

اثر کربنات کلسیم و کود فسفره بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و محتوی آلیزارین روناس (*Rubia tinctorum* L.)

محمد مقدمی‌راد^۱، رضمانعلی خاوری‌نژاد^{۲*}، سارا سعادت‌مند^۳ و فرزانه نجفی^۴

۱- دانشجوی دکترای فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- *استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیک: ra.khavarinejad@gmail.com

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

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

تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۱

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۰

چکیده

روناس (*Rubia tinctorum* L.) گیاهی علفی و پایا است که دارای ترکیب‌های فعال زیستی با توان بالای دارویی و رنگی می‌باشد. کشاورزان محلی معتقدند افزایش آهک خاک سبب افزایش ترکیب‌های رنگی در این گیاه می‌گردد. به منظور بررسی محتوای آلیزارین ریشه روناس و برخی شاخص‌های فیزیولوژیک آن تحت تأثیر کربنات کلسیم و کود فسفره، آزمایشی مزرعه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل کربنات کلسیم در پنج سطح (۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) و سوپرفسفات تریپل در چهار سطح (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) بودند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش مقدار کربنات کلسیم تا ۲۰ کیلوگرم در هکتار و افزایش سوپرفسفات تریپل تا ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار، بیشترین وزن خشک ریشه با افزایش ۷۵٪ نسبت به شاهد، وزن خشک کل گیاه با افزایش ۵۸٪ نسبت به شاهد، محتوای آلیزارین ریشه با افزایش ۷۸٪ نسبت به شاهد و فعالیت کاتالاز ریشه حاصل گردید. بیشترین طول ریشه با افزایش ۵۴٪ نسبت به شاهد و فعالیت کاتالاز برگ در تیمار ۵۰ کیلوگرم در هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار سوپرفسفات تریپل مشاهده شد. بیشترین فعالیت پراکسیداز برگ و ریشه در تیمار ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار کربنات کلسیم و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار سوپرفسفات تریپل مشاهده شد. استفاده همزمان این دو کود روی یکدیگر اثر مکمل داشت، به طوری که، کاربرد ۲۰ و ۵۰ کیلوگرم در هکتار کربنات کلسیم همراه با ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار سوپرفسفات تریپل اثر افزایشی بر محتوای آلیزارین ریشه روناس داشت. این روش می‌تواند برای توسعه آینده یک آزمایش تحمل غیرمخرب که پاسخ افزایشی روناس به کربنات کلسیم و کود فسفره را نشان می‌دهد، برای تولید بیشتر ترکیب‌های دارویی ریشه روناس به‌عنوان یک داروی هدفمند برای درمان سرطان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، حاصلخیزکننده‌ها، روناس (*Rubia tinctorum* L.)، شاخص‌های رشد، ترکیب‌های دارویی - رنگی.

مقدمه

روناس (*Rubia tinctorum* L.) گیاهی علفی و پایا است، از ویژگی‌های آن تولید ترکیب‌های فعال زیستی با توان بالای دارویی و رنگی است (Daiane & Cecilia, 2015). ریشه روناس به‌عنوان مهمترین بخش اقتصادی آن شناخته شده و حاوی آلزارین و برخی مشتقات آنتراکینونی است (Angelini et al., 2004; Vasconsuelo et al., 1997). مطالعات نشان داده‌اند که ترکیب‌های ثانویه روناس در صنایع داروسازی (Khalil et al., 2006; Hazara et al., 2004)، نساجی (Smith et al., 1997; Angelini et al., 2004)، و رنگ‌آمیزی بافت‌های آهکی شده (Javidan, 2005; al., 2004) کاربرد دارند. مطالعات دارویی اخیر نشان داده‌اند که آلزارین، پورپورین و دی- و تری هیدروکسی آنتراکینون‌های مشتق شده از ریشه روناس درجه خاصی از اثرهای مهاری انتخابی نسبت به سلول‌های سرطانی داشته و کاربرد آن را به‌عنوان یک داروی هدفمند برای درمان سرطان نشان می‌دهند (Lajko et al., 2015).

یکی از نیازهای مهم در برنامه‌ریزی‌های زراعی برای حصول عملکرد بالا و کیفیت مطلوب، ارزیابی سیستم‌های تغذیه گیاهان است (Ayala & Prakasa Rao, 2002). در تولید گیاهان دارویی، ترکیب‌های ثانویه این گیاهان ممکن است به‌طور مثبت یا منفی به کودها پاسخ بدهند که این موضوع مستلزم انجام مطالعات تغذیه‌ای می‌باشد (Dufault et al., 2003). گیاهی که بهینه تغذیه شده و به‌مقدار کافی عناصر مورد نیاز را دریافت کرده باشد، کمیت و کیفیت محصول آن تحت تأثیر قرار خواهد گرفت و بازده بهتری خواهد داشت.

پژوهش‌های فراوانی در مورد اثرهای کربنات کلسیم در خاک و تغذیه گیاهان وجود دارد، از جمله می‌توان به نقش کربنات کلسیم در کاهش سمیت منیزیم یا آلومینیم در خاک (Rahman et al., 2018; Toma et al., 2005)، بهبود تثبیت نیتروژن میکروبی در خاک (Weisany et al., 2013)، برخی عناصر خاک در تغذیه گیاه (Bityutski et al., 2019) و شرایط فیزیکی خاک اشاره کرد (Kader &

Lindberg, 2010; White & Broadley, 2003). همچنین یون کلسیم در فرایندهای حفظ ساختمان غشاء، پایداری ساختمان دیواره سلولی و تنظیم و کنترل تبادلات یونی نقش دارد و به‌عنوان یک پیام‌رسان ثانویه در سلول عمل می‌کند (Charpentier, 2018; Costa et al., 2018; Manishankar et al., 2018; White & Broadley, 2003).

از سوی دیگر، در غلظت‌های بالای آهک، فسفر اغلب به دلیل pH بالا و واکنش با کلسیم در دسترس نیست. البته جذب فسفر در خاک‌های آهکی از طریق افزایش مصرف کودهای شیمیایی فسفره امکان‌پذیر است (Ferguson, 2006). زیرا دسترسی و جذب فسفات در محیط ریزوسفر ریشه افزایش یافته و باعث ارتقای کارایی فیزیولوژیک فسفر در گیاه می‌شود (Padmavathi & Lakshamma, 2003). همچنین فسفر یکی از عناصر ضروری برای رشد و تکثیر گیاهان می‌باشد و برای ذخیره‌سازی و انتقال انرژی بکار می‌رود (Hopkins & Ellsworth, 2003). از این رو، تأثیر دو عامل کربنات کلسیم و کود فسفره بر محتوای دارویی - رنگی روناس مورد استفاده قرار گرفت.

