

## Evaluation of Nitrogen Levels and Planting Density Management on Physiological Traits and Secondary Metabolites in the Medicinal-Industrial Plant Indigo (*Indigofera tinctoria* L.)

M R. Zargaran Khouzani<sup>1</sup>, M H. Gharineh<sup>\*2</sup>, A. Koochekzadeh<sup>3</sup> and A. Lotfi Jalalabadi<sup>4</sup>

1, 2, 3 & 4) Department of Plant Production and Genetics, University of Agricultural Sciences and Natural Resources of Khuzestan, Mollasani, Iran.

Pages  
61-74

\*Corresponding author: [m.gharineh@asnrukh.ac.ir](mailto:m.gharineh@asnrukh.ac.ir)

Received date: 2025.01.29

Accepted date: 2025.04.13

### Abstract

*Indigofera tinctoria* L. is one of the most important natural dye-producing plants worldwide, with extensive applications in the textile and pharmaceutical industries. Given the significant role of agronomic practices in enhancing both the quantitative and qualitative performance of this species, the present study was conducted in the spring and summer of 2023 in Shushtar, Iran, using a split-plot design based on a randomized complete block design with three replications. The objective was to evaluate the effects of different nitrogen fertilizer rates (25, 50, 75, and 100 kg ha<sup>-1</sup>) and plant densities (30, 40, 50, and 60 plants m<sup>-2</sup>) on photosynthetic traits—including chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoids—and the content of the secondary pigment indigo carmine. Analysis of variance revealed that nitrogen levels and plant density had significant effects on all photosynthetic traits and indigo carmine content at the 1% probability level. Furthermore, the interaction between nitrogen and plant density was significant at the 5% level. Increasing nitrogen application significantly improved all photosynthetic pigments and enhanced the accumulation of indigo carmine. The highest values of chlorophyll a (1.85 mg g<sup>-1</sup>), chlorophyll b (0.73 mg g<sup>-1</sup>), total chlorophyll (2.58 mg g<sup>-1</sup>), and indigo carmine content (0.81%) were recorded under the combined treatment of 75 kg ha<sup>-1</sup> nitrogen and a plant density of 30 plants m<sup>-2</sup>. Moreover, the combination of 75 kg ha<sup>-1</sup> nitrogen and 40 plants m<sup>-2</sup> yielded the highest indigo carmine production (5.75 g m<sup>-2</sup>), which was considered optimal in terms of yield. A strong and significant positive correlation was observed between photosynthetic parameters and indigo carmine content (R = 0.91), indicating a direct role of the photosynthetic apparatus in the biosynthesis of secondary metabolites. Overall, the integrated treatment of 75 kg ha<sup>-1</sup> nitrogen and a planting density of 30–40 plants m<sup>-2</sup> is recommended as the most favorable strategy for balancing product quality and yield, and represents an optimal cultivation model for indigo production in similar agro-climatic regions.

### Keywords:

Agronomic management, Chlorophyll content, Natural dyes, Plant nutrition; Secondary metabolites



## ارزیابی مدیریت زراعی سطوح نیتروژن و تراکم کاشت بر صفات فیزیولوژیکی و متابولیت‌های ثانویه در

### گیاه صنعتی - دارویی نیل (*Indigofera tinctoria* L.)

شماره صفحات

۶۱-۷۴

محمد رضا زرگران خوزانی<sup>۱</sup>، محمدحسین قرینه<sup>۲\*</sup>، احمد کوچک زاده<sup>۳</sup> و امین لطفی جلال آبادی<sup>۴</sup>

۱، ۲، ۳ و ۴) گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران.

\* نویسنده مسئول: [m.gharineh@asnrkh.ac.ir](mailto:m.gharineh@asnrkh.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰

#### چکیده

گیاه نیل یکی از مهم‌ترین گیاهان رنگزا در سطح جهان است که کاربردهای گسترده‌ای در صنایع رنگ‌سازی و داروسازی دارد. با توجه به نقش مهم عوامل زراعی در بهبود عملکرد کمی و کیفی این گونه، پژوهش حاضر در سال ۱۴۰۲ در شهرستان شوشتر و در قالب طرح کرت‌های خردشده بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر سطوح مختلف کود نیتروژن (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) و تراکم کاشت (۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ بوته در مترمربع) بر صفات فتوسنتزی (شامل کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها) و محتوای رنگدانه ثانویه ایندیگو کارمین بود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر سطوح نیتروژن و تراکم کاشت به‌طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۱٪) بر تمامی صفات فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین تأثیرگذار بود. همچنین، اثر متقابل نیتروژن و تراکم کاشت در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار شد. افزایش مصرف نیتروژن منجر به بهبود معنی‌دار تمامی صفات فتوسنتزی و تجمع متابولیت ثانویه گردید. بیشترین مقادیر کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل (۱/۸۵، ۰/۷۳ و ۲/۵۸ میلی‌گرم بر گرم)، و درصد رنگدانه ایندیگو کارمین (۰/۸۱٪) در تیمار ترکیبی ۷۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و تراکم ۳۰ بوته در مترمربع مشاهده شد. همچنین، تیمار ۷۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار همراه با تراکم ۴۰ بوته در مترمربع بالاترین محتوای ایندیگو کارمین (۵/۷۵ گرم بر مترمربع) را تولید کرد که از نظر عملکرد کمی بهینه تشخیص داده شد. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین شاخص‌های فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین ( $R=0/91$ ) نشان‌دهنده نقش مستقیم دستگاه فتوسنتزی در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه است. در مجموع، تیمار ترکیبی ۷۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و تراکم کاشت ۳۰ تا ۴۰ بوته در مترمربع به‌عنوان بهترین تیمار از نظر تعادل بین کیفیت و کمیت محصول معرفی می‌شود و می‌تواند به‌عنوان الگوی بهینه کشت گیاه نیل پیشنهاد گردد.

واژه‌های کلیدی: رنگ‌های طبیعی، تغذیه گیاهی، محتوای کلروفیل، متابولیت‌های ثانویه، مدیریت کشاورزی

## مقدمه

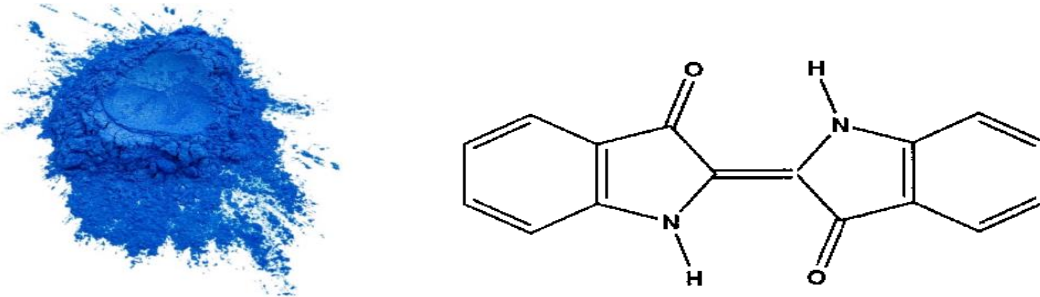
در عصر حاضر، تمایل فزاینده به سمت توسعه پایدار و استفاده از منابع طبیعی، گیاهان دارویی را به عنوان منبع اصلی تأمین ترکیبات زیست فعال مطرح کرده است. این گیاهان نه تنها در صنایع داروسازی و غذایی نقش کلیدی دارند، بلکه کاربردهای وسیعی در زمینه‌هایی مانند رنگرزی طبیعی، آرایشی و بهداشتی و حتی کشاورزی پایدار نیز دارند. گیاه نیل به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های دارویی و رنگزا، همواره مورد توجه پژوهشگران در کشورهای مختلف قرار گرفته است. نیل گیاهی یک‌ساله، دوساله و یا چندساله است که به‌طور معمول ارتفاعی بین یک تا دو متر دارد. برگ‌های آن به طول ۲/۵ تا ۷/۵ سانتی‌متر، دارای گوشوارک‌های کوچک بوده و برگچه‌های آن به تعداد ۹ تا ۱۳ عدد در آرایش متقابل قرار گرفته‌اند. رنگ برگ‌ها سبز متمایل به خاکستری است و دارای پوشش کرک‌دار و حاشیه دندانه‌دار هستند. گل‌های صورتی رنگ آن به طول حدود ۴ میلی‌متر بر روی دمگل‌های ۵ تا ۱۱ سانتی‌متری قرار دارند و گلدهی آن اغلب از خرداد تا مرداد ماه انجام می‌شود. میوه گیاه به شکل خورجینک کوتاه و سیاه‌رنگ است و بذر آن به شکل بیضی تا استوانه‌ای، به طول ۲/۳ تا ۲/۵ میلی‌متر و عرض ۱/۸ تا ۲ میلی‌متر می‌باشد (Khoshnam *et al.*, 2021) (شکل ۱).



