مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2022.357486.3145
جلد ۳۸، شماره ۴، صفحه ۶۵۰-۶۳۲ (۱۴۰۱) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1401.38.4.9.3

امکان‌سنجی اهلی‌کردن برخی گونه‌های بنفشه (*Viola* spp.) بومی ایران

محدثه قربانی[۱]، سارا خراسانی‌نژاد[۲*]، خدایار همتی[۳] و خلیل قربانی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

پست الکترونیک: khorasaninejad@gau.ac.ir؛ skhorasaninejad@yahoo.com

۳- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴- دانشیار، گروه سازه و منابع آب، دانشکده آب و خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۱ | تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۴۰۱ | تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۱

چکیده

این پژوهش با هدف مقایسه توده‌های جنس بنفشه (*Viola* spp.) جمع‌آوری شده از شمال و شمال‌غرب ایران، به‌منظور بررسی سازگاری و امکان‌سنجی اهلی‌سازی آنها در شرایط آب و هوایی گرگان انجام شد. نمونه‌های گیاه کامل به‌همراه ریزوم آنها از ۹ رویشگاه در استان‌هان گلستان، مازندران، گیلان، آذربایجان و کرمانشاه در فصل رویش جمع‌آوری شدند. پس از تأیید گیاهشناسی و دریافت کد هرباریومی، ریزوم‌ها با سه تکرار در ترکیب خاکی و آب و هوای یکسان کشت شدند. اجزای عملکرد و صفات فیزیولوژیک، مورفولوژیک و فیتوشیمیایی آنها پس از گذشت یک سال زراعی در زمان گلدهی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد این ۹ توده از گونه‌های *V. alba* Besser، *V. odorata* L.، *V. sieheana* W.Becker و *V. ignobilis* Rups. بودند. همگی توده‌ها پس از گذشت یک سال زراعی تولید گل و بذر نمودند. توده‌ها با هم اختلاف معنی‌دار (در سطح احتمال ۱٪) داشتند. جمعیت *V. ignobilis* از منطقه کرمانشاه بیشترین مقدار وزن تر ریشه و اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی و سطح برگ را داشت. بیشترین میزان طول ریشه و اندام هوایی به جمعیت *V. sieheana* از منطقه النگدره اختصاص یافت. جمعیت *V. alba* از منطقه زیارت بیشترین مقدار فنل کل (۴۵/۷۴ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره خشک) و فلاونوئید کل (۲۰/۲۴ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره خشک) را داشت. بیشترین میزان کلروفیلa، کلروفیلb، کلروفیل کل، کاروتنوئید و آنتوسیانین به جمعیت V. odorata از منطقه بندرگز تعلق گرفت. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش‌های DPPH و ABTS در جمعیت *V. alba* از منطقه افراتخته و بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش FRAP در جمعیت *V. odorata* از منطقه قرن‌آباد مشاهده شد. بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان کل در جمعیت‌های *V. alba* و *V. oderata* از منطقه زیارت اندازه‌گیری شد. به‌طور کلی، نتایج حاکی از وجود تنوع قابل ملاحظه صفات در جمعیت‌های بنفشه است. این تنوع می‌تواند به‌دلیل پتانسیل ژنتیکی بالا در بین جمعیت‌ها، اختلاف شرایط محیطی و یا اثرات متقابل جمعیت و محیط بوجود آمده باشد.

واژه‌های کلیدی: ABTS، DPPH، *Viola alba*، *Viola ignobili*، *Viola odorata*، *Viola sieheana*.

مقدمه

در سراسر جهان خانواده بنفشه (Violaceae) ۲۰ جنس و ۸۰۰ گونه دارد (Deepak *et al*., 2017). جنس بنفشه (*Viola*) حدود ۵۰۰ گونه دارد که در سراسر جهان پراکنده‌اند، ۲۳ گونه آن بومی ایران هستند. تعدادی از این گونه‌ها در شمال کشور متمرکزند و *V. kitaibeliana*، *V. elatior*، *V. spathulata*، *V. ignobilis*، *V. alba* و *V. oderata* جزء گیاهان چندساله محسوب می‌شوند (Khatamsaz, 1990). بیوشیمی و بیولوژی پپتیدهای تولید شده گیاهی از این خانواده منحصربه‌فرد، برای محققان بسیاری جالب است. تعدادی از گیاهان دارویی برای کاربردهای درمانی مانند تصفیه‌کننده خون، درمان کبودی، زخم، عفونت تنفسی و اختلال کلیوی متعلق به این خانواده هستند (Henriques & Craik, 2010). از دیگر خواص درمانی می‌توان به اثرهای ضد قارچ، ضد باکتری، ضد مالاریا، آنتی‌اکسیدان، ضد سرطان، ضد ایدز، ضد آسم و غیره اشاره کرد (Muhammad *et al*., 2012). مطالعات پیرامون این جنس بسیار کم انجام شده است. بیشترین تحقیقات روی بنفشه معطر با نام علمی *Viola odorata* انجام شده است (Akhbari *et al*., 2012). این گونه بومی اروپا و آسیا بوده و به شمال آفریقا نیز وارد شده است (Hammami *et al*., 2011). همچنین در کشورهای هند، پاکستان، ایران و افغانستان نیز رویش دارد (Suratia *et al*., 2015). گونه *V. ignobili* بسیار شبیه به گونه *V. odorata* است که خاص ارتفاعات خزری و منطقه ایرانی-تورانی می‌باشد. یکی از گونه‌های بنفشه که دارای ساقه گل‌دهنده مشخص به ارتفاع تا ۱۵ سانتی‌متر می‌باشد، گونه *V. sieheana* است که در شمال و شمال‌غرب کشور پراکنش دارد. بین دو گونه *V. odorata* و *V. alba* هیبرید انجام می‌گردد و نمونه‌هایی بینابین این دو گونه معمولاً دیده می‌شود (Khatamsaz, 1990).

اهمیت پوشش گیاهی و گیاهان بر کسی پوشیده نیست. طی سال‌های گذشته مواد اولیه گیاهی مورد نیاز صنایع دارویی از طبیعت برداشت شده است که علاوه‌بر تخریب روزافزون جنگل‌ها، مراتع و فضای سبز، تولید مواد اولیه ناهمگن، همچنین امکان خطر انقراض گونه را در پی داشته است (Fotovati & Noorbakhsh, 2009). بهره‌برداری بیش از حد از منابع وحشی، فرسایش ژنتیکی را افزایش می‌دهد (Vogel *et al*., 2016). بیشتر گونه‌های گیاهی (حدود ۸۲٪) از جنگل بدست می‌آیند و کوششی برای کشت و اهلی کردن انجام نشده است. تنها ۲۰٪ از گیاهان دارویی کشت می‌شوند و این نشان‌دهنده پایین بودن مطالعه تحقیقاتی و توسعه گیاهان دارویی بومی است (Hamidah *et al*., 2018). براساس برخی از بررسی‌ها، با اینکه فاکتور آب و هوا بیشترین نقش را در رشد و پراکنش گیاهان دارد اما گیاهان در ارتباط با تعدادی از عوامل مختلف شامل اقلیم، ویژگی‌های خاک و شرایط طبیعی توسعه پیدا می‌کنند (Gavili Kilaneh & Vahabi, 2012). پی بردن به ارتباط بین درصد ماده مؤثره و اجزای آن با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک این امکان را به ما می‌دهد که برای دستیابی به بالاترین کمّیت و کیفیت ماده مؤثره، مناسب‌ترین شرایط خاکی و اقلیمی را برای گیاه فراهم کنیم (Khorshidi *et al*., 2019). مطالعات بر روی گیاهان نادر و در حال انقراض و مسئله حفظ ذخائر ژنتیکی در دنیا از سال ۱۹۶۰ به‌طور جدی مطرح و سازمان‌های بین‌المللی اقداماتی را انجام داده‌اند ولی متأسفانه بسیاری از گونه‌های گیاهی حتی قبل از شناسایی آنها منقرض شده‌اند (Saparinto & Susiana, 2016). سیاست‌های پژوهشی برای بهره‌برداری از گیاهان دارویی، عدم استخراج آنها از طبیعت است که یکی از این سیاست‌ها، اهلی کردن است. اهلی شدن، فرایند تبدیل گیاهان وحشی به گیاهان زراعی با کاشت در زیستگاه جدید است. کشت گیاهان دارویی یک راهکار مهم برای محافظت از این گونه‌ها از برداشت بیشتر است (Chen *et al*., 2014). برای جلوگیری از انقراض و تجاری‌سازی گیاهان دارویی، لازم است که کشت گیاهان دارویی یا فرایند اهلی‌سازی گیاهان وحشی به محصولات زراعی با کاشت در زیستگاه جدید انجام شود. آماده‌سازی کاشت گیاهان دارویی نیاز به توجه به جنبه‌های فنی، به‌ویژه عوامل محیطی مانند دما،

رطوبت و شدت نور دارد (Hamidah *et al*., 2018). شناسایی جمعیت‌های مختلف و گزینش افراد برتر از لحاظ خصوصیات رشدی و تیپ شیمیایی در بین جمعیت‌های طبیعی گیاهان دارویی اولین و مهمترین مرحله در طی اهلی کردن گیاه است (Nemeth, 2002). در اصلاح گیاهان، بررسی تنوع ژنتیکی پایه برنامه‌های اصلاحی محسوب می‌شود (Solouki *et al*., 2008) و وارد کردن یا اهلی کردن جمعیت منتخب برخوردار از کارایی بالا از میان انبوه توده‌های طبیعی یک گونه می‌تواند پیشرفت مهم و قابل توجهی در دستیابی به ارقام مورد نیاز صنایع بدون صرف‌وقت و هزینه اضافی برای بکارگیری روش‌های اصلاحی باشد (Pank, 2007).

