ثعلب‌های خاکرُست ایران: جوانه‌زنی غیرهمزیست درون شیشه‌ای پیش‌نیازی برای حفاظت ژنتیکی

یاور وفایی*، مژگان فتاحی، فرزاد نظری، علی اکبر مظفری، جلال خورشیدی
گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه کردستان، سنندج
واحد پژوهشی اصلاح و توسعه گیاهان دارویی، سنندج
*نویسنده مسئول: y.vafaee@uok.ac.ir

چکیده

۴۶ گونه ثعلب خاکرست در نقاط مختلف ایران می‌روید که غده‌های گوشتی ۳۶ گونه برای تولید پودر ثعلب جهت استفاده در صنایع غذایی جمع‌آوری می‌شود. برداشت گیاهان ثعلب در ایران منجر به تخلیه جمعیت‌های وحشی بسیاری از گونه‌ها شده است به طوری که ۱۹ گونه از ثعلب‌های ایرانی جزوه گونه‌های در معرض خطر شناخته می‌شوند. بذرها ثعلب‌ها دارای یک جنین کوچک با قطر تنها ۰/۱ میلی‌متر می‌باشد که فاقد هر گونه بافت آندوسپرم ذخیره‌ای می‌باشد. جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه در گونه‌های ثعلب خاکرست ایرانی در طبیعت به صورت همزیست با گونه‌های ویژه‌ای از قارچ و تحت شرایط میکرواقلیمی مخصوص صورت می‌گیرد. با وجود در معرض خطر بودن گونه‌های ثعلب ایرانی، تلاش‌های محدودی در جهت جوانه‌زنی همزیست یا غیرهمزیست سایر گونه‌های ثعلب خاکرست ایرانی صورت گرفته است. در حال حاضر در هسته تحقیقاتی ثعلب‌های خاکزی واحد پژوهشی گیاهان دارویی در گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه کردستان جوانه‌زنی غیرهمزیست ۸ گونه ثعلب بهینه شده است. همچنین جوانه‌زنی و رشد گیاهچه ۳ گونه *O. simia*، *D. umbrosa* و *A. coriophora* تا مرحله گیاهچه‌های چند سانتی پیشرفت داشته است. با توجه به عدم وجود راهکارهای حفاظت گونه برای ثعلب‌های ایرانی، می‌توان گیاهان درون شیشه‌ای تولید شده هر گونه را در محل‌های اصلی رویش در غرب کشور کشت کرد. به دلیل اندازه بسیار کوچک بذرهای ثعلب، هر گیاه قادر به تولید چند میلیون بذر می‌باشد و براساس این حقیقت که دستورالعمل توسعه یافته قادر به جوانه‌زنی صدرصدی برخی گونه‌ها می‌باشد، می‌توان تعداد بسیار زیادی گیاه درون شیشه‌ای مقاوم شده را در مناطق اصلی هر گونه کاشت و امیدوار به استقرار مجدد جمعیت‌ها و نجات این گونه‌های با ارزش بود.