در خاک‌های قلیایی و آهکی به دلیل pH بالا و محتوای کربنات کلسیم، دسترسی آهن در بافت‌های گیاهی کاهش می‌یابد و آهن بیشتر به حالت هیدروکسید نامحلول باقی می‌ماند (Ahmad et al., 2014). از سوی دیگر، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نیز تحت تأثیر کربنات کلسیم است (Chao et al., 2021). سیستم‌های آنزیمی آنتی‌اکسیدانی یکی از این سازوکارهای حفاظتی گیاهان است (Meloni et al., 2004). از این رو، دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز که در ترکیب آنها آهن وجود دارد، برای بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف کربنات کلسیم بر دسترسی آهن در نظر گرفته شدند. کاتالاز آنزیمی دارای آهن است که در سلول‌های گیاهی یافت شده و با تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن در کاهش اثرهای تخریبی آن نقش دارد (Preston et al., 2001; Scandalios, 1997). پراکسیدازها هم پروتئین‌های دارای آهن هستند که وجود کلسیم و حداقل چهار باند

دی سولفید در ساختار پروتئین آنها به اثبات رسیده که به شکل گیری و استحکام ساختار سه بعدی مولکول آن کمک می کنند. این آنزیم دو سوبسترای که پراکسید هیدروژن را تبدیل به آب می کند، در مسیر کاتالیز خود باعث اکسید شدن بسیاری از سوبستراهای آلی و غیر آلی می شود؛ تنوع سوبستراهای پراکسیداز و تولید موادی مانند لیگنین و سوبرین دلیل قاطعی بر عملکرد این آنزیم در متابولیسم ثانویه سلول های گیاهیست (Cogrove, 2001; Scialabba et al., 2002). همچنین پراکسیدازها به علت شرکت در دو چرخه پراکسیداتیو و هیدروکسیلیک می توانند در طیف وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیک مانند رشد سلولی شرکت کنند (Cogrove, 2001; Welinder, 1979).

دانش بومی کشاورزان محلی در مورد گیاه روناس مبنی بر این است که در خاک های شنی - رسی، ریشه بیشتری تولید می کند و در زمین های آهکی محتوای آلیزارین مرغوب تر است. هدف از این پژوهش، با توجه به دانش بومی ذکر شده، حصول عملکرد و کیفیت مطلوب تر، با استفاده از سطوح مختلف کربنات کلسیم و کود فسفره بر محتوای آلیزارین، فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز و برخی شاخص های رشد در روناس است.

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 کود فسفره به شکل سوپرفسفات تریپل تهیه و به مزرعه منتقل شدند. پس از اینکه زمین آماده کشت گردید، بذرها را روناس سالم تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی 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 باقی مانده به عنوان اثر حاشیه ای حذف و بقیه گیاهان به عنوان جامعه آماری در نظر گرفته شدند. در ردیف های منظم به فاصله تقریباً هفتاد سانتی متر، در حفره هایی به عمق پنج سانتی متر تعداد ۲۰ تا ۲۵ عدد بذر ریخته و روی آن با خاک پوشانده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل با دو عامل و چهار تکرار در قالب طرح پایه

مواد و روش ها

شرایط جغرافیایی و اقلیمی منطقه

این پژوهش به صورت کشت در شرایط مزرعه در سال های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹ در شهرستان اردکان (طول جغرافیایی ۵۳ درجه و ۴۸ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۲۰ دقیقه شمالی) در استان یزد انجام شد. دما و بارندگی سالانه منطقه مورد مطالعه براساس ایستگاه سینوپتیک اردکان در بازه زمانی ده ساله، به ترتیب برابر ۱۸/۵ درجه سانتی گراد و ۷۵ میلی متر است. رژیم حرارتی و رطوبتی خاک منطقه به ترتیب هایپرترمیک و اردیک (توریک) است و از لحاظ رده بندی آمریکایی در رده انتیسول و زیر رده اورتننت قرار دارد (Mahdavi Ardakani

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

به ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم (۶۰ میلی‌مولار با pH برابر ۶/۱) و ۰/۵ میلی‌لیتر گایاکول (۲۸ میلی‌مولار) و ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن (۵ میلی‌مولار) اضافه کرده و جذب آن به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۳۶ نانومتر قرائت گردید. فعالیت آنزیمی به صورت تغییرات جذب در واحد زمان و واحد وزن تر نمونه گیاهی (ریشه و برگ به صورت جداگانه) محاسبه شد (Mac-Adam, 1992).

اندازه‌گیری محتوای آلیزارین

بعد از خشک کردن ریشه، آنها را به وسیله آسیاب برقی پودر کرده و در مرحله بعد در بن‌ماری در دمای ۷۰°C یک گرم نمونه پودر شده را با ۵۰ میلی‌لیتر متانول مخلوط کرده، سپس نمونه‌ها را به مدت یک ساعت روی شیکر قرار داده تا سرد شوند. نمونه‌ها را صاف کرده و حجم آنها با متانول ۸۰٪ به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. یک میلی‌لیتر آلیزارین استاندارد در متانول (HPLC grade)، با شرایط ذکر شده در بالا حل گردید. غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ آلیزارین استاندارد تهیه شده برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر Carry-100 خوانده شد. محتوای آلیزارین با استفاده از روش Siebenborn و همکاران (۲۰۰۱) محاسبه گردید.

تحلیل آماری

بررسی‌های آماری با استفاده از آزمون آماری تحلیل واریانس دو طرفه ANOVA و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال $P \leq 0.05$ توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد.

نتایج

تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده و متقابل تیمارهای

بلوک‌های کامل تصادفی اجرا شد. 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 شد. 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.

آنالیز رشد

گیاهان در پایان دوره رشد برای آنالیز رشد برداشت شدند. طول ریشه بلافاصله پس از برداشت اندازه‌گیری شد (Newman, 1966)، برای بدست آوردن وزن خشک کل گیاه و وزن خشک ریشه هر یک از تیمارها، نمونه‌ها را در آون به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از خارج شدن نمونه‌ها از آون، نمونه‌ها به دسیکاتور منتقل و بعد وزن خشک هر یک تعیین گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز براساس تجزیه H_2O_2 توسط اندازه‌گیری تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه با فواصل زمانی ۱۵ ثانیه انجام شد. مخلوط ۳ میلی‌لیتری واکنش شامل ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار بر لیتر (pH برابر ۷) همراه با ۰/۵ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن، ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و ۰/۹۵ میلی‌لیتر آب مقطر است و کاهش در جذب در ۲۴۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر ثبت شد. فعالیت آنزیمی بر حسب میکرومول H_2O_2 تجزیه شده در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Aebi, 1984).

۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار کود فسفره مشاهده شد. تجزیه واریانس دو عاملی نشان داد که اثر ساده و متقابل تیمارهای مختلف کربنات کلسیم و کود فسفره بر فعالیت پراکسیداز ریشه و برگ، به ترتیب در سطح احتمال ۰/۰۰۱ و ۰/۰۵ معنی دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داد که در تمامی سطوح پنج‌گانه کربنات کلسیم با افزایش مقدار کود فسفره فعالیت پراکسیداز ریشه در تیمار توأم ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار کود فسفره مشاهده شد.

تجزیه واریانس دو عاملی نشان داد که اثر ساده و متقابل تیمارهای مختلف کربنات کلسیم و کود فسفره بر محتوای آلیزارین ریشه روناس در سطح احتمال ۰/۰۰۱ معنی دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها در شکل ۸ نشان داد که به موازات افزایش مقدار کود فسفره تا سطح ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار افزایش محتوای آلیزارین ریشه روناس مشاهده شد، اما در سطح ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار مقدار آن کاهش یافت. در تیمار ۲۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار کود فسفره بیشترین محتوای آلیزارین با افزایش ۷۸٪ نسبت به کنترل و کمترین آن در تیمار ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم مشاهده شد.

ضریب همبستگی پیرسون برای تعیین ارتباط محتوای آلیزارین با شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تحت تیمارهای مختلف کربنات کلسیم و کود فسفره (جدول ۳) تعیین شد. همبستگی معنی دار مثبت بین محتوای آلیزارین با طول ریشه، وزن خشک ریشه، وزن خشک کل گیاه و میزان فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در ریشه و برگ در سطح احتمال ۰/۰۱ مشاهده شد. نتایج نشان‌دهنده ارتباط قوی بین محتوای آلیزارین و پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تحت تیمارهای مختلف مورد بررسی است.

