

## The additive effect of calcium carbonate and phosphate on anthraquinone contents in the roots of *Rubia tinctorum* L.

Mohamad Moghadami Rad<sup>1</sup>, Ramazan Ali Khavari-Nejad<sup>2\*</sup>, Sara Saadatmand<sup>3</sup> and Farzaneh Najafi<sup>4</sup>

- 1- Department of Biology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Islamic Azad University of Qom, Iran  
2\*- Corresponding author, Department of Biology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Science and Research Branch Islamic Azad University, Tehran, Iran, E-mail: ra.khavarinejad@gmail.com  
3- Department of Biology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran  
4- Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Received: July 2021

Revised: February 2024

Accepted: March 2024

### Abstracts

**Background and objectives:** Madder (*Rubia tinctorum* L.) is a perennial and herbaceous plant. Madder's root is known as its most important economic part, and it is rich in anthraquinone derivatives. Madder is a plant with medicinal, nutritional, color and health benefits. Recent pharmaceutical studies have shown that the anthraquinones of the madder root have selective inhibitory effects on cancer cells. In this research, according to the water and soil limitations of the tested area, the use of biodegradable calcium carbonate and phosphate fertilizers to produce madder was suggested. So, considering climate change and water shortage as severe risks to sustainable development, the cheapness of madder production and its multiple uses, the planting and production of this plant are mainly used in semi-arid areas.

**Methodology:** In field conditions in Ardakan, Yazd, this research was tested in factorial form in a randomized complete block design with two factors and four replications. Calcium carbonate agent was supplied at five levels of 0, 20, 50, 100 and 150 kg h<sup>-1</sup> and phosphate from triple superphosphate fertilizer at four levels of 0, 50, 100 and 150 kg h<sup>-1</sup>. In each four-by-four-meter plot, four rows of seeds were planted, two side rows and two plants from the sides of the remaining lines were removed as marginal effects, and the rest of the plants were considered statistical populations. Irrigation water's electrical conductivity was measured during the growth period, and its average was 11.6 ds m<sup>-2</sup>. The plots were irrigated immediately after planting the seeds. Four days later, irrigation was done again. In the fall of the second and third years, soil was again given to the plants along with the desired treatments. Madder plants were harvested in the third winter year. Root fresh-weight biomass was weighed immediately after harvesting. After drying the roots at 104 °C, the dry weight of the roots was measured. A spectrophotometer also determined the content of anthraquinone and hydrogen peroxide in the roots.

**Results:** The results of bivariate analysis of variance of the data showed that the simple and reciprocal effect of different calcium carbonate and phosphate treatments on functional indicators of biomass, root fresh weight, root dry weight, anthraquinone content and root hydrogen peroxide in this research was significant at  $P \geq 0.05$ . The comparison of averages showed that the highest values of biomass, root wet weight, root dry weight, anthraquinone and hydrogen peroxide were observed in the combined treatment of 20 kg h<sup>-1</sup> of calcium carbonate and 100 kg h<sup>-1</sup> of phosphate, compared to the control. The lowest value of performance indicators investigated in this research was observed in the combined treatment of 150 kg h<sup>-1</sup> of calcium carbonate and 150 kg h<sup>-1</sup> of phosphate, compared to the control. The simultaneous use of these two fertilizers had a complementary effect on each other. This was because the application of 20 and 50 kg h<sup>-1</sup> of calcium carbonate and 100 kg h<sup>-1</sup> of phosphate had an increasing impact on the anthraquinone and hydrogen peroxide content in madder roots. The comparison of the averages showed that in the combined treatment of 20 kg h<sup>-1</sup> of calcium



carbonate and 100 kg h<sup>-1</sup> of phosphate, compared to the control, the highest wet weight of the root increased by 71%, the highest dry weight of the root increased by 91%, and the highest anthraquinone content increased by 142% was observed. The comparison of the averages showed that in the combined treatment of 50 kg h<sup>-1</sup> of calcium carbonate and 100 kg h<sup>-1</sup> of phosphate, compared to the control, the highest biomass index was observed, with an increase of 79%.

**Conclusion:** The results showed that the functional indices of root fresh weight, root dry weight, anthraquinone content and biomass of madder increased significantly under the combined treatment of 20 kg h<sup>-1</sup> of calcium carbonate and 100 kg h<sup>-1</sup> of phosphate. It is suggested that madder be cultivated using calcium carbonate and phosphate fertilizers to increase the anthraquinone compounds under the influence of biodegradable and inexpensive external environmental stimuli in regions similar to the climatic conditions studied in this research.

**Keywords:** Secondary compounds, triple superphosphate, performance indicators, calcium carbonate, medicinal plant.

## اثر افزایشی کربنات کلسیم و فسفات بر محتوای آنتراکینونی در ریشه روناس (*Rubia tinctorum* L.)

محمد مقدمی راد<sup>۱</sup>، رمضانعلی خاوری نژاد<sup>۲\*</sup>، سارا سعادت‌مند<sup>۳</sup> و فرزانه نجفی<sup>۴</sup>

۱- مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی قم، ایران

۲- نویسنده مسئول، استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

پست الکترونیک: ra.khavarinejad@gmail.com

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه و فناوری‌های همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی تهران، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۰

تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۴۰۲

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۲

### چکیده

سابقه و هدف: روناس (*Rubia tinctorum* L.) گیاهی چندساله و علفی است که ریشه آن به‌عنوان مهم‌ترین بخش اقتصادی آن شناخته شده و غنی از مشتقات آنتراکینونی است. روناس گیاهی با مزیت‌های چندگانه دارویی، غذایی، رنگی و بهداشتی است. مطالعات دارویی اخیر نشان داده‌اند که آنتراکینون‌های ریشه روناس درجه خاصی از اثر مهارتی انتخابی نسبت به سلول‌های سرطانی دارد. در این پژوهش با توجه به محدودیت‌های آب و خاک منطقه مورد آزمایش، استفاده از حاصلخیزکننده‌های زیست‌تخریب‌پذیر کربنات کلسیم و فسفات برای تولید روناس پیشنهاد گردید تا با توجه به تغییر اقلیم و کمبود آب به‌عنوان خطرات جدی توسعه پایدار، ارزان بودن تولید روناس و کاربرد چندگانه آن، کاشت و تولید این گیاه به‌ویژه در مناطق نیمه‌خشک انجام شود.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به‌صورت فاکتوریل با دو عامل و چهار تکرار در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی اجرا شد. عامل کربنات کلسیم در پنج سطح ۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار و فسفات از منبع کود سوپر فسفات تریپل در چهار سطح ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار تأمین شد. در شرایط مزرعه در اردکان یزد در هر کرت چهار در چهار متر، چهار ردیف بذر کاشته شد، دو ردیف کناری و دو گیاه از طرفین خطوط باقی مانده به‌عنوان اثر حاشیه‌ای حذف و بقیه گیاهان به‌عنوان جامعه آماری در نظر گرفته شدند. هدایت الکتریکی آب آبیاری در طول دوره رشد اندازه‌گیری و میانگین آن ۱۱/۶ دسی‌زیمنس بر مترمربع گزارش شد. کرت‌ها بلافاصله بعد از کاشت بذر، آبیاری شدند. چهار روز بعد دوباره آبیاری انجام گردید. بعد از آبیاری دوم، هر ۱۲ روز یک‌بار و در زمستان آبیاری ماهی یک‌بار انجام شد. در پاییز سال دوم و سوم نیز پای بوته‌ها، دوباره خاک همراه با تیمارهای مورد نظر داده شد. در زمستان سال سوم گیاهان روناس برداشت شدند. زیست‌توده وزن تر ریشه بلافاصله بعد از برداشت توزین شد. بعد از خشک کردن ریشه‌ها در دمای ۱۰۴ درجه سانتی‌گراد، وزن خشک ریشه اندازه‌گیری شد. محتوای آنتراکینونی و پراکسید هیدروژن ریشه‌ها نیز به‌وسیله اسپکتروفتومتر انجام شد.

