The University of Tehran Press

Iranian Journal of Horticultural Science

Online ISNN: 2008-482X

Homepage: http:// ijhs.ut.ac.ir/

Phytochemical Assessment and Comparison of some Iranian Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) Populations in Field Conditions

Ghasem Eghlima✉

Corresponding Author, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail: gh-eghlima@sbu.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 15 April 2023

Received in revised form: 23 September 2023

Accepted: 11 October 2023

Published online: Spring 2024

Keywords:

Cluster analysis,

diversity,

breeding,

glycyrrhizic acid,

glabridin.

ABSTRACT

Licorice is a perennial herbaceous plant belonging to the Fabaceae family which possesses several medicinal properties, such as antioxidant, antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory, and anticoagulant properties. It is an invaluable and strategic plant in Iran, and Iran is one of the major exporters of licorice roots.

In this study, the diversity of phytochemical traits, among different Iranian licorice landraces cultivated in field conditions, was investigated. Rhizomes of different populations were collected from different regions of Iran in 2019 and were planted in a randomized complete block design with five replications in the medicinal plants collection of Shahid Beheshti University. The studied traits were glycyrrhizic acid, glabridin, liquiritigenin, liquiritin, rosmarinic acid, rutin, total phenol, total flavonoids content and antioxidant activity. The highest content of glycyrrhizic acid (155.17 mg/g dry weight) and glabridin (19.46 mg/g dry weight) were observed in Kazerun and Ilam population, respectively. The population of Yasuj had the highest amounts of liquiritin (5.32 mg/g dry weight) and liquiritigenin (12.16 mg/g dry weight). A positive and significant correlation was observed between glabridin and liquiritin content at 5% probability level, but it had a significant negative correlation with IC_{50} at 5% probability level. Based on the results of cluster analysis, 22 licorice populations divided into five main groups. Factor analysis showed that the first four factors explained 69.21% of the total variance. Overall, the findings of this study showed that the studied licorice populations had unique phytochemical properties that can be used in breeding programs, and also in the pharmaceutical industry.

Cite this article: Eghlima, Gh. (2024). Phytochemical Assessment and Comparison of some Iranian Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) Populations in Field Conditions. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 55 (1), 135-151. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.353421.2082

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.353421.2082

Extended Abstract

Introduction

Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), as a strategic and very valuable plant in Iran, is overused and is endangered. Although the government has adopted strict regulations to prevent the extinction of licorice, the destruction of its habitat, due to improper and indiscriminate exploitation is still a serious threat. Since the propagation and reproduction of many endangered medicinal species is prolonged and the speed of their habitat renewal is lower than the speed of their exploitation from nature, the issue of their protection becomes more important. Licorice is a perennial herbaceous plant with antioxidant, antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory and anticoagulant properties Licorice is one of the most valuable economic plants in the world, which is widely used in cosmetics, tobacco, pharmaceutical and food industries, and Iran is one of the major exporters of licorice roots. Given the importance of licorice phytochemical compounds such as glycyrrhizic acid, glabridin, liquiritigenin, and liquiritin as well as the increasing demand for their utilization in industry, the present study aimed to introduce genotypes rich in phytochemical compounds from cultivated Iranian *G. glabra* populations. This study not only introduced superior genotypes in terms of phytochemicals, but also focused on comparing

these medicinal compounds in cultivated populations. These introduced populations can be used in future breeding programs to release new bred licorice cultivars for commercial cultivation.

Matrial and methods

In this study, the variation in phytochemical traits among different Iranian licorice landraces cultivated in field conditions, was investigated. Rhizomes of different populations were collected from different regions of Iran in 2019 and were planted in a randomized complete block design with 5 replications in the medicinal plants collection of Shahid Beheshti University. The rhizomes of plant samples were harvested at the end of the season (autumn) of the third year of cultivation. Then, after washing, the samples were transferred to the laboratory and dried at 25 °C. In order to extract the samples, they were powdered by an industrial mill. The studied traits were glycyrrhizic acid, glabridin, liquiritigenin, liquiritin, rosmarinic acid, rutin, total phenol, flavonoids content and antioxidant activity. Glycyrrhizic acid, glabridin, liquiritigenin, liquiritin, rosmarinic acid and rutin content were measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The total phenol content, total flavonoid content and antioxidant activity were measured by the folin–Ciocalteu, aluminum chloride and DPPH methods, respectively.

Results and Discussion

According to the results, the highest content of glycyrrhizic acid (155.17 $mg.g^{-1}$ dry weight) and glabridin (19.46 $mg.g^{-1}$ dry weight) were observed in Kazerun and Ilam populations, respectively. The population of Yasuj had the greatest amount of liquiritin (5.32 $mg.g^{-1}$ dry weight) and liquiritigenin (12.16 $mg.g^{-1}$ dry weight). The maximum content of total phenol (8.36 $mgGAE.g^{-1}$ dry weight) and total flavonoid (27.28 $mgQUE.g^{-1}$ dry weight) was observed in Kashmer and Baft populations, respectively. Bradsir and Kazerun had the highest concentration of rutin (5.93 mg/g dry weight) and rosmarinic acid (0.624 $mg.g^{-1}$ dry weight), respectively. The results also showed that the glycyrrhizic acid content had a positive and significant correlation with liquiritigenin content at 5 % probability level. A positive and significant correlation was observed between glabridin and liquiritin contents at 5% probability level, but it had a significant negative correlation with IC50. Based on the results of cluster analysis, 22 licorice populations were categorized into five main groups comprising ten, two, two, one and seven populations, respectively. Factor analysis showed that the first four factors explained 69.21% of the total variance. The first to fourth factors accounted for 24.26%, 17.10%, 15.49% and 12.34% of the total variance, respectively.

Conclusion

Knowledge of different phytochemical characteristics helps breeders in the improvement and domestication of plants. This was a practical research study to create the possibility of selection in order to select desirable populations of licorice. The results of this research showed that there are high levels of diversity among licorice populations in terms of phytochemical characteristics including glycyrrhizic acid, glabridin, liquiritigenin and liquiritin contents. In general, this study showed that different licorice populations have high phytochemical potential and diversity, so that Kazerun, Ilam, and Yasouj were superior populations in terms of glycyrrhizic acid, glabridin, liquiritigenin and liquiritin contents, respectively, and depending on the industry's needs, they can be used for breeding programs, domestication and introduction to the licorice cultivation system.

انتشارات دانشگاه تهران

نشریه علوم باغبانی ایران، دوره ۵۵، شماره ۱

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۷۹۳۰

Homepage: http://ijhs.ut.ac.ir//

بررسی و مقایسه فیتوشیمیایی برخی جمعیت‌های شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) بومی ایران در شرایط مزرعه

قاسم اقلیما✉

نویسنده مسئول، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران. رایانامه: gh-eghlima@sbu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۹
تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۳

کلیدواژه‌ها:
تجزیه خوشه‌ای، تنوع، اصلاح، گلیسیریزیک اسید، گلابریدین.

چکیده

شیرین‌بیان گیاهی است علفی و چند ساله از تیره پروانه‌آساها که خواص دارویی متعددی از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد ویروس، ضد التهاب و ضد انعقاد دارد. شیرین بیان یکی از گیاهان مهم و استراتژیک در ایران است و ایران یکی از کشورهای عمده صادر کننده ریشه آن محسوب می شود. در این پژوهش، تنوع صفات فیتوشیمیایی ریزوم در برخی جمعیت‌های شیرین‌بیان بومی ایران در شرایط مزرعه بررسی شد. ریزوم جمعیت‌های مختلف در سال ۱۳۹۸ از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۵ تکرار در کلکسیون گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران کشت گردید. صفات مورد بررسی شامل مقدار گلیسیریزیک‌اسید، گلابریدین، لیکوریتجنین، لیکوریتین، رزمارنیک اسید، روتین، فنل کل، فلاونوئیدکل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ریزوم گیاه بودند. بیشترین محتوای گلیسیریزیک‌اسید (۱۵۵/۱۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و گلابریدین (۱۹/۴۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) به‌ترتیب در جمعیت کازرون و ایلام مشاهده شد. جمعیت یاسوج دارای بیشترین لیکوریتین (۵/۳۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و لیکوریتیجنین (۱۲/۱۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) بود. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین گلابریدین و لیکوریتین در سطح پنج درصد مشاهده شد، ولی با IC_{50} دارای همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح پنج درصد بود. براساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، ۲۲ جمعیت شیرین‌بیان در پنج گروه اصلی قرار گرفتند. تجزیه به عامل‌ها نشان داد که چهار عامل اول توانستند ۶۹/۲۱ درصد از کل واریانس را توجیه نمایند. در مجموع، یافته‌های این تحقیق نشان داد که جمعیت‌های مورد بررسی شیرین‌بیان دارای خصوصیات فیتوشیمیایی منحصر به‌فردی بودند که می‌توان از آن‌ها برای طراحی برنامه‌های اصلاحی و نیز صنایع داروسازی استفاده نمود.