مختلف کربنات کلسیم و کود فسفره بر طول ریشه و وزن خشک ریشه در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین طول ریشه با افزایش ۵۴٪ نسبت به کنترل در تیمار ۵۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار کود فسفره مشاهده شد. کمترین طول ریشه در سطح ۱۵۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم دیده شد. همچنین بیشترین طول ریشه و وزن خشک ریشه در عامل کود فسفره در سطح متوسط ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار مشاهده شد. مقایسه میانگین‌ها در تیمارهای متقابل نشان داد که بیشترین وزن خشک کل گیاه و وزن خشک ریشه، به ترتیب با افزایش ۵۸٪ و ۷۵٪ نسبت به کنترل در تیمار ۲۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار کود فسفره مشاهده شد (شکل ۱ و ۲).

تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده و متقابل تیمارهای مختلف کربنات کلسیم و کود فسفره بر وزن خشک کل گیاه در سطح احتمال ۰/۰۰۱ معنی دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها در شکل ۳ نشان می‌دهد که تیمار ۲۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار کود فسفره بیشترین مقدار وزن خشک کل گیاه را به خود اختصاص داده‌اند. همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد که عامل کود فسفره اثر افزایشی بر وزن خشک کل گیاه داشت.

تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده و متقابل تیمارهای مختلف کربنات کلسیم و کود فسفره بر فعالیت کاتالاز برگ و ریشه در سطح احتمال ۰/۰۰۱ معنی دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داد که با افزایش مقدار کود فسفره تا سطح ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار افزایش فعالیت کاتالاز در برگ و ریشه مشاهده شد. بیشترین مقدار کاتالاز ریشه در تیمار توأم ۲۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و ۱۰۰ کیلوگرم بر هکتار کود فسفره دیده شد. بیشترین مقدار کاتالاز برگ در تیمار توأم ۵۰ کیلوگرم بر هکتار کربنات کلسیم و

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک محل آزمایش

Table 1. Some physicochemical properties of experimental soil

HCO ₃	Cl ⁻	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Fe ²⁺	HPO ₄ ²⁻	pH	N	Clay	Sand	Silt
meq.L ⁻¹								%				
1.2	28.8	0.1	23.8	27.6	11.6	1.5	24.9	7.6	0.1	39	21	40

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر کربنات کلسیم و سوپرفسفات تریپل روی برخی صفات گیاه روناس

Table 2. ANOVA of calcium carbonate (cc) and triple superphosphate (tsp) effects on some traits of *Rubia tinctorum*

Sources of variation	d.f.	Root dry weight	Root length	Total dry weight	Leaf catalase	Leaf peroxidase	Root catalase	Root peroxidase	Alizarin content
cc	4	1.33 ^{***}	2073.60 ^{**}	9.19 ^{***}	0.00 ^{***}	0.00 ^{***}	0.00 ^{***}	0.00 ^{***}	7.49 ^{***}
tsp	3	0.27 ^{***}	358.60 ^{***}	2.66 ^{***}	0.00 ^{***}	0.00 ^{***}	0.00 ^{***}	0.01 ^{***}	0.36 ^{***}
cc × tsp	19	0.02 [*]	18.30 [*]	0.17 ^{***}	0.00 ^{***}	0.00 ^{**}	0.00 ^{***}	0.00 ^{***}	0.32 ^{***}
Experimental error	6	0.00	8.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

***, **, and *: significant at probability levels of 0.001, 0.01, and 0.05, respectively.

جدول ۳- ضریب همبستگی پیرسون برای تعیین ارتباط محتوای آلیزارین با پارامترهای فیزیولوژیک و فعالیت آنتی اکسیدانی کاتالاز و

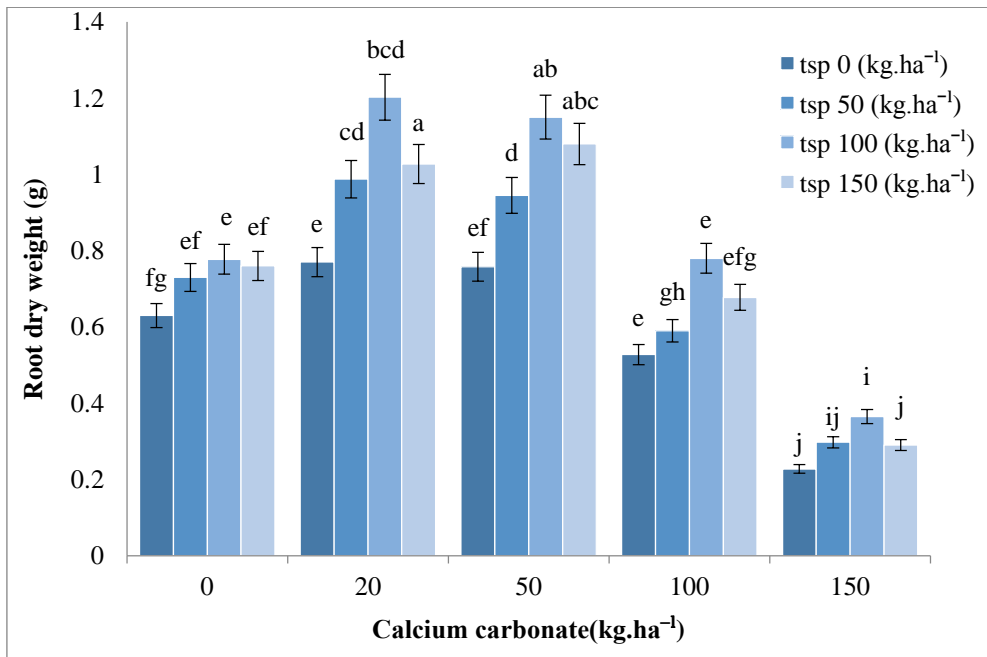
پراکسیداز گیاه روناس تحت تیمارهای مختلف سوپرفسفات تریپل و کربنات کلسیم

Table 3. Pearson's correlation coefficient to determine relationship between alizarin content and physiological parameters and antioxidant activity of catalase and peroxidase of *Rubia tinctorum* under different triple superphosphate and calcium carbonate treatments

Pearson's correlation									
Alizarin content	1								
RL	0.80 ^{**}	1							
RDW	0.78 ^{**}	0.99 ^{**}	1						
TDW	0.77 ^{**}	0.96 ^{**}	0.95 ^{**}	1					
Root CAT	0.82 ^{**}	0.72 ^{**}	0.72 ^{**}	0.68 ^{**}	1				
Root POX	-0.47 ^{**}	-0.03 ^{ns}	-0.03 ^{ns}	0.03 ^{ns}	-0.42 ^{**}	1			
Leaf CAT	0.75 ^{**}	0.55 ^{**}	0.55 ^{**}	0.51 ^{**}	0.89 ^{**}	-0.49 ^{**}	1		
Leaf POX	-0.64 ^{**}	-0.22 ^{ns}	-0.22 ^{ns}	-0.16 ^{ns}	-0.63 ^{**}	0.86 ^{**}	-0.61 ^{**}	1	

ns., **, and *: not significant, and significant at probability levels of 0.01 and 0.05, respectively.

