

Investigation of Genetic Diversity of Some Iranian Violet Species (*Viola* sp.) based on iPBS Molecular Marker

Faraneh Roshan¹, Mohammad Rabiei^{2,*} and Behrouz Shiran³

- 1- M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
- 3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

*Corresponding author ✉: rabiei@sku.ac.ir

Citation: Roshan, F., Rabiei, M. and Shiran, B. (2024). Investigation of genetic diversity of some iranian violet species (*Viola* sp.) based on iPBS molecular marker. *Plant Genetic Researches*, **11**(1): 89-102. <http://dx.doi.org/10.22034/PGR.11.1.6>

(Received: June 24, 2024; Final Revised: August 10, 2024; Accepted: August 17, 2024; Published online: September 21, 2024)

Extended abstract

Introduction

Viola sp. ($2n=2x=20$) is the largest genus within the violet family, commonly known as medicinal plants due to its extensive use in traditional medicine. Recently, the cyclotide compounds found in the violet family have attracted considerable attention. Cyclotides are stable plant proteins with a circular peptide backbone crosslinked by a cystine knot of disulfide bonds, which can be used as scaffolds in drug design. The types of cyclotides are directly influenced by the kind of species and ecotypes, making it essential to maintain diverse genotypes of *Viola* species. Furthermore, assessing genetic variation aids researchers in utilizing plants for various purposes and helps prevent their extinction. The advancement of biotechnology, combined with other life sciences like bioinformatics, has increasingly highlighted the role of markers in identifying hereditary differences in DNA sequences. The iPBS molecular marker (Inter Primer Binding Sites) is one of the markers that amplifies repetitive mobile sequences (retrotransposons). The iPBS molecular marker was used as a method for identifying LTR sequence diversity and directly observing polymorphism among different plant varieties. There is no report of using this marker in the violet family so far. Therefore, this study aims to use iPBS marker to identify the genetic diversity among different ecotypes of violets.

Materials and methods

In this study, 21 ecotypes of the genus *Viola* were collected during the peak flowering period (mid-March to mid-April) from various locations in the Mazandaran and Gilan provinces of Iran. The complete plant samples were transferred to the herbarium of the Natural Resources Research Division at the Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (SFAHAN), and herbarium codes were registered. Fresh leaf samples for DNA extraction were also stored in liquid nitrogen at -80°C . For the molecular study, DNA was extracted using a modified CTAB method with 3% PVP for plants with high secondary metabolism. Samples were purified with RNase A and stored at -20°C . DNA quantity was measured using a biophotometer, with quality assessed by 0.8% agarose gel electrophoresis. A concentration of 25 nanograms per sample was prepared for PCR reactions. PCR was carried out using an Eppendorf 5331 Gradient MasterCycler. Optimal annealing temperatures were determined using a gradient from 45 to 50°C . DNA Green Viewer dye was used for staining, and samples were placed in a horizontal electrophoresis device. Gels were imaged under UV light, and bands were scored as present (1) or absent (0), creating a binary matrix for statistical analysis using NTSYSpc ver2.2 software. A distance matrix



©2024 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

based on Nei's analysis was used for clustering with the UPGMA method. Some indices including observed alleles, effective alleles, Shannon's index, and AMOVA were calculated using GenAlEx6-5 software.

Results and discussion

The genetic diversity of violet plant populations was examined using 12 iPBS primers, resulting in 214 bands, 199 of which were polymorphic. The highest number of bands was produced by iPBS13, and the lowest by iPBS9, with band sizes ranging from 300 to 1500 bp. The polymorphism information content (PIC) for each iPBS primer was calculated, with an average polymorphism of 92.3%. The mean PIC was 0.35, with the highest being 0.45 for iPBS 9 and iPBS21, and the lowest being 0.24 for iPBS10. Higher PIC values indicate greater allele numbers and increased polymorphism frequency. The marker index (MI) for each primer, based on the number of polymorphic bands, averaged 5.64, ranging from 1.61 to 8.1. The highest MI was for iPBS21, indicating its high discriminatory power. Cluster analysis grouped the ecotypes into four clusters, with significant genetic diversity observed among the ecotypes. The clustering was independent of geographical regions, suggesting that ecotype similarities within species led to their grouping. This classification can be useful in taxonomic studies and breeding programs. Population structure analysis showed that *V. alba* had the highest and *V. sieheana* the lowest values for polymorphic bands, effective alleles, expected heterozygosity, observed heterozygosity, and Shannon's index. The average heterozygosity was 0.15. AMOVA indicated that within-species genetic diversity was higher than between-species diversity. The F_{st} index, indicating interspecies differentiation, was significant at 1%. Genetic distance analysis revealed the highest genetic distance (0.53) between *V. odorata* and *V. ignobilis*, and the lowest (0.19) between *V. alba* and *V. reichenbachiana*. The dendrogram grouped the species into three major clusters, with *V. odorata* in the first group, *V. alba* and *V. reichenbachiana* in the second, and *V. ignobilis* and *V. sieheana* in the third.

Conclusion

According to the results of this experiment, there was a significant relationship between *V. odorata* and *V. alba*, supported by their placement in the same group in the dendrogram, the lowest genetic distance, and the highest gene flow. These species had the highest levels of polymorphism, number of alleles, effective alleles, Shannon's index, and heterozygosity ratio. They are recognized for their fragrance and ornamental use alongside medicinal applications. The highest diversity among collected ecotypes was intra-species, explained by the higher likelihood of intra-species crossings. Given the high gene flow and close relationship in the dendrograms, *V. odorata* and *V. alba* are closely related and should be considered in future studies.

Keywords: Polymorphism, Genetic distance, Interspecies analysis

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از گونه‌های بنفشه ایرانی (*Viola sp.*) با استفاده از نشانگر مولکولی iPBSفرانه روشن^۱، محمد ربیعی^{۲*} و بهروز شیران^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۲- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

۳- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۴؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۷؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۳/۰۶/۳۱)

چکیده

گیاه بنفشه (*Viola spp.*) متعلق به خانواده بنفشگان از جمله گیاهان زینتی است که به دلیل داشتن ترکیبات سیکلوپدی در طراحی و ساخت داروها قابل استفاده است. در این پژوهش از ۲۱ اکوتیپ مختلف بنفشه از مناطق شمالی ایران نمونه برداری شد و بعد از استخراج DNA، با استفاده از نشانگر مولکولی iPBS مورد ارزیابی تنوع ژنتیکی قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده، در مجموع ۲۱۴ نوار برای نشانگر iPBS حاصل شد. میانگین درصد چندشکلی مشاهده شده، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) به ترتیب ۹۲/۳۱ درصد، ۰/۳۵ درصد و ۵/۶۴ محاسبه شد. مقادیر شاخص فاصله ژنتیکی Nei نیز بین صفر و ۰/۶۶ قرار داشت. نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر تنوع ژنتیکی قابل توجه بین اکوتیپ‌های بنفشه ایران است و به نظر می‌رسد که استفاده از نشانگر iPBS برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در این گونه مناسب باشد. نتایج مربوط به تجزیه و تحلیل‌های بین‌گونه‌ای و درون‌گونه‌ای نشان داد که ۶۱ درصد از تنوع مربوط به تنوع درون‌گونه‌ای است. بیشترین میزان پلی مورفیسم (چندشکلی)، تعداد آلل، تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون و نسبت هتروزیگوسیتی مربوط به گونه‌های *V. alba* و *V. odorata* بود. بررسی فواصل ژنتیکی نی و ترسیم دندروگرام هم نشان داد که این دو گونه کمترین فاصله ژنتیکی را با هم دارند. به‌طور کلی با توجه به اطلاعات تاکسونومیکی موجود و نتایج به دست آمده از این آزمایش می‌توان گفت که استفاده از نشانگر iPBS کارایی بالایی در مطالعات سیستماتیک جنس *Viola* دارد. نتایج این آزمایش باعث تفکیک مؤثر اکوتیپ‌ها و گونه‌ها شد که در مطالعات اصلاحی نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: پلی مورفیسم، تجزیه و تحلیل‌های بین‌گونه‌ای، فاصله ژنتیکی

