

گوناگونی ویژگی‌های رویشی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنل و فلاونوئید کل برگ در

جمعیت‌های بنفشه معطر (*Viola odorata* L.)

احد چراغی^۱، مرضیه قنبری جهرمی^{۱*}، امیر موسوی^۲

۱- گروه علوم باغبانی و زراعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

۲- گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

✉ ghanbari@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۸/۴، تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۹/۶، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۹/۸

چکیده

بنفشه معطر (*Viola odorata* L.) گیاهی چندساله از تیره Violaceae است که به صورت خودرو در مناطقی از شمال ایران می‌روید. این پژوهش برای بررسی گوناگونی الگوی رشد رویشی و برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی در ۱۰ جمعیت برگزیده گیاه بنفشه معطر در استان مازندران در اوایل بهمن ۱۴۰۱ پیش از آغاز گلدهی در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. رویشگاه‌ها شامل الیمالات، لایوچ، آب‌پری، پارک جنگلی نور، سی‌سنگان، نمک‌آبرود، کلارآباد، امامزاده عبدالله، لاریجان و خشت‌سر بودند. از هر رویشگاه در هر تکرار، ۱۰ نمونه گیاهی جمع‌آوری شد و صفات مربوط به خصوصیات رویشی، رنگدانه‌های نورساختی و ترکیبات فیتوشیمیایی برگ هر جمعیت ارزیابی گردید. نتایج نشان داد تمامی صفات در رویشگاه‌های مختلف تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهند به طوری که بیشترین ارتفاع بوته و تعداد برگ در نمونه‌های مربوط به رویشگاه‌های الیمالات، لایوچ و خشت‌سر مشاهده شد؛ بیشترین قطر ساقه اصلی و فرعی، وزن تر و خشک بوته، عرض و سطح برگ و قطر دمبرگ در رویشگاه‌های کلارآباد و نمک‌آبرود و سپس خشت‌سر گزارش گردید. بیشترین رنگدانه‌های نورساختی برگ در رویشگاه‌های غرب مازندران (کلارآباد و نمک‌آبرود) ارزیابی شد؛ بیشترین مقادیر ترکیبات فیتوشیمیایی مربوط به نمونه‌های رویشگاه لاریجان با بیشترین ارتفاع از سطح دریا (۴۱۱۵ متر) بود. تجزیه خوشه‌ای رویشگاه‌های مختلف بر اساس صفات اندازه‌گیری شده، جمعیت‌های مختلف بنفشه معطر را به سه گروه مجزا تقسیم‌بندی کرد. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت‌های جغرافیایی، یکی از مهم‌ترین پارامترهای مؤثر بر رشد و کیفیت گیاهان زینتی و دارویی است. اغلب صفات مورفولوژیکی، رنگدانه‌های نورساختی برگ بنفشه و مواد موثره مانند فنل و فلاونوئید کل در جمعیت‌های مورد بررسی دارای تفاوت زیادی بودند، که بخشی از این گوناگونی می‌تواند مربوط به ویژگی‌های ژنتیکی و بخشی وابسته به شرایط اقلیمی باشد.

واژه‌های کلیدی: بنفشه، خصوصیات برگ، رویشگاه، ویژگی‌های بیوشیمیایی.

مقدمه

کشور ایران رویشگاه طبیعی گونه‌های بی‌شماری از گیاهان است که جزو منابع با ارزش ژنتیکی در پژوهش‌های بنیادی و کاربردی به‌نژادی گیاهان به شمار می‌آیند و در برطرف کردن نیازهای انسان می‌تواند کمک شایانی نمایند (Yazdi Far et al., 2022). عواملی همچون خاک، شرایط آب و هوایی و غیره، گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. در چنین حالاتی علاوه بر اینکه بین ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه تفاوت دیده می‌شود از لحاظ ترکیبات دارویی فعال نیز با هم فرق می‌کنند (Chen et al., 2023). بهره‌برداری بیش از حد از منابع وحشی، فرسایش ژنتیکی را افزایش می‌دهد (Vogel et al., 2016). بیشتر گونه‌های گیاهی دارویی (حدود ۸۲ درصد) از جنگل به‌دست می‌آیند و کوششی برای کشت و اهلی کردن آن‌ها انجام نشده است. تنها ۲۰ درصد از گیاهان دارویی کشت می‌شوند و این نشان دهنده پایین بودن توسعه گیاهان دارویی بومی است (Hamidah et al., 2018).

بنفشه معطر^۱ (Noori et al., 2016) یکی از ۴۷۸ گونه *Viola* از تیره Violaceae (گل بنفشه) است (Qasemzadeh et al., 2015). این گونه گیاهی با کاربردهای درمانی زیاد از گذشته‌های دور گیاهی کم‌عارضه (Noori et al., 2016؛ Qasemzadeh et al., 2015) بوده و در طب سنتی ایران، مزاج سرد و تر (Motavasselian et al., 2022) دارد. این گیاه بومی آسیا، شمال آفریقا و اروپا می‌باشد و به‌طور گسترده در مناطق شمالی ایران به‌صورت خودرو یافت می‌شود (Feyzabadi et al., 2014؛ Mozafarian, 2022). در پژوهشی که به منظور تشخیص گونه‌های گیاهی رایج شمال ایران در جنگل‌های جنوب دریای خزر انجام شد، بنفشه معطر *V. odorata* L. بیشترین گونه رایج بنفشه‌ها در جنگل‌های خزری بود (Rad & Shafiei, 2010). مطالعه گوناگونی ژنتیکی گیاهان بومی در دو دهه گذشته عمدتاً با استفاده از نشانگرهای مورفولوژی، فیتوشیمیایی و اخیراً مولکولی انجام شده است (Moradi et al., 2022؛ MirMohammadi Maibody & Golkar, 2019). در بررسی گوناگونی ژنتیکی توده‌های گیاه بومی، استفاده از هر سه نوع نشانگرها؛ موجب نمایان ساختن گوناگونی ژنتیکی گیاه و نیز منجر به شناسایی تیپ‌های شکلی و شیمیایی گیاه می‌شوند.

با توجه به اهمیت گیاه بنفشه معطر از لحاظ ویژگی‌های زینتی، دارویی و همچنین دارا بودن ترکیبات منحصر به فرد و با ارزش و از همه مهمتر تحقیقات اندک در رابطه با شناسایی نقش رویشگاه بر روی خصوصیات ریخت‌شناسی و نیز ترکیبات موثره این گیاه زیبا، انجام تحقیق حاضر در رویشگاه‌های مختلف ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

برای بررسی تاثیر خصوصیات رویشگاه‌های مختلف بر صفات مورفوفیتوشیمیایی و رنگدانه‌های نورساختی برگ بنفشه معطر، آزمایشی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. جهت انجام آزمایش، ابتدا گیاه مورد نظر از طریق پلات‌گذاری به فاصله ۵ متر از یکدیگر با ابعاد ۲×۲ مترمربع؛ در عرصه‌های منابع طبیعی ۱۰ رویشگاه مختلف برگزیده جمع‌آوری گردید. اطلاعات جغرافیایی مناطق ده‌گانه توسط GPS دستی و با درج اطلاعاتی از قبیل طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا یادداشت‌برداری و ثبت گردید (جدول ۱).



جدول ۱- اطلاعات جغرافیایی رویشگاه‌های مورد نظر.

Table 1- Geographic information of the habitats.