نتایج: نتایج آنالیز واریانس دوعاملی داده‌ها نشان داد که اثر ساده و متقابل تیمارهای مختلف کربنات کلسیم و فسفات بر شاخص‌های عملکردی زیست‌توده، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، محتوای آنتراکینونی و پراکسید هیدروژن ریشه در این پژوهش در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین مقادیر زیست‌توده، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، محتوای آنتراکینونی و پراکسید هیدروژن در تیمار توأم ۲۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار فسفات نسبت به شاهد مشاهده شد. کمترین مقدار شاخص‌های عملکردی مورد بررسی در این پژوهش در تیمار توأم ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار فسفات نسبت به شاهد مشاهده شد. استفاده همزمان این دو کود روی یکدیگر اثر مکمل داشت، بدین ترتیب که کاربرد ۲۰ و ۵۰ کیلوگرم در هکتار کربنات کلسیم، همراه با ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار فسفات اثر افزایشی بر محتوای آنتراکینونی و پراکسید هیدروژن ریشه روناس داشت. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در تیمار توأم ۲۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار فسفات نسبت به شاهد، بیشترین وزن تر ریشه با افزایش ۷۱٪، بیشترین وزن

خشک ریشه با افزایش ۹۱٪ و بیشترین محتوای آنتراکینونی با افزایش ۱۴۲٪ مشاهده شد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در تیمار توأم ۵۰ کیلوگرم بر هکتار کرنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار فسفات نسبت به شاهد، بیشترین مقدار شاخص زیست‌توده با افزایش ۷۹٪ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که شاخص‌های عملکردی وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، محتوای آنتراکینونی و زیست‌توده روناس تحت تأثیر تیمار توأم ۲۰ کیلوگرم بر هکتار کرنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار فسفات افزایش قابل توجهی داشتند. برای افزایش ترکیبات آنتراکینونی تحت تأثیر محرک‌های محیطی خارجی زیست‌تخریب‌پذیر و ارزان‌قیمت در مناطقی مشابه شرایط اقلیمی مورد مطالعه در این پژوهش، کشت روناس با استفاده از حاصلخیزکننده‌های کرنات کلسیم و فسفات پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات ثانویه، تریل سوپر فسفات، شاخص‌های عملکردی، کرنات کلسیم، گیاه دارویی.

## مقدمه

روناس با نام علمی *Rubia tinctorum* گیاهی چند ساله از خانواده Rubiaceae است. جنس *Rubia* تقریباً دارای ۶۳۷ جنس و ۱۳۰۰۰ گونه می‌باشد (Pereira & Meieles, 2010). ریشه حاوی آنتراکینون‌ها، به‌ویژه آلیزارین و پورپورین با اثرهای دارویی ضد التهابی (Li et al., 2013)، تصفیه‌کننده (Gong et al., 2015)، تنظیم‌کننده ایمنی (Abu et al., 2018)، ضد هیپرلیپیدمی (Wang et al., 2014)، ضد سرطانی (Yang et al., 2015؛ Lin et al., 2016؛ Cui et al., 2016؛ El-Tanahy et al., 2019) و ضد باکتریایی (El-Tanahy et al., 2022) است. از ویژگی‌های خانواده روناس، تولید ترکیبات ثانویه با توان بالای دارویی است (Chen et al., 2015؛ Martins & Nunez, 2015؛ Chen et al., 2022). آلیزارین و پورپورین به‌عنوان رنگ طبیعی برای پارچه‌های پنبه‌ای، ابریشم و پشمی از هزاران سال پیش استفاده شده‌اند. همچنین از این مواد در صنایع آرایشی و بهداشتی و غذایی برای رنگ‌آمیزی محصولات استفاده شده است. این گیاه در ایران بیشتر در مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند یزد و اردکان کشت می‌شود (Moghadami, 2022). (Rad et al., 2022).

دستیابی به یک الگوی جدید برای تغذیه هدفمند گیاهی برای رسیدن به اهداف متعدد اقتصادی، زیست محیطی و بهداشتی مستلزم استفاده از تمامی منابع غذایی ارگانیک و معدنی موجود با بازدهی بالا، متناسب با ویژگی‌های خاص زیست‌بوم‌های کشاورزی در مناطق مختلف جهان است

(Fuglie, 2018؛ McArthur & McCord, 2017؛ Dobermann et al., 2022؛ Tuninetti et al., 2020). برخی اقدامات اساسی مانند نقشه راه استفاده از مواد حاصلخیزکننده مبتنی بر پایداری، راه‌حل‌های تغذیه دیجیتال محصولات و بازیافت مواد مغذی، ارزش‌افزوده‌ای را برای همه بازیگران در زنجیره تولید ایجاد می‌کند. این پژوهش به بررسی راهکارهایی برای بهبود محدودیت‌های خاک، مقابله با تغییرات اقلیمی با توجه به تغییرات آب و هوای جهانی و افزایش عملکرد برای حفظ تولید محصول روناس از طریق افزودن کرنات کلسیم و فسفات می‌پردازد. یکی از نگرانی‌های بزرگ، از دست دادن اشکال واکنش‌پذیر فسفر در محیط است که بر کیفیت آب، تنوع زیستی، کیفیت هوا و انتشار گازهای گلخانه‌ای تأثیر می‌گذارد (Dobermann et al., 2022). فسفر یک درشت مغذی اساسی است که برای رشد بهینه گیاه در بخش کشاورزی مورد نیاز است (Wahid et al., 2020). در دسترس نبودن فسفر یک مسئله جدی است و عامل اصلی محدود کننده کاهش عملکرد محصول در اکوسیستم کشاورزی مدرن در نظر گرفته می‌شود (Metson et al., 2016). در خاک‌های قلیایی، فسفر در ترکیبات معدنی منیزیم و کلسیم که کم محلول هستند، به دام می‌افتد و قابل استفاده برای گیاه نیست (Hummel et al., 2021). مطالعات پژوهشگران نشان داد که در خاک‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک به علت pH بالا و غلظت زیاد یون کلسیم، عناصر غذایی مانند

ایجاد می‌کند (Naorem *et al.*, 2023). ترکیبات آنتراکینونی تحت تأثیر آب‌وهوای متغیر و تنش‌های القایی یا طبیعی مانند خشکی و شوری قرار می‌گیرند. تغذیه مناسب در تعدیل این تنش‌ها بر سازوکارهای فیزیکی و شیمیایی آنتراکینون‌ها تأثیر می‌گذارند و باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند؛ بنابراین، اثرهای مفید ترکیبات آنتراکینونی تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده به‌عنوان «متعادل‌کننده یک‌پارچه» در سیستم‌های خاک و گیاه، در رابطه با تغییرات آب و هوایی جهانی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

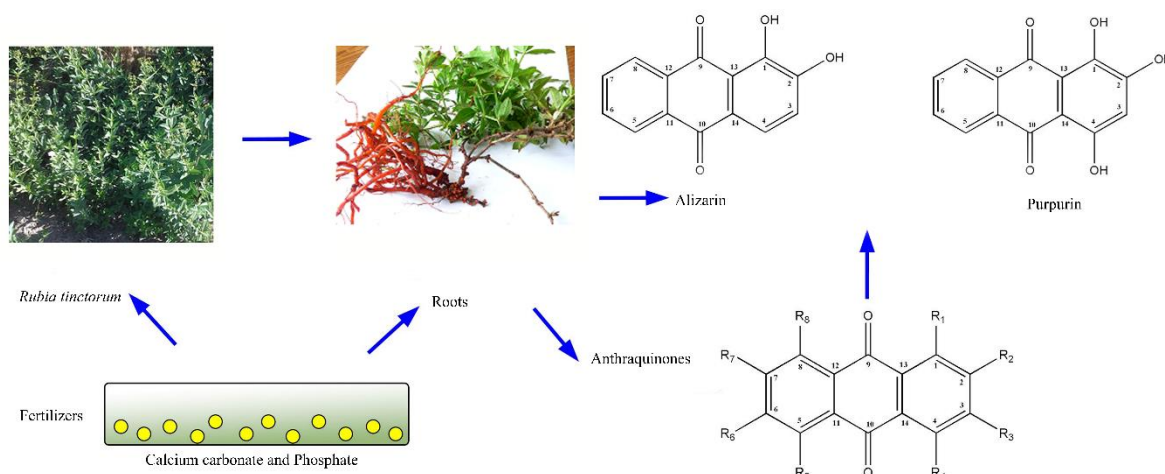
### مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت کشت در شرایط مزرعه در سال‌های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۱ در شهرستان اردکان (بین ۱° ۵۳' تا ۱۸° ۵۶' طول شرقی و ۳۱° ۵۸' تا ۲۲° ۳۲' عرض شمالی) در استان یزد انجام شد. خاک مورد استفاده از سطح زمین تا عمق ۳۰ سانتی‌متری در منطقه مورد مطالعه جمع‌آوری گردید، در شرایط هوای آزاد، برخی از ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی آن تعیین گردید، هدایت الکتریکی و pH خاک در عصاره خاک: آب (۱:۱)، به ترتیب با استفاده از هدایت‌سنج الکتریکی و pH متر اندازه‌گیری شد. درصد نیتروژن کل براساس روش تیتراسیون بعد از تقطیر با استفاده از سیستم کجل تک اتوآنالایزر (Bremner, 1996)، غلظت سدیم و پتاسیم با خواندن جذب توسط فلیم فتومتر (Rayan *et al.*, 2001)، غلظت فسفات به روش اسپکتروفوتومتری (Ganesh *et al.*, 2012)، غلظت کلسیم و آهن با خواندن جذب محلول در دستگاه جذب اتمی GTALLO مدل Varian، غلظت بی‌کربنات به روش تیتراسیون و غلظت منیزیم به روش کمپلکسومتری (Zangen, 2007) تعیین گردید (جدول ۱).