مقدمه

گیاه بنفشه با نام علمی *Viola spp.* دارای ۲۰ کروموزوم ($2n=2x=20$) و از رده دولپه‌ای‌ها (Magnoliopsida)، راسته بنفشه‌سان (Violales)، تیره بنفشگان (Violaceae) و جنس بنفشه (*Viola*) می‌باشد (Inceer et al., 2007). این گیاه گسترده‌ترین جنس تیره بنفشگان (*Violaceae*) می‌باشد (Anca et al., 2009). از جمله ترکیبات ثانویه شاخص در این گیاه می‌توان به سیکلوتیدها اشاره نمود که اثرات ضدسرطانی قوی برای آن گزارش شده است (Gharari et al., 2019). اسید سالیسیلیک موجود این گیاه اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی داشته و برای ترکیبات فنلی این گیاه نیز، فعالیت ضدویروسی گزارش شده است (Khajuria et al., 2019).

جمع‌آوری اطلاعات در حوزه تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی به محققان رشته علوم پزشکی در طب سنتی، پزشکی جدید و متخصصان داروسازی کمک می‌کند تا با مطالعات بیشتر، اقدام به بهره‌برداری از منابع ژنتیکی نمایند (Eghlima et al., 2021). به‌علاوه در صورت احتمال خطر انقراض و یا فرسایش ژنتیکی، اطلاعات تنوع ژنتیکی کمک می‌کند تا بتوان با به‌کارگیری روش‌های علمی و اصلاحی، تهدیدات فوق را از حیات گیاه برطرف نمود (Golkar and Nourbakhsh, 2019). تولید ژنوتیپ‌های مطلوب و برتر، تنها از طریق انتخاب صحیح مواد ژنتیکی در یک گونه گیاهی بسیار متنوع و ارزیابی مداوم ژنوتیپ‌های برتر در محیط‌های مختلف امکان‌پذیر است (Gorji et al., 2011). فناوری‌های جدید فرصت‌های خوبی را برای یافتن الگوهای تنوع ژنتیکی برای پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی ایجاد کرده‌اند. امروزه با توسعه سریع فناوری توالی‌یابی‌های نسل جدید، توالی‌یابی ژنومی و روش‌های با کارایی بالا برای نشانگرها، ایجاد نشانگرهای جدید را آسان کرده است (MirMohammadi Maibody and Golkar, 2019). جمله ویژگی‌های یک نشانگر خوب پیروی از توارث مندلی، عدم وابستگی به محیط، چندشکلی بودن و تکرارپذیری نتایج آن است (Jamshidi-Kia et al., 2017).

نشانگر مولکولی iPBS (Inter Primer Binding Sites) از جمله نشانگرهایی می‌باشد که موجب تکثیر توالی‌های تکراری متحرک (Retrotransposons) می‌گردد. نشانگر مولکولی iPBS توسط کالندر و شولمن (Kalendar and Schulman, 2014) گسترش یافت و تحت عنوان روشی برای شناسایی تنوع توالی‌های LTR (Long Terminal Repeat Sequences: LTR) و مشاهده مستقیم چندشکلی میان ارقام مختلف گیاهان مورد استفاده قرار گرفت. هرچند تاکنون از نشانگر iPBS در مطالعات مربوط به خانواده بنفشه استفاده نشده است اما با استفاده از نشانگرهای دیگر، تنوع ژنتیکی گونه‌های *V.odorata* مناطق اروپا؛ گونه‌های *V.alba* در مناطقی از اروپا، قفقاز و آذربایجان (Marcussen, 2006)؛ گونه‌های *V.suavis* در اسپانیا و اروپا (Nadeem et al., 2018)؛ گونه‌های *V.section melanium* در مناطق اروپا (Yockteng et al., 2003)؛ گونه *V.wittrockiana* (Yang and Yeh, 1992)؛ گونه *V.tricolor* (Marcussen, 2003) و گونه‌های *V.riviniana* و *V.cornuta* (Bennouna et al., 2019) مورد بررسی قرار گرفته است. از طرفی، استفاده از نشانگر مولکولی iPBS در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۵ واریته گندم (Gao et al., 2014)؛ ۲۸ اکوتیپ زراعی زعفران (Babaei et al., 2014)؛ ۶۶ توده بامیه (Elisafenko, 2015)؛ ۷۰ گونه گندم وحشی (Kizilgeci et al., 2022)؛ ۴۰ رقم محلی لوبیا ترکی و ۶۳ ژنوتیپ گندم نان (Haliloğlu et al., 2022, 2023) نیز مؤثر واقع شده است. با توجه به اینکه گزارشی مبنی بر استفاده از نشانگر iPBS در ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه بنفشه ارائه نشده است و همچنین تأیید کارایی این نشانگر در گیاهان دیگر، تحقیق حاضر جهت بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های مختلف چند گونه بنفشه ایرانی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه گیاهی: در پژوهش حاضر ۲۱ اکوتیپ از جنس *viola* در زمان اوج گلدهی گیاه بنفشه که در ایران حدود نیمه اسفندماه تا نیمه فروردین‌ماه می‌باشد، از نقاط مختلف استان مازندران و گیلان جمع‌آوری شدند.

اتصال قوی‌تری) از شرکت سیناکلون تهران سفارش داده شدند. به‌منظور انجام واکنش PCR از دستگاه ترموسایکلر مدل Master cycler Gradient 5331 ساخت شرکت اپندروف آلمان استفاده شد. اجزای مورد استفاده برای واکنش PCR به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۷ میکرولیتر آب دیونیزه، ۱ میکرولیتر DNA با غلظت ۲۵ نانوگرم، ۲ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومولار و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس AMPILIQON با غلظت ۱۰X بود. جهت تعیین بهترین دمای اتصال هرکدام از آغازگرها از گرادایانت ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد که در نهایت دمای اتصال هرکدام از آغازگرها مشخص شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده و دمای اتصال مربوط به هرکدام در جدول ۲ ارائه شده است.