ردیف	شهرستان	رویشگاه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)	زمان نمونه‌برداری
Row	City	Habitat	Longitude	Latitude	Above sea level (m)	Sampling time
1	تنکابن	کلارآباد	51.14.50	36.41.08	0	2 February 2023
2	چالوس	نمک‌آبرود	51.19.13	36.40.11	-13	1 February 2023
3	نوشهر	سی‌سنگان	51.48.37	36.34.33	101	3 February 2023
4	نور	آب‌پری	51.54.57	36.28.42	1424	28 January 2023
5	نور	الیمالات	52.03.19	36.29.28	250	27 January 2023
6	نور	پارک جنگلی نور	20.03.22	36.34.05	4	28 January 2023
7	نور	لاویج	52.02.19	36.22.26	2180	25 January 2023
8	محمودآباد	خشت‌سر	52.11.52	36.36.43	-65	7 February 2023
9	آمل	لاریجان	52.11.35	35.54.17	4115	5 February 2023
10	آمل	امامزاده عبدالله	52.18.09	36.24.21	528	6 February 2023

خصوصیات خاک رویشگاه‌ها

از مناطق ده‌گانه مورد مطالعه از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر (عمق نفوذ ریشه گیاه) نمونه خاک تهیه و به آزمایشگاه خاکشناسی منتقل و اطلاعاتی از قبیل بافت خاک، pH، EC، میزان ماده آلی و NPK مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (جدول ۲). عملیات نمونه‌برداری از گیاهان در اوایل بهمن ۱۴۰۱ پیش از آغاز گلدهی انجام شد. از هر جمعیت مورد مطالعه تعداد ده بوته به صورت تصادفی انتخاب و در مرحله بعد به منظور شناسایی دقیق و انجام بررسی‌های مورفولوژیک از منابع مختلف شامل فلور ایرانیکا (Reachinger, 1984)، فلور ایران- تیره Violaceae (Mozafarian, 2022) استفاده شد. همچنین بر اساس اطلاعات مقاله‌های مختلف برخی از صفات مورفولوژیک مهم انتخاب و مورد شناسایی و اندازه‌گیری قرار گرفت (Zakaria)



(Moradi et al., 2022؛ Nejad et al., 2022). برای بررسی صفات فیتوشیمیایی نیز از جمعیت هر رویشگاه، ۱۰ نمونه برداشت شد. انتخاب بوته‌ها به صورت تصادفی در فاصله ۴ متر از هم انجام گردید.

جدول ۲- خصوصیات خاک رویشگاه‌های مورد نظر.

Table 2- Soil characteristics of the habitats.

ردیف Row	رویشگاه Habitat	بافت خاک Soil texture	ماده آلی Organic matter (%)	EC (ds/m)	pH	N (%)	P (ppm)	K (ppm)
1	کلارآباد Kalarabad	لومی Loamy	7.50	0.38	5.50	0.42	7.00	150
2	نمک‌آبرود Namak Abroud	لومی Loamy	7.00	0.35	5.00	0.40	7.10	153
3	سی‌سنگان Seasangan	لومی شنی Sandy loam	7.50	0.30	5.50	0.42	7.20	150
4	آب‌پری Abpari	لومی رسی Clay loam	6.50	0.44	5.80	0.40	7.00	148
5	ایمالات Elimalat	لومی شنی Sandy loam	6.92	0.52	6.00	0.38	6.00	142
6	پارک جنگلی نور Noor forest park	لومی Loamy	6.50	0.42	6.00	0.35	6.30	138
7	لاویج Lavij	لومی رسی Clay loam	6.70	0.50	6.20	0.35	6.00	135
8	خشت‌سر Khesht sar	لومی Loamy	6.00	0.46	5.80	0.30	6.00	135
9	لاریجان Larijan	لومی رسی Clay loam	5.20	0.43	6.80	0.30	6.20	130
10	امامزاده عبدالله Emamzadeh Abdollah	لومی رسی Clay loam	6.20	0.47	6.00	0.32	5.90	132

ارزیابی صفات مورفولوژیک

خصوصیات بوته

ارتفاع بوته با خط‌کش میلی‌متری، قطر ساقه اصلی و فرعی با کولیس بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و تعداد شاخه فرعی در هر گیاه شمارش شد. پس از شستشوی مختصر و جدا کردن خاک و برش از محل طوقه، وزن تر بوته (اندام هوایی) با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ درصد سنجش شد. بوته‌هایی که از محل طوقه جدا شدند، پس از شستشوی مختصر و جدا کردن خاک



در آون با دمای ۴۸ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفته و سپس وزن خشک بوته (اندام هوایی) با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ درصد ارزیابی شد.

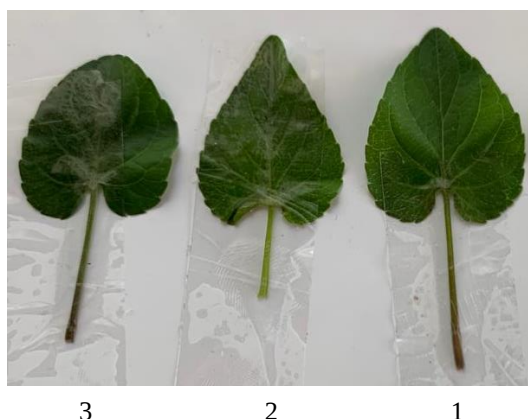
خصوصیات برگ

طول و عرض برگ و طول دمبرگ با خطکش میلی متری، سطح برگ با استفاده از سطح سنج برگ و قطر دمبرگ با کولیس اندازه گیری شد. در هر گیاه تمامی برگ ها جدا و شمارش گردید.

وضعیت نوک برگ

از هر رویشگاه سه گیاه و از هر گیاه سه برگ به صورت تصادفی جدا شده و از نظر نوک برگ ها به سه دسته قرار داده شد (شکل ۱).

شاخص های تعیین وضعیت نوک برگ: نوک تیز معمولی (نوک برگ خیلی تیز نیست خیلی هم گرد نیست) شماره ۱، نوک برگ خیلی تیز و نازک شماره ۲ و نوک برگ حالت گرد و نیم دایره شماره ۳



شکل ۱- انواع وضعیت نوک برگ گیاه بنفشه معطر. نوک تیز معمولی (۱)، خیلی تیز و نازک (۲)، گرد و نیم دایره (۳).

Figure 1- Types of leaf tip shapes. Normal sharp tip (1), very sharp and thin (2), round and semicircular (3).

سنجش میزان رنگدانه های گیاهی

برای مقایسه میزان رنگدانه های گیاهی؛ مقدار نیم گرم از پیکره رویشی گیاه در هاون چینی ریخته، سپس با استفاده از نیتروژن مایع خرد و به خوبی له شد. ۲۰ میلی لیتر استن ۸۰ درصد به نمونه اضافه شد، سپس در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. عصاره جدا شده فوقانی حاصل از سانتریفیوژ به بالن شیشه ای منتقل شد. مقداری از نمونه داخل بالن، در کووت اسپکتروفتومتر ریخته و سپس به طور جداگانه در طول موج های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ برای کارتنوئیدها توسط اسپکتروفتومتر مدل Visible/UV-45 Lambda مقدار جذب قرائت شد. در نهایت با استفاده از رابطه های ۱-۳ میزان کلروفیل a، b و کارتنوئیدها بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه به دست آمد (Arnon, 1967).

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 \times A_{663} - 0.86 \times A_{645}) V/100W$$

رابطه ۱

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663}) V/100W$$

رابطه ۲

$$\text{Carotenoides} = 100(A470) - 3.27(\text{mg chl. a}) - 104(\text{mg chl. b})/227$$

رابطه ۳

V = حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتیفریوژ)

A = جذب نور در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر

W = وزن تر نمونه بر حسب گرم

بررسی صفات فیتوشیمیایی

اندازه‌گیری میزان فنل کل

پس از عصاره‌گیری متانولی، عصاره‌های حاصل با دستگاه تبخیرکننده چرخان در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و میزان ترکیب‌های فنلی موجود در عصاره این گیاه از طریق رنگ‌سنجی به روش فولین - سیوکالتو مورد بررسی قرار گرفت (Singleton & Rossi, 1965). مطابق روش McDonald و همکاران (۲۰۰۱)، ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره استخراجی با ۵ میلی‌لیتر معرف فولین - سیوکالتو (که با آب مقطر ۱۰ برابر رقیق شد) و ۴ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم یک مولار به خوبی مخلوط گردید. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس مقدار جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Visible/UV-45 Lambda در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد (Oroojalian et al., 2010). بدین منظور روش رنگ‌سنجی (فولین - سیوکالتو) نیز روی محلول‌های استاندارد اسید تانیک با غلظت‌های مختلف انجام شد. منحنی استاندارد در برابر جذب اسید تانیک رسم گردید ($Y=0/00114X+0/01062$ ، Y عدد جذب و X غلظت بر حسب ppm). برای تعیین غلظت فنل نمونه‌ها، اعداد جذب به دست آمده از اسپکتروفتومتر را در معادله بالا (Y) قرار داده و میزان غلظت ترکیب‌های فنلی موجود در نمونه‌ها بر حسب ppm (X) محاسبه گردید. در نهایت مقادیر فنل تام عصاره با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره اندازه‌گیری شد.

تعیین میزان فلاونوئید کل

از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئیدها استفاده شد. هر کدام از عصاره‌های متانولی گیاهی (نیم میلی‌لیتر از ۱:۱۰ گرم بر میلی‌لیتر) به صورت جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰ درصد متانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (۱M) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Visible/UV-45 Lambda اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با محلول‌های کوئرستین (Quercetin, Sigma Chemical Co.) متانولی در غلظت‌های ۲۵۰-۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و منحنی با نرم‌افزار Excel رسم گردید، سپس معادله خط $y=bx+a$ به دست آمد. جذب‌های خوانده شده از نمونه‌ها به جای y قرار داده شده و x یا همان غلظت به دست آمد (Chang et al., 2002).

