaei^{1*}

¹ Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Science and Engineering,
College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Email: Rezaei.mahdi@ut.ac.ir

Abstract

Transportation over longer distance losses the quality of cut flowers because of more time spending for export. Long vase life in cut flowers attract the customer satisfaction. Ethylene sensitivity in dendrobium is lower than some other orchids genus and not considered as limiting factor in post-harvest. Here we reviewed some technologies used in post-harvest dendrobium orchids such as atmosphere control and finally predicted the perspective technologies in this area.

Keywords: Atmosphere control, Dendrobium orchid, Post-harvest, Nanotechnology

القاء غده‌زایی درون شیشه‌ای *Dactylorhiza umbrosa* با پیش تیمار تنش اسمزی

سعیده رستمی بالان^۱، شیرین دیان‌تی دیلمی^۲، سهیل کریمی^{۳*}

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران

۲- استادیار گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران

Email: srostamy@ut.ac.ir

skarimi@ut.ac.ir

چکیده

غده‌های ارزشمند ارکیده خاکروی ثعلب سایه‌پسند *Dactylorhiza umbrosa* به علت وجود گلوکومانان در صنایع دارویی، نوشیدنی، شیرینی‌سازی، بستنی‌سازی و صنایع غذایی کاربرد دارد. برداشت بی‌رویه از منابع طبیعی در فصل گلدهی و پیش از بلوغ و پراکنش بذر، این گونه ارزشمند را در معرض انقراض قرار داده است. استفاده از تکنیک‌های کشت بافت گیاهی می‌تواند افزون بر حفظ ژرم پلاسما، برای تولید غده‌های ارزشمند گیاه نیز استفاده شود. اثر پیش تیمارهای اسمزی شامل کاربرد قندهای الکلی (سوربیتول، مانیتول، پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰۰۰) در سطح ۴ درصد و شاهد (بدون اعمال پیش تیمار تنش اسمزی) بر القاء غده‌زایی در گیاهچه‌های کشت بافتی ثعلب سایه‌پسند بررسی شد. ۲۹ روز بعد از اعمال این پیش تیمارها، گیاهان به محیط بدون تنش انتقال داده شدند. پس از ۷۰ روز، شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان ارزیابی شد. پیش تیمارهای اسمزی رشد ریشه و تولید غده ثانویه را بهبود بخشیدند. تجمع قندهای محلول در تیمارهای تنش اسمزی مشاهده شد که با تنظیم اسمزی برای حفظ محتوای آب بافت در ارتباط بود. پاسخ‌های گیاه به عوامل اسمزی متفاوت بود. در نهایت با توجه به افزایش زیست توده گیاه، درصد بقاء و تجمع کربوهیدرات در غده‌ها، تیمار پلی‌اتیلن گلیکول ۴ درصد برای بهبود کیفیت و افزایش غده‌زایی ثعلب سایه‌پسند توصیه شد.

کلمات کلیدی: ارکیده خاک‌روی، پیش تیمار اسمزی، تنظیم اسمزی، ثعلب، قندهای محلول

مقدمه

ثعلب سایه‌پسند *D. umbrosa* یکی از گونه‌های گروه ارکیده‌های خاکروی مناطق معتدله است. این گیاه دارای غده‌های زیرزمینی به شکل پنجه‌ای است. پودر حاصل از غده‌های خشک این گیاهان با عنوان ثعلب شناخته می‌شود. ثعلب دارای خواص درمانی بوده و همچنین در صنایع دارویی، نوشیدنی، شیرینی‌سازی و بستنی‌سازی نیز استفاده می‌شود (۱۶). ارکیده‌های مولد ثعلب به صورت تجاری کشت و کار نمی‌شوند، بلکه غده‌های ارزشمند این گیاه از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری شده و مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرند (۶). این گونه‌های ارزشمند به علت برداشت بی‌رویه از منابع طبیعی، برداشت غده‌ها در فصل گلدهی و پیش از بلوغ و پراکنش بذر (۶)، عدم کشت و کار متمرکز، پروسه طولانی تولید غده از بذر در طبیعت و همچنین نرخ غده‌دهی پایین در معرض انقراض قرار دارند. لذا یافتن راهی جهت تکثیر این گونه ضروری است. عوامل متعددی در تشکیل اندام‌های ذخیره‌ای در شرایط درون شیشه‌ای همچون شرایط محیطی (شامل دما، شدت و طیف نور، طول روز، غلظت دی اکسید کربن محیط) نقش دارند (۳). ثابت شده تنش غیرزیستی بر ریشه‌زایی و تشکیل غده مؤثر است (۱۵). هنگامی که گیاهان در معرض تنش‌های ملایمی قرار می‌گیرند،

سازگاری‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک نشان می‌دهند که می‌توان از آن‌ها برای هدایت رشد گیاه استفاده کرد (۹). عوامل اسمزی مانند مانیتول، سوربیتول و پلی‌اتیلن گلیکول با ایجاد تنش اسمزی، در القاء غده‌دهی، افزایش سرعت غده‌زایی و اندازه ریزغده‌ها در سیب زمینی و سیب زمینی شیرین اثرات مفیدی نشان داده‌اند (۱۱، ۱۲ و ۱۴). با توجه به مطالب عنوان شده، در پژوهش حاضر تلاش شد تا با اعمال پیش تیمارهای اسمزی، رشد گیاه به سمت تولید ریشه و غده‌زایی هدایت شود. برای این منظور گیاهچه‌های ثعلب سایه پسند به مدت ۴ هفته تحت تاثیر عوامل اسمزی قرار داده شدند و سپس در محیط معمول واکشت شدند. شاخص‌های رشد و شاخص‌های بیوشیمیایی جهت ارزیابی کارایی پیش تیمارها بر رشد و غده‌زایی گیاه اندازه‌گیری شد.

مواد و روش‌ها

اثر پیش تیمار اسمزی (در سطح ۴ درصد) شامل ۱- سوربیتول، ۲- مانیتول، ۳- پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰۰۰ و ۴- شاهد (حاوی ۱۲ گرم ساکارز + ۵ گرم فروکتوز) بر رشد ریشه و غده‌زایی گیاهچه‌های ۱۳ ماهه کشت بافتی (حاصل از کشت بذر) ثعلب سایه پسند بررسی شد. تیمارها در محیط کشت فاست تغییر یافته (دیانتی، ۱۳۹۲) بدون هورمون و دارای ذغال فعال (۱ گرم در لیتر) به مدت ۲۹ روز اعمال شدند. پس از افزودن آگار به میزان پنج گرم در لیتر، محیط‌های کشت در اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه) گندزدایی و سپس داخل شیشه‌های استریل (ارتفاع ۹/۵ و قطر ۶ سانتی‌متر) توزیع شدند. در هر شیشه 10 ± 6 میلی‌لیتر از محیط توزیع شد. گیاهچه‌ها به مدت ۲۹ روز در محیط‌های تنش‌زا نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به بسترهای کشت بدون عوامل اسمزی منتقل شدند و واکشت گیاهان هر سه هفته یکبار صورت گرفت. در تمامی این مراحل گیاهچه‌ها در اتاقک رشد، با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. پس از ۷۰ روز، گیاهان از شیشه‌ها خارج شده و شاخص‌های رشد شامل قطر طوقه، ارتفاع طوقه، تعداد برگ فعال، بقاء، درصد برگ نکرور، تعداد ریشه فعال، تعداد غده‌های تشکیل‌شده مادری، تعداد غده‌های تشکیل‌شده دختری، حجم غده مادری، حجم غده دختری، حجم کل غده‌ها، وزن خشک گیاه، وزن خشک غده و محتوی نسبی آب، اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. همچنین فاکتورهای بیوشیمیایی از جمله کربوهیدرات محلول (۲۰) و ذخیره‌ای (۱۰) در اندام زمینی اندازه‌گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و در هر تکرار سه ظرف کشت و در هر ظرف کشت سه ریز نمونه گیاهی انجام شد. پس از آنالیز واریانس، مقایسه میانگین با استفاده از آزمون توکی ($P \leq 0.05$) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS (نسخه ۲۱/۰) انجام شد.

نتایج و بحث

اثر پیش تیمار عوامل اسمزی بر قطر طوقه ($P \leq 0.01$)، ارتفاع گیاه ($P \leq 0.05$)، تعداد برگ ($P \leq 0.05$)، بقاء در شرایط درون شیشه‌ای ($P \leq 0.05$) و وزن خشک گیاه ($P \leq 0.05$) معنی‌دار بود. اما اثر این پیش تیمارها بر درصد برگ نکرور و محتوی نسبی آب در ریز نمونه‌ها معنی‌دار نبود. همچنین تجزیه واریانس داده‌های مربوط به ریشه و غده‌های ثعلب سایه پسند در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد که اثر



تیمار غلظت‌های بالای قند بر تعداد ریشه ($P \leq 0.01$)، تعداد غده مادری ($P \leq 0.01$)، تعداد غده دختری ($P \leq 0.05$) و حجم کل غده‌ها ($P \leq 0.01$) معنی‌دار بود. همچنین تجزیه واریانس داده‌های بیوشیمیایی مربوط به قند محلول ریشه ($P \leq 0.01$) و قند ذخیره ریشه ($P \leq 0.01$) معنی‌دار بود.

جدول ۱. اثر پیش تیمار اسمزی بر قطر طوقه، ارتفاع گیاه، تعداد برگ، درصد بقاء و بیومس ثعلب سایه پسند در شرایط درون شیشه‌ای.

تیمار	قطر طوقه (mm)	ارتفاع گیاه (cm)	تعداد برگ	بقاء (%)	وزن خشک گیاه (mg)
شاهد	$4/63 \pm 0/23^b$	$3/32 \pm 0/16^b$	$5/22 \pm 0/2^b$	$81/48 \pm 11/20^b$	100 ± 10^c
مانیتول ۴٪	$5/38 \pm 0/23^a$	$3/71 \pm 0/19^{ab}$	$5/93 \pm 0/26^a$	$90/48 \pm 4/18^a$	133 ± 10^b
پلی اتیلن گلیکول ۴٪	$5/38 \pm 0/21^a$	$3/28 \pm 0/2^b$	$5/91 \pm 0/22^a$	$96/97 \pm 3/03^a$	171 ± 20^a
سوربیتول ۴٪	$4/93 \pm 0/24^{ab}$	$4/05 \pm 0/24^a$	$5/91 \pm 0/32^a$	$90/91 \pm 6/5^a$	127 ± 10^b

میانگین‌های ($n = 4$) دارای حروف مشابه بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

بیشترین میزان قطر طوقه مربوط به PEG و مانیتول ۴ درصد و بیشترین تعداد غده مادری مربوط به مانیتول و سوربیتول ۴ درصد بود. بیشترین تعداد برگ و تعداد ریشه مربوط به مانیتول ۴ درصد و بیشترین درصد بقاء و وزن خشک گیاه (بیومس گیاه) مربوط به PEG چهار درصد بود. بیشترین ارتفاع گیاه، تعداد غده ثانویه و مجموع حجم غده‌ها مربوط به سوربیتول ۴ درصد بود. در تمامی صفات فیزیولوژیک یاد شده، گیاهان شاهد در کمترین میزان نسبت به سایر تیمارها قرار داشتند. (جدول ۱ و ۲).

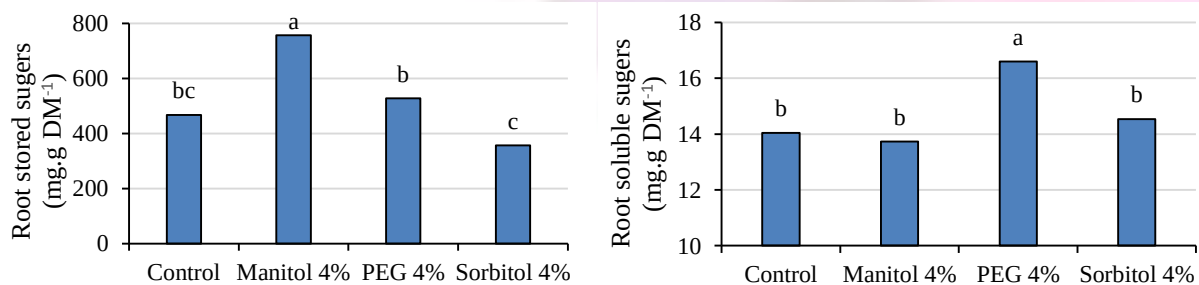
جدول ۲. اثر پیش تیمار اسمزی بر تعداد ریشه، تعداد غده مادری و دختری و مجموع حجم غده‌های مادری و دختری ثعلب سایه پسند.

تیمار	تعداد ریشه	تعداد غده مادری	تعداد غده دختری	مجموع حجم غده‌ها (mm ³)
شاهد	$3/22 \pm 0/38^c$	$0/89 \pm 0/04^b$	$0/7 \pm 0/13^b$	$0/83 \pm 0/02^b$
مانیتول ۴٪	$5/05 \pm 0/45^a$	$1/00 \pm 0/00^a$	$0/69 \pm 0/09^b$	$0/81 \pm 0/03^b$
پلی اتیلن گلیکول ۴٪	$5/03 \pm 0/56^a$	$0/97 \pm 0/03^a$	$0/88 \pm 0/16^{ab}$	$1/00 \pm 0/04^a$
سوربیتول ۴٪	$4/48 \pm 0/57^b$	$1/00 \pm 0/00^a$	$0/97 \pm 0/13^a$	$1/09 \pm 0/03^a$

میانگین‌های ($n = 4$) دارای حروف مشابه بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

بیشترین کربوهیدرات محلول مربوط به پلی اتیلن گلیکول ۴ درصد و بیشترین کربوهیدرات ذخیره ای مربوط به مانیتول ۴ درصد بود. گیاهان شاهد در شاخص های بیوشیمیایی نیز کمترین میانگین را داشتند (شکل ۱).

گیاهان پیش تیمار شده در مقایسه با گیاهان شاهد (بدون اعمال تنش) رشد بهتری داشتند. از نظر اکولوژیک پس از تنش ملایم رشد گیاهچه های ثعلب بالاخص قسمت اندام زمینی (ریشه ها و غده ها) تحریک می شود تا در صورت بروز تنش مجدد امکان بقاء گونه فراهم باشد (۱). زمانی که گیاه در معرض پتانسیل آب کم قرار می گیرد، برای مقابله با کم آبی و حفظ رشد، تغییراتی در ویژگی های مورفولوژیک و فیزیولوژیک آن ایجاد می شود که سبب تحریک رشد ریشه و کمک به جذب آب و بقاء گیاه می شود (۱۷). در پژوهش حاضر نیز تعداد ریشه در گیاه شاهد در کمترین سطح نسبت به سایر تیمارها قرار داشت و در تیمار مانیتول ۴ درصد بیشترین تعداد ریشه مشاهده شد. بررسی تعداد غده اولیه نشان داد در همه سطوح تنش تعداد غده بیشتر از گیاهان شاهد بود. این یافته در خصوص تعداد غده ثانویه نیز صادق بود. پیش تیمارهای اسمزی تعداد و حجم کل غده ها را افزایش داد. تاثیر تیمار عوامل تنش زا با یکدیگر متفاوت بود. در سیب زمینی نیز کاربرد مانیتول بر صفات مربوط به ریزغده زایی نسبت به سوربیتول مؤثرتر بود و ریزغده ها در غلظت های مختلف سوربیتول دارای طول و قطر کمتری نسبت به محیط حاوی مانیتول بودند (۱۱). ولی در پژوهش حاضر تعداد غده ثانویه و حجم کلی غده ها، سطوح سوربیتول بهتر از سطوح مانیتول بود. چنین تفاوت هایی می توانند به دلیل حساسیت گیاهان به تنش اسمزی و تفاوت در پتانسیل اسمزی محیط، عامل ایجاد کننده تنش، گونه گیاهی، و مرحله رشد و نمو و شرایط رشد رخ دهند (۴).



شکل ۱. محتوای کربوهیدرات های محلول و ذخیره ای در اندام زمینی ثعلب سایه پسند.

یکی از نگرانی های پژوهش حاضر، کاهش رشد و افزایش مرگ و میر گیاهچه ها در نتیجه اعمال پیش تیمار تنش اسمزی بود. ولی میزان بقاء در گیاهان تنش یافته با عوامل اسمزی نسبت به گیاه شاهد افزایش یافت. به نظر می رسد افزایش بقاء، به اثرات پیش تیمارها در افزایش تحمل گیاه به شرایط محیطی ارتباط دارد (۹). در این آزمایش تیمارهای اسمزی اثر معنی دار بر محتوای نسبی آب گیاه نداشتند که نشان دهنده عدم ایجاد محدودیت از نظر جذب آب (۵) و یا نشان دهنده فعال شدن مکانیسم های تنظیم اسمزی در گیاه باشد. تجمع قندهای محلول به حفظ تورژسانس سلولی و فرایندهای وابسته به آن کمک می کند و رشد، عملکرد و بقای گیاهان در شرایط تنش خشکی را تحت تأثیر قرار می دهند (۱۸). در گیاهان پیش تیمار شده، افزایش غلظت قندهای محلول مشاهده شد. افزایش غلظت قندهای محلول در گیاه به دلیل کاهش مصرف آن ها تحت تنش می باشد. ولی در پژوهش حاضر، تجمع قندها در موازات افزایش رشد گیاه



بود. انباشت قندها تحت تنش خشکی ممکن است ناشی از کاهش انتقال از برگ و یا هیدرولیز نشاسته نیز باشد (۹). ولی کاهش محتوای نشاسته در اندام گیاهان تحت پیش تیمارهای اسمزی مشاهده نشد. در پژوهشی که روی گیاه چغندر قند انجام شد نیز تنش اسمزی کوتاه مدت باعث افزایش تجمع ساکارز در ریشه ذخیره ای گیاهان شد (۱۹). پیش تیمارهای اسمزی (به استثنای سوربیتول ۴ درصد) قند ذخیره ای در اندام زمینی ثعلب را نسبت به گیاه شاهد افزایش دادند. میزان گلوکومانان و نشاسته بر کیفیت غده های این گیاه اهمیت بسزایی دارد. لذا هرچه میزان کربوهیدرات ذخیره ای در غده های ثعلب سایه پسند بیشتر باشد، کیفیت غده ها بالاتر هستند.

در مجموع اعمال پیش تیمارهای اسمزی سبب بهبود رشد و شاخص های بیوشیمیایی نسبت به گیاهان شاهد در ثعلب سایه پسند شد. همچنین مشخص شد که پیش تیمارهای اسمزی سبب تحریک رشد غده شدند. کاربرد پیش تیمارهای اسمزی میزان تولید غده ثانویه را بهبود بخشید و سبب غده زایی و بهبود کیفیت غده در گیاه شد. با توجه به اهمیت زنده مانی و همچنین بیومس گیاه در این راستا کاربرد پلی اتیلن گلیکول ۴ درصد پیشنهاد شد.

References

۱. امام، ی. ۱۳۹۰. زراعت غلات. چاپ چهارم. انتشارات دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۲. دیانتی دیلمی، ش. ۱۳۹۲. مطالعه جوانه زنی، انتقال به مرحله گلدهی و بیان برخی ژن های مربوط به آن در چند گونه ارکیده ایرانی. رساله دکتری، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی کرج، دانشگاه تهران.
3. Askari, N., (2016). Aspects of bulblet growth of lily *in vitro*. Doctoral dissertation, Wageningen University.
4. Demirevska, K., Zasheva, D., Dimitrov, R., Simova-Stoilova, L., Stamenova, M., Feller, U. (2009). Drought stress effects on Rubisco in wheat: changes in the Rubisco large subunit. Acta Physiologiae Plantarum. 31(6), 1129.
5. Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D.B.S.M.A., Basra, S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In: Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Véronique, S., Alberola, C. (Eds.), Sustainable Agriculture. Springer, Dordrecht. 153-188.
6. Ghorbani, A., Gravendeel, B., Naghibi, F., de Boer, H. (2014). Wild orchid tuber collection in Iran: a wake-up call for conservation. Biodiversity and Conservation. 23(11), 2749-2760.
7. Karimi, S., Karami, H., Mokhtassi-Bidgoli, A., Tavallali, V., Vahdati, K. (2018). Inducing drought tolerance in greenhouse grown *Juglans regia* by imposing controlled salt stress: The role of osmotic adjustment. Scientia Horticulturae. 239, 181-192.
8. Karimi, S., Rahemi, M. (2012). Growth and chemical composition of pistachio seedling rootstock in response to exogenous polyamines under salinity stress. Journal of Nuts. 3: 21-30.
9. Karimi, S., Rahemi, M., Rostami, A.A., Sedaghat, S. (2018). Drought effects on growth, water content and osmoprotectants in four olive cultivars with different drought tolerance. International Journal of Fruit Science. 18(3), 254-267.
10. McCready, R.M., Guggolz, J., Silveira, V., Owens, H.S. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. Analytical Chemistry. 22(9), 1156-1158.



11. **Motallebi-Azar, A., Kazemiani, S. (2011).** A new concept about carbon source roles on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Advances in Agriculture and Botany*. 3(3), 160-167.
12. **Motallebi-Azar, A., & Kazemiani, S., (2012).** Effects of alcohol sugars on *in vitro* potato microtuberization. *South-Western Journal of Horticulture Biology and Environment*. 3(1), 73-83.
13. **Motallebi-Azar, A., Kazemiani, S., Yarmohamadi, F. (2013).** Effect of sugar/osmotica levels on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Russian Agricultural Sciences*. 39(2), 112-116.
14. **Ovono, P.O., Kevers, C., Dommès, J. (2009).** Effects of reducing sugar concentration on *in vitro* tuber formation and sprouting in yam (*Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 99(1), 55-59.
15. **Pumisutapon, P., Visser, R.G., de Klerk, G.J. (2012).** Moderate abiotic stresses increase rhizome growth and outgrowth of axillary buds in *Alstroemeria* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 110(3), 395-400.
16. **Sezik, E., (2002).** Turkish orchids and salep. *Acta Pharmaceutica Turcica*. 44, 151-157.
17. **Teng, Y., Zhang, Y., Guo, J.T., Gao, Y.L., Li, K.H. (2019).** Acid pretreatment improves microtuberization of potato plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 55(1), 36-43.
18. **Valentovic, P., Luxova, M., Kolarovic, L., Gasparikova, O. (2006).** Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membrane stability and water relations in two maize cultivars. *Plant Soil and Environment*. 52(4), 186-191.
19. **Wu, G.Q., Feng, R.J., Shui, Q.Z. (2016).** Effect of osmotic stress on growth and osmolytes accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *Plant, Soil and Environment*. 62(4), 189-194.
20. **Yemm, E.W., & Willis, A. (1954).** The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*. 57(3), 508-514.



Induction of *in vitro* tuberization in *Dactylorhiza umbrosa* by osmotic stress pretreatment

Saeideh Rostami-Balan¹, Shirin Dianati Daylami², Soheil Karimi^{2*}

¹ Graduated Masters student of the Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran.

² Assistant professor of the Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran.

Email: srostamy@ut.ac.ir

skarimi@ut.ac.ir

Abstract

Valuable tubers of *Dactylorhiza umbrosa* are used in the pharmaceutical, beverage, confectionery, ice cream, and food industries due to the presence of glucomannan. Improper harvesting from natural habitats during the flowering season and before maturity and seed shedding has endangered the existence of this species. *In vitro* tissue culture techniques can be employed for germplasm preservation, and also mass production of the tubers. The effect of osmotic pretreatments including the use of 4% w/v of alcoholic sugars (sorbitol, mannitol, polyethylene glycol 4000) and control (without osmotic stress) was investigated on induction of tuber growth and development in *D. umbrosa* plantlets *in vitro*. After The plants were incubated in these media for 29 days. Then, the plants were transferred to optimized growing conditions and after 70 days, their physiological and biochemical responses were compared with non-pretreated plants. The osmotic pretreatments improved root growth and lateral tuber formation of the plants. Accumulation of soluble sugars was observed in osmotic pretreatments which was associated with relative water content and osmoregulation. Plant responses to the osmotic agents were different. According to the results, 4% polyethylene glycol pretreatment was recommended for improving the formation and quality of *D. umbrosa* tubers *in vitro* because incrassation of plant biomass, survival and carbohydrate accumulation in the tubers.

Keywords: Osmoregulation, Priming, Salep, Soluble sugars, Terrestrial orchid

اثر طیف‌های مختلف نور بر درصد جوانه زنی بذرهای مصنوعی ذخیره شده ثعلب خربقی معمولی (*Epipactis veratrifolia*)

زهرا مهدوی^{۱*}، شیرین دیانتی دیلمی^۲، ساسان علی نیایی فرد^۳، علی فدوی^۳

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه علوم باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه فناوری صنایع غذایی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران

Email: Zahra.mahdavi@ut.ac.ir

چکیده

تکنولوژی بذر مصنوعی روشی جدید در ریز افزایی و تکثیر به ویژه گیاهانی که تولید بذر ندارند، گیاهان تراریخته و سایر گیاهانی که نیاز به حفظ ویژگی‌های برتر از طریق تولیدمثل غیرجنسی دارند محسوب می‌شود. تولید بذر مصنوعی ابزاری بسیار ارزشمند جهت حفاظت و ذخیره‌سازی پروتوکورم ارکیده به ویژه گونه‌های بومی در حال انقراض و استفاده از پتانسیل اقتصادی و علمی آن جهت صادرات و عرضه این محصول در دنیا می‌باشد. در این مطالعه اثر ۵ طیف مختلف نور ال.ای.دی (LED) آبی، قرمز، سبز، قرمز دور، سفید با شدت ۸۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه و شرایط تاریکی بر ذخیره‌سازی و پس از آن بر درصد جوانه‌زنی پروتوکورم کپسوله شده ارکیده خربقی معمولی (*Epipactis veratrifolia*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیشترین درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی پس از کشت مربوط به شرایط نوری قرمز و سبز و کمترین آن مربوط به تاریکی بود. بین سایر تیمارهای نوری قرمز دور، آبی و سفید تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: پروتوکورم، کشت درون شیشه‌ای، کپسوله سازی، نور ال.ای.دی

مقدمه

خانواده ارکیده یکی از بزرگ‌ترین و متنوع‌ترین خانواده گیاهان گل‌دار است که شامل حدود ۸۰۰ جنس و بیش از ۲۵۰۰۰ گونه می‌باشد (۶). امروزه تولید ارکیده‌های زینتی به صنعتی میلیون دلاری در تجارت جهانی گل و گیاه زینتی تبدیل شده است به طوری که تولید ارکیده فالانوپسیس بیش از هفتادوپنج درصد از تجارت ارکیده‌ها را به خود اختصاص داده است (۷). ارکیده‌های بومی ایران نیز به دلیل خواص دارویی، مصارف غذایی و ادویه‌ای مورد توجه بازار جهانی قرار گرفته است و جمع‌آوری بی‌رویه آن‌ها از طبیعت، کاهش تنوع زیستی و انقراض این گیاهان را به دنبال خواهد داشت.

تولید گیاهچه از طریق بذر یکی از مشکلات عمده در پرورش ارکیده‌ها است. کپسول ارکیده حاوی تعداد زیادی بذر می‌باشد بذرها با جنین حساس و ابتدایی بدون ذخیره غذایی و آندوسپرم بوده و در طبیعت قادر به جوانه‌زنی و رشد نیست (۱۱)، بنابراین تکثیر جنسی آن بسیار دشوار است. همین مسئله موجب شده تکثیر تجاری این گیاهان بیشتر از طریق کشت درون شیشه‌ای بذر و ریزنمونه بافت‌های گیاهی انجام گیرد. روش کپسوله کردن ریزنمونه‌ها برای تولید بذور مصنوعی به ابزاری نوین و کارآمد در ریز افزایی و ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت با هدف تولید در سطح وسیع و صادرات آن و ذخیره‌سازی بلندمدت با هدف حفاظت از ژرم پلاسم گونه گیاهی در بانک ژن تبدیل شده است. به گونه‌ای که این روش برای برخی از گیاهان زینتی

و گونه‌های در حال انقراض به عنوان تنها راه ازدیاد مطرح شده است (۱۵). دستیابی به روشی کارآمد برای ذخیره سازی این محصول برای برنامه‌ریزی جهت عرضه محصول متناسب با تقاضای بازار می‌تواند بسیار ارزشمند باشد و در درازمدت به صادرات این محصول به ویژه انواع دارویی - صنعتی ارکیدها که به دلیل بازار مناسب و بی رقیب از ارزآوری بالایی برخوردارند کمک شایانی نماید.

ارکیده خربقی معمولی با نام علمی *Epipactis veratrifolia* از ارکیدهای خاکروی مناطق معتدله و از جمله ثعلب‌های بومی ایران است. ارکیدهای خاکروی مناطق معتدله دسته مهمی از ارکیدها هستند که با داشتن گیاهان چندساله دارای پتانسیل تبدیل به انواع جدید گل‌های زینتی گلدانی و شاخه بریده را دارا بوده و در سال‌های اخیر توجه دنیای باغبانی را به خود جلب کرده‌اند (۱۲). با توجه به تغییرات احتمالی محیط زیست در رویشگاه‌های ارکیده بومی و یا برداشت بی‌رویه توسط مردم محلی، این احتمال وجود دارد که برخی از گونه‌های ارکیده موجود در منطقه با ارزش زینتی یا دارویی در معرض خطر انقراض واقع شوند. از این رو، یک استراتژی کارآمد برای ذخیره این گونه‌های نادر و ارزشمند گیاهی و همچنین برای استفاده از پتانسیل اقتصادی و علمی آن مورد نیاز است.

از جوانه زنی بذر ارکیده اندامی کروی و غده مانند به نام پروتوکورم نمو می‌یابد (۲). پروتوکورم ارکیده را نمی‌توان مدت زیادی انبار کرد. این نقیصه را می‌توان به طور نسبی با توسعه پوشش‌دار کردن پروتوکورم‌ها با کپسول‌های آلزینات برطرف کرده و با استفاده از دمای پایین به مدت چند هفته انبار نمود. از این رو بذر مصنوعی روشی عالی جهت ذخیره پروتوکورم ارکیده در دمای اتاق، ذخیره سازی در دمای پایین و یا حتی ذخیره‌سازی در سرما برای هفته‌ها، ماه‌ها و حتی سال‌ها می‌باشد. دستیابی به روشی کارآمد برای ذخیره‌سازی می‌تواند برای برنامه‌ریزی جهت عرضه محصول متناسب با تقاضای بازار بسیار ارزشمند باشد و در درازمدت می‌توان به صادرات این محصول به ویژه انواع دارویی - صنعتی ارکیدها که به دلیل بازار مناسب و بی رقیب از ارزآوری بالایی برخوردارند کمک شایانی نماید. از دیگر جنبه‌های مهم توسعه بذرهای مصنوعی، امکان حفظ ژرم پلاسما گیاهان مهم اقتصادی، کمیاب و در حال انقراض از طریق ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت است. تولید بذر مصنوعی برای حفاظت و ذخیره مواد گیاهی ارکیده مورد توجه خاصی قرار گرفته است.

بذر مصنوعی از یک ریزنمونه گیاهی در مرکز یک آندوسپرم مصنوعی تشکیل شده که به وسیله یک پوشش مصنوعی برای حفاظت از بذر احاطه شده است. بذر مصنوعی از یک جنین سوماتیکی، جوانه، توده سلولی و یا هر بافتی که توانایی تشکیل یک گیاه کامل را داشته باشد، به همراه یک آندوسپرم مصنوعی و یک پوشش مصنوعی برای حفاظت از بذر تشکیل شده است. بذر مصنوعی همانند یک بذر حقیقی رفتار می‌کند، جوانه می‌زند و تحت شرایط مناسب به گیاهچه تبدیل می‌شود (۱۳). یکی از اهداف تکنولوژی تولید بذر مصنوعی ذخیره‌سازی بذر مصنوعی است. ذخیره‌سازی هم به معنی حفظ و نگهداری ژرم پلاسما و هم به معنی ذخیره سازی در انبار بوده و در حال حاضر این تکنولوژی به عنوان روشی کارآمد برای تکثیر و ذخیره‌سازی کوتاه‌مدت و میان مدت برای چندین ارکیده مهم تجاری نیز در نظر گرفته شده است (۱۰ و ۱۴).

مواد و روش‌ها

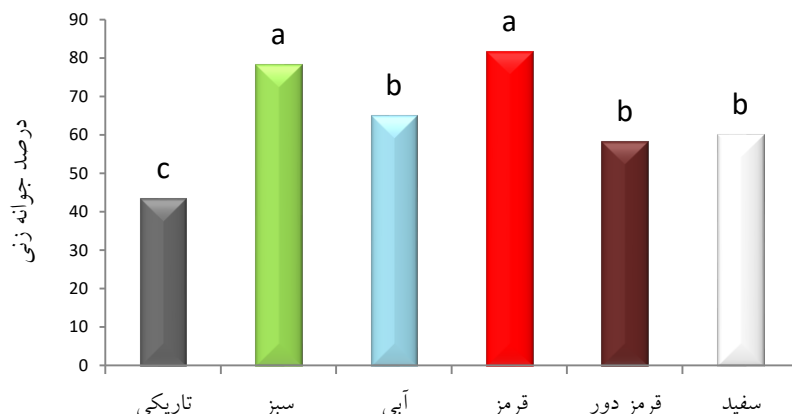
کپسول‌های بذر پس از جمع‌آوری از رویشگاه‌های طبیعی به آزمایشگاه کشت بافت منتقل شد. در ابتدا بذرها به روش دیانتی و همکاران (۱) با استفاده از هیپوکلریت سدیم با ۵ درصد ماده فعال کاملاً استریل و سپس روی محیط کشت فاست تغییر یافته کشت شدند (۱). برای ساخت محلول‌های آلژینات سدیم و کربنات کلسیم در ابتدا محیط کشت فاست تغییر یافته ساخته شد. پس از تنظیم pH محیط روی ۵/۸، پودر آلژینات سدیم به آن اضافه شد. محلول کلرید کلسیم دو آبه آماده و pH آن روی ۵/۸ تنظیم شد. تمام محلول‌های آماده شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو و استریل شد. برای تولید بذر مصنوعی از پروتوکورم‌های ارکیدها با اندازه‌های ۳ میلی‌متر استفاده شد. عمل کپسوله کردن پروتوکورم‌ها با استفاده از محلول کلرید کلسیم و آلژینات سدیم و در اثر واکنش بین این دو و تشکیل ماده جامد آلژینات کلسیم انجام شد.

به منظور بررسی اثر شرایط نوری بر درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی، ۵ طیف مختلف نور ال‌ای‌دی (LED)^۱ شامل طیف آبی، قرمز، سبز، قرمز دور، نیز نور سفید با شدت ۸۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه و همچنین تاریکی بررسی شد. بذره‌های مصنوعی ساخته شده با محلول آلژینات سدیم در غلظت ۴ درصد و محلول کلرید کلسیم در غلظت ۱۵۰ میلی‌مولار، در فالكون‌های پلی‌اتیلنی ۱۵ سی‌سی استریل حاوی ۱ سی‌سی آب مقطر استریل قرار داده شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۶ تیمار، سه تکرار و ۵ بذر مصنوعی بعنوان واحد آزمایشی پیاده شد. تیمارها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. اندازه‌گیری درصد جوانه‌زنی ۴ هفته پس از خروج بذر مصنوعی از شرایط ذخیره سازی و کشت آن‌ها روی محیط کشت جامد اندازه‌گیری شد.

نتیجه و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر نورهای مختلف ال‌ای‌دی روی درصد جوانه زنی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است. همچنین طبق نمودار مقایسه میانگین اثر تیمارهای نوری بر روی درصد جوانه‌زنی بیشترین درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی ارکیده خربقی معمولی پس از کشت مربوط به شرایط نوری قرمز با ۸۱/۶۷ درصد و سبز با ۷۸/۳۳ درصد جوانه‌زنی و کمترین آن مربوط به تاریکی با ۴۳/۳۳ درصد جوانه‌زنی بود. بین سایر تیمارهای نوری قرمز دور، آبی و سفید تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱). نور قرمز سبب تجمع زیست توده بیشتری در مقایسه با سایر طیف‌های نوری می‌شود و به طبع آن رشد بیشتری را در گیاه ایجاد می‌کند (۱۷). همچنین در پژوهش انجام گرفته روی گیاه *Oreorchis patens* Lindl نور قرمز بیشترین درصد تولید پروتوکورم را نسبت به نور آبی داشت (۴). نتیجه به دست آمده با نتایج حاصل از جوانه‌زنی بذر حقیقی ارکیده *Bletilla ochracea* Schltr مطابقت دارد به‌طوری‌که بالاترین درصد جوانه‌زنی بذر با استفاده از نورپردازی سبز و نارنجی حاصل شد (۸). همچنین گزارش شده نور سبز باعث افزایش رشد و تولید PLB بیشتر در ارکیده *Cymbidium devonianum* Lindl نسبت به سایر نورهای قرمز، آبی و سفید شد (۹).

¹ Light Emitting Diode



شکل ۱. اثر تابش طیف‌های نوری مختلف در شرایط ذخیره‌سازی بر درصد جوانه‌زنی بذر مصنوعی ارکیده خربقی معمولی پس از کشت

در برخی از پژوهش‌ها مشخص شده که نور قرمز باعث رشد بیشتر بخش هوایی گیاه می‌شود (۳، ۵ و ۱۶). در سال‌های اخیر، پیشرفت چشمگیری در فناوری تولید بذر مصنوعی حاصل شده است. بذرهای مصنوعی روشی مناسب جهت تکثیر گیاهانی است که قادر به تولید بذر طبیعی نیستند یا تعداد کمی بذر بارور تولید می‌کنند. تکنیک بذر مصنوعی روشی ساده و ارزان برای تکثیر گیاهان کشت بافت و روشی برای کاشت مستقیم بذر کپسوله شده در مزرعه است. این فناوری را می‌توان روشی امیدوارکننده برای تکثیر ساده، سریع، پایدار و بسیار مقرون به صرفه گیاهان در معرض خطر در نظر گرفت. این روش نه تنها شرایط ذخیره کوتاه، میان مدت ریزنمونه‌های محصور شده را فراهم می‌کند، بلکه می‌تواند برای برنامه‌های تبادل ژرم پلاسما و حفاظت طولانی مدت نیز مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، تحقیقات بیشتر برای تولید بذر مصنوعی با کیفیت بالا و بهینه‌سازی ذخیره‌سازی آن‌ها بدون آسیب رساندن به گیاه، لازم است. در مطالعه حاضر با استفاده از طیف‌های مختلف نور ال ای دی برای ذخیره‌سازی بذر مصنوعی ارکیده خربقی معمولی و تاثیر آن در جوانه‌زنی پس از کشت کپسول‌ها، بیشترین درصد جوانه‌زنی در نورهای قرمز و سبز مشاهده شد.

References

۱. دیانتي، ش. ۱۳۹۲. مطالعه جوانه‌زنی، انتقال به مرحله گلدهی و بیان برخی ژن‌های مربوط به آن در چند گونه ارکیده ایرانی. (رساله دکتری). دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی
2. **Arditti, J. (2009).** Micropropagation of orchids, John Wiley & Sons.
3. **Appelgren, M. (1991).** Effects of light quality on stem elongation of *Pelargonium* in vitro. *Scientia Horticulturae*, 45, 345-351.
4. **Bae, K. H., Oh, K. H., Kim, S.-Y. (2014).** Sodium hypochlorite treatment and light-emitting diode (LED) irradiation effect on in vitro germination of *Oreorchis patens* (Lindl.) Lindl. *Journal of Plant Biotechnology*, 41, 44-49.
5. **Da Silva, M. M., Debergh, P. (1997).** The effect of light quality on the morphogenesis of in vitro cultures of *Azorella vidalii* (Wats.) Feer. *Plant cell, tissue and organ culture*, 51, 187-193.
6. **Garay, L. A. (1960).** On the origin of the Orchidaceae. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 19: 57-96.



7. **Griesbach, R. (2002).** Development of Phalaenopsis orchids for the mass-market. Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, 458-465.
8. **Godo, T., Fujiwara, K., Guan, K., Miyoshi, K. (2011).** Effects of wavelength of LED-light on in vitro asymbiotic germination and seedling growth of *Bletilla ochracea* Schltr.(Orchidaceae). Plant Biotechnology, 28, 397-400.
9. **Haque, S. M., Nahar, S. J., Kazuhiko, S. (2017).** Effect of Light Quality, Sucrose and Trehalose on In Vitro Organogenesis of *Cymbidium devonianum* (Lindl.). Notulae Scientia Biologicae, 9, 89-93.
10. **Mohanraj, R., Ananthan, R., V. Bai. (2009).** Production and storage of synthetic seeds in *Coelogyne breviscapa* Lindl. Asian J. Biot. 1: 124-128.
11. **Mitra, G. (1971).** Studies on seeds, shoot-tips & stem-discs of an orchid grown in aseptic culture. Indian journal of experimental biology.
12. **Rannback, L.-M. (2007).** Propagation, cultivation and breeding of terrestrial temperate orchids, with focus on *Cypripedium* spp.
13. **Ravi, D. & Anand, P. (2012).** Production and applications of artificial seeds: a review. Int. Res. J. Biol. Sci. 1: 74-78
14. **Saiprasad, G. & Polisetty, R. (2003).** Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 39, 42-48.
15. **Sharma, S. & Shahzad, A. (2012).** Encapsulation technology for short-term storage and conservation of a woody climber, *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 111, 191-198.
16. **Shin, K. S., Murthy, H. N., Heo, J. W., Hahn, E. J., Paek, K. Y. (2008).** The effect of light quality on the growth and development of in vitro cultured *Doritaenopsis* plants. Acta Physiologiae Plantarum, 30, 339-343.
17. **Wollaeger, H. M. & Runkle, E. S. (2014).** Growth of impatiens, petunia, salvia, and tomato seedlings under blue, green, and red light-emitting diodes. HortScience, 49, 734-740.



Effect of different light spectra on germination percentage of stored artificial seeds of Iranian native orchid (*Epipactis veratrifolia*)

Zahra Mahdavi^{1*}, Shirin Dianti², Sasan Aliniaefard², Ali Fadavi³

¹Department of Horticulture, Abu Rihan Campus, University of Tehran, Iran.

²Assistant Professor, Department of Horticulture, Aburaihan College, University of Tehran, Iran.

³Associate Professor of Department of Food Technology, Aburaihan College, University of Tehran, Iran.

Email: Zahra.mahdavi@ut.ac.ir

Abstract

Artificial seed technology is a new method of micropropagation and multiplication, especially plants that do not produce seeds, transgenic plants, and other plants that need to maintain superior characteristics through asexual reproduction. The production of artificial seeds is a very valuable tool for the protection and storage of orchid protocorm, especially endangered native species, and the use of its economic and scientific potential for the export and supply of this product in the world. This study was examined, the effect of 5 different spectra of LED light: blue, red, green, far-red, white with an intensity of 80 $\mu\text{mol} / \text{m}^2$ and dark conditions on storage and then on the germination percentage of protocorm encapsulated common orchid (*Epipactis veratrifolia*). The results showed that the highest germination percentage of artificial seeds after culturing was related to green and red light conditions and the lowest was related to darkness. No significant difference was observed between other far-red, blue, and white light treatments.

Keywords: Protocorm, In vitro culture, Encapsulation, LED light

بررسی عوامل مؤثر بر جوانه زنی غیر همزیست در ثعلب ارغوانی (*Orchis mascula*)

مژگان فتاحی^{۱*}، یاور وفایی^۲، فرزاد نظری^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Email: Mozhganfatahi72@gmail.com

چکیده

خانواده ارکیدسانان در ایران دارای ۴۶ گونه و زیر گونه می باشد که ۳۶ گونه غده تشکیل داده و برای تولید ثعلب استفاده می شوند. بیش تر گونه های خانواده ارکیدسانان در لیست قرمز گونه های کمیاب و در معرض خطر قرار دارند. برداشت ثعلب در ایران به دلیل افزایش تقاضا از کشورهای ترکیه، پاکستان و هندوستان افزایش پیدا کرده است؛ بنابراین همسو با سایر کشورها، لزوم انجام پژوهش های کاربردی برای حفظ گونه ها و تجاری سازی تکثیر آن ها کاملاً روشن می نماید. در مطالعه حاضر تأثیر ترکیبات آلی (آب آناناس و آب نارگیل) و ترکیبات نیتروژن دار (آمینون، پپتون و کازئین هیدرولیزات) در محیط کشت تغییر یافته مالمگرن بر درصد و سرعت جوانه زنی، طول گیاهچه، قطر و طول ساقه، وزن، طول و عرض پروتوکورم، تعداد غده و ریشه در *Orchis mascula* مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج حاصل در این تحقیق، بیش ترین درصد جوانه زنی در تیمارهای آب نارگیل به همراه پپتون با ۲۵/۹۶۴٪ و آب آناناس به همراه آمینون و پپتون با ۲۵/۸۶٪ حاصل گردید.

کلمات کلیدی: انقراض؛ ترکیبات آلی؛ ترکیبات دارای نیتروژن؛ ثعلب ارغوانی؛ جوانه زنی غیر همزیست

مقدمه

خانواده ارکیدسانان^۱، بعد از خانواده کاسنیان از بزرگترین خانواده های گیاهی می باشد که ۷-۱۱٪ از کل گیاهان گلدار در دنیا را شامل می شوند. این خانواده گیاهی دارای ۵ زیر خانواده با ۷۳۶ تا ۹۰۰ جنس (۶) و تقریباً ۲۵۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ گونه است (۱۴) که این تعداد هر ساله افزایش می یابد. این خانواده گیاهی در سراسر جهان به جز قطب جنوب، با بیش ترین تنوع در مناطق جنوب شرقی آسیا، جنوب آمریکا و آمریکای مرکزی یافت می شود. تقریباً هفتاد درصد کل گونه های ارکید دارزی (اپیفیت) هستند اما گونه های خاکزی، سنگزی نیز یافت می شوند (۱۱). خانواده ارکیدسانان در ایران دارای ۴۶ گونه و زیر گونه می باشد که ۳۶ گونه غده تشکیل داده و برای تولید ثعلب استفاده می شوند (۹). بیش تر گونه های خانواده ارکیدسانان در لیست قرمز گونه های کمیاب و در معرض خطر گیاهان وحشی و حیوانات (CITES)^۲ قرار دارند (۱۷). خطر انقراض گونه های ارکید به دلایلی از قبیل جاده سازی، دست کاری زمین ها، تغییرات آب و هوایی، جمع آوری بیش از حد و تجارت غیر قانونی می باشد (۱۵). برداشت ثعلب در ایران به دلیل افزایش تقاضا از کشورهای ترکیه، پاکستان و هندوستان افزایش پیدا کرده است، به طوری که سالانه حدود ۱۱ - ۷ میلیون بوته ارکید در ایران برداشت می شود که این حجم برداشت، این گونه های دارویی را در خطر جدی انقراض قرار داده است (۸). بنابراین همسو با سایر کشورها، لزوم انجام پژوهش های کاربردی برای حفظ گونه ها و

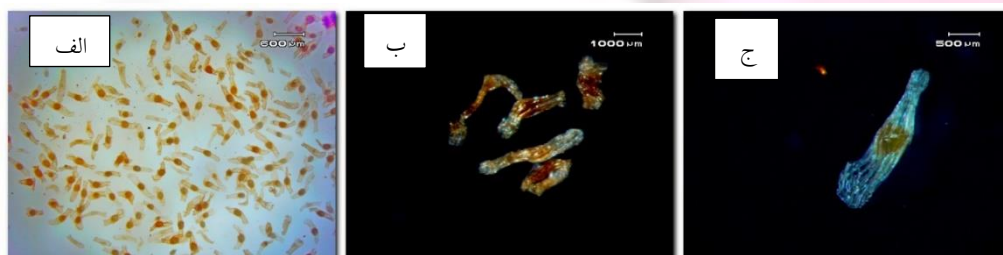
¹ Orchidaceae

² Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

تجاری سازی تکثیر آن‌ها کاملاً روشن می‌نماید. بذرهای ارکید دارای جنین تمایز نیافته با مقدار کمی آندوسپرم یا بدون آندوسپرم و یا هر گونه بافت ذخیره‌ای دیگری هستند (۴). بذرهای ارکید بسیار کوچک هستند به طوری که ۰/۰۵ تا ۰/۰۶ میلی‌متر طول، ۰/۰۱ تا ۰/۰۳ میلی‌متر عرض و ۰/۳ تا ۱۴ میکروگرم وزن دارند (۵). قیمت بالای غده‌های ثعلب باعث ایجاد رقابت بین جمع‌کنندگان ثعلب شده است. از طرفی دیگر، فرآیند جوانه‌زنی پیچیده و داشتن رابطه همزیستی با قارچ‌ها و طولانی بودن چرخه زندگی ارکیدها (حدود پنج تا ده سال طول) در شرایط طبیعی باعث ایجاد محدودیت‌هایی در تکثیر این گونه‌ها شده است (۱). با توجه به این شرایط یافتن راهکاری کارآمد برای حفاظت از ارکیدها امری ضروری می‌باشد. بسیاری از محققان، جوانه‌زنی درون شیشه‌ای بذر را راهکاری کارآمد برای حفاظت از ارکیدها پیشنهاد کرده‌اند. *Orchis mascula* یکی از گونه‌های معمول در کمربندهای زیستی مناطق معتدله است که اکثراً به علت تشابه برخی جنس‌ها و گونه‌های خویشاوند، در شناسایی با آن اشتباه گرفته می‌شوند. معمولاً در جمعیت‌های بسیار کوچک و به صورت تنک با گل‌هایی به رنگ صورتی تیره یا گاهی روشن با محوری بلند دیده می‌شود. دوره گلدهی آن به نسبت کوتاه بوده و حضور در چمن‌زارهای ارتفاعات بالا، باعث آسیب‌پذیری آن در برابر چرای دام و تردد می‌شود (۲).

مواد و روش‌ها

کپسول‌های حاوی بذرهای بالغ *Orchis mascula* در تابستان سال ۹۸ از استان کرمانشاه (شهرستان پاوه) جمع‌آوری شدند. بعد از جمع‌آوری، کپسول‌ها در دمای اتاق و رطوبت هوای نرمال قرار داده شد تا رطوبت بذرها از بین برود. سپس بذرهای از کپسول‌ها خارج شدند و تا زمان استفاده درون لوله‌های آزمایشگاهی درب بسته در یخچال نگهداری شدند. قبل از کشت بذرهای جهت اطمینان حاصل کردن از زنده بودن بذرهای، آزمون تترازولیوم انجام شد (۱۰). در این پژوهش از هیپوکلیت سدیم با غلظت ۰/۵ درصد به مدت زمان ۱۵-۱۰ دقیقه، به منظور انجام فرآیند ضدعفونی استفاده شد.



شکل ۱. الف) نتایج حاصل از آزمون تترازولیوم؛ ب) بذر *O. mascula* قبل از ضدعفونی؛ ج) بذر *O. mascula* بعد از ضدعفونی.