استناد: اقلیما، قاسم (۱۴۰۳). بررسی و مقایسه فیتوشیمیایی برخی جمعیت‌های شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) بومی ایران در شرایط مزرعه. *نشریه علوم باغبانی ایران*، ۵۵ (۱)، ۱۵۱-۱۳۵. DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.353421.2082

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijhs.2023.353421.2082

مقدمه

رشد روزافزون جمعیت جهان و وابستگی آن‌ها به طبیعت، همراه با بهره برداری و مصرف بی رویه گیاهان دارویی، منجر به فرسایش سریع اکوسیستم‌ها و زیستگاه‌های طبیعی بسیاری از گونه‌های دارویی شده است (Esmaeili *et al*., 2019). شیرین‌بیان به عنوان یک گیاه استراتژیک[1] و بسیار با ارزش در ایران، بیش از حد مورد استفاده قرار گرفته و در حال انقراض است. اگرچه دولت مقررات سختگیرانه‌ای را برای جلوگیری از انقراض این گیاه اتخاذ کرده است، اما تخریب ناشی از بهره‌برداری نادرست و بی‌رویه زیستگاه شیرین‌بیان همچنان یک تهدید جدی است. از آنجایی که تکثیر و زادآوری بسیاری از گونه های دارویی در حال انقراض، طولانی و سرعت تجدید زیستگاه آن‌ها کمتر از سرعت بهره‌برداری آنها از طبیعت است، موضوع حفاظت از آنها اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (Esmaeili *et al*., 2020). از طرفی شیرین‌بیان یک گیاه با ارزش اقتصادی برای ایران است و سهم بزرگی در صادرات گیاهان دارویی ایران معادل ۷۵۰۰ تن با ارزش مالی ۴۴ میلیون دلار در سال دارد (Deylami *et al*., 2008). همچنین، ایران با مساحتی بالغ بر ۱۶۴۸۱۹۵ کیلومتر مربع بین عرض‌های جغرافیایی ۲۴ و ۴۰ درجه شمالی و طول جغرافیایی ۴۴ و ۶۴ درجه شرقی، ۱۱ اقلیم از ۱۳ اقلیم شناخته شده جهان را پوشش می‌دهد. دارا بودن ۳۰۰ روز آفتابی در سال و اختلاف دمایی ۴۰–۵۰ درجه سلسیوس بین سردترین و گرمترین مناطق، شرایط بسیار مطلوبی را برای رشد و نمو گیاهان در کشور فراهم می‌کند (Kashfi-Bonab, 2010). به همین دلایل، کشت و اهلی‌کردن شیرین‌بیان، نه تنها به عنوان یک روش موقتی برای مواجهه با تقاضا برای حجم زیادی از گیاهان و محصولات جانبی آن، بلکه به عنوان راه حلی برای کاهش تأثیر برداشت بر جمعیت‌های وحشی، پتانسیل فوق العاده‌ای دارد (اقلیما و همکاران، ۱۴۰۰). کشت، راه حل‌هایی را برای مشکلات مربوط به جمع‌آوری گیاهان دارویی وحشی مانند شناسایی نامناسب گونه‌ها، تنوع زیاد، ناپایداری مواد موثره و اختلاط گیاه هدف با مواد سمی و آلاینده‌ها ارائه می‌دهد و نیز فرصتی برای بهینه سازی عملکرد و ارائه محصولی با کیفیت بالا و سازگار فراهم می‌کند (Canter *et al*., 2005; Kala *et al*., 2006; Esmaeili *et al*., 2020). شیرین‌بیان گیاهی است علفی، چندساله و متعلق به تیره نخود که دارای ساقه‌هایی به طول[2] ۱۰۰–۱۷۰ سانتی‌متر، برگ‌های مرکب، گل‌های بنفش تا ارغوانی و میوه‌های گرد و قهوه‌ای به طول ۲–۳ سانتی‌متر می‌باشد (Esmaeili *et al*., 2019) و به دلیل وجود ترکیبات ثانوی دارویی فعال، دارای خواص آنتی اکسیدانی (Parvaiz *et al*., 2014)، ضد میکروبی (Vlaisavljević *et al*., 2018)، ضد تصلب شرائین (Esmaeili *et al*., 2019)، ضد ویروسی (Wang *et al*., 2015)، ضد التهاب و ضد انعقادی (Farag *et al*., 2015) است. این گیاه به طور گسترده در چین، فرانسه، آلمان، هند، ایتالیا، روسیه، انگلستان و ایالات متحده آمریکا کشت می شود (اقلیما و همکاران، ۱۳۹۸). تری ترپنوئید ساپونین‌ها (اسید گلیسیریزیک) و فلاونوئیدها (گلابریدن، لیکوریتین و لیکورتیجینین) مهمترین ترکیبات این گیاه هستند. شیرین بیان یکی از گیاهان گرانبهای اقتصادی در جهان است که کاربرد وسیعی در صنایع آرایشی و بهداشتی، دخانیات، داروسازی و غذایی دارد (Eghlima *et al*., 2021).

هدف از تحقیق حاضر، بررسی تنوع فیتوشیمیایی برخی جمعیت‌های وحشی شیرین‌بیان ایران در محیط کشت یکسان و شناسایی و انتخاب جمعیت‌های برتر از نظر خصوصیات فیتوشیمیایی به منظور اهلی‌سازی و کشت جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی بود.

پیشینه پژوهش

اولین مرحله از فرآیند اهلی‌سازی و کشت، بررسی جمعیت‌های طبیعی از جنبه‌های مختلف از جمله خصوصیات ژنتیکی، مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی است (Hadian *et al*., 2011). مقایسه جمعیت‌های مختلف شیرین بیان ازبکستان نشان داده است که محتوای گلیسریزیک اسید بین ۳/۳ تا ۶/۱ درصد و محتوای گلابریدین بین ۰/۰۸ تا ۰/۳۵ درصد وزن خشک متغیر

1. *Glycyrrhiza glabra* L.

2. Fabaceae

است. این جمعیت‌ها براساس فلاونوئیدهای برگ در دو گروه روتین و ایزوکوئرستین قرار گرفتند (Hayashi *et al*., 2003a). بررسی پروفایل متابولیت‌های ریشه شیرین‌بیان از منابع مختلف نیز دلالت بر این داشت که مقادیر گلیسریزیک اسید در نمونه های مختلف از ایتالیا، چین، ترکیه و ایران متفاوت و به ترتیب برابر ۵۱، ۵۳، ۳۳ و ۳۲ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک بود. همچنین، طیف وسیعی از فنل‌ها و فلاونوئیدهای مختلف در این نمونه‌ها شناسایی شد که مقادیر کمی و کیفی آنها تنوع بالایی را نشان داد (Montoro *et al*., 2011). وجود تنوع در نوع و مقادیر ترکیبات گلیسیریزیک اسید و فلاونوئیدها ازجمله گلابریدین در بین سایر گونه های شیرین بیان (*G. inflata*، *G. glabra*، *G. uralenis*) نیز گزارش شده است (Farag *et al*., 2015). مطالعه جمعیت‌های شیرین بیان مناطق مرکزی زاگرس در ایران نیز نشان از تنوع بالای ویژگی‌های مورفولوژیکی، محتوای گلیسیریزین (۰/۰۳ تا ۰/۲۳ درصد وزن خشک) و فلاونوئید (جداسازی و شناسایی هفت نوع فلانوئید با روش TLC) در این جمعیت ها دارد (Sharifi-Tehrani *et al*. 2012).

روش شناسی پژوهش

به منظور بررسی تنوع صفات فیتوشیمیایی جمعیت‌های مختلف شیرین بیان (جدول ۱) در شرایط اقلیمی تهران آزمایشی در طی سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۹ اجرا شد. ریزوم های شیرین بیان در فصل پاییز جمع‌آوری گردید و بلافاصله در اندازه هایی به قطر و طول به ترتیب ۲ و ۱۵ سانتی متر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۵ تکرار با فاصله بین ردیف ۶۰ و روی ردیف ۴۰ سانتی‌متر کشت شدند. محل اجرای آزمایش و کلکسیون جمعیت‌های شیرین‌بیان بومی ایران، کلکسیون گیاهان دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران با عرض جغرافیایی ۳۵ درجه ۴۸ دقیقه و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۲۳ دقیقه و ارتفاع ۱۷۷۳ متر از سطح دریا بود. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه تحقیقاتی در جدول ۲ آمده است. نمونه خاک از عمق۳۰ سانتی‌متری جمع‌آوری و بافت خاک با استفاده از روش هیدرومتر بویوکوس[1] تعیین شد (Gee & Bauder, 1979). میزان پی‌اچ و هدایت الکتریکی خاک با استفاده مولتی- میتر[2] (ساخت کشور کره‌جنوبی) اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین مقادیرکربن آلی از روش اصلاح شده واکلی و بلک[3] (Allison *et al*., 1965)، کلسیم کربنات از روش برنارد[4] (Khym, 1974) و محتوای فسفر، پتاس وکلسیم از روش اولسن[5] استفاده شد (Nelson & Sommers, 1982). مقدار نیتروژن نیز با استفاده از روش کجدال تعیین شد (Bremner & Mulvaney, 1982).

