



Paper Type: Original Article



Leaf Micromorphology of Some *Viola* spp. from Iran

Mahideh Habibi Kaleybar¹, Sara Khorasaninejad^{*1} , Mostafa Ebadi Nahari², Ghasem Karimzadeh³, Mohsen Farhadpour⁴, Christian Gruber⁵

¹Department of Horticultural Sciences, Plant Production Faculty, University of Agricultural Sciences and Natural Resource, Gorgan, Iran;*(Associate Professor: Corresponding author: khorasaninejad@gau.ac.ir).

²Department of Biology, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

³Department of Biotechnology and Plant Breeding, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

⁴Department of Plant Biotechnolog, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

⁵Medical University of Vienna, Center for Physiology and Pharmacology, Vienna, Austria.

Citation:

Habibi Kaleybar, M., Khorasaninehad, S., Ebadi Nahari, M., Karimzadeh, G., Farhadpour, M. & Gruber, C. (2024). Leaf micromorphology of some *Viola* spp. from Iran. *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 37 (Issue No. 3), PP. 61-70

Received: 2023.08.30

Accepted: 2024.10.02

Abstract

Introduction: The genus *Viola* is the largest genus of the *Violaceae* and includes 525-600 species, of which 19 species are native to Iran.

Methods: For the first time, micromorphological studies of leaf characters such as shape, dimensions, and density of stomata and trichomes in 6 species of Violets were carried out using scanning electron microscopy (SEM) to identify useful characters for the identification of species. The characteristics of the leaf such as the dimensions and density of stomata and trichome were measured by image J V.1.52 software. The information was obtained from leaf micromorphological properties were analyzed using SPSS V. 26. Cluster analysis was used by WARD method to determine the species affinity.

Results: The results of the microscopic analysis of the species in terms of micromorphological properties, classified 7 types of trichomes and stomata into 4 groups. The results of the microscopic analysis showed that the trichomes in the studied species are conical, triangular, and uncinata in shape, and there are 3 states: lying, raised, and semi-raised. The longest trichome in *V. hirta* observed. In all species, stomata were seen as oval in shape. The largest stomatal size was related to *V. occulta* species and the highest stomatal density was also related to *V. hirta* species.

Conclusion: The results showed that micromorphological characters of six species of *viola* species, especially *V. hirta* species identification and separation.

Keywords: Stomata, Taxonomy, Trichome, Violet



بررسی ریزریخت‌شناسی برگ برخی از گونه‌های بنفشه (*Viola spp.*) در ایران

ماهیده حبیبی کلیبر^۱، سارا خراسانی نژاد^{۲*}، مصطفی عبادی نهاری^۳، قاسم کریم زاده^۴، محسن فرهادپور^۵، کریستین گوربر^۶

^۱دانشجوی دکتری تخصصی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده تولید گیاهی، گروه علوم باغبانی، گرگان، ایران.

^۲دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده تولید گیاهی، گروه علوم باغبانی، گرگان، ایران.

(*نویسنده مسئول: khorasaninejad@gau.ac.ir)

^۳دانشیار، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تبریز، ایران.

^۴استاد، دانشگاه تربیت مدرس تهران، پردیس کشاورزی، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، تهران، ایران.

^۵استادیار، پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، گروه زیست‌فرآورده‌های گیاهی، تهران، ایران.

^۶استاد، دانشگاه پزشکی وین، مرکز فیزیولوژی و فارماکولوژی، وین، اتریش.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۸

چکیده

مقدمه: سرده بنفشگان (*Viola L.*) بزرگترین سرده از تیره بنفشه بوده و شامل ۶۰۰-۵۲۵ گونه است که ۱۹ گونه از آن بومی ایران است.

روش‌ها: تحقیق حاضر برای نخستین بار اقدام به بررسی ریزریخت‌شناسی صفات برگ از قبیل شکل، ابعاد و تراکم روزنه و کرک در ۶ گونه بنفشه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) با هدف شناسایی صفات مفید جهت تفکیک و تشخیص گونه‌ها نمود. خصوصیات برگ از قبیل ابعاد و تراکم روزنه و کرک به وسیله نرم‌افزار Image J v 1.52 اندازه‌گیری شد. آنالیز داده‌ها از صفات ریزریخت‌شناسی برگ با نرم‌افزار SPSS v 26 انجام شد. برای تعیین میزان قرابت گونه‌ها از روش تحلیل خوشه‌ای WARD استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج آنالیز میکروسکوپی گونه‌ها را از لحاظ ویژگی‌های ریزریختی، به ۷ نوع تیپ کرکی و روزنه‌ها را به ۴ گروه تفکیک کرد. نتایج آنالیز میکروسکوپی نشان داد که کرک‌ها در گونه‌های مورد مطالعه به شکل مخروطی، مثلثی شکل و بندبند و ۳ حالت خوابیده، افراشته و نیمه‌افراشته وجود دارند بلندترین کرک در گونه *V. hirta* مشاهده شد. روزنه‌ها در همه گونه‌ها از لحاظ شکل به صورت تخم‌مرغی شکل دیده شدند. بزرگترین ابعاد روزنه مربوط به گونه *V. occulta* و بیشترین تراکم روزنه هم مربوط به گونه *V. hirta* بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که صفات ریزریخت‌شناسی برگ در ۶ گونه بنفشه به‌ویژه گونه *V. hirta* می‌تواند در شناسایی و تفکیک گونه‌ها مفید باشد.

کلیدواژه‌ها: بنفشه، تاکسونومی، روزنه، کرک

مقدمه

تیره *Violaceae Batsch* با ۲۳ سرده و نزدیک به ۹۰۰-۸۲۵ گونه عموماً در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان پراکنش دارد [1]، [2]. این تیره مدت ها به عنوان تیره اصلی راسته *Violales* شناخته می شد [3]، [4] ولی براساس مطالعات مولکولی در راسته *Malpighiales* قرار گرفته است [5]، [6]. در این راسته، تیره *Violaceae* و چهار تیره دیگر (*Achariaceae*، *Lacistemataceae*، *Passifloraceae*، *Salicaceae*) یک کلاد را تشکیل می دهند [7]، [8] و *Violaceae* به عنوان گروه خواهری با *Passifloraceae* در نظر گرفته می شود [8]، [9]. طبقه بندی تیره *Violaceae* توسط چندین گیاه شناس بررسی شده است [1]، [10]، [11]. با توجه به اغلب سیستم های طبقه بندی اخیر، این تیره به ۳ زیر تیره *Leonioideae*، *Fusispermoideae* و *Violoideae* تقسیم می شود [1]، [11]، [12]. زیر تیره *Violoideae* براساس دو صفت جام گل منظم یا نامنظم و حضور یا عدم حضور شهدگاه به دو طایفه *Violoae* و *Rinoreae* تقسیم می شود [1]، [11]، که سرده *Viola* متعلق به طایفه *Violoae* می باشد.