در مطالعه حاضر تأثیر ترکیبات آلی (آب آناناس و آب نارگیل) و ترکیبات نیتروژن دار (آمینوون، پپتون و کازئین هیدرولیزات) در محیط کشت تغییر یافته مالمگرن بر درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول و وزن گیاهچه، قطر و طول ساقه، وزن و طول عرض پروتوکورم، تعداد غده و ریشه در *Orchis mascula* بررسی شد. ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت تغییر یافته مالمگرن (۱۳) در تحقیق حاضر شامل KH_2PO_4 و $(\text{Ca})_3(\text{PO}_4)_2$ ۰/۰۹ g/l، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۰/۱۸۴ g/l، آمینوون ۴ ml/l، پپتون ۱ g/l، کازئین هیدرولیزات



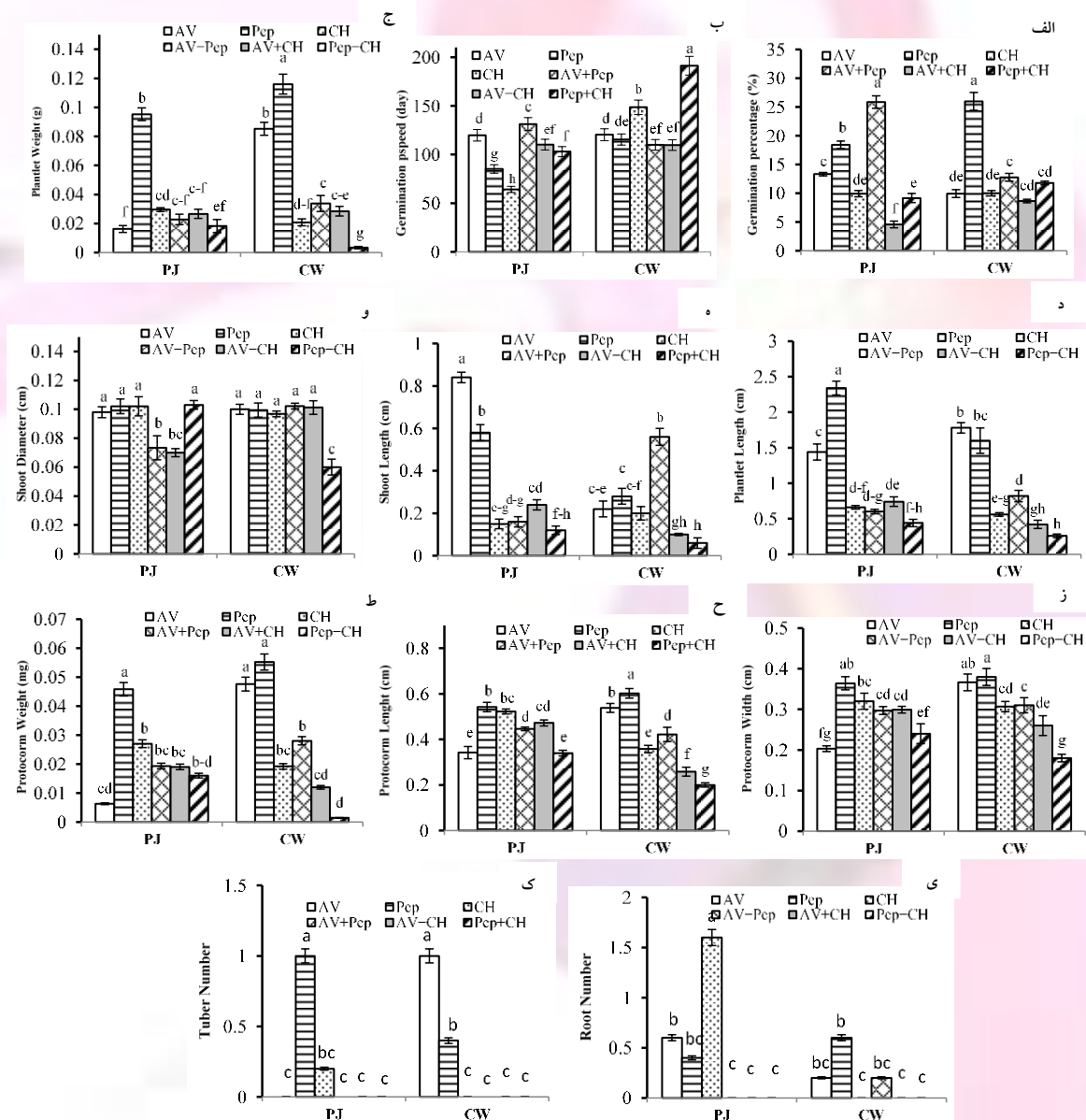
g/l ۲، آب آناناس ml/l ۲۰، آب نارگیل ml/l ۱۵۰ و شکر، زغال و آگار نیز به ترتیب g/l ۱۰، ۱ و ۵ بود. pH محیط نیز روی ۵/۸ تنظیم شد. در این مرحله شیشه‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۲۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از رشد پروتوکورم‌ها به اندازه تقریباً ۳-۵ میلی‌متر، شیشه‌ها به سردخانه با دمای ۴ درجه سلسیوس و با همان شرایط تاریکی به مدت دو ماه انتقال داده و در پایان دوره سرمادهی پروتوکورم‌ها، شیشه‌ها به اتاق رشد با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و شرایط روشنایی ۱۶/۸ ساعت تاریکی/روشنایی منتقل شدند. سه ماه بعد از انتقال مجدد پروتوکورم‌ها به اتاق رشد با استفاده از کولیس و ترازو صفات مورفولوژیک دانه‌های هر تیمار در ۵ تکرار اندازه گرفته شد و داده‌های به دست آمده برای هر تیمار یادداشت شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از طرح کرت‌های خرد شده با ۵ تکرار (۵ شیشه آزمایش) استفاده شد. در کل ۱۲ تیمار در ۵ تکرار برای جوانه‌زنی اعمال شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام شد. همچنین برای تهیه نمودارها از نرم افزار Excel 2016 استفاده شد.

نتایج و بحث

یکی از مشکلات جوانه‌زنی ارکیدهای خاکزی در مقایسه با ارکیدهای گرمسیری یا زینتی این است که محیط کشت‌های مرسوم همانند Mid and Balard, Knudson C, MS, Fast, Queiris, Vacin and Went و Mitra برای این گونه‌های خاکزی بسیار غلیظ هستند از طرف دیگر سطوح بالای نیتروژن در فرم‌های نیترات و آمونیوم (نیتروژن غیر آلی) برای بذر سمیت ایجاد می‌کنند (۷). استفاده از یک ترکیب آلی مناسب مثل آب آناناس، شیر نارگیل، سیب‌زمینی پخته، و یا ترکیبات مشابه دیگر از اهمیت بسیاری برخوردار است. این ترکیبات غنی از ویتامین‌ها، هورمون‌های گیاهی و انرژی می‌باشند، که اغلب در مناسب‌ترین ترکیبات و غلظت‌ها برای تکثیر ارکیدها هستند. بخشی از این محتویات شناخته شده و بخشی نیز هنوز شناسایی نشده‌اند، اما تأثیر آن در بسیاری از موارد خیلی خوب است (۱۳). غلظت بالای نیتروژن غیر آلی به‌ویژه نیترات می‌تواند تأثیر منفی بر جوانه‌زنی ارکید داشته باشد (۱۳)؛ به علاوه جوانه‌زنی غیرهمزیست اغلب بهترین عملکرد را با نیتروژن آلی دارد (۱۳، ۱۶). طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه (شکل-۳)، بیش‌ترین و کم‌ترین درصد جوانه‌زنی به ترتیب در تیمار آب نارگیل به همراه پپتون با ۲۵/۹۶۴٪، آب آناناس به همراه آمینوون و پپتون با ۲۵/۸۶٪ و تیمار آب آناناس به همراه آمینوون و کازئین هیدرولیزات با ۴/۶۰۴٪ مشاهده گردید؛ که با توجه به پایین بودن قوه نامیه بذرهای کشت شده (۴۰٪) این نتایج تا حدی قابل قبول می‌باشد. نتایج حاصل با نتایج تحقیقات پیشین در رابطه با تأثیر مثبت ترکیبات آلی و ترکیبات دارای نیتروژن آلی بر جوانه‌زنی و رشد پروتوکورم‌های ارکیدها همسو بود.



شکل ۲. مراحل جوانه‌زنی غیر همزیست در *O. mascula*. (الف) کپسول حاوی بذرهای نابالغ، (ب) بذرهای نابالغ، (ج) بذرهای کشت شده بر روی محیط کشت در مرحله پیش از جوانه‌زنی و متورم شدن جنین، (د) جوانه‌زنی به همراه تشکیل پروتوکورم و ریزوئید، (ه) خروج کامل جنین از پوشش بذر، (و) پروتوکورم از نمای نزدیک به همراه ریزوئیدها که نوک گیاهچه در انتها قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر تیمارهای مورد مطالعه بر (الف) درصد جوانه زنی (ب) سرعت جوانه زنی (ج) وزن گیاهچه (د) طول گیاهچه (ه) طول ساقه (و) قطر ساقه (ز) عرض پروتوکورم (ح) طول پروتوکورم (ط) وزن پروتوکورم (ی) تعداد ریشه (ک) تعداد غده در *O. mascula*. PJ: آب آناناس؛ CW: آب نارگیل؛ AV: آمینون؛ Pep: پیتون؛ CH: کازئین هیدرولیزات. ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند.

References

- دیانتی، ش. کافی، م. میرمعصومی، م. مظفریان، و. و سلامی، ع. ۱۳۹۲. معرفی محیط کشت مناسب برای جوانه زنی غیرهم زیست ارکیده خاگروی خربقی معمولی (*Epipactis veratrifolia*) (Boiss.&Hohen). به زراعی کشاورزی، جلد ۱۵، شماره ۲، صفحات ۱۷۷-۱۶۱.
- زارع، ح. امینی، ط. و جعفری گرزین، ب. ۱۳۹۸. ثعلب‌ها و تنوع زیستی آن‌ها در رویشگاه‌های کاسپینی. طبیعت ایران، جلد ۴، شماره ۱، صفحات ۸۰-۹۳.



۳. محمدیان، ح. ۱۳۷۶. گل‌های ارکید ایران. چاپ اول، انتشارات راهنما، ۱۲۷ صفحه.

4. **Arditti, J. (1992).** Fundamentals of orchid biology. John Wiley & Sons.
5. **Arditti, J. & Ghani, A. (2013).** Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications (vol 145, pg 367, 2000).
6. **Christenhusz, M.J. & Byng, J.W. (2016).** The number of known plants species in the world and its annual increase. Phytotaxa, 261: 201-217.
7. **Dianati, D.S., Kafi, M., Salami, S.A. (2017).** Improvement of asymbiotic germination of *Epipactis veratrifolia*. Iranian Journal Of Horticultural Sciences. 48: 73-78.
8. **Ghorbani, A., Gravendeel, B., Zare, S., De Boer, H.J. (2014a).** Illegal wild collection and international trade of CITES-listed terrestrial orchid tubers in Iran. TRAFFIC Bulletin, 26: 52-58.
9. **Ghorbani, A., Zarre, S., Gravendeel, B., de Boer, H.J. (2014b).** Illegal wild collection and international trade of CITES-listed terrestrial orchid tubers in Iran. Traffic Bulletin, 26: 52-58.
10. **Hosomi, S.T., de Souza, T.B., Custódio, C.C., Neto, N.B.M. (2017).** Refining the tetrazolium test for evaluation of *Cattleya labiata* and *C. tigrina* seeds viability. Australian Journal of Crop Science, 11: 1320.
11. **Kauth, P.J., Dutra, D., Johnson, T.R., Stewart, S.L., Kane, M.E., Vendrame, W. (2008).** Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues, 5: 375-391.
12. **Malmgren, S. (1989).** Asymbiotisk förökning från frö av guckusko, flugblomster, brunkulla och några andra svenska orkidéarter. Svensk Botanisk Tidskrift, 83: 347-354.
13. **Malmgren, S. (1996).** Orchid propagation: theory and practice. In: C. Allen (Editor), North American native orchids: propagation and production., Germantown, Maryland, USA, pp. 63-71.
14. **Morton, W.G. (2015).** Isolating mycorrhizal fungi from *Spiranthes vernalis* for subsequent in vitro seed germination, Southern Illinois University at Edwardsville.
15. **Pant, B., Swar, S., Gurung, R. (2007).** Current Status and ex situ conservation of threatened orchids of Nepal, Proceedings of 9th Asia Pacific Orchid Conference (APOC 9), Seoul, Korea.
16. **Rasmussen, H.N. (1995).** Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press.
17. **Valletta, A. (2008).** In vitro asymbiotic germination of *Orchis mascula* L, Plant Biosystems, 142: 653-655.



Investigation of factors affecting asymbiotic germination in *Orchis mascula*

Mozhgan Fatahi^{*1}, Yavar Vafae², Farzad Nazari²

¹M.Sc. Student, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

²Assistant of Professor, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Email: Mozhganfatahi72@gmail.com

۵۳

Abstract

The family of orchids in Iran has 50 species and subspecies, which form 36 species of tubers and are used to produce salep. Most species of the orchid family are on the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). The harvest of salep in Iran has increased due to increased demand from Turkey, Pakistan and India; Therefore, in line with other countries, the need for applied research to preserve species and commercialize their reproduction is quite clear. In the present study, the effect of organic compounds (pineapple juice and coconut water) and nitrogenous compounds (aminoven, peptone and casein hydrolyzate) in Malmgren modified culture medium on germination percentage and speed, seedling length, stem diameter and length, weight, length and width of protocorm, the number of tubers and roots in the *Orchis mascula* was examined. According to the results of this study, the highest germination percentage was obtained in coconut water treatments with peptone with 25.96% and pineapple juice with aminoven and peptone with 25.86%.

Keywords: Asymbiotic germination; Extinction; *Orchis mascula*; Nitrogen compounds; Organic compounds



موقعیت سیستماتیکي جنس *Corybas* در زیر قبيله *Acianthinae* بر اساس آنالیز توالی های *matK* در جزیره مالزی

شهلا حسینی*

استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Email: sh.hosseini@uok.ac.ir

چکیده

زیرقبيله *Acianthinae* دارای پنج جنس است که جنس *Corybas* با ۱۴۰ گونه بیشترین تعداد گونه ها را دارا می باشد. گونه های این جنس خاص مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آسیا تا اقیانوس آرام شامل جزایر ساب آنتراکتیک هستند. از مجموع یازده گونه گزارش شده برای جزیره مالزی، ۸ گونه بومی این منطقه است و این گونه ها در لیست گونه های در معرض انقراض قرار دارند. در مطالعه حاضر موقعیت فیلوژنتیک گونه های جنس *Corybas* در بین تعدادی از گونه های زیر قبيله *Acianthinae* بر اساس توالی های *matK* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آنالیز فیلوژنی نشان داد که این زیر قبيله تک نیا بوده و گونه های جنس *Corybas* با حمایت شاخه ایی بالا درون سایر گونه های این زیر قبيله قرار گرفته است. نتایج پیشنهاد می کند که گونه *C. neocaledonicus* از زیر جنس *Corybas* جدا و در زیر جنس *Corysanthes* قرار بگیرد و همچنین ادغام زیر جنس *Acianthella* در جنس *Stigmatodactylus* حمایت نشده است و احتمالاً این گروه همچنان باید تحت جنس *Acianthus* باقی بماند.

کلمات کلیدی: ارکید، فیلوژنی، *Corybas*، *matK*

مقدمه

خانواده ارکید یکی از پیشرفته ترین خانواده های گیاهی در بین نهاندانگان است و تعداد ۹۷۲ گونه در ۱۴۶ جنس در شبه جزیره مالزی شناخته شده است که ۱۹۸ گونه (۲۱/۸٪) بومی این منطقه است (۳). زیرقبيله *Acianthinae* با حدود ۱۷۰ گونه شناخته شده، برای اولین بار توسط رودولف شلشر^۱ (۱۹۲۳) شناخته شد و در قبيله *Diurideae* قرار گرفت. این گروه در درجه اول با صفات رویشی از جمله، داشتن تنها یک برگ نازک، قلبی شکل و غده های کوچک تقریباً کروی زیر زمینی شناخته می شود. بر اساس چک لیست گیاهان نهاندانه کیو و همچنین مطابق نظر چیس و همکاران (۲)، زیرقبيله *Acianthinae* دارای پنج جنس است شامل *Acianthus* (۲۰~ گونه)، *Cyrtostylis* (۶~ گونه)، *Stigmatodactylus* (۱۰~ گونه)، *Townsonia* (۲~ گونه) و *Corybas* (۱۴۰~ گونه) (۷). تمام گونه هایی که در این جنس ها قرار دارند جز ارکیدهای زمینی کوچک هستند که با حشرات گرده افشانی می شوند. در حالیکه اشکال رویشی نسبتاً درون گروه ها یکسان است، تنوع اندام گل درون این زیر قبيله بسیار زیاد است به خصوص درون جنس بزرگ *Corybas* (۷).

¹ Rudolf Schlechter

این گروه بسیار کم مورد مطالعه قرار گرفته است و برای انجام مطالعات تکاملی به طور ویژه حائز اهمیت هستند. لازم به ذکر است مطالعه وسیعی با حجم گونه های بالا در دانشگاه ویسکانسین توسط لیون (۷) انجام شده است که هنوز نتایج این پروژه و داده های آن در قالب مقاله منتشر نشده است.

یکی از عجیب ترین جنس های این زیر قبیله، جنس *Corybas* است. یک گونه علفی غده دار که تنها یک برگ و یک گل دارد. این گونه ها نیز خشکی زی و زمینی هستند و تنها در جنگل های کوهستانی خزه دار با ارتفاعات بیش از ۱۰۰۰ متر در حوزه های آهکی مرطوب یافت می شوند. گونه های این جنس از هیمالیا تا جنوب چین، مجمع الجزایر مالزی، پلی نزی، گینه نو و استرالیا توزیع شده اند (۶ و ۷). از میان حدود ۱۴۰ گونه شناخته شده در جهان، یازده گونه در شبه جزیره مالزی ثبت شده است که هشت گونه از جمله گونه ی کاملاً شناخته شده ی *Corybas caudatus*، بومی این منطقه هستند (۱۰، ۱۱ و ۱۴).

رنگ جذاب گل و ریخت شناسی غیرمعمول *Corybas* باعث شده است که به این جنس اسامی مانند ارکید عنکبودی یا ارکید کلاه خودی بدهند. این گونه دارای یک ساقه باریک است و یک گل را درست بالای برگ کوچک قلبی شکلش که دارای رگه های سبز کم رنگ، سفید یا قرمزا است، حمل می کند. گونه های این جنس، گیاهانی کوچک با ارتفاع فقط چند سانتی متر هستند. در بین سه کاسبرگ، کاسبرگ پشتی بزرگ و از قسمت پایه با یک راس قلاب مانند ایستاده است. کاسبرگ های جانبی و گلبرگها باریک و نخ مانند هستند و گاهی طویل تر از کل گل هستند. قسمت لب از یک پایه لوله ای برآمده و دارای دو زائده ی خار کوتاه است (۴). همانطور که توسط هولتوم (۵) اشاره شده است، دم گل در *Corybas* کوتاه است ولی در دوران تولید میوه دم گل کشیده می شود. این خاصیت به پراکنش بهتر دانه ها کمک می کند. گونه های جنس *Corybas* ارتفاعات و کوهستان را ترجیح می دهند تا محیط مناسبی برای رشد آنها فراهم شود. در شبه جزیره مالزی، جنگل های کوهستانی با میزان رطوبت بالا، درختان پوشیده از خزه و بستر ضخیم کف جنگل ها، رشد گونه های *Corybas* را حمایت می کنند. بیشتر گونه ها در لایه خزه ها و صخره ها رشد می کنند. برخی از گونه ها، مانند *C. ridleyanus*، *C. Holtumii* و *C. villosus*، که در شکل ۱ نشان داده شده است (۴)، اغلب در میان پوششی از خزه اسفاگونوم رشد می کنند، که این خود ممکن است به تکثیر و رشد آنها کمک کند.

تغییرات آب و هوا و فعالیت های انسانی روی زیستگاه بسیاری از موجودات زنده، به ویژه گونه های مرتفع تأثیر گذاشته است. ارتفاعات گنتینگ و ارتفاعات کامرون دو منطقه مرتفع در شبه جزیره مالزی هستند که به شدت تقسیم شده و به نقاط محبوب گردشگری بوم گردی تبدیل شده اند. محیط طبیعی و اکولوژی عمومی آن به طور جدی تغییر یافته است. از جمله جمعیت ارکیدها، و گونه هایی که به تغییرات شدید محیطی حساس هستند، در معرض نابودی قرار دارند. تمام گونه های *Corybas* در شبه جزیره مالزی از سال ۲۰۰۳ در ضمیمه CITES ذکر شده اند (۱). بدون شک، گونه های *Corybas* شایسته توجه و تلاش حفاظتی هستند زیرا از دست دادن آنها می تواند تأثیرات مخربی بر موجودات گرانبهای دیگر در اکوسیستم ایجاد کند. آنها "پاندهای" جهان ارکیده در نظر گرفته می شوند. ارتفاعات گنتینگ و ارتفاعات کامرون در جزیره مالزی دو منطقه اصلی هستند که در اثر فعالیت های پاکسازی جنگل با افزایش دما تهدید می شوند. در نتیجه، زیستگاه های طبیعی بسیاری از ارکیدها از بین رفته است (۴).



جنس *Corybas* به دو بخش تقسیم شده است. بخش *Corybas* با دو خار در قاعده لیپ و بخش *Steleocorys* با قاعده بدون خار ولی همراه با دو شیار. بخش *Corybas* به دو زیر بخش *Corybas* و *Gastrosiphon* تقسیم می‌شود که تمام گونه های مالزی، به استثنای گونه *Corybas fornicatus* (Blume) Rchb.f. متعلق به زیر بخش *Corybas* هستند (۲ و ۶).

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین و درون گونه ایی جنس *Corybas* در لابه لای تعدادی از گونه های دیگر از زیر قبیله *Acianthinae* بوده است تا رابطه خویشاوندی گونه های تعیین توالی شده مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از توالی‌های مربوط به ناحیه *matK* موجود در وب سایت NCBI، استفاده شد که بیشتر گونه های مورد نظر از جزیره مالزی جمع آوری شده و توسط روزیا گو و تن میو چین (۴) تعیین توالی شده اند.

آنالیز فیلوژنتیک داده‌ها

تعیین توالی چندگانه با استفاده از Clustal W (۱۳) با دستور قراردادی موجود در نرم افزارهای Mega 4 و BioEdit انجام گرفت. توالی‌های پیش رو و معکوس هماهنگ شده و با همدیگر مقایسه شدند. قسمت پرایمر از ابتدای هر توالی حذف شد زیرا توالی های حاوی صفات مورد استفاده نباید محتوی پرایمر باشند. بنابراین انتهای توالی‌ها با همدیگر هماهنگ شده و توالی های ناهماهنگ از مجموعه حذف شدند. داده‌ها برای هر ناحیه ژنی با استفاده از نرم افزار PAUP* 4.0b10 (۱۲) به صورت دستی منظم شدند.

به همه صفات به صورت یکسان وزن داده شد و جاهای خالی به عنوان داده های گم در نظر گرفته شد. آنالیز فیلوژنتیک با هزار تکرار با اضافه شدن مرحله ایی تصادفی تاکسون ها به منظور دست یافتن به درختانی با بیشینه صرفه جویی انجام شد و در هر مرحله ده درخت نگهداری شد. حمایت شاخه ها نیز بر اساس ۱۰۰۰ تکرار بوت سترپ و اضافه شدن مرحله ایی تصادفی تاکسون ها انجام شد.

نتایج و بحث

در آنالیز حاضر ماتریکس داده های توالی *matK* با استفاده از داده های ژن بانک NCBI تهیه گردید. نتیجه آنالیز فیلوژنتیک داده ها، تک نیا بودن این زیر قبیله را بر اساس گونه های مورد آنالیز تایید می‌کند (شکل ۲). در این درخت دو شاخه اصلی قابل مشاهده است که در این دو شاخه جنس های *Stigmatodactylus*، *Acianthus*، *Cyrtostylis* و *Corybas* با درصد حمایت شاخه ایی بالا (BP= 100)، تک نیا هستند. بر اساس نتایج، جنس *Corybas* با گونه های انتخابی از جزیره مالزی با حمایت شاخه ایی بالا گروه خواهری با سایر جنس‌ها در زیر قبیله *Acianthinae* می باشد.

در شاخه نخست، جنس *Acianthus* به دو زیر شاخه تقسیم شده است که در زیر شاخه اول زیر جنس های *Acianthella*، *Stigmatodactylus* و *Acianthopsis* قرار دارند. این رده بندی توسط جونز و کلمنتس (۶) بوده است و بر اساس صفات ریخت شناسی تطابق دارد. ولی نتایج تحقیق لیون (۸) نشان داد که این سه زیر جنس براساس آنالیز توالی‌های هسته‌ای و کلروپلاستی می‌بایست در جنسی مشترک به نام



Stigmatodactylus قرار بگیرند. که نتایج آنالیز حاضر این شاخه را به عنوان گروهی چند نیا معرفی می کند که گونه *S. sikikiamus* با حمایت شاخه ایی پایین (BP=63) در بین گونه های جنس *Acianthus* قرار گرفته است. به نظر می رسد جدا شدن گونه *S. sikikiamus* در سطح جنس تا حدودی منطقی باشد ولی ماندن سه گونه دیگر همچنان در جنس *Acianthus* پیشنهاد می شود. هر چند صحت این رده بندی نیاز به آنالیز داده های بیشتر دارد.

در زیر شاخه دوم جنس *Acianthus* و *Corybas* گروه های خواهری تشکیل داده اند. اگر چه گونه *Cyrtostylis huegelii* با حمایت شاخه ایی پایین (BP=55) در بین آن ها قرار گرفته است.

دومین شاخه بزرگ این آنالیز تمام گونه های مطالعه شده از جزیره مالزی است که همه در زیر جنس *Corybas* قرار گرفته اند. این رده بندی مطابق با نظر جونز (۶) و لیون (۷) می باشد. این شاخه نیز خود به سه زیر شاخه تقسیم شده است که با حمایت شاخه ایی قوی (BP=100) هر سه زیر شاخه گروه های خواهری هستند.

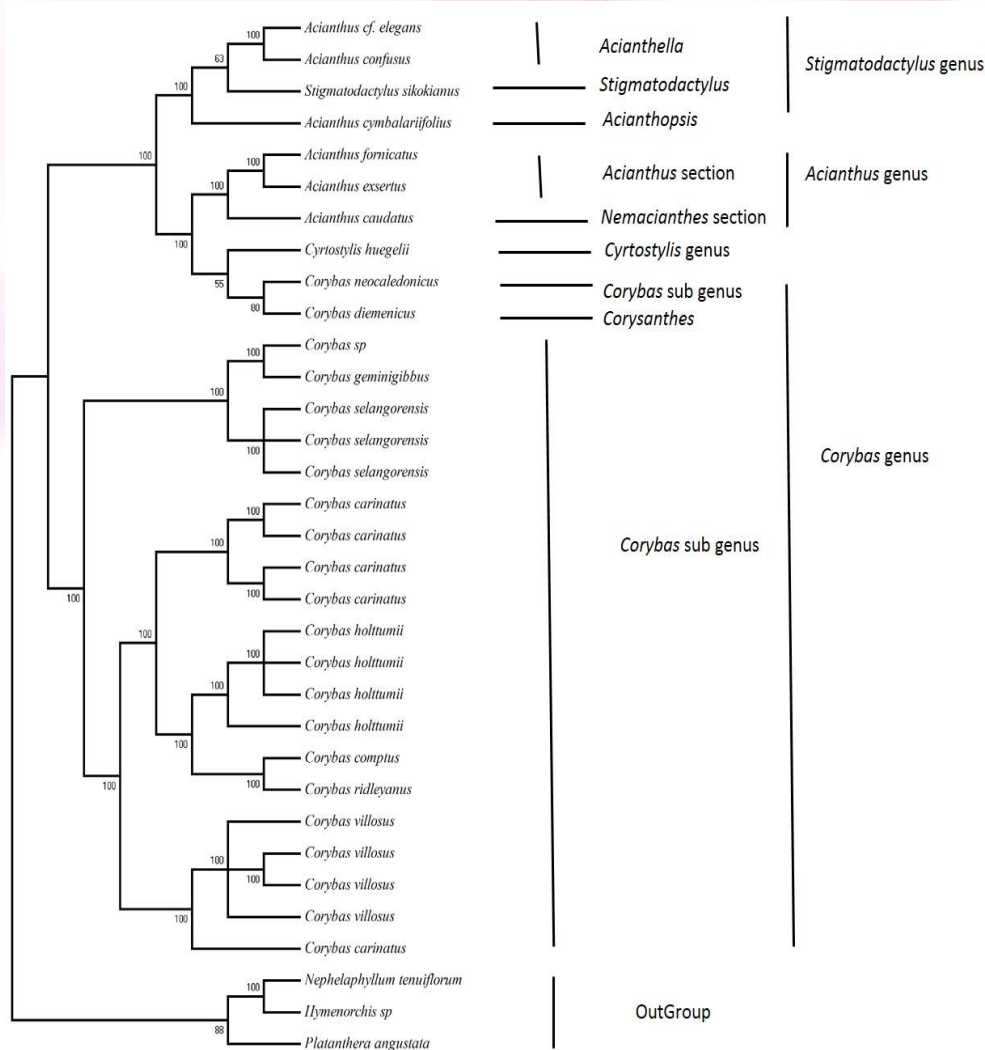
بنا بر نتایج این آنالیز گونه *C. neocaledonicus* با حمایت شاخه ایی نسبتاً بالا (BP=80) می تواند در زیر جنس *Corysanthes* قرار بگیرد و از سایر گونه های زیر جنس *Corybas* جدا شود. صفات ریخت شناختی از جمله طول کاسبرگ کناری، که طول کاسبرگ ها کمتر از نصف طول کاسبرگ پشتی است و همچنین قسمت باد کرده ناحیه پشتی لپ و یا صفت مربوط به ستون که در آن ها توسط لایه شکمی، کوتاه و ضخیم شده است، در هر دو گونه مشترک است.

نتیجه گیری

در آنالیز حاضر روابط خویشاوندی گونه هایی از زیر قبیله *Acianthineae* با تاکید بر جنس *Corybas* از جزیره مالزی مورد بررسی قرار گرفت که این جنس تک نیا تشخیص داده شده است. نتایج مولکولی موقعیت سیستماتیکی تعریف شده بر اساس صفات مورفولوژیک جونز و کلمنتس (۶) و تا حدودی بر اساس صفات مولکولی لیون (۸) را تایید می کند. افتراق گونه *C. neocaledonicus* از زیر جنس و بخش *Corybas* و انتقال آن به زیر جنس *Corysanthes* نیز پیشنهاد شده است.



شکل ۱. A. *Corybas calopeplos* ; B. *Corybas carinatus* ; C. *Corybas comptus* ; D. *Corybas geminigibbus* ; E. *Corybas holttumii* ; F. *Corybas ridleyanus* ; G. *Corybas selangorensis* ; H. *Corybas villosus* . I کف جنگل پوشیده از خزه که محیط مناسب برای رویش *Corybas* است (۳).



شکل ۲. درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده های مربوط به ناحیه *matK* به روش بیشینه صرفه جویی. اعداد بالای شاخه ها به درصد حمایت شاخه مربوط است. موقعیت تاکسون ها مطابق با چهار چوب تعریف شده توسط جونز و کلمنتس (۲۰۰۱) و لیون (۲۰۱۴) است.

Reference

1. **CITES (2009).** Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. <http://www.cites.org/index.html> (accessed 28 January 2010).
2. **Chase, M. W., Cameron, K. M., Barrett, R. L., & Freudenstein, J. V. (2003).** DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. *Orchid conservation*, 69(89), 32.
3. **Go, R., Yong, W.S.Y., Joanes, U. & Salleh, R. (2010).** Orchids of Perlis, jewels of the forest. revised Edition. Jabatan Perhutanan Perlis and Universiti Putra Malaysia, Kuala Lumpur, 152 pp.
4. **Go, R., Tan, M., Naruddin, A., Abdullah, J. O., Ng, Y., Nordin, F. A., . . . Nulit, R. (2015).** Extinction risks and conservation status of *Corybas* (Orchidaceae; Orchidoideae; Diurideae) in Peninsular Malaysia. *Phytotaxa*, 233(3), 273-280.
5. **Holtum, R. E. (1957).** A Revised Flora of Malaya: Orchids of Malaya (Vol. 1): US Government Printing Office.



6. **Jones, D.L., AND M.A. Clements. (2002).** A review of *Pterostylis* (Orchidaceae): 1. A reassessment of *Pterostylis* R. Br. (Orchidaceae). *Australian Orchid Research* 4: 3–63.
7. **Lyon, S. P. (2014).** Molecular systematics, biogeography, and mycorrhizal associations in the *Acianthinae* (Orchidaceae), with a focus on the genus *Corybas*. The University of Wisconsin-Madison.
8. **Lyon, S. P. (2016).** Six new species of New Guinea *Corybas*. *Malaysian Orchid J.*, 18, 85-103.
9. **Schlechter, R. (1923).** *Figuren-Figuren-atlas zu den Orchidaceen von Deutsch-Neu-Guinea* (Vol. 19): *reperorium Specierum Novarum regni Vegetabilis*
10. **Schuiteman, A., de vogel, E., vermeulen, J., Kessler, P. & vogel, A. (2008).** Malesian orchid genera illustrated. Nationaal Herbarium Nederland, Universiteit Leiden.
11. **Seidenfaden, G., Wood, J. J., and Holttum, R. E. (1992).** The orchids of peninsular Malaysia and Singapore: Olsen & Olsen.
12. **Swofford, D. (2002).** PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0 b10: Sinauer Associates, Sunderland, MA.
13. **Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
14. **Turner, I. (1995).** A catalogue of the vascular plants of Malaya. Vol. 1: National Parks Board.



Systematic situation of *Corybas* in subtribe *Acianthinae* based on *matK* sequence analysis in Peninsular Malaysia

Shahla Hosseini*

Associates Professore of Biology department, Faculty of science, University of Kurdistan,
Sanadaj, Iran

Email: sh.hosseini@uok.ac.ir

۶۱

Abstract

The *Acianthinae* subtribe has five genera, of which the genus *Corybas* has the largest number of species with 140 species. Species of this genus are tropical and subtropical from Asia to the Pacific, including sub-Antarctic islands. Among 11 species reported for the island of Malaysia, 8 are endemic to the area and are on the endangered species list. In the present study, the phylogenetic status of *Corybas* species among a number of subspecies of *Acianthinae* was evaluated based on *matK* sequences. The results of phylogenetic analysis showed that this subfamily is a single ancestor and species of the genus *Corybas* with high branching support are included in other species of this subfamily. The results suggest that *C. neocaledonicus* should be isolated from the genus *Corybas* and placed under the genus *Corysanthes*, and that the integration of the subgenus *Acianthella* into the genus *Stigmatodactylus* is not supported, and this group should probably remain under the genus *Acianthus*.

Key words: *Corybas*, *matK*, Orchid, Phylogeny



First section

بخش اول

۶۲



صفحه	نویسنده	عنوان
۶۳	فردین تمجیدی	کاربرد ثعلب در محصولات غذایی
۷۲	پری سهرابی	مانان و اهمیت آن ها در ثعلب
۸۲	سالار عبدی	اثر محیط کشت بر زنده مانی و تکثیر گیاه ثعلب معطر (<i>Gymnadenia conopsea</i> L.) از طریق انواع قلمه در شرایط طبیعی
۸۹	فروزان ولدی	بهینه سازی جوانه زنی بذر و تشکیل گیاهچه ثعلب گونه <i>Orchisanatolica</i> در شرایط کشت درون شیشه‌ای
۹۵	کلثوم احمد زاده	بررسی جوانه زنی ناهمزیست بذر و تشکیل پروتوکورم در ثعلب <i>Ophrys straussii</i> تحت شرایط درون شیشه‌ای
۱۰۲	شادی استوار	کاربرد ثعلب در محصولات لبنی
۱۱۱	مژگان فتاحی	بهینه سازی جوانه زنی بذر در ثعلب کیسه‌ای (<i>Orchis collina</i>)
۱۱۷	فاطمه فیضی	بررسی تغییرات ارتفاع از سطح دریا بر روی برخی از خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ثعلب <i>Soo Dactylorhiza romana</i> (Klinge) <i>Soo</i> subsp. <i>Georgica</i> (Sebast.) در استان گیلان
۱۲۴	زهرا جوانمردی	مروری بر چند کاربرد ثعلب در صنایع غذایی
۱۳۰	سعیده رستمی بالان	اثر پیش تیمار افزایش غلظت قند بر رشد و کیفیت غده های <i>Dactylorhiza umbrosa</i> در شرایط درون شیشه‌ای
۱۳۷	آیلار محمد پور باروق	تأثیر محیط‌های کشت کم هزینه بر برخی صفات رشدی و مورفولوژی ارکیده فالانوپسیس



کاربرد ثعلپ در محصولات غذایی

فردین تمجیدی*

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران؛

Email: f.tamjidi@uok.ac.ir

۶۳

چکیده

ثعلپ پودر حاصل خشک کردن و خرد کردن غده‌های بعضی گونه‌های ارکیده است که پتانسیل زیادی برای استفاده در صنعت غذا دارد. اهمیت ثعلپ عمدتاً ناشی از همی‌سلولز گلوکومانان موجود در آن است. ثعلپ به عنوان فیبر رژیمی، پربیوتیک، فیلم و پوشش خوراکی، پایدارکننده و اصلاح‌گر بافت در صنایع غذایی قابل استفاده است. این هیدروکلوئید در افزایش گرانروی، بهبود احساس دهانی و کاهش بیاتی نان نقش دارد. پوشش/فیلم ثعلپ برای افزایش عمر ماندگاری میوه و سبزی، کاهش اکسایش روغن و کاهش جذب روغن در محصولات سرخ‌کردنی موثر است. اما ثعلب ممکن است اثر بد بر طعم داشته باشد که احتمالاً ناشی از ناخالصی‌های آن باشد. این مطالعه به مرور کاربردهای ثعلپ در محصولات غذایی می‌پردازد.

کلمات کلیدی: ارکیده، پایدارکننده، پوشش/فیلم خوراکی، ثعلپ

مقدمه

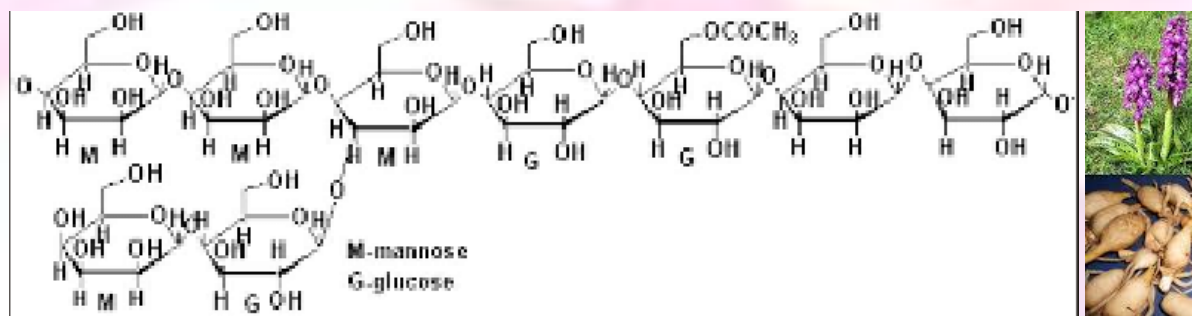
ثعلپ پودر سفید حاصل از خرد کردن غده‌های مایل به زرد پوست‌گیری شده و خشک شده بعضی از گونه‌های گیاهان خانواده ارکیده است که به‌طور معمول بصورت یک نوشیدنی رایج و افزودنی غذایی، به ویژه در کشورهای بالکان و خاورمیانه مصرف می‌شود. اثرات فیزیکیوشیمیایی ثعلب در مواد غذایی به ترکیب شیمیایی به‌ویژه میزان گلوکومانان آن بستگی دارد که خود تابع گونه ارکیده است. از آنجایی که ثعلب از گونه‌های مختلف ارکیده و مناطق جغرافیایی مختلف با اقلیم گوناگون استحصال می‌شود ترکیب شیمیایی استاندارد ندارد (۱).

ترکیب شیمیایی پودر ثعلپ بسته به گونه، زیستگاه، اقلیم، زمان برداشت و میزان خشک کردن متغیر است. در یک مطالعه گزارش شد که پودر ثعلپ بعضی از گونه‌های ارکیده حاوی ۷-۶۱ درصد گلوکومانان، ۱-۳۶ درصد نشاسته، ۵/۰-۱ درصد مواد نیتروژن‌دار، ۲/۰-۶ درصد خاکستر و ۶-۱۲ درصد رطوبت است و در گونه‌های ارکیس^۱ و آناکامپتیس^۲ میزان گلوکومانان از نشاسته بیشتر است (۲). با این که میزان گلوکومانان ممکن است در ثعلب بعضی گونه‌ها کمتر از نشاسته باشد، اما اهمیت بیشتری از نشاسته دارد زیرا نشاسته در غلظت بیشتر در انواع مواد گیاهی دیگر مانند سیب‌زمینی، ذرت، برنج و ... به وفور وجود داشته و استفاده می‌شود؛ بنابراین گونه‌هایی از ارکیده که ثعلب آن‌ها گلوکومانان بیشتری دارد (مانند ارکیس/یتالیکا)، از نظر تجاری و بهره‌وری از خواص آن اهمیت بیشتری دارد. ناخالصی اصلی ثعلپ نشاسته است که باعث کاهش کیفیت آن می‌شود و حذف آن در حین استخراج و خالص‌سازی اهمیت ویژه‌ای دارد؛ گزارش شده که تیمار با

¹ Orchis

² Anacamptis

اتانول ۴۰ درصد باعث حذف بخش زیادی از ناخالصی‌ها و افزایش گرانروی محلول پودر حاصل می‌شود (۳). گلوکومانان‌های ثعلپ با استیل‌زدایی (به میزان ۴۰ تا ۱۰۰ درصد) توسط قلیا قابلیت ایجاد ژل غیرقابل برگشت (در غلظت ۱٪) با حرارت پیدا کرده و نیز با افزایش درصد استیل‌زدایی مقاومت حرارتی بیوپلیمر و سفیدی، صافی و قدرت ژل آن افزایش ولی انحلال‌پذیری، غلظت مورد نیاز برای ایجاد ژل، گرانروی و رقیق‌شوندگی با برش کاهش می‌یابد (۴). با افزودن ۲۵ تا ۷۵ درصد صمغ گزانتان به گلوکومانان‌های استیل‌زدایی شده (۱۰۰ درصد)، هیدروژل‌های تولیدی حاصل قابل برگشت با حرارت خواهند بود (۵).



شکل ۱. تصاویری از گیاه و غده‌های ارکیده در سمت چپ و ساختار گلوکومانان در سمت راست

گلوکومانان‌ها هتروپلی‌ساکاریدهای همی سلولزی متشکل از مانوز و گلوکز هستند که نسبت این قندها تابع منبع استخراجی آن‌ها می‌باشد؛ نسبت مانوز به گلوکز در ثعلپ گونه‌های مختلف حدود ۲ تا ۴ و مقدار استیل ۱/۲ درصد است (۶). اسکلت اصلی گلوکومانان اغلب متشکل از واحدهای D-مانوز بوده که ۱-۲ واحد D-گلوکز بصورت پراکنده و تصادفی بین آن‌ها وجود دارد و جمعاً با پیوند $\beta_1 \rightarrow 4$ به هم متصل شده‌اند؛ بعضی واحدهای این اسکلت روی کربن شماره ۳ با استخلاف‌های دی‌ساکاریدی (گلوکز- $\beta_1 \rightarrow 4$ -مانوز) شاخه‌دار شده‌اند؛ گلوکومانان همچنین با تعدادی گروه‌های استیل (روی کربن شماره ۶) استری شده است که با ممانت از ایجاد پیوند هیدروژنی داخل مولکولی باعث انحلال‌پذیری آن در آب می‌شود (۷).

به‌طور کلی مانان‌ها علاوه بر ثعلپ از منابع مختلف دیگر گیاهی (مانند کنجاک، گوار، خرنوب) و میکروبی (مانند مخمر) قابل برداشت بوده و به‌عنوان بیوپلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر و غیرسمی در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و نساجی کاربرد زیادی دارند. این هیدروکلوئیدها در صنایع غذایی به‌عنوان فیلم یا پوشش خوراکی، پایدارکننده (افزایش‌دهنده گرانروی، ژل‌کننده) سفیدکننده قهوه و غیره کاربرد دارد. مانان‌ها، همچنین بعنوان پربیوتیک و فیبر رژیمی اثرات سلامتی‌بخش دارند (۸).

تاکنون مهم‌ترین کاربرد ثعلپ در نوشیدنی لبنی ثعلپ و بستنی بوده که به‌عنوان پایدارکننده باعث بهبود خواص فیزیکی و نیز پذیرش حسی آن‌ها می‌شود. ثعلپ به‌عنوان افزودنی و نیز فیلم/پوشش خوراکی در بسیاری از محصولات غذایی دیگر قابل استفاده است و این مطالعه به مرور این موضوع می‌پردازد.

اثرات پربیوتیکی ثعلپ

پربیوتیک‌ها کربوهیدرات‌های (اغلب الیگوساکاریدی) هضم‌ناپذیر بوده که دست‌نخورده به انتهای روده کوچک و کولون رسیده و بصورت انتخابی توسط باکتری‌های مفید پربیوتیک (مانند بیفیدوباکترها و



لاکتوباسیلوس ها) به متابولیت های مفیدی (مانند اسیدهای چرب زنجیر کوتاه) تخمیر شده و دارای پتانسیل سلامتی بخشی بر روی میزبان هستند (۹). در یک مطالعه اثر افزودن ۱ درصد گلوکز یا ۰.۵ تا ۲ درصد ثعلپ به محیط کشت، بر رشد گونه های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بررسی و تأیید شد؛ طوری که *B. infantis* در حضور ۰.۵-۱ درصد ثعلپ بیشترین رشد داشته و اثر ثعلپ قابل مقایسه با پربیوتیک های تجاری مهم (به ویژه فروکتوالیگوساکاریدها و اینولین) بود (۱۰). مطالعات دیگری اخیراً اثبات کردند که ثعلب (۱ درصد در محیط کشت) به عنوان منبع کربن و انرژی توسط گونه های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم به اسیدهای چرب زنجیر- کوتاه کربنی (۲، ۳ و ۴) تبدیل می شود (۱۱ و ۱۲).

تولید فیلم و پوشش خوراکی از ثعلپ

با اینکه پلیمرهای سنتزی زیست تخریب ناپذیر برای بسته بندی و پوشش دهی مواد غذایی براحتی در دسترس و قابل استفاده هستند اما باعث آلودگی زیستگاه شده و انتقال مواد آن به زنجیره غذایی بدلیل پتانسیل سمیت برای انسان و سایر گونه ها همواره نگران کننده است. بنابراین تلاش های زیادی برای جایگزینی پلیمرهای سنتزی با بیوپلیمرهای طبیعی زیست تخریب پذیر مانند هیدروکلوئیدهای طبیعی پروتئینی و کربوهیدراتی (مانند انواع صمغ ها یا موسیلاژهای گیاهی) و نیز ترکیبات لیپیدی می شود.

در یک مطالعه فیلم های ثعلپ با ۱ تا ۳ درصد ثعلپ در حضور گلیسرول تهیه شد و گزارش شد که با افزایش غلظت، مقاومت کششی، میزان کشیدگی در هنگام شکست و ضخامت فیلم ها افزایش می یابد و فیلم های تولیدی با ۲ درصد ثعلپ کمترین نفوذپذیری به بخار آب دارند (۱۳). افزودن ذرات اسید استتاریک (پایدار شده با توین ۸۰) به فیلم ثعلپ باعث کاهش نفوذپذیری آن به بخار آب و در غلظت کم نیز باعث کاهش نفوذپذیری آن به اکسیژن می شود (۱۴). افزودن ثعلپ (۵-۱ درصد) به فیلم نشاسته سیب زمینی مدول الاستیک و مقاومت به کشش آن را زیاد ولی بر نفوذپذیری به بخار آب تأثیر معنی دار نداشته و نیز کشش پذیری فیلم را کم می کند (۱۵). فیلم های تولیدی با گلوکومانان های ثعلپ نسبت به انواع تولیدی با گالاکتومانان های دانه های گور یا خرنوب انعطاف پذیری بالاتر و نیز مقاومت بیشتری به عبور اکسیژن و بخار آب داشته ولی مقاومت مکانیکی کمتری دارند (۱۶)؛ استیل زدایی گلوکومانان های ثعلپ باعث کاهش انحلال پذیری و نفوذپذیری به بخار آب فیلم آن می شود و اگر درجه استیل زدایی ۱۰۰ درصد باشد پارامترهای مکانیکی فیلم (مقاومت کششی، میزان کشیدگی در هنگام شکست، مدول الاستیک) بهبود می یابد (۱۷).

محلول ثعلب (۱/۵٪) برای پوشش دهی خلال سیب زمینی قبل از سرخ کردن استفاده شده و نتایج نشان می دهد که همانند صمغ دانه ریحان (۰/۵٪) جذب روغن خلال را حدود ۲۹٪ کاهش می دهد و نیز راندمان سرخ کردن را افزایش می دهد (۱۸). در یک مطالعه دیگر گزارش شد که پوشش دهی خلال سیب زمینی با ثعلپ (محلول ۲ درصد) قبل از سرخ کردن، دفع رطوبت و جذب روغن آن را کاهش می دهد ولی کارایی آن به اندازه کربوکسی متیل سلولز نیست (۱۹).

در بخشی از یک مطالعه اثر پوشش ثعلپ (۱ تا ۳ درصد) بر فرآیند خشک کردن اسمزی تکه های گوشت شترمرغ در محلول سدیم کلرید (۲۷-۵ درصد) و پارامترهای کیفی مربوطه بررسی شد و نتایج نشان داد که پوشش باعث افت سریع تر آب و حفظ بهتر مواد جامد گوشت می شود (۲۰).

پوشش دادن میوه توت فرنگی با ثعلپ (۱/۵٪) باعث کاهش رشد میکروارگانیسم‌ها و بهبود ویژگی‌های کیفی در حین نگهداری سرد می‌شود و افزودن عصاره دانه انگور (۳٪) به پوشش نتایج بهتری ایجاد می‌کند (۲۱). عصاره پونه نیز باعث افزایش خاصیت ضدباکتریایی و ضداکسایشی فیلم ثعلپ می‌شود (۲۲). استفاده از نانوکمپوزیت‌های فلیم ثعلپ-نانوذرات اکسید روی باعث تأخیر در فوتواکسایش روغن ماهی کیلکا در مقابل نور فلورسنت می‌شود (۲۳). ترکیب ثعلپ (۰/۶ درصد) و آلزینات (۲ درصد) با مکانیسم ژل شدن یونی (۰/۳ مولار کلسیم) برای ریزپوشینه‌دار کردن روغن دانه کتان (به میزان ۴۰ درصد در فرمول) استفاده شده و نتایج نشان می‌دهد که راندمان پوشینه‌دار کردن ۹۳.۵ درصد می‌باشد (۲۴). همچنین گزارش شده که پوشش‌دهی تره فرنگی با محلول ثعلپ (۲٪) حاوی ذرات روغن ذرت/آفتابگردان (۲٪) و توین ۸۰ (۰.۵٪) باعث کاهش افت وزن و حفظ بیشتر سفتی در طی نگهداری سرد می‌شود (۲۵). تهیه فیلم آگار همراه با ثعلپ باعث کاهش حساسیت آگار به تجزیه میکروبی، کاهش نفوذپذیری آن به بخار آب، کاهش مقاومت کششی و بهبود انعطاف‌پذیری آن برای پانسمان زخم می‌شود (۲۶).