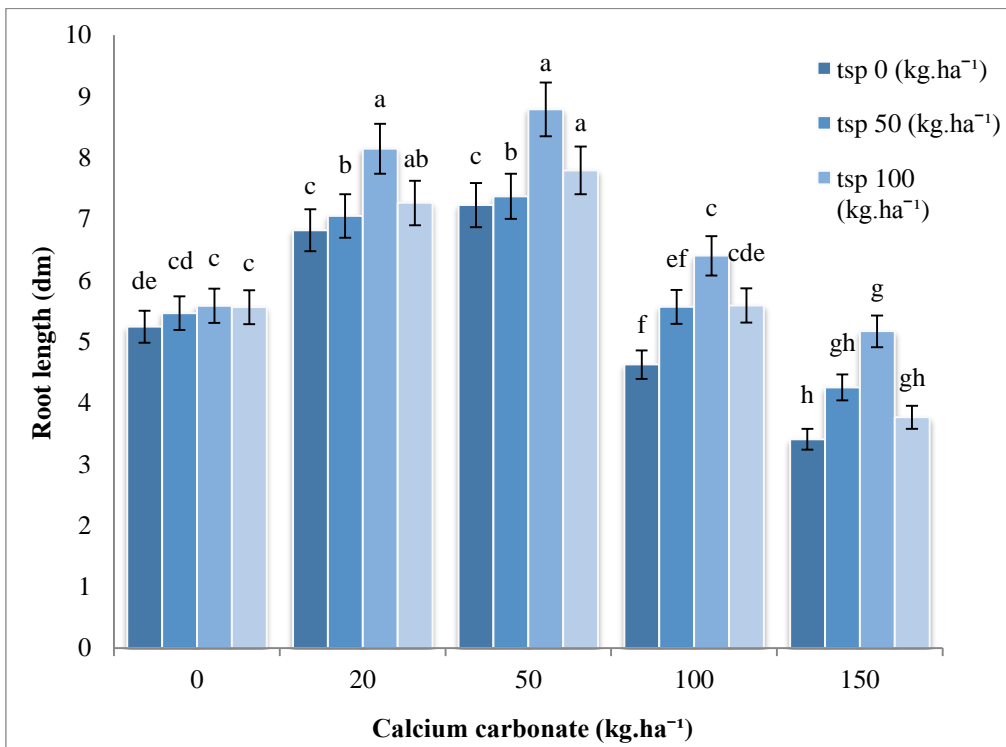
RL: Root length, RDW: Root dry weight, TDW: Total dry weight, CAT: Catalase, POX: Peroxidase.



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل سوپرفسفات تریپل و کربنات کلسیم بر وزن خشک ریشه روناس

Figure 1. Means comparison of triple superphosphate (tsp) and calcium carbonate interaction effects on *Rubia tinctorum* root dry weight

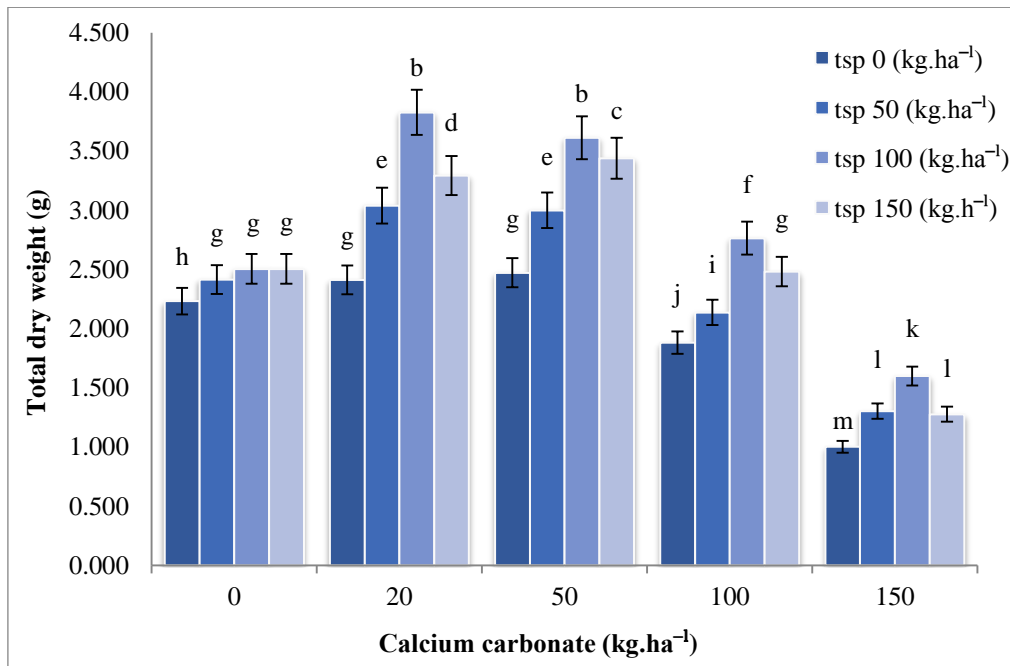
Means with at least one common letter are not significantly different at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل سوپرفسفات تریپل و کربنات کلسیم بر طول ریشه روناس

Figure 2. Means comparison of triple superphosphate (tsp) and calcium carbonate interaction effects on *Rubia tinctorum* root length

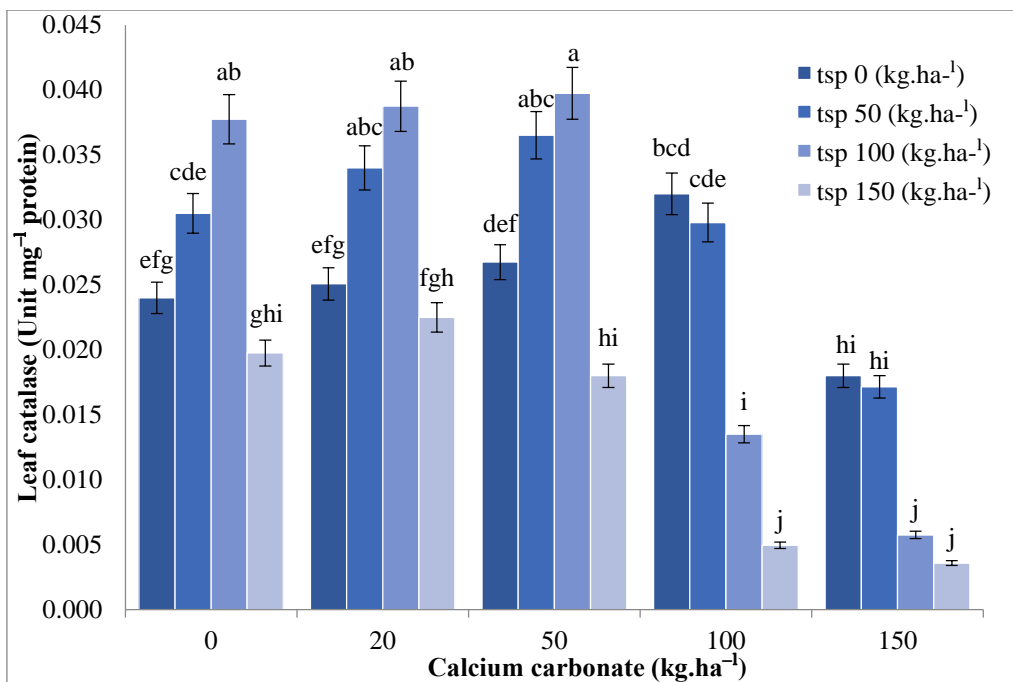
Means with at least one common letter are not significantly different at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل سوپرفسفات تریپل و کربنات کلسیم بر وزن خشک کل روناس

Figure 3. Means comparison of triple superphosphate (tsp) and calcium carbonate interaction effects on *Rubia tinctorum* total dry weight