جدول ۱. ویژگی‌های جغرافیایی و رویشگاه جمعیت‌های مورد بررسی شیرین بیان

ردیف	استان	شهرستان	ارتفاع	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	کهگیلویه و بویراحمد	یاسوج	۱۸۷۰	۵۱° ۵۶′	۳۰° ۴۵′
۲	فارس	سپیدان	۲۲۴۰	۵۱° ۵۲′	۳۰° ۱۶′
۳	فارس	اقلید	۲۳۰۰	۵۲° ۴۸′	۳۰° ۴۶′
۴	فارس	کازرون	۸۶۰	۵۱° ۳۵′	۲۹° ۵۱′
۵	فارس	باجگاه	۹۲۰	۵۰° ۳۱′	۳۰° ۰۷′
۶	فارس	داراب	۱۱۷۰	۵۴° ۵۱′	۲۸° ۵۵′
۷	اصفهان	سمیرم	۲۴۶۰	۵۱° ۱۷′	۳۰° ۴۱′
۸	اصفهان	شهرضا	۱۸۲۵	۵۱° ۴۶′	۳۲° ۰۵′

1 Bouyoucos Hydrometer

2 CPD-65N multi-meter

3 Black and Walkley

4 Calcimeter Bernard

5 Olsen

۹	هرمزگان	حاجی‌آباد	۹۴۵	۵۵° ۵۴′	۲۸° ۱۸′
۱۰	کرمان	سیرجان	۱۷۶۶	۵۱° ۱۷′	۲۹° ۴۵′
۱۱	کرمان	بافت	۲۳۰۰	۵۶° ۲۰′	۲۹° ۲۳′
۱۲	کرمان	بردسیر	۲۰۴۷	۵۱° ۴۷′	۲۹° ۳۲′
۱۳	یزد	تفت	۱۶۰۰	۵۴° ۱۲′	۳۱° ۴۴′
۱۴	یزد	مروست	۱۵۴۴	۵۴° ۲۱۶′	۳۰° ۴۷′
۱۵	خراسان جنوبی	بجنورد	۱۰۷۰	۵۷° ۳۱′	۳۷° ۴۷′
۱۶	خراسان رضوی	کاشمر	۱۰۶۳	۵۸° ۴۸′	۳۵° ۲۳′
۱۷	آذربایجان‌شرقی	اهر	۱۳۴۱	۴۷° ۰۲′	۳۸° ۲۸′
۱۸	آذربایجان‌غربی	ربط	۱۴۸۰	۴۵° ۵۵′	۳۶° ۲۰′
۱۹	کوردستان	سقز	۱۴۷۶	۴۶° ۱۲′	۳۶° ۲۲′
۲۰	قزوین	تاکستان	۱۲۶۵	۴۹° ۴۴′	۳۶° ۰۴′
۲۱	ایلام	ایلام	۱۴۷۲	۵۶° ۲۴′	۳۳° ۳۸′
۲۲	کرمانشاه	کرمانشاه	۱۴۰۰	۴۷° ۰۵′	۳۴° ۲۰′

جدول ۲. ویژگی‌های فیزیک و شیمیایی خاک محل آزمایش

مواد آلی (درصد)	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس/متر)	اسیدیته	آهک کل (درصد)	رس (درصد)	سیلت (درصد)	شن (درصد)	نیتروژن (درصد)	فسفر کل (میلی‌گرم/کیلوگرم)	پتاسیم کل (میلی‌گرم/کیلوگرم)	منیزیم کل (میلی‌گرم/کیلوگرم)	کلسیم کل (میلی‌گرم/کیلوگرم)	بافت خاک
۱/۱۸	۰/۷۲	۸/۲۸	۷/۲	۳۳	۲۷	۴۰	۰/۰۹	۹/۶	۲۸۶	۱/۱	۲۱	لومی-رسی

استخراج عصاره

ریزوم های نمونه های گیاهی در اواخر فصل سال سوم کشت برداشت و در دمای ۲۵ درجه سلیوس خشک و سپس پودر شدند. به ۱ گرم نمونه پودر گیاهی ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد اضافه و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت و سپس سانتریفیوژ گردید و توسط فلیترهای ۰/۲ میکرومتری فیلتر شد (Eghlima *et al.*, 2020).

اندازه‌گیری میزان فنل کل

ابتد ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی با ۵ میلی‌لیتر فولین سیوکالتیو (۱ به ۱۰ رقیق شده با آب مقطر) مخلوط و سپس به آن ۴ میلی‌لیتر کربنات سدیم یک مولار اضافه شد. برای شاهد بجای عصاره ، از متانول استفاده شد. جذب محلول ها بعد از قرار گرفتن در ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار ۴۰ درجه‌سلسوس، در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد (Slinkard & Singleton, 1977). رسم منحنی کالیبراسیون با غلظت های متفاوت استاندارد گالیک اسید ($y= 0.01x+0.0075$ ،$R^2 =0.998$) انجام شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید کل

به این منظور ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد در اتانول (۱۰ گرم آلومنیوم کلرید در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول)، ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. برای تهیه شاهد به جای عصاره متانولی، تنها از متانول خالص استفاده شد. جذب مخلوط پس از قرارگرفتن به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در طول موج ۴۱۵ نانومتر قرائت شد (Chang *et al.*, 2002) جهت تعیین میزان فلاونوئید

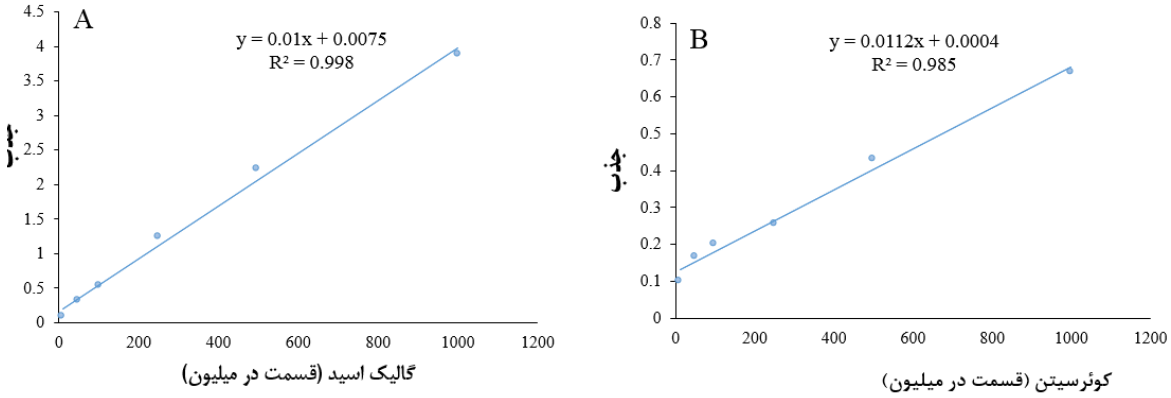
کل از منحنی استاندارد کوئرستین و معادله خط بدست آمده از منحنی استاندارد ($R^2 = 0.985$ ،$y= 0.0112 x+ 0.0004$) استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

از روش درصد مهار را دیکال های DPPH جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008). دو میلی‌لیتر ازDPPH (۰/۱ میلی مولار) با ۲ میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه شده مخلوط گردید و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در تاریکی بلافاصله جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتردر طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. از مخلوط ۲ میلی‌لیترDPPH و ۲ میلی لیتر متانول به عنوان شاهد و از متانول نیز به عنوان بلانک استفاده شد. فعالیت مهار رادیکالDPPH با استفاده از رابطه ۱محاسبه شد.

رابطه ۱) $DPPH= Ac-As/Ac\times100$

در این معادلهAC جذب رادیکال DPPH نمونه شاهد و AS جذب DPPH نمونه می باشد.



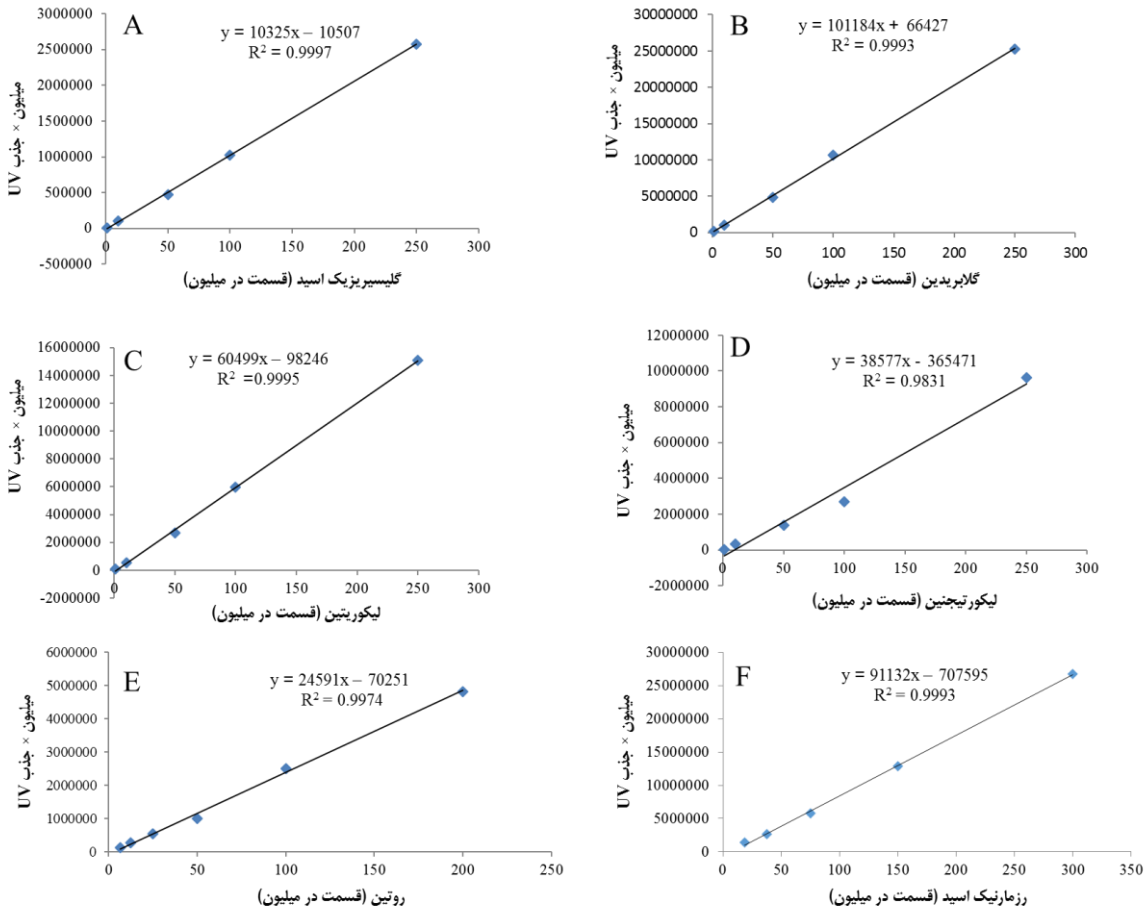
شکل ۱. منحنی کالیبراسیون استاندارد گالیک اسید (A) و کوئرسیتن (B) (منبع: یافته‌های تحقیق)

