

<https://tbj.ui.ac.ir/?lang=en>

**Taxonomy and Biosystematics**

E-ISSN: 2322-2190

Document Type: Research Paper

Vol. 17, Issue 1, No.62, (2025), P: 25-40

Received: 07/10/2024

Accepted: 04/01/2025

## Study of morphological and biochemical diversity in some violet species (*Viola* spp.)

**Seyed Hossein Mohammadi**

Ph.D. Student, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran  
Mohammadihosein22@gmail.com

**Mohammad Rabiei\*** 

Assistant Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran  
rabiei@sku.ac.ir

**Behrouz Shiran**

Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran  
Beshiran45@gmail.com

**Mahboobeh Zarrabi**

Associate Professor of Biophysics, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Iran  
mzarrabi@alzahra.ac.ir

### Abstract

To investigate the morphological and biochemical diversity and determine their relationships, 22 ecotypes of the violet medicinal plant (*Viola* spp.), comprising five species, were collected from different regions of Gilan, Mazandaran, and Chaharmahal and Bakhtiari provinces. Morphological traits, including root length, flowering stem height, number of leaves, leaf length and width, sepal length and width, and petal length and width, were measured. Biochemical traits, including chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids, anthocyanin, and mucilage, were also evaluated. Significant differences were observed among the studied species in terms of root length, number of leaves, and petal length. Based on the mean comparison of morphological traits, *V. sieheana* and *V. reichenbachiana* exhibited greater affinity. Regarding anthocyanin and carotenoid content, a significant difference was noted among the species. The mean comparison of biochemical traits revealed a similarity between *V. odorata* and *V. alba*. Finally, cluster analysis grouped the studied species into three distinct clusters: the first cluster included *V. odorata* and *V. alba*, the second cluster comprised *V. ignobilis*, and the third cluster included *V. sieheana* and *V. reichenbachiana*.

**Keywords:** violet species, ecotype, diversity, morphological traits, biochemical traits, cluster analysis

### Introduction

The use of morphological, biochemical, and physiological traits remains one of the traditional methods for classifying and evaluating plant diversity and is still widely applied in various studies. The distribution of a species across different geographical and altitudinal regions induces diversity in its morphological and physiological characteristics. This diversity, driven by environmental factors, can result in population differentiation in many species. The medicinal plant violet (*Viola* spp.) has been used for centuries to treat inflammation, eczema, skin itching, rheumatism, chronic coughs, acute bronchitis, sore throat, and other ailments. Its flowers and leaves are rich in essential oils, salicylic acid, saponins, polyphenols, alkaloids, and flavonoids. One of the most significant active compounds in this genus is a group of mini-peptides known as cyclotides, including cycloviolacin. This plant is a valuable genetic resource for pharmaceutical, phytomedicine, and breeding research. The plant extract contains a diverse array of secondary metabolites, enabling the production of medicines, combating pathogens and pests, and resisting biotic and abiotic stresses. To fully utilize the potential of this medicinal plant, it is essential to conduct comprehensive research on the morphological, biochemical, and molecular traits of various species and ecotypes of violets. The

\*Corresponding author

Mohammadi, H. Rabiei, M. Shiran, B. and Zarrabi, M (2025). The study of Morphological and Biochemical diversity in some violet species (*Viola* spp.). *Taxonomy and Biosystematics*, 17(1), 25-40.

2322-2190 © The Author(s).

Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC BY-NC 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>).



<http://dx.doi.org/10.22108/tbj.2025.142974.1283>



observed differences in morphological traits, biochemical contents, secondary metabolites, and molecular diversity among violet species emphasize the importance of studying these aspects in detail. This research aims to investigate the morphological and biochemical diversity of some species of the medicinal plant violet. Understanding the genetic diversity of this plant will significantly enhance efforts to identify the status of its genetic resources and provide valuable information for future studies on its applications.

### Materials & Methods

In this study, to determine the affinities and distances among species, morphological and biochemical traits of violet species were analyzed across 22 ecotypes representing 5 different species, including *Viola odorata* L. (7 ecotypes), *V. alba* Besser (6 ecotypes), *V. ignobilis* Rupr. (3 ecotypes), *V. sieheana* W. Becker (3 ecotypes), and *V. reichenbachiana* Jord. ex Boreau (3 ecotypes). Five plant samples from each ecotype were collected from their natural habitats, with precise locations recorded using the Universal Transverse Mercator (UTM) coordinate system (Table 1). Simultaneously, herbarium samples were prepared for identification, verification, and herbarium code assignment and were sent to the herbarium of SFAHAN for registration and storage. At the sampling sites, morphological traits were measured with a precision of 1 millimeter. These traits included root length, flowering stem height, number of leaves, leaf length and width, sepal length and width, and petal length and width. Statistical analyses were performed using SAS statistical software. For the extraction of metabolites and biochemical compounds, complete plant samples from each ecotype were collected. Fresh petals and leaves were immediately frozen in liquid nitrogen and transferred to a -80°C freezer until extraction. The measured biochemical traits included photosynthetic pigments, carotenoids, mucilage, and anthocyanin content. Finally, statistical analyses, including variance analysis, mean trait comparison, and cluster analysis, were conducted using the data obtained from the measurements of morphological and biochemical traits. The affinities among violet species were examined based on the results of these analyses.

### Research Findings

The study compared the morphological traits of five violet species, revealing that *Viola sieheana* had the longest average root length, while *V. odorata* had the shortest. No significant differences were observed between *V. sieheana* and *V. reichenbachiana* for all examined traits. Analysis of variance showed a significant difference at the 5% level among species for root length. Positive and significant correlations were identified between root length and leaf length, while negative correlations were observed with petal width at the 5% level. *V. odorata* exhibited the longest average stem length, whereas *V. ignobilis* had the shortest. No significant differences were detected among the species for stem length. Positive correlations at the 1% level were noted between stem height and sepal length. The highest number of leaves was recorded in *V. sieheana* and *V. reichenbachiana*, while the lowest was found in *V. odorata*, with significant differences at the 1% level. Negative correlations at the 1% level were identified between the number of leaves and petal width. No significant differences were observed for leaf length and width or sepal length and width. Regarding petal length, *V. sieheana* had the longest petals, followed by *V. odorata*, with significant differences at the 5% level. In terms of biochemical traits, *V. sieheana* exhibited the highest chlorophyll a content, whereas *V. odorata* showed the highest chlorophyll b content. However, no significant differences were observed among the species for these traits. Positive correlations at the 5% level were found between chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoid content. *V. ignobilis* had the highest carotenoid and anthocyanin contents. Cluster analysis grouped the ecotypes into two main clusters. The first cluster included 14 ecotypes comprising *V. odorata*, *V. alba*, and *V. ignobilis*. The second cluster consisted of 8 ecotypes, including *V. reichenbachiana* and *V. sieheana*.