کلمات کلیدی: انقراض، تفکیک جمعیت، حفاظت درون شیشه‌ای، جوانه‌زنی

مقدمه

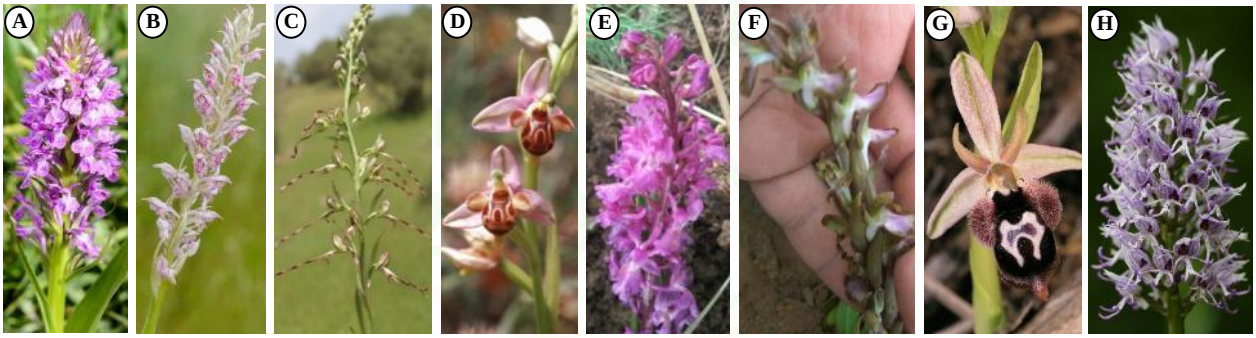
خانواده ثعلبیان با بیش از ۲۸۰۰۰ گونه و ۷۶۳ جنس، بزرگ‌ترین خانواده گیاهی می‌باشد. به واسطه گروه‌های گیاهشناسی متنوع، روابط پیچیده با قارچ‌های همزیست، تنوع فوق‌العاده در اشکال گل و سیستم گرده‌افشانی و تولید مثل ویژه، برای سالیان دراز مورد توجه‌ها زیست‌شناسان قرار گرفته است. ما بین گونه‌های ثعلب، انواع خاکرست غده‌های زیزمینی گوشتی تولید می‌کنند که با نام ثعلب (Salep) در ترکیه و خاورمیانه شناخته می‌شود (Delforge, 2006). ۴۶ گونه ثعلب خاکرست در نقاط مختلف ایران می‌روید که غده‌های گوشتی ۳۶ گونه برای تولید پودر ثعلب جهت استفاده در صنایع غذایی جمع‌آوری می‌شود. برداشت گیاهان ثعلب در ایران منجر به تخلیه جمعیت‌های وحشی بسیاری از گونه‌ها شده است به طوری که ۱۹ گونه از ثعلب‌های ایرانی جزوه گونه‌های در معرض خطر شناخته می‌شوند و تحت لیست کنوانسیون بین‌المللی گونه های وحشی در معرض خطر CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) قرار گرفته‌اند (Ghorbani *et al*., 2014a).

میزان از بین رفتن هر گونه به اندام برداشت شده و نیز کمیت، شدت و فراوانی برداشت بستگی دارد. گونه‌های علفی که ریشه‌ها یا بذر و میوه آن‌ها قابل برداشت است نسبت به گونه‌های درختی و درختچه‌ای، بیشتر در معرض خطر نابودی و انقراض قرار دارند. جمع‌آوری‌کنندگان معمولاً ثعلب‌ها را از روی ظاهر اندام‌های هوایی و ظاهر گیاهان خارج شده از خاک

IrHC2019

شناسایی می‌کنند و با جدا کردن غده‌های بقیه بخش‌ها را دور می‌ریزند (Ghorbani *et al*., 2014b). قیمت بالای غده‌های ثعلب باعث ایجاد رقابت بین جمع‌کنندگان شده و در برخی موارد قبل از گلدهی و تشکیل بذر غده‌ها از خاک خارج می‌شوند. برداشت ثعلب‌ها قبل از تشکیل بذر باعث کاهش شدید جمعیت گونه‌های جمع‌آوری شده و در نتیجه نایاب شدن و در معرض انقراض قرار گرفتن این گونه‌ها می‌شود (Kreziou *et al*., 2016). در کل می‌توان گفت که هر جا تنوع گونه‌های ثعلب بیشتر باشد میزان جمع‌آوری نیز بیشتر می‌باشد. که از جمله این مناطق می‌توان به قسمت‌های شرقی استان گلستان و نواحی شمالی استان کرمانشاه اشاره کرد. همانطور که گفته شد تمام گونه‌های ثعلب ایرانی در زمره کنوانسیون بین‌المللی گونه‌های وحشی در معرض خطر قرار دارند و تجارت بین‌المللی آن‌ها تحت مقررات قرار داد و صادرات و واردات آن‌ها باید با مجوزهای مربوطه صورت بگیرد. تنها در سال ۲۰۱۳ چیزی حدود ۷-۱۱ میلیون گیاه کامل ثعلب جهت تولید پودر ثعلب از بین رفته‌اند (Ghorbani *et al*., 2017) و در این زمینه سازمان جنگل‌ها و مراتع هر گونه جمع‌آوری، خرید و فروش و تجارت آن را غیرقانونی اعلام کرده است و آن را منوط به اخذ مجوزهای مربوطه کرده است. متاسفانه این مصوبه‌ها از قدرت لازم در جلوگیری از برداشت بی رویه گونه‌های ثعلب ایرانی چندان موثر نیست.