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، از رادیکال آزاد دی‌پی‌پی‌اچ (۲ و ۲- دی‌فنیل - پیکریل - هیدرازیل) استفاده شد. ابتدا عصاره‌های متانولی نمونه گیاهی در غلظت‌های متفاوت ۵×۱۰^{-۲} الی ۵×۱۰^{-۶} در متانول خالص تهیه گردید.



سپس مخلوطی به نسبت ۱:۱ از محلول (8 mg/100) DPPH و عصاره‌های گیاهی با غلظت‌های متفاوت تهیه شد. جذب نمونه‌ها بعد از ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه در ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Visible/UV-45 Lambda اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها با استفاده از رابطه زیر به دست آمد:

$$R\% = AD - AS / AD \times 100$$

R٪: درصد مهار، AD: جذب DPPH در ۵۱۷ نانومتر، AS: جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر
برای مقایسه فعالیت عصاره‌ها از پارامتر IC50 (غلظتی از عصاره که ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کند) استفاده شد (Sun et al., 2007).

تجزیه و تحلیل آماری

پس از داده‌برداری، تجزیه واریانس در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و پس از آن میانگین صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت. جهت دسته‌بندی جمعیت‌ها از روش تجزیه و تحلیل خوشه‌ای (کلاستر) به روش Ward و نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ استفاده شد. رسم نمودارها و جداول آماری نیز توسط نرم‌افزارهای Excel و Word office 2016 صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

خصوصیات بوته

رویشگاه بر صفات ارتفاع بوته، قطر ساقه اصلی و فرعی، وزن تر و خشک بوته بنفشه معطر در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار ایجاد نمود، تعداد شاخه فرعی تحت اثر رویشگاه تفاوت معنی‌دار نشان نداد (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر رویشگاه بر خصوصیات بوته بنفشه معطر.

Table 3- Analysis of variance effect of habitat on the characteristics of the sweet violet plant.

وزن خشک بوته	وزن تر بوته	قطر ساقه فرعی	قطر ساقه اصلی	تعداد شاخه فرعی	ارتفاع بوته	درجه آزادی	منابع تغییر
Dry weight of the plant	Fresh weight of the plant	Diameter of the secondary stem	Diameter of the main stem	Number of sub-branches	Height	DF	S.O.V
19.13**	142.92**	1.25**	1.47**	4.09 ^{ns}	158.30**	9	رویشگاه
1.07	12.03	0.06	0.03	2.03	2.80	20	خطا
							Error
9.92	11.71	13.12	7.61	25.92	18.26	-	ضرب تغییرات
							C.V. (%)

** و ns به ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد و نبود تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

** and ns respectively indicate significance at the probability level of one percent and absence of significant difference.

بیشترین ارتفاع بوته در رویشگاه خشت‌سر (۴۰ سانتی‌متر) مشاهده شد که نسبت به رویشگاه لایوچ (۳۹/۶۷ سانتی‌متر) تفاوت اندکی داشت که احتمالاً با وجود اختلاف زیاد این دو رویشگاه از نظر ارتفاع از سطح دریا؛ تشابه در سایر مشخصات اقلیمی



از جمله خصوصیات خاک، این دو رویشگاه در یک گروه قرار گرفت. در رویشگاه کلارآباد تنکابن بیشترین میزان قطر ساقه اصلی (۳/۶۰ میلی‌متر) مشاهده شد و پس از آن نمک‌آبرود چالوس (۳/۴۰ میلی‌متر) بود. بیشترین قطر ساقه فرعی مربوط به رویشگاه کلارآباد با میانگین عددی ۲/۷۷ میلی‌متر و کمترین آن مربوط به رویشگاه امامزاده عبدالله با میانگین عددی ۰/۹۳ میلی‌متر بود. بیشترین وزن تر بوته بنفشه معطر (۳۹/۶۷ گرم) در رویشگاه کلارآباد و بیشترین وزن خشک بوته در رویشگاه کلارآباد (۱۳/۵۰ گرم) و پس از آن در رویشگاه نمک‌آبرود (۱۲/۸۳ گرم) مشاهده شد. این دو رویشگاه از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نداشته و در یک گروه قرار گرفتند (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر رویشگاه بر خصوصیات بوته بنفشه معطر.

Table 4- Comparison of the average effect of the habitat on the characteristics of the sweet violet plant.

رویشگاه	ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	قطر ساقه اصلی (میلی‌متر)	قطر ساقه فرعی (میلی‌متر)	وزن تر بوته (گرم)	وزن خشک بوته (گرم)
Habitat	Plant height (cm)	Diameter of the main stem (mm)	Diameter of the secondary stem (mm)	Fresh weight of the plant (gr)	Dry weight of the plant (gr)
ایمالات	36.67 ^{ab}	2.30 ^d	1.73 ^{de}	30.33 ^{cd}	10.00 ^{cd}
Elimalat					
لاویج	39.67 ^a	1.87 ^e	1.40 ^e	24.33 ^e	8.33 ^{de}
Lavij					
آب‌پری	28.33 ^{bc}	2.63 ^{bc}	1.90 ^{cd}	30.67 ^{cd}	11.00 ^{bc}
Abpari					
پارک جنگلی نور	29.33 ^{bc}	2.17 ^{de}	1.50 ^{de}	27.33 ^{de}	9.50 ^{cde}
Noor forest park					
سی‌سنگان	34.00 ^{ab}	2.87 ^b	2.30 ^{bc}	32.33 ^{cd}	12.00 ^{ab}
Seasangan					
نمک‌آبرود	24.00 ^c	3.40 ^a	2.70 ^{ab}	38.33 ^{ab}	12.83 ^a
Namak abroud					
کلارآباد	22.33 ^c	3.60 ^a	2.77 ^a	39.67 ^a	13.50 ^a
Kalarabad					
امامزاده عبدالله	20.67 ^c	1.33 ^f	0.93 ^f	17.67 ^f	6.00 ^f
Emamzadeh Abdollah					
لاریجان	24.00 ^c	1.90 ^e	1.37 ^e	22.33 ^{ef}	8.00 ^e
Larijan					
خشت‌سر	40.00 ^a	2.40 ^{cd}	2.63 ^{ab}	33.33 ^{bc}	13.33 ^a
Kheshtsar					

در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD ندارند.

In each column, the means with at least one common letter are not significantly different Based on the LSD test ($P < 0.05$).



خصوصیات برگ

طول، عرض و تعداد برگ و قطر دمبرگ گیاه بنفشه معطر تحت اثر رویشگاه‌های مختلف در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار نشان داد. با این حال سطح برگ در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد و طول دمبرگ تفاوت معنی‌دار نشان نداد (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیه واریانس اثر رویشگاه بر خصوصیات برگ بنفشه معطر

Table 5- Analysis of variance effect of the habitat on the characteristics of the sweet violet leaves							منابع تغییر
قطر دمبرگ	طول دمبرگ	سطح برگ	تعداد برگ	عرض برگ	طول برگ	درجه آزادی	S.O.V
Petiole diameter	Petiole length	Leaf area	Number of leaves	Leaf width	Leaf length	DF	
0.62**	1.04 ^{ns}	10.55*	360.08**	0.34**	0.63**	9	رویشگاه
							Habitat
0.03	0.60	3.70	9.53	0.08	0.17	20	خطا
							Error
							ضریب
11.52	20.37	17.54	9.52	11.85	14.26	-	تغییرات
							C.V. (%)

***, ** و ns به ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد و نبود تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

***, * and ns respectively indicate significance at the probability level of 1 and 5 percent and absence of significant difference.

اگرچه طول برگ در رویشگاه‌های مختلف متفاوت بود اما تمامی رویشگاه‌ها به جز امامزاده عبدالله که کمترین طول برگ (۱/۱۷ سانتی‌متر) را دارا بود، در یک گروه آماری قرار گرفتند. بیشترین عرض برگ بنفشه معطر (۲/۸۳ سانتی‌متر) در کلارآباد و کمترین آن (۱/۶۷ سانتی‌متر) در امامزاده عبدالله و بیشترین تعداد برگ در بوته (میانگین عددی ۴۸/۳۳ عدد) در رویشگاه لاویج و در رویشگاه امامزاده عبدالله کمترین تعداد برگ (میانگین عددی ۱۷/۶۷ عدد) شمارش گردید. بیشترین سطح برگ مربوط به رویشگاه‌های نمک‌آبرود چالوس و کلارآباد با میانگین عددی ۱۳/۳۳ سانتی‌متر مربع و کمترین سطح برگ (۷/۳۳ سانتی‌متر مربع) در رویشگاه امامزاده عبدالله مشاهده شد. بیشترین قطر دمبرگ (۲/۱۲ میلی‌متر) در خشت‌سر و پس از آن کلارآباد (۲/۰۵ میلی‌متر) ارزیابی شد که این دو رویشگاه در صفت مذکور در یک رده آماری قرار گرفتند. کمترین قطر دمبرگ (۰/۹۰ میلی‌متر) در رویشگاه امامزاده عبدالله مشاهده شد (جدول ۶).