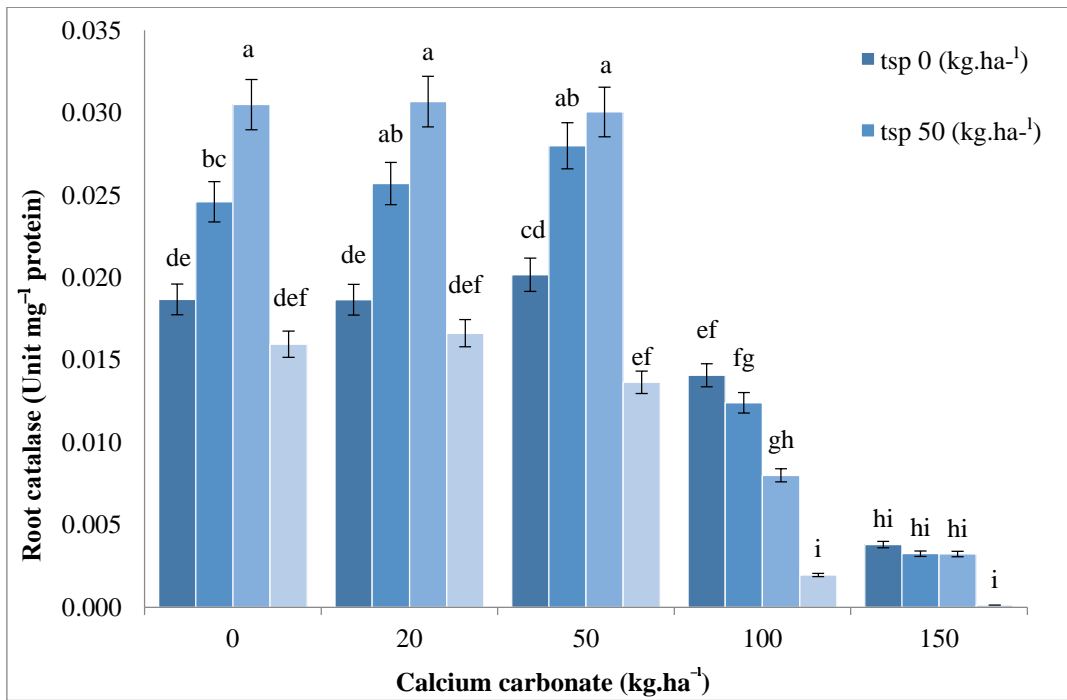
Means with at least one common letter are not significantly different at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل سوپرفسفات تریپل و کربنات کلسیم بر فعالیت کاتالاز برگ روناس

Figure 4. Means comparison of triple superphosphate (tsp) and calcium carbonate interaction effects on *Rubia tinctorum* leaf catalase activity

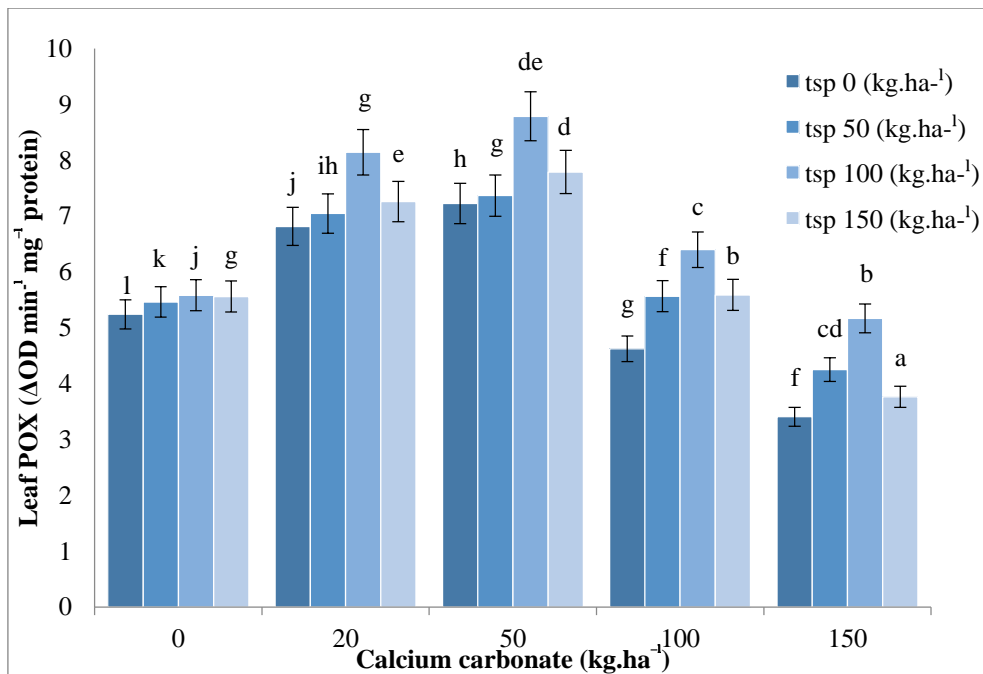
Means with at least one common letter are not significantly different at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل سوپرفسفات تریپل و کربنات کلسیم بر فعالیت کاتالاز ریشه روناس

Figure 5. Means comparison of triple superphosphate (tsp) and calcium carbonate interaction effects on *Rubia tinctorum* root catalase activity

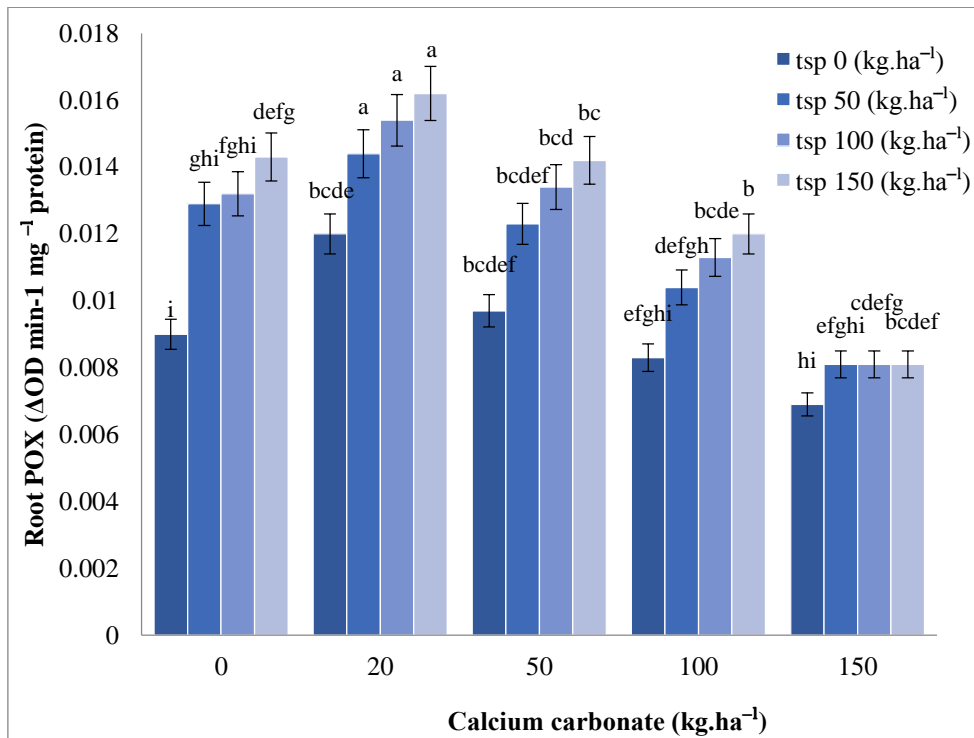
Means with at least one common letter are not significantly different at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل سوپرفسفات تریپل و کربنات کلسیم بر فعالیت پراکسیداز برگ روناس