### Discussion of Results & Conclusion

Morphological evaluation plays a vital role in managing collections, confirming sample identities, identifying errors in identification, and determining phenological relationships. Although violet plants grow wild in some forests of Iran, particularly in the northern regions, limited research has been conducted on their morphological and biochemical characteristics. The distribution of species across different geographical and altitudinal regions contributes to diversity in their morphological and biochemical traits. In this study of five violet species, significant differences were observed in root length, number of leaves, and petal length. Among the studied species, *Viola odorata* and *V. alba* exhibited a wide distribution across various altitudes, whereas the other species were primarily found in mountainous and high-altitude regions. Morphological trait measurements revealed that the longest leaf lengths were recorded in low-altitude areas, while the longest root lengths were observed in high-altitude areas. This suggests that in low-altitude regions, where soil development constraints are minimal and nutrients are readily available, roots penetrate less deeply and grow more superficially. As a result, the aerial parts, such as the number of leaves, leaf dimensions, and stem length, show improved growth. In the biochemical and phytochemical trait analysis, significant differences were found in carotenoid and anthocyanin content among species, while no significant differences were observed for mucilage content. The findings indicate that biochemical synthesis in violets tends to increase at higher altitudes. By combining morphological and biochemical data, the study clustered *V. odorata* and *V. alba* together, while *V. reichenbachiana* and *V. sieheana* formed another group, with *V. ignobilis* displaying intermediate traits. These results highlight the importance of integrating morphological and biochemical evaluations for understanding species diversity. However, further studies focusing on molecular and genetic diversity assessments are recommended to achieve more precise and comprehensive results.

## بررسی تنوع مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در برخی از گونه‌های گیاه دارویی بنفشه

سید حسین محمدی، دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، ایران

Mohammadihosein22@gmail.com

محمد ربیعی\* ، استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، ایران

rabiei@sku.ac.ir

بهروز شیران، استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، ایران

beshiran45@gmail.com

محبوبه ضرابی، دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

mzarrabi@alzahra.ac.ir

### چکیده

به منظور بررسی تنوع مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و تعیین شباهت‌ها و فواصل خویشاوندی، تعداد ۲۲ اکوتیپ گیاه دارویی بنفشه (*Viola spp.*) که شامل ۵ گونه بودند، از مناطق مختلف استان‌های گیلان، مازندران و چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شدند. صفات مورفولوژیکی شامل طول ریشه، ارتفاع ساقه گل‌دهنده، تعداد برگ، طول و عرض برگ، طول و عرض کاسبرگ و طول و عرض گلبرگ و صفات بیوشیمیایی شامل کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین و موسیلاژ اندازه‌گیری شدند. گونه‌های مطالعه‌شده از نظر صفات طول ریشه، تعداد برگ و طول گلبرگ اختلاف معنی‌داری داشتند. با توجه به مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی، دو گونه *V. sieheana* و *V. reichenbachiana* قرابت بیشتری را نشان دادند. از نظر میزان آنتوسیانین و کاروتنوئیدها تفاوت معنی‌داری بین گونه‌های مورد مطالعه مشاهده شد. از مقایسه میانگین صفات بیوشیمیایی نیز شباهت دو گونه *V. odarata* و *V. alba* منتج شد. در نهایت به منظور تعیین شباهت‌ها و فواصل خویشاوندی و با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای، ۵ گونه بنفشه در ۳ خوشه جداگانه قرار گرفتند. خوشه اول شامل گونه‌های *V. odarata* و *V. alba* خوشه دوم شامل گونه *V. ignobilis* بود. خوشه سوم نیز گونه‌های *V. sieheana* و *V. reichenbachiana* را شامل شد.

**واژه‌های کلیدی:** گونه بنفشه، اکوتیپ، تنوع، صفات مورفولوژیکی، صفات بیوشیمیایی، تجزیه خوشه‌ای

\* مسئول مکاتبات

محمدی، حسین، ربیعی، محمد، شیران، بهروز و ضرابی، محبوبه. (۱۴۰۳). بررسی تنوع مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برخی از گونه‌های گیاه دارویی بنفشه تاکسونومی و بیوسستماتیک، ۱۷ (۱)، ۲۵-۴۰.



## مقدمه

در تمدن‌های گذشته گیاهان از تقدس بسیار بالایی برخوردار بوده‌اند؛ به طوری که از آنها به عنوان سلامت روح و جسم آدمی یاد شده است (Ghasemi, 2009). دسته‌ای از آنها گیاهان دارویی و معطر جنگلی هستند که در جنگل‌ها، بیشه‌های طبیعی و حاشیه جنگل‌ها به صورت خودرو می‌رویند و حاوی مواد مؤثر دارویی یا معطر هستند که به سه گروه گیاهان طبی، ادویه‌ای و عطری تقسیم‌بندی می‌شوند (Rao, 2004). نمونه‌هایی از گیاهان دارویی را می‌توان در خانواده بنفشه یافت. گیاهان خانواده Violaceae عموماً علفی و دارای گونه‌های بوته‌ای معدودی هستند که بیشتر در نواحی معتدل می‌رویند. بخش عمده گیاهان این خانواده متعلق به جنس *Viola* است که فراوانی آنها بیشتر در نواحی معتدل نیمکره شمالی است. جنس *Viola* یا بنفشه در ایران دارای گونه‌های مختلفی است؛ از جمله *Viola odorata* L. که بیشترین گونه رایج در جنگل‌های خزری است (Moradi et al., 2021).

گیاه دارویی بنفشه (*Viola* Spp.) سالیان متوالی برای درمان التهاب، آگزما، خارش پوستی، روماتیسم و سرفه‌های مزمن، رفع برونشیت‌های حاد، گلو درد و ... به کار می‌رود. گل‌ها و برگ‌های آن حاوی اسانس، اسید سالیسیلیک، ساپونین‌ها، پولین‌ها، برخی آلکالوئیدها و فلاونوئیدها است. مهم‌ترین ماده مؤثره در این جنس، گروه مینی پتیدی به نام سیلکوتیدها (Cyclotides) هستند که از جمله آنها سیکلوویولاسین (Cycloviolacin) است (Craik et al., 1999). این گیاه از ذخایر ژنتیکی با ارزش در زمینه مطالعات دارویی، گیاه‌پزشکی و به‌نژادی است. عصاره گیاهی شامل مجموعه متنوعی از متابولیت‌های ثانویه است که قابلیت تهیه دارو، مقابله با پاتوژن‌ها و آفات گیاهی و جانوری و مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی را فراهم می‌کند. ضروری است برای بهره‌مندی از این گیاه دارویی مجموعه صفات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گونه‌های مختلف بنفشه و اکوتیپ‌های آنها به صورت کامل پژوهش و کنکاش شوند.

تفاوت در صفات مورفولوژیکی، محتوای بیوشیمیایی، متابولیت‌های ثانویه و تنوع در سطح مولکولی گونه‌های بنفشه، ضرورت مطالعه در تمام زمینه‌های فوق را روشن می‌کند. بررسی صفات مورفولوژیکی از جمله رنگ گل، قرابت واریته‌های جنس *Viola* را مطرح کرده است. در عین حال، در بعضی موارد تنوع درون گونه‌ای چشمگیری نیز مشاهده شده است (Marcussen & Borgen, 2000).

## تاریخچه موضوع و پیشینه پژوهش

استفاده از صفات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی یکی از روش‌های قدیمی برای طبقه‌بندی و ارزیابی تنوع گیاهان محسوب می‌شود که همچنان کاربرد وسیعی در مطالعات دارد. پراکنش یک گونه در مناطق مختلف جغرافیایی و ارتفاعی، سبب ایجاد تنوع در خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک آن می‌شود که این اختلاف می‌تواند از طریق اثر عوامل محیطی به تنوع جمعیت‌های اغلب گونه‌ها منجر شود (Lewinsohn & Jorge, 2024).