شکل ۱: اندام‌های زایشی و رویشی گیاه نیل-ا: برگ، b: غلاف، c: بذر، d: گل آذین  
**Figure 1: Reproductive and vegetative organs of the indigo plant**  
**a: leaf, b: pod, c: seed, d: inflorescence**

ایندیگو کارمین، یکی از مهم‌ترین ترکیبات موجود در برگ‌های نیل، از دسته ترکیبات هتروسیکلیک آروماتیک است و در شرایط خاص محیطی و مدیریت زراعی مناسب، میزان قابل توجهی از آن در بافت‌های گیاهی تجمع می‌یابد (شکل ۲). با وجود اهمیت بالای این گیاه، یکی از چالش‌های اصلی در توسعه گیاهان دارویی-صنعتی، شناسایی و بهینه‌سازی عوامل زراعی مؤثر بر عملکرد کمی و کیفی آنهاست. این عوامل شامل زمان کاشت، تراکم بوته، نوع و مقدار کوددهی، مدیریت آبیاری و شرایط اقلیمی است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که این عوامل نقش تعیین‌کننده‌ای در رشد، توسعه و تولید متابولیت‌های ثانویه دارند (Shabahang *et al.*, 2014; Ebrahimi *et al.*, 2015). نیتروژن به عنوان یکی از عناصر غذایی اصلی، از طریق تأثیر مستقیم بر تشکیل کلروفیل، پروتئین‌ها و آنزیم‌های مرتبط با فتوسنتز، نقش اساسی در افزایش رشد گیاه و عملکرد بیوماس دارد (Zhang *et al.*, 2009; Dadkhah *et al.*, 2014). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که افزایش سطح نیتروژن تا حد مشخصی منجر به افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل در گیاهان می‌شود، اما این روند در سطوح بالای نیتروژن به دلیل سمیت نیتروژنی

یا عدم تعادل تغذیه‌ای کاهش می‌یابد (Alizadeh Sahzabi *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2003). علاوه بر این، تأثیر مثبت نیتروژن بر محتوای کاروتنوئیدها و در نهایت تولید متابولیت‌های ثانویه مانند ایندیگو کارمین نیز مشاهده شده است (Tahmasebi *et al.*, 2025; Torrecilla *et al.*, 2011).



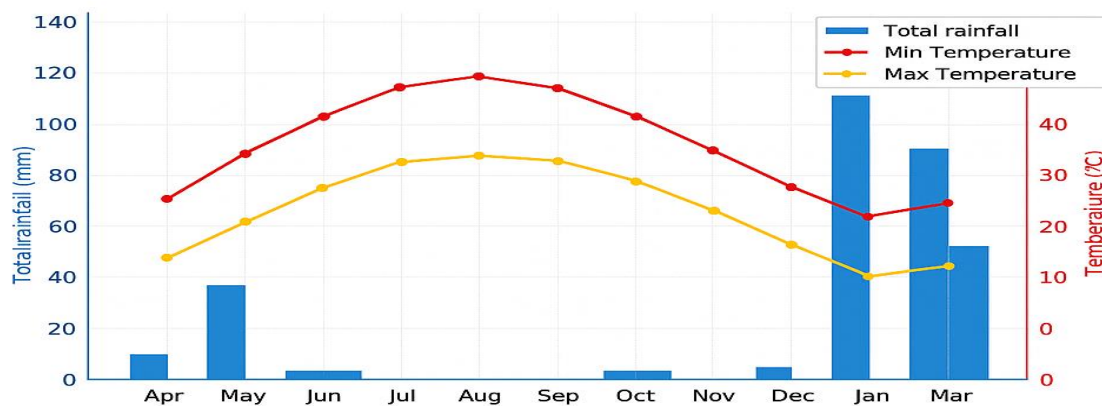
شکل ۲: ساختار شیمیایی ایندیگو کارمین  
Figure 2: Chemical structure of indigo carmine