فسفر که قابلیت جذب آنها وابسته به pH است، به صورت نامحلول درآمده و از دسترس گیاه خارج می‌شوند (Naorem *et al.*, 2023; Ibrahim *et al.*, 2022). از طریق افزایش مصرف کودهای شیمیایی فسفره دسترس و جذب فسفات در محیط ریزوسفر ریشه افزایش می‌یابد و باعث ارتقاء کارایی فیزیولوژیکی فسفر در گیاه می‌شود (Wilson *et al.*, 2019).

تغذیه مناسب گیاهان در مقاومت آنها به انواع تنش‌های زنده و غیرزنده نقش مؤثری دارد. کلسیم به‌عنوان یک پیام‌رسان، در واکنش به سیگنال‌های محیطی، تغییراتی را در نفوذپذیری غشاء انجام می‌دهد و با انتشار پروتون به داخل سلول باعث می‌شود که مقدار پراکسید هیدروژن افزایش یابد (Choudhury *et al.*, 2017; He & Ding, 2020). ارتباط بین پراکسید هیدروژن و سیگنال‌های  $Ca^{2+}$  به‌وسیله مطالعات روی گیاه آراییدویسیس تأیید شده است (Niu & Liao, 2016). پراکسید هیدروژن تولید شده در سلول‌های گیاهی دارای نقش دوگانه است. در غلظت‌های پایین، به‌عنوان یک پیام‌رسان، آغازکننده و تنظیم‌کننده پاسخ‌های گیاهان به سیگنال‌های محیطی است و در غلظت‌های بالا، منجر به مرگ سلولی می‌شود (Sachdev *et al.*, 2021). در سال‌های اخیر، نقش پراکسید هیدروژن در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی از قبیل پیری (Khan *et al.*, 2018)، تنفس نوری و فتوسنتز (Liu *et al.*, 2018)، باز و بسته شدن روزنه‌ها (Bright *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2018)، چرخه سلولی (Mittler *et al.*, 2004) و رشد و نمو (Niu & Liao, 2016) به‌عنوان یک کلید تنظیم‌کننده نشان داده شده است.

افزایش خشکی و شوری، در دسترس بودن مواد مغذی ضروری گیاه و رشد محصول را محدود می‌کند و متعاقباً تهدیدات جدی برای فرایندها و خدمات اکولوژیکی کلیدی



شکل ۱- خلاصه گرافیکی اثر افزایشی کربنات کلسیم و فسفات بر محتوای آنتراکینونی ریشه روناس

Figure 1. Graphical summary of additive effect of calcium carbonate and phosphate on anthraquinone content of *Rubia tinctorum* roots

جدول ۱- برخی خصوصیات شیمیایی خاک در پژوهش

Table 1. Some chemical properties of experimental soil

$\text{HCO}_3^-$ ( $\text{meq L}^{-1}$ )	$\text{Cl}^-$ ( $\text{meq L}^{-1}$ )	$\text{K}^+$ ( $\text{meq L}^{-1}$ )	$\text{Na}^+$ ( $\text{meq L}^{-1}$ )	$\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{meq L}^{-1}$ )	$\text{Mg}^{2+}$ ( $\text{meq L}^{-1}$ )	$\text{Fe}^{2+}$ ( $\text{meq L}^{-1}$ )	$\text{HPO}_4^{2-}$ ( $\text{meq L}^{-1}$ )	pH	N (%)
1.21	28.75	0.07	23.78	27.59	11.63	1.48	24.89	7.60	0.07

الکتریکی آب آبیاری در طول دوره رشد اندازه‌گیری و میانگین آن ۱۱/۶ دسی‌زیمنس بر مترمربع گزارش شد. کرت‌ها بلافاصله بعد از کاشت بذر، آبیاری شدند. چهار روز بعد دوباره آبیاری انجام گردید. بعد از آبیاری دوم، هر ۱۲ روز یک‌بار و در زمستان آبیاری ماهی یک‌بار انجام شد. در تابستان سال دوم و سوم عملیات سله‌شکنی، وجین و کنترل علف‌های هرز انجام گردید. در پاییز سال دوم و سوم نیز پای بوته‌ها، دوباره خاک همراه با تیمارهای مورد نظر داده شد. در زمستان سال سوم اندام‌های هوایی روناس را از سطح خاک بریده و ریشه‌ها در اسفندماه برداشت شدند. سپس سنجش‌های مورد نظر انجام شد (شکل ۱).

آنالیز رشد

زیست‌توده وزن تر ریشه بلافاصله پس از برداشت اندازه‌گیری شد و برای به‌دست‌آوردن وزن خشک ریشه، نمونه‌ها را در هوای آزاد در آون در دمای ۱۱۰ درجه

شرایط کشت روناس و تیمارهای مورد استفاده تیمارهای مورد استفاده دربرگیرنده پنج سطح ۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و چهار سطح ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار فسفات به شکل سوپر فسفات تریپل تهیه و به مزرعه منتقل شدند. پس از اینکه زمین آماده کشت گردید، بذرهای روناس سالم تهیه شده از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان یزد به صورت ردیفی کاشته شد. در هر کرت چهار در چهار متر، چهار ردیف بذر کاشته شد. دو ردیف کناری و دو گیاه از طرفین خطوط باقی‌مانده به‌عنوان اثر حاشیه‌ای حذف و بقیه گیاهان به‌عنوان جامعه آماری در نظر گرفته شدند. در ردیف‌های منظم به فاصله تقریباً ۷۰ سانتی‌متر، در حفره‌هایی به عمق ۵ سانتی‌متر تعداد ۲۰ تا ۲۵ عدد بذر ریخته و روی آن با خاک پوشانده شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل با دو عامل و چهار تکرار در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی اجرا شد. هدایت

سانتی‌گراد، به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و بعد از خارج شدن نمونه‌ها از آون، نمونه‌ها به دسیکاتور منتقل و بعد توزین انجام شد.

#### سنجش پراکسید هیدروژن

یک گرم بافت تازه ریشه در ۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۱٪ در حمام یخ ساییده شد و به مدت ۱۵ دقیقه با نیروی ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر محلول روشناور با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (اسیدیته برابر ۷/۸) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار مخلوط گردید. جذب نمونه در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد مقدار پراکسید هیدروژن برحسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Liu et al., 2018).

#### سنجش ترکیبات آنتراکینونی

برای سنجش محتوای آنتراکینونی ریشه روناس، در تیمارهای مختلف استفاده شده از حلال اتانول ۸۰٪ (v/v) استفاده شد. ترکیبات آنتراکینون با واکنش بورنترگر شناسایی شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Khoomsab & Khoomsab, 2019).

#### تجزیه و تحلیل آماری

بررسی‌های آماری براساس آنالیز واریانس دو عاملی توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال  $P < 0.05$  انجام گردید. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

#### نتایج

نتایج آنالیز واریانس دو عاملی داده‌ها نشان داد که اثر ساده و متقابل تیمارهای مختلف کربنات کلسیم و فسفات بر شاخص‌های عملکردی زیست‌توده، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، محتوای آنتراکینونی و پراکسید هیدروژن ریشه

در این پژوهش در سطح احتمال پنج درصد بود. مقایسه میانگین اثر ساده سطوح مختلف فسفات بر زیست‌توده، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، محتوای آنتراکینونی و پراکسید هیدروژن ریشه نشان داد با افزایش مصرف فسفات تا میزان ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار افزایش یافت و پایین‌ترین مقدار شاخص‌ها در عدم مصرف فسفات مشاهده شد. مقایسه میانگین اثر ساده سطوح مختلف کربنات کلسیم بر زیست‌توده، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، محتوای آنتراکینونی و پراکسید هیدروژن ریشه نشان داد با افزایش مصرف فسفات تا میزان ۵۰ کیلوگرم بر هکتار افزایش یافت و پایین‌ترین مقدار شاخص‌های عملکردی در تیمار ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم مشاهده شد.

نتایج ارائه شده در شکل‌های ۶-۲ نشان داد که در تیمار ۲۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار فسفات بیشترین مقدار زیست‌توده، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، محتوای آنتراکینونی (میلی‌گرم بر گرم) و پراکسید هیدروژن (میکرومول بر گرم وزن تر) نسبت به شاهد مشاهده گردید. کمترین مقدار شاخص‌های ذکر شده در تیمار ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار فسفات مشاهده شد. نتایج آنالیز واریانس دو عاملی نشان داد که اختلاف میانگین هر یک از عامل‌ها و تأثیر متقابل آنها برای هر سه شاخص در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است (جدول ۲).