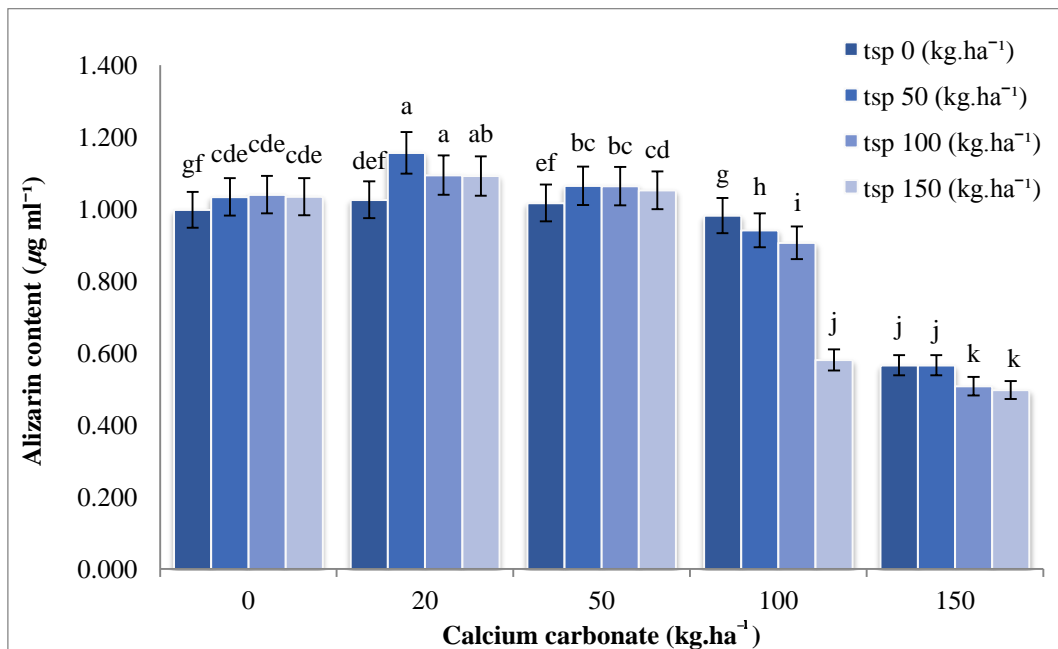
Figure 6. Means comparison of triple superphosphate (tsp) and calcium carbonate interaction effects on *Rubia tinctorum* leaf peroxidase (POX) activity

Means with at least one common letter are not significantly different at 5% probability level (Duncan test).



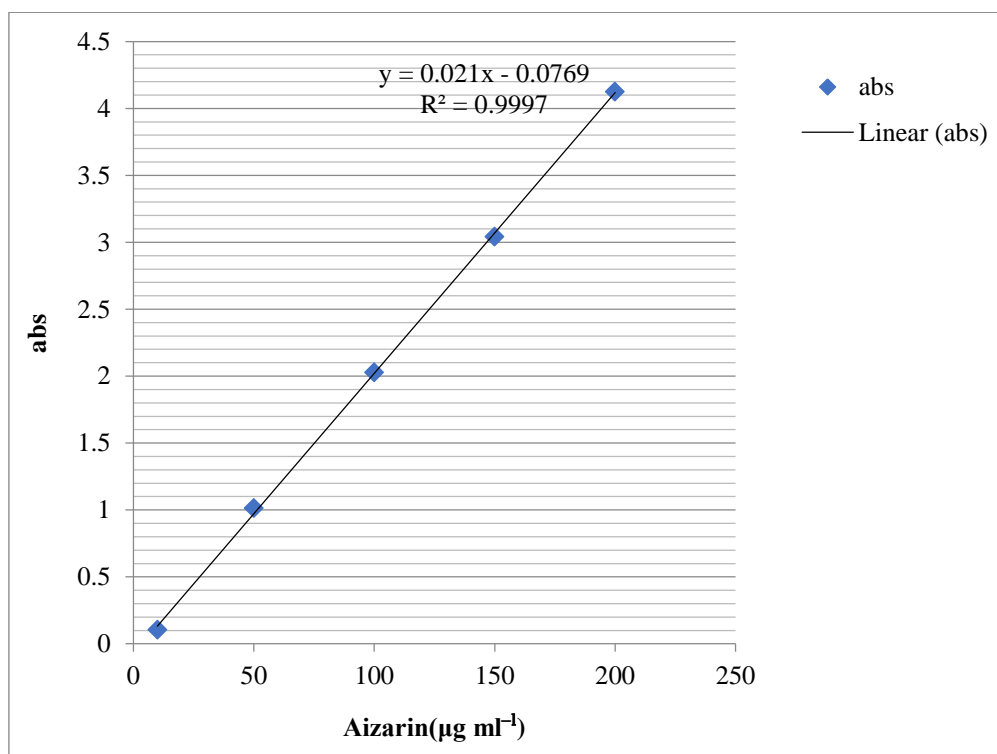
شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل سوپرفسفات تریپل و کربنات کلسیم بر فعالیت پراکسیداز ریشه روناس

Figure 7. Means comparison of triple superphosphate (tsp) and calcium carbonate interaction effects on *Rubia tinctorum* root peroxidase (POX) activity
Means with at least one common letter are not significantly different at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل سوپرفسفات تریپل و کربنات کلسیم بر محتوی آلیزارین ریشه روناس

Figure 8. Means comparison of triple superphosphate (tsp) and calcium carbonate interaction effects on *Rubia tinctorum* alizarin content
Means with at least one common letter are not significantly different at 5% probability level (Duncan test).



شکل ۹- منحنی کالیبراسیون استاندارد آلیزارین

Figure 9. Alizarin standard calibration curve

بحث

محدود می‌کند، یا ناشی از هزینه انرژی سوخت‌وساز مربوط به کاهش میزان فتوسنتز در واحد سطح برگ، کاهش جذب کربن، صدمه به بافت‌ها و رسیدن به حداکثر غلظت نمکی باشد که گیاه آن را تحمل می‌کند. در سطوح یونی بالاتر احتمالاً جذب غیرمتعارف یون، روندهای طبیعی متابولیسم را مختل کرده و گیاه بخشی از انرژی مواد آلی را به جای تخصیص به رشد، به تولید محلول‌های سازگار، تعدیل اسمزی و حفظ سلول اختصاص می‌دهد (Meneguzzo *et al.*, 2000). کاهش وزن خشک در سطوح بالای کربنات 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 (Tize & Zeiger, 2010).