تحلیل آماری: محصولات نهایی با ژل آگارز ۱/۴ درصد که در آزمایش ما نسبت به بقیه غلظت‌ها باعث تفکیک بهتر نوارها می‌شد مورد ارزیابی قرار گرفتند. جهت رنگ‌آمیزی ژل از ماده رنگی DNA Green Viewer (شرکت پارس توس) استفاده شد و نمونه‌ها در بافر TBE 1X در دستگاه الکتروفورز افقی (شرکت پایا پژوهش) قرار گرفتند. در پایان کار، ژل به دستگاه ژل‌داک (شرکت UVTech) منتقل و تصویربرداری زیر نور UV انجام شد، سپس نوارهای تفکیک شده مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ای از نوارهای تکثیر یافته در شکل ۲ ارائه شده است. وجود الگوی نواری با امتیاز ۱ و عدم حضور آن با امتیاز ۰ مشخص شد. ماتریس صفر و یک حاصل به‌عنوان ورودی برای تجزیه آماری با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc ver2.2 استفاده شد (Gogoi *et al.*, 2018). همچنین با استفاده از فاصله ژنتیک نی، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc ver2.2 انجام شد (Nei and Li, 1979). در این ارزیابی تعداد آلل‌های مشاهده شده، تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص شانون برای هر جمعیت و همچنین تحلیل واریانس مولکولی یا به اختصار AMOVA (Analysis Molecular Variance) بر اساس روش پیکال و همکاران (Peakall and Smouse, 2006) با استفاده از نرم‌افزار GenAIEx6-5 انجام گردید.

نمونه‌های کامل گیاه به هرباریوم بخش تحقیقات منابع طبیعی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان انتقال داده شد و پس از ثبت اطلاعات رویشگاهی (جدول ۱)، کد هرباریوم آن‌ها ثبت شد. شناسایی و نمونه‌گیری بر اساس رنگ و شکل گل‌ها انجام شد. نمونه‌های برگ‌ی مورد نیاز جهت استخراج DNA ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی کل از گیاه بنفشه: به‌منظور انجام مطالعه مولکولی، DNA ژنومی نمونه‌های برگ‌ی به‌وسیله روش CTAB تغییریافته استخراج شد (Saghai-Marooft *et al.*, 1984). تمامی نمونه‌های استخراج شده با آنزیم RNase A خالص‌سازی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین کمیت DNA: کمیت DNA نمونه‌های استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (اپندروف آلمان) برحسب نانوگرم بر میکرولیتر مورد بررسی قرار گرفت. نسبت قرائت شده $\frac{OD\ 260}{OD\ 280}$ نمونه‌ها در بازه ۲-۱/۷ تعیین شد؛ این مقدار نشان‌دهنده کیفیت مطلوب DNA استخراج شده است که جهت انجام واکنش زنجیره‌ای PCR مناسب می‌باشد.

تعیین کیفیت DNA: کیفیت نمونه‌های DNA توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۸ درصد در بافر 1X TBE تعیین شد. نتیجه بررسی کیفیت DNA در دستگاه ژل‌داک ساخت شرکت UVITech ارزیابی شد. با توجه به وجود تک نوارهای منفرد در زیر هر چاهک بدون هیچ‌گونه پس‌زمینه‌ای، کیفیت مطلوب DNA استخراجی تأیید شد (شکل ۱). بعد از بررسی کمیت و کیفیت DNA، از تمامی نمونه‌ها غلظت ۲۵ نانوگرم جهت انجام واکنش PCR، تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): واکنش PCR بر اساس روش ویلیام و همکاران (Williams *et al.*, 1990) انجام شد. با توجه به درصد GC توالی آغازگرهای iPBS که در پژوهش کالندر و همکاران (Kalendar and Schulman, 2014)، مورد استفاده قرار گرفته بود، ۱۲ آغازگر با محتوای GC بالاتر (به‌دلیل

جدول ۱- اطلاعات جغرافیایی مربوط به جمعیت‌های جمع‌آوری شده از گونه‌های بنفشه

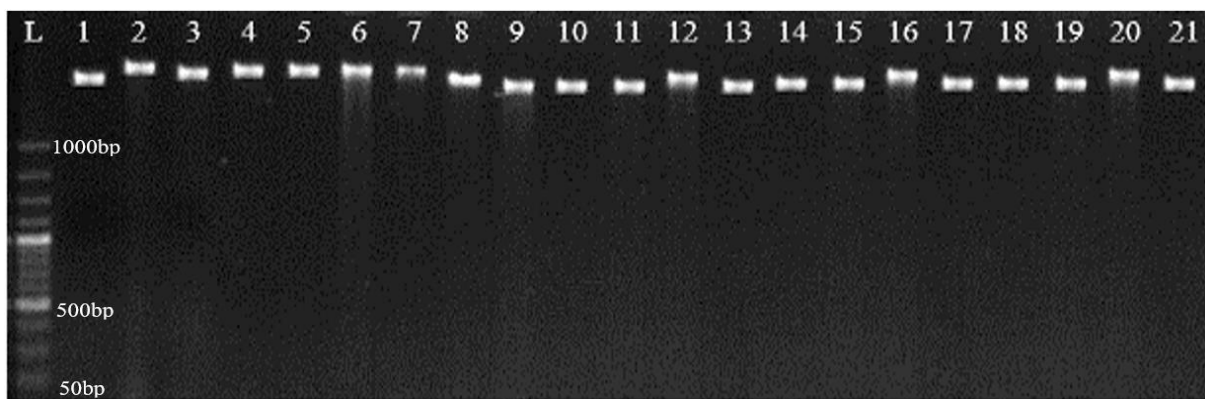
Table 1. Geographical information of the collected populations of *Viola* spp.

شماره نمونه Sample No.	گونه Species	استان Province	منطقه Location	کد نمونه Sample code	طول جغرافیایی Longitude (UTM)	عرض جغرافیایی latitude (UTM)	ارتفاع از سطح دریا (متر) Altitude (m)
1	<i>Viola odorata</i>	مازندران Mazandaran	پلنگ دره Palang dareh	V. odorat1	670443	4019593	312
2	<i>Viola odorata</i>	مازندران Mazandaran	پارک کشیل Park-kashpol	V. odorata2	596603	4034568	232
3	<i>Viola odorata</i>	مازندران Mazandaran	صلاح الدین کلا Salahodin kola	V. odorata3	574108	4046280	29
4	<i>Viola odorata</i>	مازندران Mazandaran	سی سنگان Sisangan	V. odorata4	571515	4048245	5
5	<i>Viola odorata</i>	گیلان Gilan	لاکه تاشون Lale takshon	V. odorata5	309127	4172009	1569
6	<i>Viola odorata</i>	گیلان Gilan	نارنجه دول Nareng dol	V. odorata6	317526	4177629	629
7	<i>Viola alba</i>	مازندران Mazandaran	پلنگ دره Palang dareh	V. alba1	670443	1019593	312
8	<i>Viola alba</i>	مازندران Mazandaran	پارک جنگلی نور Park nor	V. alba2	600055	4048824	8
9	<i>Viola alba</i>	مازندران Mazandaran	سی سنگان Sisangan	V. alba3	571512	4048245	5
10	<i>Viola alba</i>	گیلان Gilan	لاکه تاشون Lake tashon	V. alba4	309127	4172009	8
11	<i>Viola alba</i>	گیلان Gilan	نارنجه دول Nareng dol	V. alba5	317526	4177629	629
12	<i>Viola alba</i>	گیلان Gilan	اسبه هونی Asbe honi	V. alba6	304096	4166807	5871
13	<i>Viola reichenbachiana</i>	گیلان Gilan	اسبه هونی Asbe honi	V. reichenbachia1	304096	4166807	5871
14	<i>Viola reichenbachiana</i>	گیلان Gilan	فوشه معدن Foshe maadan	V. reichenbachia2	306718	4168131	4583
15	<i>Viola reichenbachiana</i>	گیلان Gilan	دو خاله کوه Do khale koh	V. reichenbachia3	301523	4164459	5974
16	<i>Viola ignobilis</i>	گیلان Gilan	فوشه معدن Foshe maadan	V. ignobilis1	306718	4168131	458
17	<i>Viola ignobilis</i>	گیلان Gilan	اسبه هونی Asbe honi	V. ignobilis2	304069	4166807	5871
18	<i>Viola ignobilis</i>	گیلان Gilan	لرزره Larzreh	V. ignobilis3	670443	4019593	312
19	<i>Viola sieheana</i>	گیلان Gilan	لاکه تاشون Lake tashon	V. sieheana1	596603	4034568	232
20	<i>Viola sieheana</i>	گیلان Gilan	پارک درستکار Park dorostkar	V. sieheana2	574108	4046280	29
21	<i>Viola sieheana</i>	گیلان Gilan	نارنجه دول Nareng dol	V. sieheana3	571515	4048245	5