سرده بنفشه (*Viola*) بزرگترین سرده از تیره بنفشه بوده و شامل ۶۰۰-۵۲۵ گونه است که در بیشتر نقاط دنیا رویش دارد [13]. بر اساس فلور ایران، از این تیره تنها سرده *Viola* با ۱۹ گونه در ایران پراکنش دارد. گونه های *Viola* در ایران بر اساس فلور ایران، در دو بخش (بخشه *Viola* با ۱۴ گونه و بخش *Melanium* با ۵ گونه) قرار می گیرند. گونه های *V. odorata*، *V. hirta*، *V. ignobilis* و *suavis* متعلق به بخش *Viola* و دو گونه دیگر متعلق به بخش *Melanium* می باشند [14]. سرده *Viola* در اغلب نواحی معتدله جهان، به طور گسترده در رویشگاه های معتدله نیم کره شمالی و ارتفاعات بالای نزدیک استوا و نیز در نیم کره جنوبی پراکنش دارد. مراکز اولیه تنوع مورفولوژیکی و تاکسونومیکی در آلپ و نواحی مدیترانه ای، هیمالیا و کوه های شرق آسیا، جنوب آمریکا (آند، مرکز احتمالی پیدایش) و پاتاگونیا قرار دارد. مراکز ثانویه نواحی ساحلی اقیانوس آرام در ایالات متحده و دشت ساحلی آتلانتیک واقع در شرق ایالات متحده و کوه های مرکزی و شمالی مکزیک است [13]. گونه های بومزاد در آفریقا (کوه های مرتفع استوایی و Cape)، شرق استرالیا، تاسمانی، نیوزیلند و هاوایی وجود دارند [15]. تیره بنفشه پروتئین های حلقوی با خاصیت دارویی ارزشمند دارد که با عنوان سیکلوپتیدها با ویژگی ضد میکروبی شناخته می شوند. برخی اثرات دارویی گیاهان این تیره عبارتند از تصفیه خون، درمان عفونت تنفسی، اختلال کلیوی اثرات ضد قارچ، ضد باکتری، ضد مالاریا، آنتی اکسیدان، ضد سرطان و ایدز، ضد آسم و غیره اشاره کرد [16].

ریخت شناسی همواره مهمترین معیار مقایسه بین گونه ها بوده و شناسایی های اولیه بر اساس صفات ریخت شناسی صورت گرفته است. طی دو قرن اخیر از صفات ریخت شناسی میکروسکوپی برای تشخیص گونه ها استفاده شد. نتایج مطالعه Ghorbani و همکاران (۲۰۲۲) [17] حاکی از وجود تنوع قابل ملاحظه صفات در جمعیت های بنفشه بود [17]. اخیراً از ویژگی های ریخت شناسی برگ با استفاده از آنالیز میکروسکوپ الکترونی (SEM) برای شناسایی و رده بندی گیاهان دارویی استفاده شده است [18]، [19]، [20]، [21]. ویژگی های ریخت شناسی برگ ها در مطالعات سیستماتیک برای طبقه بندی گروه های مختلف مانند بریوفیت ها [22]، سرخس ها [23]، [24]، بازدانگان [25]، [26] و نهاندانگان [27]، [28]، [29] مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج مطالعه ای بیانگر این است که با وجود اینکه صفات کمی از شرایط اکولوژی و اقلیمی تأثیر می گیرند؛ اما ضمن همپوشانی با صفات کیفی در جداسازی گونه ها مؤثرند [30]. نتایج مطالعات ریخت شناسی برگ ها نشان داده است که سلول های اپیدرمی، روزنه ای، کرک ها و موم های روکتیکولی یا روپوستکی در سطح اپیدرم برگ ها از ویژگی های تشخیصی و طبقه بندی مفیدی هستند [31]، [32]، [33]. یکی از صفات برگ که در رده بندی گیاهان مورد توجه قرار می گیرید، روزنه ها هستند [34]. محققان معتقدند که تعداد و تراکم روزنه در واحد سطح در بین جنس ها، گونه ها و واریته ها دارای تفاوت و قابل بررسی و مطالعه است. از دیگر صفات مهم در تاکسونومی گیاهان کرک های سطح برگ و دم برگ است [35]. پژوهش های اخیر نشان داد که الگوی حاشیه برگ، اندازه سلول نگهبان و نوع روزنه فرورفته برای شناسایی گونه های زنبق (*Iris spp.*) در سطح گونه مفید [36]. در بررسی ریخت شناسی و ریخت شناسی برگ گونه های *Anemone L.* و *Pulsatilla Mill.* صفاتی مانند طول، شکل برگ همراه با ویژگی های اپیدرمی در جدایی گونه ها و حتی واریته ها ارزشمند هستند [37].

در پژوهش حاضر برای نخستین بار ویژگی های ریخت شناسی برگ ۶ گونه بنفشه بومی از ایران با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های برگ از ۶ گونه بنفشه در فروردین‌ماه ۱۴۰۱ از رویشگاه‌های طبیعی واقع در چهار استان گلستان، مازندران، آذربایجان شرقی و ایلام جمع‌آوری و خشک گردید. از هر گونه ۳ جمعیت جمع‌آوری شد و ۱۰ نمونه تصادفی از برگ‌ها انتخاب شد و در نهایت ۳ نمونه مختلف اپیدرم برگ از هر گونه با میکروسکوپ الکترونی تصویربرداری شد (شکل ۱). نمونه‌ها جهت شناسایی و اخذ کد هرباریومی به هرباریوم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی جهادکشاورزی آذربایجان شرقی (AZH) و هرباریوم دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تبریز (TBZFPH) منتقل شد. گونه‌های مورد مطالعه شامل *V. odorata*، *V. occulta*، *V. modesta*، *V. ignobilis*، *V. hirta* و *V. suavis* است (جدول ۱).