جدول ۶- مقایسه میانگین اثر رویشگاه بر خصوصیات برگ گیاه بنفشه معطر

Table 6- Comparison results of the average effect of the habitat on the characteristics of the leaves of the sweet violet plant

رویشگاه	طول برگ (سانتی متر)	عرض برگ (سانتی متر)	تعداد برگ	سطح برگ (سانتی متر مربع)	قطر دمبرگ (میلی متر)
Habitat	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Number of leaves	Leaf area (cm ²)	Petiole diameter (mm)
الیمالات	2.83 ^a	2.47 ^{abc}	46.67 ^{ab}	10.33 ^{abc}	1.45 ^{de}
Elimalat					
لاویج	2.80 ^a	2.27 ^{bc}	48.33 ^a	10.67 ^{ab}	1.38 ^{de}
Lavij					
آب پری	3.00 ^a	2.50 ^{abc}	34.33 ^c	12.67 ^{ab}	1.63 ^{cd}
Abpari					
پارک جنگلی نور	2.83 ^a	2.67 ^{bc}	35.33 ^c	12.67 ^{ab}	1.40 ^{de}
Noor forest park					
سی سنگان	3.17 ^a	2.70 ^{ab}	42.67 ^b	9.67 ^{bc}	1.78 ^{bc}
Seasangan					
نمک آبرود	3.17 ^a	2.73 ^{ab}	25.00 ^d	13.33 ^a	2.05 ^{ab}
Namak abroud					
کلارآباد	3.23 ^a	2.83 ^a	21.00 ^{de}	13.33 ^a	2.25 ^a
Kalarabad					
امامزاده عبدالله	1.17 ^b	1.67 ^d	17.67 ^e	7.33 ^c	0.90 ^f
Emamzadeh Abdollah					
لاریجان	2.67 ^a	2.17 ^c	31.00 ^c	9.67 ^{bc}	1.02 ^{ef}
Larijan					
خشت سر	3.17 ^a	2.37 ^{abc}	22.33 ^{de}	11.00 ^{ab}	2.12 ^a
Kheshtsar					

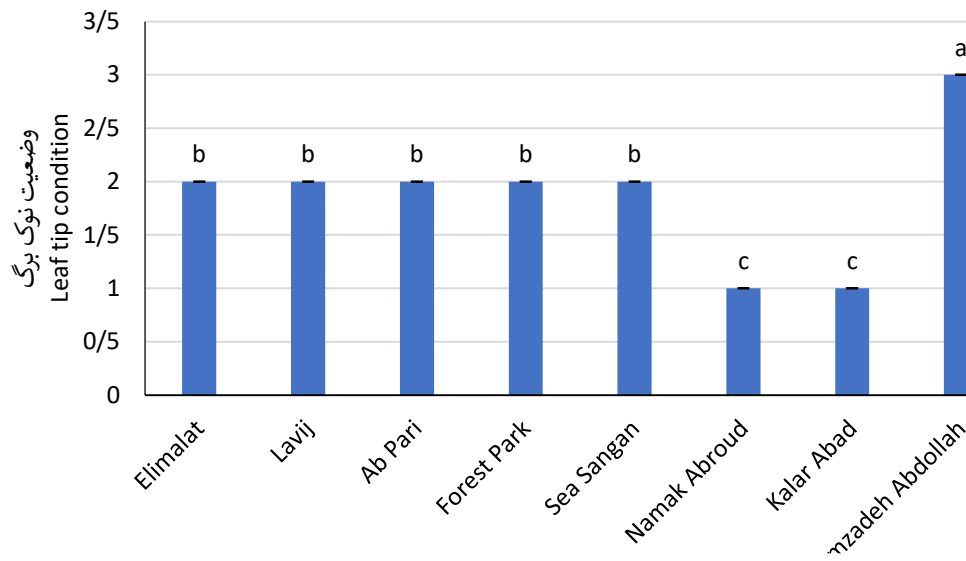
در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD ندارند.

In each column, the means with at least one common letter are not significantly different Based on the LSD test (P<0.05).

وضعیت نوک برگ

وضعیت نوک برگ در رویشگاه‌های لاریجان، کلارآباد و نمک‌آبرود حالت گرد و نیم‌دایره بود، در رویشگاه‌های الیمالات، لاویج، آب‌پری، پارک جنگلی نور، سی‌سنگان و خشت‌سر عمدتاً برگ به حالت نوک تیز و نازک و در رویشگاه امامزاده عبدالله نوک تیز معمولی بود (شکل ۲).





شکل ۲- مقایسه میانگین اثر رویشگاه بر وضعیت نوک برگ بنفشه معطر. حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون **LSD** می‌باشد. شاخص تعیین وضعیت نوک برگ: نوک تیز معمولی (1)، خیلی تیز و نازک (2)، گرد و نیم دایره (3).

Figure 2- Comparison results of the average effect of the habitat on the condition of the tip of the sweet violet leaf. (Non-identical letters indicate a significant difference at 5% level using LSD test.)
Normal sharp tip (1), very sharp and thin (2), round and semicircular (3).

رنگدانه‌های نورساختی

اثر رویشگاه بر میزان کلروفیل a، b و کل و نیز کاروتنوئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۷).

جدول ۷- نتایج تجزیه واریانس اثر رویشگاه بر میزان رنگدانه‌های نورساختی برگ بنفشه معطر.

کاروتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	درجه آزادی	منابع تغییر
Carotenoid	Total chlorophyll	Chlorophyll b	Chlorophyll a	DF	S.O.V
0.10**	1.02**	0.17**	0.38**	9	رویشگاه
					Habitat
0.018	0.06	0.016	0.04	20	خطا
					Error
5.03	5.67	9.52	6.07	-	ضریب تغییرات
					C.V. (%)

** بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

** Respectively indicate significance at the probability level of 1 percent.

در رویشگاه کلارآباد میزان کلروفیل a بیشتری در برگ بنفشه معطر (۳/۶۰ میلی گرم بر گرم وزن تر) سنتز شد؛ این در حالی است که کمترین مقدار عددی صفت مذکور (۲/۳۳ میلی گرم بر گرم وزن تر) در امامزاده عبدالله گزارش شد. بیشترین کلروفیل b مربوط به رویشگاه کلارآباد (۱/۶۸ میلی گرم بر گرم وزن تر) و پس از آن نمک‌آبرود (۱/۶۵ میلی گرم بر گرم وزن تر) بود.



این دو رویشگاه در یک رده آماری قرار گرفتند. بیشترین کلروفیل کل مربوط به رویشگاه کلارآباد و کمترین آن مربوط به رویشگاه امامزاده عبدالله بود. بیشترین کاروتنوئید برگ (۲/۹۳ میلی گرم بر گرم وزن تر) در رویشگاه امامزاده عبدالله ارزیابی شد (جدول ۸).

جدول ۸- نتایج مقایسه میانگین اثر رویشگاه بر میزان رنگدانه‌های نورساختی برگ بنفشه معطر.

Table 8- Comparison results of the average effect of habitat on the amount of photosynthetic pigments of sweet violet leaves.