با این حال، باید توجه داشت که نیل یک گیاه تثبیت‌کننده نیتروژن است و نیازمند مدیریت دقیق در تغذیه کودی می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که مصرف بیش از حد نیتروژن ممکن است تثبیت بیولوژیک نیتروژن را مهار کند و به جای افزایش کیفیت، منجر به کاهش محتوای ایندیگو کارمین شود (Hernández-Cruz *et al.*, 2002; Nohong *et al.*, 2019). یکی دیگر از عوامل مهم زراعی، تراکم بوته است که تأثیر مستقیمی بر بهره‌برداری بهینه از منابع محیطی (آب، نور و مواد معدنی) و توزیع انرژی در گیاه دارد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که افزایش تراکم بوته تا حد مشخصی می‌تواند منجر به افزایش عملکرد کمی شود، اما ممکن است تأثیر منفی بر محتوای کیفی متابولیت‌های ثانویه داشته باشد. تعداد بوته‌ها در هر واحد سطح (تراکم) یکی از عوامل اساسی در تعیین عملکرد گیاهان به‌شمار می‌رود. تعیین تراکم مناسب برای کشت گیاهان به‌عنوان عامل زراعی قابل مهار، تأثیر قابل توجهی در کارایی محصولات مختلف دارد. تراکم گیاهی مطلوب جزء اصول بنیادین زراعت هر محصول بوده و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر عملکرد کمی و کیفی گیاهان شناخته می‌شود (Koocheki *et al.*, 2020; Sajed, 2020). به‌طور کلی، افزایش تراکم بیش از حد مطلوب منجر به رقابت درون‌گونه‌ای خواهد شد که در نتیجه عملکرد گیاهان را کاهش می‌دهد. از سوی دیگر، در تراکم‌های کمتر از حد مطلوب، بهره‌برداری بهینه از منابع محیطی نظیر نور، فضا، آب و خاک به‌درستی انجام نمی‌گیرد و در نهایت باعث کاهش عملکرد می‌شود (Tahmasebi *et al.*, 2025; Omid Beigi, 2021). با توجه به اهمیت چشمگیر گیاه نیل در صنایع داروسازی و نساجی، کاربرد آن در تناوب‌های زراعی و قابلیت رشد در شرایط اقلیمی خشک و نیمه‌خشک، کاهش چشمگیر سطح زیر کشت این گیاه در سال‌های اخیر قابل تأمل است. نظر به اهمیت روزافزون رنگ‌های طبیعی، انجام یک پژوهش جامع و میدانی برای شناسایی عوامل مؤثر بر عملکرد کمی و کیفی این گیاه در شرایط اقلیمی مناطق خشک و نیمه‌خشک ضروری به نظر می‌رسد، این فرآیند می‌تواند ارزش تجاری و فرهنگی زیادی داشته

باشد و نتایج حاصل از آن در بخش‌های مختلف، مورد استفاده قرار گیرد (Zargarani Khouzani & Daei Naseri, 2025). با توجه به اهمیت این گیاه در تأمین رنگ‌های طبیعی و همچنین کاربردهای دارویی آن، شناسایی بهترین تیمار کود نیتروژن و تراکم مناسب گیاهی می‌تواند به بهینه‌سازی تولید و افزایش کارایی این گیاه کمک کند. این مطالعه با هدف ارائه داده‌های علمی قابل اتکا به منظور بهبود شیوه‌های کشت و مدیریت زراعی گیاه نیل انجام می‌گیرد. در این پژوهش ضمن ارزیابی تأثیر عوامل زراعی مختلف، به دنبال شناسایی الگوی بهینه کشت برای حداکثرسازی محتوای ایندیگو کارمین و بهبود کیفیت صفات فتوسنتزی بوده و یافته‌های این پژوهش می‌توانند به‌عنوان معیارهای علمی و عملی برای مدیریت زراعی گیاه نیل مطرح گردد.

### مواد و روش‌ها

این پژوهش در مجتمع گلخانه ای شهید شرافت شوشتر در سال ۱۴۰۲ به اجرا درآمده است. شوشتر با مساحت، ۲۴۳۶ کیلومتر مربع و طول جغرافیایی بین ۴۸ درجه و ۳۵ دقیقه تا ۴۹ درجه و ۱۲ دقیقه و عرض جغرافیایی بین ۳۱ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۳۲ درجه و ۲۶ دقیقه، با میانگین دما ۲۷/۲ درجه سانتی‌گراد و متوسط بارندگی سالیانه ۳۲۲ میلی‌متر (شکل ۳)، در استان خوزستان واقع شده است (Zahedifar et al., 2022; Bagherpour et al., 2015).