آنالیز کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا ساخت شرکت کنائور آلمان مجهز به دو پمپ (مدل[1]ولکرون- ک ۱۰۰۱[2]) و آشکارساز پی‌دی آ (مدل ک ۲۸۰۰[3]) برای جداسازی و اندازه‌گیری استفاده شد. ستون دستگاه نیز ساخت شرکت یوروسفر[4] و از نوع آرپی- س ۱۸ با قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و طول ۲۵۰ میلی‌متر بود[5]. از حلال‌های استونیتریل و آب مخصوص HPLC به عنوان فاز متحرک استفاده شد با سرعت جریان یک میلی‌متر در دقیقه استفاده شد. این برنامه شامل شویش ستون با ۹۵ درصد آب به‌مدت ۵ دقیقه و تغییر ترکیب درصد از ۹۵ درصد به ۵ درصد در مدت ۳۰ دقیقه طراحی گردید. نمونه‌ها در طول موج جذب و نشر ۲۷۶ نانومتر برای لکوریتین[6] و لکورتیجنین[7]، ۲۳۰ نانومتر برای گلابریدین و ۲۵۰ نانومتر برای گلیسیریزیک

1Knauer
2 Wellchron-K1001
3 PDA-K2800
4 Eurosphr
5 RP-C18
6 Liquiritin
7 Liquiritigenin

اسید ارزیابی شدند. استاندارد گلیسیریک اسید، لیکوریتین، لکورتیجنین وگلابریدین از شرکت فیتولب آلمان تهیه گردید. به منظور رسم منحنی‌های استاندارد، غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ پی‌پی‌ام استانداردها تهیه و به دستگاه تزریق گردید. از نرم‌افزار شرکت ازکورم[1] که بر روی سیستم عامل ویندوز نصب شده است، برای انتگرال‌گیری و محاسبه سطح زیر منحنی استفاده گردید. مساحت پیک غلظت‌های استاندارد حساب شده و منحنی استاندارد با نرم افزار اکسل رسم گردید و سپس معادله خط (y=bx+a) بدست آمد. شناسایی و سنجش مقدار ترکیبات فنلی از قبیل رزمانیک اسید و روتین در نمونه‌ها نیز، به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و با ستون (سونفایر–سی ۱۸ [2]) فاز معکوس (۱۵ سانتی‌متر × ۴/۶ میلی‌متر) استفاده شد. آب اسیدی شده با تی‌اف‌ای ۰/۰۲ درصد (حلال A) و متانول (حلال B) به عنوان فاز متحرک با زمان‌بندی گرادیانی و سرعت جریان ۰/۵ میلی‌متر بر دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. حجم تزریق هر نمونه برای آنالیز ۲۰ میکرولیتر بود و از نرم افزار میلنیوم ۳۲ برای داده‌های دستیابی استفادهٔ شد. نمونه‌ها در طول موج ۲۵۷ نانومتر برای روتین و ۳۲۹ نانومتر برای اسید رزمارینیک بررسی شدند. هر نمونه در سه نوبت تزریق شد. نواحی پیک در برابر غلظت برای رسم منحنی های کالیبراسیون استانداردها رسم شد. مقدار R^2 هر استاندارد بالاتر از ۰/۹۸۳ در محدوده خطی بود (Esmaeili *et al.*, 2019).



شکل ۲. منحنی کالیبراسیون استاندارد گلیسیزیک اسید (A)، گلابریدین (B)، لیکوریتین (C)، لیکوریتیجنین (D)، روتین (E) و رزمانیک اسید (F). (منبع: یافته‌های تحقیق)

1 EZchorm

2 Sunfire C18

3 TFA

4 Millennium 32

تجزیه و تحلیل داده‌ها

اطلاعات بدست آمده به وسیله نرم‌افزارهای آماری SAS (9.4) و SPSS (20.0) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن و در سطح احتمال یک درصد انجام شد. به منظور تعیین ارتباط بین صفات، همبستگی جزئی بین صفات محاسبه شد. به منظور گروه‌بندی جمعیت‌ها تجزیه خوشه‌ای به روش وارد[1] و معیار توان دو فاصله اقلیدسی بر روی صفات مورد مطالعه انجام شد و برای تعیین محل برش دندروگرام از تجزیه تابع تشخیص استفاده شد.

نتایج

تجزیه واریانس

تجزیه واریانس براساس داده‌های سال سوم حاصل از بررسی صفات فیتوشیمیایی در بین جمعیت‌های مختلف صورت گرفت (جدول ۳). نتایج حاصل نشان داد که در بین ۲۲ جمعیت از نظر کلیه صفات مورد مطالعه در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود داشت. مقادیر F مربوط به تکرار درون جمعیت‌ها برای گلیسیریزیک‌اسید، گلابریدین، لیکوریتین، لیکورتیجنین، روتین و رزمارنیک‌اسید در سطح یک درصد و فلاونوئید کل در سطح ۵ درصد معنی دار و برای بقیه صفات معنی‌دار نشد.

جدول ۳. تجزیه واریانس صفات فیتوشیمیایی در جمعیت‌های مختلف شیرین‌بیان

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		لیکورتیجنین	لیکوریتین	گلابریدین	گلیسیریزیک‌اسید
بلوک	۴	۲/۷۵۲**	۰/۴۱۶**	۰/۷۳۵**	۲۸۳/۴۴۹**
جمعیت	۲۱	۴۶/۶۰۱**	۸/۳۹۳**	۹۷/۶۹**	۷۷۲۰/۰۵۵**
خطای آزمایشی	۸۴	۰/۱۹۳	۰/۰۵۱	۰/۱۵۴	۲۲/۴۱۷
ضریب تغییرات (درصد)		۶/۵۷	۱۳/۲۷	۱۳/۸۷	۴/۸۹

ns، *، **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

ادامه جدول ۳. تجزیه واریانس صفات فیتوشیمیایی در جمعیت‌های مختلف شیرین‌بیان

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		رزمارنیک‌اسید	روتین	فعالیت آنتی‌اکسیدانی	فلاوئوئید کل	فنل کل
بلوک	۴	۰/۰۱۲۹**	۰/۰۷۸**	۳/۹۲۲ns	۴۲/۹۶۲*	۰/۰۹۳ns
جمعیت	۲۱	۰/۱۴۸**	۲/۹۰۳**	۱۵۰/۹۵۱**	۱۰۱/۱۸۳**	۹/۲۴۹**
خطای آزمایشی	۸۴	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۱	۰/۲۶۰	۱۷/۵۶	۰/۷۲۴
ضریب تغییرات (٪)		۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۱۲	۶/۳۷	۲۵/۷۳	۱۳/۸۵

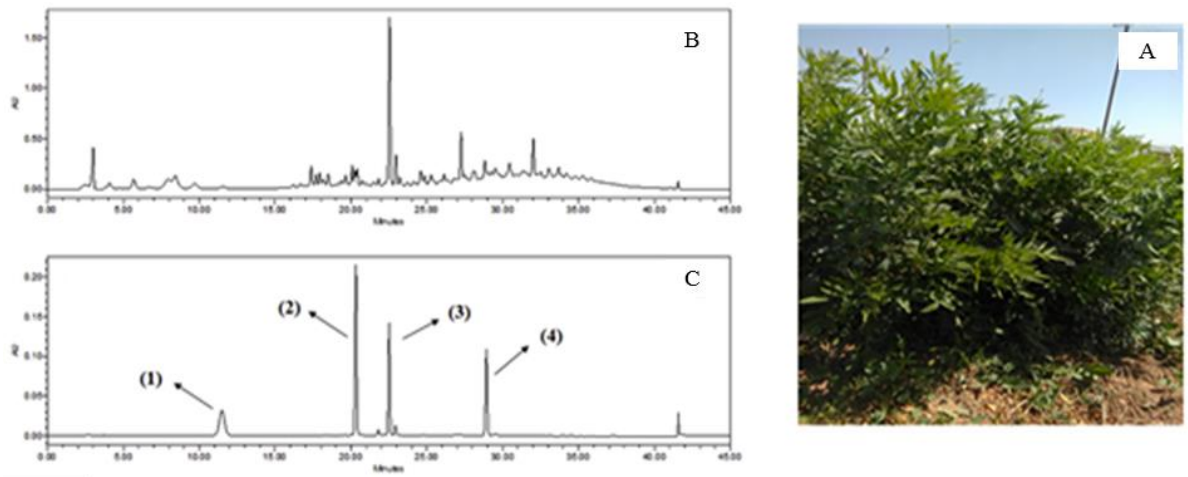
ns، *، **: به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

مقایسه میانگین صفات بین جمعیت‌ها

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تنوع قابل توجهی در بین جمعیت‌های کشت شده شیرین بیان از نظر ویژگی های فیتوشیمیایی وجود دارد (جدول ۴). میزان ضریب تغییرات برای صفات گلیسیریزیک‌اسید، گلابریدین، لیکوریتین و لیکورتیجنین به ترتیب ۴۰/۰۹، ۱۵۲/۰۰، ۷۵/۳۶ و ۴۵/۲۶ درصد بدست آمد. نتایج مقایسه میانگین صفات در جمعیت‌های مختلف نشان داد که بیشتر میزان گلیسیریزیک اسید مربوط به جمعیت کازرون با میانگین ۱۵۵/۱۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و کمترین

1Ward

مربوط به جمعیت بردسیر با میانگین ۱۵/۶۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود. مقایسه گلابریدین موجود در نمونه‌ها نشان داد که جمعیت ایلام با میانگین ۱۹/۴۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بیشترین و جمعیت‌های اقلید، بافت، باجگاه، مروست و سپیدان با مقادیر ناچیز، کمترین گلابریدین را داشتند. مقایسه میانگین لیکوریتین نشان داد که جمعیت یاسوج با میانگین ۵/۳۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بیشترین و جمعیت اقلید با میانگین ۰/۱۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک کمترین مقدار این صفت را به خود اختصاص دادند. از نظر میزان لیکوریتیجنین جمعیت یاسوج با میانگین ۱۲/۱۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک دارای بیشترین و جمعیت اقلید با میانگین ۰/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک دارای کمترین لیکورتیجنین بودند (جدول ۵).