Asadi and Babaei (2012) در پژوهش خود ۲۲ نمونه از جمعیت‌های گیاهی بنفشه معطر ایرانی، *Viola alba* Besser را در مناطق شمالی کشور (استان‌های گیلان، مازندران و گلستان)، جمع‌آوری و ۱۶ صفت کمی را اندازه‌گیری کردند. براساس تجزیه خوشه‌ای، توده‌ها به سه دسته تقسیم شده‌اند که نتایج نشان دادند جمعیت‌های گیاهی قسمت‌های

مرکزی تا شرق دریای خزر به صورت کاملاً مجزا از توده‌های بخش غربی هستند. برای رسیدن به نتایج دقیق‌تر ضرورت ارزیابی داده‌های اقلیمی، آب و خاک و همچنین بررسی‌های مولکولی و تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها پیشنهاد شد. **Marcussen (2003)** اکوتیپ‌های مختلفی از گونه‌های بنفشه جمع‌آوری شده از نقاط مختلف اروپا، قفقاز و آذربایجان را با استفاده از ۶ ایزوآنزیم و مشخصه‌های مورفولوژیکی بررسی کرد. او نتایج حاصل از ارزیابی‌های مولکولی و مورفولوژیکی، اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از آذربایجان، قبرس و یونان را در یک گروه و اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق جنوبی اروپا و شرق اروپا را در گروهی دیگر قرار داد.

گل‌های بنفشه حاوی مقادیر زیادی از آنتوسیانین‌ها هستند. آنتوسیانین‌ها به دلیل داشتن ویژگی ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدالتهابی به سلامت بدن کمک می‌کنند (**Kong et al., 2003**). در پژوهش **Asadi and Babaei (2012)** مشاهده شد که کمترین میزان آنتوسیانین در گل‌های سفید رنگ و بیشترین مقدار در گل‌های بنفش است. با توجه به نقشه پراکندگی، میزان آن در گل‌های گیاهان مناطق شرق دریای خزر بیشتر از میزان آنتوسیانین در گل‌های غرب دریای خزر است. به نظر می‌رسد نور تأثیر به‌سزایی در سنتز آنتوسیانین‌ها داشته باشد؛ زیرا مناطق شرق دریای خزر دارای روزهای بارانی کمتر و روزهای آفتابی با نور بیشتر هستند. از جمله ترکیبات پلی‌ساکاریدی در بنفشه ترکیبات موسیلاژی هستند که در گیاه نقش‌های متفاوتی از جمله تحمل سرما، انتقال آب، پاسخ به زخم‌ها، تأثیر بر اثر متقابل پاتوژن و گیاه میزبان، تعادل یونی در سلول‌های گیاهی، ذخیره کربوهیدرات، ذخیره مواد و تنظیم فشار اسمزی دارند (**Franz, 1979**). مشخص شده است با افزایش سن گیاه، میزان موسیلاژ گیاه نسبت به مرحله گیاهچه‌ای افزایش می‌یابد و به‌خصوص در مرحله زایشی بیشترین مقدار نسبت به سایر مراحل مشاهده می‌شود؛ بنابراین، ضروری است در مطالعات بررسی تنوع گونه‌ها مرحله اندازه‌گیری ترکیبات موسیلاژی مشخص شود (**Shafqat & Zarinkemer, 2017**). در پژوهشی دیگر با موضوع اثر ارتفاع بر خصوصیات مورفولوژیکی و رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه بنفشه معطر مشخص شد میزان کاروتنوئیدها با افزایش ارتفاع کاهش می‌یابد. براساس نتایج حاصل، صفات مورفولوژیکی نسبت به صفات بیوشیمیایی تغییرات معنی‌دار بیشتری را تحت تأثیر ارتفاع از خود نشان دادند (**Zakaria nezhad et al., 2022**). در تحقیق مشابهی نتایج نشان دادند تنوع ریخت‌شناسی و فیتوشیمیایی در گونه *Viola odorata* در ارتفاعات مختلف معنی‌دار به دست آمد. این گونه در مقایسه با سایر گونه‌ها علاوه بر مواد مؤثر با ارزش دارویی از لحاظ میزان آنتی‌اکسیدان نیز از ظرفیت خوبی برخوردار بود که مقدار آن با توجه به محل رویش، همبستگی مستقیم و معنی‌داری با تغییرات ارتفاع از سطح دریا داشت. همچنین، ارتفاع از سطح دریا همبستگی منفی معنی‌داری را با صفات مورفولوژیکی نشان داد (**Moradi et al., 2021**).

**Asadi و همکاران (2015)** تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای را در ۳۷ جمعیت گیاهی جنس بنفشه مطالعه کردند. با بهره‌گیری از روش ISSR، ۱۱۷ باند تشکیل شد که ۵۹ باند دارای ویژگی پلی‌مورفیمی بودند. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، جمعیت‌های جمع‌آوری شده به ۴ گروه مجزا تقسیم شدند. گونه‌های *Viola odorata* و *V. alba* قرابت و شباهت ژنتیکی زیادی به هم نشان دادند؛ با این حال، جمعیت‌های گونه *V. alba* واقع در قسمت مرکزی و به سمت غرب دریای خزر شباهت ژنتیکی بسیار زیادی را به گونه *V. odorata* داشتند؛ اما جمعیت‌های این گونه در قسمت

مرکزی به شرق را براساس تفاوت‌هایی می‌توان در یک گروه مجزا قرار داد. Marcussen (2006) نیز در پژوهش خود به نتایج مشابهی رسیده بود. او پیشنهاد کرد به دلیل تفاوت زیاد گونه‌های مناطق خزر و آذربایجان و وجود تنوع ژنتیکی بیشتر درون گونه‌ای نسبت به مناطق اروپایی باید رده‌بندی جداگانه‌ای صورت گیرد. Mehrvarz & Yeganeh (2016) تنوع ژنتیکی و تمایز در گونه‌های جنس *Viola* را در جمعیت گیاهی مناطق شمالی ایران مطالعه کردند. با توجه به الگوی تنوع ایزوآنزیمی در گونه‌های مطالعه‌شده، زیرگونه‌های *caspia* و *sylvestroides* از گونه *V. caspia* (Rupr) دارای قرابت ژنتیکی نزدیکی بودند. گونه‌های *V. alba* و *V. Sintenisii* W. becker دارای تمایز ژنتیکی مشخص بودند. در بررسی تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های گونه بنفشه معطر، *V. odorata* در مناطق جامو و کشمیر و تجزیه خوشه‌ای براساس مارکرهای مولکولی توده اکوتیپ‌های این گونه در منطقه به سه زیرخوشه تقسیم شد. با توجه به تنوع بالای مشاهده‌شده در این گونه به ضرورت بهره‌گیری از آن به منظور حصول گونه‌های برتر در برنامه‌های اصلاحی منتج شد (Mahajan et al., 2014).