رویشگاه Habitat	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر) Chlorophyll a (mg/g f.w)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر) Chlorophyll b (mg/g f.w)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر) Total chlorophyll (mg/g f.w)	کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر) Carotenoid (mg/g f.w)
الیمالات Elimalat	3.23 ^{bc}	1.27 ^{bcd}	4.50 ^{cd}	2.65 ^{bcd}
لاویج Lavij	3.10 ^{cd}	1.13 ^{de}	4.23 ^{de}	2.82 ^{ab}
آب‌پری Abpari	3.23 ^{bc}	1.37 ^{bc}	4.60 ^{cd}	2.52 ^{cde}
پارک جنگلی نور Noor forest park	3.14 ^{cd}	1.17 ^{cde}	4.31 ^{de}	2.73 ^{abc}
سی‌سنگان Seasangan	3.40 ^{abc}	1.43 ^b	4.83 ^{bc}	2.47 ^{de}
نمک‌آبرود Namak abroud	3.50 ^{ab}	1.65 ^a	5.15 ^{ab}	2.47 ^{de}
کلارآباد Kalarabad	3.60 ^a	1.68 ^a	5.28 ^a	2.38 ^e
امامزاده عبدالله Emamzadeh Abdollah	2.33 ^e	0.96 ^e	3.29 ^f	2.93 ^a
لاریجان Larijan	2.87 ^d	1.07 ^{de}	3.93 ^e	2.83 ^{ab}
خشت‌سر Kheshtsar	3.23 ^{bc}	1.40 ^b	4.63 ^{cd}	2.62 ^{bcd}

در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD ندارند.

In each column, the means with at least one common letter are not significantly different Based on the LSD test ($P < 0.05$).

ترکیبات فیتوشیمیایی

اثر رویشگاه بر فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پیکره رویشی گیاه بنفشه معطر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۹).



جدول ۹- نتایج تجزیه واریانس اثر رویشگاه بر میزان ترکیبات فیتوشیمیایی برگ بنفشه معطر.

Table 9- Analysis of variance effect of habitat on the amount of phytochemical compounds of sweet violet leaves.

منابع تغییر	درجه آزادی	فنل کل	فلاونوئید کل	فعالیت آنتی اکسیدانی
S.O.V	F.D	Total phenol	Total flavonoids	Antioxidant activity
رویشگاه	9	422.22**	205.81**	250.08**
Habitat				
خطا	20	4.53	4.73	5.00
Error				
ضریب تغییرات	-	2.90	3.37	2.73
C.V. (%)				

** بیانگر معنی داری در سطح احتمال یک درصد می باشد.

** Respectively indicate significance at the probability level of 1 percent.

بیشترین فنل کل پیکره رویشی گیاه بنفشه معطر (۹۴/۳۳ میلی گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک) و بیشتر فلاونوئید کل (۷۷/۳۳ میلی گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک) مربوط به رویشگاه لاریجان بود، کمترین مقادیر عددی صفات مذکور در رویشگاه خشت سر ارزیابی شد. در رویشگاه لاریجان فعالیت آنتی اکسیدانی پیکره رویشی بنفشه معطر بیش از سایر رویشگاهها بود، اگرچه این رویشگاه با لاویج و آب پری در یک رده آماری قرار گرفتند (جدول ۱۰).

جدول ۱۰- نتایج مقایسه میانگین اثر رویشگاه بر میزان ترکیبات فیتوشیمیایی برگ بنفشه معطر

Table 10- Comparison results of the average effect of habitat on the amount of phytochemical compounds of sweet violet leaves

رویشگاه	فنل کل (میلی گرم گالیک اسید بر گرم ماده خشک)	فلاونوئید کل (میلی گرم کوئرستین بر گرم ماده خشک)	فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد)
Habitat	Total phenol (mg of gallic acid per gr of dry matter)	Total flavonoids (mg of quercetin per gr of dry matter)	Antioxidant activity (%)
الیمالات	75.33 ^d	63.33 ^d	83.00 ^c
Elimalat			
لاویج	83.67 ^{bc}	75.33 ^{ab}	92.00 ^a
Lavij			
آب پری	84.67 ^b	72.00 ^{bc}	92.33 ^a
Abpari			
پارک جنگلی نور	62.67 ^e	61.00 ^{de}	74.67 ^{de}
Noor forest park			
سی سنگان	64.67 ^e	61.67 ^d	77.33 ^d
Seasangan			
نمک آبرود	62.67 ^e	55.00 ^f	72.33 ^e
Namak abroud			
کلارآباد	62.67 ^e	57.67 ^{ef}	73.00 ^e
Kalarabad			



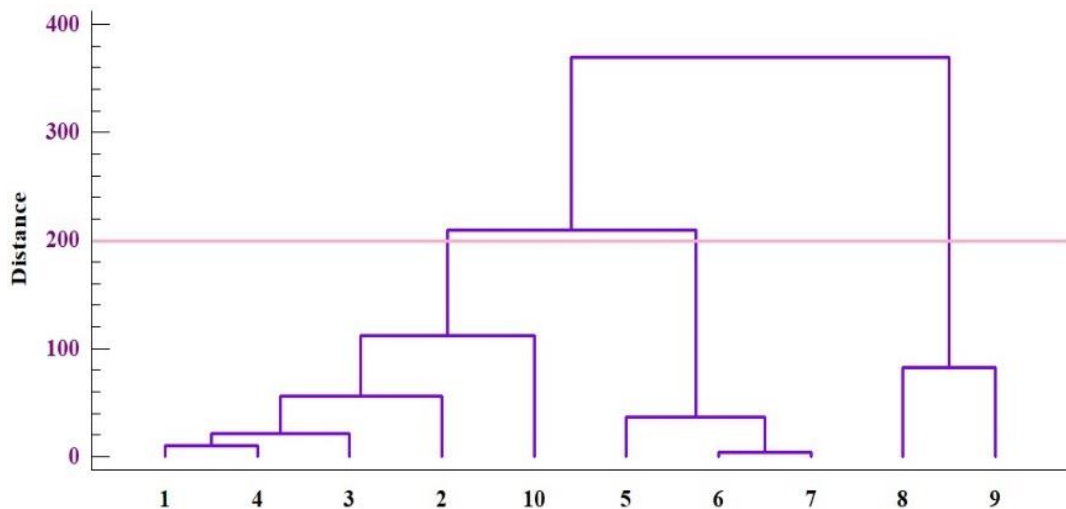
87.67 ^b	68.67 ^c	80.33 ^c	امامزاده عبدالله Emamzadeh Abdollah
94.67 ^a	77.33 ^a	94.33 ^a	لاریجان Larijan
72.00 ^e	54.33 ^f	62.33 ^e	خشت سر Kheshtsar

در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD ندارند.

In each column, the means with at least one common letter are not significantly different Based on the LSD test ($P < 0.05$).

نتایج تجزیه خوشه‌ای

در این مطالعه گروه‌بندی رویشگاه‌های مختلف با استفاده از تجزیه خوشه‌ای (Cluster) انجام گرفت و برای این منظور از روش WARD استفاده شد که بر اساس صفات اندازه‌گیری شده و خصوصیات اقلیمی رویشگاه‌ها، به ۳ گروه مجزا تقسیم‌بندی شدند (شکل ۳). گروه‌بندی با تجزیه خوشه‌ای نشان داد که دو رویشگاه امامزاده عبدالله و لاریجان در یک گروه قرار گرفتند، بنابراین این دو رویشگاه بسیار به هم شبیه هستند و بیشترین مقدار عددی از کاروتنوئید، فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند. این گروه بیشترین ارتفاع از سطح دریا و کمترین ماده آلی خاک و به طور کلی هدایت الکتریکی حدود ۰/۴۵ را داشتند و بیشترین مقدار pH خاک در این گروه مشاهده شد. گروه بعدی شامل رویشگاه‌های سی‌سنگان، نمک‌آبرود و کلارآباد بود. بیشترین مقدار عددی قطر ساقه اصلی، قطر ساقه فرعی، وزن تر و خشک بوته، طول و عرض برگ، قطر دم‌برگ، کلروفیل کل، کلروفیل a و کلروفیل b در این گروه مشاهده شد. این گروه کمترین ارتفاع از سطح دریا، کمترین هدایت الکتریکی و کمترین اسیدیته خاک را داشت. بیشترین مقدار ماده آلی، نیتروژن، پتاسیم و فسفر در خاک مربوط به این گروه بود. گروه سوم شامل رویشگاه‌های الیمالات، لایوچ، آب‌پری، پارک جنگلی و خشت‌سر بود. این گروه بیشترین مقدار ارتفاع بوته، تعداد شاخه فرعی، تعداد برگ، سطح برگ و طول دم‌برگ را داشت. گیاهان در این گروه همه از نظر شکل برگ به صورت نوک تیز بودند. این گروه از نظر میزان نیتروژن، پتاسیم، فسفر، ماده آلی و اسیدیته خاک، همچنین ارتفاع از سطح دریا بین دو گروه دیگر بود، از نظر هدایت الکتریکی خاک بیشترین مقدار را داشت.



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی رویشگاه‌های مورد بررسی بنفشه معطر. (اعداد اختصاص داده شده به رویشگاه‌ها به ترتیب از یک تا ده عبارتند از الیمالات، لایوچ، آب‌پری، پارک جنگلی نور، سی‌سنگان، نمک‌آبرود، کلارآباد، امامزاده عبدالله، لاریجان و خشت‌سر).