جدول ۲- توالی آغازگرهای iPBS مورد استفاده در تکثیر نواحی ژنومی گیاه بنفشه

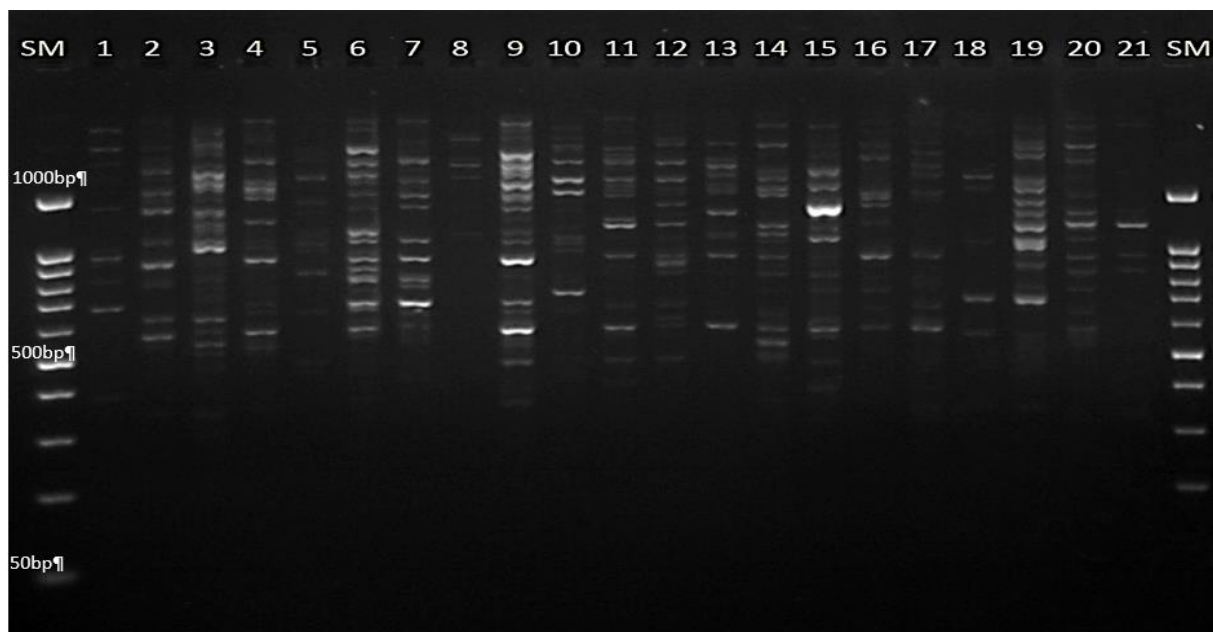
Table 2. The sequences of iPBS primers used for amplification of genomic regions of violet plant

iPBS آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')	دمای اتصال (سانتی‌گراد)
iPBS primer	Primer sequences (5'→3')	Annealing temperature (°C)
iPBS 1	GCTCCGATGCCA	49
iPBS 2	CTCACGATGCCA	49
iPBS 8	GCTCATCATGCCA	49
iPBS 9	AGAACGGCTCTGATACCA	45
iPBS 10	TCAACGGCTCTGATACCT	45
iPBS 12	TCGCATCAACCA	49
iPBS 13	TAGATGGCACCA	48
iPBS 14	ACGAAGGGACCA	48
iPBS 15	GGTCTCATCCA	49
iPBS 17	CCATTGGGTCCA	48
iPBS 19	GCAACAACCCCA	48
iPBS 21	GAACCCTTGCCGATACCA	45



شکل ۱- کیفیت DNA استخراج شده نمونه‌های گیاه بنفشه با ژل آگارز ۰/۸ درصد (نمونه ۱ تا ۲۱ مطابق جدول ۱)

Figure 1. The quality of extracted DNA of violet samples using 0.8% agarose gel (L: size marker). (Samples 1-21 according to Table 1)



شکل ۲- نواری تکثیر یافته با استفاده از آغازگر iPBS21 در ۲۱ اکوتیپ مختلف گیاه بنفشه (نمونه ۱ تا ۲۱ مطابق جدول ۱)

Figure 2. iPBS-PCR amplification products of 21 *Viola* sp ecotypes amplified by marker iPBS21. (Samples 1-21 based on Table 1)

نتایج و بحث

محاسبه شاخص مولکولی: در مطالعه حاضر، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاه بنفشه با استفاده از ۱۲ آغازگر iPBS مورد بررسی قرار گرفت. در کل تعداد ۲۱۴ نوار حاصل شد که از میان آن‌ها ۱۹۹ نوار پلی‌مورفیک بود. حداکثر نوار مربوط به iPBS ۱۳ و حداقل نوار به ۹ iPBS و دامنه انتخاب نوارها بین ۳۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت‌باز بود. مقدار محتوای چندشکلی (PIC) برای هر نمونه از آغازگر iPBS به همراه تعداد نوارها و نوع آغازگر محاسبه شد (جدول ۳). میانگین پلی‌مورفیک ۹۲/۳ درصد مشاهده شده در حالی که میانگین نوارهای چندشکل به ازای هر واحد سنجش برابر ۱۹/۳۱ بود. در این پژوهش میانگین PIC، ۰/۳۵ دیده شد که بیشترین مقدار آن مربوط به آغازگرهای ۹ و ۲۱ iPBS به میزان ۰/۴۵ و کمترین آن مربوط به آغازگر ۱۰ iPBS به میزان ۰/۲۴ بود. هرچه مقدار شاخص PIC به یک نزدیک باشد به همان میزان تعداد آلل‌ها زیاده‌تر بوده و فراوانی چندشکلی در جمعیت افزایش می‌یابد (Nadeem et al., 2018). مقدار PIC به دست آمده در این آزمایش، نسبت به گزارش ارائه شده توسط محمدی (Mohammadi et al, 2003) در بنگدانه (PIC= ۰/۳۰)، حلیل اقلو و همکاران (Haliloğlu et al., 2023) در گندم (PIC=۰/۱۷) و (Haliloğlu et al., 2022) در لوبیا (PIC= ۰/۱۹) بیشتر بود.