شکل ۱- نقشه جغرافیایی رویشگاه‌های ۶ گونه بنفشه

Figure 1- Geographical map of the habitats of 6 species of Violaceae

جدول ۱- ویژگی‌های محل جمع‌آوری و مشخصات هرباریومی گونه‌های مورد مطالعه

Table 1. Herbarium characteristics of the studied species

Locality	Altitude	Voucher No.	species
Mazandaran, Nowshahr, Zanus	1846	AZH8915	<i>V. hirta</i>
East-azarbaijan, Kaleybar	1132	TBZFPH4092	<i>V. ignobilis</i>
Ilam, Malekshahi, Gajar region	1771	AZH8911	<i>V. modesta</i>
Mazandaran, Nowshahr, Zanus	1818	AZH8914	<i>V. occulta</i>
Golestan, Gorgan, Alangdareh	358	TBZFPH4084	<i>V. odorata</i>
Golestan, Gorgan, Gelin, Nomal	610	TBZFPH4081	<i>V. suavis</i>



شکل ۲- تصاویر مربوط به گونه‌های مورد مطالعه (A: *V. hirta*; B: *V. ignobilis*; C: *V. modesta*; D: *V. occulta*; E: *V. odorata*; F: *V. suavis*)

Figure 2- Pictures related to the studied species (A: *V. hirta*; B: *V. ignobilis*; C: *V. modesta*; D: *V. occulta*; E: *V. odorata*; F: *V. suavis*)

برای تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی، ابتدا از برگ های خشک شده قسمت کوچکی انتخاب شد و نمونه ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دستگاه لایه نشان (Sputter coater) قرار گرفت. طبق روش Physical Vapor Deposition (PVD) لایه نازکی از طلا روی نمونه ها قرار داده شد. سپس ساختار روزه های برگ با بزرگ نمایی متفاوت توسط میکروسکوپ الکترونی مطالعه شد [38]. تصویربرداری از سطح زیرین برگ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی FESEM مدل MIRA III انجام شد. خصوصیات برگ از قبیل ابعاد و تراکم روزه و کرک به وسیله نرم افزار Image J v 1.52 اندازه گیری شد. اطلاعات حاصل از صفتهای ریزریخت شناسی برگ با نرم افزار SPSS v 26 تجزیه و تحلیل آماری شد. برای تعیین میزان قرابت گونه ها از روش تحلیل خوشه ای WARD استفاده گردید. اصطلاحات به کار رفته جهت مطالعات میکرومورفولوژی سطح برگ بر اساس مطالعات متاکالف و چالک [39] صورت گرفته است.

نتایج و بحث

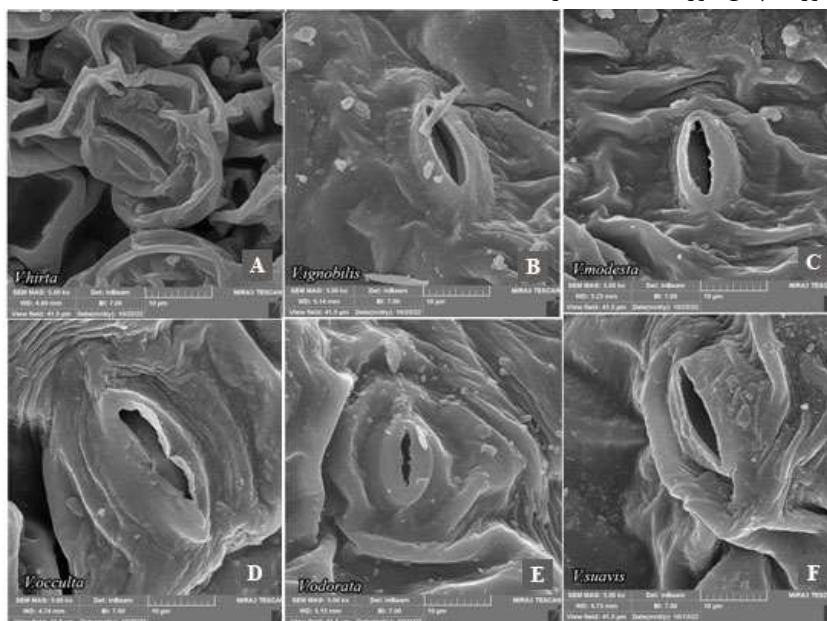
اندازه گیری از صفات ریزریخت شناسی سطح زیرین برگ در گونه های مورد مطالعه به طور تصادفی انجام شد سپس داده های کمی و کیفی گونه های بررسی شده در جدول ۲ ارائه شد.

جدول ۲- ارزیابی تاکسونومیک برخی از گونه های خانواده بنفشگان

Table 2- Taxonomic evaluation of 6 species of *Violaceae*

Species	Trichome					Stomata				
	Shape	Width in base (μm) ± S.E	Length (μm) ± S.E	no. (200μm ²)	Ornamentation	no. of cells glandular (5-7)	Length (μm) ± S.E	Width (μm)	ornamentation	no. (200μm ²)
<i>V. hirta</i>	Uncinate	46.19 ± 6.60	494.46 ± 88.83	3	streaky	Multicellular (5-7)	19.44 ± 2.50	9.61 ± 1.21	papillate	18
<i>V. ignobilis</i>	Conical	48.21 ± 6.12	171.56 ± 101.14	2	scabrous	Uicellular	15.74 ± 0.81	7.27 ± 0.71	papillate	9
<i>V. modesta</i>	Conical	45.55 ± 10.86	122.13 ± 10.83	2	scabrous	Uicellular	17.83 ± 1.85	8.92 ± 1.24	smooth	6
<i>V. occulta</i>	Triangular	62.66 ± 9.52	121.78 ± 2.38	1	streaky	Uicellular	22.58 ± 2.32	11.03 ± 0.83	papillate	5
<i>V. odorata</i>	Conical	62.19 ± 2.19	302.77 ± 41.37	2	scabrous	Uicellular	16.44 ± 1.35	8.79 ± 1.35	smooth	12
<i>V. suavis</i>	Conical	55.07 ± 3.67	304.08 ± 80.65	2	scabrous	Uicellular	19.72 ± 1.55	9.89 ± 1.52	papillate	9

نتایج تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد که بزرگترین ابعاد روزه مربوط به گونه *Viola occulta* (طول ۲۲/۵۷ و عرض ۱۱/۰۳ میکرومتر) و کوچکترین ابعاد نیز متعلق به گونه *V. ignobilis* (طول ۱۵/۷۴ و عرض ۷/۲۷ میکرومتر) است. بیشترین تراکم روزه در گونه *V. hirta* (۱۸ عدد در ۲۰۰ میکرومتر مربع) و کمترین تراکم در گونه *V. occulta* (۵ عدد در ۲۰۰ میکرومتر مربع) مشاهده شد. روزه های *V. ignobilis*، *V. modesta*، *V. occulta* و *V. suavis* به صورت دانه دار و پوسته پوسته، در گونه *V. odorata* صاف و در گونه *V. hirta* به صورت چین خورده مشاهده گردید (شکل ۳).