اثر ثعلپ بر پایداری و بافت مواد غذایی

بسیاری از مواد غذایی (مانند بستنی، سس سالاد، مایونز، سوسیس، کالباس، خامه، ماست، شیر، امولسیون‌های نوشیدنی و...) به شکل امولسیون به‌ویژه نوع روغن در آب (O/W) هستند که متشکل از ذرات ریز روغن پایدار شده با امولسیفایر در یک محیط آبی می‌باشد. امولسیون پایداری سینتیکی، نه ترمودینامیکی، دارد و به همین دلیل در طی زمان ذرات روغن با مکانیسم‌های مختلفی به هم متصل یا با هم ادغام شده و بصورت لایه‌ای خامه‌ای بالای امولسیون تجمع می‌یابند و در طولانی‌مدت حتی روغن از فاز آبی جدا شده تا به پایداری ترمودینامیکی برسد (۲۷).

افزودن ثعلپ (حداقل ۰/۷ درصد) به امولسیون O/W پایدار شده با توین ۲۰ باعث افزایش پایداری آن، به‌دلیل افزایش گرانشی فاز آبی می‌شود (۲۸). گزارش شده که افزودن ثعلپ (۳/۵-۰/۵ درصد) به سس سالاد کم چرب (حاوی ۷/۵-۲۵ درصد روغن) با افزایش گرانشی، باعث پایداری آن می‌شود (۲۹). ثعلپ (۰/۷-۱/۳ درصد) و کیتوزان (۰/۱-۰/۳ درصد) به مایونز کم چرب (۴۸-۳۰ درصد چربی) نیز با هدف بهبود پایداری آن و جایگزین چربی افزوده شده‌اند و اثرات مفیدی و موثری داشته‌اند (۳۰).

ثعلپ (اغلب در کمتر از ۱ درصد) به‌عنوان پایدارکننده طبیعی، به‌تنهایی یا همراه با صمغ‌های دیگر، بطور وسیعی در بستنی (ماراش؛ ترکی) و "نوشیدنی لبنی داغ ثعلپ" استفاده می‌شود و باعث افزایش گرانشی و حالت غیرنیوتنی (رقیق‌شوندگی با برش) در آن‌ها (۳۱-۳۵)، افزایش خاصیت تیکسوتروپی (برگشت‌پذیری) (۳۵) و مقبولیت حسی و مقاومت به ذوب (۳۶) در بستنی و نیز افزایش گرانشی و ظرفیت نگهداری آب در دیگر دسرهای لبنی می‌شود (۳۷). ثعلپ‌های حاوی گلوکومانان بالا (< ۴۰ درصد) اثر بهتری در افزایش گرانشی و حجم و بهبود خواص حسی بستنی دارند (۳۸).

اثر ثعلپ (۵-۰/۵ درصد در آرد) و صمغ فارسی (۳-۰/۵ درصد در آرد) به‌تنهایی یا بصورت مخلوط بر خصوصیات رئولوژیکی و کیفی نان تافتون بررسی شده و نتایج نشان می‌دهد که هر دو هیدروکلوئید مقاومت خمیر به کشش را افزایش و قابلیت گسترش آن را کاهش می‌دهند؛ غلظت ۵ درصد ثعلپ سختی مغز نان را کاهش داده و بیاتی آن را (حداقل ۲ روز) به تأخیر می‌اندازد (۳۹). استفاده از ثعلپ در خمیر نان (۱-



۵/۰ درصد) قبل از انجماد، باعث تعویق بیاتی و بهبود قابلیت جویدن نان بربری تولیدی با خمیر انجمادزدایی شده می شود ولی مقبولیت حسی نان را کاهش می دهد (۴۰). افزودن ثعلپ (۱-۵/۰ درصد) به آرد نان بربری، تأثیر چندانی روی خصوصیات رئولوژیکی خمیر نداشته و مقبولیت حسی نان را نیز کاهش داده ولی در به تاخیر انداختن بیاتی تا حدی موثرتر از کتیرا بوده است (۴۱).

افزودن ثعلپ (۵/۰-۱/۰ درصد) به دوغ باعث افزایش پایداری و همگن سازی آن ولی نه به اندازه کتیرا می شود؛ همچنین پذیرش حسی دوغ را کاهش داده و باعث تغییر رفتار آن از حالت نیوتنی به شبه پلاستیک می شود (۴۲).

گزارش شده است که پنیر سفید کم چرب تولیدی از شیر حاوی ۵/۰ درصد چربی و ۰/۰۳-۰/۰۱ درصد ثعلپ (به عنوان جایگزین چربی)، از نظر سفتی بافت، پخش پذیری و پذیرش کل با پنیر شاهد متفاوت است و پنیر تولیدی با شیر حاوی ۰/۰۲ درصد ثعلپ ویژگی های بهتری دارد (۴۳).

نتیجه گیری

پودر ثعلپ خرد کردن غده های خشک شده بعضی گونه های ارکیده است که ترکیب و خصوصیات متغیر دارد. هیدروکلئید قابل توجه در آن همی سلولز گلوکومانان است که نقش فیبر رژیمی دارد و در چند مطالعه اثرات پریبیوتیکی آن به اثبات رسیده است. همچنین مطالعات زیادی نیز قابلیت ایجاد فیلم ثعلپ را بررسی و تأیید کرده اند. به نقش ثعلپ به عنوان پوشش خوراکی برای کاهش جذب روغن در خلال سیب زمینی، کاهش اکسایش روغن و بهبود ماندگاری میوه و سبزی نیز بخوبی اشاره شده است. ثعلپ در جلوگیری از بیاتی نان نقش دارد. ثعلپ با افزایش ویسکوزیته بر پایداری و احساس دهانی دیسپرسیون های غذایی مانند بستنی، خامه، دسر ها، دوغ و نوشیدنی لبنی ثعلپ اثر مفید دارد و به عنوان یک جایگزین چربی نیز مطرح است. اکثر محققین ثعلپ را بدون خالص سازی استفاده کرده و اطلاع دقیقی از درصد ترکیبات آن نداشته اند، بنابراین لازم است این کار انجام شود و اثر آن به ویژه بر خواص حسی محصولات غذایی بیشتر بررسی شود.

References

1. Tekinşen, K.K. & Güner, A. (2010). Chemical composition and physicochemical properties of tubera salep produced from some Orchidaceae species. Food Chemistry 121 (2), 468-471.
2. Sezik, E. (1967). Türkiye'nin salepgilleri ticari salep çeşitleri ve özellikle Mug'la salebi üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi. No: 34. Istanbul.
3. Kurt, A. & Kahyaoglu, T. (2015). Rheological properties and structural characterization of salep improved by ethanol treatment. Carbohydrate Polymers 133, 654-661.
4. Kurt, A. & Kahyaoglu, T. (2017). Gelation and structural characteristics of deacetylated salep glucomannan. Food Hydrocolloids 69, 255-263.
5. Kurt, A. (2018). Modulating hydrogel characteristics of deacetylated salep glucomannan by blending xanthan gum. The International Symposium on Food Rheology and Texture, Oct 19-21.
6. Juers, D.H. et al. (1967). Configuration and hydrodynamic properties of fully acetylated salep glucomannan. Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics 5 (2), 361-375.



7. **Alonso-Sande, M. et al. (2009).** Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72 (2), 453-462.
8. **Singh, S. et al. (2018).** Mannans: An overview of properties and application in food products. *International journal of biological macromolecules* 119, 79-95.
9. **Saarela, M. (2011).** Functional foods: Concept to product, Elsevier.
10. **Usta, B. & Yilmaz-Ersan, L. (2017).** Evaluation of prebiotic potential of salep obtained from some Orchidaceae species. *Fresen Environ Bull* 26 (10), 6191-8.
11. **Usta-Gorgun, B. & Yilmaz-Ersan, L. (2020).** Short-chain fatty acids production by Bifidobacterium species in the presence of salep. *Electronic Journal of Biotechnology* 47, 29-35.
12. **Gorgun, B.U. & Ersan, L.Y. (2018).** Bifidogenic effect of salep powder. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi* 23 (2), 150-158.
13. **Ekrami, M. & Emam-Djomeh, Z. (2014).** Water vapor permeability, optical and mechanical properties of salep-based edible film. *Journal of Food Processing and Preservation* 38 (4), 1812-1820.
۱۴. **اکرامی، م. و امام جمعه، ز. (۱۳۹۵).** اثر اسید استئاریک بر خواص حرارتی، سدکنندگی و مورفولوژی فیلم های خوراکی بر پایه ثعلب. *علوم و صنایع غذایی ایران* ۱۳ (۵۸)، ۱۶۱-۱۷۱.
۱۵. **فاضل، م. و همکاران (۱۳۹۰).** تعیین تاثیر ثعلب، گلیسرول و روغن بر ویژگی های فیلم خوراکی بر پایه نشاسته سیب زمینی. *علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران* ۶ (۴)، ۹۳-۱۰۲.
16. **Kurt, A. & Kahyaoglu, T. (2014).** Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan. *Carbohydrate polymers* 104, 50-58.
17. **Kurt, A. (2019).** Development of a water-resistant salep glucomannan film via chemical modification. *Carbohydrate polymers* 213, 286-295.
18. **Karimi, N. & Kenari, R.E. (2016).** Functionality of coatings with salep and basil seed gum for deep fried potato strips. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 93 (2), 243-250.
۱۹. **شرایعی، پ. و همکاران (۱۳۹۲).** بررسی سینتیک جذب روغن توسط خلال سیب زمینی تحت تأثیر روغن مغز بنه، مواد صابونی ناشونده روغن مغز بنه و هیدروکلوئید ثعلب طی فرآیند سرخ کردن عمیق. *تحقیقات مهندسی صنایع غذایی* ۱۴ (۳)، ۹۷-۱۱۲.
20. **Alamatian, S. et al. (2019).** Modeling of osmotic treatment of ostrich meat coated by tragacanth and salep. *Meat science* 156, 231-239.
21. **Emamifar, A. et al. (2019).** Effect of salep-based edible coating enriched with grape seed extract on postharvest shelf life of fresh strawberries. *Journal of Food Safety* 39 (6), e12710.
22. **Ekrami, M. et al. (2019).** Characterization of a high-performance edible film based on Salep mucilage functionalized with pennyroyal (*Mentha pulegium*). *International journal of biological macromolecules* 133, 529-537.
23. **Ekrami, M. et al. (2021).** Eco-friendly UV protective bionanocomposite based on Salep-mucilage/flower-like ZnO nanostructures to control photo-oxidation of kilka fish oil. *International Journal of Biological Macromolecules* 168, 591-600.
24. **Wissam, Z. & Samer, H. (2019).** Encapsulation of flaxseed oil extract in alginate-salep system by ionic gelation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 55(12).
25. **Papandreopoulou, V. et al. (2015).** Use of Salep Based Edible Coating for the Preservation of Leek. *Fork to Farm: International Journal of Innovative Research and Practice* 2(1).



26. **Akkaya, N.E. et al. (2020).** New biocompatible antibacterial wound dressing candidates; agar-locust bean gum and agar-salep films. *International journal of biological macromolecules* 155, 430-438.
27. **McClements, D.J. (2004).** Food emulsions: principles, practices, and techniques, CRC press.
28. **Georgiadis, N. et al. (2012).** Isolation, characterization and emulsion stabilizing properties of polysaccharides from orchid roots (salep). *Food Hydrocolloids* 28 (1), 68-74.
29. **Pero, M. et al. (2014).** Stability and rheological properties of model low-fat salad dressing stabilized by salep. *Journal of dispersion science and technology* 35 (2), 215-222.
30. **Askari, M. & Mostaghim, T. (2019).** Evaluation of Using Salep and Chitosan Hydrocolloid as Stabilizers and Fat Replacer in Physicochemical and Rheological Features of Low-Fat Mayonnaise. *Journal of Food Biosciences and Technology* 9 (2), 63-72.
31. **Kaya, S. & Tekin, A.R. (2001).** The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix. *Journal of Food Engineering* 47 (1), 59-62.
32. **Dogan, M. & Kayacier, A. (2004).** Rheological properties of reconstituted hot salep beverage. *International Journal of Food Properties* 7 (3), 683-691.
33. **Guven, M. et al. (2003).** The effects of the combined use of stabilizers containing locust bean gum and of the storage time on Kahramanmaraş-type ice creams. *International Journal of Dairy Technology* 56 (4), 223-228.
34. **Bahramparvar, M. et al. (2008).** Effect of substitution of carboxymethylcellulose and salep gums with Lallemania royleana hydrocolloid on ice cream properties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 4(1), 37-47.
35. **Kuş, S. et al. (2005).** Rheological behavior and time-dependent characterization of ice cream mix with different salep content. *Journal of Texture Studies* 36 (3), 273-288.
36. **Bahramparvar, M. et al. (2009).** The effect of Lallemania royleana (Balangu) seed, palmate-tuber salep and carboxymethylcellulose gums on the physicochemical and sensory properties of typical soft ice cream. *International journal of dairy technology* 62 (4), 571-576.
37. **Ayar, A. et al. (2009).** Effect of salep as a hydrocolloid on storage stability of 'İncir Uyumtu' dessert. *Food hydrocolloids* 23 (1), 62-71.
38. **Sen, M.A. et al. (2019).** The effect of saleps obtained from various Orchidaceae species on some physical and sensory properties of ice cream. *Food Science and Technology* 39 (1), 82-87.
39. **Sahari, M. et al. (2014).** Rheological and quality characteristics of taftoon bread as affected by Salep and Persian gums. *International journal of food science* doi, 10.1155/2014/813286.
۴۰. **قزایی، ز. و همکاران (۱۳۹۲).** بررسی ویژگی‌های رئولوژیکی و حسی نان بربری تولید شده از خمیر منجمد حاوی صمغ‌های کتیرا و ثعلب. *علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران* ۸ (۳)، ۱۳۷-۱۴۴.
۴۱. **قزایی، ز. و همکاران (۱۳۹۵).** تاثیر هیدروکلوئیدهای کتیرا و ثعلب بر خواص رئولوژیک خمیر و کیفیت نان بربری علوم و صنایع غذایی ایران ۱۳ (۵۰)، ۲۳-۳۱.
۴۲. **فروغی نیا، س. و همکاران (۱۳۸۶).** تأثیر افزودن تکی و ترکیبی صمغ‌های کتیرا، ثعلب و گوار در پایداری سازی دوغ. *علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران* ۲ (۲)، ۱۵-۲۵.



43. **Nikjooy, S. et al. (2015).** The effect of various concentrations of salep gum on physicochemical characteristics of low-fat white cheese. International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS) 8 (2), 136-141.



Application of salep in food products

Fardin Tamjidi*

*Assistant Professor, Department of Food Sciences and Engineering, Faculty of Agriculture,
University of Kurdistan, Sanandaj, Iran*

Email: f.tamjidi@uok.ac.ir

۷۱

Abstract

Salep is a powder producing by drying and grinding of the tubers of some orchid species, which has a great potential for utilization in the food industry. The importance of salep is mainly due to the glucomannan hemicellulose in it. Salep can be used as a dietary fiber, prebiotic, edible film and coating, stabilizer and texture modifier in the food industry. This hydrocolloid is involved in increasing viscosity, improving mouthfeel and reducing bread staling. Salep coating/film is effective in increasing the shelf life of fruits and vegetables, reducing oil oxidation and reducing oil absorption in frying products. But, salep may have a bad effect on the flavor, which is probably due to its impurities. This study reviews the applications of salep in food products.

Keywords: Edible coating/film, Orchid, Salep, Stabilizer

مانان‌ها و اهمیت آن‌ها در ثعلپ

پری سهرابی^۱، فردین تمجیدی^{۲*}

^۱ دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، ایران

^۲ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Email: p.sohrabi2017@yahoo.com

f.tamjidi@uok.ac.ir

چکیده

مانان‌ها همی‌سلولزهایی خطی یا شاخه‌دار بوده که اسکلت آن متشکل از واحدهای D-β-مانوپیرانوز متصل شده با پیوندهای گلیکوزیدی $\beta_{1\rightarrow4}$ است. مانان‌ها اکثراً هتروپلی‌ساکارید بوده و بر اساس حضور دیگر قندها در آن‌ها به ۴ دسته مانان‌های خالص، گالاکتومانان‌ها، گلوکومانان‌ها و گالاکتوگلوکومانان‌ها تقسیم می‌شوند. مانان‌ها از گیاهان (مانند غده‌های کنجاک، دانه‌های گوار، لوبیای لوکاست و غده‌های ارکیده) و ریزاندامگان (مثل مخمر) قابل استحصال بوده و به‌عنوان بیوپلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر و غیرسمی در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و نساجی کاربرد زیادی دارند. این هیدروکلوئیدها در صنایع غذایی به‌عنوان عوامل فیلم یا پوشش خوراکی، اصلاح‌گر بافت (افزایش دهنده ویسکوزیته/ژل‌کننده)، پایدارکننده، امولسیفایر، سفیدکننده قهوه و غیره کاربرد دارد. مانان‌ها، همچنین به‌عنوان پربیوتیک و فیبر رژیمی اثرات سلامتی‌بخش دارند. گلوکومانان‌ها مهم‌ترین جزء ثعلپ، همان غده‌های خشک و پودر شده بعضی از گیاهان ارکیده، بوده که در نوشیدنی ثعلپ و بستنی باعث بهبود خواص فیزیکی و حسی می‌شوند. ثعلپ به‌عنوان افزودنی و نیز فیلم/پوشش خوراکی در بسیاری از محصولات غذایی قابل استفاده است. این مطالعه انواع مانان‌ها و نیز حضور و اهمیت آن‌ها را در ثعلپ مرور می‌کند.

کلمات کلیدی: ارکیده، پایدارکننده‌ها، ثعلپ، مانان‌ها

۱. مقدمه

حدود ۹۰ درصد از مواد دیواره سلولی گیاهی متشکل از سلولز، همی‌سلولز و لیگنین به نسبت ۲:۱:۱ است (۱). میزان همی‌سلولز در چوب‌های نرم و سفت به‌ترتیب حداکثر ۲۰ و ۵ درصد وزن خشک است. همی‌سلولز دومین هتروپلیمر فراوان در طبیعت پس از سلولز است. همی‌سلولز هتروپلی‌ساکاریدی خطی یا شاخه‌دار است که بر اساس مونوساکارید اصلی موجود در آن به زایلان، مانان، گالاکتان، آرابینوگالاکتان یا آرابینان‌ها تقسیم‌بندی می‌شود (۲). مونومر اصلی زایلان D-گزیلوز است و همی‌سلولز اصلی موجود در گیاهان و چوب سخت است، اما مونومر اصلی مانان D-مانوز است و در چوب نرم و نیز اندوسپرم دانه‌های گیاهی و میوه‌ها فراوان است. مانان‌ها پلی‌ساکاریدهای خطی یا شاخه‌دار بوده که از دانه‌های قهوه، لوبیا سبز، بذر یونجه، عاجدانه، چغندر قند، دیواره سلولی برخی قارچ‌ها و باکتری‌ها، ریشه‌ها و غده‌های ارکیده، حبوبات، هسته و پودر نارگیل، هسته پالم و غده‌های کنجاک قابل تولید می‌باشند (۳ و ۴). اسکلت اصلی مانان‌ها شامل یک زنجیره خطی متشکل از D-مانوز با پیوند $\beta_{1\rightarrow4}$ است که بر اساس قند (به‌ویژه D-گالاکتوز و D-گلوکز) یا اسید استخلافی در شاخه آن‌ها به عنوان گالاکتومانان، گلوکومانان و گالاکتو-گلوکومانان مشخص می‌شوند.



میزان گالاکتومانان در دیواره سلولی بیشتر است و استخلاف آن شامل واحدهای D-گالاکتوز بوده که با پیوند $\alpha_{1\rightarrow6}$ به اسکلت اصلی مانان متصل شده اند (۵). روش های مختلف فیزیکی، شیمیایی و مکانیکی برای تخریب جزئی مانان های گیاهی (مانند صمغ گوار و صمغ لوبیای لوکاست) و میکروبی (مانند مانان مخمری) قابل استفاده است، اما در میان آن ها روش های آنزیمی و اسیدی (+الکل) به دلیل سهولت اجرا، ارجحیت دارند. مانوالیگوساکاریدهای حاصل از تجزیه مانان ها کاربرد زیادی در صنایع کاغذ، شوینده، دارو و غذا دارند؛ همچنین اثرات دارویی و سلامتی بخشی (به عنوان فیبر، پربیوتیک و ...) دارند (۲). مانان ها ویسکوزیته بالا ایجاد کرده و بنابراین اثرات مهمی روی خصوصیات بافتی و پایداری فیزیکی محصولات غذایی خواهند داشت.

۲. مانان ها در طبیعت

مانان ها شامل مانان های خطی یا خالص (فقط حاوی مانوز)، گلوکومانان ها، گالاکتومانان ها و گالاکتوگلوکومانان ها هستند و به طور وسیعی در طبیعت حضور داشته و در سراسر جهان از منابع مختلف جدا شده اند. مانان ها اغلب در گیاهان غیرحبوباتی برتر وجود دارند. به طور کلی دانه های حاوی مانان، مانند دانه های نخل، سخت و دارای مقاومت مکانیکی بالا هستند. علاوه بر این، حضور مانان ها در جلبک ها، برخی میکروب ها، از جمله قارچ ها به عنوان یک جزء ساختاری اصلی گزارش شده است. اگرچه، از نظر تجاری فقط β -مانان های گیاهی بصورت صمغ در دسترس هستند (۶). گالاکتومانان ها از بعضی منابع میکروبی و دانه های حبوبات خاص (مانند صمغ لوبیای لوکاست) خشک و پودر شده تولید می شوند و قرن ها است که توسط انسان مصرف می شوند. گالاکتومانان ها به همراه مانان های مخمری و گلوکومانان ها اثرات فیزیولوژیکی مثبت دارند (۷). در میان اگزوپلی ساکاریدهای قارچی، مانان های مخمری به دلیل داشتن اثرات بیولوژیکی و زیست فعالی متعدد و مفید مانند فعالیت ضدتوموری، ضدالتهابی، ضدانعقادی، تحریک کنندگی ایمنی، ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی، به عنوان یک افزودنی زیست تخریب پذیر طبیعی اهمیت ویژه ای در فراوری غذا و نگهداری میوه جات و سبزیجات تازه دارند. مانان ها از نظر مقدار دومین پلی ساکارید در دیواره مخمر بوده و تقریباً ۴۰ درصد وزن خشک دیواره سلولی مخمر را شامل می شوند (۸، ۹، ۱۰، ۱۱).

۳. انواع مانان ها

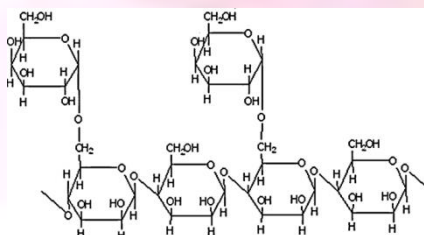
۱.۳. مانان خطی

مانان خطی یا خالص یک هموپلی ساکارید خطی محلول در آب و خنثی متشکل از باقیمانده های D-مانوز با پیوند $\beta_{1\rightarrow4}$ است که حاوی ۹۵-۸۰ درصد قند مانوز بوده و جز اصلی ساختار چوب نرم و دانه ها است. مانان خطی باعث ایجاد مقاومت فیزیکی در اندوسپرم دانه ها می شود (۱).

۲.۳. گالاکتومانان

بطور کلی، گالاکتومانان ها هتروپلی ساکاریدهای خنثی و نامحلول در آب بوده که منبع عمده آن ها گیاهی (اندوسپرم حبوبات دولپه ای به عنوان منبع اصلی و علف های دریایی) و میکروبی می باشد. اسکلت اصلی آن ها متشکل از باقیمانده های D-مانوز با پیوند $\beta_{1\rightarrow4}$ است که بعضی کربن های شماره ۶ آن با D-

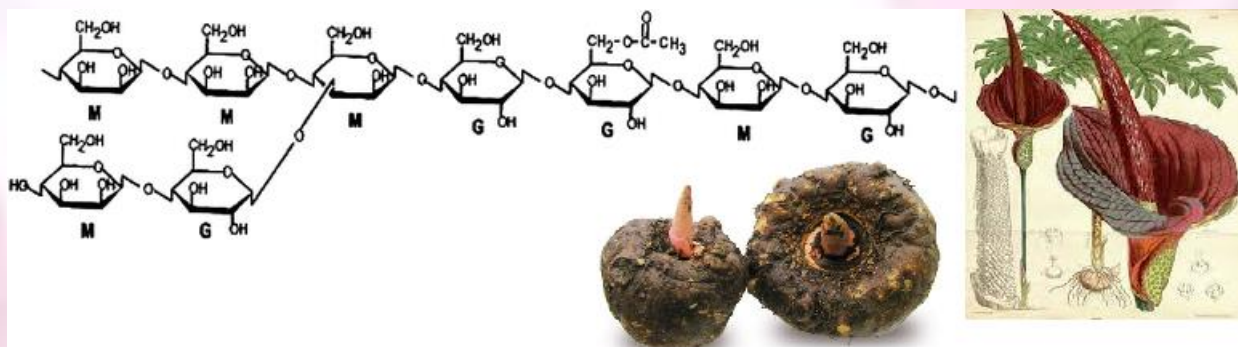
گالاکتوز استخلاف شده است (۱۲). درجه پلیمریزاسیون و نیز میزان گالاکتوز در گالاکتومانانهای منابع مختلف، متفاوت بوده و روی خواص عملکردی آنها اثر دارد. با افزایش باقیماندههای گالاکتوز، درجه هیدروفیلی و حلالیت گالاکتومانانها افزایش می یابد (۱۳ و ۱۴). نسبت مانوز به گالاکتوز روی خصوصیات عملکردی گالاکتومانانها (مانند ایجاد ویسکوزیته، فیلم و ژل و خاصیت امولسیفایری) اثر دارد (۱، ۵ و ۱۲)؛ مثلاً با افزایش درجه پلیمریزاسیون و کاهش استخلافات گالاکتوز خاصیت امولسیفایری بهبود می یابد (۱۲). نسبت مانوز به گالاکتوز در صمغ لوبیای لوکاست و صمغ گوار به ترتیب حدود ۴ و ۲ می باشد (۸).



شکل ۱. ساختار گالاکتومانان موجود در گوار.

۳.۳. گلوکومانان

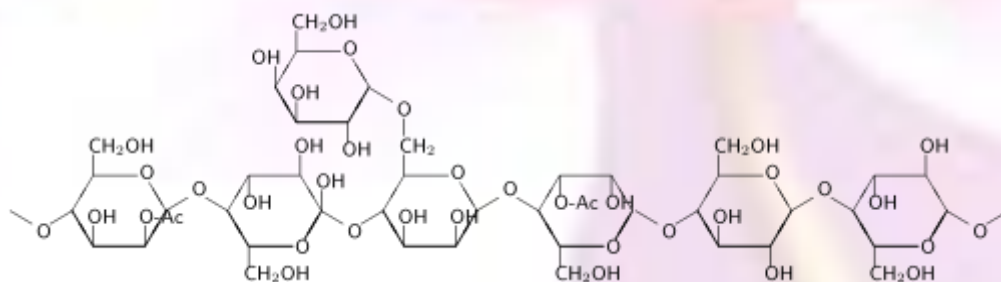
گلوکومانان یک هتروپلی ساکارید غیرسلولزی بوده که منبع مهم آن غده گیاه کنجاک است. گلوکومانانها متشکل از گلوکز و مانوز بوده و نسبت این دو تابع منبع استخراجی آنها می باشد؛ در کنجاک نسبت مانوز به گلوکز ۱/۶ است. اسکلت اصلی گلوکومانان متشکل از باقیماندههای D-مانوز همراه با ۱-۲ باقیمانده پراکنده و تصادفی D-β-گلوکز جمعاً با پیوند β_{1→4} است؛ البته بعضی مونومرهای اسکلت اصلی روی کربن شماره ۳ با استخلافهای دی ساکاریدی (گلوکز-β_{1→4}-مانوز) شاخه دار شده اند؛ گلوکومانان همچنین با تعدادی گروههای استیل (روی کربن شماره ۶) استری شده است که با ممانت از ایجاد پیوند هیدروژنی داخل مولکولی باعث انحلال پذیری آن در آب می شود. فاکتورهایی مانند درجه استیله شدن، دما، pH و وزن مولکولی بر فرایند ایجاد ژل گلوکومانان تاثیر دارد (۱۶).



شکل ۲. ساختار گلوکومانان موجود در غده کنجاک

۴.۳. گالاکتوگلوکومانان

گالاکتوگلوکومانان جزء اصلی بخش همی سلولزی چوب های نرم (درختان مخروطی) بوده و تقریباً ۱۵ تا ۲۵ درصد وزن خشک چوب را تشکیل می دهد (۱۵). گالاکتوگلوکومانان ها اجزای ساختاری مهم دیواره های سلولی اولیه و ثانویه در گیاهان برتر هستند. گالاکتوگلوکومانان ها متشکل از باقیمانده های D-مانوز و D-گلوکز با پیوند $\beta_{1 \rightarrow 4}$ بوده که به طور تصادفی با حدود ۸ درصد گروه جانبی گالاکتوز با پیوند $\alpha_{1 \rightarrow 6}$ استخلاف شده است، همچنین به طور تصادفی حاوی تعدادی استیل استری شده است. گالاکتوگلوکومانان ها پتانسیل بالقوه ای برای تولید فیلم های نفوذناپذیر به اکسیژن، پایدار کردن امولسیون و تولید ژل دارند، اما میزان تولید آن ها بصورت تجاری فعلاً محدود است (۱۷ و ۱۸).



شکل ۳. ساختار گالاکتوگلوکومانان ها.

۴. اهمیت تجاری مانان ها

با افزایش آگاهی مصرف کنندگان، نیاز و خواسته آن ها برای غذاهای ایمن تر، سالم تر و جدید با ویژگی های خاص افزایش یافته که یک نتیجه آن گرایش تولیدکنندگان به مصرف صمغ های گیاهی در صنعت غذا است. به عنوان مثال، مانان ها مانند صمغ گوار و صمغ لوبیای لوکاست، خواص فیزیکوشیمیایی متعددی مانند انحلال پذیری در آب، ایجاد ویسکوزیته، زیست تخریب پذیری و پایداری در محلول ها آبی دارند و مانوآلیگوساکاریدهای حاصل از هیدرولیز آن ها به عنوان فیبر و پری بیوتیک اثرات مفیدی در روده دارند. این موارد مانان ها و یا مانوآلیگوساکاریدها را برای بسیاری از کاربردهای تجاری (مصرف در غذا، دارو و مکمل ها، استفاده در غذای دام (به عنوان آنتی بیوتیک با عملی مشابه لکترین) و صنایع نساجی مناسب می سازد (۱۹)؛ مانان ها در خوراک حیوان گاهی به عنوان عناصر ضد تغذیه ای شدید باعث استفاده ناکافی کربوهیدرات خوراک شده و نیز ممکن است باعث القای بیماری های متابولیکی و نامنظمی های گوارشی شود (۷). اما با افزودن مانان ها به خوراک حیوان می توان هم اثر ضد تغذیه ای مانان ها را حذف کرد و هم مانوآلیگوساکاریدهای مفید در خوراک تولید کرد. مانان ها به همراه سایر اجزای موجود در ژل آلونورا اثرات ضد قارچی، هیپوگلاسمی (کاهش قند خون)، بهبود زخم، ضد التهابی و ضد سرطانی و اثرات تقویت کنندگی ایمنی دارد (۲۰ و ۲۱).

۵. گلوکومانان ثعلپ

ثعلب پودر سفید حاصل پس از پوست گیری، خشک کردن و خرد کردن غده های مایل به زرد برخی ارکیدهای وحشی است. تنها در ترکیه، ۳۰ گونه ارکیده چندساله تولیدکننده ثعلب یافت می شود (۲۲). گزارش شده است که غده های گونه ای به نام اُرکیس/ایتالیکا دارای حداکثر نسبت گلوکومانان به نشاسته بوده و بنابراین بهترین گزینه برای تولید ثعلب با کیفیت بالا است. استفاده از ثعلب به عنوان یک افزودنی غذایی، به دلیل داشتن خواص تغذیه ای و نیز به عنوان یک نوشیدنی رایج، سابقه ای طولانی دارد. با این وصف، خواص فیزیوشیمیایی ثعلب تحت تاثیر ترکیب شیمیایی آن به ویژه درصد گلوکومانان، که حد مطلوب آن ۱۶ تا ۵۵ درصد است، قرار می گیرد (۲۳). مقدار گلوکومانان به نوبه خود تابع گونه، منطقه جغرافیایی، شرایط کشت و غیره است. در ترکیه، ثعلب به عنوان یک پایدارکننده به ویژه در بستنی قهرمان ماراش^۱ استفاده می شود (۲۲).

زنجیره اصلی خطی گلوکومانان ثعلب متشکل از واحدهای مانوز و گلوکز است که با پیوند $\beta_{1\rightarrow4}$ به هم وصل شده اند؛ یک هتروپلیمر است که نسبت مانوز به گلوکز در آن ۲ تا ۴ و مقدار استیل ۱/۲ درصد است (۲۴).

گلوکومانان ثعلب یک پلی ساکارید محلول در آب و خنثی با وزن مولکولی بالا است که آن را برای کاربردهای تجاری مختلف مانند پایدارکننده، تقویت کننده طعم، افزایش دهنده ویسکوزیته و تسکین دهنده مطلوب می سازد (۲۵). همانند گلوکومانان کنجاک، خصوصیات آن با استیل زدایی توسط قلیا تغییر می کند. گروه های استیل در ایجاد پیوند هیدروژنی با مولکول های آب نقش داشته و به همین دلیل باعث انحلال آن در آب می شوند (۲۶). یک مطالعه (۲۷) به عمل سینرژستی صمغ لوبیای لوکاست و ثعلب اشاره کرده و آن را به برهمکنش های بین قسمت های بدون لاکتوز صمغ لوبیای لوکاست و گلوکز ثعلب نسبت داده است. از این رو استنباط شده است که استفاده از ترکیب هیدروکلوئیدهای گلوکومانان و گالاکتومانان می تواند برای کنترل و بهبود رفتار رقیق شوندگی با برش^۲ نوشیدنی های لبنی مفید باشد (۲۷).

گلوکومانان استیل زدایی شده نسبت به گلوکومانان طبیعی ثعلب ویسکوزیته ظاهری کمتری دارد. استیل زدایی منجر به تشکیل ژل های غیرقابل برگشت با حرارت در pH قلیایی می شود و با افزایش استیل زدایی قدرت ژل بهبود یافته و سطح آن نیز صاف می شود. گروه های استیل با به حداقل رساندن برهمکنش های بین زنجیره ای گلوکومانان، حلالیت در آب آن را تضمین می کنند و با کاهش تعداد این گروه ها، انحلال در دمای بالا انجام می شود (۲۵).

گلوکومانان جز اصلی و ضروری ثعلب بوده و بقیه اجزا مانند نشاسته، پروتئین و خاکستر به عنوان ناخالصی محسوب می شوند. تاکنون، ثعلب نسبت به گلوکومانان کنجاک کاربرد کمتری داشته که ممکن است ناشی از استفاده مستقیم ثعلب کم کیفیت که حاوی همه ناخالصی های نام برده است، باشد. یک مطالعه

¹. Kahramanmaraş

². Shear-thinning

(۲۲) گزارش کرد که ثعلپ حاوی ۴۰ درصد گلوکومانان کیفیت خوبی دارد. اجزای ثعلپ و در نتیجه کیفیت آن ممکن است تحت تاثیر منطقه، طبیعت و دوره جمع‌آوری حتی برای یک گونه تغییر کند. ناخالصی اصلی ثعلپ نشاسته است که باعث کاهش کیفیت آن مانند تقلیل ویسکوزیته می‌شود. بنابراین، قبل از استخراج پلیمر، فرآیندهایی مانند تیمار با اتانول، برای تخلیص و شفاف‌سازی صمغ‌ها بحرانی و اساسی است. با این شیوه، نسبت گلوکومانان به نشاسته می‌تواند از ۱/۵ تا ۳/۵ زیاد شود و در نتیجه کیفیت محصول افزایش می‌یابد (۲۸).

۱.۵. نوشیدنی سنتی ثعلپ-لبنی

پودر ثعلپ جزء اصلی نوشیدنی ثعلپ است که یک نوشیدنی لبنی سنتی بوده که معمولاً در ترکیه و مناطق مدیترانه در زمستان مصرف می‌شود. نوشیدنی ثعلپ با جوشاندن پودر ثعلپ با شیر و قند همراه با ادویه‌های معطر مانند دارچین تولید شده و به‌صورت داغ مصرف می‌شود (۲۹). ثعلپ نه تنها از نظر حسی طعم مشخصی به محصول می‌دهد، بلکه نقش پایدارکننده و ایجاد کننده ویسکوزیته نیز دارد. مصرف نوشیدنی ثعلپ در کشورهای بالکان سابقه طولانی دارد (۳۰) و گلوکومانان موجود در آن مزایای سلامتی‌بخشی مانند کاهش استرس، تنظیم قندخون، ممانعت از هیپوگلیسمی و کاهش ریسک بیماری‌های مزمن دارد (۳۰).

بنا به درخواست مصرف‌کنندگان جوان، پودر کاکائو به نوشیدنی ثعلپ اضافه شده و گزارش شده که علاوه بر بهبود آروما باعث افزایش ضریب قوام و گرانیوی ظاهری می‌شود (۳۱).

۲.۵. فیلم خوراکی

فیلم‌های خوراکی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر هستند که با کاهش تبادل رطوبت و گازهایی مانند اکسیژن و دی‌اکسید کربن باعث بهبود ظاهر و عمر ماندگاری محصولات غذایی می‌شوند. گزارش شده است که گلوکومانان‌های ثعلپ خاصیت تشکیل فیلم دارند و بنابراین به‌عنوان فیلم و پوشش خوراکی برای مواد غذایی قابل استفاده هستند. محلول‌های فیلم صمغ ثعلپ خواص ویسکوالاستیک شبیه صمغ لوبیای لوکاست و خصوصیات ممانعت‌کنندگی حتی بهتر از فیلم‌های صمغ لوبیای کوکاست و صمغ گوار دارند. خواص ساختاری فیلم‌های ثعلپ مشابه انواع گالاکتومانانی می‌باشد. سازش‌پذیری ثعلپ با گالاکتومانان‌ها مانند صمغ لوبیای لوکاست ممکن است در توسعه فیلم‌های با خصوصیات و عملکردهای برتر مفید باشد (۳۲).

۳.۵. بستنی

بستنی قهرمان‌ماراش در ترکیه و ایران رایج است و از ثعلپ (۱-۰/۷ درصد)، قند و شیر تهیه می‌شود. ثعلپ علاوه بر خاصیت پایدارکنندگی، طعم مشخص طبیعی به بستنی می‌دهد. با استفاده از ترکیب هیدروکلوئیدها مانند مخلوط صمغ کتیرا و ثعلپ، نتایج بهتری مانند کاهش تشکیل کریستال یخ و لاکتوز،



افزایش سفتی و صافی (۳۳) و مقاومت به ذوب، حاصل می شود. ثعلپ ویسکوزیته و ظرفیت نگهداری آب دسر را افزایش می دهد، بنابراین به مدت طولانی می توان آن در نگهداری کرد (۲۲ و ۳۴).

۶. نتیجه گیری

مانان ها بیوپلیمرهایی زیست تخریب پذیر با منشا گیاهی (مانند گوار، لوبیای لوکاست، گنجاک، ثعلپ) یا میکروبی بوده که نه تنها نقش تغلیظ کننده، امولسیفایر، پایدارکننده، اصلاح گر بافت و ایجادکننده پوشش/فیلم داشته بلکه خاصیت فیبری و پروبیوتیکی نیز دارند. بنابراین افزودن آن ها به غذا در بهبود خواص حسی و سلامتی بخشی آن موثر است بدون این که همانند پلیمرهای سنتزی پتانسیل سمیت داشته باشند و مسائل زیست محیطی ایجاد کنند. اما جهت دستیابی بهینه به خواص عملکردی فوق، لازم است برهمکنش مانان ها با دیگر اجزای غذایی به ویژه پلی ساکاریدهای دیگر بررسی شود و نیز سرنوشت بیولوژیکی آن ها در رابطه با خاصیت فیبری و اثر آن بر باکتری های پروبیوتیک ها روده بخوبی بررسی شود. اثرات عملکردی یا زیست فعالی مانان ها بشدت تابع ترکیب و ساختار شیمیایی آن بوده و این نیز به نوبه خود تابع منبع و منطقه جغرافیایی رشد آن، شرایط کشت و برداشت و غیره می باشد.

References

1. **Srivastava, P.K., Kapoor M. (2017).** Production, properties and applications of endo- β -mannanases. *Biotechnology Advances* 35, 1–19.
2. **Regmi S., Pradeep, G.C., Choi, Y.H., Choi, Y.S., Choi, J.E., Cho, S.S., Yoo, J.C. (2016).** A multi-tolerant low molecular weight mannanase from *Bacillus* sp.CSB39 and its compatibility as an industrial biocatalyst, *Enzyme and Microbial Technology* 92, 76–85.
3. **Van Zyla, W.H., Rose, S.H., Trollope, K., Gorgens, J.F. (2010).** Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications, *Process Biochemistry*, 45 (2010) 1203–1213.
4. **Olaniyi, O.O., Igbe, F.O., Ekundayo, T.C. (2013).** Optimization studies on mannanase production by *Trichosporonoides oedocephalis* in submerged state fermentation, *J. Biotech. Pharm. Res.* 4, 110-116.
5. **Bento, J.F., Mazzaro, I., de Almeida Silva, L.M., Moreira, R.A., Ferreira, M.L.C., Reicher, F., de O. Petkowicz, C.L. (2013).** Diverse patterns of cell wall mannan/galactomannan occurrence in seeds of the *Leguminosae*. *Carbohydr. Polym.* 92, 192-199.
6. **De Petkowicz, C.L., Reicher, F., Chanzy, H., Taravel, F.R., Vuong, R. (2001).** Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*, *Carbohydr. Polym.* 44 (2001) 107–112.
7. **Tester, R.F., Al-Ghazzewi F.H. (2013).** Mannans and health, with a special focus on glucomannans, *F. Res. Int.* 50, 384–391.
8. **Cheng, J.-J., Chao, C.H., Chang, P.C., Lu, M.K. (2016).** Studies on anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides from cultivated fungi *Antrodia cinnamomea*, *Food Hydrocol.* 53, 37–45.
9. **Telles, C.B.S., Sabry, D.A., Almeida-Lima, J., Costa, M.S.S.P., Melo-Silveira, R.F., Trindade, E.S., Sassaki, G.L., Wisbeck, E., Furlan, S.A., Leite, E.L., Rocha, H.A.O. (2011).** Sulfation of the extracellular polysaccharide produced by the edible mushroom



- Pleurotus sajor-caju alters its antioxidant, anticoagulant and antiproliferative properties in vitro, Carbohydr. Polym. 85, 514–52.
10. **Osińska-Jaroszuk, M., Jarosz-Wilkolazka, A., Jaroszuk-Ścisł, J., Szalapata, K., Nowak, A., Jaszek, M., Ozimek, E., Majewska, M. (2015).** Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties, World J. Micro. Biotech. 31, 1823–1844.
 11. **Korcová, J., Machová, E., Filip, J., Bystrický S. (2015).** Biophysical properties of carboxymethyl derivatives of mannan and dextran, Carbohydr. Polym. 134, 6–11.
 12. **Malgas, S., van Dyk, S.J., Pletschke, B.I. (2015).** β -galactosidase (Aga27A) synergism factor for the hydrolysis of galactomannan substrates, Enz. Micro. Tech. 70, 1–8. –A key
 13. **Prajapati, V.D., Jani, G.K., Moradiya, N.G., Randeria, N.P., Nagar, B.J., Naikwadia, N.N., Variya, B.C. (2013).** Galactomannan: A versatile biodegradable seed polysaccharide, Int. J. Biol. Macromol. 60, 83–92.
 14. **Sébastien, G., Christophe, B., Marioa, A., Pascal, L., Michel, P., Aureora, R. (2014).** Impact of purification and fractionation process on the chemical structure and physical properties of locust bean gum, Carbohydr. Polym. 108 (2014) 159–168.
 15. **Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, S.E. (2010).** Materials for Encapsulation, in: N.J. Zuidam and V.A. Nedović (Eds.), Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer Science+ Business Media, LLC.
 16. **Sande, M.A., Osorio, D.T., López, C.R., Alonso M.J. (2009).** Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes, Eur. J. Pharm. Biopharm. 72, 453–462.
 17. **Gao S., Nishinari, K. (2004).** Effect of deacetylation rate on gelation kinetics of konjac glucomannan, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 38, 241–249.
 18. **Krawczyk, H., Jönsson, A.S. (2011).** Separation of dispersed substances and galactoglucomannan in thermomechanical pulp process water by microfiltration, Sep. Purif. Technol. 79, 43–9.
 19. **Pham, T.A., Berrin, J.G., Record, E., To, Sigoillot K.A. (2011).** Hydrolysis of softwood by *Aspergillus mannanase*: role of a carbohydrate-binding module, J. Biotech. 148, 163–70.
 20. **Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Simões, J., Teixeira, J.A., Rosário, Domingues, M. M., Coimbra, M.A., Vicente, A.A. (2011).** Structural and thermal characterization of galactomannans from nonconventional sources, Carbohydr. Polym. 83, 179–185.
 21. **Liu H.X., Gong J.S., Li H., Lu Z.M., Qian J.Y., Xu Z.H., Shi J.S. (2015).** Biochemical characterization and cloning of an endo-1,4- β -mannanase from *Bacillus subtilis* YH12 with unusually broad substrate profile, Proc. Biochem. 50, 712–721.
 22. **Hamman, J.H. (2008).** Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel, Molecules 13, 1599–1616.
 23. **Tekinşen, K. K., Güner A. (2010).** Chemical composition and physicochemical properties of tubera produced from some Orchidaceae species, Fd. Chem. 121, 468–471.
 24. **Farhoosh R., Riazi A. (2007).** A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature, Fd. Hydrocol. 21, 660–666.
 25. **Juers, D.H., Swenson, H.A., Kurath, S.F. (1967).** Configuration and Hydrodynamic Properties of Fully Acetylated Salep Glucomannan, J. Polym. Sci. 5, 361–375.
 26. **Kurt, A., Kahyaoglu, T. (2017).** Gelation and structural characteristics of deacetylated salep Glucomannan, Fd. Hydrocol. 69, 255–263.



27. **Campestrini, L.H., Silveira, J.L.M., Duarte, M.E.R., Koop, H.S., Nosedá, M.D. (2013).** rheological study of Aloe barbadensis partially acetylated glucomannan, Carbohydr. Polym. 94, 511– 519.
28. **Yasař, K., Kahyaoglu, T., Şahan, N. (2009).** Dynamic rheological characterization of salep glucomannan/galactomannan based milk beverages, Fd. Hydrocol. 23, 1305–1311.
29. **Kurt, A. Kahyaoglu, T. (2015).** Rheological properties and structural characterization of salep improved by ethanol treatment, Carbohydr. Polym. 133 (2015) 654–661.
30. **Karaman, S., Yilmaz, M.T., Kayacier, A. (2011).** Simplex lattice mixture design approach on the rheological behavior of glucomannan based salep-honey drink mixtures: An optimization study based on the sensory properties, Fd. Hydrocol. 25 (2011) 1319-1326.
31. **McGee, H. (2007).** Ice cream that's a stretch, The New York Times. <https://www.nytimes.com/2007/08/01/dining/01curi.html>.
32. **Karaman, S., Kayacier, A. (2010).** Rheological characteristics of traditional salep drink flavoured with cocoa powder, GIDA 35, 397-401.
33. **Kurta, A., Kahyaoglu, T. (2014).** Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan, Carbohydr. Polym. 104, 50–58.
34. **Kurt, A., Cengiz, A., Kahyaoglu, T. (2016).** The effect of gum tragacanth on the rheological properties of salep based ice cream mix, Carbohydr. Polym. 143, 116-123.
35. **Ayar, A., Sert, D., Akbulut, M. (2009).** Effect of salep as a hydrocolloid on storage stability of "İncir Uytması" dessert, Fd. Hydrocol. 23, 62–71



Mannans and their importance in Salep

Pari Sohrabi¹, Fardin Tamjidi^{2*}

¹Ph.D Student, Department of Food Sciences and Technology, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Iran

²Assistan Professor, Department of Food Sciences and Engineering, faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Email: p.sohrabi2017@yahoo.com

f.tamjidi@uok.ac.ir

Abstract

Mannans are linear or branched hemicelluloses which their backbone is constituted of β -D-manopyranose units connected through $\beta_{1\rightarrow4}$ glycosidic bonds. The majority of mannans are hetro-polysaccharides which depending on the presence of other sugars in their structure are divided into the 4 groups, pure mannans, galactomannans, glucomannans and galactoglucomannans. The mannans can be harvested from plants (e.g., konjac tubers, guar seeds, locust bean, orchid tubers) and microorganisms (e.g., yeast), and as biodegradable and non-toxic biopolymers have many applications in food, pharmaceutical, cosmetic and textile industries. These hydrocolloids are utilized in food industry as edible film/coating, texture modifier (viscosity enhancer or gelling agent), stabilizer, emulsifier, coffee whiter and so on. The mannans also show health-promoting effects as prebiotic and dietary fiber. Glucomannans are the main constitute of salep, the dried and powdered tubers of some orchid plants, which improve the physical and sensory properties of salep beverage and ice-cream. Salep can be used in many food products as additive and also as edible film/coating. This study reviews the mannan types, and their occurrence and importance in salep.