شکل ۳: میانگین دما حداقل و حداکثر و میزان بارندگی در سال ۱۴۰۲ شهرستان شوشتر

Figure 3: Average minimum and maximum temperatures and rainfall in 2023 in Shushtar County

آزمایش به صورت کرت‌های یکبارخرد شده در قالب بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) با سه تکرار اجرا شد. عامل اصلی شامل چهار سطح کود نیتروژن (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) و عامل فرعی شامل چهار تراکم بوته (۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ بوته در متر مربع) بودند. برای ارزیابی کیفیت و ویژگی‌های خاک، نمونه‌برداری به صورت تصادفی از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متر انجام و نتایج ارزیابی گردید. خاک منطقه از نوع خاک لومی - سیلتی با اسیدته ۷/۱۸ و هدایت الکتریکی ۲/۳ dS/m بود (جدول ۱). دو ماه قبل از کاشت آماده‌سازی بستر کشت، با دو نوبت شخم عمود بر هم صورت گرفت. پس از آن برای ایجاد بستر یکنواخت عملیات تسطیح زمین انجام شد و با استفاده از دستگاه نهرکن برای هدایت آب اضافی اقدام به ایجاد جوی‌های زهکشی شد. ابعاد کرت‌ها، سه در پنج متر و فاصله بین کرت‌های اصلی دو متر و فاصله بین کرت‌های فرعی یک متر در نظر گرفته شد.

بذرها از توده شهر جیرفت جنوب استان کرمان تهیه و کاشت مستقیم بذر روی شش خط کاشت به صورت کرتی و به شیوه دستی به صورت برنامه‌ریزی شده طبق تاریخ‌های تعیین شده انجام پذیرفت.

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک قبل از کاشت (عمق ۰-۳۰ سانتیمتر) در سال دوم

Table 2. Physical and chemical properties of soil before planting (0-30 cm depth) in the second year

پی‌اچ pH	هدایت الکتریکی Electrical Conductivity (dS/m)	نیتروژن کل Total Nitrogen (%)	فسفر قابل جذب Available Phosphorus (ppm)	پتاسیم قابل جذب Available Potassium (ppm)	رس (%) Clay	لای (%) Silt	ماسه (%) Sand
7.18	1.59	0.047	4	430	13	48	39

بعد از اطمینان از سبز شدن و استقرار کامل، تعداد گیاهچه‌ها در مرحله سه و چهار برگی شمارش و تنک گردیدند. مهار علف‌های هرز به صورت وجین دستی به طور منظم در طول دوره رشد انجام شد. کود نیتروژن به صورت اوره در دو نوبت (قبل از کاشت و در مرحله چهار برگی) به مزرعه اعمال شد. تمامی تیمارها تحت مدیریت یکسان آبیاری و کنترل علف‌های هرز قرار گرفتند. عملکرد کیفی گیاه نیل، از طریق اندازه‌گیری مقادیر کلروفیل‌ها، همچنین بررسی محتوای ایندیگو کارمین انجام شد. برای اندازه‌گیری کلروفیل‌ها (کلروفیل a، b و کلروفیل کل) و کارتنوئید از روش آرنون (۱۹۶۷) استفاده گردید، به این صورت که، نیم گرم از ماده تر گیاهی در هاون چینی قرار داده و با نیتروژن مایع خرد شد. ۲۰ میلی‌لیتر استن ۸۰٪ به نمونه افزوده شد. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره جدا شده به یک بالن شیشه‌ای منتقل گردید. مقدار جذب در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و کارتنوئید ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی و فرابنفش Hach DR6000 قرائت شد.

رابطه ۱:

$$\text{Chlorophyll a} \left( \frac{\text{mg}}{\text{gFW}} \right) = \frac{(15/65 \times A_{663}) - (7/34 \times A_{645})}{W}$$

رابطه ۲:

$$\text{Chlorophyll b} \left( \frac{\text{mg}}{\text{gFW}} \right) = \frac{(27/05 \times A_{645}) - (11/21 \times A_{663})}{W}$$

رابطه ۳:

$$\text{Total Chlorophyll} \left( \frac{\text{mg}}{\text{gFW}} \right) = \text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b}$$

رابطه ۴:

$$\text{Carotenoids} \left( \frac{\text{mg}}{\text{gFW}} \right) = \frac{(1000 \times A_{470}) - (1/82 \times \text{Chlorophyll a}) - (85/02 \times \text{Chlorophyll b})}{227}$$