### روش کار و شیوه انجام مطالعه

در این پژوهش به منظور تعیین قرابت‌ها و فواصل گونه‌ها، اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گونه‌های بنفشه در ۲۲ اکوتیپ از ۵ گونه مختلف شامل *Viola odorata* (۱۷ اکوتیپ)، *V. alba* (۶ اکوتیپ)، *V. ignobilis* Rupr. (۳ اکوتیپ)، *V. sieheana* W. Becker (۳ اکوتیپ) و *V. reichenbachiana* Jord. ex Boreau (۳ اکوتیپ) انجام شد. از هر کدام از اکوتیپ‌ها تعداد پنج نمونه گیاهی از رویشگاه‌های طبیعی برداشت شد که با استفاده از مختصات UTM (Universal Transverse Mercator coordinate system) مکان آنها به‌طور دقیق مشخص شده بود (جدول ۱). همزمان نمونه‌های هرباریومی گونه‌ها نیز برای شناسایی، تصدیق و دریافت کد هرباریومی، تهیه و به هرباریوم بخش تحقیقات منابع طبیعی مرکز تحقیقات کشاورزی استان اصفهان با نام اختصاری SFAHAN ارسال، ثبت و نگهداری شدند. در محل نمونه‌برداری، صفات مورفولوژیکی گیاه شامل طول ریشه، ارتفاع ساقه گل‌دهنده، تعداد برگ، طول و عرض برگ، طول و عرض کاسبرگ و طول و عرض گلبرگ با دقت ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شدند و سپس با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری انجام گرفتند. برای استخراج متابولیت‌ها و ترکیبات بیوشیمیایی نیز نمونه‌های گیاه کامل از هر اکوتیپ، جمع‌آوری و برای اندازه‌گیری برخی ترکیبات بیوشیمیایی گلبرگ‌ها و برگ‌های تازه جمع‌آوری شدند و نمونه‌های گیاهی بلافاصله در تانک ازت مایع، منجمد و تا زمان استخراج به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

### صفات شیمیایی مورد ارزیابی

#### رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاروتنوئیدها

برای اندازه‌گیری کلروفیل a و b نمونه‌هایی از برگ‌های بالغ برداشته شدند که در ازت مایع منجمد شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند. ۰/۵ گرم از برگ توزین شد و با ۵۰ میلی‌لیتر حلال استون ۸۰ درصد سائیده شد. پس از استخراج با کاغذ صافی، نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۲ طول موج ۶۴۳ و ۶۶۰ نانومتر خوانده شدند. سپس اعداد خوانده‌شده در روابط زیر قرار داده شدند و میزان کلروفیل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر بیان شد (Mazumdar & Majumder, 2014).

$$a \text{ (A643)} = 0.777 - 9/93 \text{ (A660)} = \text{کلروفیل } a$$

$$b \text{ (A660)} = 2/81 - 17/6 \text{ (A643)} = \text{کلروفیل } b$$

$$\text{کل کلروفیل} = 7/12 \text{ (A660)} + 16/8 \text{ (A643)}$$

به منظور اندازه‌گیری میزان کاروتنوئیدها مطابق روش بالا محلول تهیه شد، از کاغذ صافی عبور داده و عصاره به دست آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۳ طول موج ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۴۰ نانومتر خوانده شد. اعداد در رابطه زیر قرار گرفتند و میزان کاروتنوئید بر حسب میکروگرم در گرم وزن تر به دست آمد (Mazumdar & Majumder, 2014).

$$\text{میزان کاروتنوئیدها} = 4/69 \text{ (A440)} - 0/268 \text{ (A645)} + 8/02 \text{ (A663)}$$

### استخراج موسیلاژ

به منظور استخراج موسیلاژها (هیدروکلونیدهای پلی ساکاریدی) پس از خشک شدن برگ‌های گیاه، به ۰/۵ گرم از پودر آنها ۵۰ میلی لیتر از اتانول ۹۶ درصد و سپس ۲۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. مخلوط حاصل هر ۱۰ دقیقه یک بار و به مدت ۱ ساعت توسط دستگاه شیکر به شدت تکان داده و سپس به مدت ۳ ساعت ساکن نگه داشته شد. پس از سانتریفیوژ کردن در دور ۲۰ هزار و به مدت ۵ دقیقه رسوب حاصل با مخلوط اتانول ۹۶ درصد و اسید استیک ۱ درصد به حجم ۶۰۰ میلی لیتر رسانده شد؛ در نهایت رسوب حاصل با اتانول سرد، شسته و خشک و توزین شد (Ghanem et al., 2010).

### اندازه‌گیری آنتوسیانین

به منظور استخراج آنتوسیانین بر اساس روش Francis و Chiriboga از متانول ۰/۱ درصد برای استخراج رنگریزه فلانوئیدی استفاده شد. ۰/۱ گرم از گلبرگ پودر شده در ۱ میلی لیتر متانول حل شد و یک روز در تاریکی قرار گرفت تا استخراج آنتوسیانین کامل شود. با بهره‌گیری از روش تفاوت pH، میزان جذب با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر و همراه با بافرهای با pH متفاوت تعیین شد (Delpozo et al., 2004).

در نهایت با داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی تجزیه و تحلیل‌های آماری شامل تجزیه واریانس، مقایسه میانگین صفات و تجزیه خوشه‌ای انجام شد و بر اساس نتایج به دست آمده قرابت گونه‌های بنفشه بررسی شد.

جدول ۱ - مختصات مکانی نمونه‌های جمع‌آوری شده از گونه‌های بنفشه

Table 1 - Geographical coordinates of collected samples of violet species

شماره نمونه	نام نمونه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع	منطقه / استان
۱	<i>V.odorata1</i>	۶۷۰۴۴۳	۴۰۱۹۵۹۳	۳۱۲	پلنگ دره / مازندران
۳	<i>V.odorata2</i>	۵۹۶۶۰۳	۴۰۳۴۵۶۸	۲۳۲	پارک کشپل / مازندران
۵	<i>V.odorata3</i>	۵۷۴۱۰۸	۴۰۴۶۲۸۰	۲۹	صلاح الدین کلا / مازندران
۶	<i>V.odorata4</i>	۵۷۱۵۱۲	۴۰۴۸۲۴۵	۵	سی سنگان / مازندران
۸	<i>V.odorata5</i>	۴۵۷۰۲۸	۳۵۶۴۷۹۳	۲۰۱۸	پیر غار / چهار محال و بختیاری
۹	<i>V.odorata6</i>	۳۰۹۱۲۷	۴۱۷۲۰۰۹	۱۵۶۹	لاکه تاشون / گیلان
۱۰	<i>V.odorata7</i>	۳۱۷۵۲۶	۴۱۷۷۶۲۹	۶۲۹	نارنجه دول / گیلان
۲	<i>V.alba1</i>	۶۷۰۴۴۳	۴۰۱۹۵۹۳	۳۱۲	پلنگ دره / مازندران
۴	<i>V.alba2</i>	۶۰۰۰۵۵	۴۰۴۸۲۴۴	-۸	پارک جنگلی نور / مازندران
۷	<i>V.alba3</i>	۵۷۱۵۱۲	۴۰۴۸۲۴۵	۵	سی سنگان / مازندران
۱۱	<i>V.alba4</i>	۳۰۹۱۲۷	۴۱۷۲۰۰۹	۱۵۶۹	لاکه تاشون / گیلان
۱۲	<i>V.alba5</i>	۳۱۷۵۲۶	۴۱۷۷۶۲۹	۶۲۹	نارنجه دول / گیلان
۱۳	<i>V.alba6</i>	۳۰۴۰۹۶	۴۱۶۶۸۰۷	۵۸۷۱	اسبه هونی / گیلان
۱۷	<i>V.ignobilis1</i>	۳۰۶۷۱۸	۴۱۶۸۱۳۱	۴۵۸۳	فوشه معدن / گیلان
۱۸	<i>V.ignobilis2</i>	۳۰۴۰۹۶	۴۱۶۶۸۰۷	۵۸۷۱	اسبه هونی / گیلان
۱۹	<i>V.ignobilis3</i>	۲۹۹۷۷۰	۴۱۶۵۰۵۲	۶۵۲۷	لرزوه / گیلان
۲۰	<i>V.sieheana1</i>	۳۰۹۱۲۷	۴۱۷۲۰۰۹	۱۵۶۹	لاکه تاشون / گیلان
۲۱	<i>V.sieheana2</i>	۳۲۵۴۹۶	۴۱۶۸۹۶۷	۳۲	پارک درستکار / گیلان
۲۲	<i>V.sieheana3</i>	۳۱۷۵۲۶	۴۱۷۷۶۲۹	۶۲۹	نارنجه دول / گیلان
۱۴	<i>V.reichenbachiana1</i>	۳۰۴۰۹۶	۴۱۶۶۸۰۷	۵۸۷۱	اسبه هونی / گیلان
۱۵	<i>V.reichenbachiana2</i>	۳۰۶۷۱۸	۴۱۶۸۱۳۱	۴۵۸۳	فوشه معدن / گیلان
۱۶	<i>V.reichenbachiana3</i>	۳۰۱۵۲۳	۴۱۶۴۴۵۹	۵۹۷۴	دو خاله کوه / گیلان