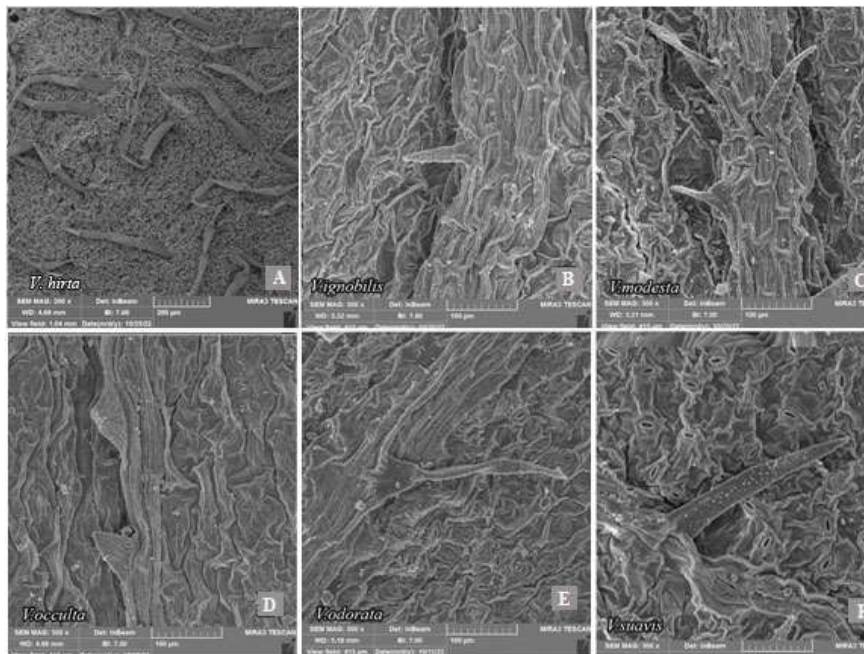


شکل ۳- تصاویر میکروگراف برگ گونه های مورد مطالعه (A: *V. hirta*; B: *V. ignobilis*; C: *V. modesta*; D: *V. occulta*; E: *V. odorata*; F: *V. suavis*)

Figure 3- Stomata electron micrograph of studied species (A: *V. hirta*; B: *V. ignobilis*; C: *V. modesta*; D: *V. occulta*; E: *V. odorata*; F: *V. suavis*)

نتایج مطالعه روزنه‌های گونه‌های مورد بررسی نشان داد که روزنه‌ها در گونه‌های *V. hirta*، *V. odorata* و *V. suavis* لبه بیرونی برجسته و لبه درونی همپوشان دارند در حالی که در گونه‌های *V. ignobilis*، *V. modesta* و *V. occulta* روزنه‌ها با لبه بیرونی برجسته و لبه درونی افراشته بودند. دهانه منفذ در *V. occulta*، *V. ignobilis* و *V. odorata* دنداندار و در گونه‌های *V. modesta* و *V. suavis* دهانه منفذ بریده بریده و در گونه *V. hirta* به صورت صاف می‌باشد. در همه گونه‌ها روزنه‌ها به شکل تخم‌مرغی شکل است. در تمام گونه‌های مورد بررسی، لبه‌های روزنه و سلول‌های محافظ به‌جز منافذ پوشیده از موم است، بیشترین میزان دانه‌های گرانول، لایه‌های موم و صفحات کوچک مومی در گونه‌های *V. ignobilis* و *V. modesta* و کمترین میزان در گونه‌های *V. hirta* و *V. occulta* دیده شد (شکل ۳).

نتایج آنالیز میکروسکوپی بیانگر این است که کرک در گونه‌های *V. hirta* و *V. suavis* به‌صورت خوابیده و در گونه‌های *V. occulta* و *V. odorata* به صورت نیمه‌افراشته و در دو گونه *V. ignobilis* و *V. modesta* به‌صورت افراشته است. کرک‌ها به سه شکل مخروطی (*V. ignobilis*، *V. modesta*، *V. odorata* و *V. suavis*)، مثلثی‌شکل (*V. occulta*) و بندبند (*V. hirta*) دیده شد (شکل ۵). همچنین این کرک‌ها به سه حالت راست (گونه‌های *V. ignobilis* و *V. occulta*)، موج‌دار (گونه‌های *V. modesta*، *V. odorata* و *V. suavis*) و در گونه *V. hirta* به‌شکل خمیده و بند بند است. بزرگ‌ترین ابعاد کرک در گونه *V. hirta* (قائده ۴۵/۵۵ و طول ۱۲۲/۱۳ میکرومتر) مشاهده شد. گونه *V. hirta* بلندترین کرک و کوچک‌ترین ابعاد هم در گونه *V. modesta* (قائده ۴۵/۵۵ و طول ۱۲۲/۱۳ میکرومتر) مشاهده شد. از نظر الگوی پراکنش موم نتایج نشان داد (۴۹۴/۴۶ میکرومتر) و گونه *V. occulta* کوتاه‌ترین کرک (۱۲۱/۷۸ میکرومتر) را داشت. از نظر الگوی پراکنش موم نتایج نشان داد که موم‌ها بیشتر به صورت دانه‌های گرانول روی کرک‌ها قرار گرفته‌اند که این دانه‌های گرانول اندازه‌های متفاوتی در گونه‌های مورد مطالعه دارند. گونه *V. odorata* بزرگ‌ترین قطر (۲/۷۳ تا ۵/۷۱ میکرومتر) و گونه *V. hirta* کمترین قطر (۰/۸ تا ۲/۵۳) دانه‌های گرانول را داشت. در گونه *V. modesta* بیشترین میزان دانه‌های گرانول و در گونه *V. occulta* کمترین میزان دانه‌های گرانول مشاهده شد (شکل ۴).