در این فرمول‌ها، V حجم حلال استخراجی (ml)، W وزن تازه برگ (g) و A ضریب جذب نور در طول موج مشخص است. برای اندازه‌گیری محتوای ایندیگو کارمین، از برگ‌های گیاهان قبل از گلدهی نمونه‌برداری شد. یک گرم از برگ‌های نیل توزین شده و داخل لوله آزمایش قرار گرفت. ۱۰ سی سی آب مقطر به لوله‌های حاوی نمونه برگ اضافه می‌شود و لوله‌ها برای ۱۰ دقیقه در بن‌ماری قرار گرفت. سپس نمونه‌ها بی‌درنگ در حمام آب یخ سرد قرار داده شده و با استفاده از NaOH اسید نمونه به پی‌اچ ۱۰ رسید که بعد از یک ساعت، با اسید کلریدریک، پی‌اچ به یک تا دو تنظیم گردیده و پس از ۳۰ دقیقه با

نمودار استاندارد مقایسه شد. بعد از سانتریفیوژ نمونه‌ها در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه، جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی و فرابنفش اندازه‌گیری گردید. به منظور تهیه نمودار استاندارد، یک محلول پایه از ۸ میلی‌گرم ایندیگو کارمین خالص در ۲۰ سی‌سی اسید سولفوریک تهیه شده و با آب مقطر تا ۵۰۰ میلی‌لیتر رقیق شد تا غلظت‌های مورد نیاز برای آزمایش فراهم گردد. مقدار ایندیگو کارمین بر اساس منحنی استاندارد و با مقایسه با نمونه استاندارد ایندیگو محاسبه گردید (Laitonjam & Wangkheirakpam, 2011 ; Sales *et al.*, 2016).

رابطه ۵:

$$\text{Indigo carmine} \left( \frac{\text{mg}}{\text{gFW}} \right) = \frac{A_{608} \times V \times 1000}{\epsilon \times l \times W}$$

در این فرمول،  $A_{608}$  جذب نوری محلول استخراجی در طول موج ۶۰۸ نانومتر،  $V$  حجم محلول استخراجی (لیتر)،  $\epsilon$  ضریب خاموشی مولار ایندیگو کارمین در pH قلیایی = حدود  $1,75,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ، ضخامت کوتاه سل اسپکتروفتومتر = ۱ سانتی‌متر و  $W$  وزن نمونه تازه (گرم) است. در این تحقیق به منظور بررسی اثر متغیرها و مقایسه میانگین‌ها، از تجزیه واریانس (ANOVA) و تحلیل‌های آماری با استفاده نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ و SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد. پس از انجام تجزیه واریانس و در صورت معنی‌دار بودن نتایج، میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال خطای ۵ درصد مقایسه شدند و هوش مصنوعی ChatGPT برای رسم نمودارها به کار گرفته شد. (Lootfalizadeh *et al.*, 2011).

## نتایج و بحث

نتایج این پژوهش نقش حیاتی دو عامل مدیریتی کود نیتروژن و تراکم بوته را در تنظیم مکانیسم‌های فیزیولوژیک و متابولیکی گیاه نیل به روشنی آشکار می‌سازد. بر اساس داده‌های جامع ارائه شده، این دو عامل نه تنها به صورت مستقل، بلکه از طریق تعامل پویای خود، شبکه پیچیده‌ای از پاسخ‌های بیوشیمیایی را فعال می‌کنند که نهایتاً کیفیت محصول را تعیین می‌نماید. تحلیل عمیق این یافته‌ها نشان می‌دهد که بهینه‌سازی این متغیرها می‌تواند منجر به تحول قابل توجهی در زراعت صنعتی این گیاه دارویی ارزشمند شود. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشانگر تأثیر بسیار معنی‌دار هر دو عامل اصلی نیتروژن و تراکم بوته بر تمامی شاخص‌های مورد بررسی شامل پیگمان‌های فتوسنتزی و متابولیت ثانویه ایندیگو کارمین در سطح ۱ درصد است. اثر متقابل این دو عامل نیز در سطح معنی‌داری ۵ درصد بر تمامی صفات تأیید شده است. تأثیر همزمان این فاکتورها بر تمامی جنبه‌های کیفی مطالعه شده، گویای وجود مکانیسم‌های کنترل مشترک در سطح سلولی است. همچنین معنی‌داری اثر متقابل نشان می‌دهد پاسخ گیاه به نیتروژن به شدت تحت تأثیر شرایط رقابتی ناشی از تراکم بوته قرار دارد. بررسی روند تغییرات شاخص‌ها تحت تأثیر سطوح مختلف نیتروژن، الگوی کاملاً معنی‌داری را آشکار می‌سازد (جدول ۳). افزایش تدریجی نیتروژن از ۲۵ تا ۷۵ کیلوگرم در هکتار موجب افزایش خطی محتوای کلروفیل a (از ۱/۶۸ به ۱/۷۸ میلی‌گرم بر گرم)، کلروفیل b (از ۰/۶۵ به ۰/۶۹) و کلروفیل کل (از ۲/۳۳ به ۲/۴۷) می‌شود. این روند کاملاً با نقش شناخته شده نیتروژن در سنتز

هسته پورفیرین و تشکیل کمپلکس‌های کلروفیل-پروتئینی سازگار است که توسط آرنون (۱۹۶۷) و لیختنتالر (۱۹۸۷) به تفصیل توصیف شده است.