در همین راستا، Saghalli و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های گیاه دارویی خارمریم (*Silybum marianum* L.) جمع‌آوری شده از نقاط مختلف ایران و رقم اصلاح شده اکالازی و دو اکوتیپ متعلق به انگلستان، مشاهده شد که بین اکوتیپ‌های خارمریم بررسی شده از نظر صفات ظاهری تنوع بالایی وجود دارد. در پژوهشی دیگر، Golchin و همکاران (۲۰۱۳) بذرهای گیاه اسفرزه (*Plantago ovata*) را از چهار رویشگاه مختلف در استان گلستان جمع‌آوری کرده و برای بررسی صفات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی توده‌های مختلف این گیاه را در شرایط آب و هوایی آزادشهر کشت کردند و مشخص شد که توده‌های اسفرزه استان گلستان، از عملکرد موسیلاژی بسیار بالایی برخوردارند. همچنین در تحقیقاتی برای بررسی تنوع چای کوهی (*Stachys lavandulifolia* Vahl.) از رویشگاه‌های مختلف در مشهد، قوچان، شاهرود و نیشابور مشخص شد که تنوع بالایی بین اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده به لحاظ ترکیب‌های فنلی، فلاونوئیدی، آنتی‌اکسیدانی و کمّیت و کیفیت اسانس وجود دارد، به‌طوری که عوامل اقلیمی، ادافیکی و مختصات جغرافیایی و ارتفاع اثرهای معنی‌داری روی ویژگی‌های دارویی این گیاه داشته‌اند (Chorli *et al*., 2017؛ Chorli *et al*., 2020).

از آنجایی‌که در اکوسیستم‌های زراعی و طبیعی عواملی شامل رطوبت، آب، عناصر غذایی، نور و ارتفاع از سطح دریا عوامل مهم و تأثیرگذار بر رشد، مورفولوژی و کمّیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی است، بر این اساس با انتخاب عوامل محیطی و ارقام گیاهی مناسب می‌توان حداکثر مقدار محصول را بدست آورد (Zobayed *et al*., 2005). برای معرفی و اهلی کردن گیاهان دارویی نه‌تنها باید از رشد، توسعه و تولیدمثل آن در مناطق معرفی شده مطمئن شد بلکه باید از حفظ و بهبود خواص دارویی نیز اطمینان حاصل کرد (JianHua *et al*., 2018). با توجه به تغییرات اقلیمی و افزایش دمای متوسط زمین و محدود شدن رویشگاه‌های این گیاه از یکسو و اهمیت بالای دارویی این گیاه در طب ایرانی و در دنیا از سوی دیگر و برداشت بی‌رویه آنها از رویشگاه‌های طبیعی، نیاز مبرمی به بررسی سازگاری و اهلی کردن این گیاه وجود دارد. این پژوهش با هدف مقایسه توده‌های جنس بنفشه از ۹ رویشگاه شمال و شمال‌غرب ایران در شرایط آب و هوایی گرگان برای بررسی بهترین توده در این شرایط و امکان‌سنجی اهلی‌سازی آنها طراحی شد.

مواد و روش‌ها

مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. جمع‌آوری ریزوم بنفشه برای کشت و چند گیاه کامل جهت شناسایی از رویشگاه‌های مورد نظر (افراتخته، قرن‌آباد، النگدره، دو منطقه در زیارت، بندرگز، آمل، کلیبر، کرمانشاه) در اسفندماه سال ۱۳۹۷ و فروردین‌ماه ۱۳۹۸، در زمان گلدهی، از ارتفاعات استان‌های گلستان، مازندران، گیلان، آذربایجان و کرمانشاه انجام شد. برای شناسایی، نمونه‌ها کامل خشک شده و به دانشکده داروسازی تبریز برای دریافت کد هربایوم ارسال شدند. سپس در سه تکرار در قالب طرح بلوک کامل تصادفی، در ترکیب خاکی و آب و هوایی یکسان کشت شدند. به‌طوری که فضای اختصاص داده‌شده به هر نمونه دارای ابعاد

۵۰ ×۳۰ سانتی‌متر بود که در مجموع فضای اختصاص داده شده به طرح حدود ۱/۵ مترمربع شد (شکل ۱). خاک مورد استفاده آنالیز و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن بدست آمد (جدول ۱). وضعیت اقلیمی محل کشت نیز در این مدت به‌صورت ماهانه از مرکز هواشناسی هاشم‌آباد تهیه و ثبت گردید (جدول ۲). بوته‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری و گذراندن مدت زمانی در محیط موقت، در فروردین‌ماه ۱۳۹۹، در محل اصلی کشت شدند. فاصله ریزوم‌ها ۲۰ سانتی‌متر و عمق کشت ۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. آبیاری به‌طور روزانه انجام شده و عملیات داشت مانند سله‌شکنی و وجین نیز به‌طور مرتب انجام شد. مراحل رشد جمعیت‌های کشت شده بررسی گردید (شکل ۲). پس از گذشت یک سال زراعی در زمان گلدهی بوته‌ها (بهار ۱۳۹۹)، صفات مورفولوژیک و اجزای عملکرد (طول ریشه، طول اندام هوایی، تعداد برگ، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، تعداد ریزوم، تعداد برگ، تعداد انشعابات ریشه و سطح برگ)، ویژگی‌های فیتوشیمیایی (کلروفیل a، b و کل برگ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین) این جمعیت‌ها اندازه‌گیری شد.

شکل ۱- بخشی از واحدهای آزمایشی بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی

Figure 1. Part of experimental units based on randomized complete block design

شکل ۲- مراحل رشد ***Viola siehreana*** از رویشگاه النگدره

Figure 2. Growth stages of *Viola siehreana* from Alangdare habitat

جدول ۱- نتایج آنالیز خاک

Table 1. Soil analysis results

Texture	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Absorbable potassium (ppm)	Absorbable phosphorus (ppm)	Organic carbon (%)	Nitrogen (%)	Neutralizing substances (%)	Saturation (%)	Electrical conductivity ($dS.m^{-2}$)	pH
Silty-Loam	24	60	16	556	68.5	7.28	0.728	20	45.80	1.64	7.9

جدول ۲- اطلاعات هواشناسی شهرستان گرگان در سال ۱۳۹۸

Table 2. Meteorological information of Gorgan city in 2019

	March	April	May	June	July	August	September	October	November	Decemder	January	February
Maximum monthly temperature (°C)	32.6	37.1	35	38.8	42.1	3.9	34.9	27.9	24.5	26.4	29.8	25.2
The lowest monthly temperature (°C)	2.7	3.6	13.9	17.7	18	16.8	9.2	3.7	-0.5	-1	-2.2	0.5
Average monthly temperature (°C)	14.9	20.3	25.2	28.1	28.2	25.7	22.2	15.3	10.68	9.84	9.54	11.4
Average monthly rainfall (mm)	2.4	1.7	0	1.3	0.3	0.8	1.7	4.5	0.3	0.3	2.8	2
Average monthly relative humidity (%)	81.5	67.4	58.2	67.4	64.1	62.7	65.3	70.8	73.8	69.6	66.1	75.8
Average solar radiation ($W.m^{-2}$)	4.3	7.7	9.6	6.3	7.3	7.2	7.6	5.4	5.3	5.2	6.6	4.7

ثبت مشخصات محل جمع‌آوری

در زمان جمع‌آوری نمونه‌ها، خصوصیات مختلف رویشگاه از قبیل ارتفاع از سطح دریا و مختصات جغرافیایی با استفاده از دستگاه GPS و جهت شیب (سعی شد از شیب‌های جنوبی برداشت انجام شود) ثبت شد (جدول ۳).

شناسایی گونه‌های جمع‌آوری شده

ضمن جمع‌آوری نمونه‌ها، از هر گیاه ۳ نمونه هرباریمی تهیه و برای شناسایی و دریافت کد هرباریمی به دانشکده داروسازی تبریز ارسال شدند (جدول ۳).