منطقه اصلی تنوع گونه‌های ثعلب در غرب کشور منطقه کرند در استان کرمانشاه و مناطق مهاباد، پیرانشهر و سردشت در استان آذربایجان غربی می‌باشند. در استان کرمانشاه بیشتر گونه‌های *Himantoglossum comperianum* و *H. affine* جمع‌آوری می‌شوند. در حالی که در استان آذربایجان غربی بیشتر گونه‌های *Orchis simia*، *Orchis adenochiela*، *Orchis mascula*، *Orchis pyramidalis* و *Dactylorhiza umbrosa* مورد بهره‌برداری و جمع‌آوری قرار می‌گیرند (Kreutz and Spencer, 2011). طی ۴ سال گذشته هسته تحقیقاتی بروی ثعلب‌های ایرانی در گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه کردستان تشکیل شده است که تحقیقاتی را بروی ۸ گونه ثعلب خاکرست مهم ایرانی شامل گونه‌های Orchis *mascula*، *Orchis simia*، *Anacamptis coriophora*، *H. affine*، *Orchis collina*، *Ophrys schulzei*، *O. straussii* و *D. umbrosa* آغازه نموده است. در شکل ۱ مورفولوژی گل این گیاهان که مهم‌ترین گونه‌های مهم در غرب کشور هستند، نشان داده شده است.



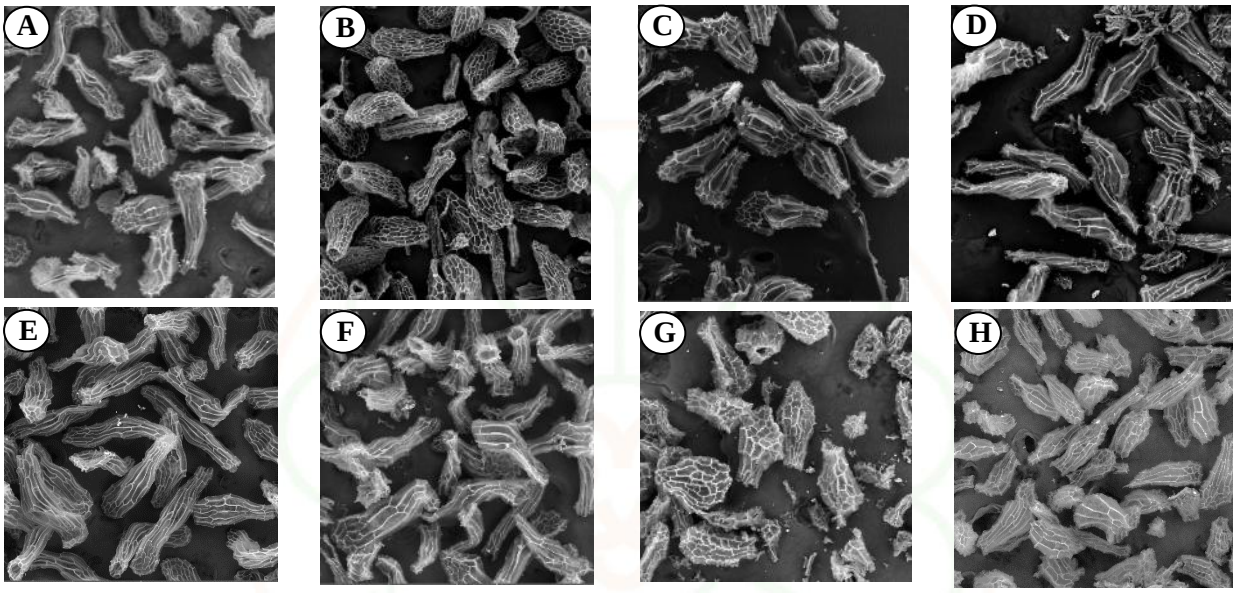
شکل ۱. مورفولوژی گل و گل‌آذین در مهم‌ترین ثعلب‌های خاک‌رست ایران. A: *Dactylorhiza umbrosa* ، B: *Anacamptis coriophora*، C: *Himantoglossum affine*، D: *Ophrus schulzei*، E: *Orchis mascula*، F: *Orchis collina*، G: *Ophrys straussii*، H: *Orchis simia*