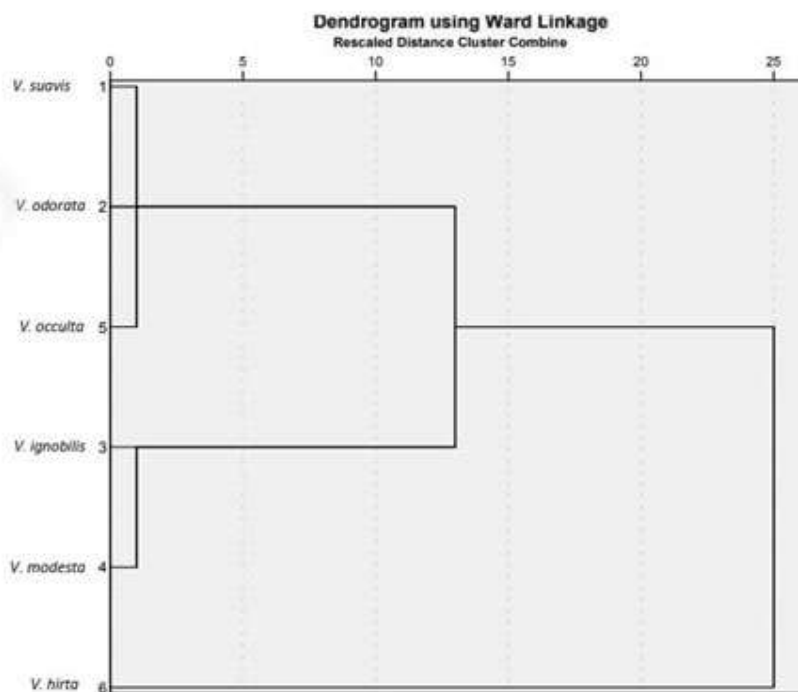
شکل ۴- تصاویر میکروگراف کرک گونه‌های مورد مطالعه (A: *V. hirta*; B: *V. ignobilis*; C: *V. modesta*; D: *V. occulta*; E: *V. odorata*; F: *V. suavis*)

Figure 4- Trichomes electron micrograph of studied species (A: *V. hirta*; B: *V. ignobilis*; C: *V. modesta*; D: *V. occulta*; E: *V. odorata*; F: *V. suavis*)

دندروگرام حاصل از خصوصیات ریزریختی برگ شامل دو خوشه اصلی است. گونه‌های *V. ignobilis*، *V. modesta* و *V. odorata*، *V. suavis* و *V. occulta* در یک خوشه و گونه *V. hirta* در یک خوشه دیگر قرار دارد. بنابراین بر اساس صفات ریزریخت‌شناسی برگ این ۶ گونه از هم تفکیک شدند، بیشترین نزدیکی از لحاظ صفات، بین گونه *V. ignobilis* با *V. modesta* و همچنین *V. suavis* با *V. odorata* وجود دارد. گونه *V. hirta* بیشترین تفاوت را از نظر صفات ریزریخت‌شناسی با سایر گونه‌ها دارد (شکل ۶).



شکل ۵- شکل کرک‌ها در گونه‌های مورد مطالعه (Metcalf and Chalk, 1950)
Figure 5- Trichomes shape of the studied species (Metcalf and Chalk, 1950)



شکل ۶- دندروگرام رسم شده به روش WARD بر اساس میانگین صفات ریزریختی در شش گونه جنس *Viola*
Figure 6- Dendrogram drawn by WARD method based on the average of micromorphological characters in 6 species of *Viola* spp

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، کرک‌ها در گونه‌های مورد مطالعه از لحاظ صفات ریزریخت‌شناسی به چندین تیپ کرکی متمایز شدند. ۱- تیپ اول: کرک‌ها به سه شکل کرک‌های مخروطی شکل (*V. suaveis*, *V. odorata*, *V. modesta*, *V. ignobilis*)، مثلثی شکل (*V. occulta*) و بندبند (*V. hirta*) مجزا شدند. شکل کرک در *V. suaveis*, *V. odorata* مخروطی بلند و در گونه‌های *V. ignobilis*، *V. occulta* و *V. modesta* مخروطی کوتاه است. ۲- تیپ دوم: کرک‌ها از لحاظ حالت به کرک‌های موج‌دار (*V. odorata*، *V. modesta*)، صاف (*V. suaveis*، *V. occulta*، *V. ignobilis*) و خمیده (*V. hirta*) تفکیک شدند. ۳- تیپ سوم: کرک‌ها به دو نوع کرک‌های بلند (*V. hirta*، *V. odorata*، *V. modesta*) و کرک‌های کوتاه (*V. occulta*، *V. ignobilis*) متمایز شدند. ۴- تیپ چهارم: کرک‌ها به سه نوع کرک‌های افراشته (*V. modesta* و *V. ignobilis*)، نیمه‌افراشته (*V. odorata* و *V. occulta*) و خوابیده (*V. suaveis* و *V. hirta*) مجزا شدند. ۵- تیپ پنجم: کرک‌ها به دو نوع کرک‌های تک‌سلولی (*V. suaveis*، *V. odorata*، *V. occulta*، *V. modesta*، *V. ignobilis*) و چندسلولی (*V. hirta*) تفکیک شدند. تنها گونه *V. hirta* دارای کرک‌های ۷-۵ سلولی است و بقیه گونه‌ها همگی تک سلولی هستند. ۶- تیپ ششم: کرک‌ها به دو نوع کرک‌هایی با تراکم زیاد (*V. hirta*)، و کرک‌هایی با تراکم کم (*V. occulta*) جدا شدند، گونه *V. hirta* از لحاظ تراکم و ابعاد کرک به وضوح قابل تشخیص است که در این گونه کرک‌ها دارای بزرگترین ابعاد و بیشترین تراکم هستند. ۷- تیپ هفتم: کرک‌ها با تزئینات دانه‌دار و ناصاف در گونه‌های *V. ignobilis*، *V. modesta*، *V. odorata*، *V. suaveis* و رگه‌دار در گونه‌های *V. occulta* و *V. hirta* دیده شد. بر اساس مشاهدات پژوهش حاضر، کرک‌ها در همه گونه‌ها از نوع پوششی بوده و در

گونه‌های *V. odorata* و *V. suavis* در روی رگبرگ‌ها و هم دور از رگبرگ‌ها دیده شد. کرک‌ها در گونه‌های *V. ignobilis*، *V. modesta* و *V. occulta* تنها بر روی رگبرگ و در گونه *V. hirta* نیز کرک‌ها در بیشتر سطوح برگ مشاهده شدند (شکل ۴).