جدول ۳- مشخصات جغرافیایی رویشگاه‌های محل جمع‌آوری توده‌های بنفشه

Table 3. Geographical characteristics of habitats from which *Viola* spp. populations collected

No.	Habitat: area, city, province	Altitude (m)	Latitude (°)	Longitude (°)	Steep direction (°)	Herbarium code
1	Afratakhte, Aliabad, Golestan (purple flower) (*V. alba*)	1620	36.7939	54.9655	South	TBZFPH 4098
2	Qarnabad, Jelin, Golestan (purple flower) (*V. odorata*)	515	36.7935	54.6242	South	TBZFPH 4083
3	Alangdare, Gorgan, Golestan (white flower) (*V. sieheana*)	361	36.7832	54.4517	Plain (flat)	TBZFPH 4085
4	Ziyarat, Gorgan, Golestan (purple flower) (*V. odorata*)	649	36.7297	54.4842	South	TBZFPH 4095
5	Ziyarat, Gorgan, Golestan (white flower) (*V. alba*)	633	36.7302	54.4845	South	TBZFPH 4096
6	Bandargaz, Golestan (purple flower) (*V. odorata*)	322	36.6927	53.954	South	TBZFPH 4088
7	Pasha kolah, Amol, Mazandaran (purple flower) (*V. odorata*)	420	36.5392	52.677	South	TBZFPH 4097
8	Kaleibar, East Azerbaijan (purple flower) (*V. ignobilis*)	1110	38.8515	47.0474	South	TBZFPH 4092
9	Paveh, Kermanshah, Kermanshah (purple flower) (*V. ignobilis*)	1348	38.7727	62.1916	South	TBZFPH 4093

ارزیابی صفات مورفولوژیکی و اجزای عملکرد

تعداد برگ، تعداد انشعابات، تعداد ریزوم به صورت شمارش، طول اندام هوایی و طول ریشه با استفاده از خط‌کش مدرج، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه نیز توسط ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و درج شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها در پاکت‌های مجزا قرار داده شد و در آون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت خشک گردیدند (Zare *et al.*, 2018). برای اندازه‌گیری سطح برگ، ۵ برگ به‌طور تصادفی انتخاب کرده و از دستگاه سطح برگ‌سنج برای اندازه‌گیری استفاده شد.

اندازه‌گیری صفات فیتوشیمیایی

استخراج عصاره متانولی: برای اندازه‌گیری فنل کل و فلاونوئید کل، مواد گیاهی تازه برداشت شده در هر مرحله در دمای اتاق خشک شدند و پس از خشک شدن ۱ گرم از مواد گیاهی پودر شده به همراه ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به‌مدت ۱۲

ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر عصاره‌گیری گردید و عصاره بدست آمده پس از صاف شدن تا زمان اندازه‌گیری در فریزر نگهداری شد (Mozaffari *et al*., 2017).

فنل کل: محتوای فنل کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی فولین- سیوکالتیو (Folin-Ciocalteureagent) اندازه‌گیری شد (Oki *et al*., 2002). طبق این روش، ۱ میلی‌لیتر از محلول نمونه اضافه گردید. پس از ۳ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر از محلول آبی کربنات‌سدیم ۱۰٪ به محلول اضافه شد. مخلوط نهایی به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید، سپس جذب در ۷۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتوای فنلی بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک در گرم وزن خشک با استفاده از منحنی استاندارد اسیدگالیک بیان گردید.

فلاونوئید کل: میزان فلاونوئید کل به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید اندازه‌گیری شد. در این روش میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰٪، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. بعد از نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه، جذب مخلوط در ۴۱۵ نانومتر خوانده شد (Chang *et al*., 2002).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش مهار رادیکال آزاد DPPH: این روش یکی از روش‌های رایج برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های گیاهیست. در این روش، آنتی‌اکسیدان‌های نمونه با رادیکال‌های آزاد DPPH وارد واکنش شده و منجر به کاهش میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر می‌شوند. برای اندازه‌گیری به روش DPPH ابتدا ۱ میلی‌لیتر از عصاره آبی با ۱ میلی‌لیتر DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط گردید. برای تهیه نمونه شاهد ۱ میلی‌لیتر متانول خالص به جای ۱ میلی‌لیتر عصاره متانولی قرار داده شد. برای بلانک از متانول خالص استفاده شد. پس از ۳۰ دقیقه تاریکی، میزان جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. اعداد بدست آمده توسط رابطه ۱ به درصد مهار رادیکال آزاد تبدیل شد.

$$DPPH= 100 (1 - AS/AC)$$ رابطه ۱

در این رابطه، As و Ac به‌ترتیب برابر با عدد جذب نمونه و کنترل است. اعداد بدست آمده برابر با درصد مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره آبی نمونه‌ها می‌باشد (Wu *et al*., 2003).

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش کاتیون‌زدایی رادیکال ABTS: فعالیت مهار رادیکال ABTS پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از روش تشریح شده توسط You و همکاران (۲۰۱۰) تعیین شد. محلول رادیکال ABTS با ترکیب نسبت حجمی یکسانی از ABTS در غلظت ۷ میلی‌مولار و ۴/۴۵ میلی‌مولار پتاسیم‌پرسولفات تهیه گردید. مخلوط در تاریکی و در دمای محیط به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت قبل از مصرف قرار داده شد. در این مدت، اکسیداسیون و تولید رادیکال ABTS به‌وسیله پتاسیم پرسولفات انجام می‌شود. قبل از آزمون، محلول ABTS با استفاده از PBS (۰/۲ مولار و ۷/۴pH) تا جذب ۰/۷+۰/۲ در ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. سپس ۴۰ میکرولیتر از هر نمونه به ۴ میلی‌لیتر محلول رقیق شده ABTS افزوده شد. مخلوط برای ۳۰ ثانیه به‌شدت ورتکس و به‌مدت ۶ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. جذب محلول نهایی در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش FRAP: در این روش توانایی عصاره‌ها در احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها اندازه‌گیری می‌شود. با احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) و تبدیل آن به یون‌های فرو (Fe^{2+}) در pH اسیدی و در حضور تری‌پریدیل اس‌تریازین (TPTZ)، کمپلکس Fe-TPTZ تشکیل می‌شود که رنگ آن آبی است. پس از آن سنجش نوری در ۵۹۳nm اندازه‌گیری می‌شود. البته باید اشاره کرد که توانایی یک آنتی‌اکسیدان برای غلبه بر رادیکال‌های آزاد الزاماً منطبق بر توانایی آن برای احیاء Fe^{3+} به Fe^{2+} نیست. اندازه‌گیری ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی براساس روشی که توسط Benzie و Strain (۱۹۹۶) پیشنهاد شده است، انجام شد. برای تهیه واکنشگر FRAP به شرح زیر عمل می‌شود. بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار با (pH=۳/۶)، TRAP ۱۰ میلی‌مولار در HCL ۴۰ میلی‌مولار و محلول کلریدآهن به نسبت ۱۰:۱:۱ مخلوط می‌شود. محلول FRAP باید به‌طور روزانه تهیه شده و قبل از مصرف در دمای ۳۷ درجه

سانتی‌گراد، میزان جذب در ۵۹۳ نانومتر قرائت شود. منحنی استاندارد با کمک سولفات آهن، در محدوده معمول ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ میکرومولار رسم شده و با استفاده از آن نتایج به‌صورت معادل میکرومولار آهن در گرم نمونه بیان شد.

ارزیابی آنتی‌اکسیدان کل (TAOC): برای تهیه معرف TAOC از آمونیوم مولیبدات $(NH_4)_2MoO_4$ ۴ میلی‌مولار، اسیدسولفوریک (H_2SO_4) ۰/۶ مولار و سدیم فسفات (Na_3PO_4) ۲۸ میلی‌مولار استفاده شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی مقدار ۱ میلی‌لیتر معرف TAOC اضافه شد. پس از ورتکس کردن، لوله‌های آزمایش به‌مدت ۹۰ دقیقه و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد بن‌ماری انکوبه شد. پس از طی این مدت زمان و بلافاصله بعد از سرد شدن نمونه‌ها، عدد جذب آنها نسبت به شاهد (همه ترکیب‌ها بجز عصاره) در طول‌موج ۶۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد (Sun *et al*., 2011).

اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین: ۱ گرم از نمونه برگ را با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (۹۹ میلی‌لیتر متانول خالص و ۱ میلی‌لیتر اسیدهیدروکلریک) اضافه و عصاره برای ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و جذب محلول بالایی با استفاده از اسپکتوفتومتری در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد (Wagner, 1979).