برای هر آغازگر شاخص نشانگر (MI) بر اساس تعداد نوارهای چندشکلی تعیین شد که با متوسط ۵/۶۴، مقدار آن بین ۱/۶۱ و ۸/۱ قرار داشت. این شاخص برآورد مناسبی از کارایی آغازگراهاست و به پوشش بالای ژنوم با نشانگر نسبت داده می‌شود. حداکثر شاخص نشانگر به ۲۱ iPBS تعلق داشت که بیانگر قدرت تفکیک بالای ۲۱ iPBS در گونه‌های مورد مطالعه گیاه بنفشه بود. نشانگر مولکولی iPBS برای تعیین تنوع ژنتیکی و ارتباطات بین ارقام و دسترسی‌ها نقش مهمی در انتخاب والدین هدفمند مستقل از تأثیرات محیطی ایفا می‌کنند. در این مطالعه، نشانگرهای iPBS قادر به شناسایی گونه‌های بنفشه (*Viola spp.*) در سطح مولکولی بودند که کمک قابل توجهی در شناسایی گونه‌ها می‌نماید. تاکنون مطالعه خاصی بر روی

گونه‌های بنفشه با استفاده از نشانگر iPBS انجام نشده است. مقادیر مربوط به مقدار چندشکلی و شاخص‌های مربوط به توانایی این نشانگر در تمایز و آشکارسازی چندشکلی‌ها که در جدول ۳ ارائه شده است، به وضوح نشان می‌دهد که رتروترانسپوزون‌های iPBS نشانگرهای توانمندی در شناسایی گونه‌های بنفشه می‌باشند. بررسی‌های حلیل اقلو و همکاران (Haliloğlu et al., 2022) روی ۶۳ ژنوتیپ از ژرم‌پلاسم گندم نان با استفاده از آغازگرهای iPBS نشان داد ۴ که ۳۴ آغازگر iPBS استفاده شده در مطالعه در مجموع ۱۲۳۱ نوار چندشکلی ایجاد می‌کنند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مطالعه حلیل اقلو و همکاران (Haliloğlu et al., 2022) بین ۰/۴۸ (iPBS 2087) و ۰/۳۰۳ (iPBS 2382) با میانگین ۰/۱۷۵ متغیر بود که در مقایسه با پژوهش ما مقدار میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی کمتر بود. در پژوهش دیگری روی برنج با استفاده از آغازگرهای iPBS در مجموع ۱۳۵ نوار چندشکلی ایجاد شد؛ که میانگین درصد چندشکلی آن ۴۷/۵ بود (Dwiningsih and Alkahtani, 2022). محتوای اطلاعات چندشکلی مطالعه مذکور بین ۰/۰۷۸ (iPBS 1854) و ۰/۲۴۱ (iPBS 2240) با میانگین ۰/۱۹۵ متغیر بود که در مقایسه با پژوهش ما این مقدار کمتر می‌باشد. برای نشانگرهای غالبی همچون iPBS فاصله ژنتیکی نی توصیه شده است. استفاده از ضریب نی در تعیین مکان‌های ژنی هتروزیگوت در ارقام هیبرید به شکل - های متفاوتی عمل می‌کند در صورتی که در تخمین فاصله ژنتیکی در لاین‌های اینبرد نتیجه یکسانی می‌دهد (Kwiatkowska et al., 2019).

برای طبقه‌بندی اکوتیپ‌های مختلف گیاه بنفشه از تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. اکوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از داده‌های iPBS در ۴ گروه دسته‌بندی شدند (شکل ۳). نمونه جمع‌آوری شده از پلنگ دره مازندران (*V. odorata*) به تنهایی در یک گروه مجزا قرار گرفت. با توجه به اطلاعات ارائه شده در جدول ۱، این اکوتیپ فاصله جغرافیایی بیشتری از دیگر اکوتیپ‌ها دارد و این مسئله باعث شده تغییرات ژنتیکی روی داده در طی سالیان متوالی در این اکوتیپ مستقل از اکوتیپ‌های دیگر باشد. در سایر خوشه‌های دیگر نیز گروه‌بندی‌های متعددی بر اساس نوع گونه، قابل تشخیص

گونه *V. reichenbachiana* و *V. ignobilis*، *V. sieheana* کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند (جدول ۴). تجزیه واریانس مولکولی یا به اختصار AMOVA (Analysis of Molecular Variance) بر اساس روش پیکال و همکاران (Peakall and Smouse, 2006) انجام گردید. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای در نشانگر مورد استفاده، بیش‌تر از بین گونه‌ای است (جدول ۶). همچنین میزان شاخص Fst مطابق جدول ۵ که بیانگر تمایز بین گونه‌ای است در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. بررسی فواصل ژنتیکی در جدول ۶ نشان می‌دهد که بر اساس نشانگر iPBS بیشترین میزان فاصله ژنتیکی (۰/۵۳) بین دو جمعیت *V. ignobilis* و *V. odorata* و کمترین آن (۰/۱۹) بین دو گونه *V. alba* و *V. reichenbachiana* وجود دارد. جهت بررسی میزان قرابت و تفاوت جوامع مورد بررسی با استفاده از فواصل ژنتیکی حاصله، دندروگرام ارائه شده در شکل ۴ ترسیم شد. نتیجه حاصله حاکی از آن است که گونه‌های مورد بررسی در سه گروه بزرگ قرار گرفته‌اند. گونه *V. odorata* در گروه اول، *V. alba* و *V. reichenbachiana* در گروه دوم و *V. ignobilis* و *V. siehana* در گروه سوم قرار گرفته‌اند.

است. مطابق دندروگرام در دسته سوم، پنج اکوتیپ *V. odorata*، اکوتیپ‌های ۴، ۵ و ۶ *V. alba*، گونه‌های *V. reichenbachiana* و *V. ignobilis* و در دسته چهارم اکوتیپ‌های ۱، ۲ و ۳ *V. alba* قرار گرفتند.

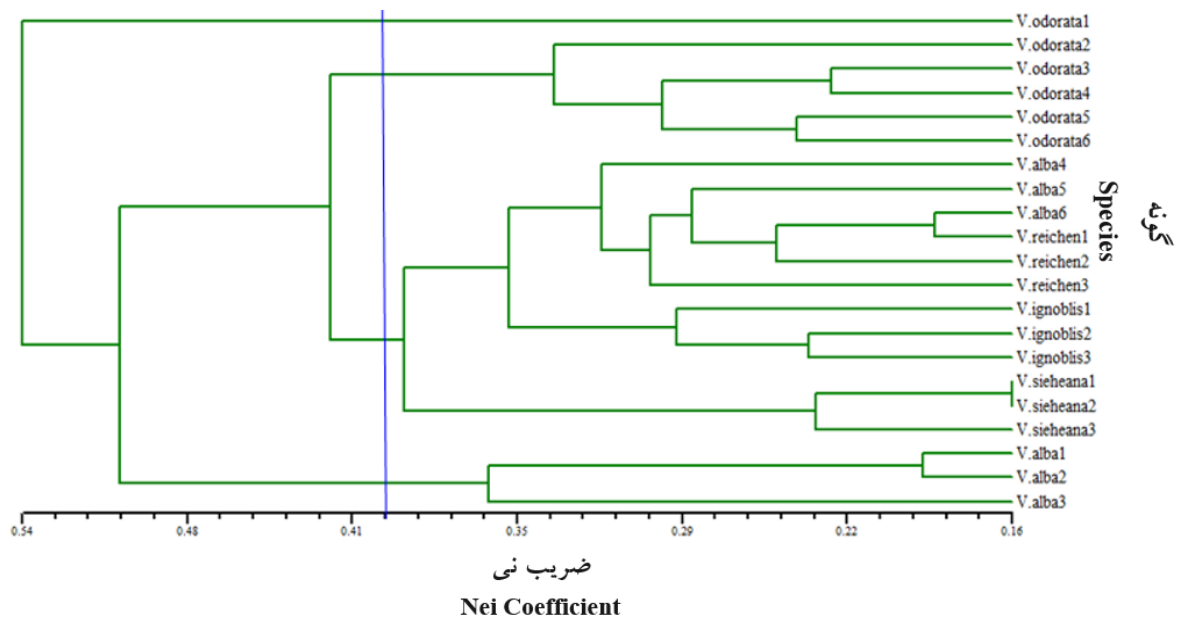
تنوع ژنتیکی قابل توجهی بین اکوتیپ‌های مختلف بنفشه معطر وجود دارد که در سطح مطالعات مولکولی قابل تمایز و تشخیص است. با توجه به نتایج تجزیه خوشه‌ای مشخص شد که دسته‌بندی‌های اکوتیپ‌ها، مستقل از مناطق جغرافیایی است و شباهت اکوتیپ‌ها موجود در هر گونه باعث قرار گرفتن آن‌ها در گروه‌های تا حدی مستقل شد. از این گروه‌بندی‌ها می‌توان در مطالعات تاکسونومیک و همچنین انتخاب گونه‌ها و اکوتیپ‌های بنفشه به‌خصوص در برنامه‌های به‌زادی استفاده کرد.