با توجه به نتایج، در بررسی روزنه‌ها به وسیله تصاویر میکروسکوپی، گونه *V. hirta* بیشترین ابعاد و گونه *V. ignobilis* کمترین ابعاد را نشان داد. همچنین بیشترین تراکم روزنه متعلق به گونه *V. hirta* و کمترین تراکم روزنه نیز در گونه *V. occulta* مشاهده شد.

با توجه به آنالیز میکروسکوپی گونه‌های مورد مطالعه، روزنه‌ها از لحاظ صفات ریزریخت‌شناسی به چهار گروه تقسیم شدند. در گروه اول شکل دهانه منفذ در گونه‌های مورد بررسی به سه نوع روزنه‌هایی با دهانه منفذ دندانه‌دار، روزنه‌هایی با دهانه منفذ بریده‌بریده و روزنه‌هایی با دهانه منفذ صاف مجزا شدند. در گروه دوم گونه‌ها از نظر تراکم روزنه به گونه‌هایی با تراکم روزنه بالا (*V. hirta*)، تراکم روزنه متوسط (*V. ignobilis*، *V. odorata* و *V. suavis*) و تراکم روزنه پایین (*V. modesta* و *V. occulta*) تفکیک شدند. تراکم روزنه‌ها در گونه *V. hirta* به طور چشمگیری بیشتر از سایر گونه‌ها بود به طوری که تراکم روزنه‌ها در این گونه سه برابر تراکم روزنه در گونه‌های *V. modesta* و *V. occulta* و نزدیک به دوبرابر تراکم روزنه‌ها در گونه‌های *V. ignobilis*، *V. odorata* و *V. suavis* بود. گروه سوم از لحاظ ابعاد روزنه به سه نوع گونه‌هایی با ابعاد روزنه بالا (*V. occulta*)، گونه‌هایی با ابعاد روزنه متوسط (*V. hirta* و *V. suavis*) و گونه‌هایی با ابعاد روزنه پایین (*V. ignobilis*، *V. modesta* و *V. odorata*) تفکیک شدند، در گروه چهارم از لحاظ تزئینات به سه حالت دانه‌دار و پوسته‌پوسته (*V. ignobilis*، *V. modesta*، *V. occulta*، *V. suavis*)، صاف (*V. odorata*) و چین‌خورده (*V. hirta*) مجزا شدند. تحقیقات مختلفی روی نقش ویژگی‌های روزنه‌ها در تفکیک و شناسایی گیاهان مختلف انجام شده است: ریزریخت‌شناسی سطح برگ در ۲۰ گونه و دو وارسته از جنس *Viola* با استفاده از میکروسکوپ نوری (LM) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ریزریخت‌شناسی نشان داد که سطوح برگ را می‌توان با توجه به نوع روزنه تقسیم کرد: ۱- سطح رویی با روزنه پاراسیتیک، مانند *V. tricolor* ۲- سطح زیرین برگ بدون روزنه پاراسیتیک، از جمله بیشتر گونه‌های جنس. نوع دوم را می‌توان بر اساس شکل سلول‌های سطحی به چهار گروه تقسیم کرد. اشکال و الگوهای دیواره تاقدیس برای طبقه‌بندی گونه‌ها و وارسته‌ها در جنس ارزشمند است [40]. به طوری که در مطالعات مختلف نشان داده شده شکل روزنه دارای ارزش تاکسونومیک بوده و می‌تواند برای تشخیص گروه‌های نزدیک استفاده شود. نتایج تحقیق Pilberg و همکاران (۲۰۱۶) [41] روی گونه *V. maculata* و نیز نتایج پژوهش Toiu و همکاران (۲۰۱۰) [42] روی گونه *V. arvensis* Murray نشان‌دهنده وجود کرک‌های ساده و تک‌سلولی در هر دو گونه بود که در گونه *V. arvensis* تجمع کرک‌ها در ناحیه رگبرگ‌ها بیشتر بود [41]، [42]. بر اساس نتایج پژوهش حاضر در گونه *V. ignobilis* کرک‌ها بیشتر روی رگبرگ‌ها قرار دارند. در گونه *V. suavis* کرک‌ها کوتاه هستند و گونه *V. occulta* دارای کرک‌های اندک می‌باشد که Khatamsaz (۱۹۹۱) [14] به این موارد در فلور ایران اشاره نموده است [14].

بر اساس نمودار دندروگرام بیشترین شباهت از نظر صفات ریزریخت‌شناسی برگ در بین دو گونه *V. modesta* و *V. ignobilis* و نیز گونه *V. odorata* و *V. suavis* مشاهده شد که این نتیجه با نتایج آنالیز تصاویر میکروسکوپی مطابقت دارد. دو گونه *V. modesta* و *V. ignobilis* از لحاظ شکل کرک (مخروطی بلند)، دارا بودن کرک‌های کوتاه، حالت افراشته بودن کرک‌ها، تعداد سلول‌های کرک (تک‌سلولی بودن) و نوع تزئینات سطح برگ با هم شباهت دارند. همچنین دو گونه *V. odorata* و *V. suavis* از نظر شکل کرک (مخروطی بلند)، ابعاد کرک (کرک‌های بلند)، حالت کرک (موج‌دار بودن)، تراکم کرک، تعداد سلول‌های کرک (تک‌سلولی بودن) و نوع تزئینات سطح برگ با یکدیگر شباهت دارند.