در مجموع، ثعلب‌ها را بر پایه پاسخ بذرهایشان نسبت به محیط کشت سترون (استریل) درون شیشه‌ای می توان به سه دسته تقسیم کرد. گروه اول ثعلب‌های گرمسیری هستند که ساده‌ترین نیازها برای جوانه‌زنی را دارند و بنابراین به طور معمول به آسانی روی یک محیط کشت ساده جوانه می‌زنند. گروه بعدی ثعلب‌های خاکرست گرمسیری هستند که به طورکلی از نظر جوانه‌زنی دشوارتر از گروه اول هستند، زیرا نیازهایشان پیچیده‌تر یا ویژه‌تر است. ثعلب‌های خاکرست نواحی معتدله جز گروه سوم و سخت‌ترین و مشکل‌ترین گروه از نظر جوانه‌زنی هستند (Rasmussen *et al*., 2015).

بذر ثعلب‌ها بسیار ریز بوده و جزئیات آن فقط با میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده است. شکل ۲ تصاویر میکروسکوپ الکترونی از گونه‌های ثعلب مورد بررسی در هسته تحقیقاتی ثعلب در گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه کردستان را نشان می‌دهد. این بذرها دارای یک جنین کوچک با قطر تنها ۰/۱ میلی‌متر می‌باشد که فاقد هر گونه بافت آندوسپرم ذخیره‌ای

IrHC2019

می‌باشد. جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه در گونه‌های ثعلب خاکرست ایرانی در طبیعت به صورت همزیست با گونه‌های ویژه‌ای از قارچ و تحت شرایط میکرواقلیمی مخصوص صورت می‌گیرد. تنها پژوهش‌های مربوط به جوانه‌زنی ثعلب‌های ایرانی روی دو گونه *Epipactis veratrifolia* و *D. umbrosa* متمرکز شده است (Dianati Daylami *et al*., 2017; Moradi *et al*., 2016) و با وجود در معرض خطر بودن تلاشی در جهت جوانه‌زنی همزیست یا غیرهمزیست سایر گونه‌های ثعلب خاکرست ایرانی صورت نگرفته است. یکی از مشکلات جوانه‌زنی ثعلب‌های خاکرست در مقایسه با ثعلب‌های گرمسیری یا ثعلب‌های زینتی این است که محیط کشت‌های مرسوم همانند وسین و ونت، کیورتیس، فاست، MS، نادسون C، مید و بالارد، نورستوگ، نیچ، میترا برای این گونه‌های خاکزی بسیار غلیظ هستند از طرف دیگر سطوح بالای نیتروژن در فرم‌های نیترات و آمونیوم برای بذر سمیت ایجاد می‌کنند.