اندازه‌گیری محتوای کلروفیل a، b، کل وکاروتنوئید: برای اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید ابتدا ۰/۵ گرم از بافت برگ تازه را خورد کرده و در داخل لوله آزمایش ریخته، سپس ۱۰ میلی‌لیتر اسید دی‌میتل سولفوکسید خالص به آن اضافه کرده و بعد به‌مدت ۳ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا رنگیزه‌ها استخراج و بافت برگی کاملاً بی‌رنگ شود. سپس بعد از صاف کردن نمونه‌ها با کاغذ واتمن، ۱ میلی‌لیتر از محلول صاف شده را برداشته و به حجم ۵ میلی‌لیتر رسانده و بعد میزان جذب محلول بدست آمده توسط دستگاه اسپکتوفتومتری در طول‌موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵، ۴۸۰ و ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان کلروفیل a و b، کلروفیل کل و کاروتنوئید به‌ترتیب با استفاده از رابطه‌های ۲، ۳، ۴ و ۵) برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد (Barens *et al*., 1992).

$$ChIa = \frac{12}{7}(A663) - \frac{2}{69}(A645) * \frac{V}{1000*W}$$ رابطه ۲

$$ChIb = \frac{22}{9}(A645) - \frac{4}{68}(A663) * \frac{V}{1000*W}$$ رابطه ۳

$$ChIt = \frac{20}{2}(A645) + \frac{8}{02}(A633) * \frac{V}{1000*W}$$ رابطه ۴

$$C = \frac{7}{6}(A480) - \frac{1}{49}(A510) * \frac{V}{1000*W}$$ رابطه ۵

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.1) مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند و میانگین صفات با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) مقایسه شدند.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱٪ بین جمعیت‌های مورد بررسی از نظر خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی شامل (تعداد برگ، طول اندام هوایی، طول ریشه، وزن تر اندام هوایی، وزن تر ریشه، وزن خشک اندام هوایی، سطح برگ، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئید، فنل کل، فلاونوئید کل، آنتی‌اکسیدان کل، آنتوسیانین، ABTS، DPPH، FRAP) گیاه *Viola* spp. نشان داد که طبق این نتایج هر یک از نمونه‌های مناطق مختلف دارای ویژگی‌های خاص ظاهری بودند. صفات مورفولوژی وزن خشک ریشه، تعداد انشعابات و تعداد ریزوم، اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. به لحاظ مشاهداتی ریزوم‌های کشت‌شده، زنده‌مانی کامل داشتند.

جدول ۴- تجزیه واریانس برخی صفات در توده‌های کشت شده *Viola* spp.

Table 4. ANOVA of some traits in cultivated *Viola* spp. populations

S.O.V.	d.f.	Number of leaves	Aerial parts length	Root length	Aerial parts fresh weight	Root fresh weight	Aerial parts dry weight	Root dry weight	Number of branches	Number of rhizomes	Leaf area
Population	8	52.95**	24.7**	23.07**	1.73**	0.12**	0.11**	0.02n.s.	1.33n.s.	1.02n.s.	30.61**
Experimental error	18	4.92	4.51	7.15	0.14	0.03	0.01	0.02	0.7	0.8	1.28
C.V. (%)	–	23.4	1.27	22.96	30.72	40.67	38.94	71.21	70.15	72.73	15.59

n.s. and **: non-significant and significant at 1% probability level, respectively.

ادامه جدول ۴-...

Continued Table 4. …

S.O.V.	d.f.	Chlorophyll *a*	Chlorophyll *b*	Total chlorophyll	Carotenoids	Anthocyanins	Total phenols	Total flavonoids	Antioxidant activity by DPPH	Antioxidant activity by ABTS	Antioxidant activity by FRAP	Total antioxidants
Population	8	0.88**	0.11**	1.43**	0.21**	0.003*	403.9**	33.44**	381.02**	419.8**	11.49**	4.62*
Experimental error	18	0.05	0.02	0.1	0.02	0.001	22.53	5.03	14.28	11.5	1.77	1.47
C.V. (%)	–	11.14	18.76	11.10	12.95	18.52	21.92	15.75	7.71	24.23	23.87	18.9

n.s., *, and **: non-significant and significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

جدول ۵- مقایسه میانگین اجزای عملکرد توده‌های کشت شده بنفشه

Table 5. Means comparison of yield components in cultivated *Viola* spp. populations

Areas / Characteristics	Afratakhte (*V. alba*)	Qarnabad (*V. odorata*)	Alangdareh (*V. sieheana*)	Ziyarat (*V. odorata*)	Ziyarat (*V. alba*)	Bandargaz (*V. odorata*)	Amol (*V. odorata*)	Kleybar (*V. ignobilis*)	Kermanshah (*V. ignobilis*)
Number of leaves	6.33 e	12.66 b	10.3 bcd	11 bc	18.6 a	7.66 cde	8.33 cde	7 de	4.66 e
Aerial parts length (cm)	8.66 de	7.5 e	16.9 a	13 b	12.5 bc	12 bcd	9.16 cde	11.4 bcd	13.5 ab
Root length (cm)	11.1 bc	9.33 c	15.8 a	10.6 bc	12 abc	14.66 ab	8.16 c	8.66 c	14.3 ab
Aerial parts fresh weight (g)	0.76 de	0.86 de	0.77 de	0.88 de	2.1 ab	1.08 cd	0.24 e	1.61 bc	2.66 a
Aerial parts dry weight (g)	0.17 bc	0.23 bc	0.25 bc	0.29 b	0.61 a	0.24 bc	0.07 c	0.27 bc	0.66 a
Root fresh weight (g)	0.35 bcd	0.53 abc	0.6 ab	0.22 cd	0.35 bcd	0.77 a	0.18 d	0.35 bcd	0.68 a
Leaf area (cm^2)	15.8 bc	13.3 c	18.9 ab	20.71 a	15.5 bc	15.4 bc	18.9 ab	14.1 c	22.7 a

In each column, the means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

ارزیابی خصوصیات مورفولوژی

مطابق نتایج مقایسه میانگین (جدول ۵)، گونه *V. odorata* از منطقه النگدره بیشترین میزان طول ریشه و طول اندام هوایی را داشت و بیشترین میزان وزن تر ریشه، وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی و سطح برگ مربوط به گونه *V. ignobilis* از منطقه کرمانشاه بود، در حالی که کمترین میزان وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر ریشه و طول ریشه مربوط به منطقه آمل با جمعیت *V. odorata* است. کمترین میزان سطح برگ و طول اندام هوایی نیز در منطقه قرن‌آباد در گونه *V. odorata* دیده شد.

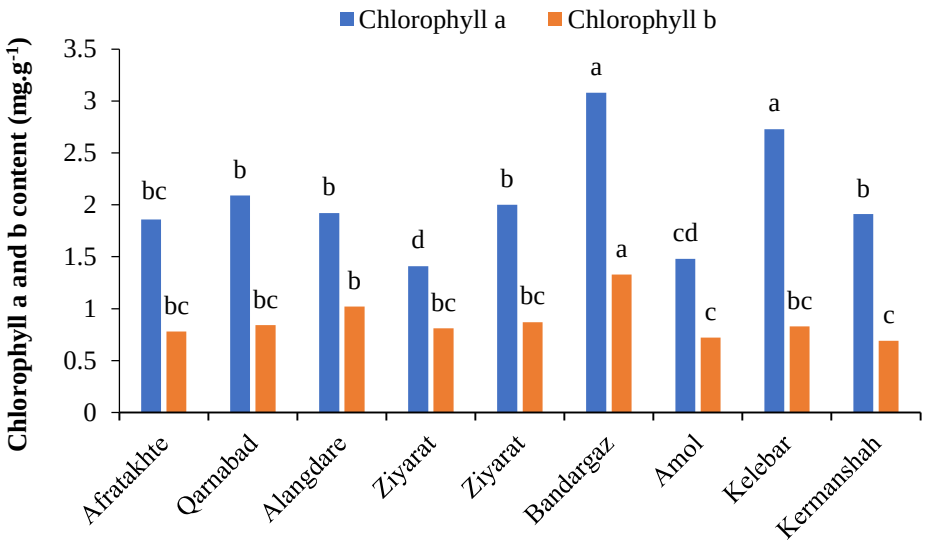
نتایج خصوصیات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که میزان غلظت نسبی کلروفیل‌ها و آنتوسیانین در جمعیت بندرگز (*V. odorata*) دارای بیشترین مقدار و در جمعیت زیارت (*V. odorata*) کمترین مقدار است (شکل‌های ۳ و ۴).

فنل کل: طبق نتایج مقایسه میانگین، منطقه زیارت با جمعیت *V. alba* با میانگین ۴۵/۷۴ میلی‌گرم برابر اسیدگالیک بر گرم عصاره خشک دارای بیشترین مقدار فنل کل و منطقه زیارت با جمعیت *V. odorata* با میانگین ۱۱/۲۶ میلی‌گرم برابر اسیدگالیک بر گرم عصاره خشک، دارای کمترین میزان فنل کل (شکل ۵) بود.

فلاونوئید کل: مقایسه فلاونوئید کل جمعیت‌های بنفشه نشان داد که همانند نتایج فنل کل، جمعیت *V. alba* از منطقه زیارت، فلاونوئید کل بیشتری نسبت به جمعیت‌های دیگر داشتند که این مقدار برابر با ۲۰/۲۴ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم عصاره خشک بود، همچنین این منطقه با جمعیت *V. odorata* کمترین میزان فلاونوئید کل را نشان داد (شکل ۵).