Keywords: Orchid, Stabilizers, Salep, Mannans

اثر محیط کشت بر زنده‌مانی و تکثیر گیاه ثعلب معطر (*Gymnadenia conopsea* L.) از طریق انواع

قلمه در شرایط طبیعی

سالار عبدی^{۱*}، علی اکبر مظفری^۱، یاور وفایی^۱، کلثوم احمدزاده^۲

^۱گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

^۲واحد پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Email: abdi.salar1372@gmail.com

چکیده

امروزه حفاظت از ارکیدها به موضوعی نگران کننده در سطح جهانی تبدیل شده و جمعیت ارکیدها به دلایل مختلفی مانند برداشت بیش از حد، تجارت غیرقانونی و تغییرات آب و هوا در معرض خطر انقراض می‌باشند. گونه *Gymnadenia conopsea* گونه‌ای خاکزی بوده و دارای غده‌های گوشتی زیر زمینی به شکل پنجه‌ای است. این مطالعه با هدف بررسی درصد زنده‌مانی و تعداد غده‌های دختره تشکیل شده از انواع قلمه (قلمه گیاه کامل، قلمه قاعده، قلمه قاعده بدون غده، قلمه میانی و قلمه انتهایی گیاه) این گونه از ثعلب در شرایط طبیعی انجام شد. انواع قلمه‌های مورد آزمایش در دو مرحله‌ی گلدهی و میوه‌دهی گیاه تهیه شدند. برای این منظور از هفت نوع محیط کشت خاک مزرعه، خاک هوموس، ماسه، پرلیت + کوکوپیت، کود دامی، کود دامی + ماسه و آب استفاده شد. صفات مورد مطالعه شامل: درصد زنده‌مانی قلمه و تعداد غده‌های دختره تشکیل شده از هر قلمه بود. نتایج نشان داد که در مرحله گلدهی درصد زنده‌مانی قلمه گیاه کامل و قلمه قاعده در تمام محیط کشت‌ها به جز آب و کود دامی، بیشتر از سایر محیط‌ها بود. در مرحله میوه‌دهی درصد زنده‌مانی قلمه‌ها تفاوت آماری نشان ندادند اما در خاک مزرعه قلمه گیاه کامل و قلمه قاعده ۱۰۰ درصد زنده ماندند، درحالی که قلمه قاعده بدون غده به طور کامل از بین رفتند. قلمه میانی و قلمه انتهایی در هر دو مرحله گلدهی و میوه‌دهی، در تمام محیط کشت‌ها از بین رفتند. کشت گونه ثعلب *Gymnadenia conopsea* بعد از برداشت غده در فصل تابستان امکان‌پذیر است و باز رشد و زنده‌مانی انواع قلمه‌های آن تابع شرایط و نوع محیط کشت است.

کلمات کلیدی: تکثیر، حفاظت، غده، قلمه، محیط کشت

مقدمه

خانواده ثعلبیان با بیش از ۸۸۰ جنس و حدود ۲۶۰۰۰ گونه، یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهان گل‌دار می‌باشد، که بسیاری از آن‌ها به صورت وحشی در سراسر جهان رشد می‌کنند (۱). گونه *Gymnadenia conopsea* L. گیاهی چند ساله و علفی که متعلق به تیره *Gymnadenia* از خانواده Orchidaceae است که به طور گسترده در سراسر اروپا و مناطق معتدل و نیمه گرمسیری آسیا رشد می‌کند. این گونه دارای گل‌های معطر و غده‌های گوشتی زیرزمینی به شکل پنجه می‌باشد که در جنگل‌ها، چمن‌زارها و مراتع پر آب با ارتفاع ۲۰۰ تا ۴۷۰۰ متری می‌روید (۵). برداشت بیش از حد از غده‌های زیرزمینی ثعلب‌ها به ویژه ثعلب پنجه‌ای منجر به از بین رفتن و کوچک شدن جمعیت‌ها شده است (۲).

استفاده از غده‌های ارکید تحت عنوان ثعلب در ایران رایج است. بیش‌ترین مصرف ثعلب در ایران برای تولید بستنی می‌باشد. غده‌های ارکید در ایران برای درمان خلط، پوکی استخوان، درد مفاصل و تنگی نفس به‌کار می‌روند و برای کودکانی که دچار سوء تغذیه هستند به عنوان مکمل غذایی تجویز می‌شوند (۲). گونه‌های ثعلب در ایران شامل ۴۸ گونه و زیرگونه می‌باشند که ۳۰ گونه و زیرگونه قابلیت تولید غده زیرزمینی را دارا می‌باشند و تنها ۱۶ گونه برای برداشت غده مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرند (۲). قیمت بالای غده‌های ثعلب باعث ایجاد رقابت بین جمع‌کنندگان شده و در برخی موارد قبل از گلدهی و تشکیل بذر، غده‌ها را از بوته جدا می‌کنند و بقیه بخش‌ها را دور می‌ریزند. برداشت ثعلب‌ها قبل از تشکیل بذر باعث کاهش شدید جمعیت گونه‌ها شده و امر سبب انقراض این گونه‌ها می‌شود (۳).

مواد و روش‌ها

گونه مورد آزمایش از منطقه چهل چشمه (شهرستان دیواندره) استان کردستان طی فصل‌های بهار و تابستان سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری و جهت قلمه‌گیری در گلدان‌های پلاستیکی کشت شدند. طی این تحقیق، در دو مرحله رشد گیاه شامل مرحله گلدهی و میوه‌دهی قلمه‌گیری شد. برای این منظور ابتدا غده‌های دختری از گیاه مادری جدا و سپس از گیاه، قلمه گیاه کامل، قلمه قاعده، قلمه بدون غده مادری، قلمه میانی و قلمه انتهایی استفاده شد (شکل ۱). قلمه‌های تهیه شده در محیط کشت‌های مختلف شامل خاک مزرعه، هوموس، ماسه، پرلیت + کوکوپیت، کود دامی، کود دامی + ماسه و آب کشت شدند. برای انجام این تحقیق از روش آزمایش فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار (۵ گلدان پلاستیکی یک کیلویی و هر گلدان شامل یک نمونه) استفاده گردید. فاکتورهای مورد بررسی شامل: فاکتور اول (A) مراحل رشد گیاه و فاکتور دوم (B) نوع قلمه و فاکتور سوم نوع محیط کشت بود. صفات قابل اندازه‌گیری شامل درصد زنده‌مانی قلمه و تعداد غده‌های دختری تشکیل شده از هر نمونه قلمه بود.

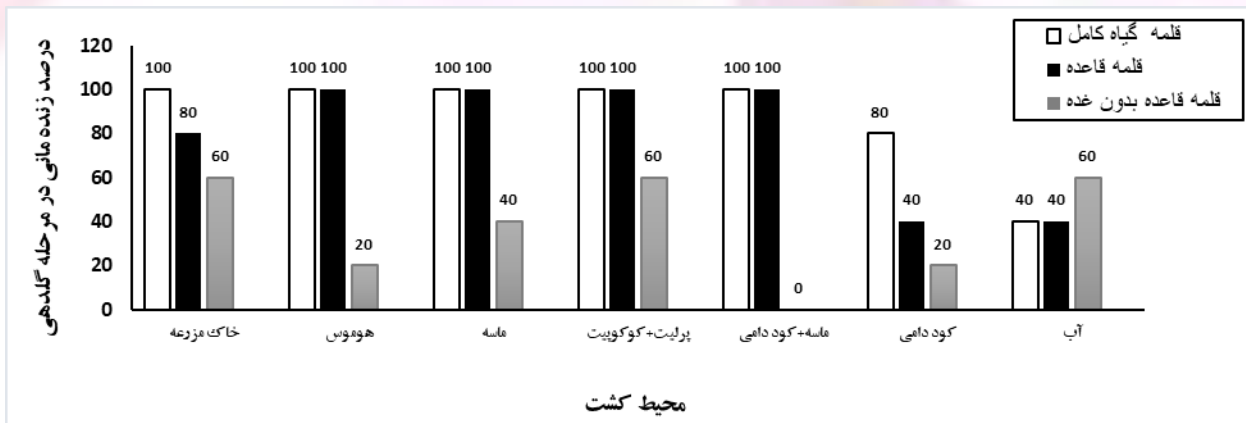


شکل ۱. انواع قلمه تهیه شده از گونه *Gymnadenia conopsea*. A: قلمه قاعده، B: قلمه کامل گیاه، C: قلمه قاعده بدون غده، D: قلمه انتهایی در مرحله گلدهی و میوه‌دهی، E: قلمه میانی

نتایج و بحث

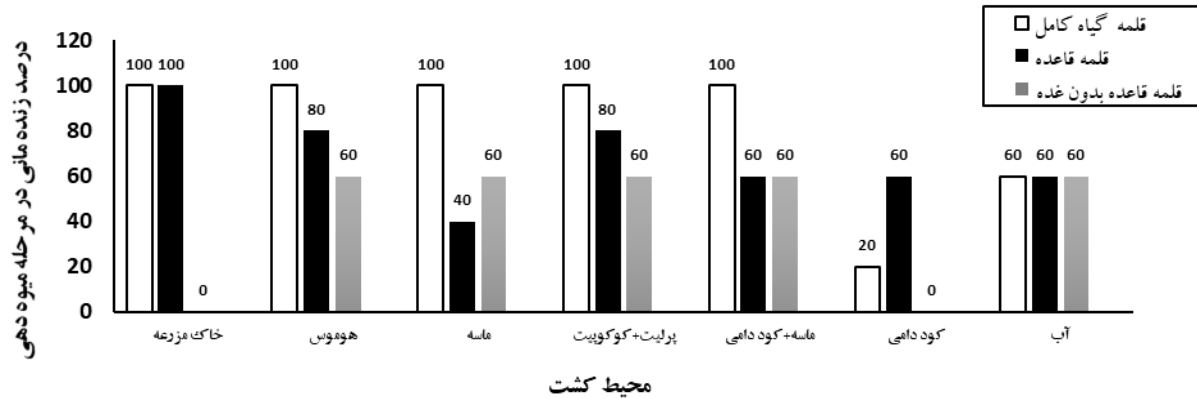
بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس ANOVA تیمارهای آزمایش شامل: قلمه گیاه کامل، قلمه قاعده و قلمه قاعده بدون غده در دو مرحله گلدهی و میوه‌دهی در محیط‌های کشت خاک مزرعه، خاک هوموس، ماسه، پرلیت + کوکوپیت، کود دامی، کود دامی + ماسه و محیط کشت آب روی درصد زنده‌مانی قلمه‌ها اثر معنی‌داری داشتند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در مرحله گلدهی درصد زنده‌مانی گیاه

کامل (شکل ۲) در پنج نوع محیط کشت خاک مزرعه، هوموس، ماسه، پرلیت+کوکوپیت و ماسه+کود دامی نسبت به سایر قلمه‌ها بیشتر بود که تفاوت معنی‌داری با محیط کشت کود دامی نداشت. کمترین درصد زنده‌مانی در آب مشاهده شد، که نسبت به سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت. در قلمه قاعده بیشترین درصد زنده‌مانی قلمه در محیط کشت‌های هوموس، ماسه، پرلیت+کوکوپیت و ماسه+کود دامی مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با زنده‌مانی در محیط کشت خاک مزرعه نداشت. حداقل درصد زنده‌مانی قلمه‌ها در محیط کشت‌های کود دامی و آب مشاهده شد. بالاترین درصد زنده‌مانی در قلمه قاعده بدون غده در محیط کشت‌های خاک مزرعه، پرلیت+کوکوپیت، ماسه و آب مشاهده گردید. در محیط کشت ماسه+کود دامی نمونه‌های قلمه‌گیری شده زنده نماندند و همگی از بین رفتند.



شکل ۲. زنده‌مانی قلمه در مرحله گلدهی در محیط‌های کشت خاک مزرعه، خاک هوموس، ماسه، پرلیت + کوکوپیت، کود دامی، کود دامی + ماسه و آب در شرایط طبیعی.

نتایج نشان داد که در مرحله میوه‌دهی درصد زنده‌مانی قلمه گیاه کامل در محیط‌های کشت خاک مزرعه، هوموس، ماسه، پرلیت + کوکوپیت و ماسه + کود دامی بیشتر از سایر قلمه‌ها بود. در محیط کشت کود دامی کمترین درصد زنده‌مانی قلمه مشاهده شد که با محیط کشت آب اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۳). قلمه قاعده در خاک مزرعه، هوموس و پرلیت + کوکوپیت بیشترین و در محیط کشت ماسه کمترین درصد زنده‌مانی مشاهده شد. قلمه‌های قاعده بدون غده در مرحله میوه‌دهی روی محیط کشت‌های خاک مزرعه و کود دامی بطور کامل از بین رفتند در حالیکه در سایر محیط کشت‌ها ۶۰٪ زنده‌مانی مشاهده شد. قلمه میانی و قلمه انتهایی گیاه در هیچکدام از محیط کشت‌ها زنده نماندند (شکل ۳).



شکل ۳. زنده ماندن قلمه در مرحله میوه دهی در محیط کشت خاک مزرعه، خاک هوموس، ماسه، پرلیت + کوکوپیت، کود دامی، کود دامی + ماسه و آب در شرایط طبیعی.

بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس ANOVA نشان داد که در هر دو مرحله گلدهی و میوه دهی تعداد غده های دختره تشکیل شده از هر قلمه ها در تمام محیط های کشت، تفاوت معنی داری داشتند. بر اساس نتایج در مرحله میوه دهی تعداد غده های دختره تشکیل شده از هر قلمه در محیط های کشت مختلف با هم تفاوت معنی داری داشتند. بیشترین تعداد غده های دختره در قلمه گیاه کامل مربوط به محیط های کشت خاک مزرعه، هوموس، ماسه، پرلیت + کوکوپیت و ماسه + کود دامی بود. کمترین تعداد غده دختره تشکیل شده در محیط کشت کود دامی مشاهده شد. قلمه قاعده در خاک مزرعه و هوموس مطلوب ترین محیط کشت برای ازدیاد غده های دختره بودند. که تفاوت معنی داری با هم نداشتند. حداقل غده تشکیل شده در ماسه + کود دامی، کود دامی و ماسه مشاهده شد. بهترین محیط کشت برای ازدیاد غده از قلمه قاعده بدون غده در هوموس، ماسه، پرلیت + کوکوپیت، ماسه + کود دامی و آب بودند، که تفاوت معنی داری بین آن ها مشاهده نشد. تمام قلمه ها در خاک مزرعه و کود دامی از بین رفتند.

نتایج نشان داد که در مرحله گلدهی در تمام محیط های کشت مورد آزمایش، تعداد غده های دختره تشکیل شد، اما هم تفاوت معنی داری بین آن ها وجود داشت. مطلوب ترین محیط کشت برای ازدیاد غده های دختره در قلمه گیاه کامل مربوط به محیط های کشت خاک مزرعه، هوموس، ماسه، پرلیت + کوکوپیت و ماسه + کود دامی بود، که تفاوت معنی داری بین آن ها مشاهده نشد. کمترین تعداد غده دختره تشکیل شده در آب مشاهده شد. در خاک مزرعه، هوموس، ماسه و پرلیت + کوکوپیت بیشترین غده دختره در قلمه قاعده تشکیل شد و تفاوت معنی داری بین آن ها وجود نداشت (جدول ۴). محیط های کشت کود دامی و آب بطور معنی داری کمتر از سایر محیط های کشت بودند. تشکیل غده دختره در قلمه قاعده بدون غده در خاک مزرعه بطور معنی داری بهتر از سایر محیط های کشت بود. هوموس و کود دامی کمترین تعداد غده را ایجاد کردند. روی محیط کشت ماسه + کود دامی قلمه ها زنده نماندند.

جدول ۴. تعداد غده‌های تشکیل شده روی محیط کشت خاک مزرعه، خاک هوموس، ماسه، پرلیت + کوکوپیت، کود دامی، کود دامی + ماسه و آب در مرحله گلدهی و میوه‌دهی

تعداد غده دختری (مرحله گلدهی)			تعداد غده دختری (مرحله میوه دهی)			محیط کشت
قلمه کامل	قلمه گیاه	قلمه قاعده	قلمه قاعده بدون غده	قلمه کامل	قلمه گیاه	
۱/۴ ^a	۱/۴ ^a	۱/۴ ^a	۰/۰ ^b	۱/۴ ^a	۱/۶ ^a	خاک مزرعه
۰/۲ ^c	۱/۶ ^a	۱/۸ ^a	۰/۶ ^a	۱/۶ ^a	۱/۶ ^a	هوموس
۰/۴ ^b	۱/۶ ^a	۱/۶ ^a	۰/۸ ^a	۰/۶ ^c	۱/۶ ^a	ماسه
۰/۶ ^b	۱/۶ ^a	۱/۴ ^a	۰/۶ ^a	۱/۲ ^b	۱/۶ ^a	پرلیت + کوکوپیت
۰/۰ ^d	۱/۲ ^b	۱/۴ ^a	۰/۶ ^a	۰/۸ ^c	۱/۴ ^a	ماسه + کود دامی
۰/۲ ^c	۰/۴ ^c	۱/۲ ^b	۰/۰ ^b	۰/۸ ^c	۰/۲ ^c	کود دامی
۰/۶ ^b	۰/۶ ^c	۰/۶ ^c	۰/۶ ^a	۱ ^b	۰/۶ ^b	آب



شکل ۴: تشکیل غده دختری در چند محیط کشت. A: قلمه کامل در محیط کشت آب، B: قلمه قاعده در محیط کشت ماسه، C: قلمه قاعده در محیط کشت خاک مزرعه، D: قلمه قاعده در محیط کشت کود دامی + ماسه، E: قلمه کامل در محیط کشت کود دامی، F: محیط کشت پرلیت + کوکوپیت، G: قلمه کامل در محیط کشت هوموس، H: قلمه قاعده بدون غده در محیط کشت هوموس

نتیجه گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که می‌توان از قلمه‌های گیاه ثعلب در زمان بعد از برداشت غده‌های آن، مجدداً غده برداشت کرد. محیط کشت و نوع قلمه از فاکتورهای مهم و تاثیرگذار بر تولید مجدد غده از قلمه گیاه ثعلب می‌باشند. لذا با برداشت و بلافاصله کشت مجدد بوته می‌توان به محصول دوم دست یافت.

References



1. **Dressler, R.L. (1982).** The orchids: Natural history and classification. Harvaed University Press ,Cambridge.
2. **Ghorbani, M.A., Gravendeel, A., Selliah, B., Zarre, S., de Boer, H. (2017).** DNA barcoding of tuberous Orchidoideae: a resource for identification of orchids used in Salep. Molecular Ecology Resources, 17 :342-352.
3. **Kreziou, A., de Boer, H., Gravendeel, B. (2016).** Harvesting of salep orchids in north-western Greece continues to threaten natural populations. Oryx 50, 393-396.
4. **Ghorbani, A., Gravendeel, B., Zare, S., De Boer, H.J. (2014).** Illegal wild collection and international trade of CITES-listed terrestrial orchid tubers in Iran. TRAFFIC Bulletin, 26: 52-58.
5. **Meekers, T., Hutchings, M.J., Honnay, O., Jacquemyn, H. (2012).** Biological flora of the British Isles: Gymnadenia conopseas. L. J. Ecol. 100, 1269–1288.



Effect of growth medium on survival and propagation of fragrant orchid (*Gymnadenia conopsea* L.) through different cuttings in normal conditions

Salar Abdi^{*1,2}, Ali Akbar Mozafari^{1,2}, Yavar Vafae^{1,2}, Kolsom Ahmadza^{1,2}

¹Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

²Medicinal Plants Breeding and Development Research Institute, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Email: abdi.salar1372@gmail.com

Abstract

Today, the protection of orchids has become a global concern, and orchid populations are endangered for a different reasons such as overharvesting, illegal trade, and climate change. The fragrant orchid (*Gymnadenia conopsea* L.) is one of the terrestrial species with claw-shaped underground fleshy tubers. The aim of this study was to investigate the survival rate and number of daughter tubers initiated from different cuttings (whole plant cutting, basal cutting, basal cutting without tubers, middle cuttings and terminal plant cutting) of this species in natural conditions. The tested cuttings were prepared in two stages of flowering and fruiting. For this purpose, seven types of growth media were used: field soil, humus soil, sand, perlite + cocopeat, animal manure, animal manure + sand and water. The studied traits included: survival percentage of cuttings and number of daughter tubers initiated of each cutting. The results showed that in the flowering stage, the percentage of survival of whole plant cutting and basal cutting in all of media except water and manure was higher than other media. At the fruiting stage, the survival percentage of cuttings did not show a statistical difference, but in the field soil, whole plant cutting and basal cuttings survived by 100%, while basal cutting without tuber was completely destroyed. The middle and terminal cuttings were died in all growth media during both flowering and fruiting stages. Cultivation of this species is possible after harvesting the tubers in summer, and the regrowth and survival of its cuttings depend on the conditions and type of growth medium.

Keywords: Growth medium, Propagation, Protection, Tubers, Cuttings





بهینه سازی جوانه زنی بذر و تشکیل گیاهچه ثعلب گونه *Orchisanatolica* در شرایط کشت درون شیشه ای

فروزان ولدی^{۱،*}، جلال خورشیدی^{۱،۲}، علی اکبر مظفری^{۱،۲}، یاور وفایی^{۱،۲}

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

^۲ مرکز پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Email: frouzan.valadi@gmail.com

چکیده

برداشت های بی رویه از ارکیده های دارویی موجب کاهش جمعیت این گونه ها شده و لذا تکثیر و حفاظت از این گونه ها امری ضروری به نظر می رسد. تکثیر ارکیده ها در طبیعت معمولاً از طریق بذر صورت می گیرد، ولی جوانه زنی بذرهای آن ها به دلیل اندوخته ذخیره ای کمی که دارند، پایین است. تکثیر درون شیشه ای یکی از مناسب ترین راهکارها جهت ازدیاد و جلوگیری از انقراض گونه های گیاهی است. هدف از این پژوهش ارزیابی شاخص های جوانه زنی بذر گونه *Orchisanatolica* در شرایط درون شیشه ای روی محیط های کشت Malmgren، MS، ¼ MS، ¼ B5 و p723 می باشد. بر اساس نتایج بیشترین تعداد بذر متورم شده و پروتوکورم روی محیط کشت Malmgren مشاهده شد. کمترین تعداد پروتوکورم و بذر متورم شده روی محیط کشت MS ¼ به دست آمد. سرعت جوانه زنی بذر روی محیط کشت MS ¼ کمتر از سایر محیط های کشت بود. مشاهدات نشان داد که پس از چهار ماه رشد بذرهای MS ¼ متوقف و پروتوکورم های تشکیل شده شروع به خشک شدن کردند. بیشترین درصد خشک شدن پروتوکورم ها روی محیط کشت Malmgren و کمترین درصد خشک شدن روی محیط کشت ¼ B5 مشاهده شد. در نهایت طبق مشاهدات و نتایج به دست آمده محیط کشت malmgren به دلیل درصد و سرعت بالای جوانه زنی بذر به عنوان مناسب ترین محیط در بین چهار محیط پیشنهاد می شود.

کلمات کلیدی: محیط کشت مصنوعی، ارکید، جوانه زنی، درون شیشه ای، پروتوکورم

مقدمه

خانواده ارکید (Orchidaceae) با حدود ۲۸۰۰۰ گونه و ۸۸۰ جنس، دومین خانواده بزرگ گیاهان گل دار بعد از تیره کاسنی است (۱). اگرچه ارکیده ها در درجه اول به عنوان گل های زینتی پرورش داده می شدند، اما بسیاری از آن ها به عنوان گیاه دارویی یا ماده غذایی توسط بسیاری از اقوام و قبایل در مناطق مختلف جهان مورد استفاده قرار می گیرند (۳). به دلیل کوچک بودن جمعیت و توزیع محدود هرگونه ارکید، مراقبت های شدید و مدیریت زیستگاه بسیار توصیه می شود. تلاش بسیار کمی برای پرورش ارکیده های دارویی در مقیاس تجاری انجام شده است. گونه هایی که به دلیل فعالیت های انسانی به مرحله انقراض رسیده اند، فقط با حمایت انسان می توانند زنده بمانند. خطر انقراض ارکیده ها به دلایلی از قبیل جاده سازی، دست کاری زمین ها، تغییرات آب و هوایی، جمع آوری بیش از حد و تجارت غیرقانونی می باشد. بذر این گیاهان بسیار ریز و به تعداد زیاد در کپسول ها تولید می شود و بدون آندوسپرم و دارای جنین نابالغ بوده و جوانه زنی آن ها در طبیعت



بسیار دشوار، آهسته، طولانی مدت و وابسته به قارچ‌های همزیست است (۹). جوانه‌زنی آزمایشگاهی ارکیدهای خاکی به چند جنس محدود می‌شود (۵). در ایران ۴۶ گونه و زیرگونه از ارکیدها وجود دارد که ۳۶ گونه آن‌ها تولید غده کرده و برای تولید ثعلب استفاده می‌شوند. سالانه حدود ۷-۱۱ میلیون بوته ارکید در ایران برداشت می‌شود که این میزان برداشت، ارکیدها را در خطر جدی انقراض قرار داده است (۲). بنابراین، تکثیر در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند برای تکثیر انبوه ارکیدها برای اهداف تجاری مفید باشد. در این پژوهش اثرات محیط کشت‌های مختلف، در جوانه‌زنی بذر، رشد پروتوکورم‌ها، و تشکیل گیاهچه *Orchisanatolica* به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش

در این پژوهش از بذور گونه *Orchisanatolica* برای کشت در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد. نمونه‌های گیاهی در مرحله گلدهی از رویشگاه طبیعی (روستای لورابی، شهرستان جوانرود، استان کرمانشاه) جمع‌آوری و سپس به کلکسیون ثعلب مرکز پژوهشی گیاهان دارویی دانشگاه کردستان منتقل شد. بعد از رسیدن میوه، کپسول‌های رسیده از روی بوته‌ها جمع‌آوری و خشک شدند. سپس از کپسول‌ها بذور خشک‌شده استحصال و در فالكون ریخته و تا زمان کشت، در یخچال با دمای مثبت ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

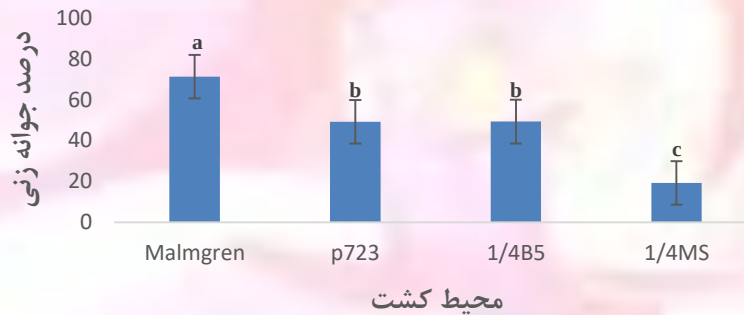
محیط کشت‌های استفاده شده شامل Malmgren، 1/4 B5، 1/4 MS، p723 بودند. برای تهیه محیط کشت از استوک محیط‌های کشت مورد آزمایش استفاده شد. بعد از حل شدن کامل مواد اضافه‌شده به محیط کشت، pH آن روی ۵/۸ تا ۶ تنظیم و مقدار ۷ گرم در لیتر آگار-آگار به محیط کشت اضافه شد. مقدار ۰/۲ درصد زغال فعال به محیط‌های کشت اضافه شد. محیط کشت در اتوکلاو با فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱/۵ درجه سلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه استریل و پس از رسیدن به دمای حدود ۵۰ درجه سلسیوس بین پتری‌ها تقسیم شد.

برای ضدعفونی بذر از وایتکس (هیپوکلریت سدیم) ۰/۵ درصد استفاده شد. مقدار مورد نیاز بذر برای کشت، در فالكون استریل ریخته شده و محلول وایتکس ۰/۵ درصد به آن اضافه شد. بعد از ۷ دقیقه، مقداری آب مقطر اتوکلاو شده به آن اضافه شد و توسط لوپ یا سمپلر، تعدادی بذر به هر پتری انتقال یافت و با اسپریدر بذرها بر روی سطح محیط کشت به‌طور یکنواخت پخش شد. بعد از اتمام کشت، پتری‌های آماده‌شده در اتاقک رشد در شرایط تاریکی مداوم و دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۵ تا ۶۰ درصد قرار داده شد. پس از جوانه‌زدن بذرها و تشکیل پروتوکورم برای شاخه‌زایی و رشد، پتری‌ها در فتوپریود ۸ ساعت تاریک و ۱۶ ساعت نور $42 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ و در همان دمای جوانه‌زنی قرار داده شدند. در این مطالعه دو شاخص درصد جوانه‌زنی و درصد خشک شدن پروتوکورم‌ها در فواصل زمانی یک ماهه با استفاده از میکروسکوپ و ذره بین بررسی شد.

بحث و نتیجه‌گیری

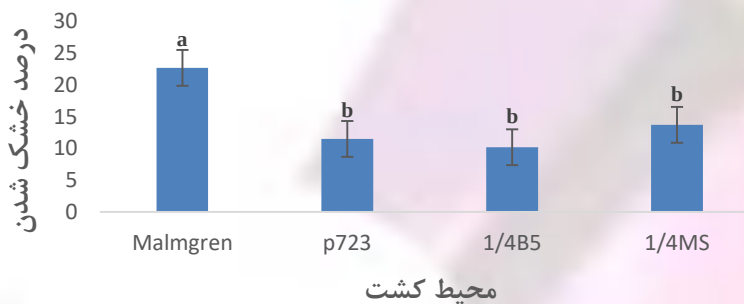
مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در بین چهار محیط کشت استفاده شده، محیط کشت Malmgren با ۷۱/۳۸ درصد و محیط کشت 1/4 MS با ۱۹/۲۴ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین درصد جوانه‌زنی را

داشتند. جوانه زنی روی محیط کشت B5 ¼، ۴۹/۳۲ درصد و روی محیط کشت p723، ۴۹/۲۷ درصد بود که تفاوت معنی داری با هم نداشتند (شکل ۱).



شکل ۱. درصد جوانه زنی بذر گونه‌ی *Orchisanatolica* در محیط کشت‌های مختلف

نتایج نشان داد که بیشترین درصد بذر مرده مربوط به محیط کشت Malmgren بود که ۷۷/۳۵ درصد از بذرها جوانه زدند. و کمترین درصد جوانه زنی بذر (۱۹/۸ درصد) روی محیط کشت ¼ MS مشاهده شد. محیط‌های کشت B5 ¼ و p723 تفاوت آماری معنی داری نداشتند (شکل ۲).



شکل ۲. درصد خشک شدن بذر گونه‌ی *Orchisanatolica* در محیط کشت‌های مختلف

بر اساس نتایج، بیشترین زمان لازم برای متورم شدن بذرهای مربوط به محیط کشت ¼MS بود، در حالی که محیط‌های کشت Malmgren، B5 ¼ و p723 به‌طور معنی داری نسبت به محیط کشت ¼ MS از لحاظ مدت زمان متورم شدن بذرها تفاوت نشان داشتند. بذرهای روی محیط کشت ¼ MS بعد از ۱۶۹ روز به مرحله شاخساره‌زایی رسیده که کمترین سرعت رشد را در بین محیط کشت‌های دیگر داشت. تشکیل ریزوئید نیز با سرعت تورم یافتن بذرها و جوانه زنی آنها همخوانی نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱. سرعت رشد بذر گونه‌ی *Orchisanatolica* در محیط کشت‌ها و مراحل مختلف

محیط کشت	متورم شدن (روز)	تشکیل ریزوئید (روز)	شاخساره‌زایی (روز)
Malmgren	۲۰ ^c	۸۰ ^b	۱۲۴ ^b
p723	۳۰ ^b	۸۵ ^b	۱۲۹ ^b
1/4MS	۶۰ ^a	۱۲۰ ^a	۱۶۹ ^a



چهار ماه بعد از کشت، پروتوکورمها شروع به خشک شدن کردند. محیط کشت Malmgren با ۲۲/۶۵ درصد بیشترین میزان خشک شدن را به همراه داشت. در حالی که محیط کشت B5 ¼ کمترین درصد (۱۰/۱۸ درصد) خشک شدن را داشت.

از مشکلات جوانه زنی ارکیدهای خاکزی در مقایسه با ارکیدهای گرمسیری یا زینتی این است که محیط کشت های مرسوم مانند: Mit و Mid and Balard, Knudson C, MS, Fast, Queiris, Vacin and Went برای این گونه های خاکزی پر نمک هستند. از طرف دیگر سطح بالای نیتروژن در فرم های نترات و آمونیوم (نیتروژن غیر آلی) برای بذر سمیت ایجاد می کند. اشکال غیر آلی نیتروژن ممکن است به دلیل کم بودن فعالیت نترات ردوکتاز در طی جوانه زنی و رشد پروتوکورم مانع از جوانه زنی شود (۶). ممکن است یکی از دلایل پایین بودن درصد جوانه زنی روی محیط کشت MS ¼، نیتروژن غیر آلی موجود در این محیط باشد. طبق گزارش های قبلی، منابع نیتروژن آلی (به عنوان مثال اسیدهای آمینه) در مقابل اشکال غیر آلی ممکن است تأثیر مثبتی بر جوانه زنی بذر در گل ارکیدها داشته باشد (۷). استفاده از آب آناناس به عنوان منبع نیتروژن آلی در محیط کشت Malmgren، ممکن است از دلایل مؤثر در جوانه زنی بیشتر بذر باشد. آمینون ترکیبی از اسید آمینه های مختلفی است که در تحقیق حاضر به عنوان یکی از منابع نیتروژن آلی مورد استفاده قرار گرفت و بر افزایش درصد و سرعت جوانه زنی تأثیر مثبت داشت. آب آناناس تأثیر بسیار تحریک کننده ای بر تشکیل ریشه و رشد دارد (۷). محیط کشت Orchimax همراه با ۶- بنزیلادنین و زغال فعال بهترین ماده در ارتقاء جوانه زنی بذر در *Orchis mascula* است (۱۳). به این دلیل در مطالعه حاضر، محیط کشت- های MS ¼ و B5 ¼ با افزودن ۲ گرم در لیتر زغال فعال اصلاح شد. ارکیدهای خاکزی نواحی معتدله سخت ترین و مشکل ترین گروه ارکیدها از نظر جوانه زنی می باشند (۱۰). پیتون به عنوان منبعی از کربن و نیتروژن در کشت بافت گیاهی مورد استفاده قرار می گیرد (۸). پیتون، یک منبع نیتروژن آلی موجود در محیط کشت p723 است که ممکن است با ایجاد ترکیبات شبه اکسین یا آمینواسیدهای موجب افزایش نمو دانهال شود (۴). پیتون می تواند به عنوان فاکتور افزایش رشد و نمو بافت گیاهی نقش ویژه ای داشته باشد (۱۱).

نتیجه گیری کلی

تکثیر ارکیدها در شرایط آزمایشگاهی به دلیل اینکه نیازهای غذایی آنها به طور کامل یافت نشده است مشکل است. استفاده از یک ترکیب آلی مانند آب آناناس یا ترکیبات مشابه دیگر از اهمیت بالایی برخوردار است. سطوح بالای نیتروژن در فرم های نترات و آمونیوم (نیتروژن غیر آلی) ایجاد سمیت می کنند. بنابراین استفاده از ترکیبات دارای نیتروژن آلی در محیط کشت می تواند تأثیر به سزایی در جوانه زنی و رشد بذر ارکیدها داشته باشد. با انتخاب محیط کشت مناسب می توان در شرایط آزمایشگاهی جوانه زنی بذر و تشکیل گیاهچه *Orchisanatolica* را بهبود بخشید. در نهایت طبق مشاهدات و نتایج به دست آمده محیط کشت malmgren به دلیل درصد و سرعت بالای جوانه زنی بذر به عنوان مناسب ترین محیط در بین چهار محیط پیشنهاد می شود.



References

1. Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Salazar, G., Van den Berg, C., Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. Botanical journal of the Linnean Society, 177(2), 151-174.
2. Ghorbani, A., Zarre, S., Gravendeel, B., de Boer, H.J. (2014). Illegal wild collection and international trade of CITES-listed terrestrial orchid tubers in Iran. Traffic Bulletin, 26(2), 52-58.
3. Kasulo, V., Mwabumba, L., Cry, M. (2009). A review of edible orchids in Malawi. Journal of Horticulture and Forestry, 1(7), 133-139.
4. Kauth, P.J., Vendrame, W.A., Kane, M.E. (2006). In vitro seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 85(1), 91-102.
5. Leroux, G., Barabe, D., Vieth, J. (1995). Comparative morphogenesis of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) protocorms cultivated in vitro with or without sugar. Canadian Journal of Botany, 73(9), 1391-1406.
6. Malmgren, S. (1992). Large scale asymbiotic propagation of *Cypripedium calceolus*-plant physiology from a surgeon's point of view. Botanic gardens Micropropagation news, 1: 59-63.
7. Malmgren, S. (1996a). Orchid propagation: theory and practice. In: C. Allen (Editor), North American native orchids: propagation and production, Germantown, Maryland, USA, pp. 63-71.
8. Nhut, D. T., Thi, N. N., Khiet, B. L. T., Luan, V.Q. (2008). Peptone stimulates in vitro shoot and root regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.). Scientia Horticulturae, 115(2), 124-128.
9. Pant, B. (2013). Medicinal orchids and their uses: Tissue culture a potential alternative for conservation. African Journal of plant science, 7(10), 448-467.
10. Rasmussen, H. N., Dixon, K.W., Jersáková, J., Těšitelová, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. Annals of Botany, 116(3), 391-402.
11. Sivakumar, G., Yu, K.W., Hahn, E.J., Paek, K.Y. (2005). Optimization of organic nutrients for ginseng hairy roots production in large-scale bioreactors. Current Science, 89: 641-649.
12. Stewart, S.L., Kane, M.E. (2006). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. Plant Cell Tissue and Organ Culture 86: 147-158.
13. Valletta, A., Attorre, F., Bruno, F., Pasqua, G. (2008). In vitro asymbiotic germination of *Orchis mascula* L. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 142(3), 653-655.



Optimization of seed germination and orchid seedling formation of *Orchisanatolica* species in Invitro culture conditions

Forouzan Valadi^{*1,2}, Jalal Khorshid^{1,2}, Ali Akbar Mozaffari^{1,2}, Yavar Vafaei^{1,2}

¹Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan,
Sanandaj, Iran

²Research Center for Medicinal Plants Improvement and Development, Kurdistan University,
Sanandaj, Iran

Email: frouzan.valadi@gmail.com

۹۴

Abstract

Improper harvesting of medicinal orchids has reduced the population of these species and therefore reproduction and protection of these species is necessary. Propagation of orchids in nature is usually done by seeds, but the germination of their seeds is low due to lack endosperm in seeds. Invitro propagation is one of the most appropriate strategies to propagation and prevents the extinction of plant species. The aim of this study was to evaluate the seed germination indices of *Orchisanatolica* in invitro conditions on Malmgren, ¼MS, p723 and ¼B5 media. Based on the results, the highest number of swollen seeds and protocorm were observed on Malmgren medium. The lowest number of protocorms and swollen seeds were obtained on ¼MS medium. Seed germination rate on ¼MS medium was slower than other media. Results showed that after four months the seeds growth was stopped on ¼MS and protocormes began to dry. The highest and the lowest percentage of dried protocormes were observed on Malmgren and ¼B5 medium medium, respectively. Finally, according to the results, malmgren medium is recommended as the most suitable medium among the four evaluated media.

Keywords: Artificial culture medium, Orchid, Germination, Invitro, Protocorm



بررسی جوانه‌زنی ناهمزیست بذر و تشکیل پروتوکورم در ثعلب *Ophrys straussii* تحت شرایط درون شیشه‌ای

کلتوم احمدزاده^{۱*}، علی‌اکبر مظفری^{۲،۱}، یاور وفایی^{۲،۱}، جلال خورشیدی^{۲،۱}

^۱ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

^۲ واحد پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Email: k.ahmadzadeh1990@gmail.com

چکیده

در سال‌های اخیر در جهان و ایران جمعیت ارکیدها در معرض انقراض قرار گرفته و حفاظت از ارکیدها به یک موضوع جهانی تبدیل شده است. *Ophrys straussii* یکی از گونه‌های ثعلب خاکزی است. بذر ثعلب‌های خاکزی دارای جنینی کوچک و وزنی معادل ۰/۳ تا ۱۴ میکروگرم می‌باشند. که فاقد هر گونه بافت ذخیره‌ای و دارای پوسته سختی است که باعث طولانی شدن دوره خواب آن‌ها می‌شود. این پژوهش با هدف بررسی جوانه‌زنی ناهمزیست بذر گونه *Ophrys straussii* در شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. برای این منظور سه نوع محیط کشت ¼ MS، Orchimax و Malmgren مورد استفاده قرار گرفت. صفات مورد مطالعه شامل درصد جوانه‌زنی و درصد زنده‌مانی پروتوکورم، درصد متورم شدن بذر، درصد تشکیل ریزوئید، درصد شاخساره‌زایی و درصد تشکیل گیاهچه بود. نتایج نشان داد که محیط کشت Malmgren با ۸۳/۸۸ درصد جوانه‌زنی مطلوب‌ترین محیط کشت بود. محیط‌های کشت ¼ MS با ۶۵/۸۶ درصد و Orchimax با ۶۰/۵۰ درصد در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند و با محیط کشت Malmgren به طور معنی‌داری اختلاف نشان دادند. درصد زنده‌مانی پروتوکورم‌ها روی محیط کشت پایه ¼ MS با گذشت زمان کاهش یافت و پس از ۸۰ روز از ۹۱/۵۶ درصد به ۶۲/۲ درصد رسید. متورم شدن بذر، تشکیل ریزوئید، شاخساره‌زایی و تشکیل گیاهچه روی محیط کشت Malmgren بهتر از محیط‌های کشت ¼ MS و Orchimax بود. می‌توان بیان کرد که ترکیبات محیط کشت پایه تاثیرات معنی‌داری روی جوانه‌زنی بذر، درصد زنده‌مانی پروتوکورم‌ها، تشکیل ریزوئید، شاخساره‌زایی و تشکیل گیاهچه می‌گذارند.

کلمات کلیدی: ارکید دارویی، بذر، جوانه‌زنی، حفاظت، درون شیشه‌ای

مقدمه

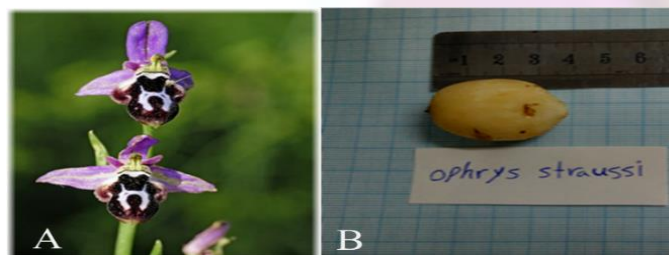
خانواده ارکیدسانان^۱ یکی از بزرگ‌ترین تیره‌های گیاهان گلدار، نهان‌دانه و تک لپه می‌باشد و طبق آخرین طبقه‌بندی انجام‌شده این تیره در راسته‌ی Asparagales طبقه‌بندی شده است (۱). این خانواده شامل بیش از ۸۸۰ جنس و حدود ۲۶۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ گونه می‌باشد (۲). غده‌های خشک شده ارکید دارویی تحت عنوان ثعلب برای تولید بستنی و نوشیدنی و همچنین برای مصارف پزشکی و دارویی استفاده می‌شود (۴). فیزیولوژی جوانه‌زنی بذر باعث شده است که خانواده ارکیدسانان از همه جوانب جالب توجه باشند. در هر کپسول میلیون‌ها بذر با اندازه میکروسکوپی تولید می‌شوند (۵). اما میزان جوانه‌زنی بذر در طبیعت بسیار کم

¹ Orchidaceae

و حدود ۵-۲ درصد می باشد. برای جوانه زنی بذر ارکیدها زمان زیادی لازم است. در سطح جهان، ارکیدها به دلایل مختلفی مانند برداشت بیش از حد، تجارت غیرقانونی و تغییر آب و هوا تهدیدی جدی برای این گونه است (۶). در حال حاضر گونه *Ophrys straussii* به دلیل دارا بودن غده درشت (شکل B۱) در آستانه انقراض قرار گرفته است. بنابراین ضروری است که راهکاری موثر در راستای حفاظت از این گونه بعمل آید. کشت بافت گیاهی به عنوان یک روش جایگزین برای تکثیر و حفظ این گونه در مقیاس وسیع، یکی از راه های موثر و کاربردی می باشد (۷). لذا در این پژوهش جوانه زنی بذر و تولید گیاهچه ثعلب در آزمایشگاه در شرایط درون شیشه‌ای مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این پژوهش تاثیر سه نوع محیط کشت Malmgren (۱۰)، Orchimax و MS ¼ (۱۱) در شرایط درون شیشه‌ای روی جوانه زنی بذر گونه‌ی *Ophrys straussii* بررسی شد. نمونه‌های گیاهی در مرحله گلدهی (شکل A۱) از رویشگاه طبیعی در غرب کشور (شهرستان‌های جوانرود و پاوه) جمع‌آوری و سپس به کلکسیون ثعلب مرکز پژوهشی و توسعه گیاهان دارویی دانشگاه کردستان انتقال داده شدند. در خرداد ماه سال ۱۳۹۹ بعد از رسیدن بذر، کپسول‌های رسیده از روی بوته‌ها جمع‌آوری شدند.



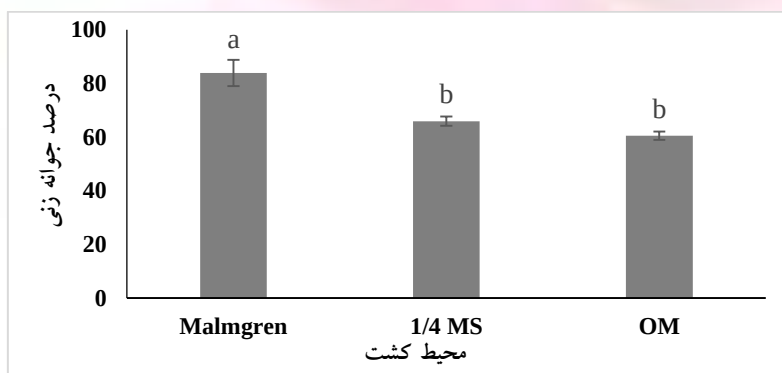
شکل ۱. ویژگی‌های زایشی و رویشی گونه *Ophrys straussii*. A: گل و اندام زایشی، B: اندازه و مورفولوژی غده.

بذرهای تهیه شده به عنوان نمونه گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. به دلیل ترشح ترکیبات ثانویه از پوسته بذر، ترکیبات جاذب همانند ذغال فعال به محیط کشت مصنوعی اضافه شد. همچنین، یکی دیگر از موانع بازدارنده جوانه زنی در این گونه، پوسته‌ی محکم بذر بود که دارای ترکیبات سلولزی و لیگنینی می باشد. برای رفع این مشکل بذر با سدیم کلرید حاوی ۵ درصد کلر فعال گندزدایی شدند که نه تنها باعث استریل شدن سطح شد، بلکه پوسته بذر را نیز نرم و قابل نفوذ کرد. در این پژوهش از نیتروژن آلی (اسید آمینه، عصاره آناناس) به عنوان جایگزین ازت معدنی در محیط کشت Malmgren استفاده شد. همچنین کمپلکس ویتامین B به ویژه تیامین، نیکوتینیک اسید به محیط‌های کشت پایه اضافه گردید. محلول محیط کشت روی pH: ۵/۸ تنظیم شد و بعد از اضافه کردن آگار، در دمای ۱۲۱/۵ سلسیوس اتوکلاو شد.

نتایج و بحث

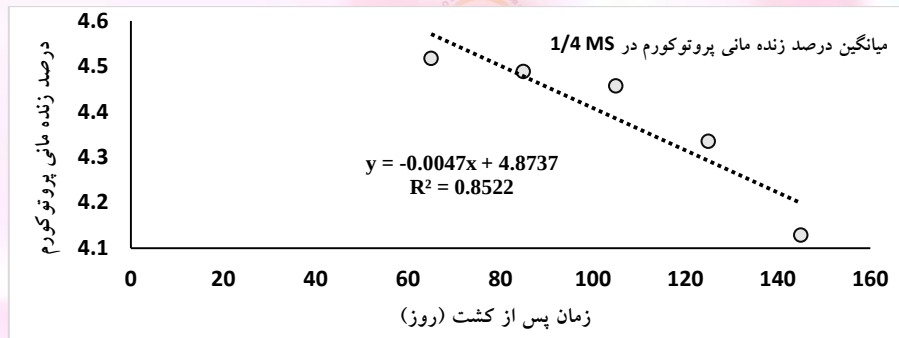
درصد جوانه زنی بذر و درصد زنده ماننی پروتوکورم

بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس، اثر محیط های کشت Malmgren، Orchimax و $\frac{1}{4}$ MS روی درصد جوانه زنی بذر و درصد زنده ماننی پروتوکورم اثر معنی داری داشتند. مقایسه میانگین ها نشان داد که محیط کشت Malmgren با $\frac{83}{88}$ درصد جوانه زنی بیشترین تاثیر را روی درصد جوانه زنی بذر گونه ی مورد نظر داشت که نسبت به دو محیط کشت Orchimax و $\frac{1}{4}$ MS به طور معنی داری ($p < 0.01$) اختلاف نشان داد (شکل ۲). کمترین درصد جوانه زنی بذر روی محیط کشت Orchimax مشاهده شد که نسبت به محیط کشت $\frac{1}{4}$ MS تفاوت معنی داری نداشت.



شکل ۲. درصد جوانه زنی گونه *Ophrys straussii* روی سه محیط کشت پایه Malmgren، Orchimax و $\frac{1}{4}$ MS در شرایط آزمایشگاهی

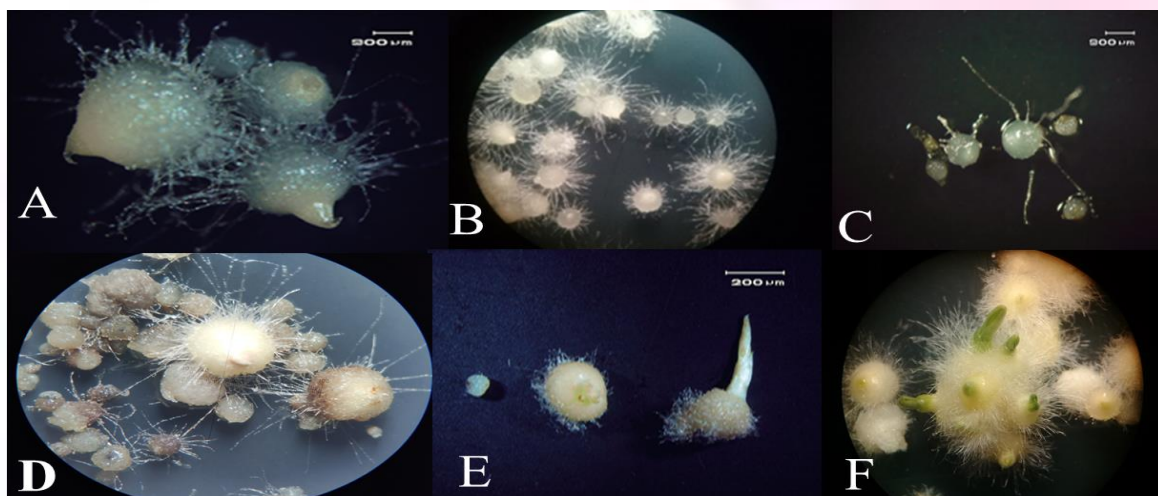
بر اساس نتایج، سرعت رشد گیاهچه در محیط کشت Malmgren بیشتر از دو محیط Orchimax و $\frac{1}{4}$ MS بود. روی محیط کشت Malmgren بعد از ۸۴ روز گیاهچه های کلروفیل دار به ارتفاع ۵ میلی متری به دست آمد، در حالی که روی محیط کشت های Orchimax و $\frac{1}{4}$ MS به مرحله گیاهچه نرسیدند و روی محیط $\frac{1}{4}$ MS با وارد شدن به مرحله شاخساره زایی پروتوکورم ها از بین رفتند و به مرحله گیاهچه نرسیدند. سرعت رشد بذر روی محیط کشت Malmgren حاوی عصاره ی آناناس بیشتر از دو محیط دیگر بود. سرعت و درصد جوانه زنی بذر روی محیط کشت Orchimax کمتر از دو محیط دیگر بود. سرعت و درصد کم جوانه زنی روی محیط Orchimax شاید به دلیل وجود مقدار زیاد نیتروژن معدنی به دو فرم (950 mg/L KNO_3 و 825mg/L NH_4NO_3) باشد. غلظت بالای نیتروژن غیر آلی به ویژه NO_3 (۱۲) اثر منفی روی جوانه زنی دارد و بسیاری از گونه ها نیتروژن به فرم NH_4 را ترجیح می دهند (۸). با بررسی صفت درصد زنده ماننی پروتوکورم ها مشاهده شد که پروتوکورم های رشد کرده روی محیط کشت $\frac{1}{4}$ MS تا مرحله شاخساره زایی (تا ارتفاع ۳-۲ میلی متری) روند عادی رشد را داشتند (شکل ۴ A و D)، اما بعد از این مرحله پروتوکورم ها به تدریج شروع به سیاه شدن کردند و در نهایت مرگ پروتوکورم ها را به دنبال داشت (شکل ۳). به نظر می رسد جوانه زنی غیر همزیست اغلب بهترین عملکرد را با نیتروژن آلی دارد (۱۳).