در مطالعه‌ای که بر روی صفات ریزریخت‌شناسی گونه‌های گل صدتومانی (*Paenonia spp.*) انجام شد مشخص شد که شکل روزنه در شناسایی گونه‌های گل صدتومانی مؤثر بود. در این مطالعه سطح روزنه به دو حالت صاف و ناصاف و شکل روزنه به دو شکل بیضوی و مستطیلی مشاهده شد [43]. همان‌گونه که ثابت شده است استفاده از صفت کرک در رده‌بندی از اهمیت فراوانی برخوردار است و ارزش تاکسونومیکی کرک و کاربرد مستقیم آن در تاکسونومی و فیلوژنی گیاهان در تیره‌های مهمی مانند نعناعیان [44]، تیره سیب‌زمینی [45] و تیره گل‌ستاره‌ای [46] به اثبات رسیده است. نتایج مطالعه‌ای که بر روی انواع کرک‌ها در گونه‌های وحشی جنس *Solanum* از تیره *Solanaceae* انجام شد نشان داد که ریخت‌شناسی کرک‌ها در تفکیک و تعیین حدود بین‌گونه‌ای در برخی گونه‌های جنس *Solanum* مفید می‌باشد [47]. نتایج بررسی ریزریخت‌شناسی کرک ۲۴ گونه از سرده *Silene* (*Caryophyllaceae*) با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی نشان داد که وجود یا عدم وجود کرک‌ها و نوع کرک‌ها می‌تواند یک صفت تشخیصی مناسب بوده و در شناسایی برخی از گونه‌ها مفید باشد [48].

نتیجه گیری

نتایج بررسی صفات ریزریخت شناسی برگ در گونه های مورد مطالعه نشان داد که صفات کرک از جمله شکل، تراکم و ابعاد کرک و همچنین ابعاد و تراکم روزنه ها در ۶ گونه بنفشه و به ویژه گونه *V. hirta* می توانند در تشخیص و تفکیک گونه ها مفید باشند. از لحاظ صفات ریزریخت شناسی برگ، گونه *V. hirta* بیشترین تفاوت را با سایر گونه ها نشان داد.

اعلام تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای حمایت از پژوهش حاضر سپاسگزاری می کنند.

منابع

- [1] Munzinger, J.K., & Ballard Jr., H.E. (2003). *Hekkingia* (Violaceae), a New Arborescent Violet Genus from French Guiana, with a Key to Genera in the Family. *Systematic Botany*, 28 (2), 345-351.
- [2] Watson, L., & Dallwitz, M. J. (1992-97). The families of flowering plants: Description illustrations, identification, and information retrieval. Version: 16th March 1997.
- [3] Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ Press, New York.
- [4] Takhtajan, A. (1997). Diversity and classification of flowering plants. Columbia Univ Press, New York.
- [5] APG II. (2003). An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141, 399-436.
- [6] APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105-121.
- [7] Davis, C.C., Webb, C.O., Wurdack, K.J., Jaramillo, C.A., & Donoghue, M.J. (2005). Explosive radiation of Malpighiales supports a Mid Cretaceous origin of modern tropical rain forests. *The American Naturalist*, 165, E36-E65.
- [8] Tokuoka, T., & Tobe, H. (2006). Phylogenetic analyses of Malpighiales using plastid and nuclear DNA sequences, with particular reference to the embryology of *Euphorbiaceae sensu stricto*. *The Journal of Plant Research*, 119, 599-616.
- [9] Soltis, D. E., Gitzendanner, M. A., & Soltis, P. S. (2007). A 567-taxon data set for angiosperms: the challenges posed by Bayesian analyses of large data sets. *International Journal of Plant Sciences*, 168 (2), 137-157.
- [10] Melichor, H. (1925). *Violaceae*. In Die natürlichen Pflanzenfamilien (ed) 2. vol. 21. (eds). AEngler and K Prantl. Wilhelm Engelmann Leipzig, Germany.
- [11] Hekking, W.H. (1988). Flora neotropica monograph 46, Violaceae Part I-Rinoreocarpus. New York Botanical Garden, New York.
- [12] Hodges, S.A., Ballard, H.E., Arnold, M. L., & Chase, M.W. (1995). Generic relationships in the *Violaceae*: data from morphology, anatomy, chromosome numbers and rbcL sequences. *American Journal of Botany*, 82, 136.
- [13] Ballard, H.E., Sytsma, K.J., & Kowal, R.R. (1999). Shrinking the Violets: Phylogenetic relationships of infrageneric groups in *Viola* (*Violaceae*) based on internal transcribed DNA sequences. *Systematic Botany*, 23 (4), 439-458.
- [14] Khatamsaz, M. (1991). Flora of Iran, Violaceae. Number 5.
- [15] Karlsson, T., Marcussen, T., Wind, P., & Jonsell, B. (2008). Flora Nordica. <http://www.floranordica.org/Review/-Review-public/accounts/Viola.html>.
- [16] Akhbari, M., Batooli, H., & 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.
- [17] Gorbani, M., Khorasaninejad, S., Hemmati, Kh., & Ghorbani, Kh. (2022). Feasibility study on some native Iranian *Viola* spp. Domestication. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 38 (4), 632-650.
- [18] Kahkeshani, N., Khanavi, M., & Hadjiakhoondi, A. (2014). quality control of *Nepeta menthoides* Boiss & Buhse 2014. Using micromorphological analysis and phytochemical screening. *Journal of Medicinal Plants Research*, 13, 34-38.
- [19] Otang, W.M., Grierson, D.S., & Ndip, R. (2014). Foliar micro-morphology of *Gasteria bicolor* haw. (*Asphodelaceae*) from South Africa. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11 (4), 71-76.
- [20] Zhao, Y., Han, B., Peng, H., Wang, X., Chu, S., Dai, J., & Peng, D. (2017). Identification of "Huoshan shihu" Fengdou: Comparative authentication of the Daodi herb *Dendrobium huoshanense* and its related species by macroscopic and microscopic features. *Microscopy Research and Technique*, 80, 712-721.
- [21] Rashid, S., Zafar M., Ahma, d M., Shinwari, M.I., Yaseen, G., Sultana, S., Memon, R.A., Zehra, S.A., & Wibawa, P.A.H. (2019). Authentication of herbal drug *Tukhm-e-balango* (*Lallemantia royleana* Benth.) using microscopic, pharmacognostic, and phytochemical characterization. *Microscopy Research and Technique*, 82 (6), 731-740.