Figure 3- Cluster analysis for grouping the habitats of sweet violet. (The numbers assigned to the habitats are, in order from one to ten, Elimalat, Lavij, Abperi, Noor Forest Park, Sisangan, Namak Abroud, Kalarabad, Imamzadeh Abdullah, Larijan and Kheshtsar).

به‌طور کلی می‌توان بیان کرد که گروه دوم که شامل رویشگاه‌های سی‌سنگان، نمک‌آبرود و کلارآباد بود از نظر اکثر صفات رویشی و رنگدانه‌های نورساختی نسبت به دو گروه دیگر بیشترین مقدار را داشت. از آنجا که این گروه کمترین ارتفاع از سطح دریا، عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و طول جغرافیایی ۵۱ درجه، کمترین pH (۵/۳۳) و کمترین EC (۰/۳۴) و بیشترین مقدار ماده آلی و عناصر NPK خاک را داشت احتمالاً بتوان نتیجه گرفت که خصوصیات اقلیمی خوب این رویشگاه‌ها در رشد و کیفیت بهتر گیاه موثر بوده است. سه رویشگاه سی‌سنگان، نمک‌آبرود و کلارآباد به احتمال قوی برای رشد بیشتر این گیاه مناسب‌تر از سایر رویشگاه‌ها می‌باشند. گیاهان دو رویشگاه امامزاده عبدالله و لاریجان که در یک گروه با بیشترین مقدار اسیدیته خاک بودند بیشترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات آنتی‌اکسیدان از جمله فنل و فلاونوئید کل را نشان دادند. البته این رویشگاه‌ها ارتفاع بیشتری نسبت به سطح دریا نسبت به دو گروه دیگر دارا بودند.

بحث

طبق جدول تجزیه واریانس، تمام صفات مورفولوژیکی ارزیابی شده در این تحقیق دارای اختلاف معنی‌داری بودند. بر اساس نتایج حاصله در رویشگاه‌های غرب مازندران، کلارآباد (تنکابن)، نمک‌آبرود (چالوس) و سی‌سنگان (نوشهر) با توجه به ارتفاع کمتر از سطح دریا، خاک با بافت لومی و غنی‌تر از نظر NPK و مواد آلی و pH و EC پایین‌تر و نیز میزان بارندگی بیشتر بنفشه‌های رشد یافته دارای صفات رویشی قوی‌تر بودند. این گیاهان رشد رویشی بهتری (قطر ساقه اصلی و فرعی، اندازه و سطح برگ، وزن تر و خشک بوته، قطر دمبرگ) نسبت به سایر رویشگاه‌ها دارا بودند. نتایج مشابهی بر روی گیاه بنفشه (معطر و سه رنگ) در گذشته گزارش شده است (Narel et al., 2020).

با افزایش ارتفاع از سطح دریا، ارتفاع بوته، طول و عرض برگ، قطر ساقه اصلی و فرعی و سایر صفات مورفولوژیک در گیاه بنفشه معطر کاهش نشان داد. از آنجایی که گیاهان به دلیل احتیاج اجتناب‌ناپذیری که به نور خورشید برای نورساخت دارند،

بیشتر تحت تاثیر نور UV قرار می گیرند و آسیب پذیرتر هستند (Nasibi et al., 2003). کاهش شدید صفات مورفولوژیک در این پژوهش احتمالاً به دلیل تاثیر منفی افزایش نور UV در ارتفاعات بالا است (Narimani et al., 2017). از طرف دیگر با افزایش ارتفاع و کاهش دما، رشد و نمو اندام های گیاهی در شرایط دمای پایین کاهش می یابد (Moradi et al., 2021). در پژوهشی بر اساس ویژگی های مورفولوژیکی دوازده جمعیت از منطقه زاگرس مشخص شد که جمعیت های جمع آوری شده از رویشگاه علزار ارتفاع و قطر کمتری نسبت به جمعیت های جمع آوری شده از رویشگاه های جنگلی داشتند، در حالی که جمعیت های باغی بیشترین تعداد برگ و گل را دارا بودند، از این خصوصیات اقلیمی همچون خصوصیات خاک، میزان نور دریافتی، درجه حرارت هوا عوامل تاثیرگذار بر پاسخ های مختلف گونه بنفشه معطر معرفی شدند. تجزیه و تحلیل شیمیایی خواص آگروشیمیایی خاک و غلظت عناصر غذایی نشان داد که غلظت مواد آلی و پتاسیم در خاک با انباشت ترکیبات در ریشه و نیز میزان رشد رویشی گیاه بنفشه معطر همبستگی مستقیم و بالایی داشت (Erhatic et al., 2010). در تحقیقی دو نوع تفاوت در بین جمعیت های مورد بررسی بنفشه دیده شد، به طوری که این تفاوت بین گونه ها بود. در همین راستا، مشخص شد که گونه *V. ignobilis* با وجود ژنوتیپ مشابه از دو منطقه کلیر و کرمانشاه، اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد از لحاظ صفات بررسی شده نشان داد، بنابراین این گونه استنباط شد که شرایط اقلیمی سبب اختلافات ظاهری در بین توده های دو منطقه شد (Ghorbani et al., 2022). نتایج پژوهشی بر روی ارزیابی خصوصیات برخی توده های ریحان^۱ در شرایط آب و هوایی اهواز نشان داد که بخشی از تفاوت های موجود در بین توده ها را می توان به شرایط محیطی شهرستان اهواز نسبت داد (Momeni Monfared et al., 2018). این نتایج با نتایج بدست آمده توسط محققان روی ارزیابی گوناگونی ژنتیکی با بررسی صفات مورفولوژیکی مرزه بختیاری^۲ مطابقت داشت (Khub-Khadivi et al., 2014). آنان گزارش کردند که توده های مختلف از نظر تعداد شاخه، قطر گیاه، وزن گیاه، وزن برگ و گل و وزن شاخه متفاوت بودند. با این حال، نتایج این پژوهش با نتیجه محققان بر روی توده های گیاه بابونه^۳ نیز مطابقت دارد (Mohammadi et al., 2014). این محققان صفات مورفولوژیک را در گیاه بابونه بررسی و گزارش کردند که بیشتر صفات مورد بررسی معنی دار بود. در پژوهشی، داده ها نشان دهنده تاثیر قابل توجهی از تفاوت های جغرافیایی (اکوتیپ های مختلف) بر مورفولوژی و رشد و تولید پونه^۴ است (Baharmast et al., 2020). تفاوت های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بین اکوتیپ های گیاهی می تواند به دلیل تغذیه گیاهی باشد به طوری که، گیاه بسته به شرایط اکولوژیکی و تغذیه خود می تواند رشد کمی و کیفی لازم را داشته باشد (Bozhuyuk et al., 2021).

نتایج این بررسی نشان داد که اغلب صفات مورفولوژیکی بنفشه در جمعیت های مورد مطالعه دارای تفاوت زیادی می باشد و گیاهان رویشگاه کلارآباد و پس از آن نمک آبرود دارای بیشترین سطح برگ است. باید توجه کرد که بخشی از گوناگونی مشاهده شده ژنتیکی است و به شرایط اقلیمی متفاوت جمع آوری شده، بستگی دارد (Yousefi et al., 2021). با وجود این نتایج اثر محیط بر تفاوت خصوصیات بنفشه معطر مشهود است (Mahajan et al., 2014; Su et al., 2018).



جغرافیایی یکی از مهمترین پارامترهای مؤثر بر رشد گیاهان دارویی (Chen et al., 2014) و خصوصاً بنفشه معطر (Eckstein et al., 2006) است.

بر اساس نتایج مشاهده شده مورفولوژیکی از نظر ابعاد و سطح برگ، دور از انتظار نخواهد بود که میزان رنگدانه‌های نورساختی در رویشگاه‌های کلارآباد و نمک‌آبرود بیش از سایر رویشگاه‌ها باشد که می‌توان به وجود مواد آلی و نیتروژن خاک به علت نقشی که در ساختار کلروفیل دارند، نسبت داد.