تجزیه و تحلیل ساختار جمعیت: مطابق جدول ۴ بیشترین کمترین تعداد نوارهای چندشکل (PPB)، تعداد آل‌های مؤثر (Ne)، هتروزیگوسیتی قابل انتظار (He)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (HO) و شاخص شانون (I) به ترتیب به گونه *V. alba* و گونه *V. sieheana* اختصاص یافت. متوسط درجه هتروزیگوسیتی در گونه‌های مورد بررسی ۰/۱۵ بود که سه

جدول ۳- اطلاعات مربوط به آغازگرهای iPBS مورد استفاده در این تحقیق جهت شناسایی میزان چندشکلی بین اکوتیپ‌های بنفشه

Table 3. Data of iPBS primers used in the present study for detecting extent of polymorphism among several ecotypes of *Viola* sp.

آغازگر Primer	تعداد نوار Total band number	تعداد نوار چندشکل Polymorphic band number	درصد چندشکلی Polymorphism percentage	محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphism information content	نسبت چندگانه مؤثر Effective multiplex ratio	شاخص نشانگر Marker index
iPBS 1	16	16	100.00	0.38	16.00	6.03
iPBS 2	22	20	90.91	0.38	18.18	6.84
iPBS 8	20	19	95.00	0.40	18.05	7.15
iPBS 9	27	27	100.00	0.45	27.00	12.07
iPBS 10	15	10	66.67	0.24	6.67	1.61
iPBS 12	20	19	95.00	0.28	18.05	5.02
iPBS 13	11	9	81.82	0.26	7.36	1.94
iPBS 14	19	17	89.47	0.31	15.21	4.64
iPBS 15	18	16	88.89	0.38	14.22	5.46
iPBS 17	15	15	100.00	0.36	15.00	5.33
iPBS 19	13	13	100.00	0.27	13.00	3.47
iPBS 21	18	18	100.00	0.45	18.00	8.10
کل Total	214	199	92.31	0.35	15.56	5.64



شکل ۳- دسته‌بندی اکوتیپ‌های مختلف بنفشه مورد مطالعه بر اساس ماتریس فاصله نی حاصل از داده‌های iPBS به روش UPGMA
Figure 3. Cluster analysis of 21 ecotypes of *Viola* sp. produced by the UPGMA method based on Nei's genetic distance of iPBS marker datasets

جدول ۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی در پنج گونه گیاه بنفشه حاصل از نشانگر iPBS

Table 4. Genetic diversity parameters among five species of *Viola* sp. obtained from iPBS marker

جمعیت Population	درصد چندشکلی Percentage of polymorphic loci	تعداد آل Na	تعداد آل مؤثر Ne	شاخص شانون I	نسبت هتروزیگوسیتی He
<i>V. odorata</i>	60.87%	1.435	1.410	0.344	0.233
<i>V. alba</i>	78.26%	1.739	1.566	0.456	0.314
<i>V. reichenachiana</i>	26.09%	1.043	1.112	0.124	0.078
<i>V. ignobilis</i>	21.74%	1.087	1.116	0.113	0.073
<i>V. sieheana</i>	17.39%	0.826	1.001	0.100	0.070
Mean	40.87%	1.226	1.269	0.229	0.155

جدول ۵- تجزیه واریانس مولکولی گونه‌های بنفشه با استفاده از نشانگر iPBS

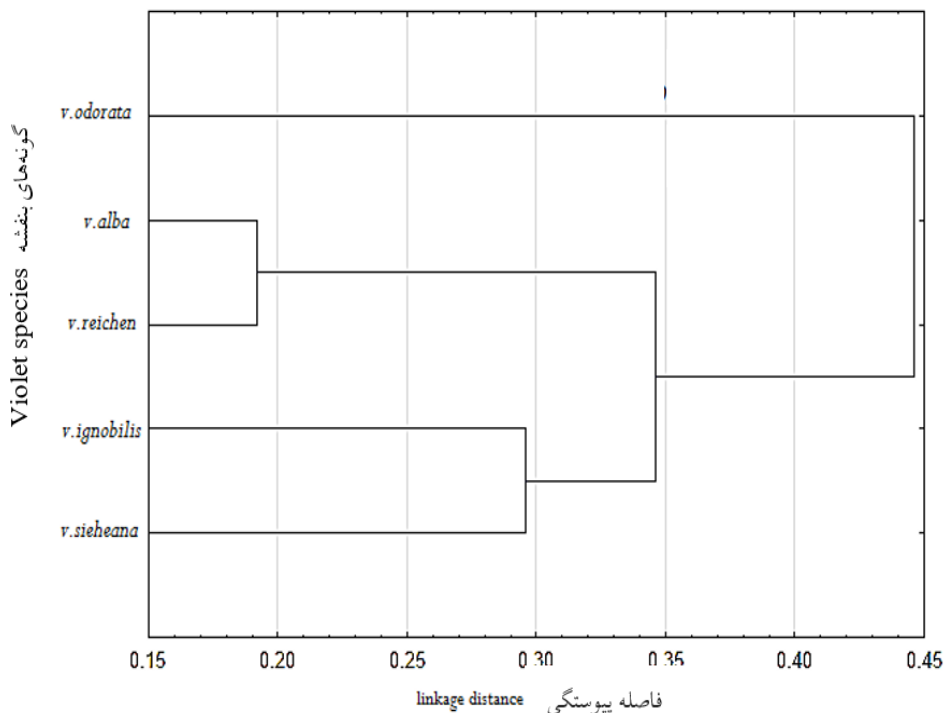
Table 5. Molecular analysis of variance of *Viola* species based on iPBS marker

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Df	میانگین مربعات MS	واریانس Estimated variance	درصد واریانس Percent of E.V.	شاخص تمایز Fst	احتمال P- value
بین گونه‌ای Among Species	4	10.5	1.8	39%	0.38	0.001
درون گونه‌ای Within Species	16	2.9	2.9	61%		