مقایسه میانگین‌های اثر ساده کربنات کلسیم (جدول ۳) نشان داد که در تیمار ۵۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم، نسبت به شاهد بیشترین زیست‌توده با افزایش ۳۰٪ مشاهده شد. مقایسه میانگین‌های اثر ساده کربنات کلسیم نشان داد که در تیمار ۲۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم، نسبت به شاهد بیشترین وزن تر ریشه با افزایش ۱۰٪، بیشترین وزن خشک ریشه با افزایش ۲۲٪ و بیشترین محتوای آنتراکینونی با افزایش ۲۴٪ مشاهده شد.

مقایسه میانگین‌های اثر ساده فسفات (جدول ۴) نشان داد که در تیمار ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار فسفات، نسبت به شاهد بیشترین زیست‌توده با افزایش ۱۸٪، وزن تر ریشه با افزایش ۲۶٪، بیشترین وزن خشک ریشه با افزایش ۲۴٪ و بیشترین محتوای آنتراکینونی با افزایش ۲۲٪ مشاهده شد.

مشاهده شد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در تیمار توأم ۵۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار فسفات، نسبت به شاهد بیشترین مقدار شاخص زیست‌توده با افزایش ۷۹٪ مشاهده شد.

مقایسه میانگین‌ها (شکل‌های ۶-۲) نشان داد که در تیمار توأم ۲۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار فسفات، نسبت به شاهد بیشترین وزن تر ریشه با افزایش ۷۱٪، بیشترین وزن خشک ریشه با افزایش ۹۱٪ و بیشترین محتوای آنتراکینونی با افزایش ۱۴۲٪

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر کربنات کلسیم و فسفات بر شاخص‌های عملکردی روناس

Table 2. ANOVA of calcium carbonate and phosphate effects on *Rubia tinctorum* yield parameters

S.O.V.	d.f.	Biomass	Root fresh weight	Root dry weigh	Root anthraquinone content	Root H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Repetition	19	1954.083	516.146	6.326	185563.156	17.423
Calcium carbonate (C)	4	1657.888**	431.600**	5.329**	134400.724**	10.386**
Phosphate (P)	3	253.568**	72.814**	0.812**	14846.314**	1.699**
C × P	12	42.627*	11.733**	0.185*	36316.119**	5.338**
Experimental error	60	105.942	19.915	0.437	3573.574	0.941
C.V. (%)		0.325	0.366	0.402	0.265	0.199

\* and \*\*: significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر کربنات کلسیم بر شاخص‌های عملکردی روناس

Table 3. Means comparison of calcium carbonate effects on *Rubia tinctorum* yield parameters

Calcium carbonate (kg ha <sup>-1</sup> )	Biomass (kg)	Root fresh weight (kg)	Root dry weigh (kg)	Root anthraquinone content mg g (DW) <sup>-1</sup>	Root H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> μmol g (FW) <sup>-1</sup>
0	13.70 <sup>b</sup>	6.52 <sup>b</sup>	0.63 <sup>b</sup>	182.95 <sup>d</sup>	2.55 <sup>c</sup>
20	15.90 <sup>a</sup>	7.13 <sup>a</sup>	0.77 <sup>a</sup>	227.69 <sup>a</sup>	2.87 <sup>a</sup>
50	17.82 <sup>a</sup>	7.07 <sup>a</sup>	0.76 <sup>a</sup>	206.17	2.66 <sup>b</sup>
100	11.91 <sup>c</sup>	5.58	0.53 <sup>c</sup>	197.97 <sup>c</sup>	2.14 <sup>d</sup>
150	6.45 <sup>d</sup>	2.07	0.23 <sup>d</sup>	107.81 <sup>e</sup>	1.87 <sup>e</sup>

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

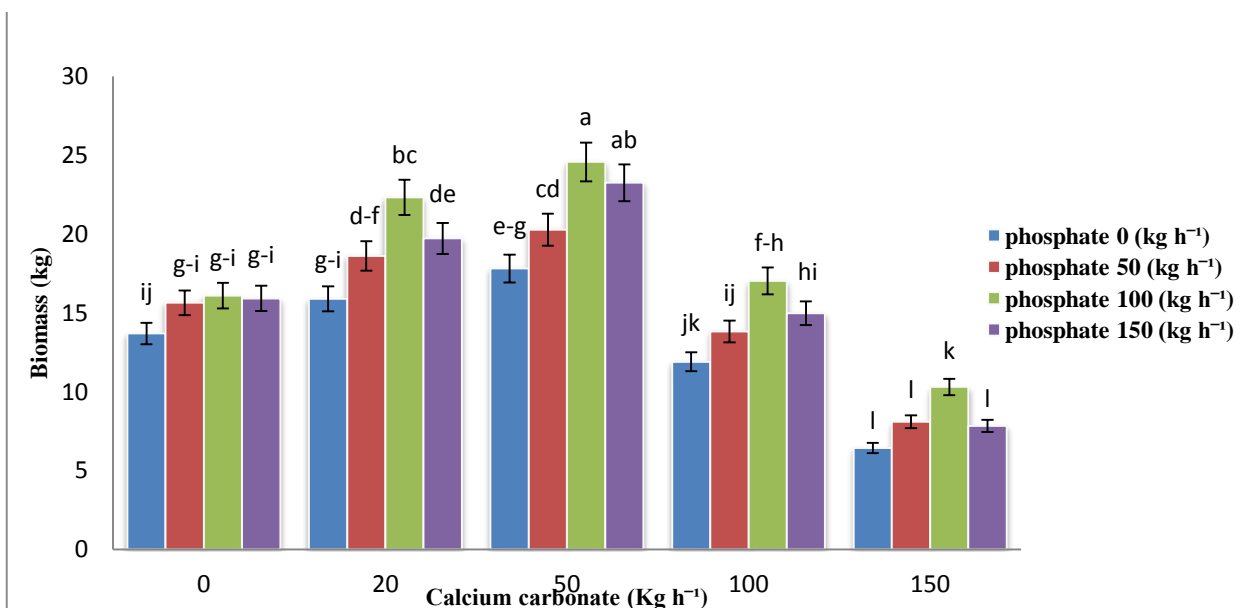
جدول ۴- مقایسه میانگین اثر فسفات بر شاخص‌های عملکردی روناس

Table 4. Means comparison of phosphate effects on *Rubia tinctorum* yield parameters

Phosphate (kg ha <sup>-1</sup> )	Biomass (kg)	Root fresh weight (kg)	Root dry weigh (kg)	Root anthraquinone content mg g (DW) <sup>-1</sup>	Root H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> μmol g (FW) <sup>-1</sup>
0	13.70 <sup>b</sup>	6.52 <sup>b</sup>	0.63 <sup>b</sup>	161.68 <sup>c</sup>	2.55 <sup>c</sup>
50	15.65 <sup>c</sup>	7.95 <sup>c</sup>	0.73 <sup>c</sup>	192.11 <sup>ab</sup>	2.62 <sup>a</sup>
100	16.11 <sup>a</sup>	8.23 <sup>a</sup>	0.78 <sup>a</sup>	196.98 <sup>a</sup>	2.49 <sup>b</sup>
150	15.93 <sup>b</sup>	8.11 <sup>b</sup>	0.76 <sup>b</sup>	187.29 <sup>b</sup>	2.29 <sup>c</sup>

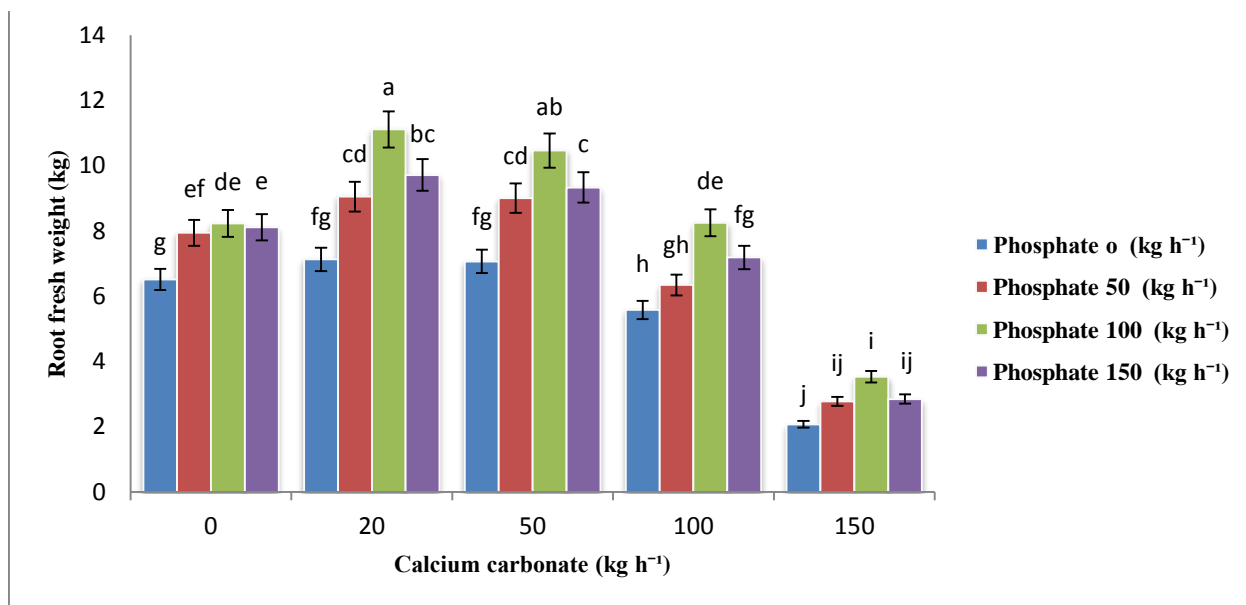
In each column, means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).





شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل فسفات و کربنات کلسیم بر زیست توده روناس

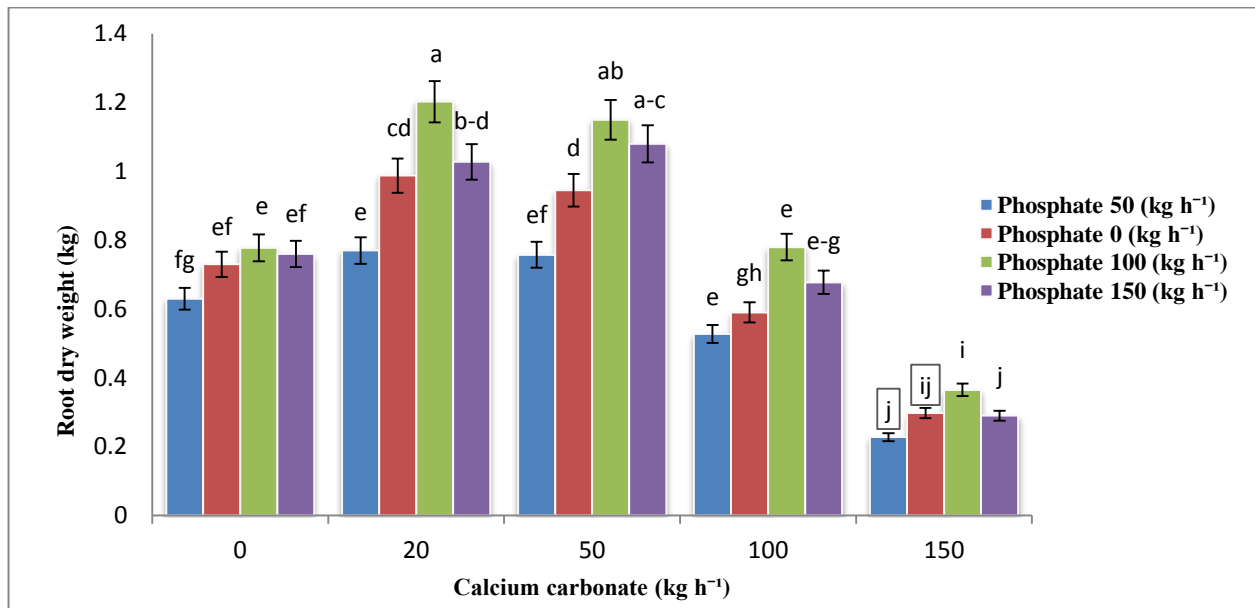
**Figure 2. Means comparison of phosphate × calcium carbonate interaction on *Rubia tinctorum* biomass**  
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل فسفات و کربنات کلسیم بر وزن تر ریشه روناس

**Figure 3. Means comparison of phosphate × calcium carbonate interaction on *Rubia tinctorum* roots fresh weight**

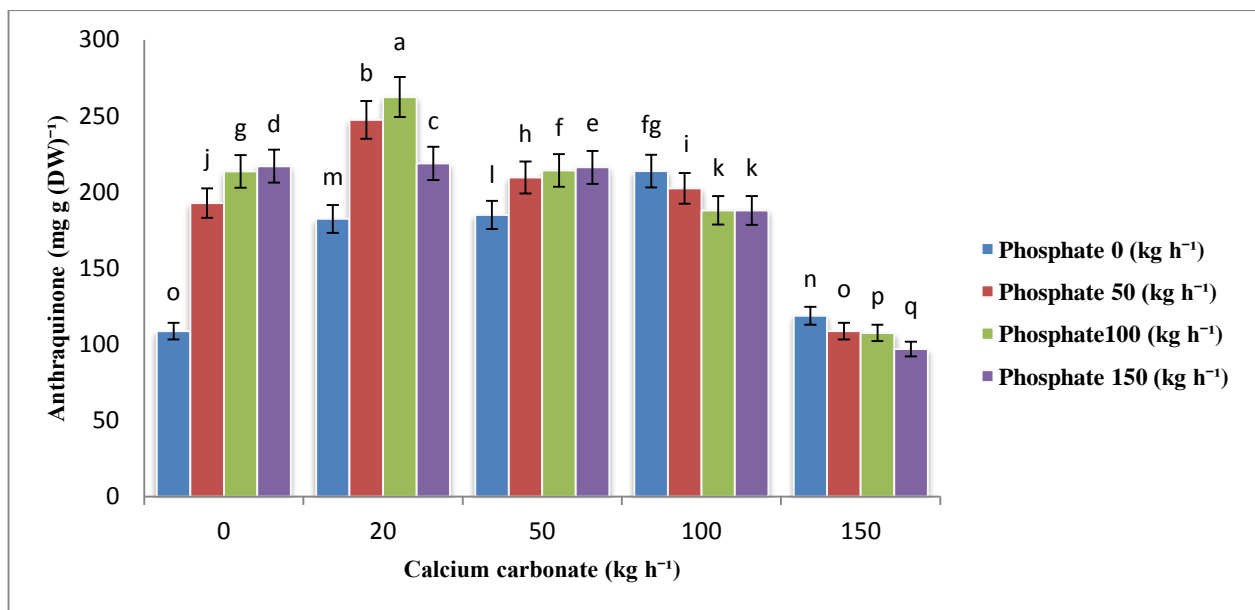
Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل فسفات و کربنات کلسیم بر وزن خشک ریشه روناس

Figure 4. Comparison of the average effect of phosphate and calcium carbonate on *Rubia tinctorum* root dry weight

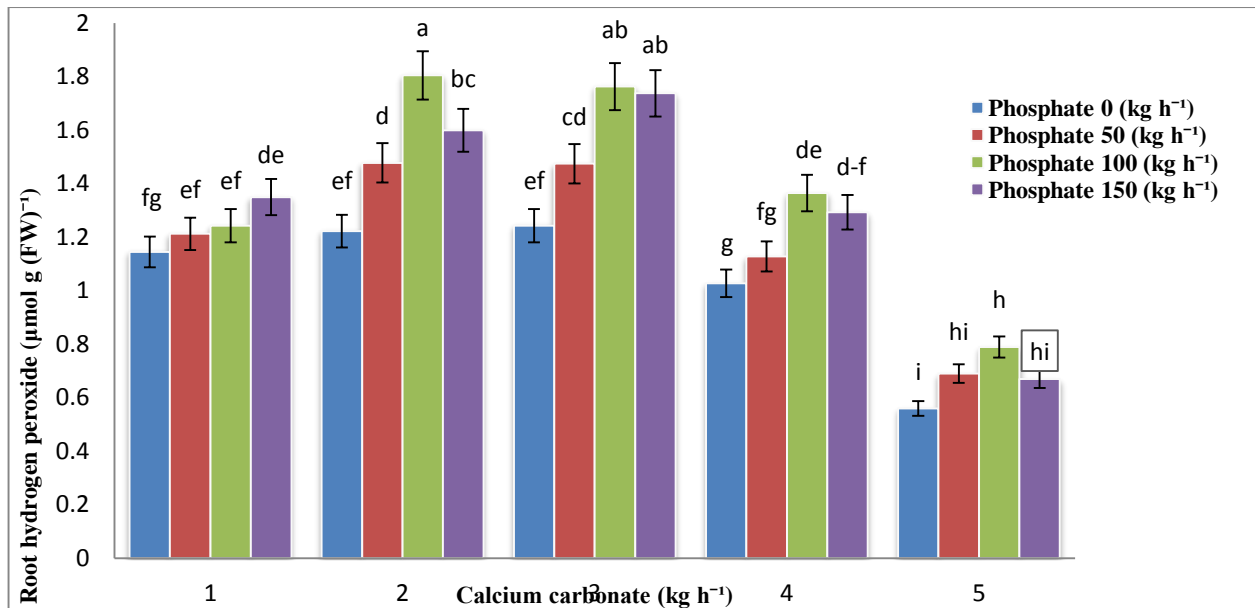
The same letters indicate no significant difference.



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل فسفات و کربنات کلسیم بر محتوای آنتراکینونی ریشه روناس

Figure 5. Comparison of the average effect of phosphate and calcium carbonate on the anthraquinone content of *Rubia tinctorum* roots

The same letters indicate no significant difference.