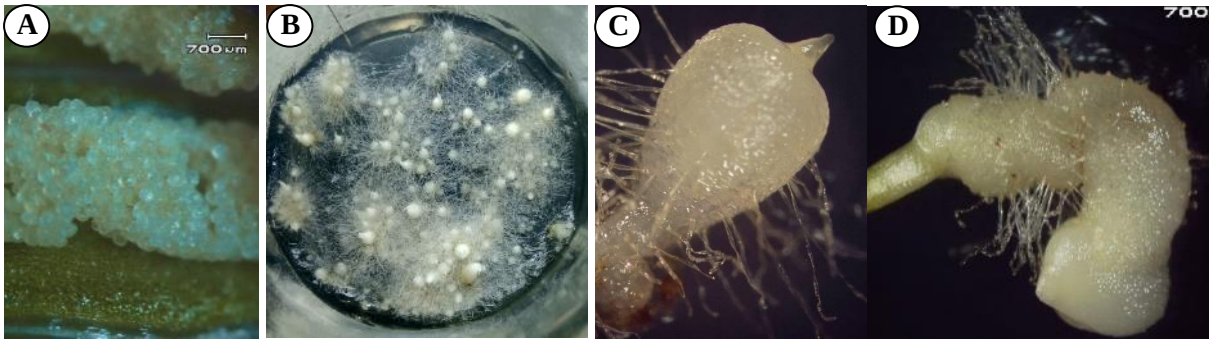


شکل ۲. مورفولوژی بذر در مهم‌ترین ثعلب‌های خاک‌رست ایران. A: *Anacamptis coriophora*، B: *Dactylorhiza umbrosa*، C: *Himantoglossum affine*، D: *Orchis collina*، E: *Ophrus schulzei*، F: *Ophrys straussii*، G: *Orchis mascula*، H: *Orchis simia*

در حال حاضر در هسته تحقیقاتی ثعلب‌های خاکزی واحد پژوهشی گیاهان دارویی در گروه علوم و مهندسی باغبانی دانشگاه کردستان جوانه‌زنی غیرهمزیست ۸ گونه ثعلب بهینه شده است (شکل ۳). در ثعلب‌های خاکزی به محض جوانه‌زنی جنین‌ها بزرگ شده و ساختار کوچک شبه‌کورم که اجسام شبه پروتوکورم (Protocorm Like Bodies) نامیده می‌شوند به وجود می‌آورند که دارای یک مریستم شاخساره و ریشه غیر فعال در قطب‌های مخالف خود می‌باشد. پروتوکورم تنها زمانی می‌تواند رشد کند که به اندازه کافی مواد ذخیره‌ای برای رشد شاخساره و ریشه داشته باشد. با رشد طبیعی دانهال استفاده از ذخایر غذایی پروتوکورم‌ها ادامه می‌یابد.

در دستورالعمل‌هایی که ما مورد استفاده قرار داده‌ایم بیشتر از نیتروژن آلی به صورت اسید آمینه و یا در قالب ترکیباتی همانند عصاره آب آناناس، شیره نارگیل یا عصاره شلغم و برای تامین سایر عناصر از غلظت‌های نمک‌های ساده استفاده نموده‌ایم. همچنین به دلیل ترشح ترکیبات ثانویه از پوسته بذر، حضور ترکیبات جاذب همانند ذغال فعال ضروری می‌باشد. یکی دیگر از موانع بازدارنده جوانه‌زنی در گونه‌های ثعلب خاکزی ایران پوسته محکم بذر می‌باشد که دارای ترکیبات سلولزی و لیگنینی می‌باشد. فرآیند گندزدایی بذرها نه تنها قادر به از بین بردن میکروارگانیسم‌های سطح بذر جهت کشت در شرایط درون شیشه‌ای می‌شود بلکه پوسته بذر را نیز نرم و از هم گسیخته کرده و برای رشد جنین و تشکیل پروتوکورم آماده می‌سازد.

IrHC2019



شکل ۳. مراحل جوانه‌زنی غیر همزیست در ارکیدها. A: بذر نابالغ درون که هنوز به مرحله بلوغ نرسیده‌اند؛ B: جوانه‌زنی در تعداد بالا همراه با تشکیل پروتوکورم و ریزوئیدها؛ C: تشکیل پروتوکورم از نمای نزدیک (نوک گیاهچه در انتها قابل مشاهده می‌باشد)؛ D: تشکیل گیاهچه کلروفیل‌دار از پروتوکورم.