شکل ۳. میزان زنده ماندن پروتوکورم ثعلب گونه *Ophrys straussii* روی محیط کشت 1/4 MS در شرایط درون شیشه‌ای طی زمان

مطابق نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس ANOVA اثر محیط‌های کشت Malmgren، Orchimax و 1/4 MS روی مدت زمان متورم شدن بذر، تشکیل ریزوئید، شاخساره‌زایی و تشکیل گیاهچه اثر معنی‌داری داشتند.

مدت زمان تورم بذر و نیز تشکیل ریزوئید روی محیط کشت Malmgren و 1/4 MS کمتر از Orchimax بود، و تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد (جدول ۱). محیط کشت Orchimax زیادی از لحاظ میزان ازت با دو محیط کشت Malmgren و 1/4 MS دارد شاید اختلاف در مدت زمان متورم شدن بذر (شکل ۴ C) به دلیل این ترکیبات باشد. شاخساره‌زایی روی محیط کشت Malmgren بطور معنی‌داری زودتر از محیط کشت 1/4 MS بود در حالیکه تولید گیاهچه (شکل ۴ F و E) تنها روی محیط کشت Malmgren مشاهده شد. روی محیط کشت 1/4 MS تمام شاخساره‌های تولید شده به تدریج خشک شدند و گیاهچه‌ای تشکیل نشد (جدول ۱ و شکل ۳). احتمالاً عدم تشکیل گیاهچه و از بین رفتن شاخساره‌ها (شکل ۴ D) به خاطر وجود یون نیترات (NO_3^-) در محیط کشت باشد (۸). همچنین محققان بر این باورند که نیتروژن در فرم آمینواسیدی ممکن است برای جوانه‌زنی بذر و یا نمو پروتوکورم‌ها راحت‌تر از منابع غیر آلی نیتروژن در دسترس باشد (۱۴).



شکل ۴. مراحل جوانه‌زنی غیرهمزیست در *Ophrys straussii*: A: تشکیل پروتوکورم روی محیط 1/4 MS، B: جوانه‌زنی با تشکیل پروتوکورم و ریزوئید روی محیط Malmgren، C: مرحله متورم شدن و تشکیل



ریزوتید روی محیط Orchimax, D: تشکیل شاخساره روی محیط MS ¼ و مرحله از بین رفتن پروتوکورم،
E: مراحل رشد پروتوکورم تا تشکیل گیاهچه کلرفیل دار روی محیط Malmgren, F: تشکیل گیاهچه روی
محیط Malmgren

جدول ۱. فاصله زمانی بروز صفات در بذر و اندام‌های رشدی ثعلب گونه *Ophrys straussii* روی محیط
کشت‌های مختلف در شرایط درون شیشه‌ای

مدت زمان (روز)				
محیط کشت پایه	متورم شدن بذر	تشکیل ریزوتید	شاخساره‌زایی	تشکیل گیاهچه
Malmgren	۶ ^b	۲۰ ^b	۳۸ ^b	۸۴ ^a
Orchimax	۳۵ ^a	۷۰ ^a	-	-
¼ MS	۱۰ ^b	۲۴ ^b	۴۳ ^a	۰/۰ ^b

نتیجه‌گیری کلی

سیکل کامل رشد ثعلب گونه *Ophrys straussii* از سه تا شش سال طول می‌کشد. استفاده از تکنیک
کشت درون شیشه‌ای یکی از روش‌های تکثیر و کاهش سیکل زندگی این گیاه می‌باشد. محیط کشت‌های
مختلف اثرات متفاوتی روی جوانه‌زنی، تشکیل پروتوکورم و رشد گیاهچه دارد. ترکیبات محیط کشت پایه
یکی از موثرترین فاکتورهای تاثیر گذار روی جوانه‌زنی و رشد گیاه ثعلب خاکزی می‌باشد. ازت آلی باعث
بهبود رشد و میزان بالای ازت معدنی به ویژه یون نیترات اثر منفی روی جوانه‌زنی و رشد پروتوکورم گونه
Ophrys straussii می‌شود. به نظر می‌رسد که تکثیر تجاری ثعلب خاکزی در شرایط آزمایشگاهی امکان‌پذیر
می‌باشد.

References

1. Chase, M.W., Christenhusz, M.J.M., Fay, M.F., Byng, J.W., Judd, W.S., Soltis, D.E., Mabberley, D.J., Sennikov, A.N., Soltis, P.S., Stevens, P.F. An update of the Angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society, 18(1): pp.1-20.
2. Zhang, S.B., Yang, Y.J., Li, J.W., Qin, J., Zhang, W., Huang, W., Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. Plant Diversity, 4:196-208.
3. Kong, J.M., Goh, N.K., Chia, L.S., Chia, T.F. (2003). Recent advances in traditional plant drugs and orchids. Acta Pharmacologica Sinica 24:7-21.
4. Ghorbani, A., Zarre Gravendeel, B., de Boer, H.J. (2014). Illegal wild collection and international trade of CITES-listed terrestrial orchid tubers in Iran. Traffic Bulletin, 26(2): 52-58.
5. Mitra, G. (1971). Studies on seeds shoot tips and stem discs of an orchid grown in aseptic culture. Indian J. Exp. Biol 9:79-85.
6. Pant, B., Swar, S., Gurung, R. (2007). Current Status and ex situ conservation of threatened orchids of Nepal. In: Proceedings 9th Asia Pacific Orchid Conference (APOC 9), Seoul, Korea. pp.307-318.



7. **Vij, S. (2002).** Orchids and tissue culture: current status. Role of plant tissue culture. In biodiversity conservation and economic development. Gyanodaya Prakashan, Nainital India. p.491.
8. **Rasmussen, H.N. (1995).** Terrestrial orchids – from seed to mycotrophic plant. Cambridge University Press, 444 P.
9. **Arditti, J., Ghani, A.K.A. (2013).** Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications new phytologist, 145(2000): 146-156.
10. **Malmgren, S. (1996).** Orchid propagation: theory and practice. In: C. Allen(Editor), North American native orchids: production., Germantown, Maryland, USA, pp. 63-71.
11. **Murashige, T., Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum, 15: 473-497
12. **Dijk, E. (1988).** Mykorrhizen der Orchidee. III. Physiologische Aspekte bezüglich Kohlenstoff und Stickstoff. Die Orchidee, 39: 196-200.
13. **Malmgren, S. (1989).** Asymbiotisk förökning från frö av guckusko, flugblomster, brunkulla och några andra svenska orkidéarter. Svensk Botanisk Tidskrift, 83: 347-354.
14. **Malmgren, S. (1992).** Large scale asymbiotic propagation of Cypripedium calceolus-plant physiology from a surgeon's point of view. Botanic gardens Micropropagation news.



Seed asymbiotic germination and protocorm formation analysis of *Ophrys straussii* in vitro

Kolsom Ahmadzade^{*1,2}, Ali Akbar Mozafari^{1,2}, Yavar Vafae^{1,2}, Jalal Khorshidi^{1,2}

¹ Department of Horticulture Science and Engineering, University of Kurdistan, Sanandaj

² Medicinal Plants Breeding and Development Research Institute, University of Kurdistan, Sanandaj

Email: k.ahmadzadeh1990@gmail.com

۱۰۱

Abstract

In recent years, the orchid population has become endangered in the world and in Iran, therefore, the preservation of orchids has become a global issue. *Ophrys straussii* is a species of terrestrial orchids family. The seeds of terrestrial orchids have small embryos and weigh 0.3 to 14 µg. It lacks any storage tissue and has a hard shell that prolongs its dormancy period. The aim of this study was to investigate the asymbiotic germination of *Ophrys straussii* seeds under in vitro conditions. For this purpose, three types of culture media containing ¼ MS, Orchimax and Malmgren were used. The studied traits included germination percentage and protocorm viability, seed turgidity percentage, rhizoid formation percentage, branch percentage, and seedling formation percentage. The results showed that Malmgren culture medium with 83.88% germination was the most optimal culture medium. MS media with 65.86% and Orchimax with 60.50% were in the next ranks which were significantly different from Malmgren medium. The viability protochromes percentage in MS basal medium decreased over time (91.56% to 62.2% decrease after 80 days). Also, seed turgidity, rhizoid formation, and branch and seedling formation were higher in Malmgren medium in comparison with MS and Orchimax media. It can be stated that the used substances and composition of the base culture medium has significant effects on seed germination, protocorm viability, rhizoid formation, and branch and seedling formation of Orchid.

Keywords: in vitro culture, Medicinal orchid, protocorm, plant preservation, seed germination.

کاربرد ثعلپ در محصولات لبنی

شادی استوار^۱، فردین تمجیدی^{۲*}

^۱ دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، ایران

^۲ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Email: f.tamjidi@uok.ac.ir

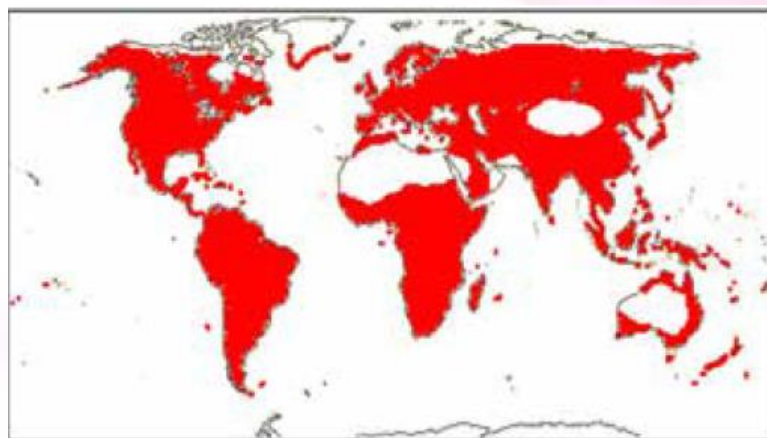
چکیده

هیدروکلوئیدهای غذایی به ویژه به دلیل داشتن اثرات تغلیظ کنندگی، پایدارکنندگی، امولسیون کنندگی، ژل کنندگی و ایجاد فیلم کاربرد وسیعی در صنایع غذایی دارند. ارکیده یک گیاه وحشی است که در بسیاری از مناطق دنیا بویژه غرب آسیا و از جمله ایران رشد می کند و غده ریشه ای آن منبع مهم هیدروکلوئیدی مشهور به ثعلپ است. ثعلپ براحتی قابل استخراج بوده و یکی از ترکیبات مهم و اقتصادی برای استفاده در مواد غذایی بویژه محصولات لبنی مانند بستنی است. ثعلپ باعث بهبود نرمی و یکنواختی بافت، تاخیر ذوب و نیز جلوگیری از رشد بلورهای یخ در حین نوسانات دمایی می شود. این مقاله به مرور کاربرد ثعلپ در محصولات لبنی می پردازد.

کلمات کلیدی: ارکیده، ثعلپ، محصولات لبنی، هیدروکلوئیدهای غذایی

مقدمه

سرزمین ایران با اقلیم های گوناگون، همواره زیستگاه گیاهان متنوع می باشد. حدود ۸۰۰۰ گونه گیاه بومی در ایران یافت می شود که بسته به نوع گونه و نیازهای اکولوژیک، در مناطق رویشی مختلف و چهارگانه آن انتشار یافته است. ارکیده ها با انواع گونه، زیرگونه و واریته یکی از تیره های مهم از گروه تک لپه ای ها بوده که ارزش زیستی و اقتصادی قابل توجهی دارند (۲۰).



شکل ۱. مناطق نشان دهنده انتشار و رشد ارکیده ها در جهان (۲)

هیدروکلونیدها پلیمرهای آبدوست با منشا گیاهی، حیوانی، میکروبی یا مصنوعی هستند که به طور کلی حاوی گروه‌های هیدروکسیل زیاد بوده و احتمالاً پلی الکترولیت نیز می‌باشند و برای کنترل خواص عملکردی مواد غذایی بر پایه آب استفاده می‌شوند. هیدروکلونیدها دارای طعم و رایحه خنثی هستند، ولی در رهایش (یا تغییر) طعم دیگر اجزای غذایی نقش دارند (۶).

ساقه‌ها و غده‌های بعضی ارکیدها حاوی هیدروکلونیدی مشهور به ثعلپ^۱ است. ارکیدها گیاهانی با ساقه ساقه و برگ‌های نرم و گل‌های سفید، صورتی، قرمز و بنفش هستند که ۲۴ جنس و ۹۰ گونه از آن‌ها حاوی ثعلپ هستند. ثعلپ و دیگر ترکیبات بدست آمده از ارکیدها کاربرد دارویی و غذایی دارند (۷، ۱۹، ۳۵). ثعلپ بعنوان پایدارکننده، تغلیظ‌کننده و امولسیفایر در سیستم‌های غذایی در طی سالیان متمادی کاربرد دارد و با اثرگذاری قابل توجه بر بافت و عطر و طعم محصول نهایی جایگاه ویژه‌ای را در صنعت غذا به خود اختصاص داده است.

استخراج ثعلپ و خصوصیات شیمیایی و فیزیکی آن

برای استخراج ثعلپ، غده ارکیده بعد از شستشو، در شیر، ماست رقیق یا آب پخته می‌شود، این عمل باعث توقف فعالیت آنزیمی، کاهش هدر رفت اجزاء محلول در آب و تسهیل پوست‌گیری می‌شود. سپس غده‌ها پوست‌گیری شده و بعد از خشک کردن توسط آسیاب پودر می‌شوند. پودر ثعلپ حاصل از ارکیدهای وحشی رنگ زرد کم‌رنگ دارد (۱۸، ۲۴، ۳۱).

ترکیب شیمیایی پودر ثعلپ بسته به گونه، زیستگاه، اقلیم، زمان برداشت و میزان خشک کردن متغیر است. سزیک (۱۹۷۶) گزارش کرد که پودر بعضی از گونه‌های ثعلپ حاوی ۷-۶۱ درصد گلوکومانان، ۱-۳۶ درصد نشاسته، ۵/۱-۰ درصد مواد نیتروژن‌دار، ۲/۰-۶ درصد خاکستر و ۶-۱۲ درصد رطوبت است و در گونه‌های ارکیس^۲ و آناکامپتیس^۳ میزان گلوکومانان از نشاسته بیشتر است (۳۴). تکینسن و گونر (۲۰۱۰) گزارش کردند که ترکیب شیمیایی ۱۰ گونه پودر ثعلپ خشک شده در سایه حاوی ۳۵/۹-۴۰/۱۲ درصد رطوبت، ۱۱/۳-۹۵/۴ درصد پروتئین، ۹۵/۰-۸۳/۲ درصد خاکستر، ۷/۱۷-۶/۵۴ درصد گلوکومانان و ۴۴/۵-۷/۳۸ درصد نشاسته است و در ۳۰ درصد گونه‌ها میزان گلوکومانان بیشتر از نشاسته است. در یک مطالعه دیگر گزارش شده است که ثعلپ حاوی ۴۸ درصد موسیلاژ یا صمغ، ۱ درصد قند، ۷/۲ درصد نشاسته و ۵ درصد مواد نیتروژن‌دار است. ثعلپ تازه حاوی مقادیر کمی روغن‌های فرار نیز می‌باشد. خاکستر ثعلپ اغلب شامل فسفات، کلر، پتاسیم و کلسیم می‌باشد (۳۱، ۳۲). گلوکومانان هیدروکلونید اصلی در ثعلپ است (۲۳). ثعلپ حاصل از جنس ارکیداز^۴ حاوی حدود ۲ درصد چربی بوده و بیشترین اسیدهای چرب آن شامل لینولئیک (۵۹/۹ درصد) در ارکیز ایتالیکا^۵، پالمیتیک (۳۳/۷۸ درصد) در آن‌تولیکا^۶، اولئیک (۲۸/۶۵ درصد) در پالستریس^۷، استئاریک (۱۴/۲۰ درصد) در سرپیس ورمکا زیرگونه اورنتالیس^۱ و میریستیک (۱۰/۴۷

¹ Salep

² Orchis

³ Anacamptis

⁴ Orchidaceae

⁵ Orchis italica

⁶ O. anatolica

⁷ Opalustris

درصد) در *انتولیکا*^۲ می باشد. اسیدهای لینولئیک و پالمیتیک به ترتیب فراوان ترین اسیدهای چرب غیراشباع و اشباع در تمام قسمت های گیاهان ارکیده جنس های مختلف هستند (۳۱).

۱۰۴



شکل ۲. تصاویری از گل و غده های ارکیده.

گرانروی غذا در فراوری و طراحی تجهیزات تولید مواد غذایی و ارزیابی و کنترل کیفیت و درک ساختار مواد غذایی اهمیت ویژه ای دارد (۱۴، ۲۲). محلول ثعلپ در غلظت کم، رفتار نیوتنی دارد (۱)؛ اما در غلظت بالا قوام آن افزایش یافته و نیز رفتار سودوپلاستیک نشان می دهد (۱۱). ثعلپ در pH اسیدی و خنثی پایداری مناسبی دارد اما در pH بازی بسیار ناپایدار می باشد (۲۱).

کاربرد ثعلپ در صنایع غذایی

هم اکنون پودر ثعلپ در صنایع غذایی بعنوان یک هیدروکلوئید پایدارکننده در تولید انواع محصولات غذایی مانند بستنی، شیرینی و انواع دسر ها و نوشیدنی ثعلپ کاربرد دارد. پودر ثعلپ علاوه بر ویژگی های پایدارکنندگی، در ایجاد عطر و طعم مطلوب در محصول نهایی نیز نقش مهمی ایفا می کند (۱۸). همچنین ثعلپ توانایی غلیظ کنندگی، امولسیفایری و ژل کنندگی را دارد و در برای تولید فیلم بسیار مورد توجه است (۱۱). خواص مکانیکی و فیزیکی فیلم ثعلپ بررسی شده است و گزارشاتی در مورد کاربرد بالقوه آن برای تولید فیلم های خوراکی جهت بسته بندی محصولات غذایی با فعالیت آبی کم و متوسط موجود است (۱۰).

¹ *Serapias vomeracea ssp orientalis*

² *O. anatolica*



شکل ۳. کاربردهای ثعلپ در صنایع غذایی

اثرات سلامتی بخش ثعلپ

ثعلپ در درمان اسهال تابستانی نوزادان، کودکان و اسهال مزمن در بزرگسالان نقش دارد (۳۲، ۹). گلوکومانان از ترکیبات اصلی موجود در ثعلپ بوده که جزء فیبرهای طبیعی خنثی محلول در آب است که در تنظیم قند خون، کاهش فشار بر پانکراس و ناهنجاری‌های قند خون مانند هیپوگلیسمی نقش دارد؛ همچنین ریسک ابتلا به بیماری‌های مزمن، چاقی و یبوست را کاهش می‌دهد (۱۱). استفاده از گیاه ارکیده بعنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی سابقه‌ای طولانی دارد و شناسایی، جداسازی و بررسی اثرات سلامتی بخش ترکیبات غیرصمغی آن مانند متابولیت‌های ثانویه بسیار حائز اهمیت ولی خارج از بحث این مقاله است.

کاربرد ثعلپ در محصولات لبنی

بستنی

بستنی را می‌توان بصورت مخلوطی منجمد از اجزای شیر، شیرین‌کننده، پایدارکننده، امولسیفایر و عوامل ایجادکننده عطر و طعم تعریف کرد (۲۵). ترکیب ساختاری بستنی بگونه‌ای است که سلول‌های هوا، بلورهای یخ و گویچه‌های چربی در فاز پیوسته‌ای از یک محلول غیرمنجمد پراکنده شده‌اند (۲۷). برای ایجاد ساختار مطلوب در بستنی پایدارکننده‌ای بنام ثعلپ برای سال‌هاست که مورد استفاده قرار می‌گیرد. این هیدورکلوئید در غلظت‌های ۰/۷ تا ۱ درصد در بستنی تولیدی در ترکیه و ایران مصرف می‌شود (۸، ۲۳). ثعلب بافتی نرم و یکنواخت در محصول ایجاد می‌کند. همچنین، مقاومت به ذوب را در بستنی افزایش داده و باعث کاهش رشد بلورهای یخ بویژه در اثر نوسانات دمایی و کاهش ایجاد بلور لاکتوز در طی نگهداری می‌شود (۱۵، ۲۶). اثربخشی پایدارکننده‌ها در بستنی بستگی به قابلیت آن‌ها در ایجاد پیوند در شبکه سه بعدی مولکول‌های هیدراته دارد (۲۸). کوش و همکاران (۲۰۰۵) اثر غلظت‌های مختلف (۰/۵ تا ۱/۵ درصد) ثعلپ را بر خصوصیات رئولوژی مخلوط بستنی بعد از انجماد بررسی کردند و گزارش کردند که مخلوط اندکی



رفتار تیکسوتروپیک دارد، که با کاهش درصد ثعلپ کاهش می یابد (۲۴). کایا و تکی (۲۰۰۱) نیز گزارش کردند که که مخلوط بستنی حاوی ۰/۷۵ درصد ثعلپ رفتار شبه پلاستیک دارد (۱۸).

دوغ

دوغ یکی از نوشیدنی های سنتی ایرانی است که جزو فرآورده های تخمیری است که به دلیل داشتن pH پایین پروتئین ها به نقطه ایزوالکتریک خود نزدیک شده و شروع به تجمع و رسوب می کنند و این امر موجب ناپایداری و ایجاد حالت دوفازی شدن بعد از تولید و در حین نگهداری می شود. افزودن هیدروکلوئیدها یا صمغ ها یکی از روش های افزایش پایداری، جلوگیری از دو فاز شدن و رسوب پروتئین ها در فرآورده های تخمیری است. این مواد با افزایش گرانیوی ظاهری فرآورده یا با برهمکنش های کلوئیدی ممانعت فضایی و دفع الکترواستاتیک باعث پایداری محصول می شوند. هیدروکلوئید یک شبکه در سراسر دوغ ایجاد می کند که آب و کازئین ها در شبکه حاصل به دام افتاده و تفکیک فاز ممانعت می شود که این حالت را در مورد هیدروکلوئیدهای غیرجاذب مانند ثعلپ می توان مشاهده کرد؛ به همین دلیل قابلیت پایداری سازی مخلوط های کلوئیدی مانند دوغ را دارند (۳۶). عباسی و همکاران (۱۳۸۶) برای بهبود پایداری و خواص رئولوژی دوغ، ۰/۱ تا ۰/۵ درصد صمغ ثعلب به آن اضافه کرده و گزارش کردند که ثعلب قابلیت پایدار کردن و همگن سازی دوغ را دارا می باشد و باعث تغییر رفتار آن از حالت نیوتنی به شبه پلاستیک می شود (۱).

خامه

فرآورده های لبنی در زمره پرمصرف ترین محصولات غذایی هستند و پایداری آن ها در طی نگهداری تا زمان مصرف اهمیت زیادی دارد. خامه مثل شیر به صورت امولسیون روغن در آب است اما نسبت به شیر از نظر درصد چربی شیر غنی بوده و با عمل خامه گیری از شیر جدا می شود. خامه بر اساس عوامل زیادی مانند درصد چربی، تخمیر، روش فرآوری و طبقه بندی می شود. اگرچه همگن کردن خامه با افزایش گرانیوی و کاهش اندازه ذرات چربی در جلوگیری از تفکیک فاز سرم از چربی و افزایش مقبولیت این دسته از محصولات مفید است اما افزودن هیدروکلوئیدها نیز در این رابطه تاثیر ارزشمندی دارد. ثعلپ با ایجاد شبکه کلوئیدی در افزایش پایداری محصول و ممانعت از آب اندازی نقش دارد. همچنین، قابلیت این ماده بعنوان جایگزین چربی در خامه زدنی کم چرب توسط عزیزی و همکاران (۱۳۹۴) بررسی شد و نتایج آن ها نشان داد که ۰/۱ تا ۰/۴ درصد ثعلب ویژگی های فیزیکوشیمیایی محصول را بخوبی تحت تاثیر قرار داده و ویژگی های حسی مناسبی ایجاد می کند (۲) و می تواند جایگزینی مناسب برای چربی در تولید فراورده های غذایی کم کالری باشد. محققین دیگر نتایج مشابهی را گزارش کرده اند (۵ و ۱۲).

دیگر فرآورده های لبنی

دسرهای لبنی با عطر و طعم های مختلف در سراسر دنیا وجود داشته و در بین گروه های مختلف جامعه از کودکان تا بزرگسالان محبوبیت دارند. این دسر ها حاوی اجزاء مغذی و ضروری شیر، هیدروکلوئیدهای

تغلیظ کننده و عوامل ایجاد کننده عطر و طعم هستند. مقادیر مختلف از اجزاء موجود در ترکیب دسرهای ویژگی های فیزیکی و شیمیایی متفاوتی ایجاد می کنند. گرانبوی و سینرزیس دسرهای به طور قابل توجهی تابع ترکیب شیر، مواد افزودنی، تیمارهای فرآوری و حضور هیدروکلوئیدها است.

ماست منجمد دسری ترکیبی از طعم ماست و بافت بستنی می باشد. در تهیه ماست منجمد هدف تولید محصولی پایدار با ظاهری مناسب و جذاب و بافتی نرم و روان می باشد (۴). حضور پایدارکننده هایی مانند ثعلپ در فرمولاسیون این محصولات ضروری بنظر می رسند تا با ممانعت از تشکیل بلور لاکتوز و بلورهای درشت یخ در طی فرآوری و نگهداری، بافتی نرم در محصول ایجاد کنند (۳۳). اثر ثعلپ بر پایداری دسر یوتامسی^۱ مورد مطالعه قرار گرفته و گزارش شده است که افزودن ۰/۷ درصد ثعلپ باعث افزایش مهم ویسکوزیته و ظرفیت نگهداری آب آن می شود (۶).

نیکجوی و همکاران (۲۰۱۵)، اثر افزودن ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۳ درصد صمغ ثعلپ به شیر حاوی ۰.۵ درصد چربی را بر خصوصیات پنیر سفید کم چرب حاصل بررسی کردند و گزارش کردند که با افزایش غلظت ثعلپ و گذشت زمان، سطح رطوبت و درصد پروتئین افزایش می یابد. همچنین، افزایش غلظت ثعلپ تاثیر معنی داری بر پارامترهای حسی مانند رنگ، بو و مزه نداشت، اما بر استحکام بافت، پخش پذیری و بهبود پذیرش کل اثر معنی دار داشت (۲۹).

نتیجه گیری

استفاده از مواد طبیعی در فرمولاسیون محصولات غذایی همواره مورد توجه تولیدکنندگان در صنایع غذایی است. پودر ثعلپ حاصل از گیاه ارکیده بعنوان یک پایدارکننده و تغلیظ کننده کم نظیر در محصولات لبنی و به ویژه بستنی استفاده می شود و در حال حاضر پتانسیل کاربرد ثعلپ در تمام محصولات غذایی و نیز دیگر خواص عملکردی آن به عنوان محافظ انجمادی، جایگزین چربی و حجم دهنده در حال بررسی است. همچنین استفاده از گیاه ارکیده بعنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی سابقه ای طولانی دارد و شناسایی، جداسازی و بررسی اثرات سلامتی بخش (مثل کاهش سطح انسولین، تغییرات بافتی مرتبط با افزایش سن و کاهش وزن) ترکیبات غیرصمغی ثعلپ مانند متابولیت های ثانویه نیز بسیار حائز اهمیت است.

References

۱. عباسی، س.، فروغی نیا، س. (۱۳۸۶). اثر برخی عوامل فیزیکی و شیمیایی بر رفتار جریان محلول ثعلپ. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. سال یازدهم. ص: ۳۶۵ - ۳۷۱.
۲. عزیزی، ش.، مرتضوی، س. ع.، شفافی، م.، دلیر، م. ر. (۱۳۹۴). بررسی تأثیر ایزوله پروتئین سویا و صمغ ثعلپ بر خواص فیزیکوشیمیایی و حسی خامه زده شده کم چرب. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی. سال هفتم. شماره چهارم. ص: ۹ - ۱۸.

¹ Uyutması



۳. زارع، ح.، امینی، طیبه، جعفری، ب. (۱۳۹۸). ثعلپها و تنوع زیستی آنها در رویشگاههای کاسپینی. مجله طبیعت ایران. جلد ۴ شماره ۱. ص: ۸۰-۹۵.
۴. معین فرد، م.، مظاهری تهرانی، م. (۱۳۸۹). اثرات برخی پایدارکننده‌ها بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و حسی ماست منجمد. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال ۵، شماره ۲. ص: ۱-۸.
4. Allen, K.E., Murray, B.S., Dickinson, E. (2008a). Whipped cream-like textured systems based on acidified caseinate-stabilized oil-in-water emulsions. *International Dairy Journal*, 18, 1011-1021.
5. Ayar, A., Sert, D., Akbulut, M. (2009). Effect of salep as a hydrocolloid on storage stability of 'T'ncir Uyutması' dessert. *Food Hydrocolloids* 23 62-71
6. Akgul, A. (1993). Baharat bilimi ve teknolojisi. Gıda teknolojisi derneği yayın no:15. Konya: Damla Matbaacılık.
7. Bahramparvar, M., Tehrani, M.M. (2011). Application and Functions of Stabilizers in Ice 434 Cream. *Food Reviews International*, 27(4), 389-407.
8. Baytop, T. (1999). Türkiye' de Bitkiler ile Tedavi. Istanbul: Nobel Tip Kitabevi.
9. Ekrami, M., Emam-Djomeh, Z. (2014). Water Vapor Permeability, Optical And Mechanical Properties Of Salep-Based Edible Film. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(4): 1812-1820.
10. Farhoosh, R., Riazi, A. (2007). A compositional study on two current types of salep in Iran and their Rheological properties as a function of concentration and temperature, *Food Hydrocolloids*. 21, 660-666.
11. Fernandes, R. (2009). Microbiology handbook dairy products, Biddles Ltd., King's Lynn, 37-39.
12. Igoe Robert, S. Compositions for stabilizing soft serve and hard frozen yogurt. US Patent. 4178390. 12/11/1979.
13. Işıkl, D.N., Necmi Dönmez, M., Kozan, N., Karababa, E. (2015). Rheological properties of salep powder-milk mixture. *Food Sci Technol*. DOI 10.1007/s13197-015-1777-4
14. Goff, H.D., Sahagian, M.E. (1996). Freezing of dairy products. In L.E. Jeremiah (Ed.). Freezing effects on food quality. New York: Marcel Dekker Inc.
15. Guven, M., Karaca, O.B., Kacar, A. (2003). The effects of the combined use of stabilizers containing locust bean gum and of the storage time on Kahramanmaraş-type ice creams. *International Journal of Dairy Technology*, 56(4), 223-228.
16. Grieve, M. (2004). Orchids. <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/o/orchid13.html#col> (accessed 2005).
17. Kaya, S., Tekin, A.R. (2001). The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice cream mix. *Journal of Food Engineering* 47 59-62.
18. Gemici, Y., Duman, H., Ekim, T., Alagöz, Z. (2004). Handbook of threatened and endemic plantspecies. Ankara
19. Jalili A., Jamzad, Z. (1999). Red Data Book of Iran. Research Institute of Forest and Rangelands. Pp 215.
20. Kayacier, A., Dogan, M. (2006). Rheological properties of some gums-salep mixed solutions. *Journal of Food Engineering*, 72, 261-265.
21. Krokida, M.K., Maroulis, Z.B., Saravacos, G.D. (2001) Rheological properties of fluid fruit and vegetable puree products: compilation of literature data. *Int J Food Prop* 4:179-200



22. **Kurt, A., Kahyaoglu, T. (2014).** Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan. *Carbohydrate Polymers*, 104(0), 50-58.
23. **Kus, S., Altan, A., Kaya, A. (2005).** Rheological behavior and time-dependent Characterization of ice cream mix with different Salep content. *Journal of Texture Studies* 36, 273-288.
24. **Marshall, R.T., Arbuckle, W.S. (1996).** Ice cream. 5th ed. Chapman & Hall
25. **Miller-Livney, T., Hartel, R.W. (1997).** Ice recrystallization in ice cream: Interactions between sweeteners and stabilizers, *Journal of Dairy Science*. 80, 447-456.
26. **Muse, M.R., Hartel, R.W. (2004).** Ice cream structural elements that affect melting rate and hardness, *Journal of Dairy Science*. 87, 1-10.
27. **Nielsen, B.J. (1984).** Combined emulsifier/stabilizers for ice cream. *Ice Cream Frozen Confectionery* 35, 401-407.
28. **Nikjooy, S., Joo, M.G., Jahanshahi, S.S. (2015).** The effect of various concentrations of salep gum on physicochemical characteristics of low-fat white cheese. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS)* Vol.8 No.2 pp.136-141
29. **Işıklı, N.D., Dönmez M.N., Kozan, N., Karababa E. (2015).** Rheological properties of salep powder-milk mixture. *Food Sci Technol*, pp497-512
30. **Tekinsen, K.K., Guner, A. (2010).** Chemical composition and physicochemical Properties of tuber salep produced from some orchidaceae species. *Food Chemistry*, 121,468-471.
31. **Tamer, C.E., Karaman, B., Aydogan, N., Copur, O.U. (2004).** Geleneksel Bir İçeceğimiz: Salep. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu. Eylül. 23-24 Van. 100-103.
32. **Tasneem, M., Siddique, F., Ahmad, A., Farooq, U. (2014).** Stabilizers: Indispensable Substances in Dairy Products of High Rheology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 869-879.
33. **Sezik, E. (1967).** Türkiye'nin salepgilleri ticari salep çeşitleri ve özellikle Mugla salebi üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi. No: 34. İstanbul.
34. **Sezik, E. (1984).** Orkidelerimiz. Sandoz Kültür Yayınları 6:166.
35. **Syrbe, A. Bauer, W.J., Klostremeyer, H. (1998).** Polymer science concepts in dairy system. A review of milk protein and food hydrocolloid interaction. *International Dairy Journal*, 8:179-193.



Application of salep in dairy products

Shadi Ostowar¹, Fardin Tamjidi^{2*}

¹Department of Food Sciences and Technology, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Iran

²Department of Food Sciences and Engineering, faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
Email: f.tamjidi@uok.ac.ir

Abstract

Food hydrocolloids are widely used in the food industry especially owing to their thickening, stabilizing, gelling and film-forming properties. Orchid is a wild plant which grows in many regions of the world, especially in West Asia including Iran, and its tuber is the main source of a hydrocolloid known as salep. Salep can be extracted easily and is an important and economical ingredient for utilization in food products especially dairy ones such as ice cream. It improves the uniformity and smoothness of texture, prolongs melting time and prevents from ice-crystals growth during temperature fluctuations. This document reviews the applications of salep in dairy products.

Keywords: Orchid, Salep, Dairy products, Food hydrocolloids

بهینه سازی جوانه زنی بذر در ثعلب کیسه‌ای (*Orchis collina*)

مژگان فتاحی^{۱*}، یاور وفایی^۲، فرزاد نظری^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

^۲ استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Email: Mozghanfatahi72@gmail.com

چکیده

اگرچه خانواده ارکیدسانان یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی است اما بسیاری از گونه‌های آن جزو گیاهان در معرض خطر انقراض هستند. اهمیت ارکیدها از لحاظ زینتی و صنعتی منجر به برداشت بی‌رویه آن‌ها شده است. از طرفی چرخه زندگی ارکیدها در شرایط طبیعی بسیار طولانی است و حدود پنج تا ده سال طول می‌کشد؛ بنابراین، جوانه زنی غیرهمزیست ارکیدها می‌تواند راهکاری کارآمد برای حفاظت از ارکیدها باشد. در تحقیق حاضر تأثیر ترکیبات آلی (آب آناناس و آب نارگیل) و ترکیبات نیتروژن‌دار (آمینون، پپتون و کازئین هیدرولیزات) در محیط کشت تغییر یافته مالمگرن بر درصد و سرعت جوانه زنی، طول گیاهچه، قطر و طول ساقه، وزن، طول و عرض پروتوکورم، تعداد غده و ریشه در *Orchis collina* مورد مطالعه قرار گرفت. طبق نتایج حاصل در این مطالعه، بیش‌ترین درصد جوانه زنی در تیمار آب آناناس به همراه آمینون و کازئین هیدرولیزات با ۱۰/۷۲٪ مشاهده گردید.

کلمات کلیدی: انقراض، ثعلب کیسه‌ای، حفاظت درون شیشه‌ای، جوانه زنی غیر همزیست

مقدمه

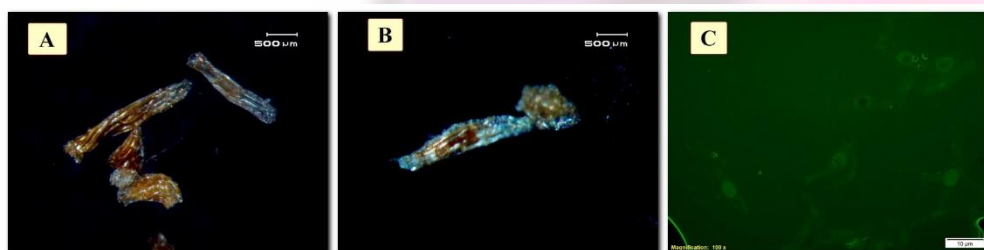
خانواده ارکیدسانان^۱ یکی از بزرگ‌ترین تیره‌های گیاهان گلدار، نهان‌دانه و تک لپه می‌باشد (۵)؛ که شامل بیش از ۸۸۰ جنس و حدود ۲۶۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ گونه می‌باشد (۱۷). بالغ بر ۸۰۰۰ گونه گیاهی در قلمرو و اقلیم‌های مختلف ایران رویش دارند، که در این بین، مطالعه در نتایج فلور ایران نشان می‌دهد که ارکیدسانان یکی از تیره‌های به نسبت کوچک است که مجموعه‌ای بالغ بر ۵۰ گونه را در خود جای داده است. همه این گونه‌ها به ۱۷ تا ۱۸ جنس مختلف تعلق دارند (۱۶). ارکیدهای ایران برخلاف ارکیدهای گرمسیری، از نظر شکل زیستی یا رویشی، جزو گروه Cryptophytes یا گونه‌هایی با جوانه زمستانه مخفی در خاک و از گروه گیاهان خاکزی هستند (۲). این گیاهان تک لپه با طیف گسترده‌ای از رنگ‌ها، گل‌های جذاب، ماندگاری طولانی و اشکال و اندازه‌های متنوع، ارزش زیادی در صنعت پرورش گل دارند و ۸٪ از تجارت گیاهان زینتی دنیا را شامل می‌شوند (۷). ارکیدها علاوه بر ارزش زینتی، ارزش دارویی نیز دارند به نحوی که می‌توان گفت تاریخچه ارکید با استفاده از آن‌ها برای اهداف دارویی آغاز شده است و چینی‌ها در کشت و استفاده از ارکیدها پیش‌تاز بوده‌اند (۹). وانیل و ثعلب، هر دو به عنوان چاشنی به خوبی شناخته شده و سالیان طولانی به طور گسترده استفاده شده‌اند. بذرهای ارکید ریز، فاقد آندوسپرم و دارای جنین نابالغ هستند که به تعداد بسیار زیادی در کپسول‌ها تولید می‌شوند و جوانه زنی آن‌ها در طبیعت بسیار دشوار،

¹ Orchidaceae

آهسته، طولانی مدت و وابسته به قارچ‌های همزیست است. چرخه زندگی ارکیدها در شرایط طبیعی بسیار طولانی است و حدود پنج تا ده سال طول می‌کشد تا رشد کنند، گل دهند و بذر تولید کنند. این نرخ تکثیر پایین، نیاز به راهکاری کارآمد برای حفاظت از ارکیدها را ضروری می‌کند (۱). کل خانواده ارکیدسانان در لیست قرمز کتاب اطلاعات اتحادیه بین المللی حفاظت از محیط زیست (IUCN) قرار گرفته‌اند و زیستگاه‌های بسیاری از ارکیدها به دلیل دستکاری‌های انسانی از بین رفته‌اند (۸). *Orchis collina* یکی از گونه‌های ارکید خاکزی می‌باشد که نام دیگر این گونه ثعلب کیسه‌ای می‌باشد. این گیاه در اواسط اردیبهشت ماه گل می‌دهد. زیستگاه این گل در صخره‌های آهکی و در میان بوته‌زارهای آفتابی و کم ارتفاع و کوهستان‌ها تا ارتفاع ۲۲۰۰ متر می‌باشد. در ایران از نواحی شمالی، غربی و مرکزی کشور گزارش شده است (۳).

مواد و روش‌ها

کپسول‌های حاوی بذرهای بالغ *Orchis collina* از استان کرمانشاه (شهرستان دالاهو شهر کرد غرب) جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها طی فصل تابستان ۱۳۹۸ از مناطق ذکر شده جمع‌آوری گردید. بعد از جمع‌آوری، کپسول‌ها در دمای اتاق و رطوبت هوای نرمال قرار گرفت تا رطوبت بذرها از بین برود. سپس بذرهای از کپسول‌ها خارج شدند و بعد از اطمینان حاصل کردن از حذف رطوبت بذرها، تا زمان استفاده درون لوله‌های آزمایشگاهی درب بسته در یخچال نگهداری شدند. قبل از کشت بذرهای جهت اطمینان حاصل کردن از زنده بودن بذرهای، آزمون FDA^۱ انجام شد (۶). در این پژوهش از هیپوکلریت سدیم با غلظت ۰/۴ درصد به مدت زمان ۱۵-۱۰ دقیقه، به منظور فرآیند ضدعفونی استفاده شد.



شکل ۱. (a) بذر *O. collina* قبل از ضدعفونی؛ (b) بذر *O. collina* بعد از ضدعفونی (c) نتایج حاصل از آزمون FDA.

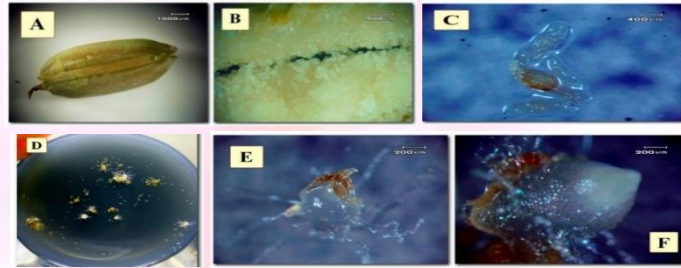
در تحقیق حاضر تأثیر ترکیبات آلی (آب آناناس و آب نارگیل) و ترکیبات نیتروژن دار (آمینوون، پپتون و کازئین هیدرولیزات) در محیط کشت تغییر یافته مالمگرن بر درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول گیاهچه، قطر و طول ساقه، وزن، طول و عرض پروتوکورم، تعداد غده و ریشه در *Orchis collina* بررسی شد. غلظت و نوع ترکیبات تشکیل دهنده محیط کشت شامل KH_2PO_4 و $(\text{Ca})_3(\text{PO}_4)_2$ ۰/۰۹ g/l، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۰/۱۸۴، آمینوون ۰/۱۸۴ ml/l، پپتون ۴ g/l، کازئین هیدرولیزات ۲ g/l، آب آناناس ۲۰ ml/l، آب نارگیل ۱۵۰ ml/l و شکر، زغال و آگار نیز به ترتیب ۱۰، ۱ و ۵ بود. پتری‌دیش‌های کشت شده در اتاق رشد در شرایط تاریکی و دمای ۲۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از اینکه پروتوکورم‌ها تقریباً به اندازه ۵-۳ میلی‌متر



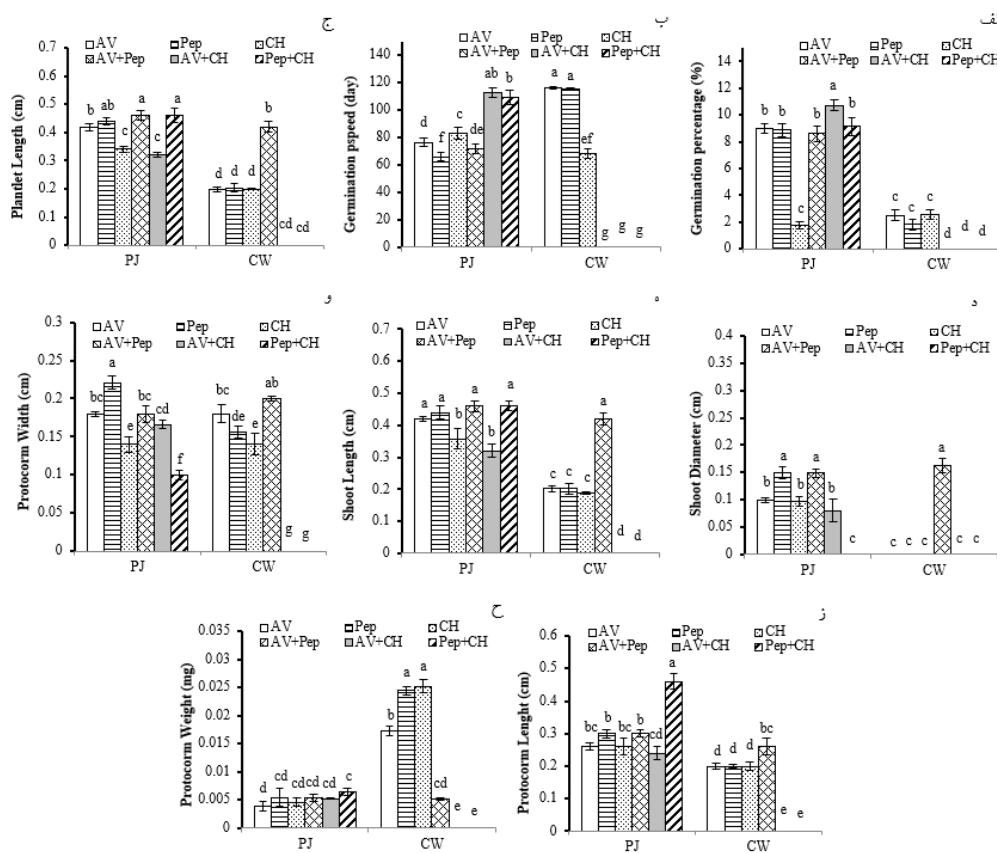
رشد کردند، نمونه‌ها به سردخانه با دمای ۴ درجه سلسیوس و تحت شرایط تاریکی به مدت دو ماه دیگر قرار گرفتند و پس از طی دوره سرمادهی پروتوکورم‌ها، نمونه‌ها مجدداً به اتاق رشد با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و شرایط روشنایی ۱۶/۸ ساعت تاریکی/روشنایی انتقال داده شدند. سه ماه بعد از انتقال مجدد پروتوکورم‌ها به اتاق رشد با استفاده از کولیس و ترازوی صفات مورفولوژیک دانه‌های هر تیمار در ۵ تکرار اندازه‌گیری شد و داده‌های حاصل برای هر تیمار یادداشت شد. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از طرح کرت‌های خرد شده با ۵ تکرار (۵ شیشه آزمایش) انجام شد. در کل ۱۲ تیمار در ۵ تکرار اعمال شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام شد. نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Excel 2016 رسم گردید.

نتایج و بحث

در مجموع، ارکیدها را بر پایه پاسخ بذرهاشان به محیط کشت سترون (استریل) درون شیشه‌ای می‌توان به سه دسته تقسیم کرد. گروه اول ارکیدهای گرمسیری هستند که به طور معمول به آسانی روی یک محیط کشت ساده جوانه می‌زنند. گروه بعدی ارکیدهای خاکزی گرمسیری هستند که به طور کلی از نظر جوانه‌زنی دشوارتر از گروه اول هستند. گروه سوم ارکیدهای خاکزی نواحی معتدله هستند که سخت‌ترین و مشکل‌ترین گروه از نظر جوانه‌زنی می‌باشند (۱۳). بذرهاي ارکید دارای جنین تمایز نیافته با مقدار کمی آندوسپرم یا بدون آندوسپرم و یا هر گونه بافت ذخیره‌ای دیگری هستند (۴). از طرفی دیگر، ارکیدها به شدت برای تهیه کربن و مواد غذایی برای جوانه‌زنی همزیست به قارچ‌هایی که میکوریزا نامیده می‌شوند وابسته‌اند (۱۰). طبق یافته‌های (۱۴) بالاترین درصد (۵۴/۲٪) تشکیل دانه‌های گونه *trianae* *Cattleya Linden & Reichb.f.* بعد از ۲۰ هفته در محیط کشت MS به همراه آب آناناس حاصل شد؛ همچنین استفاده از افزودنی‌های آلی (آب آناناس و آب نارگیل ۲۰٪) تأثیر مثبتی بر جوانه‌زنی، تشکیل و نمو دانه‌های این گونه داشت. اضافه کردن آب آناناس و آب نارگیل به محیط کشت، تأثیر مثبت ترکیبات آلی جهت بهبود جوانه‌زنی و توسعه هیبرید *Phalaenopsis* را تأیید کرد (۱۵). غلظت بالای نیتروژن غیر آلی به‌ویژه نیترات می‌تواند تأثیر منفی بر جوانه‌زنی ارکید داشته باشد (۱۱). ارجحیت نیتروژن آلی به نیتروژن غیر آلی در جوانه‌زنی ارکیدها، می‌تواند به دلیل عدم حضور آنزیم نیترات ردوکتاز در جوانه‌زنی برخی بذرها باشد؛ این آنزیم در تبدیل نیتروژن غیر آلی به نیتروژن آلی نقش دارد (۱۲). طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه (شکل-۳)، بیش‌ترین و کم‌ترین درصد جوانه‌زنی به ترتیب در تیمار آب آناناس به همراه آمینوون و کازئین هیدرولیزات با ۱۰/۷۲٪ و تیمارهای آب نارگیل به همراه آمینوون و پپتون، آب نارگیل به همراه آمینوون و کازئین هیدرولیزات و آب نارگیل به همراه پپتون و کازئین هیدرولیزات با ۰٪ مشاهده گردید و نتایج حاصل با نتایج تحقیقات پیشین در رابطه با تأثیر مثبت ترکیبات آلی و ترکیبات دارای نیتروژن آلی بر جوانه‌زنی و رشد پروتوکورم‌های ارکیدها همسو بود. از طرفی دیگر این نرخ تکثیر پایین در *Orchis collina* ممکن است به علت قوه نامیه پایین بذرهاي کشت شده (با ۱۷٪ قوه نامیه) در این مطالعه بوده باشد.