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل فسفات و کربنات کلسیم بر محتوای پراکسید هیدروژن ریشه روناس

Figure 6. Comparison of the average effect of phosphate and calcium carbonate on the Hydrogen peroxide content of *Rubia tinctorum* roots

The same letters indicate no significant difference.

در محیط ریزوسفر ریشه‌ها افزایش یافته و باعث ارتقاء کارایی فیزیولوژیکی فسفات در گیاه گردید (Johan *et al.*, 2021؛ Aimen *et al.*, 2022؛ Ibrahim *et al.*, 2022). فسفات ناکافی در خاک بر صفات کیفی در طول رشد رویشی و رشد ریشه تأثیر منفی می‌گذارد و در نهایت منجر به کاهش عملکرد محصول می‌شود (Abobatta & Abd, 2023؛ Jezak *et al.*, 2023؛ Allia, 2023؛ Lopez *et al.*, 2023). فسفر برای سنتز و فعال شدن آنزیم‌های دخیل در جذب و انتقال مواد مغذی ضروریست و کمبود آن می‌تواند منجر به عدم تعادل مواد مغذی و علائم سمیت شود. فسفر ناکافی بر جذب سایر مواد مغذی مانند نیتروژن، پتاسیم و کلسیم توسط گیاهان تأثیر می‌گذارد (Tariq *et al.*, 2023). کمبود فسفر همچنین باعث کاهش زیست‌توده می‌گردد. زیست‌توده ذرت در غلظت فسفر اندام هوایی ۲/۷ میلی‌گرم در گرم به اوج می‌رسد، مورفولوژی ریشه روند افزایشی در غلظت‌های پایین‌تر فسفر را نشان می‌دهد؛ اما در سطوح بسیار پایین

## بحث

افزایش شاخص‌های زیست‌توده، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه با افزایش تیمار فسفات می‌تواند به دلیل نقشی باشد که فسفر در تنظیم پاسخ‌های فیزیولوژیکی دارد (Lambers, 2022؛ Hawkesford *et al.*, 2023). فسفر معمولاً توسط گیاهان به صورت فسفات معدنی از خاک جذب می‌شود. پس از انتقال به گیاه، فسفات معدنی به اشکال آلی مانند آدنوزین‌تری‌فسفات و آدنوزین‌دی‌فسفات تبدیل می‌شود که به عنوان حامل انرژی استفاده می‌شوند. فسفات معدنی همچنین برای تشکیل سایر ترکیبات آلی مهم مانند اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدها و پلی‌فسفات‌های معدنی استفاده می‌شود، بنابراین رشد گیاه و سازگاری‌های فیزیولوژیکی و مولکولی را به دنبال دارد (Plaxton & Lambers, 2015).

میزان تحرک فسفر در خاک بسیار ناچیز است و با افزایش مصرف کود فسفره مقدار دسترسی و جذب فسفات

کاهش جذب یون‌های سمی می‌شود ( Zhao *et al.*, 2020). علاوه بر این، زمانی که تغذیه فسفر کافی بود، کاهش رشد به حداقل رسید و با کمبود فسفر بیشتر تشدید شد. در سطوح کرنات کلسیم بالاتر احتمالاً جذب غیرمتعارف یون، روندهای طبیعی متابولیسمی را مختل کرده و گیاه بخشی از انرژی مواد آلی را به جای تخصیص به رشد به تولید محلول‌های سازگار، به تعدیل اسمزی و حفظ سلول اختصاص می‌دهد (Gupta & Huang, 2014؛ Shahid *et al.*, 2020).

کاهش وزن خشک ریشه در سطوح بالای کرنات کلسیم و فسفات ناشی از تأثیر منفی این تیمارها بر جذب سایر عناصر غذایی از جمله عناصر کم مصرف است که منجر به برهم خوردن تعادل غذایی و در نهایت کاهش عملکرد گیاه می‌شود (Lodari *et al.*, 2022). در سطوح بالای کرنات کلسیم قابلیت جذب فسفات به‌طور عمده توسط کرنات کلسیم، pH بالا و کمبود مواد آلی محدود می‌شود (Brownrigg *et al.*, 2022؛ Opala, 2017).

نتایج حاصل نشان داد که با افزایش غلظت فسفات محتویات آنتراکینونی و پراکسید هیدروژن ریشه افزایش معنی‌داری یافت. ترکیبات آنتراکینونی به‌عنوان شاخص‌های تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند، از این رو انباشتگی انواع ترکیبات آنتراکینونی در شرایط تنش می‌تواند به‌عنوان یک نشانه در جلوگیری از تخریب سلولی عمل کرده و در نهایت به افزایش تحمل در برابر تنش منجر شود (Xin *et al.*, 2022). آنتراکینون‌ها ترکیبات عمده‌ای هستند که توسط گونه‌های گیاهی به‌عنوان یک محرک محیطی یا به‌عنوان سازوکار دفاعی تنظیمی تحت تنش‌های زیستی و یا غیرزیستی مختلف محیطی تولید می‌شوند. این متابولیت‌های ثانویه از مسیر متابولیسمی شیکیمات تولید می‌شوند. ترکیب حلقه بنزن معطر نقش مهمی در رشد گیاهان به‌ویژه در خط مقدم دفاع دارد. آنها یکپارچگی ساختاری و پشتیبانی از گیاهان را فراهم می‌کنند (Reshi *et al.*, 2023). آلیزارین از جمله ترکیبات آنتراکینونی است که می‌تواند فعالیت رادیکال‌های آزاد را مهار کرده و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را

کاهش می‌یابد. بعکس، افزایش غلظت فسفر اندام هوایی منجر به کاهش مورفولوژی ریشه می‌شود، اما پاسخ‌های فیزیولوژیکی را حتی در غلظت‌های بالای فسفر افزایش می‌دهد که اهمیت ساختار ریشه در جذب و استفاده فسفر را برجسته می‌کند (Wen *et al.*, 2017). کمبود فسفر همچنین بر مورفولوژی و فتوسنتز برگ تأثیر می‌گذارد. برای نمونه، برخی از ژنوتیپ‌های برنج سازگاری بهتری با شرایط فسفر پایین با زیست‌توده بالاتر، افزایش میزان فتوسنتز و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با سایر گونه‌ها نشان می‌دهند (Veronica *et al.*, 2017). تغییرات مشابهی نیز در بین ارقام سیب‌زمینی مشاهده شده است (Chea *et al.*, 2021). *Arabidopsis thaliana* به در دسترس بودن فسفر پایین با تأخیر فنولوژیکی پاسخ می‌دهد و امکان افزایش جذب و استفاده فسفر را فراهم می‌کند و تولید زیست‌توده بالاتری دارد (Nord & Lynch, 2008). در محصولات گندم، کمبود فسفر در درجه اول بر زیست‌توده بالای زمین، عملکرد دانه و زیست‌توده سنبله تأثیر می‌گذارد و منجر به کاهش تعداد دانه در مترمربع می‌شود (Sandaña & Pinochet, 2011).

نتایج حاصل نشان داد که با کوددهی تا غلظت ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار فسفر عملکرد برخی شاخص‌های رشد رونس از جمله وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و زیست‌توده بهبود یافت. گزارش شده است که افزایش زیست‌توده اندام هوایی و ریشه همراه با عملکرد با استفاده از کود فسفر در *Echinacea purpurea* (Attarzadeh *et al.*, 2019)، کلزا (Mamnabi *et al.*, 2020) و *Phoebe zhennan* (Tariq *et al.*, 2017) بهبود یافته است. نتایج ذکر شده با نتایج حاصل در این پژوهش مطابقت دارد.

کاهش شاخص‌های وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و زیست‌توده در سطوح بالای کرنات کلسیم و فسفات را می‌توان به سرمایه‌گذاری عمده انرژی بر روی سازوکارهای دفاعی نسبت به تولید زیست‌توده نسبت داد (Fahad *et al.*, 2015؛ Lodari *et al.*, 2022). دلیل دیگر آن می‌تواند کاهش جذب آب باشد که منجر به

محیط طبیعی، تنش‌های غیرزیستی بیشتر به دلیل مسیرهای مرتبط با یکدیگر به صورت ترکیبی رخ می‌دهند (Kumar *et al.*, 2017) و اثرهای بی‌نظیر و ترکیبی روی گیاهان دارند و بر فعالیت‌های سلولی، متابولیک و فیزیولوژیکی آنها تأثیر می‌گذارند (He *et al.*, 2018؛ Bulgari *et al.*, 2019؛ Ahluwalia *et al.*, 2021).