- [22] Khan, A.S., Ahmad, M., Zafar, M., Athar, M., Ozdemir, F.A., Gilani, S.A.A., Sultana, S., Ahmad, S., Butt, M.A., Majeed, S., & Khan, S.U. (2020). Morphological characterization of *Hypnaceae* (*Bryopsida*, *Hypnales*): Investigating four genera from Western Himalayas by using LM and SEM techniques. *Microscopy Research and Technique*, 83 (6), 676–690.
- [23] Shah, S.N., Ahmad, M., Zafar, M., Malik, K., Rashid, N., Ullah, F., Zaman, W., & Ali, M. (2018). A light and scanning electron microscopic diagnosis of leaf epidermal morphology and its systematic implications in *Dryopteridaceae*: Investigating 12 Pakistani taxa. *Micron*, 111, 36–49.
- [24] Shah, S.N., Celik, A., Ahmad, M., Ullah, F., Zaman, W., Zafar, M., Malik, K., Rashid, N., Iqbal, M., Sohail, A. & Bahadur, S. (2019). Leaf epidermal micromorphology and its implications in systematics of certain taxa of the fern family *Pteridaceae* from northern Pakistan. *Microscopy Research and Technique*, 82 (3), 317–332.
- [25] Clugston, J.A.R., Jeffree, C.E., Ahrends, A., & Mill, R.R. (2017). Do environmental factors affect the taxonomic reliability of leaf cuticular micromorphological characters? A case study in *Podocarpaceae*. *Edinburgh Journal of Botany*, 74, 299–343.
- [26] Elpe, C., Knop, F.P., Stützel, T., & Schulz, C. (2017). Cuticle micromorphology and the evolution of characters in leaves of *Taxaceae* sl. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 184, 503–517.
- [27] Carpenter, K.J. (2005). Stomatal architecture and evolution in basal angiosperms. *American Journal of Botany*, 92, 1595.
- [28] Moon, H.K., Hong, S.P., Smets, E., & Huysmans, S. (2009). Phylogenetic significance of leaf micromorphology and anatomy in the tribe *Menthae* (*Nepetoideae*: *Lamiaceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 160, 211–231.
- [29] Lima, J.F., Leite, K.R.B., Clark, L.G., & de Oliveira, R.P. (2020). Leaf micromorphology in *Poaceae* subtribe *Olyrinae* (*Bambusoideae*) and its systematic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 192, 184–207.
- [30] Singh, G. (2004). Plant systematics: an integrated approach (No. 8826). Science Publishers.
- [31] Esmaeili, G., Azizi, M., Arouiee, H., & Vaezi, J. (2019). Anatomical and morphological properties of trichomes in four Iranian native *Salvia* species under cultivated conditions. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 6 (2), 89–200.
- [32] Song, J.H., Yang, S., & Choi, G. (2020). Taxonomic implications of leaf micromorphology using microscopic analysis: a tool for identification and authentication of Korean Piperales. *Plants (Basel)*, 9 (5), 566.
- [33] Patel, S.G., Joshi, A.G., Pathak, A.R., & Raole, V.M. (2020). Micromorphology studies of three important medicinal plants of *Asclepiadaceae* family. *Notulae Scientia Biologicae*, 12 (1), 22–29.
- [34] Miskin, K.E., Rasmusson, D.C., & Moss, A.C. (1972). Inheritance and physiological effects of stomata frequency in barley. *Crop Science*, 12, 780–783.
- [35] Dennert, E. (1884). Contributions to the comparative anatomy of the leaf stem of Cruciferae feren. Marburg.
- [36] Choi, B., Ahn, Y., & Jang, T. (2020). Implications of foliar epidermal micromorphology using light and scanning electron microscopy: A useful tool in taxonomy of Korean irises. *Microscopy Research and Technique*, 85 (7), 2549–2557.
- [37] Shojaei, M., Sharifnia, F., Assadi, M., & Mehregan, I. (2021). Leaves macro and micro morphological study of Iranian *Anemone* L. and *Pulsatilla* Mill. (*Ranunculaceae*). *Applied Biology*, 33 (4), 61–79.
- [38] Smith, S., Weyers, J.D.B., & Berry, W. G. (1989). Variation in stomatal characteristics over the lower surface of *Commelina communis* leaves. *Plant, Cell and Environment*, 12, 653–654.
- [39] Metcalfe, C.R., & Chalk, L. (1950). Anatomy of the Dicotyledons. Vol. 1, Clarendon Press, Oxford, 243–245.
- [40] Min, Ch., Mei-Feng, G., Lu-Lu, L., Kang-Man, W., & Yang-Tang, H. (2010). Comparative Study on Micro-morphology of the Leaf Surfaces from the Genus *Viola* L. (*Violaceae*) in Shandong. *Plant Science Journal*, 28 (3), 268–278.
- [41] Pilberg, CH., Ricco, M.V. & Alvarez, M.A. (2016). Foliar anatomy of *Viola maculata* growing in Parque Nacional Los Alerces, Chubut, Patagonia, Argentina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26 (4), 459–463.
- [42] Toiu, A., Oniga, I., & Tămaș, M. (2010). Morphological and anatomical researches on *Viola arvensis* Murray (*Violaceae*). *Farmacia*, 58, 654–659.
- [43] Jia, W., Wang, Y., Qi, Q. He, S., Mi, ZH., & Zhu, X. (2022). Leaf Epidermal Morphology of Ten Wild Tree Peonies in China and Its Taxonomic Significance. *Horticulturae*, 8 (6), 502.
- [44] Salmaki, Y., Zarre, SH., Jamzad, Z., & Bräuchler, CH. (2009). Trichome micromorphology of Iranian *Stachys* (*Lamiaceae*) with emphasis on its systematic implication. *Flora*, 204 (5), 371–381.
- [45] Kaur, S., & Khanal, N. (2023). Morphological characterization of intraspecific variation for trichome traits in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Botanical Studies*, 64 (7), 1.
- [46] Abdul Rashid, Z.SH., Amri, C.N.A.N., & Shahari, R. (2022). The taxonomic study of trichome morphology in selected *Asteraceae* species of Pahang, Malaysia. *Malaysian Applied Biology*, 51 (4), 1–4.
- [47] Hassan, R.A., & Hamdy, R. (2023). Comparative study on trichomes types of wild species of *Solanum* l., 1753 (*Solanales*, *Solanaceae*) in Egypt and its taxonomic significance. *Bulletin of the Iraq natural history museum*, 17 (3), 349–373.
- [48] Sheibani, M., & Pirani, A. (2018). Trichome micromorphology of *Silene* (*Caryophyllaceae*) species in Iran. *Iranian journal of botany*, 24 (1), 28–44.