شکل ۲. مراحل جوانه‌زنی غیر همزیست در *O. collina* (a) کپسول حاوی بذرهای نابالغ، (b) بذرهای نابالغ، (c) بذرهای کشت شده بر روی محیط کشت، (d) جوانه‌زنی در تعداد بالا به همراه پروتوکورم و ریزوئید، (e) پروتوکورم از نمای نزدیک به همراه ریزوئیدها، (f) پروتوکورم از نمای نزدیک به همراه ریزوئیدها که نوک گیاهیچه در انتها قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر تیمارهای مورد مطالعه بر (الف) درصد جوانه‌زنی (ب) سرعت جوانه‌زنی (ج) طول گیاهیچه (د) طول ساقه (ه) قطر ساقه (و) عرض پروتوکورم (ز) طول پروتوکورم (ح) وزن پروتوکورم در *O. macula*: PJ: آب آناناس؛ CW: آب نارگیل؛ AV: آمینوون؛ Pep: پپتون؛ CH: کازئین هیدرولیزات. ستون‌های دارای حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند.

References



۱. دیانتی، ش. کافی، م. میرمعصومی، م. مظفریان، و. و سلامی، ع. (۱۳۹۲). معرفی محیط کشت مناسب برای جوانه زنی غیرهم زیست ارکیده خاکروی خربقی معمولی (*Epipactis veratrifolia* Boiss.&Hohen) به زراعی کشاورزی، جلد ۱۵، شماره ۲، صفحات ۱۶۱-۱۷۷.
۲. زارع، ح. امینی، ط. و جعفری گرزین، ب. (۱۳۹۸). ثعلبها و تنوع زیستی آنها در رویشگاههای کاسپینی. طبیعت ایران، جلد ۴، شماره ۱، صفحات ۸۰-۹۳.
۳. محمدیان، ح. (۱۳۷۶). گلهای ارکید ایران. چاپ اول، انتشارات راهنما، ۱۲۷ صفحه.
4. **Arditti, J. (1992).** Fundamentals of orchid biology. John Wiley & Sons.
5. **Chase, M.W., christenhusz, M.J.M., fay, M.F., Byng, J.W., Judd, W.S., soltis, D.E., Mabberley, D.J., sennikov, A.N., Soltis, P.S., Stevens, P.F. (2016).** An update of the Angiosperm phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the linnean Society, 18(1): pp.1-20.
6. **Chen, Y., Goodale, U.M., Fan, X.L., Gao, J.Y. (2015a).** Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. Global Ecology and Conservation, 3: 367-378.
7. **Chung, M.Y., López-Pujol, J., Maki, M., Kim, K.J., Chung, J.M., Sun, B.Y., Chung, M.G. (2012).** Genetic diversity in the common terrestrial orchid *Oreorchis patens* and its rare congener *Oreorchis coreana*: inference of species evolutionary history and implications for conservation. Journal of Heredity, 103: 692-702.
8. **IUCN, S.S.C. (2001).** IUCN Red List categories and criteria: version 3.1. Prepared by the IUCN Species Survival Commission.
9. **Jalal, J.S., Kumar, P., Pangtey, Y. (2008).** Ethnomedicinal Orchids of Uttarakhand, Western Himalaya. Ethnobotanical Leaflets, 2008: 164.
10. **Leake, J.R. (1994).** The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. New Phytologist, 127: 171-216.
11. **Malmgren, S. (1996a).** Orchid propagation: theory and practice. In: C. Allen (Editor), North American native orchids: propagation and production., Germantown, Maryland, USA, pp. 63-71.
12. **Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T., Seaton, P., Pritchard, H. (2011).** Nutritional requirements for in vitro seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. Journal of Tropical Forest Science: 204-212.
13. **Rasmussen, H.N., Dixon, K.W., Jersakova, J., Tesitelova, T. (2015).** Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. Ann Bot, 116: 391-402.
14. **Salazar-Mercado, S.A., Vega-Contreras, N.A. (2017).** Asymbiotic seed germination and in vitro propagation of *Cattleya trianae* Linden & Reichb. f.(Orchidaceae). Acta Agronómica, 66: 544-548.
15. **Salazar Mercado, S.A., Amaya Nieto, A.Z., Barrientos Rey, F. (2013).** Evaluation of different *in vitro* culture media in the development of *Phalaenopsis* hybrid (Orchidaceae). Revista Colombiana de Biotecnología, 15: 97-105.
16. **Shahsavari, A. (2008).** Orchidaceae in M. Assadi et al., Flora of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands: 85.
17. **Zhang, S.B., Yang, Y.J., Li, J.W., Qin, J., Zhang, W., Huang, W., Hu, H. (2018).** Physiological diversity of orchids. Plant Diversity, 4:196-208.



Optimize seed germination in *Orchis collina*

Mozhgan Fatahi^{*1}, Yavar Vafae², Farzad Nazari²

¹M.Sc. Student, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

²Assistant of Professor, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Email: Mozhganfatahi72@gmail.com

Abstract

50 species of orchids grow in different parts of Iran. Although the orchid family is one of the largest plant families, many species are endangered. The importance of orchids in terms of ornamental and industry has led to their improper harvest. On the other hand, the life cycle of orchids under natural conditions is very long and lasts about five to ten years; Therefore, asymptotic germination of orchids can be an effective way to protect orchids. In the present study, the effect of organic compounds (pineapple juice and coconut water) and nitrogenous compounds (aminoven, peptone and casein hydrolyzate) in Malmgren modified culture medium on germination percentage and speed, seedling length, stem diameter and length, weight, length and width of protocorm, the number of tubers and roots in *Orchis collina* was studied. According to the results of this study, the highest percentage of germination was observed in the treatment of pineapple juice with aminoven and casein hydrolyzate with 10.72%.

Keywords: Asymbiotic germination; Extinction; In vitro protection; *Orchis collina*



بررسی تغییرات ارتفاع از سطح دریا بر روی برخی از خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ثعلب *Dactylorhiza romana* (Sebast.) Soo subsp. *Georgica* (Klinge) Soo در استان گیلان

فاطمه فیضی^۱، هدایت زکی زاده^۲، محمدحسین میرجلیلی^۳، امیر صحرارو^۴، ایوب مرادی^۴

^۱ دانشجوی دکتری رشته علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه گیلان

^۲ استادیار گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه گیلان

^۳ دانشیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی

^۴ محقق مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان

Email: zakizadeh55@yahoo.com

چکیده

خانواده ثعلبیان بزرگترین خانواده گیاهان گل دار است. در بین ثعلبها، برخی از گونههای خاکزی دارای غدههای گوشتی زیرزمینی در تهیه بستنیهای سنتی و نیز تهیه نوشیدنیهای ویژه مورد استفاده قرار می گیرد. از بین عوامل توپوگرافی، عامل ارتفاع از سطح دریا به دلیل تأثیر در اقلیم منطقه بر پراکنش گونههای گیاهی نقش مؤثری دارد. در مطالعه حاضر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گونه *Dactylorhiza romana* جمع آوری شده از چهار منطقه با ارتفاع مختلف (۱۲۰۰، ۱۷۸۰، ۲۰۳۵ و ۲۰۹۵ متر از سطح دریا) در استان گیلان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ارتفاع رویشگاه به طور معنی داری بر روی خصوصیات طول ساقه گل دهنده، طول گل آذین، وزن تر غده، قطر غده و میزان کلروفیل کل مؤثر بوده به طوری که بهترین خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در گیاهانی مشاهده شد که در ارتفاع بالای ۲۰۳۵ متر از سطح دریا رشد کرده بودند.

کلیدواژه: تغییرات ارتفاع، ثعلب، خصوصیات فیزیولوژی، خصوصیات مورفولوژیکی

مقدمه

گیاهان تیره ثعلب به رده تک لپه ایها و راسته مارچوبه سانان^۱ تعلق دارند. *Dactylorhiza romana* subsp. *georgica* با غده انگشتی گرجی در اروپا، ایران، آسیای مرکزی و قفقاز می روید. این زیر گونه در ایران یکی از تاکسونهای نادر تیره ثعلب است که در ارتفاعات جنگلی هیرکانی رویش دارد. گیاهی است به ارتفاع ۱۵ تا ۴۰ سانتی متر با غدههای ۲-۴ انگشتی، دارای تعدادی برگهای طوقه ای خطی-نیزه ای، سنبله استوانه ای کم و بیش فشرده برگه دار با گل های معطر زرد کم رنگ. دوره گل دهی اردیبهشت تا خرداد است (۱). غده های این گیاه در ترکیه توسط مردم محلی به عنوان غذا مصرف می شوند و در طب سنتی برای مداوای برخی بیماریها مصرف می شود (۷). ارکیده های غده دار به ثعلب معروف هستند.

درک تغییر در خصوصیات ساختاری گیاهان در ارتباط با تغییرات آب و هوایی، استراتژی سازگاری گیاه را مشخص نموده و می تواند کمک فراوانی در پیش بینی پاسخ آنها به این تغییرات در آینده نماید (۶). از بین عوامل توپوگرافی، عامل ارتفاع از سطح دریا به دلیل تأثیر در اقلیم منطقه بر پراکنش گونه های گیاهی

^۱Asparagales

نقش مؤثری دارد. تغییر ارتفاع از سطح دریا به عنوان یک مفهوم محیطی مفید برای تشریح پراکنش موجودات زنده در ابعاد زمان و مکان مطرح است. این عامل با تأثیر بر میزان و نوع بارندگی، تبخیر، تعرق و شدت تشعشعات خورشیدی، بر نوع و تراکم پوشش گیاهی تأثیر به سزایی دارد (۹). با افزایش ارتفاع از سطح دریا متوسط دمای هوا کاهش یافته و با تأثیر سایر عوامل اقلیمی منجر به تشکیل نواحی اقلیمی شده، در نتیجه مناطق گیاهی با تنوع گونه ای خاص ایجاد می شود (۸). به طور کلی، ویژگی های مورفوفیزیولوژیک بسیاری از گیاهان چوبی متأثر از تغییر تدریجی در عوامل زیستی غیرزنده به ویژه تغییر در ارتفاع است (۵).

مواد و روش ها

برای انجام این پژوهش، پس از شناسایی رویشگاه گونه (Sebast.) *Soo subsp. Georgica* (Klinge) *Dactylorhiza romana* Soo در جنگل جواهر دشت استان گیلان نمونه برداری به صورت تصادفی در چهار ارتفاع ۱۲۰۰، ۱۷۸۰، ۲۰۳۵ و ۲۰۹۵ متر از سطح دریا انجام شد (شکل ۱). فاصله و سطوح نمونه برداری با توجه به تغییرات پوشش گیاهی و توپوگرافی در هر ارتفاع به طور متناسب انتخاب شد تا اطلاعات به دست آمده قابل تعمیم به هر ارتفاع باشد. نمونه گیری از گیاهان در مرحله گلدهی انجام شد. صفات طول ساقه گل دهنده، طول گل آذین، وزن تر غده، قطر غده و میزان کلروفیل کل اندازه گیری شد.



شکل ۱

بحث و نتیجه گیری

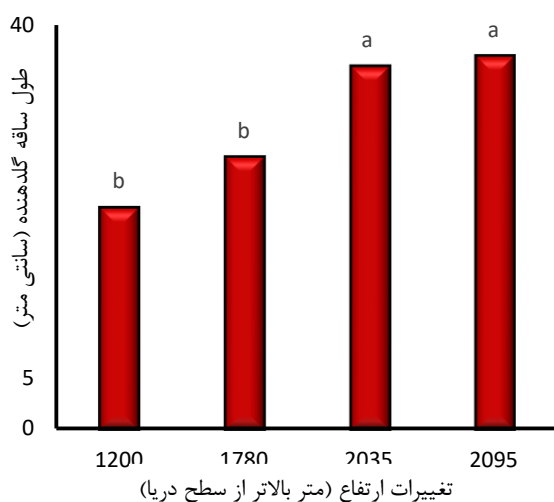
نتایج آنالیز واریانس نشان داد که تغییرات ارتفاع از سطح دریا در گونه ی مورد مطالعه بر روی تمام صفات اندازه گیری شده (ارتفاع ساقه گل دهنده، طول گل آذین، وزن تر غده، قطر غده و میزان کلروفیل کل) در سطح ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۱).

جدول ۱. تجزیه واریانس تغییرات ارتفاع بر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه ثعلب

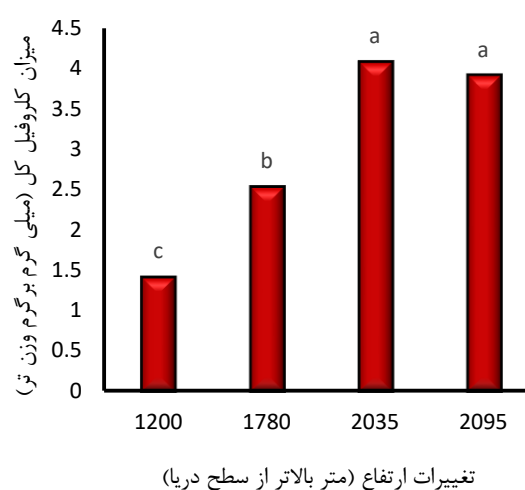
میانگین مربعات M.S

منبع تغییر	درجه آزادی	ارتفاع ساقه گل دهنده	طول تاج گل	وزن تر سوخ	قطر سوخ	میزان کلروفیل کل
تیمار	۳	۱۴۹/۱۱**	۲۵/۲۱**	۰/۲۱۷**	۳/۲۰۰**	۴/۷۱**
خطا	۸	۱۰/۱۶۶	۰/۹۸۹	۰/۰۰۲۸	۰/۰۳۵۰	۰/۰۵۸۰
ضرب تغییرات		۹/۸۲	۷/۴۷	۴/۱۹	۹/۲۳	۸/۰۵۷

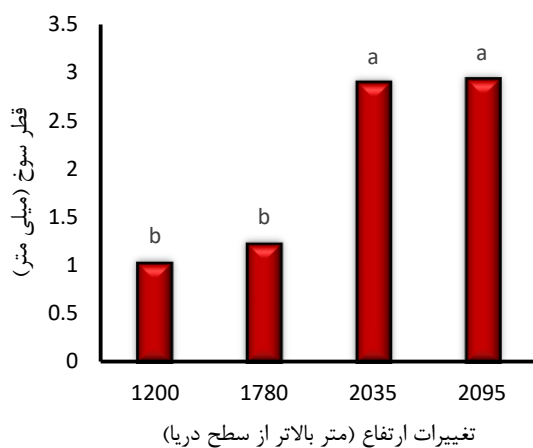
** معنی دار در سطح ۱ درصد * معنی دار در سطح ۵ درصد ns معنی دار نمی باشد.



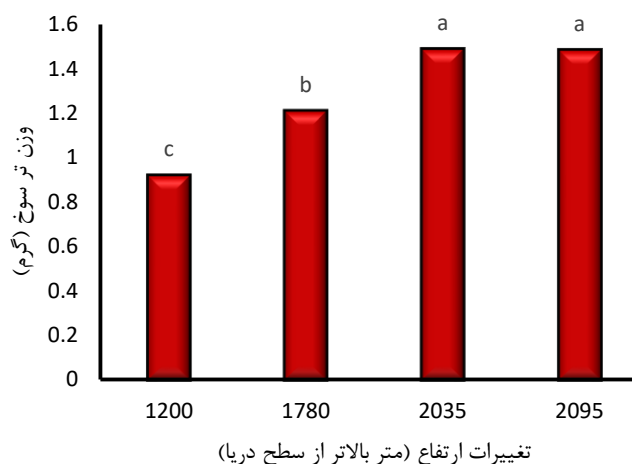
(شکل ۳)



(شکل ۲)



(شکل ۵)



(شکل ۴)



تبخیر و تعرق، شدت تشعشعات خورشیدی، تشکیل و تکامل خاک بر خصوصیات گیاه تاثیر بسزایی دارد. پراکنش گسترده ثعلب ها می تواند نشان دهنده تغییرپذیری زیاد ویژگی های فیزیولوژیک آن ها تحت تاثیر تغییرات آب و هوایی باشد. در مطالعه حاضر، اثر ارتفاعات مختلف بر ویژگی های فیزیولوژی و مورفولوژی گیاه ثعلب مورد بررسی قرار گرفت. ارتفاع نقش مهمی در تغییر ویژگی های گیاهان دارد و مطالعه آن به شناخت بهتر محیط جنگل و موضوعات مرتبط با مدیریت توده های جنگلی در ارتفاعات مختلف کمک می کند.

گونه *Dactylorhiza romana* گیاهی سایه دوست محسوب می شود. به طور تقریبی ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ فوت کندل نور مورد نیاز این گیاه است (که می توان چنین مقایسه کرد که یک روز ابری بهاری حدود ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ شمع نور دارد و در مقابل یک روز تابستانی آفتابی حدود ۱۰۰۰۰ شمع نور خواهد داشت). ثعلب برای گل دادن به دمای ۱۰ درجه سانتی گراد در شب و دمای ۲۴-۱۲ درجه سانتی گراد در روز نیاز دارد. در طول تابستان گیاه در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد قادر به زیست است، باین حال نباید به مدت طولانی در معرض این دما قرار گیرد. با توجه به اینکه گلدهی این گیاه در اواخر بهار و اوایل تابستان رخ می دهد در نتیجه می توان گفت گیاه هر چه در ارتفاع بالاتری رشد کند خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بهتری خواهد داشت. حداقل ارتفاع مورد نیاز برای رشد ثعلب ها ارتفاع ۱۲۰۰ متری از سطح دریا است.

References

۱. شهسواری، ا. (۱۳۸۷). فلور ایران. شماره ۵۷. تیره ثعلب. موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور، تهران. ۸۵ صفحه.
۲. عزیزی، ک.، ناجی، ح.، حسینیان خوشرو، ح.، حیدری، م. (۱۳۹۹). تاثیر ارتفاع از سطح دریا و فصل بر خصوصیات فیزیولوژیکی برگ گونه بلوط ایرانی در جنگلهای زاگرس (مطالعه موردی: ایلام). فرآیند و کارکرد گیاهی. ۹: ۳۵.
۳. مهدوی فیکجور، ا.، ملا احمد نالوس، ا.، عاشوری واجاری، م. (۱۳۸۲). بررسی تاثیر تغییرات ارتفاع از سطح دریا بر روی خصوصیات مورفولوژیکی گیاه دارویی شابیزک در استان گیلان. اولین همایش منطقه ای گیاهان دارویی شمال کشور.
۴. نجار فیروز جایی، م.، همتی، خ.، خراسانی نژاد، س.، دارائی گرمه خانی، ا.، باقری فرد، ا. (۱۳۹۳). اثر ارتفاع بر خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برگ گیاه گزنه در استانهای مازندران و گلستان. نشریه پژوهش های اکوفیزیولوژی گیاهی ایران ۹: ۱۱-۱.
5. Hultine, K. R. and Marshall, J. D. (2000). Altitude trends in conifer leaf morphology and stable carbon isotope composition. *Oecologia* 123: 32-40.
6. Korner, C. (2007). The use of 'altitude' in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 569-574.
7. Kotiloglu, D., Acet, T., Ozcan, K. (2020). Phytochemical profile and biological activity of a therapeutic orchid from Anatolia: *Dactylorhiza romana* subsp. *Georgica*. *Journal of Food Measurement and Characterization*.online.
8. Magurran, A. E. (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Cambridge University Press.



9. Roupioz, L., Jia, L., Nerry, F. and Menenti, M. (2016). Estimation of daily solar radiation budget at kilometer resolution over the Tibetan plateau by integrating Modis data products and a DEM. Remote Sensing of Environment 8: 1-24.



Investigation of Altitude Changes on Some Morphological and Physiological Characteristics of Salep *Dactylorhiza romana* (Sebast.) Soo subsp. *Georgica* (Klinge) Soo in Guilan province

Fatemeh Feizi¹, Hedayat Zakizadeh^{*2}, Mohammad Hossein Mirjalili³, Amir Sahraroo², Aiuob Moradi⁴

¹PhD student, Department of Horticultural Sciences and Engineering, University of Guilan, Rasht.

²Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences and Engineering, University of Guilan, Rasht.

³Associate Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, 1983969411, Tehran, Iran

²Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences and Engineering, University of Guilan, Rasht.

⁴Researcher, Agricultural Research, Education and Agricultural Organization.

Email: zakizadeh55@yahoo.com

Abstract

The orchid family is the largest family of flowering plants. Among orchids, some terrestrial orchid species with underground fleshy tubers are used in the preparation of traditional ice cream as well as special drinks. Among the topographic factors, the altitude factor has an effective role on the distribution of plant species due to its effect on the climate of the region. In this study, morphological and physiological characteristics of *Dactylorhiza romana* species collected from four regions with different altitude (1200, 1780, 2035 and 2095 meters above sea level) in Guilan province were examined. The results showed that the height of habitats had significantly effect on the characteristics of the flowering stem length, inflorescence height, fresh weight of tuber, tuber diameter and chlorophyll content, so that the best morphological and physiological characteristics of the plants were observed in plants had grown at 2035 meters above sea level.

Keyword: Height changes, Morphological characteristics, Physiological characteristics, Salep

مروری بر چند کاربرد ثعلب در صنایع غذایی

زهرا جوانمردی^{۱*}، هیمن نوربخش^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

^۲ استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Email: javanmardi.zahra111@gmail.com

چکیده

ثعلب یک ترکیب هیدروکلوئیدی است که از غده‌های خشک شده گیاه ثعلب به دست می‌آید و مهم‌ترین ترکیب تشکیل‌دهنده آن، گلوکومانان می‌باشد. این ترکیب علاوه بر کاربردهای دارویی، در صنایع غذایی به عنوان ژل‌دهنده، غلیظ‌کننده، امولسیفایر و در تولید فیلم‌های خوراکی پلی‌ساکاریدی به کار می‌رود. پودر ثعلب در کنار این ویژگی‌ها، در ایجاد عطر و طعم در محصول نهایی نیز نقش مهمی ایفا می‌کند. در این مطالعه به پژوهش‌های انجام شده اخیر در ارتباط با کاربردهای ثعلب در صنعت غذا مرور شده است. به‌طور کلی ثعلب با خاصیت پایدارکنندگی، به منظور ایجاد بافتی نرم در بستنی، کاهش رشد کریستال‌های یخ و لاکتوز بخصوص در نوسانات دمایی و نیز یکنواختی و مقاومت به ذوب مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین به دلیل ماهیت پلیمری، وزن مولکولی بالا و برهم‌کنش‌هایی که بین زنجیره آن‌ها در محلول رخ می‌دهد سبب افزایش گرانشی می‌شوند، بنابراین در تولید فیلم‌های خوراکی و کپسوله کردن مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این وجود، انجام پژوهش‌های بیشتر برای کسب دانش کافی از ثعلب و گسترش کاربردهای آن در صنایع غذایی امری ضروری می‌باشد.

کلمات کلیدی: بستنی، ثعلب، فیلم خوراکی، کپسوله کردن

مقدمه

گیاه دارویی ثعلب^۱ از خانواده ارکیداسه^۲ می‌باشد. گیاهی پایا و چند ساله و دارای گل‌های خوشه‌ای و برگ‌های پهن است (۱). از غده‌های خشک شده گیاه ثعلب، هیدروکلوئید ثعلب به دست می‌آید و مهم‌ترین ترکیب تشکیل‌دهنده آن، گلوکومانان (حدود ۱۶ تا ۵۵ درصد) می‌باشد (۲). گلوکومانان‌ها فیبرهای طبیعی خنثی محلول در آب هستند که به تنظیم قند خون، کاهش فشار بر پانکراس و ناهنجاری‌های قند خون مانند هیپوگلیسمی کمک می‌کنند. این ترکیبات در جلوگیری از بیماری‌های مزمن و درمان یبوست مزمن در بزرگسالان نیز مفید می‌باشند (۳). همچنین گیاه ثعلب دارای ترکیباتی از جمله نشاسته (۲/۷ درصد)، مواد ازته (۵ درصد)، رطوبت (۱۲ درصد) و خاکستر (۲/۴ درصد) است (۲). گونه‌های مختلف ثعلب که در ایران رشد می‌کند عمدتاً به دو صورت ثعلب پنجه‌ای و ثعلب پیازی شکل هستند. ثعلب پنجه‌ای شکل نسبت به پیازی از نظر محتوای نشاسته پایین‌تر ولی از نظر مقدار گلوکومانان بالاتر می‌باشد. بنابراین نوع پنجه‌ای شکل ثعلب منبع با ارزش گلوکومانان است (۳). گلوکومانان‌ها توجه قابل ملاحظه‌ای را به عنوان مواد ایجاد

¹ *Orchis mascula*

² Orchidaceae



کننده ژل، قوام دهنده، تشکیل دهنده فیلم و امولسیفایر در صنایع غذایی دریافت کرده اند (۲، ۳). پودر ثعلب علاوه بر ویژگی های ذکر شده، در ایجاد عطر و طعم در محصول نهایی نیز نقش مهمی ایفا می کند (۲).

کاربردهای متداول ثعلب در صنایع غذایی

تهیه بستنی

بافت بستنی به عواملی از جمله؛ حالت تجمع ذرات چربی، میزان هوا، اندازه سلول های هوا، ویسکوزیته فاز آبی و اندازه و حالت تجمعی بلورهای یخ بستگی دارد (۴). پایدارکننده های هیدروکلوئیدی یکی از ترکیبات مهم بستنی هستند که به منظور تولید پیکره و بافت یکنواخت و صاف به کار برده می شوند. همچنین این ترکیبات از رشد کریستال های یخ و لاکتوز در طول نوسان های دمایی در دوره نگهداری ممانعت کرده و باعث یکنواختی محصول و مقاومت به ذوب آن می شوند. این ترکیبات باعث افزایش ویسکوزیته بستنی شده و با تثبیت پروتئین در مخلوط بستنی، مانع جدا شدن فازها شده و همچنین کفی پایدار تشکیل داده و سبب کاهش مهاجرت رطوبت از محصول به بسته بندی یا هوا می شوند (۲، ۵). بستنی کهرمان ماراش^۱، یکی از انواع بستنی سنتی ترکیه است که از شیر، شکر و ثعلب تشکیل شده است. محتوی زیاد قند، عطر و طعم طبیعی ناشی از افزودن ثعلب از ویژگی های منحصر به فرد و متفاوت با بستنی معمولی می باشد. هیدروکلوئیدهای محلی مانند گلوکومانان ثعلب در بستنی ها با غلظت ۰/۷ تا ۱٪ در ترکیه و ایران مورد استفاده قرار می گیرد (۶، ۷).

تهیه نوشیدنی

نوشیدنی ثعلب، یکی از نوشیدنی های لبنی سنتی است که به طور کلی در فصل زمستان در کشور ترکیه مصرف می شود و طرفداران بسیاری دارد. مواد اصلی تشکیل دهنده این نوشیدنی، شیر، شکر و پودر ثعلب است که از غده های ارکیده وحشی به دست می آید. این نوشیدنی با جوشاندن شکر و پودر ثعلب در شیر تهیه می شود و با پاشیدن دارچین روی آن سرو می شود (۸). اعتقاد بر این است که این نوشیدنی جهت تسکین سرفه و سرماخوردگی و همچنین مقاومت بدن در برابر سرما در زمستان مفید است. همچنین چندین مطالعه بیان نموده است که نوشیدنی ثعلب برای رفع اسهال تابستانی نوزادان و کودکان و همچنین اسهال مزمن در بزرگسالان مفید است (۹، ۱۰). برخی از محققان خواص رئولوژیکی نوشیدنی ثعلب به عنوان تابعی از غلظت و دما مورد بررسی قرار دادند (۳، ۸، ۱۱، ۱۲).

تهیه فیلم های خوراکی

فیلم های خوراکی لایه نازکی از مواد پلیمری هستند که در سطح یا بین اجزای مواد غذایی قرار گرفته و به عنوان سدی در برابر رطوبت، اکسیژن و دی اکسید کربن عمل می کنند. فیلم های خوراکی سبب بهبود کیفیت و افزایش ماندگاری محصول می شوند. بیوپلیمرهای مورد استفاده در بسته بندی را می توان براساس ساختار شیمیایی به چهار دسته پروتئین ها، پلی ساکاریدها، لیپیدها و پلی استرها طبقه بندی کرد. این مواد می توانند به تنهایی یا در ترکیب با هم بکار روند. استفاده از منابع تجدیدپذیر همانند هیدروکلوئیدها جهت

¹ Kahramanmaraş



تولید فیلم های خوراکی به دلیل اثرات زیست محیطی و اقتصادی بودن مورد توجه محققان قرار گرفته است (۱۳، ۱۴). صمغ ها و پلی ساکاریدها بیوپلیمرهایی آب دوست با وزن مولکولی بالا و محلول در آب هستند. از آنجا که صمغ از نظر ماهیت پلیمری است، وزن مولکولی زیاد آن و برهم کنش هایی که بین زنجیره های آن ها در محلول رخ می دهد، باعث افزایش ویسکوزیته می شود (۱۵). یکی از انواع هیدروکلوئیدها، صمغ ثعلب می باشد، که می تواند به عنوان یک منبع کربوهیدرات برای تشکیل فیلم خوراکی بیوپلیمر در بسته بندی مواد غذایی استفاده شود. نتایج پژوهش های مختلف تأثیر مثبت ثعلب را در تهیه فیلم خوراکی تایید می کنند (۱۶، ۱۷).

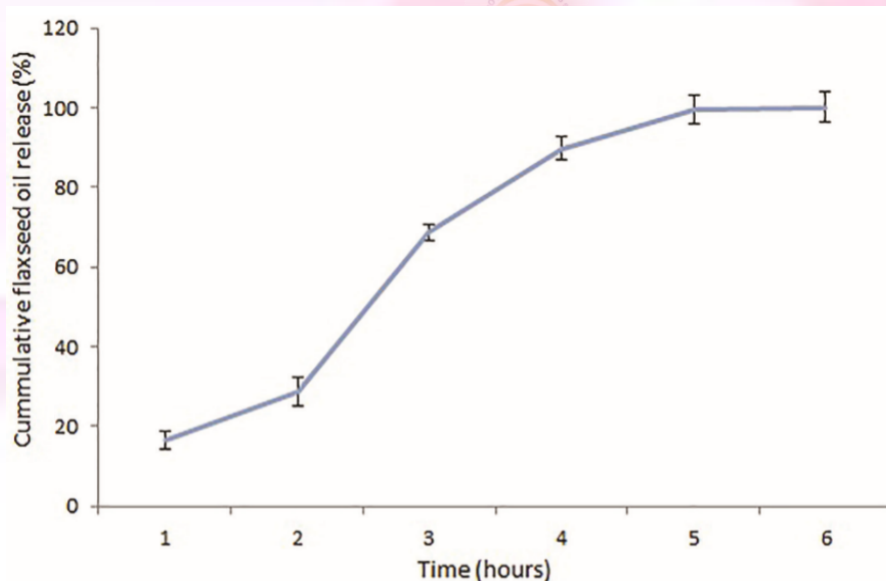
کپسولاسیون

کپسوله کردن روشی است که در آن اجزای جامد، مایع یا گاز درون کپسول های کوچک پوشانده می شوند، تا محتوای آن ها با سرعتی کنترل شده تحت شرایط خاص آزاد شود. روش ها و تکنیک های زیادی برای درون پوشانی کردن ترکیبات فعال در رژیم غذایی وجود دارد. با این حال، در تمامی آن ها سه هدف عمده از جمله، تشکیل یک دیواره مناسب در اطراف ماده انتخاب شده، جلوگیری از نشت و نفوذ ماده کپسوله شده به داخل سطح کپسول در طول نگهداری و عدم اختلال یا واکنش با محیط دنبال می شود (۱۸، ۱۹). یکی از مهم ترین مشکلات روغن های غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع، حساسیت بالای آن ها به تخریب اکسیداتیو و تولید بو و مزه نامطلوب است. بنابراین نیاز به محافظت و پایدار نمودن آن ها در زمان نگهداری می باشد (۲۰). امروزه از تکنیک ژلاسیون یونی^۱ به طور گسترده جهت کپسوله کردن مواد استفاده می گردد (۲۱). با این تکنیک، هنگامی که یک پلیمر مانند سدیم آلژینات و گلوکومانان تحت ژلاسیون یونی قرار می گیرد، به دلیل برقراری نیروهای الکترواستاتیکی بین گروه های دارای بار مخالف، ژل تولید می شود. در پژوهشی روغن بذر کتان در سیستم آلژینات - ثعلب به روش ژلاسیون یونی کپسوله شد و نتایج نشان داد که راندمان کپسوله کردن با استفاده از ۶٪ ثعلب و ۲٪ سدیم آلژینات با محلول ژل زنی کلرید کلسیم ۰/۳ مولار به ۹۳/۴۶ ± ۰/۰۶۴ رسید. در محیط SGF^۲، ماتریس فقط حدود ۲۸/۵۶٪ از روغن بذر کتان محبوس شده را پس از ۲ ساعت آزاد کرد، سپس بقیه روغن در محیط SIF^۳ آزاد شد و ۵ ساعت طول کشید تا ۹۹/۳۲٪ روغن آزاد شد (شکل ۱) (۲۲).

¹ Ionotropic gelation

² Simulated Gastric Fluid

³ Simulated Intestinal Fluid



شکل ۱. مشخصات رهایش روغن بذر کتان از کلسیم آلزینات/ثعلب در طول ۶ ساعت مطالعه آزمایشگاهی. محیط SGF (0.1 M HCl, pH 1.2) در دمای 37 ± 0.5 درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت نگهداری شد. سپس با محیط SIF (phosphate buffer, pH 7.4) جایگزین شد و تا زمانی که دانه ها از هم پاشیده شدند، نگهداری شد.

نتیجه گیری

امروزه به دلیل خواص کاربردی هیدروکلوئیدها به عنوان ژل دهنده، غلیظ کننده، پایدارکننده و امولسیفایر در صنایع غذایی، به فور مورد استفاده قرار می گیرند. با توجه به ویژگی ها و سابقه های کاربردهای ثعلب در صنایع غذایی، لازم است با تکمیل اطلاعات موجود و بررسی های دقیق تر در راستای کاربرد آن در سایر فرآورده های غذایی قدم های موثرتری برداشته شود.

References

1. Cozzolino, S., and Widmer, A. (2005). Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception?. Trends in Ecology and Evolution, 20(9): 487-494.
2. Kaya, S., and Tekin, A. R. (2001). The effect of salep content on the rheological characteristics of a typical ice-cream mix. Journal of Food Engineering, 47(1): 59-62.
3. Farhoosh, R., and Riazi, A. (2007). A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature. Food Hydrocolloids, 21(4): 660-666.
4. Dickinson, E., and Stainsby, G. (1982). Colloids in foods (pp. 382±383). London: Applied Science Publishers, 42(1): 191-204
5. Goff, H. D. (2000). Ice cream and frozen desserts. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 1-15.
6. Bahramparvar, M., and Mazaheri Tehrani, M. (2011). Application and functions of stabilizers in ice cream. Food reviews international, 27(4): 389-407.
7. Guven, M. E. H. M. E. T., Karaca, O. B., and Kacar, A. (2003). The effects of the combined use of stabilizers containing locust bean gum and of the storage time on Kahramanmaraş-type ice creams. International Journal of Dairy Technology, 56(4): 223-228.



8. Işıklı, N. D., Dönmez, M. N., Kozan, N., and Karababa, E. (2015). Rheological properties of salep powder-milk mixture. *Journal of food science and technology*, 52(10): 6556-6564.
9. Ece Tamer, C., Karaman, B., and Utku Copur, O. (2006). A traditional Turkish beverage: salep. *Food Reviews International*, 22(1): 43-50.
10. Telcioglu, A., and Kayacier, A. (2007). The effect of sweeteners and milk type on the rheological properties of reduced calorie salep drink. *African Journal of Biotechnology*, 6(4): 465-469
11. Yilmaz, M. T., SERT, D., Karakaya, M., and TISKE, S. S. (2010). Optimization of the effect of sweetener and dietary fiber on rheological and sensory properties of salep beverage. *Journal of texture studies*, 41(6): 804-824.
12. Yaşar, K., Kahyaoglu, T., and Şahan, N., (2009). Dynamic rheological characterization of salep glucomannan/galactomannan-based milk beverages. *Food Hydrocolloids*, 23(5): 1305-1311.
13. Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International food research journal*, 15(3): 237-248.
14. Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Martins, J. T., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., and Vicente, A. A. (2011). Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. *Trends in Food Science and Technology*, 22(12): 662-671.
15. Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food hydrocolloids*, 23(6): 1473-1482.
16. Kurt, A., and Kahyaoglu, T. (2014). Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan. *Carbohydrate polymers*, 104, 50-58.
17. (17). Ekrami, M., Emam-Djomeh, Z., Ghoreishy, S. A., Najari, Z., and Shakoury, N. (2019). Characterization of a high-performance edible film based on Salep mucilage functionalized with pennyroyal (*Mentha pulegium*). *International journal of biological macromolecules*, 133, 529-537.
18. Calvo, T. R. A., and Santagapita, P. R. (2017). Encapsulation of a free-solvent extract of lycopene in alginate-Ca (II) beads containing sugars and biopolymers. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1): 1-8.
19. Javadian, S. R., Shahosseini, S. R., and Ariaii, P. (2017). The effects of liposomal encapsulated thyme extract on the quality of fish mince and *Escherichia coli* O157: H7 inhibition during refrigerated storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(1): 115-123.
20. Augustin, M. A., Sanguansri, L., and Bode, O. (2006). Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders. *Journal of food science*, 71(2): E25-E32.
21. Patil, J. S., Kamalapur, M. V., Marapur, S. C., and Kadam, D. V. (2010). Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(1): 241-248.
22. Wissam, Z., and Samer, H. (2019). Encapsulation of flaxseed oil extract in alginate-salep system by ionic gelation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(12).



An overview on the applications of salep in the food industry

Zahra Javanmardi^{1*}, Himan Nourbakhsh²

¹MSc. Student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

²Assistant Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Email: javanmardi.zahra111@gmail.com

۱۲۹

Abstract

The salep is a hydrocolloid compound obtained from the dried tubers of orchid plants and its most important constituent is glucomannan. In addition to pharmaceutical applications, this compound is used in the food industry as a gelling agent, thickener, and emulsifier. Moreover, it has been incorporated in production of polysaccharide edible films. In addition to these properties, salep powder also plays an important role in creating flavor in food formulations. In this study, the preceding studies recently carried out in connection with applications orchids in the food industry have been reviewed. In general, stabilizing salep are used to create a soft texture in ice cream; reduce the growth of ice and lactose crystals, especially in temperature fluctuations; as well as uniformity and melting resistance. Also, the salep solution will be viscous since it has a polymeric nature, and supramolecular structure which can enhance the occurred interactions among their chains in solution. It is also applied in the production of edible films and encapsulation. However, further research is needed to gain sufficient knowledge of salep and expand its applications in the food industry.

Keywords: Edible films, Encapsulation, Ice cream, Salep



اثر پیش تیمار افزایش غلظت قند بر رشد و کیفیت غده‌های *Dactylorhiza umbrosa* در شرایط درون شیشه‌ای

سعیده رستمی بالان^۱، شیرین دیان‌تی دیلمی^{۲*}، سهیل کریمی^۲

^۱ کارشناس ارشد، گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران.

^۲ استادیار، گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران.

Email: srostamy@ut.ac.ir, dianati@ut.ac.ir

چکیده

غده‌های ارکیده خاکروی سایه‌پسند *Dactylorhiza umbrosa* به علت وجود گلوکومانان در صنایع دارویی، نوشیدنی، شیرینی‌سازی، بستنی‌سازی و صنایع غذایی کاربرد دارد. برداشت بی‌رویه از منابع طبیعی این گونه ارزشمند را در معرض انقراض قرار داده است. استفاده از تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای می‌تواند افزون بر حفظ ژرم پلاسما، برای تولید غده‌های ارزشمند گیاه نیز استفاده شود. در این پژوهش اثر پیش تیمار با غلظت‌های مختلف قند شامل ساکارز ۱۸ گرم در لیتر + فروکتوز ۷/۵ گرم در لیتر (قند ۱۵۰ درصد)، ساکارز ۲۴ گرم در لیتر + فروکتوز ۱۰ گرم در لیتر (قند ۲۰۰ درصد) و شاهد (شامل ساکارز ۱۲ گرم در لیتر + فروکتوز ۵ گرم در لیتر) بر رشد ریشه و غده‌زایی گیاهچه‌های کشت بافتی ثعلب سایه پسند بررسی شد. ۲۹ روز بعد از اعمال پیش تیمارها، گیاهان به محیط رشد بهینه انتقال داده شدند و پس از ۷۰ روز، شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان ارزیابی شد. پیش تیمار افزایش غلظت قند سبب بهبود شاخص‌های رشد نسبت به گیاهان شاهد در ثعلب سایه پسند شد. با توجه به اهمیت اندام‌های زمینی از جمله ریشه و غده، مشخص شد که افزایش غلظت قند سبب تحریک رشد ریشه شدند. همچنین کاربرد پیش تیمارها میزان تولید غده ثانویه را بهبود بخشید و سبب غده‌زایی و بهبود کیفیت غده از طریق افزایش میزان کربوهیدرات ذخیره‌ای در گیاه شد. در نهایت با توجه به افزایش شاخص‌های رشد و حجم غده‌ها، تیمار قند ۲۰۰ درصد برای افزایش غده‌زایی ثعلب سایه پسند توصیه شد.

کلمات کلیدی: ارکیده بومی، ثعلب، ساکارز، فروکتوز، کربوهیدرات ذخیره‌ای

مقدمه

ثعلب سایه‌پسند *Dactylorhiza umbrosa* یکی از گونه‌های گروه ارکیده‌های خاکروی مناطق معتدله با غده‌های زیرزمینی پنجه‌ای شکل است (۴). گلوکومانان مهمترین ماده موجود در غده‌ها و متشکل از فیبرهای محلول در آب می‌باشد که افزون بر اینکه برای سلامتی مصرف‌کننده مفید است (۱۳)، به دلیل خواص قوام‌دهندگی و تثبیت‌کنندگی در صنایع غذایی کاربرد دارد (۴). همچنین از ثعلب در صنایع دارویی، نوشیدنی، شیرینی‌سازی و بستنی‌سازی نیز استفاده می‌شود (۱۲). در حال حاضر ارکیده‌های مولد ثعلب به صورت تجاری کشت و کار نمی‌شوند، بلکه غده‌های ارزشمند این گیاه از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری شده و مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرند لذا این گیاه در معرض انقراض قرار دارد (۵). روش‌های کشت بافت افزون بر اینکه امکان تولید انبوه و حفظ ژرم پلاسما ارزشمند را فراهم آورده‌اند، پتانسیل تولید غده‌ها در



شرایط کنترل شده را نیز ایجاد می کنند ولی فرایند غده زایی درون شیشه ای محدود و کند است. لذا یافتن یک روش بهینه برای تکثیر و تولید انبوه آن ها حائز اهمیت است. عوامل متعددی در تشکیل اندام های ذخیره ای در شرایط درون شیشه ای نقش دارند که قندها به ویژه ساکارز از مهم ترین آن ها هستند (۱۰). معمولاً در کشت درون شیشه ای، ساکارز با غلظت ۱ تا ۵ درصد استفاده می شود. در پژوهشی مشخص شد که غلظت بهینه ساکارز برای ریزغده زایی در سیب زمینی ۶۰ تا ۸۰ گرم در لیتر است (۳). غلظت های خیلی بالا یا خیلی کمتر از ۸۰ گرم در لیتر ساکارز، منجر به ریزغده زایی کندتر و کمتر و تولید ریزغده های کوچکتر می شود (۹).

با توجه به مطالب عنوان شده، در پژوهش حاضر تلاش شد تا با اعمال پیش تیمارهای غلظت بالای قند، رشد گیاه به سمت تولید ریشه و غده زایی هدایت شود. برای این منظور گیاهچه های ثعلب سایه پسند به مدت ۴ هفته تحت تاثیر غلظت های بالای قند قرار داده شدند و سپس در محیط معمول واکشت شدند. شاخص های رشد و کربوهیدرات ذخیره ای در اندام زمینی جهت ارزیابی کارایی پیش تیمارها بر رشد و غده زایی گیاه اندازه گیری شد.

مواد و روش ها

در این آزمایش اثر غلظت های بالای قندهای ساکارز و فروکتوز به ترتیب به میزان ۱۵۰٪ (۱۸ + ۷/۵ گرم در لیتر)، ۲۰۰٪ (۲۴ + ۱۰ گرم در لیتر) و شاهد (۱۲ + ۵ گرم فروکتوز) بر رشد ریشه و غده زایی گیاهچه های ۱۳ ماهه کشت بافتی ثعلب سایه پسند بررسی شد. تیمارهای قندی در محیط کشت فاست تغییر یافته (دیانتی، ۱۳۹۲) دارای ۱ گرم در لیتر ذغال فعال و به مدت ۲۹ روز اعمال شدند. محیط ها پس از افزودن پنج گرم در لیتر آگار، در اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه) گندزدایی و سپس داخل شیشه های استریل (ارتفاع ۹/۵ و قطر ۶ سانتی متر) توزیع شدند. در هر شیشه ۶۰ میلی لیتر از محیط توزیع شد. گیاهچه ها به مدت ۲۹ روز در این محیط ها نگهداری شدند. پس از آن همگی در محیط کشت مشابه شاهد و دارای ذغال فعال (۱ گرم در لیتر) منتقل شدند و واکشت گیاهان هر سه هفته یکبار صورت گرفت. در تمامی این مراحل گیاهچه ها در اتاقک رشد (فیتوترون)، با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری می شدند. پس از ۷۰ روز گیاهان از شیشه ها خارج شده و شاخص های رشد شامل قطر طوقه، ارتفاع گیاه، تعداد برگ فعال، بقاء، درصد برگ نکرور، تعداد ریشه فعال، تعداد غده های تشکیل شده مادری، تعداد غده های تشکیل شده دختری، حجم غده مادری، حجم غده دختری، حجم کل غده ها، وزن خشک گیاه و وزن خشک غده اندازه گیری شد. برای اندازه گیری وزن خشک، نمونه ها در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. همچنین غلظت کربوهیدرات ذخیره ای (۸) در اندام زیرزمینی اندازه گیری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و در هر تکرار سه ظرف کشت و در هر ظرف کشت سه ریز نمونه گیاهی انجام شد. آنالیز واریانس داده ها با استفاده از آزمون ANOVA و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون توکی ($P \leq 0.05$) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها توسط نرم افزار SPSS (نسخه ۲۱/۰) انجام شد.

نتایج و بحث

اثر پیش تیمار غلظت های بالای قند بر قطر طوقه ($P \leq 0.01$)، تعداد برگ ($P \leq 0.05$)، بقاء در شرایط درون شیشه ای ($P \leq 0.05$) و وزن خشک گیاه ($P \leq 0.05$) معنی دار بود. اما اثر این پیش تیمارها بر ارتفاع گیاه و درصد برگ نکروز در ریز نمونه ها معنی دار نبود. همچنین تجزیه واریانس داده های مربوط به ریشه و غده های ثعلب سایه پسند در شرایط درون شیشه ای نشان داد که اثر تیمار غلظت های بالای قند بر تعداد ریشه ($P \leq 0.01$)، تعداد غده مادری ($P \leq 0.01$)، تعداد غده دختری ($P \leq 0.05$) و حجم کل غده ها ($P \leq 0.01$) معنی دار بود. همچنین تجزیه واریانس داده بیوشیمیایی مربوط به قند ذخیره ریشه ($P \leq 0.01$) معنی دار بود.

جدول ۱. اثر افزایش غلظت قند محیط کشت بر میانگین صفات قطر طوقه، ارتفاع، تعداد برگ، درصد بقاء و وزن خشک ثعلب سایه پسند.

تیمار	قطر طوقه (mm)	تعداد برگ	بقاء (%)	وزن خشک گیاه (mg)
شاهد	$4/63 \pm 0/23^b$	$5/22 \pm 0/2^b$	$81/48 \pm 11/20^b$	100 ± 10^b
قند ۱۵۰٪	$5/14 \pm 0/25^a$	$5/71 \pm 0/24^a$	$93/33 \pm 4/44^a$	137 ± 20^a
قند ۲۰۰٪	$5/20 \pm 0/27^a$	$5/83 \pm 0/44^a$	$94/44 \pm 5/56^a$	110 ± 20^b

میانگین های ($n = 4$) دارای حروف مشابه بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.

اگرچه بیشترین میزان بیومس گیاه و بیشترین تعداد ریشه مربوط به قند ۱۵۰٪ بود، اما در بیشتر صفات همچون قطر طوقه، تعداد برگ، بقاء در شرایط درون شیشه ای، تعداد غده دختری و حجم کل غده ها، قند ۲۰۰٪ بیشترین میانگین را به خود اختصاص داد. تعداد غده مادری در هر دو تیمار قندی یکسان بود. در تمامی صفات فیزیولوژیک یاد شده، گیاهان شاهد در کمترین میزان نسبت به سایر تیمارها قرار داشتند (جدول ۱ و ۲). ارزیابی کربوهیدرات ذخیره ای نشان داد بیشترین کربوهیدرات ذخیره ای مربوط به قند ۲۰۰٪ بود. گیاهان شاهد در این شاخص بیوشیمیایی کمترین میزان را داشتند (شکل ۱).

جدول ۲. اثر افزایش غلظت قند محیط کشت بر تعداد ریشه، تعداد غده مادری و دختری و مجموع حجم غده های ثعلب سایه پسند.

تیمار	تعداد ریشه	تعداد غده مادری	تعداد غده دختری	مجموع حجم غده ها (mm ³)
شاهد	$3/22 \pm 0/38^c$	$0/89 \pm 0/04^b$	$0/7 \pm 0/13^b$	$0/83 \pm 0/02^c$
قند ۱۵۰٪	$4/35 \pm 0/38^a$	$1/00 \pm 0/00^a$	$0/90 \pm 0/10^{ab}$	$1/03 \pm 0/03^b$
قند ۲۰۰٪	$4/06 \pm 0/51^b$	$1/00 \pm 0/00^a$	$1/11 \pm 0/11^a$	$1/24 \pm 0/03^a$

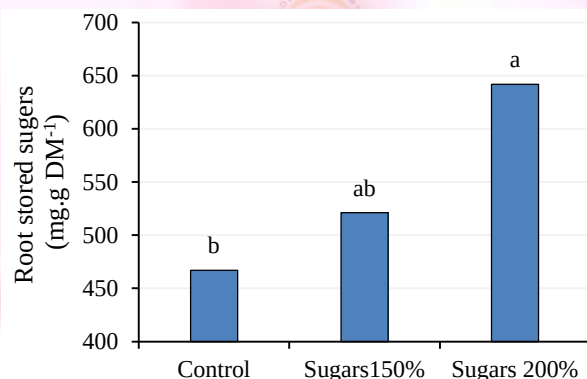
میانگین های ($n = 4$) دارای حروف مشابه بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.