در پژوهشی که به منظور بررسی اثر ارتفاع بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و رنگدانه نورساختی بنفشه معطر در سه منطقه از استان مازندران صورت گرفت، نشان داده شد که رنگدانه‌های نورساختی تحت تأثیر ارتفاع تغییر کردند. میزان کارتنوئید با افزایش ارتفاع افزایش نشان داد. کارتنوئید یکی از رنگدانه‌های کمکی برای کلروفیل است که تا حدودی مانع از فتو اکسیداسیون نوری می‌شود (Amini & Haddad, 2013). از میان صفات مورفولوژیکی صفت طول برگ در سطح ۵ درصد اثر معنی‌دار نشان داد و دو ارتفاع بیشتر (بهشهر ۱۰۱۸ متر از سطح دریا) و ساری (۱۱۲۸ متر از سطح دریا) در یک گروه قرار گرفتند و نسبت به ارتفاع پایین‌تر منطقه نکا (۵۸۵ متر از سطح دریا) به صورت معنی‌داری افزایش نشان دادند. به‌طوری‌که در گیاه بنفشه معطر صفات مورفولوژیکی نسبت به رنگدانه‌های نورساختی تغییرات بیشتری تحت تأثیر اختلاف ارتفاع از خود نشان دادند (Zakaria nejad et al., 2022).

نتایج مقایسه میانگین حکایت از وجود گوناگونی قابل ملاحظه جمعیت‌های بنفشه برای صفات مورد بررسی دارد. این نتایج نشان داد که در بین توده‌های مختلف بنفشه معطر از لحاظ صفات مورفولوژیکی، علاوه بر تأثیر عوامل محیطی، گوناگونی فیتوشیمیایی زیادی نیز وجود دارد. درک این گوناگونی بالا می‌تواند در مدیریت و حفاظت ژرم‌پلاسماها و کموتایپ‌های بنفشه معطر مفید باشد. این گوناگونی ممکن است به دلیل اختلافات جمعیتی افراد، یا به علت اختلافات شرایط محیطی، یا گاهی توسط اثرهای متقابل جمعیت و محیط بوجود آمده باشد (Osamny & Siosemardeh, 2009) که در نتایج سایر محققان در بنفشه معطر (Moradi et al., 2021) نیز مشهود بود.

نتایج نشان داد که ترکیب‌های فنلی به عنوان یکی از مهم‌ترین ترکیب‌های موجود در بنفشه معطر است. همان‌طور که در نتایج مشاهده شد میزان فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به محل جمع‌آوری تحت تأثیر شرایط محیطی متفاوت است که با نتایج سایر پژوهشگران در گیاهان بومی مختلف مانند کُور^۱ (Ghahramani et al., 2022)، درمنه دشتی^۲ (Yazdi far et al., 2022) و زنجبیل شامی^۳ (Moradi et al., 2022) مطابقت دارد. گزارش پژوهش حاضر مبنی بر اثر شرایط رویشگاه متفاوت بر ترکیب فنلی گیاه است که بیشترین مقدار محتوای ترکیبات فنلی برگ در گیاه بنفشه معطر در رویشگاه لاریجان با ارتفاع بیشتر از سطح دریا و بافت خاک لومی رسی بود.

در بررسی فیتوشیمیایی سه گیاه دارویی پر مصرف در رویشگاه‌های طبیعی استان فارس مشاهده شد محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در سه اکوتیپ آویشن^۵، بابونه^۶ و بومادران^۷ تحت تأثیر شرایط آب و هوایی مناطق مورد مطالعه بودند و این نشان دهنده اثر شرایط محیطی بر میزان ترکیبات پلی‌فنولی گیاهان دارویی مورد نظر بود. در نتیجه بیان گردید تفاوت در میزان این

۴- *Dianthus L.*

۳- *Inula helenium L.*

۲- *Artemisia sieberi Besser.*

۱- *Capparis spinosa*

۷- *Achillea millefolium*

۶- *Matricaria chamomilla*

۵- *Thymus vulgaris*



ترکیبات می‌تواند ناشی از تأثیر عوامل مختلفی نظیر اقلیم منطقه، نوع گونه، محیط خاک، ارتفاع از سطح دریا و موقعیت جغرافیایی باشد (Mazaraie & Fahmideh, 2020). همچنین با بررسی اثر شرایط رویشگاه بر میزان فنل فلاونوئید کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ و ساقه شش گونه میخک وحشی ایران مشخص شد که تفاوت شرایط منطقه مانند ارتفاع و تغییرات اقلیمی اثر معنی‌داری بر مقدار ترکیبات فنلی، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارد (Saboori et al., 2013). بنابراین نتایج بالا تایید می‌کنند که شرایط رویشگاه مختلف، اثر معنی‌داری در محتوای ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت آن‌ها دارد.

تحقیق حاضر نشان داد صفات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاهان مختلف اعم از دارویی یا غیردارویی، به شدت تحت تأثیر شرایط اقلیمی و جغرافیایی قرار خواهد گرفت و همچنین خواص فارماکولوژیکی آن‌ها بالتبع متفاوت خواهد بود. علاوه بر این، مشخص شد حتی اندام‌های مختلف گیاه به لحاظ ترکیبات شیمیایی اسانس با یکدیگر اختلافاتی دارند. در نتیجه به‌طور کلی با بررسی نتایج آزمایش حاضر و انطباق با یافته دیگر مطالعات می‌توان گفت ارتفاع، فاکتور موثر بر مقدار درصد مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشد.

تغییرات میزان فنل، فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی گیاهان هر منطقه بستگی به پارامترهای زیادی نظیر نور، ارتفاع از سطح دریا، آب و هوا، نوع گونه گیاهی و خصوصیات خاک روییده شده دارد (Mirzaei et al., 2010) که به نظر می‌رسد جهت تکمیل و بحث مطلوب تحقیق، نیاز به اطلاعات هواشناسی و موقعیت مکانی محل جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی از نظر شیب، جهت جغرافیایی و غیره و نیز مطالعه گوناگونی ژنتیکی گیاهان باشد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که تأثیر شرایط اقلیمی بر گونه‌های گیاهی بسیار متفاوت است و همواره باید با تحقیقات مناسب به بررسی نقش عوامل اقلیمی بر رشد و نمو و مواد موثره گونه‌های مختلف گیاهان دارویی پرداخت.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصله صفات مورفوفیزیولوژیکی و ترکیبات ثانویه گیاه بنفشه معطر تحت اثر رویشگاه‌های مختلف تفاوت معنی‌دار نشان داد. خصوصیات جغرافیایی و اقلیمی رویشگاه‌ها عوامل موثر بر رفتار گیاهان و سازگاری آن‌ها می‌باشند. بیشترین مقادیر عددی صفات رویشی در رویشگاه‌های با ارتفاع کمتر از سطح دریا و خاک غنی حاصل شد، در ارتفاعات بالاتر و خاک ضعیف مقادیر ترکیبات فیتوشیمیایی افزایش یافت که احتمالاً به دلیل تنش احتمالی وارده به گیاه بنفشه معطر باشد. در مجموع با توجه به نرمش اکولوژیک این گیاه دارویی - زینتی ارزشمند می‌توان نتیجه گرفت احتمالاً به‌راحتی بتوان جهت اهلی‌سازی موفق آن در سایر مناطق کشور اقدام نمود.

منابع

- Amini, Z., Haddad, R. (2013). Role of photosynthetic Pigments and antioxidant enzymes against oxidative stress. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 26(3), 251-265. (In Persian).
- Arnon, A.N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Journal of Agronomy*, 23, 112-126.
- Baharmast, Z., Kheiry, A., Sanikhani, M., 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. (In Persian).
- Bozhuyuk, M.R., Ercisli, S., Karatas, N., Ekiert, H., Elansary, H.O., Szopa, A. (2021). Morphological and Biochemical Diversity in Fruits of Unsprayed *Rosa canina* and *Rosa dumalis* Ecotypes Found in Different Agroecological Conditions. *Sustainability*, 13, 8060.