با افزایش مقدار کود فسفره پارامترهای طول ریشه، وزن خشک ریشه و وزن خشک کل گیاه افزایش یافتند. فسفات نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها دارد و نیاز به

در مقادیر متوسط کربنات کلسیم بیشترین مقدار طول ریشه، وزن خشک ریشه و وزن خشک کل گیاه مشاهده شد. زیرا مقادیر متوسط کربنات کلسیم با افزایش pH خاک باعث تجمع کلئوئیدها شده و تراوایی و تهویه خاک را تنظیم می‌کند (Hopkins & Ellsworth, 2003). همچنین مقادیر متوسط کربنات کلسیم در لایه زیرین خاک، فسفات در دسترس را افزایش می‌دهد و افزودن بیشتر کربنات کلسیم به خاک باعث کمبود فسفات خواهد شد (Opala, 2017). از سوی دیگر، در خاک‌های آهکی قابلیت جذب فسفات به‌طور عمده توسط کربنات کلسیم، pH بالا و کمبود مواد آلی محدود می‌شود (Hopkins & Ellsworth, 2003). کاهش طول ریشه، وزن خشک ریشه و وزن خشک کل گیاه با افزایش غلظت تیمار کربنات کلسیم ممکن است مربوط به کاهش سطح فسفر خاک باشد (Opala, 2017) که در گیاه به کاهش تولید پروتئین می‌انجامد و رشد ریشه و گیاه را

با دانش شفاهی کشاورزان محلی نیز مطابقت دارد. در این مطالعه، با توجه به نتایج حاصل می‌توان پیشنهاد کرد در منطقه مورد آزمایش، غلظت‌های ۲۰ و ۵۰ کیلوگرم در هکتار کربنات کلسیم توأم با غلظت ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کود فسفره می‌تواند گزینه‌ای مناسب برای افزایش محتوای آلیزارین موجود در ریشه روناس باشد. این روش می‌تواند برای توسعه آینده یک آزمایش تحمل غیرمخرب که پاسخ افزایشی در محتوای دارویی - رنگی روناس به کربنات کلسیم و کود فسفره را نشان می‌دهد، در راستای تولید بیشتر ترکیب‌های دارویی ریشه روناس به‌عنوان یک داروی هدفمند برای درمان سرطان مورد بهره‌برداری قرار گیرد. چون برای اولین بار این پژوهش انجام شده، تحقیقات بیشتری برای تأیید نتایج بدست آمده ضروری می‌باشد.

References

- Abebe, G., Hattar, B. and Al-Tawaha, A.R.M., 2005. Nutrient availability as affected by manure application to cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp.) on calcareous soils. *Journal of Agricultural and Social Science*, 1: 1-6.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Method of Enzymology*, 105(1): 121-126.
- Ahmad, F., Maqsood, M.A., Aziz, T. and Cheem, M.A., 2014. Water soluble iron (Fe) concentration in alkaline and calcareous soils influenced by various Fe sources. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 51(2): 417-421.
- Angelini, L., Pistelli, G., Belloni, P., Bertoli, A. and Panconeri, S., 1997. *Rubia tinctorum* a source of natural dyes: Agronomic evaluation, quantitative analysis of alizarin and industrial assays. *Industrial Crops and Products*, 6: 303-311.
- Ayala, S. and Prakasa Rao E.V.S., 2002. Perspectives of soil fertility management with a focus on fertilizer use for crop productivity. *Current Science*, 82: 797-807.
- Bargaz, A., Nassar, R.M.A., Rady, M.M., Gaballah, M.S., Thompson S.M. and Brestic, M., 2016. Improved salinity tolerance by phosphorus fertilizer in two *Phaseolus vulgaris* recombinant inbred lines contrasting in their P-efficiency. *Journal of Agronomy and Crop Sciences*, 202(6): 497-507.
- Bitvutski, N.P., Yakkonen, K.L., Petrova, A.I., Lukina, K.A. and Shavarda, A.L., 2019. Calcium carbonate reduces the effectiveness of soil-added monosilicic acid in cucumber plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19: 660-670.

فسفات کافی، مربوط به نقش این عنصر در تنظیم تجمع یون‌ها در داخل سلول است (Bargaz *et al.*, 2016). میزان تحرک فسفر در خاک‌های قلیایی بسیار ناچیز است و با افزایش مصرف کودهای فسفره مقدار دسترسی و جذب فسفات در محیط ریزوسفر ریشه‌ها افزایش یافته و باعث ارتقای کارایی فیزیولوژیک فسفات در گیاه می‌شود (Padmavathi & Lakshamma, 2003). همچنین فسفر به‌عنوان یکی از عناصر پرمصرف، نقش مهمی در تولید محصول در خاک‌های دارای کربنات کلسیم مناطق خشک و نیمه‌خشک دارد (Hopkins & Ellsworth, 2003).

نتایج نشان داد در غلظت‌های بالای کربنات کلسیم میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز تحت غلظت‌های بالای یون‌های فلزی می‌تواند به‌دلیل ممانعت از سنتز آنزیم یا تغییر در تجمع زیر واحدهای آن باشد (Abebe *et al.*, 2005). همچنین در خاک‌های قلیایی و آهکی به‌دلیل pH بالا و محتوای کربنات کلسیم، دسترسی آهن در بافت‌های گیاهی کاهش می‌یابد و آهن بیشتر به حالت هیدروکسید نامحلول باقی می‌ماند. همچنین منابع گوناگون محلول‌های مختلف در خاک ممکن است باعث درجات مختلفی از دسترسی به آهن باشند (Ahmad *et al.*, 2014). از این رو، در شرایط کمبود آهن، آنزیم آهن‌دار کاتالاز با کاهش فعالیت مواجه شد (Santos *et al.*, 2019).

نتایج بدست آمده نشان داد که به‌موازات افزایش غلظت کود فسفره و کربنات کلسیم میزان فعالیت پراکسیداز برگ و ریشه افزایش یافت. زیرا وجود جایگاه‌های اتصال کلسیم و پل‌های دی‌سولفید پایداری آنزیم را تأمین می‌کنند. همچنین فعالیت پراکسیدازی به حضور کلسیم یا یون مشابهی به لحاظ شعاع یونی وابسته است (Tams & Welinder, 1994; XU & Van Hugstee, 1994).

نتایج بدست آمده نشان داد که با افزایش غلظت فسفات، محتوای آلیزارین ریشه افزایش معنی‌داری یافت. محتوای آلیزارین ریشه، به‌ویژه در سطوح متوسط کربنات کلسیم و کود فسفره افزایش ۷۸ درصدی نشان داد. نتایج بدست آمده