جدول ۲: تجزیه واریانس اثر کود نیتروژن و تراکم بر صفات کیفی گیاه نیل

Table 2: Analysis of variance of the effect of nitrogen fertilizer and density on the quality traits of indigo plants

کاروتنوئیدها Carotenoids (MS)	محتوای ایندیگو Indigo Content (MS)	ایندیگو کارمین Indigo Carmine (MS)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (MS)	کلروفیل b Chlorophyll b (MS)	کلروفیل a Chlorophyll a (MS)	درجه آزادی Degrees of Freedom (df)	منبع تغییرات Source of Variation
0.001	0.12	0.001	0.005	0.001	0.003	2	بلوک (Block)
0.019**	0.85**	0.018**	0.065**	0.023**	0.042**	3	نیتروژن Nitrogen
0.001	0.08	0.001	0.003	0.001	0.002	6	خطای کرت اصلی (Ea) Main plot error
0.032**	5.32**	0.025**	0.103**	0.035**	0.068**	3	تراکم (D) Density
0.003*	0.28*	0.003*	0.012**	0.004*	0.008**	9	N × D
0.001	0.10	0.001	0.003	0.001	0.002	36	خطای کرت فرعی (Eb) Subplot error

\*معنی‌دار در سطح ۵٪ (P < 0.05) \*\*معنی‌دار در سطح ۱٪ (P < 0.01) / ۱ (P < 0.01)

جالب توجه آنکه در سطح ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن، این روند افزایشی متوقف شده و حتی کاهش جزئی مشاهده می‌شود که می‌تواند ناشی از اختلال در جذب سایر عناصر غذایی یا اختلالات متابولیکی ناشی از سمیت نیتروژن باشد. در مورد متابولیت ثانویه کلیدی، یعنی ایندیگو کارمین، بیشترین مقدار (۴/۵۶ گرم بر مترمربع) در سطح ۷۵ کیلوگرم نیتروژن ثبت شده است. این یافته از نظر فیزیولوژیک بسیار قابل تأمل است چرا که نشان می‌دهد حداکثر تولید متابولیت‌های ثانویه در سطحی پایین‌تر از حد بهینه فتوسنتز اتفاق می‌افتد که احتمالاً بیانگر تخصیص مجدد منابع کربنی از مسیرهای اولیه به ثانویه تحت سطوح متوسط نیتروژن است. این مشاهده کاملاً با مدل پیشنهادی فاضلی و همکاران (۲۰۱۹) در مورد ارتباط مستقیم بین ظرفیت فتوسنتزی و تولید متابولیت‌های ثانویه همخوانی دارد.

جدول ۳: مقایسه میانگین اثر ساده سطوح کود نیتروژن بر صفات کیفی

Table 3: Comparison of the mean simple effect of nitrogen fertilizer levels on qualitative traits

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content (g/m <sup>2</sup> )	ایندیگو کارمین Indigo carmine (%)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg/g)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g)	نیتروژن Nitrogen (Kg/ha)
0.22 ± 0.01a	0.43 ± 0.01c	4.03 ± 0.16c	0.72 ± 0.01c	2.33 ± 0.08c	0.65 ± 0.03c	1.68 ± 0.06c	25
0.21 ± 0.01ab	0.44 ± 0.01b	4.29 ± 0.17b	0.74 ± 0.01b	2.40 ± 0.09b	0.67 ± 0.03b	1.73 ± 0.06b	50
0.20 ± 0.01b	0.46 ± 0.01a	4.56 ± 0.18a	0.76 ± 0.01a	2.47 ± 0.10a	0.69 ± 0.03a	1.78 ± 0.07a	75
0.21 ± 0.01ab	0.45 ± 0.01ab	4.43 ± 0.17ab	0.75 ± 0.01ab	2.43 ± 0.09ab	0.68 ± 0.03ab	1.75 ± 0.07ab	100

وجود حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد است.

The presence of similar letters in each column indicates no significant difference at the 5% statistical level.