ساکارز یک منبع کربن خارجی ضروری برای القاء غده زایی و توسعه آن در شرایط درون شیشه ای است (۶). به طور کلی قندها و به ویژه ساکارز سه نقش اصلی و اساسی در غده زایی دارند. آن ها به عنوان منبع ساخت کربوهیدرات، ملکول سیگنال دهنده و عامل اسمولیت عمل می کنند (۱۰). در پژوهشی ارتباط بین ساکارز و تشکیل ریزغده در سیب زمینی به وسیله بررسی نقش و اهمیت ساکارز در محیط کشت، منشا ریزنمونه ها و همچنین عملکرد بالقوه ساکارز در تشکیل ریزغده ها در شرایط درون شیشه ای تعیین شد. ساکارز بدون ایجاد عوارض جانبی منفی به شدت بر القاء ریزغده زایی، رشد و زودرس بودن غده زایی تأثیر می گذارد. نتایج این مطالعه نشان داد که بین غده زایی و مقدار بالای ساکارز در محیط کشت همبستگی معنی داری وجود دارد. محتوای بالای ساکارز در محیط، منبع کربنی است که صرف نظر از منشا ریزنمونه ها، بر تشکیل و رشد ریزغده ها تأثیر می گذارد (۶).

ارزایی رشد شاخساره و ریشه گیاهان نشان داد که گیاهان تیمار شده با غلظت های بالای قند در مقایسه با گیاهان شاهد رشد بیشتری داشتند. دلیل این امر می تواند دسترسی بیشتر گیاه به ساکارز باشد. ساکارز در آوندهای آبکش منتقل می شود و بسیاری از گیاهان از آن به عنوان منبع اصلی کربن جهت رشد استفاده می کنند (۲). در پژوهش حاضر تعداد ریشه در گیاه شاهد در کمترین سطح نسبت به سایر تیمارها قرار داشت. همچنین افزایش غلظت قند اثرات چشم گیری بر رشد در اندام زمینی داشت. پژوهش ها حاکی از آن است که قندها فعالیت آنزیم ها و بیان ژن های مرتبط با ریشه دهی را هماهنگ و تنظیم می کنند (۲). یکی از نگرانی های پژوهش حاضر، کاهش رشد و افزایش مرگ و میر گیاهچه ها در نتیجه افزایش غلظت قند و تنش اسمزی ناشی از آن بود. ولی میزان بقاء در گیاهان تیمار شده با غلظت های بالای قند نسبت به گیاه شاهد افزایش یافت. بنظر می رسد افزایش بقاء، به اثرات پیش تیمارها در القاء تحمل گیاه به شرایط محیطی ارتباط دارد (۷).

در گیاهان پیش تیمار شده، افزایش غلظت قند ذخیره ای در ریشه نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۱). نتایج نشان داد که کربوهیدرات ذخیره ای در اندام زیرزمینی در قند ۲۰٪ در بالاترین میزان قرار داشت. علت این امر آن است که ساکارز به عنوان منبع کربن در برگ های فعال فتوسنتزی تولید شده و از برگ ها به بافت های غیر فتوسنتزی مانند غده ها منتقل می شود تا از رشد و توسعه آن ها حمایت کند (۲). به این ترتیب افزایش قند در محیط کشت تا ۲ برابر حد معمول سبب تجمع بیشتر قند در اندام زمینی گیاه شد. با توجه به اینکه گلوکومانان به عنوان یک کربوهیدرات ذخیره ای در بسیاری از ژئوفیت ها و ثعلب شناخته می شود (۱۱) میزان گلوکومانان و نشاسته بر کیفیت غده های این گیاه اهمیت بسزایی دارد. لذا هرچه میزان کربوهیدرات ذخیره ای در غده های ثعلب سایه پسند بیشتر باشد، کیفیت غده ها بالاتر هستند. در مجموع افزایش غلظت قند در محیط رشد سبب بهبود شاخص های رشد و بیوشیمیایی نسبت به گیاهان شاهد در ثعلب سایه پسند شد. با توجه به اهمیت اندام های زمینی از جمله ریشه و غده، مشخص شد که پیش تیمارها سبب تحریک رشد ریشه شدند. همچنین کاربرد پیش تیمارها میزان تولید غده ثانویه را بهبود بخشید و سبب غده زایی و بهبود کیفیت غده در گیاه شد. در این راستا قند ۲۰٪ کارایی بهتری نسبت به سایر تیمارها داشت.



شکل ۱. محتوای کربوهیدرات ذخیره‌ای در ریشه ثعلب سایه پسند.

References

۱. دیانتی دیلمی، ش. ۱۳۹۲. مطالعه جوانه زنی، انتقال به مرحله گلدهی و بیان برخی ژن‌های مربوط به آن در چند گونه ارکیده ایرانی. رساله دکتری، گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی کرج، دانشگاه تهران.
2. Braun, D.M., Wang, L. and Ruan, Y.L. (2014). Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *Journal of Experimental Botany*, 65(7), 1713-1735.
3. Dodds, J.H., Silva-Rodriguez, D., Tovar, P. (1992). Micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). In *High-Tech and Micropropagation III*, Springer, Berlin, Heidelberg, 91-106.
4. Farhoosh, R., Riazi, A. (2007). A compositional study on two current types of salep in Iran and their rheological properties as a function of concentration and temperature. *Food Hydrocolloids*, 21(4), 660-666.
5. Ghorbani, A., Gravendeel, B., Naghibi, F., de Boer, H. (2014). Wild orchid tuber collection in Iran: a wake-up call for conservation. *Biodiversity and Conservation*, 23(11), 2749-2760.
6. Islam, M.S., Roni, M.Z.K., Jamal Uddin, A.F.M., Shimasaki, K. (2017). Tracing the role of sucrose in potato microtuber formation 'in vitro'. *Plant Omics*, 10(1), 15-19.
7. Karimi, S., Karami, H., Mokhtassi-Bidgoli, A., Tavallali, V., Vahdati, K. (2018). Inducing drought tolerance in greenhouse grown *Juglans regia* by imposing controlled salt stress: The role of osmotic adjustment. *Scientia Horticulturae*, 239, 181-192.
8. McCready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V., Owens, H.S. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical chemistry*, 22(9), 1156-1158.
9. Motallebi-Azar, A. and Kazemiani, S. (2011). A new concept about carbon source roles on *in vitro* microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Advances in Agriculture and Botany*, 3(3), 160-167.
10. Podwyszyńska, M. (2012). The mechanisms of *in vitro* storage organ formation in ornamental geophytes. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 6, 9-23.
11. Ranwala, A.P. and Miller, W.B. (2008). Analysis of nonstructural carbohydrates in storage organs of 30 ornamental geophytes by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *New Phytologist*, 180(2), 421-433.
12. Sezik, E. (2002). Turkish orchids and salep. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 44, 151-157.
13. Vuksan, V., Jenkins, D.J., Spadafora, P., Sievenpiper, J.L., Owen, R., Vidgen, E., Brighenti, F., Josse, R., Leiter, L.A., Bruce-Thompson, C. (1999). Konjac-mannan



۱۳۵



Effect of high sugars concentration pretreatments on development and quality of *Dactylorhiza umbrosa* tubers *in vitro*

Saeideh Rostami-Balan¹, Shirin Dianati Daylami^{2*}, Soheil Karimi²

¹ Graduated MSc., Department of Horticulture Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran.

² Assistant professor, the Department of Horticulture Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran.

Email: srostamy@ut.ac.ir, dianati@ut.ac.ir

Abstract

Tubers of *Dactylorhiza umbrosa* are used in the pharmaceutical, beverage, confectionery, ice cream, and food industries because of their glucomannan content. Improper harvesting from natural habitats has endangered the existence of this species. *In vitro* micropropagation techniques can be employed for the mass-production of tubers of such species. In this study, the effect of high concentrations of sugars [sucrose 18 g·L⁻¹+fructose 7.5 g·L⁻¹ (sugar 150%) and sucrose 24 g·L⁻¹+fructose 10 g·L⁻¹ (sugar 200%)] for 29 days was investigated on root growth and tuberization of *D. umbrosa*. Then, the plants were transferred to optimized growing conditions and after 70 days, their physiological and biochemical responses were compared with non-treated plants. The pretreatments improved growth and root development in the plant. Moreover, increasing sugar concentration improved the production of secondary tubers and caused tuber formation and improved tuber quality by increasing the content of stored carbohydrates in the plant. According to the increase in growth and tuber development, sugar 200% was recommended to increase tuberization of *D. umbrosa*.

Keywords: Fructose, Salep, Stored carbohydrates, Sucrose, Terrestrial Orchid.



تاثیر محیط‌های کشت کم هزینه بر برخی صفات رشدی و مورفولوژی ارکیده فالانوپسیس

آیلار محمدپور باروق^۱، شیرین دیانتی دیلمی^{۲*}، علی فدوی^۳، ساسان علی‌نیایی فرد^۴

^۱گروه باغبانی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

^۲گروه فناوری صنایع غذایی، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

Email: mohammadpor.aylar@ut.ac.ir

چکیده

ارکیده‌های فالانوپسیس یکی از پرمخاطب‌ترین گیاهان در جهان هستند، اما بالا بودن قیمت‌های آنان به دلیل هزینه‌های تولید، سبب کاهش تولید تجاری مقرون به صرفه و ارزان این گیاه در بسیاری از کشورها به خصوص کشور ایران شده است. بنابراین در این پژوهش سعی بر آن است که با معرفی محیط کشت‌های ساده و کم هزینه‌تر، بتوان در تولید انبوه گیاهان ارکیده راهکارهایی موثر برای تولید در سطح تجاری معرفی نمود. در این پژوهش، پروتوکورم‌های پنج میلی متری ارکیده بعنوان ریز نمونه در هشت تیمار محیط کشت نیم غلظت موراشیگ و اسکوگ (شاهد)، فاست و محیط‌های ساده کم هزینه (تیمارهای یک تا شش)، در سه تکرار، کشت شدند و سه ماه پس از کشت، برخی صفات رشدی گیاهچه‌ها ثبت گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان صفات اندازه‌گیری شده در تیمارهای پنج و شش نسبت به دیگر تیمارها بیشتر و در تیمار دو کمتر بوده است. با توجه به بهتر بودن صفات در محیط کشت‌های پنج و شش، استفاده از این تیمارها به عنوان محیط کشت‌های جامد کم هزینه مناسب جهت رشد ارکیده‌های فالانوپسیس توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پروتوکورم، تولید انبوه، محیط‌های کشت ساده

مقدمه

گیاهان ارکیده به ویژه ارکیده‌های فالانوپسیس با گل‌هایی زیبا و پتانسیل اقتصادی بالا یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان زینتی در جهان محسوب می‌شوند (۳). اما هزینه‌های بالای تهیه محیط کشت‌های رایج برای تولید درون شیشه‌ای این گیاهان، سبب کاهش تولید تجاری مقرون به صرفه گیاهان ارکیده شده است (۶). تحقیقات نشان داده‌اند که استفاده از محیط‌های کشت قدیمی‌تر از جمله میترا^۱ و نودسون^۲ و محلول‌های کودی (ان‌پی‌کا)^۳ ساخت داخل کشور در نسبت‌های مختلف، به دلیل دارا بودن میزان نمک‌های معدنی کمتر و استفاده از مواد طبیعی مانند شیر نارگیل، عصاره سیب زمینی و موز، در ترکیب با ویتامین‌ها یا به تنهایی، بعنوان جایگزین ویتامین‌ها و مواد افزودنی، می‌توانند در کاهش هزینه‌های کشت بسیار موثر باشند (۲، ۴ و ۷). به عنوان مثال در ارکیده الوفیلا^۴، بیشترین میزان پروتوکورم‌زایی در محیط کشت ان‌پی‌کا (۲۰، ۲۰، ۲۰) حاوی ۵۰ و ۱۰۰ میلی لیتر بر لیتر شیر نارگیل اتفاق افتاده است (۷). در پژوهش حاضر بعنوان هر یک از مواد سازنده محیط‌های کشت شامل شکر، نمک‌های پرمصرف و کم مصرف، ویتامین‌ها و

¹ Mitra et al. (M)

² Knudson

³ NPK

⁴ Eulophia graminea





مواد افزودنی، از مواد طبیعی و ارزان قیمت استفاده خواهد شد تا با معرفی محیط‌های کشت کم هزینه، بتوان در ارزان‌سازی تولید انبوه گیاهان ارکیده راهکارهایی موثر در سطح تجاری معرفی نمود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش ابتدا بذرهای ارکیده فالانوپسیس آمیبیلیس^۱ تحت شرایط استریل در محیط نیم غلظت موراشیگ و اسکوگ^۲ جامد دارای ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، کشت شدند. سه ماه پس از کشت، محیط‌های کشت تهیه، سپس افزودنی‌ها شامل پودر موز و ذغال به محیط‌های کشت سه تا شش و در نهایت آگار به تمام محیط‌های کشت افزوده شد و همه محیط‌ها جهت سترون شدن به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر، قرار گرفتند و با پایین آمدن دمای آن‌ها، هر یک به مقدار ۳۰ میلی لیتر، در ظروف جار توزیع شدند. یک هفته بعد از توزیع محیط‌های کشت، پروتوکورهای پنج میلی متری در هشت تیمار محیط‌های کشت جامد شامل ۱/۲ ام‌اس، فاست و محیط‌های دارای عناصر اصلی نیتروژن، پتاسیم و فسفر (که با شماره‌های یک تا شش مشخص شدند) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و هر تکرار دارای پنج عدد ریز نمونه، کشت شدند. سپس ظروف کشت شده، به شرایط رشدی داخل اتاقک کشت با دمای 25 ± 1 درجه سانتی گراد، طول مدت ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و تحت نور سفید لامپ‌های فلئوروسنت دارای طیف ۷۰۰-۴۰۰ نانومتر و با شدت نور ۲۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه منتقل و به مدت سه ماه نگهداری شدند. در مدت سه ماه هر ۳۰ روز یکبار واکشت ریز نمونه‌ها صورت گرفت و سه ماه پس از کشت صفات مورفولوژی از جمله وزن تر و خشک، تعداد و حجم برگ، ریشه، گیاهچه، سطح برگ و طول ریشه و گیاهچه، مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به جدول ۱، نتایج به دست آمده از تجزیه آماری داده‌ها نشان‌دهنده آن است که بین محیط‌های کشت مختلف در تمامی صفات در سطح احتمال یک درصد، تفاوت معنی‌دار بوده است.

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات مورفولوژی اندازه‌گیری شده ارکیده فالانوپسیس رشد یافته در محیط کشت‌های جامد مختلف

منابع تغییرات	تیمار	خطا	ضریب تغییرات (درصد)
درجه آزادی	۷	۱۶	-
وزن تر برگ	۵/۲۰۶۱**	۰/۰۶۷۵	۲۵/۴۹
وزن خشک برگ	۰/۰۱۱۶**	۰/۰۰۰۱	۲۲/۶۹
وزن تر ریشه	۱۳/۸۷۷۷**	۰/۳۴۰۸	۲۵/۷۲
وزن خشک ریشه	۰/۰۸۳۵**	۰/۰۰۰۹	۱۸/۶۳
وزن تر گیاهچه	۳۶/۹۹۲۱**	۰/۷۳۴۴	۲۳/۶۷
وزن خشک گیاهچه	۰/۱۲۱۷**	۰/۰۰۲۸	۲۷/۰۴
تعداد برگ	۳۳۵۴/۵۱۷۹**	۶/۲۵	۸/۸۱
تعداد ریشه	۱۲۱۱/۱۳۶۹**	۱۲/۷۵	۱۶/۵۸

¹ Phalaenopsis amabilis 'Anthura Beijing'

² Murashige and Skoog (MS)





۲۸/۸۷	۹/۰۴۱۷	۲۰۶/۴۵۲۴**	تعداد گیاهچه
۴/۱۴	۵/۷۲۴۳	۷۶۸۰/۳۴۴۱**	سطح برگ
۲۸/۰۱	۱۲۳/۲۸۳۸	۵۴۵۷/۷۷۱۲**	طول ریشه
۲۶/۹۴	۴۱/۸۹۴۶	۱۰۶۳/۱۶۴۵**	طول گیاهچه
۲۶/۵۹	۰/۰۶۹	۳/۷۷۵۲**	حجم برگ
۲۸/۸۷	۰/۳۴۲۸	۱۴/۳۹۰۶**	حجم ریشه
۲۴/۷۹	۰/۸۴۳۵	۳۵/۹۳۲۶**	حجم گیاهچه

** معنی دار در سطح احتمال یک درصد، * معنی دار در سطح احتمال پنج درصد و ^{ns} غیر معنی دار.

نتایج و بحث

با توجه به جدول ۲ و شکل ۱، بیشترین تعداد، سطح، طول، وزن تر و خشک و حجم برگ و ریشه ابتدا در تیمار شش سپس پنج و بعد در تیمارهای فاست، شاهد و سه مشاهده شد. همچنین کمترین این صفات در تیمارهای دو، یک و چهار بود. در محیط‌های شش و پنج مانند محیط‌های شاهد و فاست عناصر درشت مغذی، ریز مغذی و ویتامین‌های مورد نیاز ارکیدها فالانوپسیس وجود دارند، به همین دلیل طبیعی است که رشد و توسعه ارکیدها فالانوپسیس در این محیط‌ها نسبت به بقیه بهتر باشد. به طور کلی در یک محیط کشت میزان نیتروژن و فسفر عامل اصلی تشکیل برگ و ریشه هستند. همچنین وجود ویتامین‌ها و مواد افزودنی نیز می‌توانند در بهبود تشکیل برگ و ریشه موثر باشند. وجود نیتروژن و فسفر به میزان بالا، قند میوه و ذغال در محیط‌های شش و پنج باعث شد که تعداد برگ و ریشه، طول ریشه و سطح برگ در این محیط‌ها نسبت به محیط‌های شاهد و فاست بیشتر باشد. بالا بودن تعداد برگ و ریشه، سطح برگ و طول ریشه در محیط‌های شش و پنج به دلیل افزایش فتوسنتز و جذب آب و مواد غذایی بیشتر، باعث شده است که میزان وزن تر، خشک و حجم برگ و ریشه نیز در این محیط‌ها نسبت به محیط‌های شاهد و فاست بیشتر باشد. همچنین دلیل میزان بالای این صفات در تیمار شش نسبت به پنج می‌تواند به این دلیل باشد که تیمار شش حاوی هر دو قند ساکارز و فروکتوز است و احتمالاً محتوای کربوهیدرات بالاتر سبب افزایش انرژی و صفات رشدی گیاه نسبت به تیمار پنج شده است. در تیمارهای یک، دو و چهار، به دلیل وجود تنش ناشی از کمبود مواد غذایی میزان این صفات نسبت به دیگر تیمارها کمتر بوده است. تیمار سه نیز اگر چه مانند تیمارهای یک، دو و چهار فاقد عناصر ریز مغذی و ویتامین است ولی وجود نیتروژن و فسفر به مقدار کافی و نیز وجود پودر موز و ذغال سبب شده تا از نظر این صفات نسبت به تیمارهای تحت تنش، عملکرد بهتری داشته باشد. نتایج به دست آمده با یافته‌های پژوهش‌های استفاده از محیط‌های کم هزینه برای پروتوکورم‌زایی ارکیدها الوفیا، سیمبیدیوم^۱ و کاتلیا^۲ مطابقت دارد (۱، ۴ و ۷).

تعداد، طول، وزن تر و خشک و حجم گیاهچه نیز ابتدا در تیمار شش سپس به ترتیب در تیمارهای پنج، سه، فاست و شاهد از بقیه تیمارها بیشتر و در تیمارهای یک، دو و چهار نسبت به دیگر تیمارها کمتر بوده است (جدول ۲ و شکل ۱). بالا بودن تعداد گیاهچه در محیط‌های شش، پنج، سه و همچنین شاهد و فاست حاوی پودر موز و پپتون، به دلیل فراهم بودن شرایط مناسب‌تر برای تبدیل تعداد بیشتری از

¹ Cymbidium aloifolium

² Cattleya amethystoglossa x nobilior





پروتوکورمها و با سرعت بیشتر، به گیاهچه است. زیرا گزارشات نشان می‌دهند که افزودن مواد طبیعی مانند پیتون، عصاره مخمر و آب میوه‌هایی مانند موز و نارگیل به محیط‌های کشت به عنوان مواد افزودنی، سبب جوانه‌زنی، تشکیل پروتوکورم و توسعه سریع گیاهچه‌ها می‌شود (۳). بالا بودن تعداد گیاهچه در محیط‌های شش و فاست نسبت به دیگر تیمارها می‌تواند به دلیل وجود قند فروکتوز به همراه قند ساکارز (محرک پروتوکورم‌زایی) باشد. همچنین گیاهچه‌های ارکیده فالانوپسیس متشکل از برگ و ریشه هستند که افزایش طول ریشه و برگ به ترتیب در تیمارهای شش، پنج، سه، شاهد و فاست باعث شده است که صفت ارتفاع گیاهچه نیز در این تیمارها بیشتر گردد. همچنین بالا بودن ارتفاع ریشه در این تیمارها، سبب جذب مواد غذایی و آب بیشتر از محیط کشت و در نهایت افزایش وزن تر، خشک و حجم گیاهچه‌ها شده است. میزان این صفات در تیمارهای یک، دو و سپس چهار به دلیل بالا بودن تنش ناشی از کمبود مواد غذایی، پایین بوده است. نتایج به دست آمده مطابق نتایج آزمایش استفاده از محیط‌های کم هزینه جهت پروتوکورم‌زایی ارکیده گاستروچیلوس^۱ است (۵) ولی با نتیجه آزمایش ریزازدیادی ارکیده‌های برزیلی با استفاده از محیط کشت‌های تجاری و کم هزینه همخوانی ندارد (۲).

جدول ۲. مقایسه میانگین صفات مورفولوژی گیاهچه‌های فالانوپسیس رشد یافته در محیط کشت‌های جامد

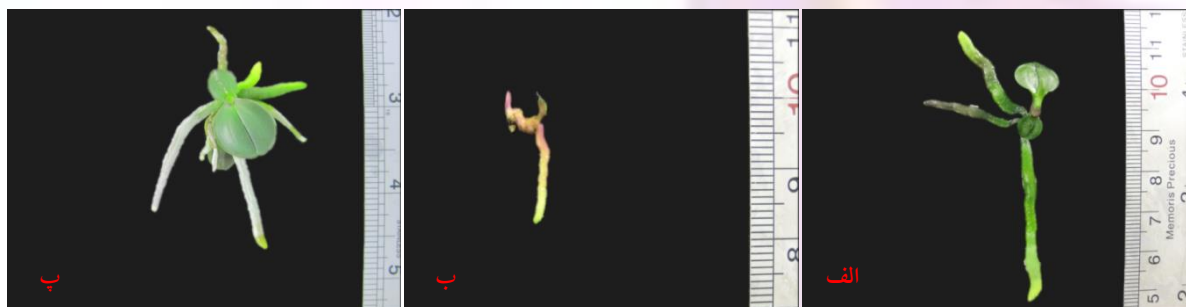
مختلف

صفات	۱/۲ ام‌اس	فاست	یک	دو	سه	چهار	پنج	شش
وزن تر برگ (گرم)	۰/۳۶۶ ^{dc}	۱/۶۴ ^b	۰/۰۷ ^d	۰/۰۶ ^d	۰/۵۹۳ ^c	۰/۰۹ ^d	۱/۴۳۳ ^b	۳/۹ ^a
وزن خشک برگ (گرم)	۰/۰۲۵ ^{dc}	۰/۰۵۶ ^{ab}	۰/۰۰۸ ^{cd}	۰/۰۰۵ ^{cd}	۰/۰۳۰ ^{cd}	۰/۰۰۹ ^{cd}	۰/۰۷۳ ^b	۰/۱۹۲ ^a
وزن تر ریشه (گرم)	۱/۰۵ ^{cd}	۲/۴۳ ^b	۰/۴۱۶ ^{cd}	۰/۲ ^d	۱/۷۸ ^{cb}	۱/۱۶ ^{cd}	۵/۶۷۶ ^a	۵/۴۴۳ ^a
وزن خشک ریشه (گرم)	۰/۰۸۷ ^{dc}	۰/۱۲۹ ^c	۰/۰۶۳ ^{de}	۰/۰۱۶ ^{ce}	۰/۱۰۹ ^{dc}	۰/۰۶۲ ^{de}	۰/۴۹۵ ^a	۰/۳۴۵ ^b
وزن تر گیاهچه (گرم)	۱/۵۶۳ ^{de}	۴/۰۷۳ ^c	۰/۸۶۳ ^{ce}	۰/۴۵ ^e	۲/۷ ^{dc}	۱/۳۸۳ ^{de}	۸/۱۶۳ ^b	۹/۷۶۳ ^a
وزن خشک گیاهچه (گرم)	۰/۰۷۵ ^{cd}	۰/۱۷۵ ^b	۰/۰۴۸ ^{cd}	۰/۰۲۱ ^d	۰/۱۳۱ ^{cb}	۰/۰۸۳ ^{cbd}	۰/۵۰۳ ^a	۰/۵۲۰ ^a
تعداد برگ	۱۲/۶۶ ^d	۳ ^b	۶ ^e	۶ ^e	۲۰/۶۶ ^c	۷/۶۶ ^e	۳ ^b	۱۰۶ ^a
تعداد ریشه	۹ ^{ed}	۲۸/۶۶ ^c	۵ ^e	۶ ^e	۱۴/۳۳ ^d	۶/۳۳ ^e	۴ ^b	۵۵ ^a
تعداد گیاهچه	۴/۳۳ ^c	۲۳ ^a	۴ ^c	۵ ^c	۶ ^c	۴ ^c	۱۵ ^b	۲۲ ^a
سطح برگ (سانتی متر مربع)	۵/۸۰ ^c	۲/۲۳ ^d	۱/۰۴ ^d	۰/۴۱ ^d	۵/۵۴ ^c	۰/۹۱ ^d	۲۵/۲۰ ^b	۹۳/۵۳ ^a
طول ریشه (سانتی متر)	۱۸/۲۳ ^{cb}	۲۰/۸۶ ^{cb}	۹/۵۳ ^{cb}	۶/۷۶ ^c	۳۰/۰۶ ^b	۱۷ ^{cb}	۹۸/۱۶ ^a	۱۱۶/۵ ^a
طول گیاهچه	۱۷/۰۳ ^c	۱۶/۴۶ ^c	۱۱/۱۳ ^c	۷/۸۶ ^c	۱۹/۱۳ ^c	۱۴/۶۶ ^c	۴۳/۹۳ ^b	۶۱/۹۶ ^a

¹ Gastrochilus calceolaris

۳/۲۳۳ ^a	۲/۰۳۳ ^b	۰/۱۳۳ ^{ed}	۰/۶۱۳ ^d	۰/۰۹۶ ^e	۰/۱۴۳ ^{ed}	۱/۱۷۳ ^c	۰/۴۷۶ ^{ed}	(سانتی متر)
۵/۴۶۶ ^a	۵/۳۶۶ ^a	۰/۴۳۳ ^d	۱/۶۳۶ ^{cb}	۱/۷۳ ^d	۰/۲۵۶ ^d	۲/۰۲ ^b	۰/۸۷۳ ^{cd}	حجم برگ (میلی لیتر)
۹/۰۴۳ ^a	۸/۵ ^a	۱/۲۷۶ ^d	۳ ^c	۰/۴۰۶ ^d	۰/۷۸۳ ^d	۵/۰۸۳ ^b	۱/۵۵ ^{dc}	حجم ریشه (میلی لیتر)
								حجم گیاهچه (میلی لیتر)

بر اساس نتایج به دست آمده، میزان صفات اندازه گیری شده در محیط کشت های شاهد، فاست، پنج و شش از بقیه تیمارها بیشتر و در محیط های یک و دو نسبت به دیگر تیمارها کمتر بوده است، به همین دلیل تیمارهای پنج و شش با توجه به کاهش ۲۳ درصدی هزینه های کشت، به عنوان محیط کشت های جامد کم هزینه مناسب جهت رشد ارکیده های فالانوپسیس انتخاب شدند.



شکل ۱. ریز نمونه های رشد یافته در محیط کشت های جامد (الف) نیم غلظت اماس (شاهد)، (ب) دو و (پ) شش

References

1. Berka, M.G., Venturieri, G.A., and Teixeira, T.N., (2014). Development of cattleya amethystoglossa x nobilior - orquidaceae in simplified culture media. Acta Scientiarum-Agronomy, 36(4): 425-428.
2. do Valle Rego-Oliveira, L., and de Faria, R.T., (2005). In vitro propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. Acta Scientiarum. Agronomy, 27(1): 1-4.
3. Favetta, V., Colombo, R.C., Júnior, J.F.M., and de Faria, R.T., (2017). Light sources and culture media in the in vitro growth of the Brazilian orchid *Microlaelia lundii*. Semina-Ciencias Agrarias, 38(4): 1775-1784.
4. Hossain, M.M., Sharma, M., and Pathak, P., (2009). Cost effective protocol for in vitro mass propagation of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.- a medicinally important orchid. Engineering in Life Sciences, 9(6): 444-453.
5. Pathak, P., Piri, H., Vij, S., Mahant, K., and Chauhan, S., (2011). In vitro propagation and mass scale multiplication of a critically endangered epiphytic orchid, *Gastrochilus calceolaris* (Buch.-Ham ex JE Sm.) D. Don. using immature seeds. Indian Journal of Experimental Biology, 49(9): 711-716.
6. Pereira, N.S., Ferreira, B.R.R., de Carvalho, E.M., and Damiani, C.R., (2018). Application of *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) as supplement and/or an alternative medium for the in vitro cultivation of *Schomburgkia crispa* (Orchidaceae). Journal of Applied Phycology, 30(4): 2347-2358.

- ۱۴۲



Effects of low cost culture media on some morphological traits of *Phalaenopsis* orchid

Aylar Mohammadpour Barough^{1*}, Shirin Dianati Daylami¹, Ali Fadavi², Sasan Aliniaiefard¹

¹Department of Horticulture, Aburaihan Campus University of Tehran, Pakdasht, Iran

²Department of Food Science Technology, Aburaihan Campus University of Tehran,
Pakdasht, Iran

Email: mohammadpor.aylar@ut.ac.ir

Abstract

Phalaenopsis orchids are one of the most popular plants in the world, but their high prices due to production costs have reduced the cost-effective and inexpensive commercial production of these plants in many countries, especially Iran. Therefore, in this study is aimed to by introducing simplified and low-cost culture media, it is possible to introduce effective strategies for commercial production in mass production of orchid plants. In this study, 5 mm orchid protocorms were cultured as explants in eight treatments culture media of Murashige and Skoog semi-concentrated (control), FAST and simplified culture media (treatments one to six), in three replications and some growth traits of plantlet were recorded three months after cultivation. The results showed that the amount of measured traits in five and six culture media were more than other treatments and less in treatment two. Due to the better traits in five and six culture media, the use of these treatments as a suitable low-cost solid culture medium is recommended for phalaenopsis orchids growth.

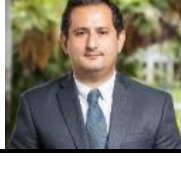
Keywords: Mass production, Protocorm, Simplified culture media

Second section

بخش دوم

Key Lectures

144

	Professor Rusea Go Department of Botany, Universiti Putra Malaysia Title: Orchid Diversity, Conservation Strategies and Initiatives in Malaysia
	Dr. Paromik Bhattacharyya School of Life Sciences, University of, KwaZulu-Natal, Durban, South Africa Title: Biotechnological interventions in the sustainable utilization of orchid bioresources
	Dr. Shirin Dianati Assistant Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, University of Tehran, Iran Title: Development of Scientific and applied findings on Iranian orchids
	Dr. Yavar Vafae Assistant Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, University of Kurdistan, Iran Title: Iranian terrestrial orchids: An update to current achievements
	Dr. Svante Malmgren Orchid propagation Expert, Kvänum, Sweden Title: Asymbiotic seed germination of terrestrial orchids
	Professor Philipp M. Schlüter Department of Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, University of Hohenheim, Germany Title: Pollination, genes and speciation
	Dr. Abdolbaset Ghorbani Department of Organismal Biology, Uppsala University, Sweden Title: Salep orchids trade and conservation
	Dr. Nora Eugenia DG Anghelescu Department of Plant Sciences, University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine of Bucharest, Romania Title: Orchids of Romania taxonomy, morphology, pollination strategies, habitats and conservation
	Dr. Amir Ali Khoddamzadeh Agroecology Program, Department of Earth and Environment & Institute of Environment, Florida International University, USA Title: Conservation Horticulture: Short and Long Term Preservation Techniques in Floridian Endangered Orchids



Development of Scientific & applied findings about Iranian orchids

Shirin Dianati Daylami

*Assistant professor of the Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of
Tehran, Pakdasht, Iran*

Email: y.vafaei@uok.ac.ir

145

Abstract

Orchids that grow in Iran belong to the group which is known as terrestrial- temperate orchids with hard-working seeds. In 2009, we defined research projects on Iranian orchids that are still continuing. The results of morphological study of collected plants showed that they can be divided into two groups in terms of future aspect in horticulture (inorder new ornamental cultivars or producing tubers for food industry). In mass propagation programs we found protocol for mass seed asymbiotic culture and direct somatic embryogenesis that help to cultivation of native orchid in both group. The results of tuber production project on *in vitro* plants were a significant advance in the production of the second group of plants and it is a big step to cultivate them and achieve industrial production. Artificial seed production is an alternative technique for asexual propagation and conservation of plants with hard natural seed propagation such as orchids. This technique is rapidly growing in germplasm conservation and plant gene pool exchanges between countries and *in vitro* floriculture trades. It is a great fortune that we can now produce artificial seeds for native orchids using somatic protochromes. One of the most interesting and valuable studies in plants with a long juvenile phase, such as orchids, is shortening growth cycle which is important for both breeding purposes and commercial cultivation and production. Achieving a protocol for shortening the length of juvenile phase in native orchids and finding some genes which involved in flowering of them, has been a good tool for us to continue our work in both aspects of breeding, biotechnology and production programs.

Keywords: Artificial seed, Direct somatic embryogenesis, Juvenile phase, Terrestrial-temperate Orchids, Tuber production

1. Introduction

The orchid family (Orchidacea) is one of the largest and most diverse plant families among monocots, which has a Holarctic distribution with about 800 genera and more than 25,000 species (about 10% of the Monocotyledons) (Jezek, 2006). In general, different types of orchids have categorized in three groups based on their Growth habits on trees, land or rocks including Epiphyte, Terrestrial and Lithophyte orchids (Rittershausen and Rittershausen, 2001). Orchids that grow in Iran belong to the second group and are known as Temperate-terrestrial orchids wich have hardworking seeds. In 2009, we defined a research project to work on Iranian orchids. Based on library and herbarium studies, we made a list of them with 64 species, based on habitat and their characteristics and were able to found out that 16 genera of them from 18 provinces have been reported in Iran (Dianati et al. 2014). Then we travelled to provinces with richer flora and were able to collect 130 accessions from 17 beautiful species of 10 different genera of native orchids. The results of morphological study of collected plants showed that they can be divided into two groups in terms of future aspect in horticultural industry. The first group was more suitable for domestication, breeding and introduction of new ornamental cultivars like *Epipactis veratrifolia*, *Platanthera bifolia*, *Cephalanthera* sp., etc and the second especially was more suitable in order to produce tubers

that named Salep like *Dactylorhiza umbrosa*, *Orchis* sp., etc. Projects have been done on these plants in our lab¹ that at the following the most important of which will be mentioned in summarized.

2. Mass propagation programs

2.1. Seed culture

This project began with a review of scientific sources related to the germination of orchid seeds, 8 suitable media for a symbiotic *in vitro* culturing of orchid seeds were selected based on the review and the germination of collected seed investigated on them. Medium with the highest seed germination percentage was selected and for optimizing of it, the effect of 36 kinds and compounds of sugars as well as 6 different concentrations of organic nitrogen on the seed germination percentage and growth of protocorms was investigated in it. Finally, the modified culture medium based on FAST or MS was optimized for each species (Dianati *et al.* 2014, 2017). The effect of change in *in vitro* culture atmosphere was also investigated on seedling growth by adding and removing CO₂ (Soltani *et al.* 2020). At the end of project, the best protocol was presented for the most suitable *in vitro* seed culture and plant growth conditions. Then Seedlings Acclimatization was done and the plants were transferred to *ex vitro* conditions (Fig 1).

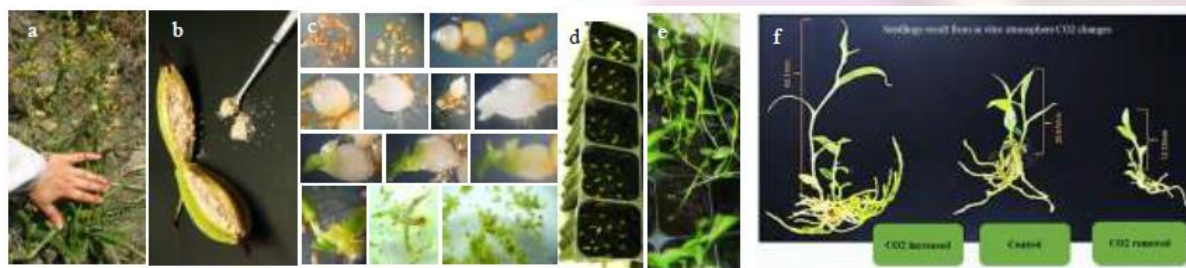


Fig 1. a) *Epipactis veratrifolia* plant in its natural habitat. b) Seed collection .c) Seed cultivation and its germination stages until full seedling production. d) Acclimatization and e) transfer of seedlings to *ex vitro* conditions. f) Improve *in vitro* growth by changing the atmosphere and adding various additives.

2.2. Somatic embryogenesis

There are several methods for mass propagation of orchids; among them, direct somatic embryogenesis may be one of the best options as protocorm-like bodies (PLBs) respond as somatic embryos in orchids. Therefore, developing an efficient protocol for direct somatic embryogenesis is highly important in clone production. In this project, effects of different types of plant growth regulators (PGRs) including TDZ, BA, 2,4-D, NAA, KI, gibberellic acid (GA3), cooling and ABA as pretreatment and Paclobutrazol (PBZ) as well as different types of explants, light and dark conditions and the effects of different light spectra were investigated on somatic embryogenesis induction in some of native orchids (Moradi *et al.* 2014, 2015, 2017, Naderi *et al.* 2019, 2021). The results showed positive effects of paclobutrazol, abscisic acid and in some cases cold as pretreatment and a combination of blue, red and far red spectra on increasing the percentage of direct somatic embryogenesis (PLB numbers) of explants (fig 2).

¹ Breeding and Propagation of Salep (Orchid) Lab. Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran, Iran

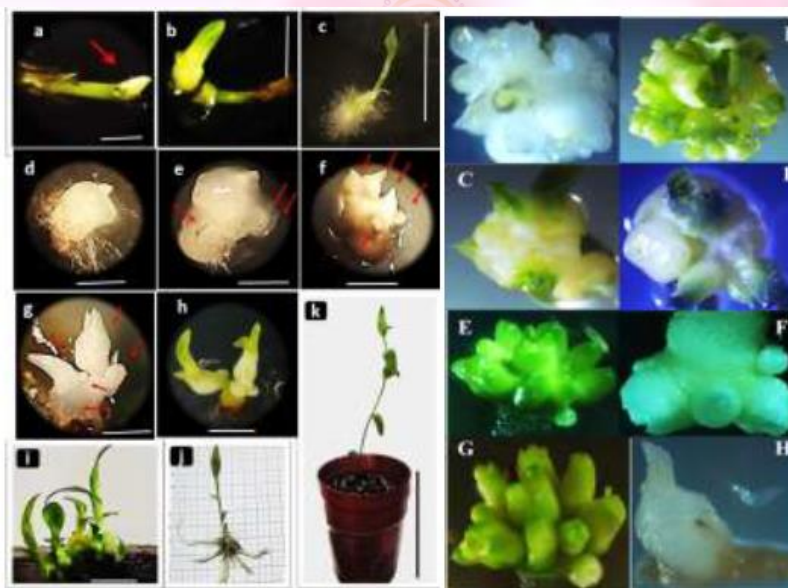


Fig 2. Embryogenesis in *Epipactis veratrifolia* a) early embryo formed on stem explant (after 2 weeks), (b) mature embryos on stem explant (4 weeks-old), (c) first leaf formation, (d) protocorm explant first day, (e) proembryos (red arrows) formed on protocorm explant (after 3 weeks), (f) multiple early embryos (red arrows) on protocorm explant (4 weeks-old), (g) mature embryos (red arrows) consisting of a shoot apical meristem (5 weeks-old), (h) first leaf formation (7 weeks-old). A) Embryo formed in red + Fred light B) Embryo in red spectrum C) Embryo in blue spectrum D) Embryo in green spectrum, H) Embryo formed in BA+ NAA, Embryogenesis in *Dactylorhiza umbrosa* E) Embryos formed in the dark F) Embryos formed in the white spectrum, G) 2 mg l⁻¹ KI and lighting conditions with an average of 26.66 embryos.

3. Tuberization programs

Some of terrestrial orchids produce tuber named salep and used as a source of medicine or in food industry as stabilizing agent. Therefore, the production of tuberous *in vitro* plants was important for us (Fig 3). Based on the results of the experiments, it was found that the use of other materials with or instead of agar, the addition of CO₂ to the atmosphere in culture dishes, the type and concentration of sugars and osmotic agents, as well as light spectra and growth regulators can be effective in tuberization of *in vitro* seedlings. Good results were observed by comparing the percentage of glucomannan in the tubers of natural plants (12.5%) with those obtained from selected treatments (9.3%). It is expected that a higher percentage of this substance will be produced in osmotic treatments applied to seedlings.

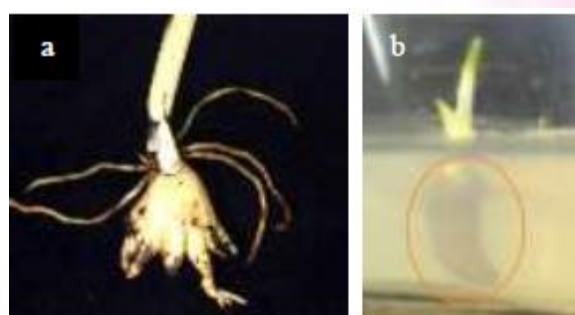


Fig 3. a) Natural tuber of *Dactylorhiza umbrosa*, b) *in vitro* seedling with tuber.

4. Synthetic seeds production

Artificial seed production is an alternative technique for asexual propagation and conservation of plants with hard natural seed propagation such as orchids. This technique is rapidly growing in germplasm conservation and plant gene pool exchanges between countries and *in vitro* floriculture trades. Artificial seed is the beads formed by encapsulating somatic

embryo with coating materials (Mahdavi *et al.* 2020). The production of artificial seeds was first done manually in our laboratory and then a semi-mechanized system was designed and built for it. Quality, durability and survival of artificial seed are very important and depend on the kinds of explant, concentration of encapsulation materials and other conditions. For first time Mahdavi *et al.* (2018) investigated the interaction of sodium alginate and calcium chloride concentration, time and temperature of storage on germination percentage of encapsulated protocorm (as embryo) of two native orchids.



Fig 4. a) Artificial seed of *Epipactis veratrifolia*, b) *in vitro* seed culture and seed germination, c) seedling growth.

5. Reduction of juvenile phase

Orchids need several years of vegetative growth before flowering. They have a long juvenile phase from 2 years to 10 years and some up to 13 years (Duan and yazawa 1994, Kostenyetal 1999), thus finding optimum method for reduction of this phase and induction of early flowering are important for breeding purpose and flowering plants production. kinds of media and medium content modification, plant growth regulator like BA, PBZ, GA and root pruning, could affected *in vitro* flowering of orchid. The transition from vegetative to reproductive growth is a key developmental step that is under tight genetic control. SOC1 expressed with activation of flowering genetic pathways, and in turn mediate other regulators, such as the floral meristem identity gene LFY, that activated floral identity genes and determine the formation of floral meristems. We found a protocol for decreasing the juvenile phase (at least 3 years) that induced DOSOC and Orch/LFY gene expression in *Epipactis veratrifolia* and induced obvious flower stuck on *Dactylorhiza umbrosa* (Dianati et al. 2014).

6. Conclusion

Different species of terrestrial- temperate orchids grow in different parts of Iran and each of them has a special genetic potential based on the climatic and Environment conditions of its growing place. Preserving the genetic resources of these plants by using new techniques of propagation and production and using their potential in breeding projects will help to preserve these natural and national resources as well as create a new business market. All the projects that have been done or are being done in the comprehensive plan for propagation and breeding of orchids were all in line with achieving these aims.

References

Dianati Daylami, Sh., Kafi, M., Salami, S.A., Mozaffarian, V.A. (2014). Study of seed germination, floral transition and expression of some related gene in some Iranian Orchids. Thesis for the Doctor of philosophy in Horticulture Sciences, Department of Horticulture Sciences and landscape, University of Tehran.



- Dianati Daylami, Sh., Kafi, M., Salami, S.A. (2017).** Improvement of asymbiotic germination of *Epipactis veratrifolia*, Iranian Journal of Horticultural Science Vol 48, No 1, (73-83).
- Duan, J. X., Yazawa, S. (1994).** In vitro floral development in $\times$ Doruekka tiny (*Doritis pulcherrima* $\times$ *Kingiella philippinensis*). *Scientia Horticulturae*, 59:253-264.
- Jezek, Z. (2006).** The complete Encyclopedia of ORCHIDS, Rebo international b. v., Lisse.
- Kostenyuk I., Oh, B.J., So, I.S. (1999).** Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* Mak in vitro. *Plant Cell Reports*. 19 : 1-5.
- Mahdavi, Z., Dianati Daylami, Sh., Aliniaefard, S. (2020).** Protocorms encapsulation of *Phalaenopsis* hybrids (*Orchidaceae*) in order to schedule *in vitro* plantlet production, *ISHS Acta Horticulturae*.
- Mahdavi, Z., Dianati Daylami, Sh., Aliniaefard, S., Fadavi, A. (2020).** Effect of Temperature and Storage Duration on Germination Process of Encapsulated Protocorms of *Dactylorhiza umbrosa*, *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology* 21 (3) :299-308
- Moradi, Sh., Dianati Daylami, Sh., Arab, M., Vahdati, K. (2016).** Direct somatic embryogenesis in *Epipactis veratrifolia*, a temperate terrestrial orchid, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2016, 92:1, Pages88-97.
- Moradi, Sh., Dianati Daylami, Sh., Arab, M., Vahdati, K. (2016).** Direct somatic embryogenesis in *Epipactis veratrifolia*, a temperate terrestrial orchid, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92:1, Pages88-97.
- Moradi, Sh., Dianati Daylami, Sh., Vahdati, K., Arab, M. (2015).** Direct Somatic Embryogenesis of Two Iranian Native Orchid Species Using Protocorm Explants *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, Volume 16, Issue 1, Pages 137-148
- Moradi, Sh., Dianati Daylami, Sh., Vahdati K., Arab M. (2015).** Effect of medium, explants and BA on somatic embryogenesis induction in tow Iranian native orchids, *Journal of Plant Production Research*, Volume 22, Issue 4, Pages 119-132.
- Naderi Boldaji, H., Dianati Daylami, Sh., Norouzi, M., Aliniaefard, S., Fadavi, A. (2019).** Effects of light spectra and growth regulators on induction of somatic embryogenesis in temperate and tropical orchids, M.S thesis in *Horticultural Science*.
- Naderi Boldaji, H., Dianati Daylami, Sh., Aliniaefard, S., Norouzi, M. (2021).** Efficient Method for Direct Embryogenesis in *Phalaenopsis* Orchid, *International Journal of Horticultural Science and Technology*, Volume 8, Issue 1, Pages 37-50.
- Rittershausen, B., Rittershausen, W. (2001).** ORCHIDS a practical hand book, a beautiful guide to growing orchids. Published by Hermes House.
- Rostami Balan, S., Dianati Daulami, Sh., Karimi, S., Vahdati, K. (2020).** Evaluating in vitro tuberization of terrestrial orchid *Dactylorhiza umbrosa* in response to medium type and osmotic stress, M.S thesis in *Horticultural Science*.
- Soltani, Z., Dianati Daylami, Sh., Aliniaefard, S., Rostami, S. (2020).** Effects of different concentrations of CO₂ in the atmosphere of in vitro culture vessels on growth characteristics and photosynthetic capacity of *Epipactis veratrifolia* *Iranian Journal of Horticultural Science* Vol 51, No 1, (45-54).
- Soltani, Z., Dianati Daylami, Sh., Aliniaefard, S. (2018).** Improvement of *in vitro* tuberization in *Dactylorhiza umbrosa*, hesis for the Doctor of philosophy in *Horticulture Sciences*, Department of Horticulture Sciences and landscape, University of Tehran.



Iranian terrestrial orchids: An update to current achievements

Yavar Vafaee*, Mozghan Fatahi, Soheila Gholami, Aboubakr Kaki, Shoja Sadeghian,
Kolsom Ahmadzade, Mitra Molaei

Department of Horticultural Sciences and Engineering, Faculty of agriculture, University of
Kurdistan, Sanandaj, Iran

Email: y.vafaee@uok.ac.ir

150

Abstract

Salep is a powder produced from dried tubers of terrestrial orchids which is used to prepare traditional ice creams and beverages. There are 46 Iranian terrestrial orchid species in Iran which 36 species produce underground fleshy tubers. In this regard, west of Iran is a hotspot for most endangered and threatened species. Recently researches have been conducted to study different biological, molecular and conservational aspect of Iranian Terrestrial orchids. In this paper, we aimed to review current research progress on Iranian terrestrial orchid species. Metabarcoding has been successfully used to understand the species diversity and provenance of salep orchid tubers. Morphological traits at whole plant scale combined with seed-micromorphology characters could discriminate and clarify the relationships among the Iranian species and their geographically different populations. The inter- and intra-population variation of most endangered Iranian orchid species were successfully discriminated using of ISSR, IRAP and SCoT molecular markers. Ongoing phytochemical studies represent the presence of high value constituents in hydroalcoholic extract of leaf and tubers. On the other hand, efforts to conserve threatened species led to optimization of asymbiotic seed germination and in vitro multiplication of seven most important Iranian orchid species. More comprehensive and applied researches are needed to study different biological and ecological aspect of Iranian orchid species to define conservational strategies.

Keywords: Conservation, Genetic Diversity, Iranian Orchids, Orchis, Salep

1. Introduction

Terrestrial species of orchids suffer from a high extent of global population fragmentation and depletion due to climate change and human impacts. All the Iranian orchid species are grouped under CITES (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) appendix and overexploitation of some important species has led to the depletion of their wild populations (Ghorbani et al. 2014a; Ghorbani et al. 2014b). Among them, 19 species and subspecies are indiscriminately exploited, leading to defragmentation and threatening several species. As forgotten plant species, limited studies has performed on these threatened species, however, currently several research groups started some preliminary researches on different biological, ecological and molecular aspect of Iranian orchids' life. In this paper, we aimed to review current research progress on Iranian terrestrial orchid species. In Fig 1 flower and inflorescence morphology of some main Iranian Orchid species has been shown.