شکل ۳. A) شیرین‌بیان. B) کروماتوگرام HPLC جمعیت سپیدان. C) کروماتوگرام HPLC استانداردهای لیکوریتیجنین (1)، لیکوریتین (2)، گلیسیریزیک اسید (3) و گلابریدین (4). (منبع: یافته‌های تحقیق)

جمعیت کاشمر با میانگین ۸/۳۶ میلی‌گرم گالیک اسید برگرم وزن خشک بیشترین و جمعیت سقز با میانگین ۳/۹۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک کمترین فنل کل را داشتند. بیشترین فلاونوئید کل در جمعیت بافت با میانگین ۲۷/۲۸ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم وزن خشک و کمترین میزان آن در جمعیت یاسوج با میانگین ۸/۸۶ میلی‌گرم کوئرسیتین بر گرم وزن خشک به‌دست آمد. بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی (کمترین IC_{50}) در جمعیت ربط و کمترین (بیشترین IC_{50}) آن در جمعیت تاکستان مشاهده شد. حداکثر (۵/۹۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و حداقل (۲/۸۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) میزان روتین به ترتیب در جمعیت‌های بردسیر و حاجی‌آباد بدست آمد. مقایسه رزمارنیک‌اسید در نمونه‌ها نشان داد که جمعیت کازرون با میانگین ۰/۶۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بیشترین و جمعیت‌های کرمانشاه و سیرجان با مقادیر ناچیز دارای کمترین مقدار زرمارنیک اسید بودند (جدول ۵).

جدول ۴. آماره توصیفی برای صفات فیتوشیمیایی جمعیت‌های مختلف شیرین‌بیان

ترکیب	ضریب تغییرات (درصد)	انحراف معیار	میانگین	حداقل	حداکثر
گلیسیریزیک اسید (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	۴۰/۰۹	۳۸/۷۴	۹۶/۶۴	۱۵/۶۴	۱۵۵/۱۷
گلابریدین (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	۱۵۲/۰۰	۴/۳۳	۲/۸۳	ناچیز	۱۹/۴۶
لیکوریتین (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	۷۵/۳۶	۱/۲۸	۱/۷۰	۰/۱۶	۵/۳۲
لیکورتیجنین (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	۴۵/۲۶	۳/۰۲	۶/۶۸	۰/۵۲	۱۲/۱۶
فنل کل (میلی‌گرم گالیک‌اسید/گرم وزن خشک)	۲۴/۸۰	۱/۵۲	۶/۱۴	۳/۹۷	۸/۳۶
فلاونوئید کل (میلی‌گرم کوئرستین/گرم وزن خشک)	۳۵/۹۶	۵/۸۵	۱۶/۲۸	۸/۸۶	۲۷/۲۸
فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میکروگرم/میلی‌لیتر)	۸/۷۴	۶/۹۸	۷۹/۹۵	۶۷/۳۴	۹۲/۵۰

روتین (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	۱۹/۹۵	۰/۷۴	۳/۷۴	۲/۷۴	۵/۹۳
رزمارنیک اسید (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	۳۴/۴۷	۰/۱۷	۰/۴۹۴	ناچیز	۰/۶۲۴

جدول ۵ . مقایسه میانگین صفات فیتوشیمیایی در بین جمعیت‌های مختلف شیرین‌بیان

جمعیت	رزمارنیک اسید (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	روتین (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میکروگرم/میلی‌لیتر)	فلاونوئید کل میلی‌گرم (کوئرسیتن/گرم وزن خشک)	فنل کل میلی‌گرم (گالیک‌اسید/گرم وزن خشک)	لیکوریتیجنین (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	لیکوریتین (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	گلابریدین (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)	گلیسیریزیک‌اسید (میلی‌گرم/گرم وزن خشک)
یاسوج	۰/۳۰۱^{j}	۴/۸۳^{e}	۷۴/۳۴^{gh}	۸/۸۶^{n}	۷/۴۱^{c}	۱۲/۱۶^{a}	۵/۳۲^{a}	۰/۸۲^{l}	۷۸/۴^{f}
سپیدان	۰/۲۹۱^{jk}	۲/۹۴^{kl}	۸۸/۵۳^{c}	۱۶/۲۸^{h}	۵/۳۴^{h}	۲/۴۳^{m}	۰/۴۳^{n}	ناچیز	۹۶/۴۳^{d}
اقلید	۰/۳۵۱^{h}	۵/۲۹^{d}	۷۵/۳۴^{gh}	۱۷/۴۳^{g}	۵/۲۹^{hi}	۰/۵۲^{p}	۰/۱۶^{o}	ناچیز	۴۱/۶۹^{i}
کازرون	۰/۶۳۴^{a}	۳/۸۹^{i}	۷۶/۴۵^{gh}	۱۸/۲۹^{f}	۱۲/۶۲^{g}	۴/۳۴^{h}	۰/۷۳^{l}	۰/۱۳^{m}	۱۵۵/۱۷^{a}
باجگاه	۰/۵۲۴^{c}	۳/۲۵^{j}	۸۵/۳۴^{de}	۱۵/۳۴^{i}	۶/۸۳^{e}	۳/۲۱^{l}	۰/۸۱^{kl}	ناچیز	۴۸/۶۴^{i}
داراب	۰/۳۹۲^{g}	۳/۱۳^{jk}	۸۶/۶۳^{d}	۱۳/۸۲^{k}	۴/۵۶^{kl}	۶/۴۴^{e}	۱/۷۳^{g}	۱/۰۲^{l}	۶۵/۸۶^{h}
سمیرم	۰/۱۸۷^{m}	۲/۸۵^{l}	۹۳/۲۳^{e}	۱۲/۳۹^{l}	۴/۹۱^{j}	۲/۳۲^{m}	۱/۳۲^{i}	۱/۸۴^{j}	۷۵/۶^{f}
شهرضا	۰/۲۹۳^{jk}	۳/۵۴^{ij}	۸۰/۵۱^{f}	۱۵/۲۴^{i}	۵/۲۲^{hi}	۵/۴۲^{f}	۰/۴۲^{n}	۵/۰۳^{f}	۹۰/۰۴^{de}
حاجی‌آباد	۰/۳۱۴^{i}	۲/۷۴^{m}	۷۹/۵۲^{f}	۱۴/۱۳^{j}	۴/۰۳^{m}	۲/۶۴^{l}	۱/۸۳^{f}	۷/۵۴^{e}	۴۹/۵۱^{i}
سیرجان	ناچیز	۴/۶۵^{fg}	۷۸/۳۱^{fg}	۱۵/۷۱^{i}	۵/۱۷^{i}	۲/۴۱^{m}	۳/۸۱^{c}	۱/۷۳^{jk}	۷۰/۷۳^{g}
بافت	۰/۲۸۳^{k}	۴/۷۵^{f}	۷۰/۰۳^{i}	۲۷/۲۸^{a}	۷/۷۳^{bc}	۱/۵۳^{o}	۰/۸۱^{kl}	ناچیز	۶۴/۹۱^{h}
بردسیر	۰/۴۸۲^{e}	۵/۹۳^{a}	۶۹/۳۱^{m}	۱۴/۳۲^{j}	۴/۳۲^{l}	۲/۵۳^{km}	۱/۸۲^{f}	۳/۵۴^{g}	۱۵/۶۴^{k}
تفت	۰/۵۰۹^{d}	۴/۲۳^{h}	۷۳/۵۲^{gh}	۱۹/۳۱^{e}	۶/۳۴^{fg}	۷/۸۴^{d}	۴/۲۶^{b}	۱/۴۳^{k}	۶۳/۹۳^{h}
مروست	۰/۴۳۸^{f}	۲/۸۳^{l}	۹۰/۳۱^{b}	۱۲/۴۷^{l}	۴/۶۳^{k}	۳/۸۲^{i}	۲/۴۳^{d}	ناچیز	۱۰۸/۴^{c}
بجنورد	۰/۳۹۱^{g}	۲/۹۸^{kl}	۸۶/۹۲^{d}	۲۳/۴۲^{b}	۴/۳۲^{hi}	۴/۸۱^{g}	۱/۶۳^{h}	۱۱/۵۴^{c}	۷۵/۷۵^{f}
کاشمر	۰/۲۶۵^{l}	۳/۰۵^{k}	۱۳/۸۴^{e}	۲۱/۱۴^{c}	۸/۳۶^{a}	۳/۷۶^{i}	۰/۹۳^{k}	۱۴/۸۲^{b}	۸۵/۷۸^{e}
اهر	۰/۳۲۳^{i}	۳/۲۱^{j}	۷۷/۵۴^{g}	۱۹/۴۶^{e}	۷/۳۳^{cd}	۱/۸۹^{n}	۱/۰۵^{j}	۳/۲۳^{gh}	۳۰/۶۸^{j}
ربط	۰/۵۹۱^{b}	۵/۷۴^{b}	۶۷/۳۴^{n}	۱۸/۹۱^{f}	۷/۹۳^{b}	۳/۶۵^{ij}	۱/۰۸^{j}	۰/۹۸^{l}	۶۴/۸۲^{h}
سقز	۰/۴۳۲^{f}	۴/۴۲^{g}	۷۳/۲۱^{h}	۱۱/۳۲^{m}	۳/۹۷^{n}	۹/۳۴^{b}	۰/۶۵^{m}	۹/۵۳^{d}	۶۴/۷۱^{h}
تاکسان	۰/۵۳۴^{c}	۲/۸۶^{l}	۹۲/۵۰^{a}	۱۶/۲۹^{h}	۶/۵۲^{f}	۳/۵۹^{j}	۲/۳۱^{e}	۲/۷۱^{i}	۹۴/۸۵^{d}
ایلام	۰/۱۷۱^{n}	۵/۴۳^{c}	۷۳/۲۳^{h}	۲۱/۴۳^{c}	۶/۸۳^{e}	۸/۳۳^{c}	۱/۰۳^{j}	۱۹/۴۶^{a}	۱۰۵/۸۶^{c}
کرمانشاه	ناچیز	۵/۳۵^{cd}	۷۵/۳۴^{gh}	۲۰/۸۵^{d}	۷/۰۸^{d}	۵/۰۱^{g}	۱/۸۳^{f}	۳/۰۵^{h}	۱۱۴/۶۳^{b}

میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون، براساس آزمون دانکن فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشند.