- Chang, C., Yang, M., Wen, H., 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., Fu, Ch. (2014). The Population Genetics of Cultivation: Domestication of a Traditional Chinese Medicine, *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. (Scrophulariaceae). *PLoS One*, 9(8), e105064.
- Chen, W., Modi, D., Picot, A. (2023). Soil and Phytomicrobiome for Plant Disease Suppression and Management under Climate Change: A Review. *Plants*, 12, 2736.
- Eckstein, R., O'Neill, R., Danihelka, J., Otte, A., Kohler, W. (2006). Genetic structure among and within peripheral and central populations of three endangered floodplain violets. *Molecular Ecology*, 15, 2367-2379.
- Erhatic, R., Vukobratović, M., Volf, T.P., Židovec, V. (2010). Morphological and chemical properties of selected sweet violet populations. *Journal of Central European Agriculture*, 11, 55-64.
- Feyzabadi, Z., Jafari, F., Kamali, S.H., Ashayeri, H., Aval, S.B., Esfahani, M.M., Sadeghpour, O. (2014). Efficacy of *Viola odorata* in treatment of chronic insomnia. *Journal of Iranian Red Crescent Medical*, 12, 1-6.
- Ghahramani A, Mohammadi J, Mousavi S A, Ghanbari Jahromi M. (2022). Morphological identification of Zanjan shit's region capers (*Capparis spinosa*) and its fruits qualitative and quantitative and photochemical Assessment. *Jornal Plant Ecosystem Conservation*, 9(19): 157-179. (In Persian).
- Ghorbani, M., Khorasaninejad, S., Hemmati, K., Ghorbani, K. (2022). Feasibility study on some native Iranian *Viola* spp. domestication. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 38(4), 632-650. (In Persian).
- Hamidah, S., Firmanul Arifin, Y., Fitriani, A. (2018). Micro climate assessment of medicinal plant habitat for the first step of domestication. *Academic Research International*, 9(3), 145-150.
- Khadivi-Khub, A., Salehi-Arjmand, H., Movahedi, Kh., Hadian, J. (2014). Molecular and morphological variability of *Satureja bachtiarica* in Iran. *Plant Systematics and Evolution*, 301, 77-93.
- Mahajan, R., Kour, R., Javed, A., Singh, I., Kapoor, N. (2014). Characterization of genetic diversity of *viola odorata* from different regions of Jammu and Kashmir using RAPD primers. *International journal of Science Inventions Today*, 3(6), 685-691.
- Mazaraie, A., Fahmideh, L. (2020). Evaluation of phytochemical and antioxidant activity of three widely-used medicinal plant in natural habitats of Fars province. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 8(1), 90-105. (In Persian).
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Autolovich, M., Robards, K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73, 73-84.
- MirMohammadi Maibody, S.A.M., Golkar, P. (2019). Application of DNA Molecular Markers in Plant Breeding (Review article). *Plant Genetic Researches*, 6(1), 1-30. (In Persian).
- Mirzaei, A., Akbartabar, M., Sadeghi, H., Sharifi, B. (2010). The Antioxidant Activities and total enolic of *Artemisia martima*, *Achillea millefolium* and *Matricaria recutita*. *Iranian Society of Horticultural Science (IRSHS)*. 15(1), 243-252. (In Persian).
- Mohammadi, R., Dehghani, H., 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 Soresani, M., Zolfaghari, M., 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. (In Persian).
- Moradi, H., Haddadinejad, M., Yavari, A., Mohammadi Azni, M., Musavi, S., 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. (In Persian).
- Moradi, N., Naghdi Badi, H., Kalateh Jari, S., Mehrafarin, A., Danaee, E. (2022). Morphological and phytochemical characteristics of *Inula helenium* L. in different altitudes of Zanjan region, Iran. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 10(4): 1-13. (In Persian).
- Motavasselian, M., Salari, R., Feyzabadi, Z., Joharchi, M.R., Ghazanfari, S.M. (2022). A Review of the



- Therapeutic Effects of *Viola odorata* Plant in Traditional Iranian Medicine and Modern Medicine. *Complementary Medicine Journal*, 12(2), 118-125. (In Persian).
- Mozafarian, W. (2022). Knowledge of medicinal and aromatic plants of Iran. *Contemporary Culture Publications*, 144 Pp. (In Persian).
- Narel, Z., Rainer, B., Carolina, R. (2020). *Viola tricolor* L. Violaceae. 10.1007/978-3-030-28933-1_297.
- Narimani, R., Moghaddam, M., Ghasemi Pir Balouti, A., Shokouhi, D. (2017). Investigation of morphological diversity, phenol content and antioxidant activity of different populations of *Nepeta nuda* and *Nepeta crassifolia* in habitats of Ardabil and Azerbaijan provinces. *Journal of Eco Phytochemistry of Medicinal Plants*, 5(19), 22-13.
- Nasibi, F., Kalantari, K., Rashidi, M. (2003). Investigation of change in morphological and physiological parameter induced by UV-A, UV-B and UV-C of ultraviolet radiation in colza seedling (*Brassica Napus*). *Research and Reconstruction*, 16(3), 97-103.
- Noori, N., Khanghahi Abyane, E., Amin, Gh. (2016). Iranian licenced herbal medicines (Persian). Tehran: Legal Medicine Research Center. (In Persian).
- Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M., Bassami, M.R. (2010). Phytochemical Composition of the Essential Oils from Three Apiaceae Species and Their Antibacterial Effects on Food-borne Pathogens. *Food Chemistry*, 120, 765-770.
- Osamny, Zh., 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.
- Qasemzadeh, M.J., Sharifi, H., Hamedanian, M., Gharehbeqlou, M., Heydari, M., Sardari, M., et al. (2015). The effect of *Viola odorata* flower syrup on the cough of children with asthma: A double-blind, randomized controlled trial. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 20(4), 287-291.
- Rad, J.E., Shafiei, A.B. (2010). The distribution of ecological species groups in *Fagetum* communities of Caspian forests: Determination of effective environmental factors. *Flora Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205, 721-727.
- Saboora, A., Dadmehr, K.H., Ranjbar, M. (2013). Total phenolic and flavonoid contents and investigation on antioxidant properties of stem and leaf extracts in six Iranian species of wild *Dianthus* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 29, 281-295. (In Persian).
- Singleton, V.L., Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-58.
- Su, X., Hou, Y.-Y., Gao, T., Wang, Y.-L., Sun, K. (2018). Taxonomic position of *Viola tuberifera* based on morphological variation of the populations and digital specimen. *Bulletin of Botanical Research*, 38, 189-194.
- Sun, T., Powers, J.R., Tang, J. (2007). Evaluation of the antioxidant activity of *Asparagus*, broccoli and their juices. *Food Chemistry*, 105, 101-106.
- Vogel, V., Bodenhausen, N., Grisse, W., 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.
- Yazdi Far, S., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., Kalateh Jari, S., Danaee, E. (2022). Evaluation of diversity of eco morphological and phytochemical traits of *Artemisia sieberi* Besser. in different habitats of Qom province in Iran. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 10(1), 27-46. (In Persian).
- Yousefi, B., Tabaie-Aghdaei, S.R., 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. (In Persian).
- Zakaria Nejad, N., Moradi, H., Biparva, 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*, 17(67), 111-125. (In Persian).





Variability in vegetative characteristics, antioxidant capacity, and total phenol and flavonoid content of leaves in some *Viola odorata* L. populations

Ahad Cheraghi¹, Marzieh Ghanbari Jahromi^{1*}, Amir Mousavi²

1. Department of Horticultural Sciences and Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran

2. Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran

✉ ghanbari@iaui.ac.ir

Received: 2023/10/26, Revised: 2023/11/26, Accepted: 2023/11/29

Abstract

Sweet violet (*Viola odorata* L.) is a perennial and aromatic plant from the Violaceae family that grows in the northern regions of Iran. This research was conducted in order to investigate the biochemical diversity of 10 selected populations of the sweet violet plant in Mazandaran province in 2023 in the form of a completely randomized design with three replications. The habitats included Elimalat, Lavij, Abpari, Noor Forest Park, Sisangan, Namak Abroud, Kalarabad, Imamzadeh Abdullah, Larijan and Khesht Sar. Ten samples were collected from each habitat and traits related to vegetative characteristics, photosynthetic pigments, and phytochemical compounds of leaves of each population were evaluated. To categorize populations, cluster analysis (cluster) was performed by Ward's method using SAS statistical software version 9/4. The results showed significant differences in all the morpho-physiological traits across different habitats, so the highest height and number of leaves were observed in Elimalat, Lavij, and Kheshtsar habitats, the highest diameter of the main and secondary stems, fresh weight and plant dryness, leaf width and surface area, and petiole diameter were reported in Kalarabad and Namak Abroud habitats and then in Kheshtsar. The most photosynthetic pigments of the leaves were evaluated in the habitats of the west Mazandaran (Klarabad and Namak Abroud) and the highest amounts of phytochemical compounds were found in the Larijan habitat which is located at a higher altitude above sea level (4115 m). The cluster analysis of different habitats based on the measured morphological traits and climatic characteristics divided the populations of violet into three separate groups. In general, we can conclude that geographical differences are one of the most important parameters affecting the growth and quality of native plants. Most of the morphological traits, photosynthetic pigments of violet leaves, and secondary metabolites such as total phenol and flavonoids in the studied populations exhibit significant differences. Some of this diversity is attributed to genetic characteristics, while another part is influenced by climatic conditions.

Keywords: Biochemical traits, Habitat, Leaf characteristics, Violet.