در این پژوهش با استفاده از حاصلخیزکننده‌های زیست‌تخریب‌پذیر، شاخص‌های عملکردی وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، محتوای آنتراکینونی و زیست‌توده روماس تحت تأثیر تیمار توأم ۲۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار فسفات افزایش قابل‌توجهی داشتند. با توجه به تغییر اقلیم و کمبود آب به‌عنوان خطرات جدی توسعه پایدار، ارزان بودن تولید روماس و کاربرد چندان آن، کاشت و تولید این گیاه به‌ویژه در مناطق نیمه‌خشک، با استفاده از حاصلخیزکننده‌های ذکر شده پیشنهاد می‌شود.

فعال کند. البته بالابودن ترکیبات آنتراکینونی، دلیل عمده بالابودن فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها نیز است، زیرا براساس شواهد موجود ارتباط مثبتی بین میزان ترکیبات آنتراکینونی و قدرت آنتی‌اکسیدانی گیاهان وجود دارد (He *et al.*, 2018؛ Chen *et al.*, 2022؛ Reshi *et al.*, 2023). در این پژوهش نیز مشاهده شد که با افزایش سطح فسفات و کربنات کلسیم تا حد متوسط با افزایش پراکسید هیدروژن و محتوای آنتراکینون‌ها همراه بود که با نتایج ذکر شده سایر پژوهشگران مطابقت دارد. پژوهش‌های متعدد نشان می‌دهد که  $\text{Ca}^{2+}$  و  $\text{H}_2\text{O}_2$  به‌عنوان سیگنال‌دهی در رشد و نمو گیاه و پاسخ به تنش‌های غیرزنده نقش دارند (Hu *et al.*, 2015؛ Li *et al.*, 2016؛ Florez-Sarasa *et al.*, 2020؛ Sachdev *et al.*, 2021). سیگنال‌دهی یون کلسیم تنظیم‌کننده اصلی فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه و سازگاری با تنش مانند تنظیم قطبیت سلولی (Zhou *et al.*, 2014)، حذف برگ (Huang *et al.*, 2012) و بسته‌شدن روزنه (Zou *et al.*, 2015) است. در یک

## References

- Abobatta, W. and Abd Alla, M., 2023. Role of phosphates fertilizers in sustain horticulture production: Growth and productivity of vegetable crops. *Asian journal of agricultural research*, 17: 1-7.
- Abu, N., Zamberi, N.R., Yeap, S.K., Nordin, N., Mohamad, N.E. and Romli, M.F., 2018. Subchronic toxicity, immunoregulation and anti-breast tumor effect of Nordamnacantal, an anthraquinone extracted from the stems of *Morinda citrifolia* L. *BMC Complement Altern Medicine*, 18(1): 31.
- Ahluwalia, O., Sing, P.C. and Bhatia, R., 2021. A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability*, 5: 100032.
- Aimen, A., Basit, A., Bashir, S., Aslam, Z., Shahid, M.F., Amjad, S., Mehmmmod, K., Aljuaid, B.S., El-Shehawi, A.M., Zuan, A.T.K., Farooq, S. and Li, Y., 2022. Sustainable phosphorous management in two different soil series of Pakistan by evaluating dynamics of phosphatic fertilizer source. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(1): 255-260.
- Attarzadeh, M., Balouchi, H., Rajaie, M., Movahhedi Dehnavi, M. and Salehi, A., 2019. Growth and Nutrient Content of *Echinacea Purpurea* as Affected by the Combination of Phosphorus with Arbuscular Mycorrhizal Fungus and *Pseudomonas Florescent* Bacterium under Different Irrigation Regimes. *Journal of Environmental Management*, 231: 182-188.
- Bremner, J.M., 1996. Nitrogen-total: 1085-1122. In: Sparks, D.K., (Ed.). *Methods of Soil Analysis: Chemical Methods Part 3*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, 1390p.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S. and Neil, S.J., 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *Plant Journal*, 45(1): 113-22.
- Bro wnrigg, S., McLaughlin, M.J., McBeath, T. and Vadakattu, G., 2022. Effect of acidifying amendments on P availability in calcareous soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 124: 247-262.
- Bulgari, R., Franzoni, G. and Ferrante, A., 2019. Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions. *Agronomy*, 9: 306.
- Chea, L., Meijide, A., Meinen, C., Pawelzik, E. and Naumann, M., 2021. Cultivar-Dependent Responses in Plant Growth, Leaf Physiology, Phosphorus Use Efficiency, and Tuber Quality of Potatoes Under

- Limited Phosphorus Availability Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 12: 1728.
- Chen, D., Mubeen, B., Hasnain, A., Rizwan, M., Adrees, M., Naqvi, S.A.H., Shahzad, S.M., Hussain, M., Alharby, H.F. and Irshad, M.K., 2022. Role of promising secondary metabolites to confer resistance against environmental stresses in crop plants: Current scenario and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 13: 881032.
  - Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E. and Mittler, R., 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal*, 90: 856-867.
  - Cui, Y., Lu, P., Song, G., Liu, Q., Zhu, D. and Liu, X., 2016. Involvement of PI3K/Akt, ERK and p38 signaling pathways in emodin-mediated extrinsic and intrinsic human hepatoblastoma cell apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 92: 26-37.
  - Dobermann, A., Bruulsema, T., Cakmak, I., Gerard, B., Majumdar, K., McLaughlin, M., Reidsma, P., Vanlauwe, B., Wollenberg, L., Zhang, F. and Zhang, X., 2022. Responsible plant nutrition: A new paradigm to support food system transformation. *Global Food Security*, 33: 100636.
  - El-Tanahy, A.H.H., Eltamany, E.E., Abdelhameed, R.F.A., Gaber, A.A., Hassan, A.A. and Badr J.M., 2022. Antibacterial activity of *Rubia tinctorum* extracts. *Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 6(2): 23-28.
  - Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F.A., Khaliq, A. and Saud, S., 2015. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*, 75(2): 391-404.
  - Florez-Sarasa, I., Fernie, A.R. and Gupta, K.J., 2020. Does the alternative respiratory pathway offer protection against the adverse effects resulting from climate change? *Journal of Experimental Botany*, 71: 465-469.
  - Fuglie, K.O., 2018. Is agricultural productivity slowing? *Global Food Security*, 17: 73-83.
  - Ganesh, S., Fahmida Khan, Ahmed, M.K., Velavendan, P., Pandey, N.K. and Kamachi Mudali, U., 2012. Spectrophotometric determination of trace amounts of phosphate in water and soil. *Water Science and Technology*, 66(12): 2653-2658.
  - Gong, X.H., Li, Y., Zhang, R.Q., Xie, X.F., Peng, C. and Li, Y.X., 2015. The synergism mechanism of Rhubarb Anthraquinones on constipation elucidated by comparative pharmacokinetics of Rhubarb extract between normal and diseased rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 40: 379-388.
  - Gupta, B. and Huang, B., 2014. Mechanism of salinity tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, 701596.
  - Hawkesford, M.J., Cakmak, I., Coskun, D., De Kok, L.J., Lambers, H., Schjoerring, J.K. and White, P.J., 2023. Functions of Macronutrients. *Marschner's Mineral Nutrition of Plants*. Academic Press; Cambridge, MA, USA, 201-281.
  - He, M., He, C.Q. and Ding, N.Z., 2018. Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multi stress tolerance. *Frontiers Plant Science*, 9: 1771.
  - He, M. and Ding, N.Z., 2020. Plant Unsaturated Fatty Acids: Multiple Roles in Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, Sec. Plant Physiology, 11.
  - Hu, Z., Li, T., Zheng, J., Yang, K., He, X. and Leng, P., 2015. Ca<sup>2+</sup> signal contributing to the synthesis and emission of monoterpenes regulated by light intensity in *Lilium 'siberia'*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 91: 1-9.
  - Huang, S.S., Chen, J., Dong, X.J., Patton, J., Pei, Z.M. and Zheng, H.L., 2012. Calcium and calcium receptor CAS promote *Arabidopsis thaliana* de-etiolation. *Plant Physiology*, 144: 73-82.
  - Hummel, C., Boitt, G., Santner, J., Lehto, N.J., Condron, L. and Wenzel, W.W., 2021. Co-occurring increased phosphatase activity and labile P depletion in the rhizosphere of *Lupinus angustifolius* assessed with a novel, combined 2D-imaging approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 153: 107963.
  - Ibrahim, M., Iqbal, M., Tang, Y.T., Khan, S., Guan, D.X. and Li, G., 2022. Phosphorus mobilization in plant-soil environments and inspired strategies for managing phosphorus: A review. *Agronomy*, 12(10): 2539.
  - Jezek, M., Allan, A.C., Jones, J.J. and Geilfus, C.M., 2023. Why Do Plants Blush When They Are Hungry? *New Phytologist*, 239: 494-505.
  - Johan, P.D., Ahmed, O.H., Omar, L. and Hasbullah, N.A., 2021. Phosphorus transformation in soils following co-application of charcoal and wood ash. *Agronomy*, 11(10): 2010.
  - Khan, T.A., Yusuf, M. and Fariduddin, Q., 2018. Hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism: Signalling and its effect under abiotic stress. *Photosynthetica*, 56(4): 1237-1248.