ضرایب همبستگی جزئی

بررسی ضرایب همبستگی جزئی نشان داد که گلیسیریزیک‌اسید با لیکوریتیجنین دارای همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح پنج درصد بود و گلابریدین با لیکوریتین دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح پنج درصد و با روتین دارای همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد. درحالی‌که، رزماینیک اسید و فنل کل هردو با IC_{50} رابطه منفی و معنی‌داری در سطح پنج درصد وجود داشت.

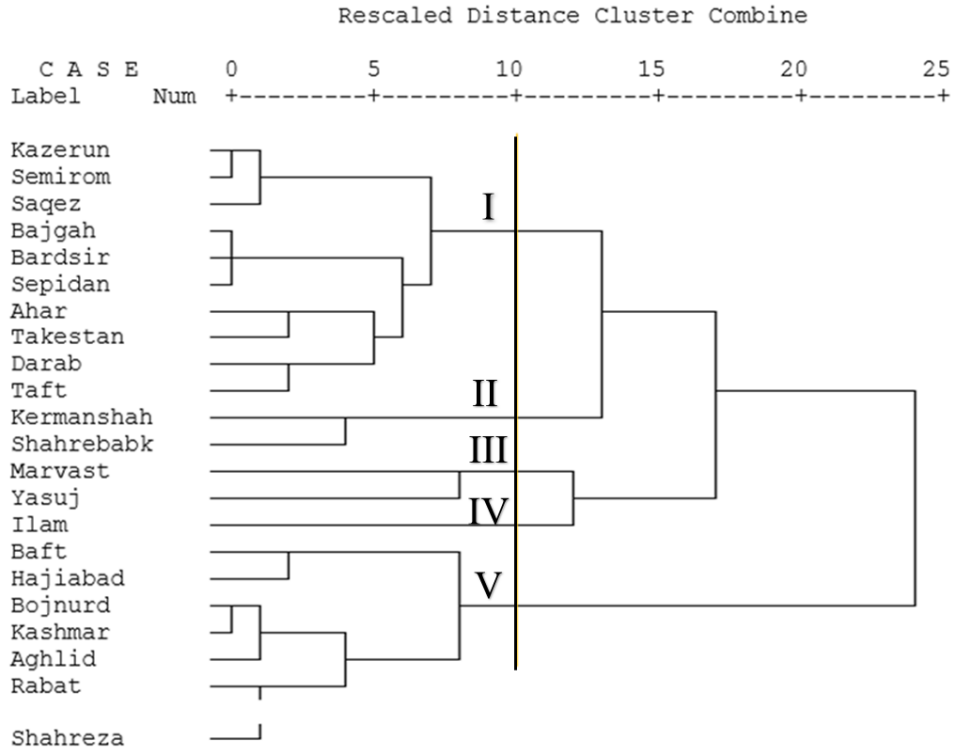
جدول ۶. ضرایب همبستگی جزئی بین صفات مورد مطالعه در جمعیت‌های مختلف شیرین‌بیان

صفات	رزمانیک اسید	روتین	فعالیت آنتی‌اکسیدانی	فلاونوئید کل	فنل کل	لیکوریتیجنین	لیکوریتین	گلابریدین
روتین	-۰/۱۵۴							
فعالیت آنتی‌اکسیدانی	-۰/۱۴۴*	-۰/۳۲۳						
فلاونوئید کل	۰/۰۷۰	-۰/۰۴۴	-۰/۱۷۹					
فنل کل	-۰/۱۹۳*	۰/۰۰۹	-۰/۰۷۰	۰/۴۸۹				
لیکوریتیجنین	۰/۳۱۵	۰/۰۰۷	-۰/۲۳۶	-۰/۵۰۴	۰/۱۵۴			
لیکوریتین	-۰/۳۲۴	۰/۰۵۶	۰/۱۵۲	۰/۰۲۰	۰/۰۸۴	۰/۷۶۴*		
گلابریدین	-۰/۳۸۱	-۰/۵۶۱*	۰/۰۹۱	۰/۴۵۸	-۰/۱۸۱	۰/۵۳۲	۰/۷۳۵*	
گلیسیریزیک‌اسید	-۰/۱۷۳	۰/۱۷۰	۰/۳۶۳	۰/۲۷۶	۰/۰۸۸	۰/۴۷۳*	-۰/۲۷۱	-۰/۲۴۷

*: معنی داری در سطح پنج درصد.

تجزیه خوشه‌ای

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ، براساس کل صفات مورد مطالعه، جمعیت های مورد بررسی را به ۵ گروه مجزا تفکیک کرد (شکل ۴). گروه‌های حاصل به ترتیب دارای ده، دو، دو، یک و هفت جمعیت بودند. نتایج مقایسه صفات در داخل خوشه‌ها دلالت بر این داشت که بیشترین فاصله میانگین مقادیر گلیسیریزیک‌اسید، گلابریدین، لیکوریتیجنین، فنل کل، فلاونوئید کل و روتین بین خوشه‌های چهار و دو و بیشترین فاصله برای میانگین مقادیر لیکوریتین و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، بین خوشه سه و دو بود. از نظر صفت رزمانیک‌اسید بیشترین اختلاف بین دو خوشه یک و دو مشاهده شد (جدول ۷).



شکل ۴. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای صفات فیتوشیمیایی جمعیت‌های مختلف شیرین‌بیان براساس روش وارد. (منبع: یافته‌های تحقیق)

جدول ۷. مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه در گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های شیرین‌بیان

خوشه	تعداد جمعیت	رزمارنیک اسید (میلی‌گرم/گر م وزن خشک)	روتین (میلی‌گرم/گر م وزن خشک)	فعالیت (آنتی‌اکسیدان ی میکروگرم بر میلی‌لیتر)	فلاونوئید کل (میلی‌گرم کوئرستین/گر م وزن خشک)	فنل کل (میلی‌گرم گالیک‌اسید/گر م وزن خشک)	لیکورتیجنین (میلی‌گرم/گر م وزن خشک)	لکورتین (میلی‌گرم/گر م وزن خشک)	گلابریدین (میلی‌گرم/گر م وزن خشک)	گلیسیریزیک اسید (میلی‌گرم/گر م وزن خشک)
I	۱۰	۰/۴۲^{a}	۳/۶۷^{c}	۸۰/۶۲^{ab}	۱۵/۶۸^{b}	۵/۶۲^{c}	۴/۳۹^{c}	۱/۵۱^{b}	۲/۳۴^{c}	۷۱/۱۵^{c}
II	۲	ناچیز	۲/۶۶^{d}	۳۷/۶۸^{d}	۱۰/۴۲^{c}	۳/۵۴^{d}	۲/۵۰^{e}	۰/۹۱^{d}	۱/۵۲^{d}	۵۷/۳۱^{d}
III	۲	۰/۳۶^{b}	۳/۸۳^{bc}	۸۲/۳۲^{a}	۱۰/۶۶^{c}	۶/۰۲^{b}	۷/۹۹^{b}	۳/۸۷^{a}	۰/۴۱^{e}	۹۳/۴^{b}
IV	۱	۰/۱۷^{c}	۵/۴۳^{a}	۷۳/۲۳^{c}	۲۱/۴۳^{a}	۸۳/۶^{a}	۸/۳۲^{a}	۱/۰۳^{c}	۱۹/۴۶^{a}	۱۰۵/۸۶^{a}
V	۶	۰/۳۵^{b}	۴/۰۱^{b}	۷۷/۶۸^{b}	۱۹/۶۵^{a}	۶/۱۲^{b}	۳/۱۹^{d}	۰/۹۸^{cd}	۵/۷۰^{b}	۶۷/۵^{cd}

میانگین‌های دارای حرف مشترک در هر ستون، براساس آزمون دانکن فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشند.

تجزیه به عامل‌ها

طبق آزمون تجزیه به عامل ها در ۸ صفت فیتوشیمیایی (جدول ۹) عامل‌های اول تا چهارم به ترتیب ۲۴/۲۶ درصد، ۱۷/۱۰ درصد، ۱۵/۴۹درصد و ۱۲/۳۴ درصد از واریانس کل را توجیه نمودند. در عامل اول صفات گلیسیریزیک اسید (۰/۹۱)، لیکوریتیجنین (۰/۸۹) و در عامل دوم گلابریدین (۰/۸۲)، لکوریتین (۰/۸۲) و فنل کل (۰/۷۵-) بیشترین تاثیر را داشتند. در عامل سوم صفات روتین (۰/۸۹)، فلاونوئید کل (۰/۶۱-) و در عامل چهارم صفات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۰/۷۰) و رزمارینیک اسید (۰/۶۴) بیشترین ضرایب را دارا بودند (جدول ۷). بطور کلی تجزیه به عامل‌ها توانست صفات مورد ارزیابی را به صورت چهار عامل اصلی بیان کند. این تجزیه می‌تواند عوامل فرق‌گذار اصلی بین جمعیت‌های مورد بررسی را روشن سازد.