2. Phenotypic and seed morphometry diversity

Phenotypic and seed-micromorphology variability of 106 accessions from *Dactylorhiza umbrosa*, *Himantoglossum affine*, *Orchis mascula*, *Orchis simia*, *Anacamptis coriophora*, *Ophrys schulzei*, *Ophrys straussii*, and *Orchis collina* species revealed that morphological traits at whole plant scale combined with seed-micromorphology characters not only could discriminate and clarify the relationships among the species and their populations collected from geographically different locations but also they could identify the diversity among the accessions within each population and species (Vafaee et al. 2021). They found a species-specific pattern of seed micromorphology for



Iranian species (Fig 1). Ebrahimi et al. (2020) analyzed the morphological variability of 101 collected samples of early purple orchids (*Orchis mascula*) from Northeast Iran based on a total of 57 morphological traits.

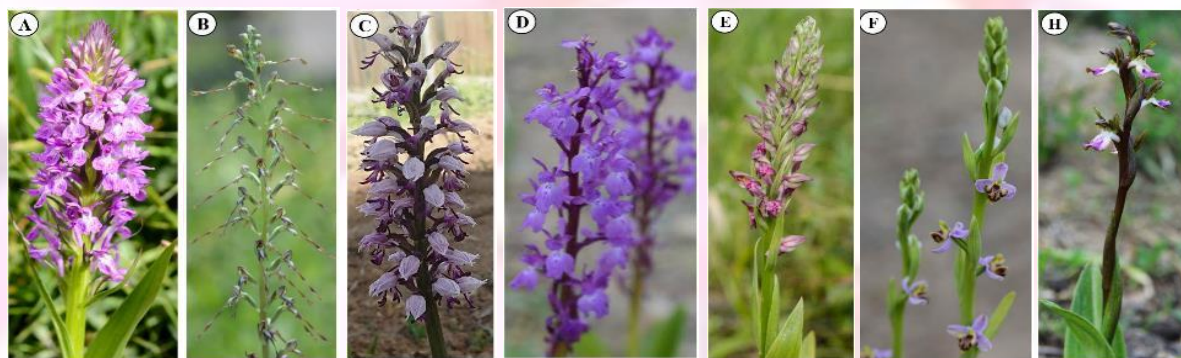


Fig 1. Flower and inflorescence morphology of Iranian orchid species. a *Dactylorhiza umbrosa*, b *Himantoglossum affine*, c *Orchis simia*, d *Orchis mascula*, e *Anacamptis coriophora*, f *Ophrys schulzei*, g *Orchis collina*.

3. Genetic variation and DNA barcoding

Little information is available on the genetic diversity of Iranian terrestrial orchid species, and there are only few studies available on these threatened species. Ghorbani et al. (2017) determined the phylogeny of the Iranian orchids based on DNA-metabarcoding analyses at the genus and species levels. They showed that all Iranian tuberous orchid species are threatened by overharvesting which highlight the need to control illegal collection and crossborder trade of orchid dried tubers. Kaki et al. (2020) investigated intra- and inter-population genetic variation and genetic distance among five medicinal orchid species using the IRAP marker. ISSR and SCoT marker was also successfully applied to elucidate the genetic variation among individuals and inter- and intra-population diversity in a collection of Iranian terrestrial orchids.

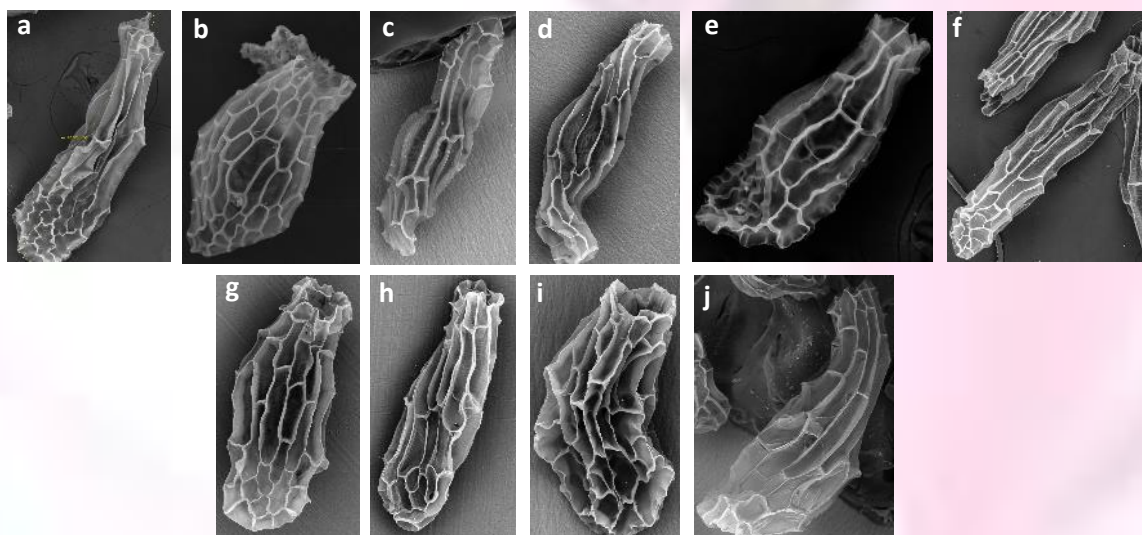


Fig 1. SEM seed morphology of some Iranian orchid species. a *Dactylorhiza umbrosa*, b *Himantoglossum affine*, c *Orchis mascula*, d *Orchis simia*, e *Anacamptis coriophora*, f *Ophrys schulzei*, g *Ophrys straussii*, h *Orchis collina*, i *Orchis anatolica*, j *Comperia comperiana*

4. Phytochemistry

There is no report on phytochemical analysis of Iranian orchid species. In an unpublished research we analyzed the total phenol, total flavonoid, antioxidant activity, glucomannan content and



phytochemicals present in hydroalcoholic extract (methanol and ethanol) of leaf and tuber in four Iranian orchid species (*O. mascula*, *D. umbrosa*, *A. coriophora* and *H. affine*) using GC-MS (Table 1). Methanolic extract of *O. mascula* had the highest phenol and flavonoid content and in turn highest antioxidant activity. These attributes were also higher in extract obtained from tuber compared to leaf. Regarding the amount of glucomannan, *O. mascula*, *H. affine*, *A. coriophora* and *D. umbrosa* had the highest amount of glucomannan, respectively. The results of GC-MS analysis showed that different phytochemical compounds were identified in these four species. In this connection, the phytochemicals found in methanolic extract of *D. umbrosa* leaf are shown in table 1. On the other hand, the type of organ (leaves and tubers) and the type of solvent (methanol and ethanol) had a great effect on the nature and percentage of phytochemical compounds. The most prevalence constituent identified in these plants were 1,2,3-Propanetriol, monoacetate, a glycerol-derived acetic acid ester that are widely used as a food flavoring, solvent and food additive.

Table 1. The phytochemical compounds identified in methanolic extract of leaf in *D. umbrosa*.

Constituent	Formula	Retention index	Content (%)	MW
1,2,3-Propanetriol, monoacetate	C ₅ H ₁₀ O ₄	18.072	74.669	134
3,5-Heptadienal, 2-ethylidene-6-methyl-	C ₁₀ H ₁₄ O	18.848	5.192	150
D-Melezitose	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	21.458	3.969	504
Ribitol	C ₅ H ₁₂ O ₅	19.417	3.017	152
Decanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester	C ₁₁ H ₂₂ O ₃	14.619	2.764	202
d-Mannose	C ₆ H ₁₂ O ₆	20.882	1.522	183
2-Propanone, 1,1-diethoxy-	C ₇ H ₁₄ O ₃	14.758	1.432	146
Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	C ₁₄ H ₂₂ O	24.294	1.381	206
L-Lyxose	C ₅ H ₁₀ O ₅	10.097	1.005	150
(Hydroxymethyl)ethylene acetate	C ₇ H ₁₂ O ₅	19.889	0.971	176
1,2,3,4,5-Cyclopentanepentol	C ₅ H ₁₀ O ₅	10.189	0.651	150
d-Glycero-d-ido-heptose	C ₇ H ₁₄ O ₇	23.507	0.613	210
beta.-D-Glucopyranose, 4-O-.beta.-D-galactopyranosyl	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	24.554	0.563	342
1-Deoxy-d-mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₅	14.337	0.539	166
Methyl 3-hydroxytetradecanoate	C ₁₅ H ₃₀ O ₃	14.935	0.250	258
Desulphosinigrin	C ₁₀ H ₁₇ NO ₆ S	29.048	0.186	279
Total			98.72	

5. Histology

As a part of comprehensive research studies on terrestrial Iranian orchid species, we analyzed anatomy of tuber, leaf, stem and root tissues of both natural and *in-vitro* raised plants using light microscopy. There was a substantial anatomical difference between the studies species. Some species like *H. affine* not only had higher intensity of rhizoids but also, they represented a higher number of amyloplasts containing glucomannan in tuber tissue. All studied species shown the typical tissue pattern of monocotyledon species. In Fig 2, the anatomy of selected tissue of some Iranian orchid species has been shown for stem, leaf, tuber and root. Work on histology and anatomy of terrestrial orchids can be informative in the identification of barriers of symbiotic and asymbiotic seed germination and plantlet growth.

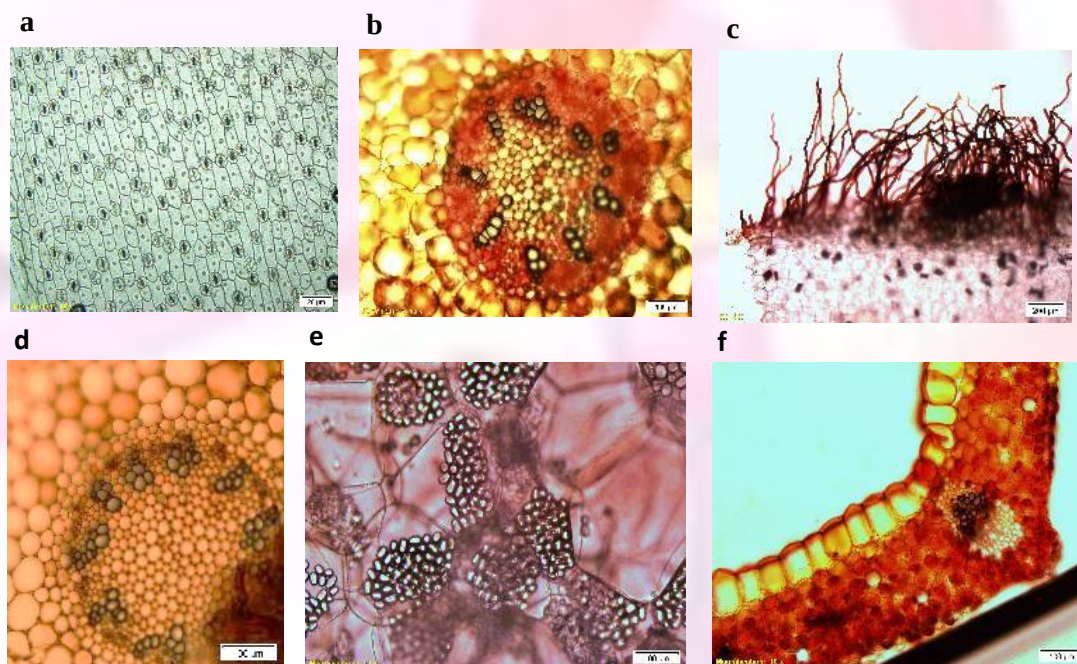


Fig 2. The anatomy of selected tissue in some Iranian terrestrial orchid species SEM seed morphology of some Iranian orchid species. **a** Epiderma and stomata in *O. schulzei*, **b** Histology of root tissue in *D. umbrosa*, **c** rhizoid generated on in-vitro raised protocorms in *H. affine*, **d** stem anatomy in *Orchis mascula*, **e** Histology of tuber in *A. coriophora* showing amyloplast granules containing glucomannan, **f** Leaf anatomy in *D. umbrosa*.

6. Seed germination

As most of terrestrial orchid species grown in Iran are at risk of extinction, optimization of *in vitro* and *in situ* conservation programs is vital to reintroduce new plants to nature and save their populations. The team of Dr. Dianati at university of Tehran could successfully optimize the *in vitro* seed germination and embryogenesis in *D. umbrosa* and *Epipactis veratrifolia* species (Moradi et al. 2016a; Moradi et al. 2016b). At the University of Kurdistan, we have optimized *in vitro* asymbiotic seed germination of eight orchid species including *D. umbrosa*, *A. coriophora*, *O. simia*, *H. affine*, *O. mascula*, *O. collina*, *O. straussii* and *O. schulzei* where the first tree species was successfully grown into ready to sown plantlets (Fig 3). For this purpose, we examined different media including, Orchimax, MS, P723, Knodson and Malmgren where Malmgren had the best result as it contains organic source of nitrogen. In contrast, medium like MS are toxic for orchid seed due to their high content of NH_4 and NO_3 . On the other hand, we could obtain secondary protocorm formation in *H. affine* and *O. coriophora*. In fig 3 we had shown some of our results on seed viability, seed germination, protocorm development and plantlet growth in some Iranian orchid species.

7. Conclusion

The Iranian terrestrial orchids are at the front-line of extinction, with a higher number of endangered species in comparison to other plant families and therefore the knowledge on their morphology, ecology, molecular biology and especially *in vitro* response could be useful to plan conservational strategies. More researches are needed to discover these important aspects of orchid biology. On the other hand, Targeted establishment of Orchid Conservation Areas can mitigate the effects of illegal collection on orchid populations in hot-spot collection areas, but also attract tourism and associated benefits.

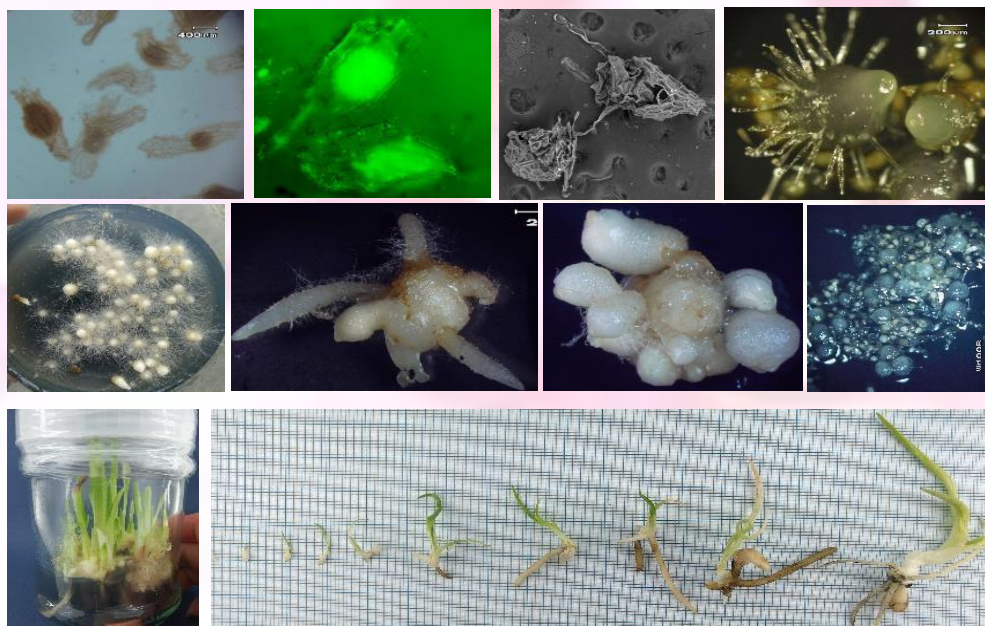


Fig 3. In vitro asymbiotic seed germination, regeneration and plant growth in Iranian Orchid species. a Thidiazuron seed viability test in *D. umbrosa*, b FDA seed viability test in *H. affine*, c SEM of seed testa rupturing and protocorm development in *H. affine*, d Asymbiotic seed germination and rhizoid formation in *H. affine*, e Protocorm development and rhizoid formation in *O. simia*, f Shoot and root direct regeneration from protocorm explant in *H. affine*, g Secondary protocorm formation in *H. affine*, h High scale seed germination in *O. schulzei*, i plantlet growth under in vitro condition ready to acclimatization, j Seed germination, protocorm development and plantlet growth stages in *A. coriophora*.

References

- Ebrahimi, A., Asadi, A., Monfared, S.R., Sahebi, M., Rezaee, S., Khaledian, Y. (2020). Evaluation of phenotypic diversity of the endangered orchid (*Orchis mascula*): Emphasizing on breeding, conservation and development. *S Afr J Bot* 132:304-315.
- Ghorbani, A., Gravendeel, B., Naghibi, F., de Boer, H. (2014a). Wild orchid tuber collection in Iran: a wake-up call for conservation. *Biodivers Conserv* 23 (11):2749-2760
- Ghorbani, A., Gravendeel, B., Selliah, S., Zarre, S., de Boer, H. (2017). DNA barcoding of tuberous Orchidoideae: a resource for identification of orchids used in Salep. *Mol Ecol Resour* 17 (2):342-352
- Ghorbani, A., Gravendeel, B., Zare, S., De Boer, H.J. (2014b). Illegal wild collection and international trade of CITES-listed terrestrial orchid tubers in Iran. *Traffic Bull* 26 (2):52-58
- Kaki, A., Vafae, Y., Khadivi, A. (2020). Genetic variation of *Anacamptis coriophora*, *Dactylorhiza umbrosa*, *Himantoglossum affine*, *Orchis mascula*, and *Ophrys schulzei* in the western parts of Iran. *Industrial Crops and Products* 156.
- Moradi, S., Dianati Daylami, S., Arab, M., Vahdati, K. (2016a). Direct somatic embryogenesis in *Epipactis veratrifolia*, a temperate terrestrial orchid. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 92 (1):88-97.
- Moradi, S., Dianati Daylami, S., Vahdati, K., Arab, M. (2016b). Effect of medium, explants and BA on somatic embryogenesis induction in tow Iranian native orchids. *Journal of Plant Production Research (JOPP)* 22 (4):119-132



155



Second section

بخش دوم

156

Oral Presentation

Title	Author	Page
A Review on In vitro Asymbiotic Seed Germination of the Orchid Flowers	Hossein Piri	157



A Review on In vitro Asymbiotic Seed Germination of the Orchid Flowers

Hossein Piri*

Assistant Professor, Agriculture and Environmental Department, Velayat University,
Iranshahr, Iran

Email: h.piri@velayat.ac.ir

157

Abstract

Orchids are most pampered plants for their aesthetically beautiful flowers and these constitute one of the highly evolved families of economically/medicinally plants, the Orchidaceae. The orchids are primarily sexual in nature and produce numerous, microscopic and non-endospermic seeds and germinate poorly in nature (less than 1), these lack proper metabolic machinery to directly utilize their own lipid food reserves and require a suitable mycorrhizal fungus for their germination in nature. The fungus is believed to augment the carbohydrate, auxin and vitamin transport in orchids. The asymbiotic germination of orchid seeds found in 1922 is applicable to *in vitro* propagation. The technique for germinating the orchid seeds at the base of mother plant was in vague. The germination of orchid seeds is dependent on an outside source of organic food and *in vitro* cultured plants also need exogenous supply of carbohydrate as a source of carbon as these are not fully autotrophic. Sucrose, in general, is the carbohydrate of choice as carbon source for *in vitro* plant culture, probably because it is the major transport sugar of many plants. Limited information of mineral requirement of different taxa, however makes it difficult to formulate a universal culture medium for orchids. Further, orchid propagation through conventional means has also lost its relevance because vegetative multiplication through division and back bulb culture is rather slow and yields only a meager number of plantlets even after 4-5 years.

Kywords: Asymbiotic Germination, In vitro, Orchid Flowers, Seeds

Introduction

The orchids possess exquisite flowers of myriad shapes, sizes, and colors and represent an order of royalty among the flowering plants. The numerical strength of orchids in terms of species has been variously estimated between 17000- 35000 (12). However, a more realistic estimate is made by Atwood (5) putting the number of species at 19,128 in 800 genera. The orchid family, Orchidaceae, is among the largest of families of angiosperms, containing more than 25000 described species within 859 genera and new species being discovered almost every day (9,35). Various other estimates suggest more than 28000 accepted species in 763 genera (7), 1800 species in 750 genera (15) and 18,500 species in 778 genera (25). A more recent report by Lawler and Rao (22) places the number of orchid species to be around 20,000. Thousands of them made hybrids and produced each year and their number far exceeds that of the native species.

Knudson (19,20) demonstrated the possibility of bypassing the fungal requirement of orchid seeds during germination by providing suitable nutrition *in vitro*. The ability of orchid seeds to germinate prior to reaching maturity was demonstrated by Withner (38) which led to the development of embryo/ovule/ green pod culture. The possibility of obtaining more than 4 million plantlets in a year from a single bud by repeatedly sectioning and subculturing the PLBs (26) created an intense interest among the orchid growers and has revolutionized the orchid industry. So, embryo culture helps in enlarging genetic diversity (30). Importance of factors affecting morphogenetic potential of a taxon is critical for developing an efficient propagation system. Orchid seeds have limited food storage tissue, which is needed for germination and protocorms development, making seed germination in natural conditions



relatively low (37,39). Under natural conditions, mature seeds depend on compatible mycorrhizal fungi for germination and early development (24,40). Therefore, *in vitro* orchid seed germination is a crucial aspect in propagation and conservation programs. Seeds cultured *in vitro* can develop into complete seedlings without the aid of fungi, which is a suitable approach for commercial orchid production (18,28,33,34).

Result and Discussion

Since in the early days (1900-1910), it was thought that orchids could only germinate *in vitro* in the presence of a fungus, only symbiotic germination or orchids was carried out. The resulting technique of asymbiotic seed germination has added new vistas in orchid propagation, and a large number of orchid species of both epiphytic and terrestrial have been germinated *in vitro* (4,11,14,16,17,23,27,29,31,36). If only a limited number of seeds are obtained as a result of a particular cross, then by choosing a suitable nutrient medium all of these can be germinated *in vitro*. Multiplication of orchids through *in vitro* seed germination technique have been developed for several species and are most commonly used method for multiplying different orchid species and hybrids representing diverse habits and habitats (4,32).

The research carried out by Knudson around 1922 was a shock to the orchid world, since he showed that seeds of *Cattleya*, *Laelia*, *Epidendrum*, and many other orchids were able to germinate asymbiotically *in vitro*. Despite Knudson's discovery it was soon realized that it was not often possible to make a medium on which a chosen orchid species could germinate and develop. Many nutrient media are described in the literature for many different genera and species (2,3).

Orchid seeds are the smallest of those produced by flowering plants and are therefore called "dust seeds" (6). However, despite their microscopic structure, they exhibit a wide variety in shape, size, color, weight, testa (cell number, size, ornamentation), and embryo characteristics. Seed size varied from 150 to 6,000 μm and weight ranged from 0.31 to 24 μg (13). Seed color also varies, including orange yellow in *Dendrobium formosum* and *Dendrobium densiflorum*, brownish yellow in *Dendrobium hookerianum*, yellow in *Cymbidium bicolor*, white in *Eria dalzellii*, pale yellow in *Liparis elliptica* and *Pholidota pallida*, golden yellow in *Bulbophyllum mysorense*, and light yellow in *Coelogyne breviscapa* (8,10).

Both immature and mature seeds can be germinated using tissue culture technique but germination of mature seeds is quite more difficult in comparison to immature seeds. Germination of seeds generally depends on their nutrient reserves. Several variations in reserve food composition between immature and mature seeds have been reported by researchers. In *Corallorhiza maculata* the immature seeds have starch as reserve food while mature seeds contain lipids. This was suggested that during the process of seed maturation starch and other carbohydrates of immature seeds is converted into lipids of mature seeds. The lack of metabolic machinery in mature seeds is another hindrance in germination of mature seeds. Dormancy of mature seeds and accumulation of germination inhibitors in the seed coat also restrict germination of mature seeds. The dormancy of seeds can be broken by low temperature treatment or by using sucrose. In the germination process, seeds first form protocorm and protocorm proliferates to form more protocorm or can differentiate root and shoot (21).

References

1. **Arditti, J. (1967).** Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot. Rev., 33: 1-97.





2. **Arditti, J. & Ernst, R. (1984).** Physiology of germinating orchid seeds. In: Orchid Biology: Reviews and Perspectives- Cornell University Press, Ithaca, New York. Vol. III (ed. J. Arditti) pp. 177-222.
3. **Arditti, J. & Ernst, R. (1993).** Micropropagation of Orchids. John Wiley and Sons, New York.
4. **Arditti, J., Clements, M. A., Fast, G., Nishimura, G., Ernst, R. (1982).** Orchid seed germination and seedling culture-A Manual. In: Orchid Biology Reviews and perspectives, (ed. J. Arditti). Cornell Univ. press, Ithaca and London, pp. 243-361.
5. **Atwood, J. T. (1986).** The size of orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. Selbyana., 1: 171-86.
6. **Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudestein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., Berg, C. V., Schuitman, A. (2015).** An update classification of orchidaceae. Bot J Linn Soc, 177: 151-174.
7. **Christenhusz, M. J. M., & Byng J. W., (2016).** Number of known plants species in the world and its annual increase, Phytotaxa, vol. 261(3), pp. 201-217.
8. **Chugh, S., Guha, S., Rao I. U., (2009).** Micropropagation of orchids: A Review on the Potential of Different Explants. Scientia Horti; 122: 507-520.
9. **Cribb, P., & Govaerts, R., (2005).** Just how many orchids are there In: Proceedings of the 18th World Orchid Conference (eds. Raynal-Roques, A., Roguenant., D, Prat), Dijon, France. pp. 161-172.
10. **Das, M.C., Kumaria, S., Tandon, P., (2008).** In vitro propagation and conservation of *Dendrobium lituiflorum* Lindl through Protocorm-Like Bodies. J. Plant Biochem Biotechnol, 17: 177-180.
11. **Datta, K. B., Kanjilal, B., Sarkar D. D. (1999).** Artificial seed technology: Development of a protocol in *Geodrum denciflorum* (Lam.) Schltr. An endangered orchid. Curr. Sci., 76(8): 1142-45.
12. **Dressler, R. L. (1993).** Phylogeny and classification of the orchid family. Timber Press, USA.
13. **Edy S. W. U. & Hariyanto S., (2020).** Organic Compounds: Contents and Their Role in Improving Seed Germination and Protocorm Development in Orchids. International Journal of Agronomy.
14. **Goh, C. J. (1970).** Tissue culture of *Vanda Miss Joaquim*. J. Singapore natl. Acad. Sci., 2: 31-33.
15. **Haywood, V. H. (1993).** Flowering Plants of the World. B. T. Batsford Ltd., Oxford.
16. **Hoshi, Y., Kondo, K., Hamatani S., (1994).** In vitro seed germination of four Asiatic taxa of *Cypripedium* and notes on the nodal micropropagation of American *Cypripedium montanum*. Lindleyana., 9(2): 93-97.
17. **Jun, Y., & Miyoshi K. (2006).** In vitro Asymbiotic Germination of Immature Seed and Formation of Protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). Faculty of Bioresources, Akita Prefectural University, Akita City, Japan.
18. **Kauth, P. J. Vendrame, W. A., Kane, M. E. (2016).** In vitro seed culture and seedling development of *Calopogon tuberosus*,” Plant Cell, Tissue and Organ Culture, vol. 85(1), pp. 91-102.
19. **Knudson, L. (1921).** La germination no simuotica de las semillas de orquideas. Real Soc Esp Hist Nat, 21: 250-260.
20. **Knudson, L. (1922).** Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botanical gazette, 73(1), 1-25.
21. **Lal, N. & Madhulika, S., (2020).** Prospects of Plant Tissue Culture in Orchid Propagation. Indian Journal of Biology, vol. 7 (2): 103-110.



22. **Lawler, L. J. & Rao, A. N. (2002).** Medicinal uses of orchids in some Asian countries. *J. Trop. Med. Plants*, 3(1): 73-88.
23. **Linden, B. (1980).** Aspectic Germination of Seeds of Northern Terrestrial Orchids. *Ann. Bot. Fennici*, 17: 174-182.
24. **Long, B. Niemiera, A. X. Cheng, Z. Y., Long, C. L., (2010).** In vitro propagation of four threatened Paphiopedilum species (Orchidaceae), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 101(2), pp. 151-162.
25. **Mabberley, D. J. (1998).** *The Plant-Book*. Cambridge University Press, Bath, U.K.
26. **Morel, G. M. (1964).** La culture in vitro du meristeme apical. *Rev. Cytol. Biol. Veg.*, 27: 304-14.
27. **Muick, F. (1978).** Propagation of Cypripedium species from seeds. *Amer. Orchid soc. Bull.*, 47(4): 306-07.
28. **Nanekar, V. Shriram, V. Kumar, V. and Kishor, P. B. K. (2014).** "Asymbiotic in vitro seed germination and seedling development of Eulophia nuda Lindl., an endangered medicinal orchid," *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, vol. 84, no. 3, pp. 837-846.
29. **Pathak, P. & Vij, S. P. (2001).** In vitro regeneration of Papilionanthe teres (Roxb.) Schltr. : Utility of folier explants. In: *Proc. 7th Asia Pacific Orchid Conference* (ed.S. Ichihashi) Organizing Committee APOC7, Nagoya, Japan. pp. 226-227.
30. **Pathak, P., Bhattacharya, A., Vij, S.P., Mahant, K.C., Dhillon, M.K., Piri, H. (2010).** An update in the medicinal orchids of Himachal Pradesh with brief notes on their habit, distribution and flowering period. *Journal of Non-Timber Forest Products*. Vol. 17(3). 365-372.
31. **Pathak, P., Piri, H., Vij, S. P., Mahant, K. C. Chauhan, S. (2011).** In vitro propagation and mass scale multiplication of a critically endangered epiphytic orchid, *Gastrochilus calceolaris* (Buch.-Ham ex J. E. Sm.) D. Don. using immature seeds. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 49, 711-716.
32. **Paul S., Kumaria, S., Tandon, P. (2012).** An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale in vitro regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India, *AoB. Plants*.
33. **Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Murugan S. B. (2013).** In vitro asymbiotic seed germination, mycorrhization and seedling development of *Acampae praemorsa* (Roxb.) Blatt. & Mc Cann, a common south Indian orchid, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, vol. 2(2), 114-118.
34. **Steward, S. L. & Kane M. E. (2006).** Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid," *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 86, 147-158,
35. **Vij, S. P. & Pathak, P. (2008).** Orchids: Some facts and myths. *National Conference on Orchids: Science and Society and Orchids Show*, Bangalor, April 10-12.
36. **Vij, S., Pathak, P. P. Mahant, K. C. (1995).** Green pod culture of a therapeutically important species *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don) Soo. *J. of Orchid Soc. India.*, 9: 7-12.
37. **Vudala S. M. & Ribas L. L. F. (2017).** Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae), *South African Journal of Botany*, vol. 108, 1-7.
38. **Withner, C. L. (1953).** Germination of cypripediums (Cyps). *Orchid J.*, 2: 473.
39. **Zeng, S. Huang, W. Wu, K. Zhang, J. Teixeira da Silva J. A., J. Duan. (2018).** In vitro propagation of Paphiopedilum orchids, *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 36, no. 3, pp. 521-534.
40. **Zhang, S., Yang, Y., J. Li. (2018).** Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity*, vol. 40, (4), 196-208.

Poster presentation

Title	First author	Page
Role of organic undefined supplements in improving the in vitro growth of orchids	Seied Mehdi Miri	162



Role of organic undefined supplements in improving the *in vitro* growth of orchids

Seied Mehdi Miri

Department of Horticulture, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

Email: smmirmi@kiauo.ac.ir

162

Abstract

Growth and morphogenesis of orchid *in vitro* culture is influenced by supplementation with certain undefined additives. Various organic compounds, i.e., coconut water, banana and potato homogenate, carrot and tomato juice, casein hydrolysate, peptone, yeast extract, chitosan and phloem sap, individually or in combination, can promote seed germination, seedling development, protocorm-like bodies (PLBs) formation, plantlet growth, and multiple shoot regeneration of various orchids. These organic supplements are a source of minerals, vitamins, amino acids, organic acids, carbohydrates, peptides, growth regulators or their derivatives, and antioxidants. The amount of these substances required for successful orchid *in vitro* culture varies with the species and genotype.

Keywords: In vitro culture, Orchid, Organic additive

1. Introduction

Orchids, member of the Orchidaceae family, are one of the two largest plant families, including 736 to 899 genera and 27800 accepted species names and over 100000 hybrids produced by artificial pollination (3, 20). Family Orchidaceae currently represents one of the most important in the world commercial floriculture (3).

In vitro asymbiotic seed germination and micropropagation techniques could be useful approaches for the mass scale propagation of orchids (3, 16). Orchid seeds do not have endosperm, and the embryo and seedlings at early germination are highly dependent on symbiosis with microorganisms known as mycorrhizae, which nutritionally supply these plants until the complete establishment of the seedling (1, 3). Therefore, *in vitro* orchid seed germination is a crucial aspect in propagation and conservation programs. Seeds cultured *in vitro* can develop into complete seedlings on sterile nutrient media without the aid of fungi, which is a suitable approach for commercial orchid production (20). On the other hand, as orchids are out breeders, their propagation using seeds leads to the production of heterozygous plants. Hence, protocols providing regeneration or multiplication from various vegetative parts of mature plants i.e. micropropagation are essential (12, 17).

2. Undefined supplements

Successful *in vitro* plant propagation is influenced by several factors such as plant genotype, explant type and media composition (10, 11). Several basic media are used for orchid tissue culture, but each of them is usually modified to suit a particular species or hybrid. Each of these media contains macroelements, microelements, iron chelate, and supplements such as plant growth regulators, vitamins, complex additives, a darkening agent and a solidifier (21). The development and regeneration of *in vitro* cultured plant tissues can be improved by adding several supplements of uncertain and variable compositions (5, 20). Effects of organic growth additives are tested in a large number of orchids (3, 9, 19). Organic nutrients are a source of vitamins, amino acids, fatty acids, carbohydrates, peptides, and growth factors (20).

2.1. Coconut water





Coconut water (CW) is the liquid endosperm of *Cocos nucifera* fruits that is often added to culture media for seed germination, growth of PLBs and plantlet development (1). Unlike other undefined supplements to culture media (such as yeast extract, malt extract and casein hydrolysate), CW has proved harder to replace by fully defined media (5). The most commonly recommended CW is that from green (unripe) nuts, although CW from ripe nuts can also be used (21). Coconut water is usually strained through cloth and deproteinized by being heated to 80-100°C for about 10 minutes while being stirred. It is then allowed to settle and the supernatant is separated from the coagulated proteins by filtration through paper. The liquid is stored frozen at -20°C. Some researchers autoclave media containing CW, others filter-sterilize CW and add it to a medium after autoclaving has been carried out (5).

Coconut water contains soluble sugars as a natural source of carbon, amino acids and vitamins such as B1 (thiamin), B6 (pyridoxine), and C (ascorbic acid) (20). In addition, 70% of the free amino acids of CW are made of glutamine, arginine, asparagine, alanine and aspartic acid (6). It consists of various minerals such as P, Mg, K, Ca, Fe, Cu, S and Mn (6, 20). Furthermore, CW contains indoleacetic acid (IAA), abscisic acid (ABA), gibberellic acid (GA), and zeatin, which are generally used as growth supplements in plant tissue culture (20).

Coconut water plays an important role in the seed germination, PLBs formation, plantlet growth, and multiple shoot induction (1, 20). The reasons for the beneficial effects of CW are not clear (21). Growth promontory nature of CW is related to its ability of inducing cell divisions in non-dividing cells, hence promoting early protocorm differentiation (9). Plant hormones and related substances may be reasons for these effects (21).

Effective stimulation only occurs when relatively large quantities are added to a medium; the incorporation of 10-20% (v/v) is quite usual (3, 5, 19). Inhibitory effects on the proliferation and regeneration of *Phalaenopsis* in the media with higher concentration of CW (20-30%) have been reported that could be due to the use of phytohormones above the optimum concentration (22). Many researchers try to avoid having to use CW in their protocols. It is an undefined supplement whose composition can vary considerably. However, adding CW to media often provides a simple way to obtain satisfactory growth or morphogenesis without the need to work out a suitably defined formulation (5). Coconut water can also increase shoot proliferation without causing mutations (21).

2.2. Banana homogenate

Homogenised banana (BH) fruit is sometimes added to media for the *in vitro* culture of orchids and is often reported to enhance seed germination and protocorm development (5, 15, 20). It can be sterilized by autoclaving (21). The reason for its stimulatory effect has not been explained (5) and attempts to find answers by fractionating banana pulp through serial extractions with a number of solvents produced inconclusive results (21). One suggestion mentioned earlier is that it might help to stabilize the pH of the medium (5). Banana homogenate may promote seedling formation because of added nutrients and adequate amounts of sugars that are supplied to the medium (4). Banana contains high levels of K, Mn, Ca, Na, Fe, Zn, vitamins such as B1, B2 (riboflavin), B3 (niacin), B5 (pantothenic acid), B6, B9 (folic acid), and C, as well as growth regulators such as zeatin, gibberellin, and IAA. It is also rich in carbohydrates, supplying energy to heterotrophic plants during the early stages of *in vitro* cultivation (20). Kaur and Bhutani (2012) suggested that the positive effects of BH (50 g/l) in inducing the highest shoot regeneration frequency and subsequent development from *Cymbidium pendulum* PLBs, could be attributed to the higher content of sucrose concentrations in BH. Tantasawat *et al.* (2015) stated that some cytokinins and/or their derivatives (e.g., zeatin), phenolic compounds, dopamine, β -carotene, flavonoids, vitamins, and minerals are present in banana pulp, that may play a major role in promoting orchid protocorm growth and proliferation. It has been suggested that antioxidants may not affect the



growth and development of orchid PLBs directly, but reduce tissue or medium browning. They also found that the AA group banana may have greater growth-promoting effects than other groups. Moreover, the effects of banana supplementation on orchid PLBs appear to be genotype dependent and should be determined individually for each orchid genotype.

2.3. Potato homogenate

Orchid PLB growth was affected by the presence of potato homogenate (PH) in the medium (15). The potato extract was prepared from unsprouted potato tubers to prevent post-culture fermentation of the medium because potato sprouting leads to conversion of starch into sugar. Sprouted tubers also contain toxic glycoalkaloids such as solanine and chaconine (6).

Potato homogenate contains important vitamins, such as C, B1, and B6, and mineral elements, such as K, Fe, and Mg, as well as carbohydrates, amino acids and antioxidants include ascorbic acid, certain carotenoids and anthocyanins (6, 20). Ascorbic acid stabilizes free radicals and prevents cellular damage via Fe absorption, which promotes the healing of cuts on the surface of the PLBs. In addition, notable amounts of proteins of high biological value could also promote the proliferation of PLBs. Substantial amounts of alkaline salts in the form of K may thwart acid overdose and prevent medium fermentation, which in turn supports the proliferation of PLBs. Furthermore, the presence of vitamin B6 in the potato extract could encourage the proliferation of PLBs by inducing the production of essential amino acids (6). Gnasekaran *et al.* (2012) found that lower concentrations (5 and 10%) of the potato extract could not provide sufficient amounts of some of the biological compounds present at trace levels in the pure extract. Therefore, PLB growth of *Vanda* halted after six weeks of culture. Murdad *et al.* (2010) observed that the presence of PH singly in the medium showed a better growth and development of the *Phalaenopsis* protocorms. However, the performance of the protocorms development reduced when both sugar and PH added together in the medium that might be caused by the high osmotic pressure of the medium.

2.4. Carrot juice

In vitro growth and regeneration can be improved by adding carrot juice (CJ) to the orchid culture medium. Carrots are rich in carbohydrates and minerals such as Ca, P, Fe and Mg, which are very important for the plant energy. Some other constituents of CJ include cytokinin, vitamins, amino acids and endogenous sterols (22).

2.5. Tomato juice

Tomato juice significantly influences the orchid seed germination and subsequent protocorm development. It contains carbohydrates [glucose (in the form of dextrose) and fructose], vitamins and minerals, which benefit cellular division and support systems (6, 20). Glucose and fructose are easily-absorbed sugars and hence promote both cellular maintenance and cellular division during PLB proliferation (6). Tomatoes also contain lycopene, α -carotene, β -carotene, and ascorbic acid, strong antioxidants with the ability to eliminate the formation of free radicals, repair wounded cells, and inhibit DNA oxidation (20). Tantasawat *et al.* (2015) demonstrated that tomato may enhance the growth and development of *Dendrobium* protocorms, possibly through lycopene, which provides the best protection for cell damage and reduces the occurrence of culture browning. Indeed, the presence of sugar and strong antioxidants plays an integral role in the proliferation and production of healthy PLBs (6).

2.6. Peptone

Peptone being water soluble protein hydrolysate with very high amino acid content promotes explant growth and development (9). It is occasionally used as a medium

supplement in orchid cultivation in 1-2 g/l to enhance seed germination and stimulate the multiple shoot and protocorms formation (2, 3, 15, 20). Response of PLB to peptone depended on the nitrogen level in the basal medium, as poor effects may be obtained in the culture media with sufficient nitrogen content (8). Peptone may have contributed to the increased seedling development of orchids by supplying auxin-like compounds or various amino acids (1).

2.7. Yeast extract

Yeast extract (YE) is also an important source of inositol, amino acids and vitamins, especially B1, and has been effectively used to increase seed germination and protocorm regeneration in many orchid species (20). The vitamin content of yeast extract distinguishes it from casein hydrolysate (CH) so that in such media, CH or amino acids alone, could not be substituted for YE. The percentage of amino acids in a typical yeast extract is high (e.g. 7% amino nitrogen), but there is less glutamic acid than in casein or other protein hydrolysate. It normally only enhances growth in media containing relatively low concentrations of nitrogen, or where vitamins are lacking. Malt extract contains little nitrogen (ca. 0.5% in total) (5).

2.8. Chitosan

Chitosan, a biopolymer derivate of chitin, has been shown to affect orchid seed germination and PLB induction (14, 20). The beneficial effect of chitosan may induce a signal to synthesize plant hormones, auxin and gibberellin (20). Chitosan effect is developmental stage dependent, and optimal concentrations of chitosan should be identified for specific developmental stages (18).

2.9. Phloem sap

The phloem sap of some trees may increase *in vitro* seed germination and the growth of seedlings developed from the protocorm of orchid during asymbiotic seed culture. For the sap collection, the trunk is tapped and the plastic spout, which had a tube, is connected into the tap hole. From this tube, sap water ran into the sterile container, and these collected saps are immediately stored at -20°C. Sap of birch (*Betula pendula*) and maple (*Acer platanoides*) possessed variable inorganic ions such as K, P, Ca, Mg, Fe and Mn, as well as organic acids including citric, malic and succinic acids. Myo-inositol and water-soluble vitamins such as B1, B2, B3, B5, B6, and C, which were recommended for orchid growth, were also detected in maple sap (7).

3. Conclusion

Addition of organic supplements in orchid culture medium is simple, practical, beneficial and a conventional method to improve media used for commercial production. These organic supplements represent natural sources of amino acids, vitamins, minerals, organic acids, sugars, proteins, and natural growth regulators. Any of these component(s) could be responsible for promoting growth and development of the cultures. Organic growth supplements effectively increase the seed germination, seedling formation, number of PLBs and multiple shoot formation of orchids.

References

1. Abbaszadeh, S.M., Miri, S.M., and Naderi, R., (2018). An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Phalaenopsis* 'Bahia Blanca'. Journal of Ornamental Plants. 8(3): 183-192.



2. **Beyhaghi, M.M., and Miri, S.M., (2020).** Effect of carbohydrate, peptone and humic acid on growth of *in vitro* PLB and seedlings of *Phalaenopsis* orchid. M.Sc Thesis of Horticultural Science and Engineering, Islamic Azad University-Karaj Branch.
3. **Cardoso, J.C., Zanello, C.A., and Chen, J.-T., (2020).** An overview of orchid protocorm-like bodies: mass propagation, biotechnology, molecular aspects, and breeding. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 985. doi: 10.3390/ijms21030985.
4. **Chen, Y., Goodale, U.M., Fan, X.L., and Gao, J.-Y., (2015).** Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. *Global Ecology and Conservation*. 3: 367-378.
5. **George, E.F., Hall, M.A., and Klerk, G.J.D., (2008).** The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: *Plant Propagation by Tissue Culture*. George, E.F., Hall, M.A., and Klerk, G.J.D. (eds). Springer.
6. **Gnasekaran, P., Poobathy, R., Mahmood, M., Samian, M.R., and Subramaniam, S., (2012).** Effects of complex organic additives on improving the growth of PLBs of *Vanda* *Kasem's Delight*. *Australian Journal of Crop Science*. 6(8): 1245-1248.
7. **Huh, Y.S., Lee, J.K., Nam, S.Y., Paek, K.Y., and Suh, G.U., (2016).** Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw. with organic additives. *Journal of Plant Biotechnology*. 43(1): 138-145.
8. **Ichihashi, S., and Islam, M.O., (1999).** Effects of complex organic additives on callus growth in three orchid genera, *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis*, and *Neofinetia*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 68(2): 269-274.
9. **Kaur, S., and Bhutani, K.K., (2012).** Organic growth supplement stimulants for *in vitro* multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw. *Horticultural Science (Prague)*. 39: 47-52.
10. **Miri, S.M., and Roughani, A., (2018).** Factors affecting tissue culture success in ornamental crops, I. medium composition. 2nd International and 3rd National Congress on Flower and Ornamental Plants, Mahallat, Iran.
11. **Miri, S.M., and Roughani, A., (2018).** Factors affecting tissue culture success in ornamental crops, II. genotype, explant and physical environment. 2nd International and 3rd National Congress on Flower and Ornamental Plants, Mahallat, Iran.
12. **Mondal, T., and Banerjee, N., (2017).** Micropropagation and *in vitro* conservation of threatened orchids: a brief review. *CIBTech Journal of Biotechnology*. 6(3): 1-12.
13. **Murdad, R., Latip, M.A., Abdul Aziz, Z., and Ripin, R., (2010).** Effects of carbon source and potato homogenate on *in vitro* growth and development of Sabah's endangered orchid: *Phalaenopsis gigantean*. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 18(1): 199-202.
14. **Restanto, D.P., Santoso, B., Kriswanto, B., and Supardjono, S., (2016).** The application of chitosan for protocorm like bodies (PLB) induction of orchid (*Dendrobium sp*) *in vitro*. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 9: 462-468.
15. **Salimi, E., Miri, S.M., and Moradi, P., (2020).** Effect of BA, peptone and banana powder on *in vitro* growth of protocorm and plantlets of *Phalaenopsis* orchid. M.Sc Thesis of Horticultural Science, Islamic Azad University-Karaj Branch.
16. **Soleimani, V., Mohammadi, A., and Miri, S.M., (2021).** Callus induction and protocorm-like bodies regeneration from leaf explants of *Phalaenopsis*. The 3rd International and 4rd National Congress on Flower and Ornamental Plants, Ahvaz, Iran.



17. **Soleimani, V., Mohammadi, A., and Miri, S.M., (2021).** *In vitro* multiplication and rooting from floral stalk in *Phalaenopsis* orchid. The 3rd International and 4rd National Congress on Flower and Ornamental Plants, Ahvaz, Iran.
18. **Tantasawat, P.A., Khairum, A., Arsakit, K., Poolsawat, O., Pornbungkerd, P., and Kativat, C., (2015).** Effects of different culture media on growth and proliferation of *Dendrobium* 'Earsakul' protocorm-like bodies, HortTechnology. 25(5): 681-686.
19. **Teixeira da Silva, J.A. (2013).** Orchids: advances in tissue culture, genetics, phytochemistry and transgenic biotechnology. Floriculture and Ornamental Biotechnology. 7(1): 1-52.
20. **Utami, E.S.W., and Hariyanto, S., (2020).** Organic compounds: contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids. International Journal of Agronomy. 2020, Article ID 2795108.
21. **Yam, T.W., and Arditti, J., (2018).** Orchid micropropagation: An overview of approaches and methodologies. In: Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols. Lee, YI., and Yeung, E.T. (eds). Springer Protocols Handbooks, Humana Press.
22. **Zahara, M., Datta, A., Boonkorkaew, P., and Mishra, A., (2017).** The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of *Phalaenopsis* Hhybrid 'Pink'. Brazilian Archives of Biology and Technology. 60, e17160149.



Scientific Committee



Dr. Mohammad Bagher Rezaee
Professor, Research Institute of Forests
and Rangelands, Tehran, Iran



Dr. Ali Akbar Mozafari
Associate Professor, Department of
Horticulture Science, Faculty of
Agriculture, University of Kurdistan,
Iran



Dr. Pejman Azadi
Assistant Professor, Plant
Biotechnology, Agricultural
Biotechnology Research Institute, Iran



Dr. Abdolbaset Ghorbani
Visiting Researcher, Department of
Organismal Biology, Uppsala
University, Sweden



Dr. Amir Ali Khoddamzadeh
Agroecology Program, Department of
Earth and Environment & Institute of
Environment, Florida International
University, USA



Dr. Shirin Dianati
Assistant Professor, Department of
Horticulture Science, Faculty of
Agriculture, Aburaihan Campus,
University of Tehran, Iran



Dr. Ali Khadivi
Associate Professor, Department of
Horticulture Science, Faculty of
Agriculture, Arak University, Iran



Dr. Mohammad Fatahi
Associate Professor, Department of
Horticulture Science, Faculty of
Agriculture, Urmia University, Iran



Dr. Ali Baghdadi
Assistant Professor, Department of
Plant Physiology, Faculty of
Agricultural and Food Sciences,
University of Bologna, Italy



Dr. Nawroz Abdul-Razzak Tahir
Professor, Department of Horticulture
Science, Faculty of Agriculture,
University of Sulaimani, Kurdistan
Region



Dr. Farzad Nazari
Assistant professor, Department of
Horticulture Science, Faculty of
Agriculture, University of Kurdistan,
Iran



Dr. Yavar Vafaei
Assistant professor, Department of
Horticulture Science, Faculty of
Agriculture, University of Kurdistan,
Iran



Dr. Ali Ghaderi
Medical Plants Ph.D, Department of
Horticulture Science, Faculty of
Agriculture Neyshabour, Technical and
Vocational University, Iran



Organizing Committee



Dr. Yavar Vafaee

Assistant professor, Department of
Horticulture Science, Faculty of
Agriculture, University of Kurdistan,
Iran



Dr. Jalal Khorshidi

Assistant professor, Department of
Horticulture Science, Faculty of
Agriculture, University of Kurdistan,
Iran



Eng. Keyvan Sobhani

Ph.D Candidate, Faculty of
Agriculture, University of Kurdistan,
Iran



Papers Collection of

1st International Conference on

Medical and Ornamental Orchids

Conference Themes:

- Domestication and Propagation
- Biotechnology and Molecular Biology
- Micropropagation and Tissue Culture
- Conservation Biology
- Physiology and Postharvest Physiology
- Phytochemistry and Medicinal Properties
- Food Industry
- Economy and Market



Date and Place of Holding:

16-17 June, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

<https://conf.uok.ac.ir/orchid400/Default.aspx?Lang=En>