براساس تلاش‌های صورت گرفته جوانه‌زنی و رشد گیاهچه ۳ گونه *O. simia*، *D. umbrosa* و *A. coriophora* تا مرحله گیاهچه‌های چند سانتی پیشرفت داشته است (شکل ۴) و این گیاهچه‌ها در محیط کشت‌های مناسب مقاوم‌سازی نیز شده‌اند. با توجه به عدم وجود راهکارهای حفاظت گونه برای ثعلب‌های ایرانی، می‌توان گیاهان درون شیشه‌ای که در حال حاضر تولید شده‌اند را برای هر گونه در محل‌های اصلی رویش در مناطق غرب کشور کشت کرد. به دلیل اندازه بسیار کوچک بذرهای ثعلب، هر گیاه قادر به تولید چند میلیون بذر می‌باشد و براساس این حقیقت که دستورالعمل توسعه یافته قادر به جوانه‌زنی صدرصدی برخی گونه‌ها می‌باشد، می‌توان تعداد بسیار زیادی گیاه درون شیشه‌ای مقاوم شده را در مناطق اصلی هر گونه کاشت و امیدوار به استقرار مجدد جمعیت‌ها و نجات این گونه‌های با ارزش بود (Aggarwal and Zettler, 2010). از طرف دیگر می‌توان در شناسایی عوامل و متغیرهای موردنیاز پس از رشد گیاهچه در راستای اهلی‌سازی و تولید تجاری این گونه‌ها گام برداشت.

شکل ۴. مراحل جوانه‌زنی تا تشکیل پروتوکروم، تشکیل عده گوشتی و رشد گیاهچه در *Orchis coriophora*

منابع

Aggarwal, S., Zettler, L.W., 2010. Reintroduction of an endangered terrestrial orchid, *Dactylorhiza hatagirea*, assisted by symbiotic seed germination-First report from the Indian subcontinent. Nature and Science 8, 139-145.

Delforge, P., 2006. Orchids of Europe, North Africa and the Middle East. Timber Press.

Dianati Daylami, S., Kafi, M., Salami, S.A., 2017. Improvement of asymbiotic germination of *Epipactis veratrifolia*. Iranian Journal of Horticultural Science 48, 73-83.

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.

IrHC2019

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, 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 Bulletin 26, 52-58.

Kreutz, K., Spencer, J., 2011. In the Footsteps of Renz: Orchids in Iran Journal of the Hardy Orchid Society 8, 12-24.

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.

Moradi, S., Dianati Daylami, S., Arab, M., Vahdati, K., 2016. Direct somatic embryogenesis in *Epipactis veratrifolia*, a temperate terrestrial orchid. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 92, 88-97.

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.

Iranian terrestrial orchids: Asymbiotic *in vitro* germination as a perquisite for genetic conservation

Yavar Vafaee*, Mojgan Fatahi, Farzad Nazari, Ali Akbar Mozafar, Jalal Khorshidi
Department of Horticultural Sciences and Engineering, University of Kurdistan, Sanandaj
Medicinal Plants Breeding & Development Research Institute, University of Kurdistan, Sanandaj
*Corresponding Author: y.vafaee@uok.ac.ir

Abstract

"Forty-six terrestrial orchid species are grown in Iran which their fleshy underground tubers are used to produce "Salep" powder. Overharvesting of Iranian orchids has led to depletion of wild populations so that 19 Iranian species are listed under CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Orchid seed have small embryo (0.1 mm diameter) without any endospermic resources. The germination and seedling growth in nature took place in the presence of mycorrhiza and under special microclimatic conditions. Despite endangering Iranian orchid species, limited information is available on their symbiotic and asymbiotic germination. Currently we have optimized asymbiotic germination of eight Iranian terrestrial orchid species at terrestrial orchids research core of Medicinal Plants Breeding and Development Research Institute in department of horticultural sciences and engineering (University of Kurdistan). Moreover, germination and growth of well-grown plantlet of three species including *Orchis simia*, *Dactylorhiza umbrosa* and *Anacamptis coriophora* has been also achieved. At the moment, there is no defined conservational strategy for Iranian orchid species, therefore *in vitro*-raised plantlets can be reintroduced to main hotspots of terrestrial orchid species in Western Iran. Due to small size of orchid seed, each individual plant can release millions of seed and based on our developed *in vitro* protocol to germinate seed at a scale of hundred percent, we can use *in vitro*-raised and acclimated plantlets for genetic conservation of these valuable species.

***Keywords*:** Distinction, Germination, *in vitro* conservation, Population defragmentation

IrHC2019