جدول ۸. آزمون تجزیه به عامل صفات فیتوشیمیایی در جمعیت‌های مختلف شیرین‌بیان

صفات	عامل			
	۱	۲	۳	۴
گلیسیریزیک اسید	۰/۹۱	۰/۱۷	-۰/۱۹	-۰/۰۸
گلابریدین	-۰/۱۱	۰/۸۲	-۰/۰۱	۰/۲۲
لیکوریتین	۰/۲۱	۰/۸۲	-۰/۰۱	۰/۳۲
لیکوریتجنین	۰/۸۹	-۰/۰۷	۰/۳۰	۰/۰۹
فنل کل	-۰/۱۲	-۰/۷۵	-۰/۰۲	۰/۰۳۶
فلاونوئید کل	-۰/۱۸	-۰/۱۶	-۰/۶۱	۰/۰۳
فعالیت آنتی‌اکسیدانی	۰/۲۰	۰/۰۹	۰/۰۴	۰/۷۰
روتین	-۰/۱۳	-۰/۰۴	۰/۸۹	-۰/۰۹
رزمارنیک اسید	-۰/۲۱	۰/۰۱	-۰/۲۰	۰/۶۴
مقادیر ویژه	۲/۱۸	۱/۵۴	۱/۳۹	۱/۱۱
درصد واریانس	۲۴/۲۶	۱۷/۱۰	۱۵/۴۹	۱۲/۳۴
درصد واریانس تجمعی	۲۴/۲۶	۴۱/۳۷	۵۶/۸۷	۶۹/۲۱

(منبع: یافته‌های تحقیق)

بحث

یکی از مهمترین اهداف اصلاح گیاهان دارویی بهبود و توسعه کموتایپ‌های برتر گیاه است، بنابراین شناسایی کموتایپ‌های برتر امری ضروری به نظر می‌رسد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تنوع قابل توجهی در بین جمعیت‌های کشت شده شیرین بیان از نظر ویژگی‌های فیتوشیمیایی وجود دارد. بیشترین میزان ضریب تغییرات در صفات گلابریدین، لیکوریتین، گلیسیریزیک‌اسید و لیکورتیجنین مشاهده شد. صفاتی که دارای ضریب تغییرات بالایی هستند محدوده وسیع‌تری از کمیت صفت را دارا هستند که دامنه انتخاب وسیع‌تری برای آن صفت محسوب می‌شود (Heydari *et al.*, 2019).

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشتر میزان گلیسیریزیک اسید مربوط به جمعیت کازرون و کمترین مربوط به جمعیت بردسیر بود. میزان گلیسیریزیک اسید در این مطالعه بیشتر از میزان گزارش شده در ایتالیا (۱/۶-۳ درصد)، اسپانیا (۰/۷- ۴/۴ درصد) و ازبکستان (۴/۷۶ – ۶/۱۳ درصد) بود (Hayashi *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 2003b). در بررسی حاضر جمعیت ایلام بیشترین و جمعیت‌های اقلید، بافت، باجگاه، مروست و سپیدان با مقدار ناچیز کمترین گلابریدین را داشتند. تغییرات محتوای گلابریدین به‌طور قابل‌توجهی تحت تاثیر ژنوتیپ، شرایط آب و هوایی، زمان برداشت، مراحل فرآوری و ... می‌باشد (Hosseini *et al.*, 2014). همچنین، گزارش شده است که میزان گلابریدین موجود در ریشه شیرین‌بیان تحت تاثیر محیط رشد قرار می‌گیرد (Kovalenco *et al.*, 2004). در یک بررسی (Hosseini *et al.*, 2014) محتوای گلابریدین در

جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه از ۱/۳۸ تا ۳/۴۰ درصد متغیر بود. همچنین، جمعیت یاسوج بیشترین میزان لیکوریتین و لیکوریتیجنین را دارا بود (Hosseini *et al*., 2014). مقدار لیکوریتین نیز دریک بررسی ۱/۹۰-۸/۱۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (Guannan et al., 2016) و در مطالعه دیگری، ۰/۱۱ تا ۰/۶۵ درصد (Mareshige *et al*., 2011) گزارش شده است. میزان فنل کل در بین جمعیت‌ها از ۳/۹۷ تا ۸/۳۶ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک متغیر بود که بیشترین و کمترین آن به ترتیب در جیت‌های کاشمر و سقز مشاهده شد. بیشترین فلاونوئید کل در جمعیت بافت و کمترین میزان آن در جمعیت یاسوج مشاهده شد. در مطالعه تنوع فیتوشیمیایی جمعیت های شیرین بیان در صربستان بیشترین میزان فنل کل (۳۷/۲۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک) و فلاونوئید کل (۵/۹ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) در جمعیت فروسکاگوار گزارش شد (Sanja et al., 2018). Husain *et al*. (2015)، میزان فنل کل در عصاره ریشه شیرین‌بیان را معادل ۷/۴۷ میلی‌گرم در گرم گزارش کردند. بسیاری از محققان نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره شیرین بیان را بررسی و عصاره آن را به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی پیشنهاد کردند (Saraf *et al*., 2013; Siracusa *et al*., 2011; Sultana *et al*., 2010; Sanja *et al*., 2018).

براساس نتایج ضرایب همبستگی جزئی ، گلیسیریزیک‌اسید با لیکوریتیجنین، و گلابریدین با لیکوریتین دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار بود. علاوه‌بر این گلابریدین همبستگی منفی و معنی‌داری با IC_{50} داشت. بسیاری از تحقیقات فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به گلابریدین ارتباط داده‌اند (Carmeli & Fogelman, 2009; Simmler *et al*., 2013; Esmaeili *et al*., 2019). همچنین بین رزماینیک اسید و فنل کل با IC_{50} رابطه منفی و معنی‌داری وجود داشت. مطالعات نشان داده است که ترکیبات فنلی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی برجسته‌ای دارند. همچنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی رزمارینیک اسید در مطالعات قبلی گزارش شده است (Erkan *et al*., 2008; Esmaeili *et al*., 2019).

روش تجزیه خوشه‌ای، با توجه به استفاده از تمام تنوع موجود بین جمعیت‌ها و صفات در طبقه‌بندی جمعیت‌ها می‌تواند بهترین روش آماری جهت گروه‌بندی جمعیت‌ها باشد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، جمعیت‌ها را به ۵ گروه مجزا تفکیک کرد. عدم شناخت کافی از ارقام جدید در برنامه اصلاحی و استفاده از والدین مشابه در دورگ‌گیری، منجر به کاهش تنوع ژنتیکی می‌شود، از طرفی دیگر دورگ‌گیری بین والدین با تفاوت بیشتر، افزایش تنوع ژنتیکی و انتقال صفات نادر را به دنبال خواهد داشت. نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که تنوع فیتوشیمیایی و گروه‌بندی جمعیت‌های مورد مطالعه شیرین‌بیان با پراکنش جغرافیایی جمعیت‌ها در ارتباط نبود و پراکنش افراد در خوشه از الگوی خاص جغرافیایی پیروی نمی‌کند. از آنجاکه در این پژوهش جمعیت‌های مختلف شیرین‌بیان در یک محیط یکسان کشت شدند و میزان اثرات محیطی بر تمامی آن‌ها یکسان بوده تفاوت مشاهده شده بین آن‌ها ناشی از ژنتیک جمعیت‌ها می باشد (Eghlima *et al*., 2020). عدم تطباق منشاء جغرافیایی با صفات فیتوشیمیایی در مرزنجوش (Azizi *et al*., 2012) و آویشن کرمانی (Bigdeloo *et al*., 2013) نیز گزارش شده است. در مطالعه‌ای دیگر تجزیه خوشه‌ای براساس ترکیبات شیمیایی بادرشبو، جمعیت‌های مختلف گیاه مورد مطالعه را در دو گروه مختلف قرار داد که بیانگر وجود تنوع شیمیایی در این گیاه بود (Borghei & Azizi, 2019).

نتیجه‌گیری کلی

آگاهی از ویژگی‌های مختلف فیتوشیمیایی، به‌نژادگران را در اصلاح و اهلی‌سازی گیاهان یاری می‌کند. این مطالعه تحقیقی کاربردی برای ایجاد امکان گزینش به منظور انتخاب جمعیت‌های مطلوب شیرین‌بیان بود. نتایج این تحقیق نشان داد که سطوح بالایی از تنوع بین جمعیت‌های شیرین‌بیان از نظر ویژگی‌های فیتوشیمیایی از جمله گلیسیریزیک اسید، گلابریدین، لیکوریتین و لیکوریتیجنین وجود دارد. در مجموع این مطالعه نشان داد که جمعیت‌های مختلف شیرین‌بیان از قابلیت و تنوع فیتوشیمیایی بالایی برخودارند، به طوریکه جمعیت‌های کازرون، ایلام و یاسوج به ترتیب از نظر محتوای گلیسیریزیک‌اسید،

گلابریدین و لیکوریتین و لیکوریتیجنین برتر بودند و می‌توان بسته به نیاز صنعت از این جمعیت‌های برتر جهت برنامه‌های اصلاحی، اهلی‌سازی و معرفی به سیستم کشت شیرین‌بیان استفاده کرد.

منابع

اقلیما، قاسم؛ ثانی‌خانی، محسن؛ خیری، عزیزالله؛ هادیان، جواد و اعلائی، میترا (۱۳۹۸). بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جمعیت‌های شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) ایران با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی. *پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۲۶ (۴)، ۲۲۶-۲۰۹.