### یافته‌های پژوهش

بررسی میانگین صفات مورفولوژیکی ۵ گونه بنفشه نشان داد از نظر طول ریشه، گونه *Viola sieheana* دارای بلندترین میانگین طول ریشه و کمترین متعلق به گونه *V. odorata* بود (جدول ۳). بین دو گونه *V. odorata* و *V. sieheana* اختلاف از نظر تمام صفات بررسی شده تفاوت معنی دار وجود نداشت. نتایج تجزیه واریانس صفات نیز اختلاف معنی داری را در سطح ۵ درصد بین گونه‌های بنفشه از نظر ریشه نشان دادند (جدول ۲). با توجه به جدول ۴، همبستگی بین طول ریشه با طول برگ، مثبت و معنی دار و با صفت عرض گلبرگ منفی و معنی دار در سطح ۵ درصد به دست آمد. بلندترین میانگین طول ساقه مربوط به گونه *V. odorata* و کمترین طول ساقه در گونه *V. ignobilis* مشاهده شد (جدول ۳)؛ اما با توجه به جدول تجزیه واریانس بین گونه‌ها از نظر این صفت اختلاف معنی داری حاصل نشد (جدول ۲). بین ارتفاع ساقه و طول کاسبرگ همبستگی مثبت و معنی داری در سطح ۱ درصد مشاهده شد (جدول ۴). مشابه با صفت طول ریشه، بیشترین تعداد برگ در گونه‌های *V. sieheana* و *V. reichenbachiana* و کمترین تعداد برگ در



گونه *V. odorata* مشاهده شد (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را در سطح ۱ درصد بین گونه‌ها از نظر تعداد برگ نشان داد (جدول ۲). بین صفات تعداد برگ و عرض گلبرگ نیز همبستگی منفی و معنی‌داری در سطح ۱ درصد به دست آمد (جدول ۴). از نظر صفات طول و عرض برگ و همچنین طول و عرض کاسبرگ بین گونه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲ و ۳). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها بیشترین طول گلبرگ در گونه *V. sieheana* و پس از آن در گونه *V. odorata* مشاهده شد (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری را بین گونه‌ها از نظر طول گلبرگ در سطح ۵ درصد نشان داد؛ اما از نظر عرض گلبرگ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). به طور خلاصه بررسی برخی صفات مورفولوژیکی به قرابت و نزدیکی دو گونه *V. sieheana* و *V. reichenbachiana* منتج شد.

با بررسی گونه‌ها از نظر صفات بیوشیمیایی بالاترین میزان کلروفیل a در گونه *Viola sieheana* و بالاترین میزان کلروفیل b در گونه *V. odorata* به دست آمد (جدول ۶)؛ هرچند با توجه به جدول تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری بین گونه‌ها از نظر میزان کلروفیل a و کلروفیل b مشاهده نشد (جدول ۵). براساس جدول ضرائب همبستگی بین صفات کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها همبستگی بالای مثبت و معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۷). با توجه به تفاوت معنی‌دار گونه‌ها از نظر میزان کاروتنوئیدها، بیشترین میزان در گونه *V. ignobilis* مشاهده شد و دو گونه *V. odorata* و *V. alba* از نظر میزان کاروتنوئیدها با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند. مشابه با برآورد میزان کاروتنوئیدها در گونه‌ها، بیشترین میزان آنتوسیانین در گونه *V. ignobilis* به دست آمد (جدول ۵ و ۶). با توجه به رنگ گل، سه گونه *V. odorata*، *V. ignobilis* و *V. reichenbachiana* از نظر میزان آنتوسیانین در گل‌ها تفاوت معنی‌داری نداشتند (جدول ۶). گونه‌ها از نظر ترکیبات موسیلاژی تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. خلاصه بررسی گونه‌ها از نظر ترکیبات بیوشیمیایی قرابت و نزدیکی دو گونه *V. odorata* و *V. alba* را نشان داد. از مطالعات قبلی نیز نتایج مشابهی حاصل شده بودند (Asadi et al., 2015).

به منظور حصول نتیجه و تعیین قرابت گونه‌های مطالعه‌شده و با جمع تمام داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، تجزیه خوشه‌ای به روش flexible و با استفاده از برنامه آماری SAS انجام شد (شکل ۱). نتایج حاصل نشان دادند از ۲۲ اکوتیپ ۵ گونه بنفشه، ۱۴ اکوتیپ در خوشه اول شامل گونه‌های غالب *Viola odorata*، *V. alba* و *V. ignobilis* و ۱۸ اکوتیپ در خوشه دوم شامل گونه‌های غالب *V. reichenbachiana* و *V. sieheana* قرار گرفتند. در زیرگروه خوشه اول اکوتیپ‌های گونه *V. ignobilis* در دسته‌ای جداگانه و متمایز جای گرفتند. در خوشه دوم فقط دو اکوتیپ از گونه *V. odorata* که متعلق به منطقه پیرغار استان چهارمحال و بختیاری و منطقه لاکه‌تاشون استان گیلان بودند، با گونه‌های غالب خوشه دوم قرابت نشان دادند.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی اکوتیپ‌های گونه‌های بنفشه

Table 2- Analysis of variance of morphological traits in violet species

منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه	ارتفاع ساقه	تعداد برگ	طول برگ	عرض برگ	طول کاسبرگ	عرض کاسبرگ	طول گلبرگ	عرض گلبرگ
گونه‌ها	۴	۲۷/۸۱*	۳/۴۳	۱۰۵/۹۱**	۱/۳۳	۰/۹۱	۰/۰۲	۰/۰۰۱۸	۰/۰۶*	۰/۰۴۶
خطا	۱۷	۷/۶۳	۱/۴۸	۱۵/۳۴	۰/۷۰	۰/۷۰	۰/۰۱	۰/۰۰۶	۰/۰۲۳	۰/۰۲
ضریب تغییرات		۱۷/۹۶	۱۷/۱۵	۳۶/۰۶	۳۰/۲۹	۳۳/۶۶	۲۰/۳۵	۵۳/۰۴	۱۱/۸۶	۲۰/۹۹

\* و \*\* به ترتیب همبستگی معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های صفات مورفولوژیکی گونه‌های بنفشه