- Mahdavi Ardakani, S.R., Jafari, M., Zargham, N., Zare Chahouki, M.A., Baghestani Meibodi, N. and Tavili, A., 2011. Investigation on the effects of *Haloxylon aphyllum*, *Seidlitzia rosmarinus* and *Tamarix aphylla* on soil properties in Chah Afzal-Kavir (Yazd). Iranian Journal of Forest, 2(4): 357-365.
- Manishankar, P., Wang, N., Köster, P., Alatar, A.A. and Kudla, J., 2018. Calcium signaling during salt stress and in the regulation of ion homeostasis. Journal of Experimental Botany, 69(17): 4215-4226.
- Mac-Adam, J.W. and Nelson Sharp, C.J., 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. Journal of Plant Physiology, 99(3): 872-878.
- Meloni, D.A., Gulotta, M.R., Martínez, C.A. and Oliva, M.A., 2004. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. Brazilian Journal of Plant Physiology, 16(1): 39-46.
- Meneguzzo, S., Navari-Izzo, F. and Izzo, R., 2000. NaCl effects on water relations and accumulation of mineral nutrients in shoots, roots and cell sap of wheat seedlings. Journal of Plant Physiology, 156: 711-716.
- Murphy, J. and Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analysis Chemical Acta, 27: 31-36.
- Newman, E.I., 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. Journal of Applied Ecology, 3: 139-145.
- Opala, P.A., 2017. Influence of lime and phosphorus application rates on growth of maize in an acid soil. Advances in Agriculture, 2017: 7083206.
- Padmavathi, P. and Lakshamma, P., 2003. Optimizing irrigation in relation to phosphorus nutrition in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Sesame and Safflower Newsletter, 18: 102-106.
- Preston, T.J., Muller, W.J. and Singh, G., 2001. Scavenging of extra cellular H₂O₂ by catalase inhibits the proliferation of HER-2/Neu-transformed rat-1 fibroblasts through the induction of a stress response. Journal of Biological Chemistry, 276(12): 9558-9564.
- Rahman, M.A., Lee, S.H., Ji, H.C., Kabir, A.H., Jones, C.S. and Lee, K.W., 2018. Importance of mineral nutrition for mitigating aluminum toxicity in plants on acidic soils: current status and opportunities. International Journal of Molecular Sciences, 19(10): 1-28.
- Rayan, J.R., Estefan, G. and Rashid, A., 2001. Soil and Plant Analysis Laboratory Manual. ICARDA, Syria, 244p.
- Santos, C.S., Ozgur, R., Uzilday, B., Turkan, I., Roriz, M., Rangel, A.O.S.S., Carvalho S.M.P. and Vasconcelos, M.W., 2019. Understanding the role of the antioxidant system and the tetrapyrrole cycle in iron deficiency chlorosis. Plants (Basel), 8(9): 348.
- Scandalios, J.G., 1997. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor, 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.
- Charpentier, M., 2018. Calcium signals in the plant nucleus: origin and function. Journal of Experimental Botany, 69(17): 4165-4173.
- Chao, Y.Y., Wang, W.J. and Liu, Y.T., 2021. Effect of calcium on the growth of dajulis (*Chenopodium formosanum* Koidz.) sprouts. Agronomy, 82: 1-11.
- Cogrove, D.J., 2001. Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. Plant Physiology, 125: 131-134.
- Costa, A., Navazio, L. and Szabo, I., 2018. The contribution of organelles to plant intracellular calcium signaling. Journal of Experimental Botany, 69(17): 4175-4193.
- Daiane, M. and Cecilia, V.N., 2015. Secondary metabolites from Rubiaceae species. Molecules, 20(7): 13422-13495.
- Dufault, R.J., Rushing, J., Hassal, R., Shepard, B.M., Mc Cotcheon, G. and Ward, B., 2003. Influence of fertilizer on growth and marker compound of field grown Echinacea species and feverfew. Scientia Horticulture, 98: 61-69.
- Ferguson, R.B., 2006. EC06-155 nutrient management for agronomic crops in Nebraska. Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension, 177p.
- Hazara, B., Sarma, M.D. and Sanyal, U., 2004. Separation method of quinonoid constituents of plants used in oriental traditional medicines. Journal of Chromatography B, 812: 259-275.
- Hopkins, B. and Ellsworth, J., 2003. Phosphorus nutrition in potato production. Idaho Potato Conference, 22-23 January: 75-85.
- Javidan, Y. and Schilling, T.F., 2004. Development of cartilage and bone. Methods in Cell Biolog, 76: 415-436.
- Kader, M.A. and Lindberg, S., 2010. Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. Plant Signaling & Behavior, 5(3): 233-238.
- Khalil, A.H.P.S., Alwani, S.M. and Omar, M.A.K., 2006. Chemical composition, anatomy, lignin distribution and cell wall structure of Malaysia plant waste fibers. Bioresource, 1: 220-232.
- Khopkar, S.M., 1998. Basic Concepts of Analytical Chemistry. New Age International, 500p.
- Lajko, E., Banyai, P., Zambo, Z., Kursinszki, L., Szoke, E. and Kohidai, L., 2015. Targeted tumor therapy by *Rubia tinctorum* L.: analytical characterization of hydroxyanthraquinones and investigation of their selective cytotoxic, adhesion and migration modulator effects on melanoma cell lines (A2058 and HT168-M1). Cancer Cell International, 15(119): 1-15.

- acidity in Andisols. *Journal of Integrated Field Science*, 2: 69-71.
- Vasconsuelo, A, Giulietti, A.M. and Boland, R., 2004. Signal transduction events mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorum*. *Plant Science*, 166(2): 405-413.
 - Xu, Y. and Van Hugstee, R.B., 1994. Association of calcium and calmodulin to peroxidase secretion. *Journal of Plant Physiology*, 141: 141-146.
 - Weisany, W., Raei, Y. and Allahverdipoor, K.H., 2013. Role of Some of Mineral Nutrients in Biological Nitrogen Fixation. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 2(4): 77-84.
 - Welinder, K.G., 1979. Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence and some structural characteristics of horseradish peroxidase C. *European Journal Biochemistry*, 96: 483-502.
 - White, P.J. and Broadley, M.R., 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany*, 92(4): 487-511.
 - Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 890p.
 - Scialabba, A., Bellani, L.M. and Dell' Aquila, A., 2002. Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish seeds. *European Journal of Histochemistry*, 46: 351-358.
 - Siebenborn, S., Marquard, R., Yüce, S. and Turgut, I., 2001. Untersuchungen zur Inkulturnahme von Farberkrapp (*Rubia tinctorum*). *Pflanzenbauwissenschaften*, 5(2): 49-57.
 - Smith, J.G., Ian, J.M. and Vincent, D., 2005. Photo tendering of wool sensitized by naturally occurring polyphenolic dyes. *Journal of Phytochemistry and Phytobiology Application: Chemistry*, 169: 147-149.
 - Taiz, L. and Zeiger, E., 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, 782p.
 - Tams, J.W. and Welinder, K.G., 1998. Glycosylation and thermodynamic versus kinetics stability of horseradish peroxide. *FEBS Letters*, 421(3): 234-236.
 - Toma, M., Saigusa, M., Qafoku, N. and Sumner, M., 2005. Effects of gypsum on amelioration of subsoil

Effects of calcium carbonate and phosphorus fertilizer on some physiological parameters and alizarin content of *Rubia tinctorum* L.

M. Moghadami Rad¹, R.A. Khavari-Nejad^{2*}, S. Saadatmand³ and F. Najafi⁴

1- Ph.D. student of Plant Physiology, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2*- Corresponding author, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

E-mail: ra.khavarinejad@gmail.com

3- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Received: October 2021

Revised: May 2022

Accepted: July 2022

Abstracts

Madder (*Rubia tinctorum* L.) is a herbaceous and perennial plant, which has bioactive compounds with high medicinal and pigment potency. Local farmers believe that increasing soil lime increases the color composition of this plant. To investigate the effects of calcium carbonate and phosphorus fertilizer on some physiological parameters and root alizarin content in madder, a field factorial experiment was conducted in a randomized complete block design with four replications. Experimental treatments included calcium carbonate at five levels (0, 20, 50, 100, and 150 kg.ha⁻¹) and triple superphosphate at four levels (0, 50, 100, and 150 kg.ha⁻¹). Means comparison showed that the highest root dry weight (an increase of 75% compared to control), total plant dry weight (an increase of 58% compared to control), root alizarin content (an increase of 78% compared to control), and root catalase activity were obtained with calcium carbonate increase up to 20 kg.ha⁻¹ and triple superphosphate increase up to 100 kg.ha⁻¹. The highest root length (an increase of 54% compared to control) and leaf catalase activity were observed in the 50 kg.ha⁻¹ calcium carbonate and 100 kg.ha⁻¹ triple superphosphate treatment. The highest leaf and root peroxidase activity was obtained in the treatment of 150 kg.ha⁻¹ calcium carbonate and 150 kg.ha⁻¹ triple superphosphate. Simultaneous application of these two fertilizers had a complementary effect on each other, so that the 20 and 50 kg.ha⁻¹ calcium carbonate application along with the 100 kg.ha⁻¹ triple superphosphate had an increasing effect on the alizarin content of madder root. This method can be used for the future development of a non-destructive tolerance test that shows madder increased response to calcium carbonate and phosphorus fertilizer, to further produce madder root medicinal compounds as a targeted drug for cancer treatment.

Keywords: Antioxidant enzymes, fertilizers, *Rubia tinctorum* L., growth indices, medicinal-dye compounds.