- Khoomsab, R. and Khoomsab, K., 2019. Extraction and determination of anthraquinone from herbal plant as bird repellent. *Science & Technology Asia*, 24(1): 14-20.
- Lambers, H., 2022. Phosphorus Acquisition and Utilization in Plants. *Annual Review Plant Biology*, 73:17-42.
- Li, D., Zhang, N., Cao, Y., Zhang, W., Su, G. and Sun, Y., 2013. Emodin ameliorates lipopolysaccharide-induced mastitis in mice by inhibiting activation of NF- $\kappa$ B and MAPKs signal pathways. *European Journal Pharmacology*, 705: 79-85.
- Li, P., Zhao, C., Zhang, Y., Wang, X., Wang, X. and Wang, J., 2016. Calcium alleviates cadmium-induced inhibition on root growth by maintaining auxin homeostasis in *Arabidopsis* seedlings. *Protoplasma*, 253: 185-200.
- Lin, L., Ni, B., Lin, H., Zhang, M., Li, X. and Yin, X., 2015. Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb: a review. *Journal Ethnopharmacol*, 159: 158-183.
- Liu, J., Sun, X., Xu, F., Zhang, Y., Zhang, Q., Miao, R., Zhang, J., Liang, J. and Xu, W., 2018. Suppression of *OsMDHAR4* enhances heat tolerance by mediating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stomatal closure in rice plants. *Rice*, 11: 38.
- Lopez, G., Ahmadi, S.H., Amelung, W., Athmann, M., Ewert, F., Gaiser, T., Gocke, M. I., Kautz, T., Postma, J. and Rachmilevitch, S., 2023. Nutrient Deficiency Effects on Root Architecture and Root-to-Shoot Ratio in Arable Crops. *Frontiers Plant Science*, 13: 5385.
- Loudari, A., Mayane, A., Zeroual, Y., Colinet, G. and Oukarroum, A., 2022. Photosynthetic performance and nutrient uptake under salt stress: Differential responses of wheat plants to contrasting phosphorus forms and rates. *Frontiers Plant Science (Sec. Plant Abiotic Stress)*, 13.
- McArthur, J.W. and McCord, G.C., 2017. Fertilizing growth: agricultural inputs and their effects in economic development. *Journal of Development Economics*, 127: 133-152.
- Mamnabi, S., Nasrollahzadeh, S., Ghassemi-Golezani, K. and Raei, Y., 2020. Improving yield-related physiological characteristics of spring rapeseed by integrated fertilizer management under water deficit conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27: 797-804.
- Martins, D. and Nunez, C.V., 2015. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. *Molecules*, 20(7): 13422-13495.
- Metson, G.S., MacDonald, G.K., Haberman, D., Nesme, T. and Bennett, E.M., 2016. Feeding the Corn Belt: Opportunities for phosphorus recycling in U.S. agriculture. *Science of the Total Environment*, 542: 1117-1126.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plant. *TRENDS Plant Science*, 9(10): 490-498.
- Moghadami Rad, M., Khavari-Nejad, R.A., Saadatmand, S. and Najafi, F., 2022. Effects of calcium carbonate and phosphorus fertilizer on some physiological parameters and alizarin content of *Rubia tinctorum* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 38(3): 504-518.
- Naorem, A., Jayaraman, S., Dang, Y.P., Dalal, R.C., Sinha, N.K., Rao, C.S. and Patra, A.K., 2023. Soil constraints in an arid environment- challenges, prospects, and implications. *Agronomy*, 13(1): 220.
- Niu, L. and Liao, W., 2016. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in plant science, Sec. Plant Physiology*, 7: 177967.
- Nord, E.A. and Lynch, J.P., 2008. Delayed Reproduction in *Arabidopsis thaliana* Improves Fitness in Soil with Suboptimal Phosphorus Availability. *Plant & Cell Environment*, 31: 1432-1441.
- Opala, P.A., 2017. Influence of lime and phosphorus application rates on growth of maize in an acid soil. *Advances in Agriculture*, 2017: 7083206.
- Pereira, C.G. and Meireles M.A.A., 2010. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food Bioprocess Technology*, 3: 340-372.
- Plaxton, W.C. and Lambers, H., 2015. Phosphorus metabolism in plants. *Annual Plant Reviews*, 48.
- Ryan, J., Estefan, G., Rashid, A., 2001. Soil and plant analysis laboratory manual. Second edition. Beirut, Lebanon, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA).
- Reshi, Z.A., Ahmad, W., Lukatkin, A.S. and Javed, S.B., 2023. From nature to lab: a review of secondary metabolite biosynthetic pathways,

- environmental influences, and *in vitro* approaches. *Metabolites*, 13: 895.
- Sachdev, S., Ansari, S.A., Ansari, M.I., Fujita, M. and Hasanuzzaman, M., 2021. Abiotic stress and reactive oxygen species: generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants (Basel)*, 10(2): 277.
  - Sandaña, P. and Pinochet, D., 2011. Ecophysiological determinants of biomass and grain yield of wheat under P deficiency. *Field Crops Research*, 120(2): 311-319.
  - Shahid, M.A., Sarkhosh, A., Khan, N., Balal, R.M., Ali, S., Rossi, L., Gomez, C., Mattson, N., Nasim, W. and Garcia-Sanchez, F., 2020. Insights into the physiological and biochemical impacts of salt stress on plant growth and development. *Agronomy*, 10(7): 938.
  - Tariq, A., Pan, K., Olatunji, O.A., Graciano, C., Li, Z., Sun, F., Sun, X., Song, D., Chen, W. and Zhang, A., 2017. Phosphorous Application Improves Drought Tolerance of *Phoebe zhennan*. *Frontiers Plant Science*, 8: 663-676.
  - Tariq, A., Zeng, F., Graciano, C., Ullah, A., Sadia, S., Ahmed, Z., Murtaza, G., Ismoilov, K. and Zhang, Z., 2023. Regulation of Metabolites by Nutrients in Plants. *Plant Ionomics*, 1-18.
  - Tuninetti, M., Ridolfi, L. and Laio, F., 2020. Ever-increasing agricultural land and water productivity: a global multi-crop analysis. *Environmental Research Letters*, 15: 0940a2.
  - Veronica, N., Subrahmanyam, D., Vishnu Kiran, T., Yugandhar, P., Bhadana, V. P., Padma, V., Jayasree, G. and Voleti, S.R., 2017. Influence of low phosphorus concentration on leaf photosynthetic characteristics and antioxidant response of rice genotypes. *Photosynthetica*, 55: 285-293.
  - Xin, D., Li, H., Zhou, S., Zhong, H. and Pu, W., 2022. Effects of anthraquinones on immune responses and inflammatory diseases. *Molecules*, 27(12): 3831.
  - Wahid, F., Fahad, S., Danish, S., Adnan, M., Yue, Z., Saud, S., Siddiqui, M.H., Brtnicky, M., Hammerschmiedt, T. and Datta, R., 2020. Sustainable management with mycorrhizae and Phosphate solubilizing bacteria for enhanced Phosphorus uptake in calcareous soils. *Agriculture*, 10: 334.
  - Wang, W., He, Y., Lin, P., Li, Y., Sun, R. and Gu, W., 2014. *In vitro* effects of active components of *Polygonum multiflorum* Radix on enzymes involved in the lipid metabolism. *Journal of Ethnopharmacol*, 153: 763-770.
  - Wen, Z., Li, H., Shen, J. and Rengel, Z., 2017. Maize responds to low shoot P concentration by altering root morphology rather than increasing root exudation. *Plant Soil*, 416: 377-389.
  - Wilson, H., Elliott, J., Macrae, M. and Glenn, A., 2019. Near surface soils as a source of Phosphorus in snowmelt runoff from crop land. *Journal of Environmental Quality*, 23: 445-455.
  - Yang, N., Li, C., Li, H., Liu, M., Cai, X. and Cao, F., 2019. Emodin induced SREBP1-dependent and SREBP1-independent apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Frontiers in Pharmacological*, 10: 709.
  - Zangen, M., 2007. Titration of carbonate-bicarbonate leach solutions. *Journal of Applied Chemistry*, 12(2): 92-96.
  - Zhao, C., Zhang, H., Song, C., Zhu, J.K. and Shabala, S., 2020. Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. *Innovation*, 1(1): 100017.
  - Zhou, L., Lan, W., Jiang, Y., Fang, W. and Luan, S., 2014. A calcium-dependent protein kinase interacts with and activates a calcium channel to regulate pollen tube growth. *Molecular Plant*, 7: 369-376.
  - Zou, J.J., Li, X.D., Ratnasekera, D., Wang, C., Liu, W.X. and Song, L.F., 2015. *Arabidopsis* Calcium-Dependent Protein Kinase8 and Catalase3 function in Abscisic Acid-mediated signaling and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. *Plant Cell*, 27: 1445-1460.