Table 3- Mean comparison of morphological traits in violet species

گونه‌ها	طول ریشه (cm)	ارتفاع ساقه (cm)	تعداد برگ (cm)	طول برگ (cm)	عرض برگ (cm)	طول کاسبرگ (cm)	عرض کاسبرگ (cm)	طول گلبرگ (cm)	عرض گلبرگ (cm)
<i>V. odorata</i>	b <sub>13/37</sub>	ab <sub>8/82</sub>	c <sub>6/71</sub>	ab <sub>2/84</sub>	a <sub>2/65</sub>	ab <sub>0/57</sub>	a <sub>0/17</sub>	ab <sub>1/32</sub>	ab <sub>0/80</sub>
<i>V. alba</i>	b <sub>13/68</sub>	abc <sub>6/6</sub>	bc <sub>10/5</sub>	b <sub>2/01</sub>	a <sub>1/85</sub>	ab <sub>0/51</sub>	a <sub>0/13</sub>	b <sub>1/26</sub>	ab <sub>0/68</sub>
<i>V. ignobilis</i>	a <sub>17/86</sub>	bc <sub>5/56</sub>	c <sub>8</sub>	ab <sub>2/30</sub>	a <sub>2/93</sub>	b <sub>0/43</sub>	a <sub>0/13</sub>	b <sub>1/16</sub>	b <sub>0/56</sub>
<i>V. sieheana</i>	a <sub>18/26</sub>	ab <sub>7/96</sub>	abc <sub>16</sub>	ab <sub>2/96</sub>	a <sub>2/70</sub>	ab <sub>0/66</sub>	a <sub>0/16</sub>	ab <sub>1/53</sub>	ab <sub>0/63</sub>
<i>V. reichenbachiana</i>	a <sub>18/1</sub>	abc <sub>7/23</sub>	ab <sub>19</sub>	ab <sub>3/33</sub>	a <sub>2/80</sub>	b <sub>0/46</sub>	a <sub>0/13</sub>	b <sub>1/23</sub>	b <sub>0/56</sub>

میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری از لحاظ

آماري ندارند.

جدول ۴- ضرایب همبستگی ساده بین صفات مورفولوژیکی اکوتیپ‌های بنفشه، اندازه‌گیری شده به روش پیرسون

Table 4- Pearson's correlation of coefficients among morphological traits in violet ecotypes

	عرض گلبرگ	طول گلبرگ	عرض کاسبرگ	طول کاسبرگ	عرض برگ	طول برگ	تعداد برگ	ارتفاع ساقه	طول ریشه
عرض گلبرگ	۱								
طول گلبرگ	۰/۳۹*	۱							
عرض کاسبرگ	-۰/۱۲	-۰/۱۲	۱						
طول کاسبرگ	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۵۲*	۱					
عرض برگ	۰/۲۳	-۰/۱۰	۰/۵۹**	۰/۲۳	۱				
طول برگ	-۰/۳۸	-۰/۱۳	۰/۳۹	۰/۰۵	۰/۹۱**	۱			
تعداد برگ	-۰/۴۲*	۰/۲۶	-۰/۰۹	-۰/۲۲	۰/۰۶	۰/۱۹	۱		
ارتفاع ساقه	۰/۲۰	۰/۲۳	۰/۲۰	۰/۶۴**	۰/۱۹	۰/۱۵	-۰/۲۶	۱	
طول ریشه	-۰/۴۹*	-۰/۱۷	۰/۲۰	-۰/۰۰۵	۰/۳۱	۰/۴۲*	۰/۴۱	۰/۰۰۱	۱

\* و \*\* به ترتیب همبستگی معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد

جدول ۵- تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی اکوتیپ‌های گونه‌های بنفشه

Table 5- Analysis of variance of biochemical traits in violet ecotypes

موسیلاژ	آنتوسیانین	کاروتنوئیدها	کلروفیل b	کلروفیل a	درجه آزادی	منابع تغییرات
۰/۰۰۰۰۲	۵۹۴/۱**	۴۵/۲۹*	۹/۱۱	۱۷/۶۲	۴	اکوتیپ‌ها
۰/۰۰۰۰۷	۸۵/۰۹	۱۰/۶۰	۱۱/۳۹	۸/۷۰	۱۷	خطا
۶/۳۴	۴۶/۲۲	۲۴/۴۶	۶۴/۵۳	۳۳/۶۵		ضریب تغییرات

\* و \*\* به ترتیب همبستگی معنی دار در سطح ۵٪ و ۱٪

جدول ۶- مقایسه میانگین‌های صفات بیوشیمیایی گونه‌های بنفشه

Table 6- Mean comparison of biochemical traits in violet species

موسیلاژ	آنتوسیانین	کاروتنوئیدها	کلروفیل b	کلروفیل a	گونه‌ها
gr	mg/l	µg/gr	mg/gr	mg/gr	
a./۱۳۴۷	ab <sub>۲۸/۶۱</sub>	bcd <sub>۱۱/۶۲</sub>	a <sub>۶/۷۰</sub>	abc <sub>۸/۱۵</sub>	<i>V. odorata</i>
a./۱۳۸۶	bc <sub>۱۰/۲۸</sub>	bcd <sub>۱۳/۴۴</sub>	a <sub>۴/۲۴</sub>	abc <sub>۸/۶۱</sub>	<i>V. alba</i>
a./۱۳۶۴	ab <sub>۳۳/۴۷</sub>	ab <sub>۱۸/۵۸</sub>	a <sub>۵/۸۲</sub>	ab <sub>۱۲/۱۰</sub>	<i>V. ignobilis</i>
a./۱۳۳۴	c <sub>۴/۲۸</sub>	abc <sub>۱۶</sub>	a <sub>۵/۳۱</sub>	abc <sub>۱۰/۱۹</sub>	<i>V. sieheana</i>
a./۱۳۹۰	ab <sub>۲۱/۲۵</sub>	cd <sub>۸/۹۹</sub>	a <sub>۳/۰۵</sub>	bc <sub>۵/۷۰</sub>	<i>V. reichenbachiana</i>

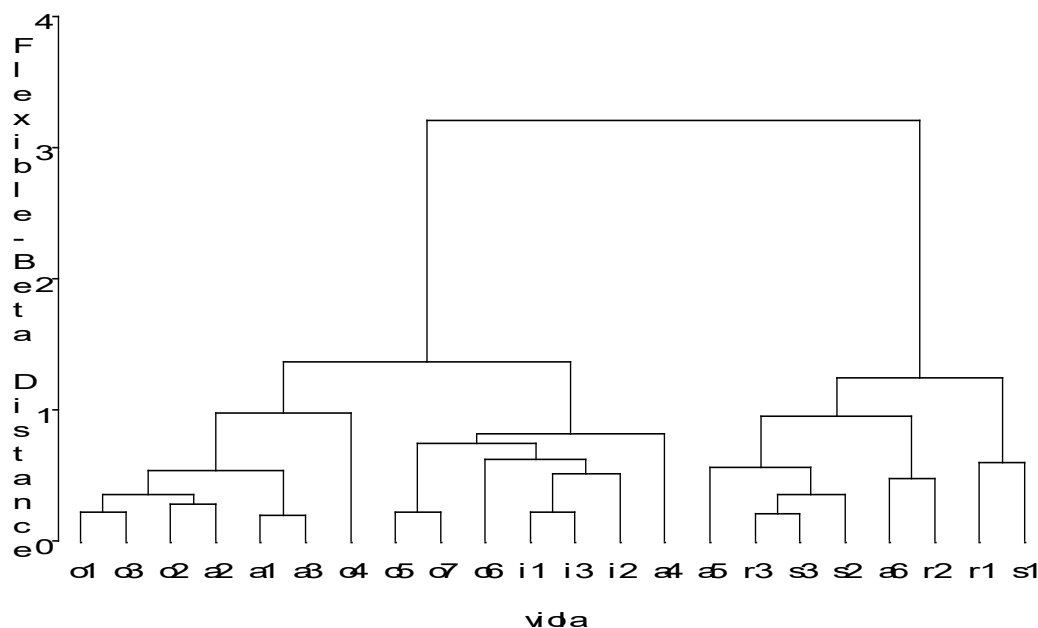
جدول ۷- ضرایب همبستگی ساده بین صفات بیوشیمیایی اکوتیپ‌های بنفشه، اندازه‌گیری شده به روش پیرسون