جدول ۶- فاصله ژنتیکی نی (قطر بالا) و میزان شاخص جریان ژن (قطر) بین گونه‌های بنفشه با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر iPBS

Table 6. Pairwise Nei's genetic distance (top diameter) and the amount of gene flow index (diameter) between violet species using the data obtained from the iPBS marker

گونه‌ها Species	<i>V.odorata</i>	<i>V. alba</i>	<i>V. reichenachiana</i>	<i>V. ignobilis</i>	<i>V. sieheana</i>
<i>V. odorata</i>	-	0.383	0.416	0.538	0.447
<i>V. alba</i>	0.40	-	0.192	0.252	0.383
<i>V. reichenachiana</i>	0.33	2.19	-	0.383	0.366
<i>V. ignobilis</i>	0.23	2.31	0.21	-	0.296
<i>V. sieheana</i>	0.28	0.54	0.18	0.21	-



شکل ۴- دندروگرام حاصل از ماتریس فاصله ژنتیکی به دست آمده از نشانگر iPBS برای گونه‌های مورد بررسی گیاه بنفشه

Figure 4. Clustre analysis of five studied species of *Viola* sp produced by the UPGMA method based on Nei's genetic distance of iPBS marker datasets

گروه‌بندی می‌شوند (Marcussen *et al.*, 2022). همان‌طور که مشاهده می‌شود دو گونه *Viola richenachia* و *Viola sieheana* در زیربخش متفاوتی قرار می‌گیرند. به دلیل تعدد زیاد گیاهان زیرمجموعه خانواده بنفشه‌گان و وقوع هیبریدهای مختلف و متعاقباً پدیده ایتروگرسیون، مشکلات متعددی در شناسایی و رده‌بندی این گیاهان وجود دارد که باعث بروز طبقه‌بندی‌های متعدد توسط متخصصین تبارشناسی گیاهی شده است. بر اساس تقسیم‌بندی جدول ۷ گونه *V. ignobilis* از نظر تاکسونومیکی مشابه دو گونه *V. odorata* و *V. alba* است، اما در شکل ۴ در گروهی مجزا قرار گرفته است. فواصل ژنتیکی به دست آمده برای گونه‌های مورد بررسی با استفاده از نشانگر iPBS هم نشان می‌دهد که بیشترین فاصله ژنتیکی بین *V. odorata* و *V. ignobilis* است. این موضوع می‌تواند در مطالعات آتی تاکسونومیکی جهت بررسی دقیق‌تر این گونه مدنظر قرار گیرد (جدول ۷).

میزان جریان ژنی (Nm) بین گونه‌های مختلف بنفشه در جدول ۶ نشان داده شده است. میزان جریان ژنی به سطح تمایز ژنتیکی بین گونه‌ها وابسته است (Abolghasemi *et al.*, 2020). بیشترین مقدار جریان ژنی با در نظر گرفتن داده‌های حاصل از نشانگر iPBS، بین دو گونه *V. sieheana* و *V. alba* مشاهده شد. بررسی ژنوتیپ‌های مختلف نشان داد که ژنوتیپ‌هایی که در یک منطقه هستند، دارای فاصله ژنتیکی کم بوده و برعکس آن‌هایی که از نظر جغرافیایی دور هستند کمترین شباهت را دارند و این موضوع فرضیه انجام هیبریداسیون و نیز جریان ژنی در فواصل جغرافیایی کم را قوت می‌بخشد.

اخیراً مارکوسن و همکاران (Marcussen *et al.*, 2022) مطالعه جامعی جهت تعیین رده‌بندی این خانواده انجام داده‌اند که بر اساس آن، جنس *Viola* به دو زیر جنس *Viola* و *Neoandinium* و متعاقباً هر زیرجنس به تعدادی بخش و زیربخش تقسیم می‌شوند. بر اساس این مطالعه، گونه‌های مورد استفاده در این تحقیق طبق جدول ۷

جدول ۷- رده‌بندی انجام شده برای گونه‌های مورد بررسی در این مطالعه بر اساس نظر مارکوسن و همکاران (۲۰۲۲)

Table 7. The classification of violet species investigated in this study based on Marcussen et al. (2022)

نام علمی	زیرجنس	بخش	زیربخش
Scientific name	Sub-genus	Section	Sub-section
<i>Viola odorata</i>	<i>Viola</i>	<i>Viola</i>	<i>Viola</i>
<i>Viola ignobilis</i>	<i>Viola</i>	<i>Viola</i>	<i>Viola</i>
<i>Viola alba</i>	<i>Viola</i>	<i>Viola</i>	<i>Viola</i>
<i>Viola richenachia</i>	<i>Viola</i>	<i>Viola</i>	<i>Rostratae</i>
<i>Viola sieheana</i>	<i>Viola</i>	<i>Viola</i>	<i>Rostratae</i>

درصد و فاصله ژنتیکی بسیار کم (۹ درصد) را نشان دادند (Rad and Cheon et al., 2019). در مطالعه راد و شفیع (Rad and Shafiei, 2010) که با هدف طبقه‌بندی و تعیین روابط فیلولوژنتیکی گونه‌های بنفشه موجود در مناطق شمال ایران و دریای خزر صورت گرفته بود، بنفشه معطر *Vi. odorata* به‌عنوان بیشترین گونه رایج در منطقه خزری معرفی شد. به‌طور کلی یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین میزان تنوع بین اکوتیپ‌های جمع‌آوری شده از نوع درون‌گونه‌ای بود. این مسئله با توجه به اینکه احتمال وقوع تلاقی‌های درون‌گونه‌ای بیشتر از تلاقی‌های بین‌گونه‌ای است قابل توجیه است. با این حال، مطالعات بسیاری وجود دارد مبنی بر اینکه بسیاری از زیرگونه‌های موجود در خانواده بنفشگان، حاصل تلاقی‌های بین‌گونه‌ای است (Marcussen et al., 2022). در این پژوهش نیز میزان تنوع بین‌گونه‌ای با توجه به نشانگر iPBS حدود ۴۰ درصد بود. با توجه به مقادیر بالای جریان ژنی و نیز ارتباط نزدیک در دندروگرام‌ها، دو گونه *Vi. odorata* و *Vi. alba* دارای قرابت نزدیکی هستند که می‌بایست در مطالعات آتی مدنظر قرار گیرند.