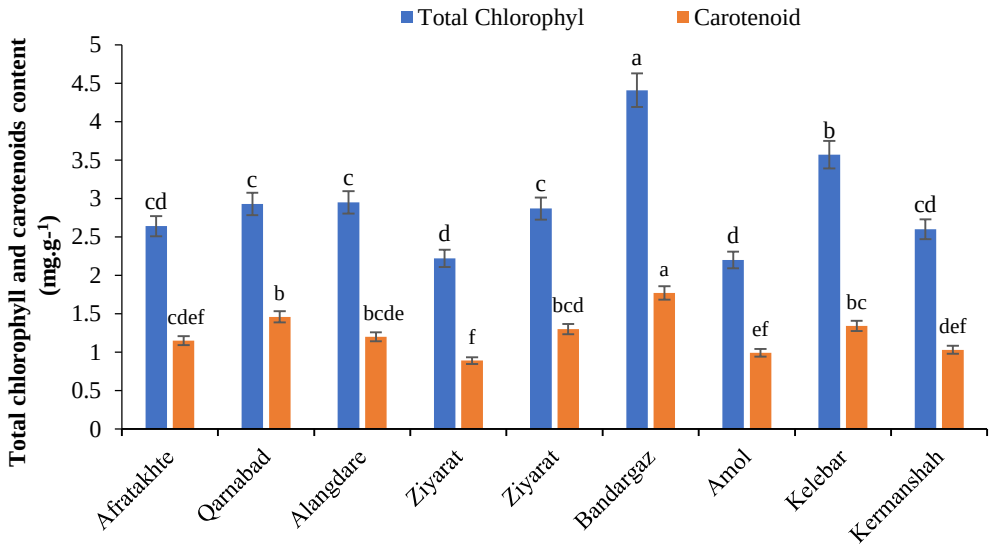
آنتی‌اکسیدان: مطابق نتایج بدست آمده در اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌روش DPPH و ABTS (شکل ۶) بیشترین میزان از منطقه افراتخته با جمعیت *V. odorata* دیده شد. همچنین بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان کل (شکل ۷) مربوط به منطقه زیارت با جمعیت *V. alba* و با اختلاف کمی بعد از آن منطقه قرن‌آباد با جمعیت *V. odorata* بود و در روش FRAP (شکل ۷) بیشترین میزان مربوط به منطقه قرن‌آباد (*V. odorata*) است.



شکل ۳- مقایسه میانگین مقدار کلروفیل ***a*** و کلروفیل ***b*** بین توده‌های کشت شده بنفشه

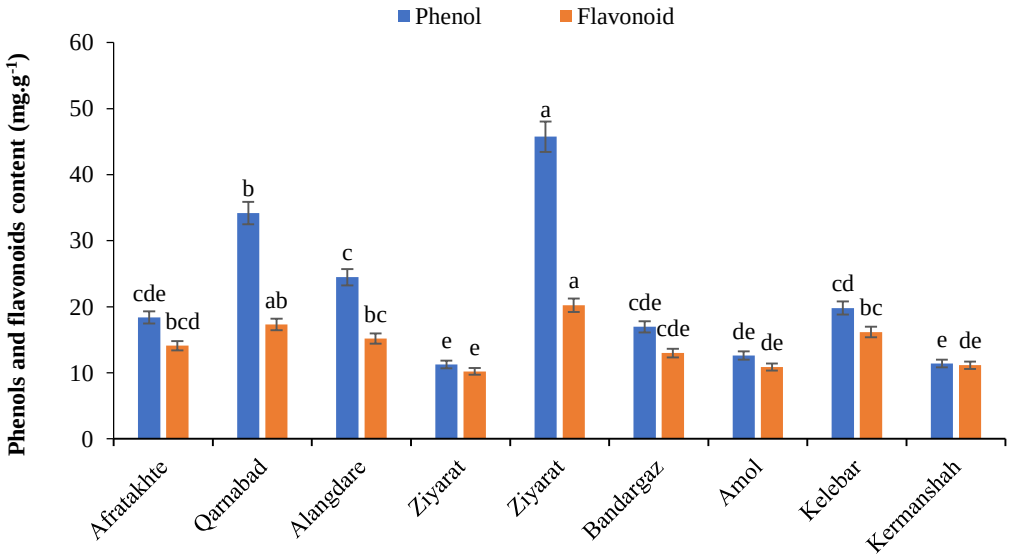
Figure 3. Means comparison of chlorophylls *a* or *b* between cultivated *Viola* spp. populations

Afratakhte (*V. alba*), Qarnabad (*V. odorata*), Alangdareh (*V. sieheana*), Ziyarat (*V. odorata*), Ziyarat (*V. alba*), Bandargaz (*V. odorata*), Amol (*V. odorata*), Kleybar (*V. ignobilis*), and Kermanshah (*V. ignobilis*).



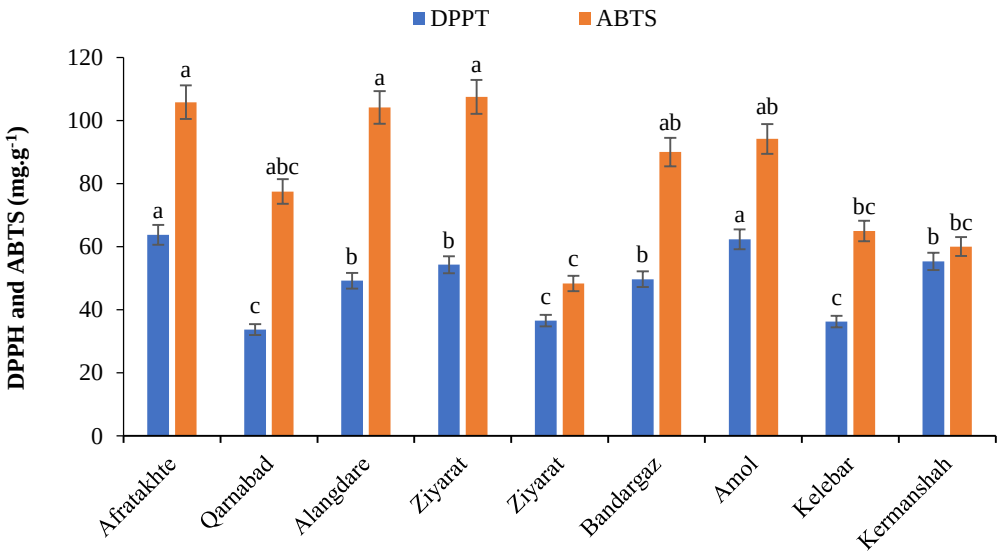
شکل ۴- مقایسه میانگین کلروفیل کل و کاروتنوئید بین توده‌های کشت شده بنفشه

Figure 4. Means comparison of total chlorophyll and carotenoids between cultivated *Viola* spp. populations
Afratakhte (*V. alba*), Qarnabad (*V. odorata*), Alangdareh (*V. sieheana*), Ziyarat (*V. odorata*), Ziyarat (*V. alba*), Bandargaz (*V. odorata*), Amol (*V. odorata*), Kleybar (*V. ignobilis*), and Kermanshah (*V. ignobilis*).



شکل ۵- مقایسه میانگین فنل کل و فلاونوئید کل بین توده‌های کشت شده بنفشه

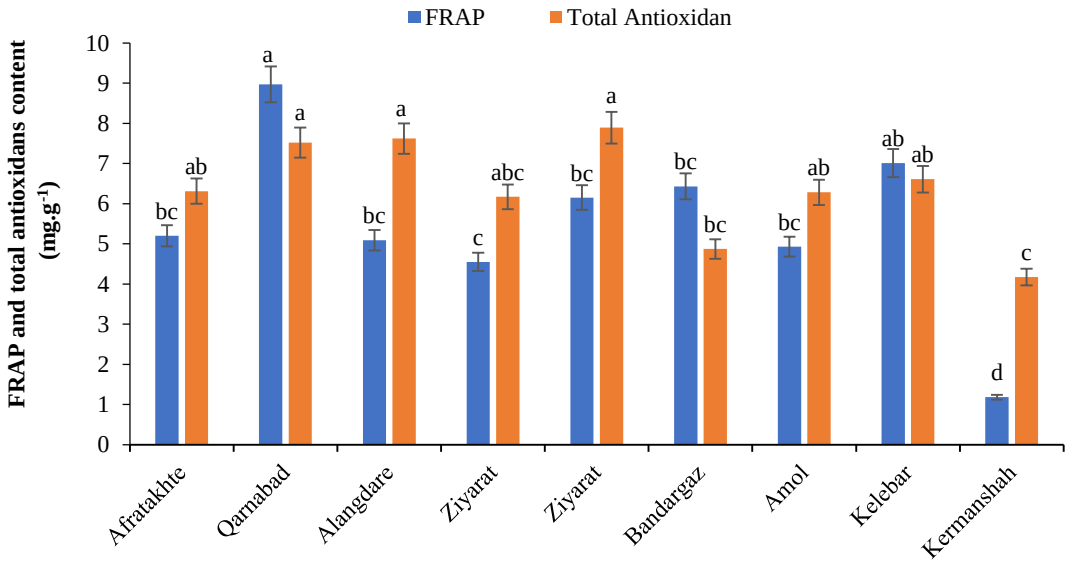
Figure 5. Means comparison of total phenols and total flavonoids between cultivated *Viola* spp. populations
Afratakhte (*V. alba*), Qarnabad (*V. odorata*), Alangdareh (*V. sieheana*), Ziyarat (*V. odorata*), Ziyarat (*V. alba*), Bandargaz (*V. odorata*), Amol (*V. odorata*), Kleybar (*V. ignobilis*), and Kermanshah (*V. ignobilis*).