اقلیما، قاسم؛ خیری، عزیزالله؛ ثانی‌خانی، محسن؛ هادیان، جواد و اعلائی، میترا (۱۴۰۰). بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شیرین‌بیان با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR. *پژوهش‌های ژنتیک گیاهی*، ۸ (۱)، ۸۱-۹۴.

بیگدلو، مهدی؛ ناظری، وحیده و هادیان، جواد (۱۳۹۱). بررسی اثر برخی عوامل محیطی بر خصوصیات ریخت‌شناسی و میزان اسانس آویشن کرمانی (*Thymus caramanicus* Jalas). *تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران*، ۲۸ (۴)، ۷۶۶-۷۵۶.

REFERENCES

Allison, L. E., Bollen, W. B., & Moodie, C. D. (1965). Total carbon. In A. G. Norman (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*, 9 (pp. 1346–1366). American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison.

Azizi, A., Hadian, J., Gholami, M., Friedt, W., & Honermeier, B. (2012). Correlations between genetic, morphological, and chemical diversities in a germplasm collection of the medicinal plant *Origanum vulgare* L. *Chemistry and Biodiversity*, 9, 2784-2801.

Bigdeloo, M., Nazeri, V., & Hadian, J. (2013). Study on effect of some environmental factors on morphological traits and essential oil productivity of *Thymus caramanicus* Jalas. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plant*, 28(4), 756-766. (In Persian).

Borghei, S. F., & Azizi, A. (2019). Assessing diversity of landraces of *Dracocephalum moldavica* from northwest of Iran using agro-morphological and phytochemical trait. *Plant Production Technology*, 10(2), 1-16.

Bremner, J. M., & Mulvaney, C. (1982). Nitrogen-total. In A. L. Page, R. H. Miller & D. R. Keeny (Eds.) *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*, 9 (pp. 1119-1123). American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison.

Canter, P. H., Thomas, H., & Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends Biotechnology*, 23, 180–185.

Carmeli, E., & Fogelman, Y. (2009). Antioxidant effect of polyphenolic glabridin on LDL oxidation. *Toxicol Industrial Health*, 25, 321-324.

Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-82.

Deylami, E., Mohammadi, H., & Borjian, A. (2008). Investigating trends and factors affecting the export of medicinal plants licorice and cumin. *Crop Ecology*, 4, 31–42.

Ebrahimzadeh, M. A., Hosseinimehr, S. J., & Hamidinia, A. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of Feijoa sallowiana fruits peel and leaves. *Pharmacology Online*, 1, 7-14.

Eghlima, G., Kheiry, A., Sanikhani, M., Hadian, J. & Aelaie, M. (2021) Study of genetic diversity of *Glycyrrizha glabra* L. populations using ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, 8(1), 81-94. (In Persian).

Eghlima, G., Sanikhani, M., Kheiry, A., Hadian, J., & Aelaei, M. (2020). A survey of genetic diversity of Glycyrrhiza glabra L. some populations using morphological and phytochemical characteristics. *Journal of Plant Production*, 26(4), 209-226. (In Persian).

Erkan, N., Ayranci, G., & Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid

and sesamol. *Food Chemistry*, 110, 76-82.
Esmaeili, H., Karami, A., Hadian, J., Nejad Ebrahimi, S., & Lars-Gernot, O. (2020). Genetic structure and variation in Iranian licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) populations based on morphological, phytochemical and simple sequence repeats markers. *Industrial Crops and Product*, 145, 112-140.
Esmaeili, H., Karami, A., Hadian, J., Saharkhiz, M. J., & Ebrahimi, S. N. (2019). Variation in the phytochemical contents and antioxidant activity of *Glycyrrhiza glabra* populations collected in Iran. *Industrial Crops Product*, 137, 248–259.
Farag, M. A., Porzel, A., & Wessjohann, L.A. (2015). Unequivocal glycyrrhizin isomer determination and comparative in vitro bioactivities of root extracts in four *Glycyrrhiza* species. *Advanced Research*, 6, 99–104.
Gee, G., & Bauder, J. (1979). Particle size analysis by hydrometer: a simplified method for routine textural analysis and a sensitivity test of measurement parameters. *Soil Science Society of America Journal*, 43, 1004-1007.
Guannan, L., Dejan, N., & Breemen, R.B. (2016). Identification and chemical standardization of licorice raw materials and dietary supplements using UHPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8062−8070.
Hadian, J., Mirjalili, M. H., & Ganjpoor, N. (2011). Morphological and phytochemical characterization of natural population of *Satureja khuzestanica*. *Chemistry Biodiversity*, 8, 1-15.
Hayashi, H., Hattori, S., Inoue, K., Khodzhimatov, O., Ashurmetov, O., Ito, M., & Honda, G. (2003a). Field survey of *Glycyrrhiza* plants in Central Asia (3). Chemical characterization of *G. glabra* collected in Uzbekistan. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51, 1338-1340.
Hayashi, H., Huang, P., & Inoue, K. (2003b). Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. *Plant Cell Physiology*, 44, 404–411.
Hayashi, H., Shibano, M., Kusano, G., Yamamoto, H., & Ikeshiro, Y. (1998). A field survey of *Glycyrrhiza glabra* L. in Sicily and Spain. *Nature Medicine*, 52, 259–264.
Heydari, A., Hadian, J., Esmaeili, H., Kanani, M. R., Mirjalili, M. H., & Sarkhosh, A. (2019). Introduction of *Thymus daenensis* into cultivation: Analysis of agro-morphological, phytochemical and genetic diversity of cultivated clones. *Industrial Crops and Products*, 131, 14-24.
Hosseini, S. M. A., Souri, M. K., Farhadi, N., Moghadam, M., & Omidbeigi, R. (2014). Changes in glycyrrhizin content of Iranian licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) affected by different root diameter and ecological conditions. *Agricultural Communication*, 2, 27-33.
Husain, A., Ahmad, A., Mujeeb, M., Khan, S.A., Alghamdi, A. G., & Anwar, F. (2015). Quantitative analysis of total phenolic, flavonoid contents and HPTLC fingerprinting for standardization of *Glycyrrhiza glabra* Linn. Roots. *Journal of Herbal Medicine*, 1, 1-9.
Kala, C. P., Dhyani, P. P., & Sajwan, B. S. (2006). Developing the medicinal plants sector in northern India: challenges and opportunities. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2, 32-43.
Kashfi-Bonab, A. (2010). The relative economic advantage of cultivating and trading medicinal plants in Iran and its value in global markets. *Global Business Review*, 44, 67–78.
Khym, J. X. (1974). *Analytical Ion-Exchange Procedures in Chemistry and Biology: Theory, Equipment, Techniques*. N. J. Prentice-Hall Englewood Cliffs.
Kovalenko, P. G., Antonjuk, V. P., & Maliuta, S. S. (2004). Secondary metabolites synthesis in transformed cells of *Glycyrrhiza glabra* L. and *Potentilla alba* L. as producents of radioprotective compounds. *Ukrainica Bioorganica Acta*, 1, 13-22.
Mareshige, K., Shigeki, H., Toshiro, S., Yutaka, Y., & Haruo, S. (2011). Variation of glycyrrhizin and liquiritin contents within a population of 5-year-old licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) plants cultivated under the same conditions. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34, 1334-1337.
Montoro, P., Maldini, M., Russo, M., Postorine, S., Piacente, S., & Pizza, C. (2011). Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by

ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54, 535-544.

Nelson, D. W., & Sommers, L. E. (1982). Total carbon, organic carbon, and organic matter. In L. A. Page (Ed), *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Properties*, (pp. 539-579). American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison.

Parvaiz, M., Hussain, K., Khalid, S., Hussnain, N., & Iram, N. (2014). A review: Medicinal importance of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae family). *Global Journal of Pharmacology*, 8, 8-13.

Sanja, V., Filip, S., Izabella, S., Istvan, Z., Imre, O., & Suzana, J. S. (2018). Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality. *Industrial Crops & Products*. 112, 217–224.

Saraf, B. D., Inam, F., & Deo, S. S. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of methanol extract roots of *Glycyrrhiza glabra* and HPLC analysis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 157-160.

Sharifi-Tehrani, M., Kazemi, A., & Shabani, L. (2012). Phenetic relationships among natural population accessions of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae) in central Zagros region of Iran, based on quantitative morphology, flavonoids and glycyrrhizin contents data. *Taxonomy and Biosystematics*, 4, 59-72.

Simmler, C., Pauli, G. F., & Chen, S. N. (2013). Phytochemistry and biological properties of glabridin. *Fitoterapia*, 90, 160-184.

Siracusa, L., Saija, A., Cristani, M., Cimino, F., D'Arrigo, M., Trombetta, D., Rao, F., & Ruberto, G. (2011). Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves – chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*, 82, 546–556.

Slinkard, K., & Singleton, V. (1977). Total phenolic analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.

Song, W., Qiao, X., Chen, K., Wang, Y., & Ji, S. (2017). Biosynthesis based quantitative analysis of 151 secondary metabolites of licorice to differentiate medicinal *Glycyrrhiza* species and their hybrids. *Analytical Chemistry*, 89, 3146-3153.

Sultana, S., Haque, A., Hamid, K., Urmi, K., & Roy, S. (2010). Antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activity of methanolic extract of *Glycyrrhiza glabra*. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1, 957–960.

Vlaisavljević, S., Šibul, F., Sinka, I., Zupko, I., Ocsovszki, I., & Jovanović-Šanta, S. (2018). Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality. *Industrial Crops and Products*, 112, 217–224.

Wang, L., Yang, R., Yuan, B., Liu, Y., & Liu, C. (2015). The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5, 310–315.