Table 7- Pearson's correlation coefficients among biochemical traits of violet ecotypes

صفات	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئیدها	آنتوسیانین	موسیلاژ
کلروفیل a	۱	۰/۵۷**		۰/۸۹**	۰/۲۱
کلروفیل b		۱		۰/۶۲**	-۰/۰۳
کاروتنوئیدها			۱	-۰/۱۹	۰/۱۸
آنتوسیانین				۱	-۰/۲۱
موسیلاژ					۱

\* و \*\* به ترتیب همبستگی معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

میانگین‌های با حروف مشترک در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری از لحاظ آماری ندارند.



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای گونه‌های بنفشه به روش flexible با استفاده از صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی

Figure 1- Cluster analysis of violet species based on flexible method using morphological and biochemical traits

o1: *V. odorata*1, o2: *V. odorata*2, o3: *V. odorata*3, o4: *V. odorata*4, o5: *V. odorata*5, o6: *V. odorata*6, o7: *V. odorata*7, a1: *V. alba*1, a2: *V. alba*2, a3: *V. alba*3, a4: *V. alba*4, a5: *V. alba*5, a6: *V. alba*6, i1: *V. ignobilis*1, i2: *V. ignobilis*2, i3: *V. ignobilis*3, s1: *V. sieheana*1, s2: *V. sieheana*2, s3: *V. sieheana*3, r1: *V. reichenbachiana*1, r2: *V. reichenbachiana*2, r3: *V. reichenbachiana*3.

### بحث، تحلیل و نتیجه‌گیری

ارزیابی مورفولوژیکی می‌تواند در مدیریت کلکسیون‌ها، تأیید هویت نمونه‌ها و تشخیص اشتباهات در شناسایی و نیز تعیین روابط فیلوژنتیکی کمک کند. با وجود اینکه گیاه بنفشه به صورت خودرو در جنگل‌های برخی از مناطق ایران به خصوص مناطق شمالی رشد می‌کند؛ تحقیقات زیادی دربارهٔ ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی صورت نگرفته است. پراکنش گونه‌ها در مناطق مختلف جغرافیایی و ارتفاعی سبب ایجاد تنوع در صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گونه‌ها می‌شود.

در ارزیابی صفات مورفولوژیکی در پژوهش حاضر مشاهده شد گونه‌ها از نظر صفات طول ریشه، تعداد برگ و طول گلبرگ تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. گونه‌ها بیشتر در نواحی کوهستانی و ارتفاعات بالا مشاهده و جمع‌آوری شدند؛ به جز دو گونه *Viola odorata* و *V. alba* که دارای گستره وسیعی از پراکندگی در ارتفاعات متنوع بودند. در نهایت، اندازه‌گیری صفات روی گونه‌های بنفشه، بیشترین طول برگ را در مناطق با ارتفاع کم و بیشترین طول ریشه را در مناطق مرتفع نشان داد. در پژوهش مشابهی نیز در منطقه ساری با ارتفاع ۵۶ متر از سطح دریا بیشترین طول برگ، تعداد برگ، طول ساقه گل‌دهنده و کمترین طول ریشه به دست آمد. می‌توان نتیجه گرفت در مناطق با ارتفاع کم به دلیل عدم

محدودیت تکامل خاک و در دسترس بودن مواد غذایی ریشه‌ها با صرف انرژی کمتر از نظر طولی در عمق کمتری از خاک نفوذ کرده و اغلب به صورت سطحی گسترش یافته‌اند که پیامد آن رشد و نمو مناسب‌تر اندام‌های هوایی مانند تعداد برگ، ابعاد برگ و طول ساقه است (Moradi et al., 2021).

در بررسی صفات بیوشیمیایی و فیتوشیمیایی بین گونه‌ها از نظر میزان کاروتنوئیدها و آنتوسیانین تفاوت معنی‌دار شد؛ اما از نظر میزان موسیلاژ که در مرحله زایشی اندازه‌گیری شد، اختلاف معنی‌دار نبود. بررسی میزان موسیلاژ در مراحل رشدی گیاه بنفشه نشان داد با افزایش سن گیاه میزان موسیلاژ نسبت به مراحل گیاهچه‌ای افزایش می‌یابد؛ اما افزایش آن در شرایط مختلف رشد روند متفاوتی را نشان می‌دهد و در مرحله زایشی بیشترین میزان نسبت به سایر مراحل مشاهده می‌شود (Shafqat & Zarinkemer, 2017). درباره صفات فیتوشیمیایی نیز پژوهش‌ها نشان می‌دهند مقدار آنها در گیاهان مناطق مرتفع و جنگلی به دلیل کاهش نور و افزایش سایه کاهش می‌یابد (Moradi et al., 2021). در بررسی پراکنش میزان آنتوسیانین در گل‌های جمع‌آوری شده توسط Asadi and Babaei (2012) مشخص شد میزان آنتوسیانین در گیاهان نواحی شرقی ساحل دریای خزر با روزهای بارانی کمتر، بیشتر از گیاهان نواحی غربی است. به طور کلی ارتفاع از دریا، درجه حرارت، رطوبت، شدت نور، طول دوره رشد، تغییرات هورمونی و تغذیه‌ای گیاه و ... عواملی هستند که بر تغییرات کمی و کیفی صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه مؤثرند. مشاهده شده است در مناطق بالاتر عامل محیطی باعث تشدید بیان ژن‌های تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه مؤثر در محافظت از گیاهان می‌شود و گیاهان این تریکیات را به عنوان مکانیسم دفاعی از خود سنتز و ذخیره می‌کنند. در گیاه بنفشه نیز سنتز تریکیات بیوشیمیایی بیشتر در ارتفاع‌های بالاتر مشاهده شده است (Moradi et al., 2021). در مطالعه‌ای روی گیاه بنفشه این نتیجه حاصل شد که صفات مورفولوژیکی بیش از صفات بیوشیمیایی تحت تأثیر اختلاف ارتفاع قرار دارند؛ به طوری که با افزایش ارتفاع کاهش مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاروتنوئیدها مشاهده می‌شود؛ اما این کاهش در صفات مورفولوژیکی مانند طول برگ با تغییرات معنی‌دار مواجه است (Zakaria nezhad et al., 2022).