شکل ۶- مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های **DPPH** و **ABTS** بین توده‌های کشت شده بنفشه

Figure 6. Means comparison of antioxidant activity by DPPH and ABTS methods between cultivated *Viola* spp. populations

Afratakhte (*V. alba*), Qarnabad (*V. odorata*), Alangdareh (*V. sieheana*), Ziyarat (*V. odorata*), Ziyarat (*V. alba*), Bandargaz (*V. odorata*), Amol (*V. odorata*), Kleybar (*V. ignobilis*), and Kermanshah (*V. ignobilis*).



شکل ۷- مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش **FRAP** و آنتی‌اکسیدان کل بین توده‌های کشت شده بنفشه

Figure 7. Means comparison of antioxidant activity by FRAP method and total antioxidants between cultivated *Viola* spp. populations

Afratakhte (*V. alba*), Qarnabad (*V. odorata*), Alangdareh (*V. sieheana*), Ziyarat (*V. odorata*), Ziyarat (*V. alba*), Bandargaz (*V. odorata*), Amol (*V. odorata*), Kleybar (*V. ignobilis*), and Kermanshah (*V. ignobilis*).

بحث

نتایج مقایسه میانگین حکایت از وجود تنوع قابل ملاحظه جمعیت‌های بنفشه برای صفات مورد بررسی دارد. این نتایج نشان داد که در بین توده‌های مختلف *Viola* spp. از لحاظ صفات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی، علاوه‌بر تأثیر عوامل محیطی، تنوع ژنتیکی زیادی نیز وجود دارد. درک این تنوع بالای ژنتیکی می‌تواند در مدیریت و حفاظت ژرم‌پلاسم‌های بنفشه مفید باشد. این تنوع ممکن است به‌دلیل اختلافات جمعیتی افراد، یا به علت اختلافات شرایط محیطی، یا گاهی توسط اثرهای متقابل جمعیت و محیط بوجود آمده باشد (Osamny & Siosemardeh, 2009). طبق جدول تجزیه واریانس، بیشتر صفات مورفولوژیکی ارزیابی شده در این تحقیق دارای اختلاف معنی‌داری بودند. البته تاکنون گزارشی مبنی بر مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی گیاه بنفشه بیان نشده‌است. با وجود رشد بنفشه به‌صورت خودرو در جنگل‌های ایران، تحقیقات زیادی بر روی شناسایی و اهلی کردن آن انجام نشده است (Moradi *et al*., 2021) و تاکنون گزارشی مبنی بر مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی گیاه بنفشه بیان نشده است. بااین‌حال، نتایج این پژوهش با نتایج Mohammadi و همکاران (۲۰۱۴) بر روی توده‌های گیاه بابونه مطابقت دارد. این محققان صفات مورفولوژیک را در گیاه بابونه بررسی و گزارش کردند که بیشتر صفات مورد بررسی معنی‌دار بود. در پژوهش Baharmast و همکاران (۲۰۲۰)، داده‌ها نشان‌دهنده تأثیر قابل توجهی از تفاوت‌های جغرافیایی (اکوتیپ‌های مختلف) بر مورفولوژی و رشد و تولید پونه است.

دو نوع تفاوت در بین جمعیت‌های مورد بررسی بنفشه دیده می‌شود، به‌طوری که این تفاوت بین گونه‌هاست. در همین راستا، مشخص شد که گونه *V. ignobilis* با وجود ژنوتیپ مشابه از دو منطقه کلیبر و کرمانشاه، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ از لحاظ صفات بررسی شده نشان داد، بنابراین این‌گونه استنباط می‌شود که شرایط اقلیمی سبب اختلافات ظاهری در بین توده‌های دو منطقه شده است. نتایج پژوهش Momeni Monfared و همکاران (۲۰۱۸) بر روی ارزیابی خصوصیات برخی توده‌های ریحان (*Ocimum basilicum*) در شرایط آب‌وهوایی اهواز نشان داد که بخشی از تفاوت‌های موجود در بین توده‌ها را می‌توان به شرایط محیطی شهرستان اهواز نسبت داد. این نتایج با نتایج بدست آمده توسط Khadivi-Khub و همکاران (۲۰۱۵) روی ارزیابی تنوع ژنتیکی با بررسی صفات مورفولوژیکی مرزه بختیاری (*Satureja bachtiarica*) مطابقت داشت. آنان گزارش کردند که توده‌های مختلف از نظر تعداد شاخه، قطر گیاه، وزن گیاه، وزن برگ و گل و وزن شاخه متفاوت بودند.

نتایج این بررسی نشان داد که سطح برگ و وزن خشک بنفشه در جمعیت‌های کشت شده دارای تفاوت زیادی می‌باشد و گیاهان کشت شده از جمعیت کرمانشاه دارای بیشترین سطح برگ و وزن خشک است. به‌دلیل یکسان بودن شرایط آب‌و هوایی و کشت‌وکار گیاهان کشت شده در مزرعه دانشگاه کشاورزی گرگان، می‌توان دلیل این برتری را توانایی بالای ریزوم جمعیت کرمانشاه در جذب آب و مواد غذایی و همچنین سازگاری گیاه به شرایط مزرعه بیان کرد. به همین صورت در ارتباط با گونه *V. alba* جمع‌آوری شده از مناطق افراتخته و زیارت تفاوت معنی‌داری در صفات رشدی و مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی بین دو جمعیت دیده شد. به‌طوری که تعداد برگ و وزن تر و خشک اندام‌هایی در توده زیارت بیشتر از توده افراتخته بود، در حالی که از لحاظ صفات فیتوشیمیایی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل توده افراتخته از مقادیر بالاتری برخوردار بود. همچنین در مورد گونه شناخته‌شده *V. odorata*، در بین چهار توده کشت شده، تفاوت معنی‌داری از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیکی، رشدی و فیتوشیمیایی دیده شد، به‌طوری که بالاترین تعداد برگ و فعالیت آنتی‌اکسیدانی از توده قرن‌آباد، بیشترین طول و وزن خشک اندام هوایی، فنل کل و فلاونوئید کل مربوط به توده زیارت، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل از توده آمل و بیشترین طول و وزن تر ریشه، کلروفیل a و b، کلروفیل کل و کاروتنوئید از توده بندرگز بدست آمد. بنابراین باید توجه کرد که بخشی از تنوع مشاهده شده ژنتیکی است و به

اختلاف واقعی بین توده‌ها که از مناطق جغرافیایی مختلف با شرایط اقلیمی متفاوت جمع‌آوری شده‌اند بستگی دارد (Yousefi *et al*., 2021). باوجوداین نتایج اثر محیط بر تفاوت خصوصیات مشهود است. تفاوت‌های جغرافیایی یکی از مهمترین پارامترهای مؤثر بر رشد گیاهان دارویی است (Chen *et al*., 2014). زیستگاه گیاه از طریق تغییرات اقلیمی می‌تواند بر فرایند تشکیل متابولیت‌های ثانویه در اندام‌های مختلف گیاه تأثیرگذار باشد (Mehpour *et al*., 2015). ازاین‌رو با توجه به اختلاف دما، بارش و میزان تابش نور بین مناطق، می‌توان منشأ تفاوت در مقدار کلروفیل‌ها، کاروتنوئید و آنتوسیانین را به اختلاف شرایط آب و هوایی نسبت داد که تأثیرات حاصل از آنها در ریزوم گیاه ذخیره شده و در سال بعد تأثیر خود را در محل کشت جدید نشان می‌دهد. در همین راستا، در تحقیقی روی ترکیب‌های ثانویه گیاه آقطی (*Sambucus ebulus* L.) در سه شهر در استان گلستان، مشخص شد که با افزایش ارتفاع از محتوای فنل کل و فلاونوئید کل کاسته شده و بهترین کیفیت را از گیاهانی در ارتفاعات پایین می‌توان بدست آورد (Kaghazloo *et al*., 2017). همچنین در بررسی که برای ارزیابی اثر ارتفاع بر خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی برگ گیاه گزنه (*Urtica dioica* L.) در استان‌های مازندران و گلستان انجام شد، نتایج نشان داد که میزان ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدها، اسیدکلروژنیک، اسیدکافئیک و روتین در برگ گیاه گزنه با افزایش ارتفاع بیشتر شد؛ به‌نحوی که بیشترین میزان ترکیب‌های ذکرشده در ارتفاع ۲۲۵۲ متری منطقه له‌کوه مازندران مشاهده گردید (Najjar Firoozjaee *et al*., 2014). در پژوهش Fathi و همکاران (۲۰۱۹) نتایج نشان داد که سطوح بالایی از تنوع بین توده‌های مرزه تابستانه از نظر ویژگی‌های مورفولوژی و محتوای کلروفیل و فلاونوئید وجود دارد که با نتایج این تحقیق یکسان است. تغییرات عوامل اکولوژیکی نقش مؤثری را بر رشد و افزایش کمّیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی دارند. در نظر گرفتن ویژگی‌های محل رویش، موقعیت جغرافیایی، اندام گیاه و تأثیر عوامل اکولوژیک بر روی گیاه در طبیعت، از عمده عواملی هستند که می‌توانند بر میزان مواد مؤثره گیاه تأثیر زیادی داشته باشند (Mehpour *et al*., 2015). وجود اختلاف معنی‌دار در بین اکسشن‌های مختلف در هر یک از گونه‌ها علاوه‌بر خاصیت ذاتی ژنتیکی می‌تواند به‌دلیل سازش و تطابق با محیط حاصل شده باشد (Zargari, 1997). ترکیب‌های فنلی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی بوده و سبب حذف رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از تجزیه هیدروپروکسیدازها به رادیکال‌های آزاد می‌شوند (Zheng & Wang, 2001؛ Razali *et al*., 2008).