نکته قابل توجه دیگر وجود ارتباط زیاد بین دو گونه *V. alba* و *V. odorata* بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌باشد. قرار گرفتن این دو گونه در یک گروه بر اساس دندروگرام ترسیم شده شکل ۳، مطابق جدول ۶ کمترین فاصله ژنتیکی و بیشترین میزان جریان ژنی گواه بر این موضوع است. علاوه بر این، این دو گونه از نظر میزان پلی‌مورفیسم، تعداد آلل، تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، نسبت هتروزیگوسیتی جدول ۴ بیشترین میزان را دارا بودند. این دو گونه، به‌عنوان گونه‌های معطر که در کنار کاربردهای دارویی به‌عنوان گیاه زینتی توسط مارکوسن و همکاران (Marcussen et al., 2022) مورد تأیید قرار گرفته است. در پژوهش دیگری که به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی نژادهای دو گونه *Vi. alba* و *Vi. odorata* با استفاده از ۲۰ نشانگر مولکولی ISSR از ۳۷ نمونه گیاهی جمع‌آوری شده در شمال ایران انجام شد، تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم UPGMA و بر اساس شاخص دایس و تجزیه و تحلیل اتصال همسایه، نژادهای مورد استفاده را به چهار گروه مجزا تفکیک نمود، همچنین بر اساس ضریب تشابه ژنتیکی نی، دو گونه مورد مطالعه شباهت ژنتیکی بالای ۹۱

References

- Abolghasemi, S., Naderi, R. and Fattahi Moghadam, M.** (2020). Evaluation of genetic diversity in Iranian Violet (*Viola spp*) populations using morphological and RAPD molecular markers. *Journal of Genetic Resources*, **6**: 157-171.
- Anca, T., Philippe, V., Ilioara, O. and Mircea, T.** (2009). Composition of essential oils of *Viola tricolor* and *V. arvensis* from Romania. *Chemistry of Natural Compounds*, **45**: 91-92.
- Babaei, S., Talebi, M., Bahar, M. and Zeinali, H.** (2014). Analysis of genetic diversity among saffron (*Crocus sativus*) accessions from different regions of Iran as revealed by SRAP markers. *Scientia Horticulturae*, **171**: 27-31.
- Bennouna, D., Avic, J.C., Rosique, C., Svilar, L., Pontet, C., Trouverie, J., Fine, F., Pinochet, X., Fraser, K. and Martin, J.C.** (2019). The impact of genetics and environment on the polar fraction metabolome of commercial Brassica napus seeds: A multi-site study. *Seed Science Research*, **29**: 167-178.

- Cheon, K.S., Kim, K.A., Kwak, M., Lee, B. and Yoo, K.O.** (2019). The complete chloroplast genome sequences of four *Viola* species (Violaceae) and comparative analyses with its congeneric species. *PLoS One*, **14**: 0214162.
- Dwiningsih, Y. and Alkahtani, J.** (2022). Genetics, biochemistry and biophysical analysis of anthocyanin in rice (*Oryza sativa* L.). *Advance Sustainable Science, Engineering and Technology*, **4**: 0220103.
- Eghlima, G., Kheiry, A., Sanikhani, M., Hadian, J. and Aelaie, M.** (2021). Study of genetic diversity of *Glycyrrhiza glabra* L. populations using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **8(1)**: 81-94 (In Persian).
- Elisafenko, T.** (2015). Features of seed germination in different ecological groups of the species of the section *Violidum*, subgenus *Nomimium*, genus *Viola* L. (*Violaceae*). *Contemporary Problems of Ecology*, **8**: 523-533.
- Gao, Y.H., Zhu, Y.Q., Tong, Z.K., Xu, Z.Y., Jiang, X.F. and Huang, C.H.** (2014). Analysis of genetic diversity and relationships among genus *Lycoris* based on start codon targeted (SCoT) marker. *Biochemical Systematics and Ecology*, **57**: 221-226.
- Gharari, Z., Sharafi, A., Bagheri, K., Yazdinezhad, A. and Bijani, S.** (2019). In vitro regeneration and secondary metabolites of *Viola caspia* subsp. *sylvestrioides* Marcussen. *BioTechnologia Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, **100**: 789-782.
- Gogoi, L.R., Singh, S.K. and Sarma, R.** (2018). Assessment of genetic diversity in indigenous sesame genotypes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **7**: 1509-1520.
- Golkar, P. and Nourbakhsh, V.** (2019). Analysis of genetic diversity and population structure in *Nigella sativa* L. using agronomic traits and molecular markers (SRAP and SCoT). *Industrial Crops and Products*, **130**: 170-178.
- Gorji, A.M., Poczai, P., Polgar, Z. and Taller, J.** (2011). Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *American Journal of Potato Research*, **88**: 226-237.
- Haliloğlu, K., Türkoğlu, A., Öztürk, A., Niedbala, G., Niazian, M., Wojciechowski, T. and Piekutowska, M.** (2023). Genetic diversity and population structure in bread wheat germplasm from Türkiye using iPBS-retrotransposons-based markers. *Agronomy*, **13**: 255-257.
- Haliloğlu, K., Türkoğlu, A., Öztürk, H.I., Özkan, G., Elkoca, E. and Poczai, P.** (2022). iPBS-retrotransposon markers in the analysis of genetic diversity among common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Türkiye. *Genes*, **13**: 1147-1150.
- Inceer, H., Hayirlioglu-Ayaz, S. and Ozcan, M.** (2007). Chromosome numbers of the twenty-two Turkish plant species. *Caryologia*, **60**: 349-357.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z. and Amini-Khoei, H.** (2017). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmед Pharmacology*, **7**: 1-7.
- Kalendar, R. and Schulman, A.H.** (2014). Transposon-based tagging: IRAP, REMAP, and iPBS. *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, **8**: 233-255.
- Khajuria, A.K., Chandra, S., Manhas, R. and Bisht, N.** (2019). Effect of different PGRs on in vitro organogenesis in *Viola canescens* Wall. ex. Roxb. from petiole callus culture. *Vegetos*, **32**: 353-362.
- Kizilgeci, F., Bayhan, B., Türkoğlu, A., Haliloglu, K. and Yildirim, M.** (2022). Exploring genetic diversity and Population structure of five *Aegilops* species with inter-primer binding site (iPBS) markers. *Molecular Biology Reports*, **49**: 8567-8574.
- Kwiatkowska, M., Żabicka, J., Migdalek, G., Żabicki, P., Cubala, M., Bohdanowicz, J., Słomka, A., Jędrzejczyk-Korycińska, M., Sliwiska, E. and Sychta, K.** (2019). Comprehensive characteristics and genetic diversity of the endemic Australian *Viola banksii* (section *Erpetion*, *Violaceae*). *Australian Journal of Botany*, **67**: 81-98.
- Marcussen, T.** (2003). Evolution, phylogeography, and taxonomy within the *Viola alba* complex (*Violaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, **237**: 51-74.
- Marcussen, T.** (2006). Allozymic variation in the widespread and cultivated *Viola odorata* (*Violaceae*) in western Eurasia. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **151**: 563-571.
- Marcussen, T., Ballard, H.E., Danihelka, J., Flores, A.R., Nicola, M.V. and Watson, J.M.** (2022). A revised phylogenetic classification for *Viola* (*Violaceae*). *Plants*, **11**: 22-24.
- MirMohammadi Maibody, S.A.M. and Golkar, P.** (2019). Application of DNA molecular markers in plant breeding. *Plant Genetic Researches*, **6(1)**: 1-30 (In Persian).

- Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.** (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, **43**: 1235-1248.
- Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A. and Labhane, N.** (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **32**: 261-285.
- Nei, M. and Li, W.H.** (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**: 5269-5273.
- Peakall, R. and Smouse, P.E.** (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**: 288-295.
- Rad, J.E. and 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.
- Saghai-Marooif, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W.** (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **81**: 8014-8019.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6531-6535.
- Yang, R.C. and Yeh, F.C.** (1992). Genetic consequences of in situ and ex situ conservation of forest trees. *The Forestry Chronicle*, **68**: 720-729.
- Yockteng, R., Jr Ballard, H., Mansion, G., Dajoz, I. and Nadot, S.** (2003). Relationships among pansies (*Viola section Melanium*) investigated using ITS and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, **241**: 153-170.