در این مطالعه با توجه به تلفیق نتایج حاصل از داده‌های صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در ۵ گونه بنفشه مورد مطالعه و با لحاظ شرایط اقلیمی در زمان اندازه‌گیری صفات، بررسی قرابت گونه‌ها منتج به قرار گرفتن دو گونه *Viola odorata* و *V. alba* در یک گروه و دو گونه *V. reichenbachiana* و *V. sieheana* در گروه دیگر شد. در این مقایسه گونه *V. ignobilis* صفات و ویژگی‌های حد واسط از خود نشان داد؛ هرچند نتایج دقیق‌تر از طریق ارزیابی داده‌های اقلیمی، آب و خاک و به نحو مطلوب‌تر از طریق مطالعات مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی با کمک نشانگرها میسر خواهد شد. در مطالعات انجام‌شده هم تنوع داخل گونه‌ها و هم تنوع بین گونه‌ای بررسی می‌شود. در بررسی تنوع داخل گونه‌ای بعضاً مشاهده شده است که اکوتیپ‌های یک گونه شباهت بیشتری با گونه دیگر نشان داده‌اند و خود گونه در مناطق مختلف به چندین توده جداگانه تفکیک شده است (Mahajan et al., 2014).

در بررسی تنوع بین گونه‌ای گیاه بنفشه براساس تنوع آلوزایمی توسط Mehrvarz and Yeganeh (2016) دو گونه *Viola reichenbachiana* و *V. rupestris* F.W.Schmidt در یک خوشه و با صفات متمایز از گونه *V. caspia* قرار گرفتند. همچنین گونه‌های *V. odorata* و *V. sintenissii* در خوشه متمایز از گونه *V. odorata* جای گرفتند. در مطالعه

تنوع بین و داخل گونه‌ای با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و تعیین میزان شباهت و فاصله ژنتیکی، دو گونه *V. odorata* و *V. alba* در نوار ساحلی خزر توسط **Asadi و همکاران** (2015) بررسی شدند. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، بیشتر اکوتیپ‌های گونه *V. alba* از بخش مرکزی ساحل دریای خزر به سمت شرق در یک گروه مجزا از گونه *V. odorata* قرار داشتند و از طرف دیگر اکوتیپ‌های گونه *V. alba* از بخش مرکز به سمت غرب از نظر ژنتیکی بسیار نزدیک به گونه *V. odorata* بودند و هرچه از شرق به غرب ساحل دریای خزر می‌رویم، شباهت دو گونه بیشتر می‌شود. در کل براساس ضرائب تشابه ژنتیکی، دو گونه مطالعه‌شده شباهت ژنتیکی زیاد و فاصله ژنتیکی بسیار کمی داشتند. در پژوهش مشابهی که توسط **Asadi and Babaei** (2012) روی تنوع مورفولوژیکی گونه *V. alba* انجام شد نیز نتایج قابل تطبیق با تنوع ژنتیکی به دست آمد؛ به طوری که اکوتیپ‌های گونه *V. alba* در بخش مرکزی تا شرق دریای خزر به صورت کاملاً مجزا از سایر اکوتیپ‌ها در یک گروه قرار گرفتند. در نهایت، با توجه به نتایج این پژوهش و مطالعات قبلی، تنوع داخل گونه‌ای و نیز تنوع بین گونه‌ای معنی‌داری بین گونه‌های جنس *viola* مشاهده می‌شود که از آنها می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی بهره گرفت.

## References

- Asadi, N., & Babaei, A. (2012, January 29). *Investigation of anthocyanin content and mapping anthocyanin distribution using ArcGIS software in the habitats of Iranian sweet violets*. [Conference presentation abstract]. The first national conference on sustainable agriculture and natural resources, Mehre- arvand Institute of Higher Education, Tehran. <https://civilica.com/doc/258645/> [In Persian].
- Asadi, N., Babaei, A., & Naqvi, M. R. (2015). Genetic diversity among some Iranian violets (*Viola* spp.) using molecular markers ISSR. *Iranian Journal of Horticultural Sciences and Technology*, 17(1), 103-116. <http://journal-irshs.ir/article-1-78-fa.html> [In Persian].
- Craik, D. J., Daly, N. L., Bond, T., & Waive, C. (1999). Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *Journal of molecular biology*, 294(5), 1327–1336. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3383>
- Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C.H., & Talcott, S.T. (2004). Phytochemical composition and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 1539-1545. <https://doi.org/10.1021/jf035189n>
- Franz, G. (1979). Metabolism of reverse polysaccharides in tubers of *Orchis morio*. *Planta Medica*, 36(05), 68-73. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097242>
- Ghanem, M. E., Han, R. M., Classen, B., Quetin-Leclercq, J., Mahy, G., Ruan, C.-J., Qin, P., Perez-Alfocea, F., & Lutts, S. (2010). Mucilage and polysaccharides in the halophyte plant species *Kosteletzkya virginica*: localization and composition in relation to salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 167(5), 382-392. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.10.012>
- Ghasemi, A. (2009). *Medicinal and aromatic plants, recognition and investigation of their effects*. Shahrekord Azad University Publications. [In Persian].
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phyto Chemistry*, 64, 923-933. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2)
- Lewinsohn, T., & Jorge, L. R. (2024). Species Diversity: Overview. In S. M. Sheiner (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity*, (3rd ed., pp. 275-286). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780323984348/encyclopedia-of-biodiversity>
- Mahajan, R., Kour, R., Javad, A., Singh, I., & Kapoor, N. (2014). Characterization of genetic diversity of *Viola odorata* different regions of Jammu and Kashmir using RAPD primers. *International Journal of Science Inventions Today*, 3(6), 685-691. [http://www.ijst.com/archives\\_ijst.php](http://www.ijst.com/archives_ijst.php)
- Marcussen, T. (2003). Evolution, phylogeography, and taxonomy within the *Viola alba* complex

- (Violaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 237(1-2), 51–74. <https://doi.org/10.1007/s00606-002-0254-5>
- Marcussen, T. (2006). Allozymic variation in the widespread and cultivated *Viola odorata* (Violaceae) in western Eurasia. *Botanical Journal Linnean Society*, 151, 563-571. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00543.x>
- Marcussen, T., & Borgen, L. (2000). Allozymic variation and relationships within subsection *Viola* (Violaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 223, 29-57. <https://doi.org/10.1007/BF00985325>
- Mazumdar, B. C., & Majumder, K. (2014). *Methods on Physico-Chemical Analysis of Fruits*. Astral International.
- Mehrvarz, S. S., & Yeganeh, T. (2016). Allozymic variation and relationships within *Viola* sect. *Viola* (Violaceae) in Iran. *Polish Botanical Journal*, 61(2), 267-274. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20173034711>
- Moradi, H., Hadadinezhad, M., Yavari, A., Mohammadi, M., Mousavi, M., & Hosein, S. M. A. (2021). Comparison of morphological and phytochemical traits in some endogenous genotypes of sweet violet (*Viola odorata* L.) in Mazandaran and Golestan provinces. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 63, 101-115. <https://doi.org/10.30495/iper.2021.686563> [In Persian].
- Rao, M., Palada, M., & Becker, B. (2004). Medicinal and aromatic plants in agroforestry systems. *Agroforestry Systems*, 61, 107–122. <https://doi.org/10.1023/B:AGFO.0000028993.83007.4b>
- Shafqat, Z., & Zarin Kemer, F. (2017). Tracking mucilage compounds in different stages of aromatic violet leaf development. *Plant Research Journal*, 31(2), 259-269. [https://plant.ijbio.ir/article\\_1286.html?lang=en](https://plant.ijbio.ir/article_1286.html?lang=en) [In Persian].
- Zakaria Nejad, N., Moradi, H., Beparva, P., & Memariani, Z. (2022). Effect of height and soil properties on some secondary metabolites of different organs of sweet violet (*Viola odorata* L.) in different natural habitats of Mazandaran province. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 65(3), 111-125. <https://sanad.iau.ir/Journal/iper/Issue/43846> [In Persian].