با بررسی گونه‌های کشت شده نیز تفاوت معنی‌داری بین صفات مورد مطالعه دیده شد، به‌طوری که بین گونه‌های متفاوت، همان‌طور که انتظار می‌رفت، از لحاظ صفات رشدی، مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی تفاوت‌های مشهودی مشاهده شد. نتایج نشان داد که گونه *V. alba* دارای بیشترین تعداد برگ و فنل کل و فلاونوئید کل، گونه *V. sieheana* بیشترین طول اندام هوایی و طول ریشه، گونه *V. ignobilis* دارای بیشترین سطح برگ و وزن تر و خشک اندام هوایی و وزن تر ریشه و گونه *V. odorata* دارای بیشترین کلروفیل a و b، کلروفیل کل، کاروتنوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. نتایج نشان داد که ترکیب‌های فنلی به‌عنوان یکی از مهمترین ترکیب‌های موجود در گونه‌های مختلف جنس بنفشه هستند. همان‌طور که در نتایج مشاهده شد میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به گونه و محل جمع‌آوری تحت تأثیر شرایط محیطی متفاوت است که با نتایج سایر پژوهشگران در گیاهان دارویی مختلف مطابقت دارد. Bystricka و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که میزان و نوع ترکیب‌های فنلی در گیاهان دارویی به گونه، نوع اندام و مرحله رشد گیاه بستگی دارد. پژوهش‌های انجام شده روی گیاهان دارویی مختلف نشان می‌دهد که ترکیب‌های فنلی اندام‌های گیاه تحت تأثیر ژنوتیپ و عادت رشدی است (Orhan *et al*., 2007). در پژوهش Norani و همکاران (۲۰۱۹) که برای مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی هفت جمعیت گیاه دارویی پای‌خر (*Tussilago farfara*) کشت شده در شرایط آب و هوایی

تهران انجام شد، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین فنل کل و فلاونوئید کل جمعیت‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشته و جمعیت نور با میانگین ۲۴۲ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره خشک بیشترین مقدار فنل کل را داشت و عصاره برگ جمعیت نور با IC_{50} برابر با ۲۷۱، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد. همچنین در همین ارتباط در تحقیق مشابهی روی سه گونه از جنس اسطوخودوس (*Lavandula* spp.) نتایج نشان داد که تفاوت بسیار معنی‌داری بین گونه‌های مورد بررسی وجود دارد که می‌تواند کارکرد آنها را در برابر تنش‌های محیطی تغییر دهد. در این تحقیق بیان شده علاوه‌بر دلایل ژنتیکی، این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط اقلیمی، مختصات جغرافیایی و خاک محل اولیه برداشت گونه‌های مورد بررسی باشد (Gorgini Shabankareh *et al.*, 2021). در پژوهشی Ghani و همکاران (۲۰۱۴) پس از بررسی تنوع بیوشیمیایی ۲۵ جمعیت از گیاه نعنا گزارش کردند که بین جمعیت‌های مورد مطالعه از نظر میزان کلروفیل a و b و کاروتنوئید، فلاون و فلاونوئید کل تفاوت معنی‌داری مشاهده شد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که آگاهی از ویژگی‌های مختلف مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی، به‌نژادگران را در اصلاح و اهلی‌سازی گیاهان یاری می‌کند. این مطالعه تحقیقی کاربردی برای ایجاد امکان گزینش به‌منظور انتخاب توده‌های مطلوب *Viola* spp. است. نتایج این تحقیق نشان داد که سطوح بالایی از تنوع بین توده‌های بنفشه از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی وجود دارد. در مجموع این مطالعه نشان داد که توده‌های *V. odorata*، *V. sieheana*، *V. alba* و *V. ignobilis* از قابلیت عملکردی بالایی برخوردارند و می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از این تنوع ناشی از تفاوت ژنتیکی جمعیت‌ها و بخشی تحت تأثیر عوامل اقلیمی و ادافیکی است. در نهایت کشت موفقیت‌آمیز این جمعیت‌ها در شرایط مزرعه امکان اهلی‌سازی موفق این جنس را نوید می‌دهد.

References

- Akhbari, M., Batooli, H. and JookarKashi, F., 2012. Composition of essential oil and biological activity of extracts of *Viola odorata* L. from central Iran. Natural Product Research, 26(9):802-809.
- Baharmast, Z., Kheiry, A., Sanikhani, M. and Soleimani, A., 2020. Study and comparison of morphological and phytochemical traits of *Mentha pulegium* L. in different habitats of Guilan province. Journal of Medicinal Plants Ecophytochemistry, 30(2): 60-75.
- Barens, J.D., Balaguer, L., Manrique, E., Elvira, S. and Davison, A.W., 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophyll a and b in lichens and higher plants. Environmental and Experimental Botany, 32(2): 85-100.
- Benzie, L.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a Measure of ‘‘Antioxidant Power’’: The FRAP Assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.
- Bystricka, J., Vollmannova, A., Margitanova, E. and Cicova, I., 2010. Dynamics of polyphenolics formation in different plant parts and different growth phases of selected buckwheat cultivars. Acta Agriculturae Slovenica, 95(3): 225-229.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Food and Drug Analysis, 10: 178-182.
- Chen, Ch., Li, P., Wang, R., Schaal, B. and Fu, Ch., 2014. The Population Genetics of Cultivation: Domestication of a Traditional Chinese Medicine, *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. (Scrophulariaceae). PLoS One, 9(8): e105064.
- Chorli, S., Khorasaninejad, S., Hemmati, Kh. and Kashefi, B., 2017. The study of morphological characteristics, antioxidant and essential oil contents of the medicinal plant *Stachys lavandulifolia* Vahl. in habitats of Semnan, Razavi, and North Khorasan provinces. Journal of Plant Environmental Physiology, 11(41): 41-52.
- Chorli, S., Khorasaninejad, S., Hemmati, Kh. and Kashefi, B., 2020. Ethnopharmacological, quantity and quality of flower and leaf of *Stachys lavandulifolia* Vahl. in four sites included Provinces of Semnan, Razavi and North Khorasan. Journal of Plant Environmental Physiology, 15(59): 72-88.
- Deepak, C., Gunjan, K., Kundan, P., Bisht, G., Vinay Deep, P. and Pandey, H.K., 2017. Chemical composition of the essential oil of *Viola serpens* from Bageshwar (Shama), Uttarakhad, India. Journal of Medicinal Plants Research, 11(32): 513-517.

- Fathi, R., Mohebodini, M. and Chamani, E., 2019. Evaluation of genetic diversity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) accessions based on morphological and phytochemical characteristics. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 36(6): 1005-1021.
- Fotovati, H. and Noorbakhsh, S., 2009. Biotechnology, the new aspect for agricultural progress. The 6th National Biotechnology Congress of Iran, Tehran, 13-15 August.
- Gavili Kilaneh, E. and Vahabi, M.R., 2012. The effect of some soil characteristics on range vegetation distribution in central Zagros, Iran. Journal of Water and Soil Science, 16(59): 245-258
- Ghani, A., Nemati, S.H., Azizi, M., Saharkhiz, M.J. and Farsi, M., 2014. The study of extract biochemical variations contents some of spearmint (*Mentha spicata* L.) population. Journal of Horticulture Science, 4(27): 433-443.
- Golchin, F., Fotokian, M.H., Hemmati, Kh. and Naqdieh Badi, H.A., 2013. Studies of physical and phytochemical traits of native populations of Asfarzeh in Golestan province under agronomic conditions. First National Conference on Agricultural Sciences, Payame Noor University, Azerbaijan Gharbi Province, 18-19 September.
- Gorgini Shabankareh, H., Khorasaninejad, S., Soltanloo, H. and Shariati, V. 2021. Physiological response and secondary metabolites of three Lavender genotypes under water deficit. Scientific Reports, 11: 19164.
- Hamidah, S., Firmanul Arifin, Y. and Fitriani, A., 2018. Micro climate assessment of medicinal plant habitat for the first step of domestication. Academic Research International, 9(3): 145-150.
- Hammami, I., Kamoun, N. and Rebai, A., 2011. Biocontrol of *Botrytis cinerea* with essential oil and methanol extract of *Viola odorata* L. flowers. Applied Science Research, 3(5): 44-51.
- Henriques, S.T. and Craik, D.J., 2010. Cyclotides as templates in drug design. Drug Discovery Today, 15: 57-64.
- JianHua, M., Zhu, Q., Dong, X., KunHua,W., YanXia, Z., ZhanJiang, Z., ShuangShuang, Q., PeiGen, X. and LuQi, H., 2018. Principles of medicinal plant introduction and domestication. Guangxi Zhiwu/Guihaia, 38(8): 973-983.
- Kaghazloo, Z., Hemati, Kh. and Khorasaninejad, S., 2017. The effect of height on some secondary metabolites of different organs of Sambucus (*Sambucus ebulus* L.) in three cities of Golestan province. Journal of Plant Environmental Physiology, 12(47): 31-43.
- Khadivi-Khub, A., Salehi-Arjmand, H., Movahedi, K. and Hadian, J., 2015. Molecular and morphological variability of *Satureja bachtiarica* in Iran. Plant Systematics and Evolution, 301(1): 77-93.
- Khatamsaz, M., 1990. Flora of Iran (Vol. 5). Published by the Ministry of Agriculture, Research Institute of Forest and Rangeland, First Edition, 55p.
- Khorshidi, J., Shekarpor, M. and Nazeri, V., 2019. Phytochemical study and comparison of medicinal plant (*Thymus daenensis* Celak) essential oil in natural and field habitats. Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants, 25(1): 1-11.
- Mehpour, M., Kashefi, B. and Moghadam, M., 2015. Study of phytochemical and antioxidant compounds of various organs of *Ferula assafoetida* L. in two natural habitats of Semnan and Khorasan provinces. Journal of Ecophytochemistry of Medicinal Plants, 13(1): 58-68.
- Mohammadi, R., Dehghani, H. and Zeynli H., 2014. Study of genetic variability of different masses of german chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) using morphological and phenological traits. Journal of Applied Crop Research, 27(105): 63-74.
- Momeni Monfared, M., Mahmoodi Sorestani, M., Zolfaghari, M. and Malekzadeh, M., 2018. Evaluation of quantitative and qualitative characteristics of essential oil of some Basil (*Ocimum basilicum* L.) accessions in Ahvaz weather conditions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 34(2): 286-297.
- Moradi, H., Haddadinejad, H., Yavari, A.R., Mohamadi Azni, M., Mosavi, S.M. and Hosseini, 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, 16(63): 101-115.
- Mozaffari, S., Khorasaninejad, S. and Shabankareh, H.G., 2017. The effects of irrigation regimes and humic acid on some of physiological and biochemical traits of common Purslane in greenhouse. Journal of Crops Improvement, 19(2): 401-416.
- Muhammad, N., Saeed, M., Aleem, A. and Khan, H., 2012. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological profile of genus *Viola*. Phytopharmacology, 3(1): 214-226.
- Najjar Firoozjaee, M., Hemmati, K., Khorasaninejad, S., Daraei Garmekhani, A. and Bagherifard, A.A., 2014. The effect of height on morphological characteristics and some secondary metabolites of nettle plant in Mazandaran and Golestan provinces. Journal of Plant Ecophysiological Research, 9(3): 1-10.
- Nemeth, D.J., 2002. The Gypsy-American: An Ethnogeographic Study. Volume 1. Edwin Mellen Press, 312p.
- Norani, M., Ebadi M. and Ayari Noshabadi, M., 2019. Cultivation and comparing morphological and

- Suratia, V.K.V., Singha, R.P., Srivastava, G.K. and Singha, A.K., 2015. Evaluation of in vitro antimicrobial activity and essential oil composition of ethanol extract of *Viola odorata* leaves. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, l4(5): 1121-1129.
- Vogel, V., Bodenhausen, N., Gruissem, W. and Vorholt, J.A., 2016. The Arabidopsis leaf transcriptome reveals distinct but also overlapping responses to colonization by phyllosphere commensals and pathogen infection with impact on plant health. New Phytologist, 212(1): 192-207.
- Wagner, G.J., 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids and anthocyanin in protoplasts. Plant Physiology, 64: 88-93.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J, M. and Ren, J., 2010. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry, 120(3): 810-816.
- Yousefi, B., Tabaie-Aghdaei, S.R. and Amiri, A., 2021. Study on yield and flower yield components, essential oil percentage, and some morphological and phenological traits in 48 different accessions of damask rose (*Rosa damascena* Mill.) in Kermanshah province. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 37(4): 612-627.
- Zare, F., Khorasaninejad, S. and Hemmati, Kh., 2018. The effect of silicon on some morpho-physiological and phytochemical traits of Purple Coneflower (*Echinacea purpurea* L.) under salinity stress. Iranian Journal of Plant Biology, 10(3): 55-68.
- Zargari, A., 1997. Medicinal Plants (Vol. 4). Tehran University Publicans, Tehran, Iran, 970p.
- Zheng, W. and Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(11): 5165-5170.
- Zobayed, S.M., Afreen, F. and T. Kozai., 2005. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentration in St. John's wort. Journal of Plant physiology and Biochemistry, 43(10-11): 977-984.

phytochemical characteristics of seven populations of *Tussilago farfara* L. in Tehran climate conditions. Journal of Horticultural Science, 33(3): 433-449.
- Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., Furuta, S. and Suda, I., 2002. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(26): 7526-7529.
- Orhan, I., Ozcelik, B., Kartal, M., Ozdeveci, B. and Duman, H., 2007. HPLC quantification of vitexine-2"-O-rhamnoside and hyperoside in three Crataegus species and their antimicrobial and antiviral activities. Chromatographia, 66: 153-157.
- Osamny, Zh. and Siosemardeh, A., 2009. A study of genetic diversity in sardari wheat ecotypes using AFLP markers and agronomic traits. Journal of Water and Soil Science, 13(47): 301-320.
- Pank, F., 2007. Breeding of medicinal plant: 417-450. In: Oliver, K. and Quax W.J., (Eds.). Medicinal Plant Biotechnology from Basic Research to Industrial Applications. Wiley-VCH Verlag Gmb H & Co. K Ga A., Weinheim, 576p.
- Razali, N., Razab, R., Junit, S. and Abdulaziz, A., 2008. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale* L.). Food Chemistry, 111: 38-44.
- Saghalli, A., Farkhari, M., Salavati, A. Alamisaeid, Kh. and Abdali Mashhadi, A.R., 2018. Evaluation of the genetic diversity of *Silybum marianum* L. ecotypes using yield components, morphological and phenological traits. Iranian Journal of medicinal and Aromatic Plants Research, 33(6): 990-1002.
- Saparinto, C. and Susiana, R., 2016. Grow your own medical plant. Yogyakarta, Penerbit Andi, 481p.
- Solouki, M., Mehdikhani, H., Zeinali, H. and Emamjomeh, A.A., 2008. Study of genetic diversity in chamomile (*Matricaria chamomile*) based on morphological traits and molecular markers. Scientia Horticultura, 117(3): 281-287.
- Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zhang, L. and Zhang, Y., 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. Food and Chemical Toxicology, 49(10): 2689-2696.

Feasibility study on some native Iranian *Viola* spp. domestication

M. Ghorbani[1], S. Khorasaninejad[2*], Kh. Hemmati[3] and Kh. Ghorbani[4]

1- M.Sc. student in medicinal plant, Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2*- Corresponding author, Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, E-mail: khorasaninejad@gau.ac.ir; skhorasaninejad@yahoo.com
3- Horticultural Sciences Department, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4- Department of Structures and Water Resources, Faculty of Water and Soil, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: April 2022 Revised: September 2022 Accepted: October 2022

Abstract

This study was aimed at comparing *Viola* spp. populations collected from north and northwest of Iran to investigate the adaptability and feasibility of their domestication under climatic conditions of Gorgan. The whole plant samples together with their rhizomes were collected from nine habitats in Golestan, Mazandaran, Gilan, East Azerbaijan, and Kermanshah provinces during the growing season. After botanical approval and receiving herbarium code, the rhizomes were cultivated under the same soil and climate with three replications. Their yield components and physiological, morphological, and phytochemical traits were measured after one crop year at flowering stage. The results showed that these populations were from *V. alba* Besser, *V. odorata* L., *V. sieheana* W.Becker, and *V. ignobilis* Rups. species. All populations produced flowers and seeds after one crop year. The populations differed significantly ($P<0.01$). *V. ignobilis* from *Kermanshah* had the highest amount of root and aerial parts fresh weight, aerial parts dry weight, and leaf area. The highest amount of root and aerial parts length belonged to *V. sieheana* from *Alangdare*. *V. alba* from *Ziarat* had the highest amount of total phenols (45.74 mg gallic acid per gram of dry extract) and total flavonoids (20.24 mg quercetin per gram of dry extract). The highest amount of chlorophylls *a* and *b*, total chlorophyll, carotenoids, and anthocyanins was observed in *V. odorata* from *Bandargaz*. The highest antioxidant activity by DPPH and ABTS methods was found in *V. alba* from *Afratakhte* and the highest one by FRAP was observed in *V. odorata* from *Qarnabad*. The highest amount of total antioxidant was measured in *V. alba* and *V. oderata* populations from *Ziarat* region. Overall, the results proved the considerable traits diversity in *Viola* spp. populations. This diversity could be due to the high genetic potential among different populations, differences in environmental conditions, or the interaction of population and environment.

Keywords: ABTS, DPPH, *Viola alba*, *Viola ignobili*, *Viola odorata*, *Viola sieheana*.