تغییرات تراکم بوته الگوی پیچیده‌ای از پاسخ‌های فیزیولوژیک را ایجاد می‌نماید (جدول ۴). افزایش تراکم از ۳۰ به ۴۰ بوته در مترمربع موجب افزایش معنی‌دار محتوای ایندیگو کارمین (از ۳/۸۶ به ۵/۶۸ گرم بر مترمربع) و کاروتنوئید (از ۰/۴۳ به ۰/۴۶ میلی‌گرم بر گرم) می‌شود که بیانگر بهبود کارایی استفاده از منابع محیطی در این تراکم است. با این حال، افزایش بیشتر تراکم به ۵۰ و ۶۰ بوته موجب کاهش محسوس این شاخص‌ها می‌گردد که نشان‌دهنده فعال شدن سازوکارهای تنش‌های زنده

ناشی از رقابت شدید است. این حساسیت بالا را می‌توان به نقش آن در فتوسیستم I و وابستگی بیشتر به شدت نور نسبت داد. در تراکم‌های بالای گیاهی (مانند ۶۰ بوته در مترمربع)، کاهش دسترسی به نور منجر به کاهش سنتز کلروفیل b و حتی تخریب آن شد (Hajmirzaei et al., 2019). نکته بسیار جالب توجه، افزایش تدریجی نسبت کاروتنوئید به کلروفیل از ۰/۱۸ در تراکم ۳۰ به ۰/۲۴ در تراکم ۶۰ بوته است. این تغییر بیانگر یک راهبرد سازشی مهم در گیاه است که طی آن تحت شرایط تنش رقابتی، منابع متابولیکی به سمت سنتز پیگمان‌های محافظتی مانند کاروتنوئید سوق می‌یابد. این پدیده که توسط ژانگ و همکاران (۲۰۱۴) به عنوان سپر کاروتنوئیدی توصیف شده است، نقش حیاتی در حفاظت از دستگاه فتوسنتزی در شرایط استرس نوری ناشی از تراکم بالا دارد. کاهش همزمان محتوای ایندیگو کارمین در تراکم‌های بالا نیز احتمالاً ناشی از تخصیص منابع کربنی به فرآیندهای بقا به جای تولید متابولیت‌های ثانویه است. این یافته‌ها با مطالعات متعددی در سایر گیاهان زراعی و دارویی از جمله ماش (Soleimani Sardo et al., 2018)، آویشن (Noroozi et al., 2024) و کاملینا (Zarei et al., 2021) همسو است که نشان می‌دهند نیتروژن و تراکم نقش تعیین‌کننده‌ای در کارایی فتوسنتز و سلامت گیاه دارند.

#### جدول ۴: مقایسه میانگین اثر ساده سطوح کود نیتروژن بر صفات کیفی

Table 4: Mean comparison of the simple effect of planting density on qualitative traits

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content (g/m <sup>2</sup> )	ایندیگو کارمین Indigo carmine (%)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg/g)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g)	تراکم Density (plants per m <sup>2</sup> )
0.18 ± 0.01c	0.49 ± 0.02a	3.86 ± 0.15b	0.79 ± 0.02a	2.52 ± 0.10a	0.71 ± 0.03a	1.81 ± 0.07a	30
0.20 ± 0.01b	0.46 ± 0.01a	5.48 ± 0.21a	0.76 ± 0.02a	2.46 ± 0.10a	0.69 ± 0.03a	1.77 ± 0.07a	40
0.22 ± 0.01a	0.43 ± 0.01b	4.51 ± 0.17a	0.73 ± 0.01b	2.38 ± 0.09b	0.66 ± 0.03b	1.72 ± 0.06b	50
0.24 ± 0.01a	0.40 ± 0.01c	3.56 ± 0.14b	0.70 ± 0.01c	2.28 ± 0.08c	0.62 ± 0.02c	1.66 ± 0.05c	60

وجود حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد است.

The presence of similar letters in each column indicates no significant difference at the 5% statistical level

عامل بین نیتروژن و تراکم بوته، الگوهای پیچیده‌ای را ایجاد می‌کند که درک آن برای مدیریت بهینه زراعی ضروری است (جدول ۵). بیشترین مقادیر تمامی شاخص‌های کیفی در تیمار ترکیبی ۷۵ کیلوگرم نیتروژن و تراکم ۴۰ بوته در مترمربع مشاهده شده است. این ترکیب بهینه موجب دستیابی به محتوای ۵/۷۵ گرم بر مترمربع ایندیگو کارمین شده که ۴۹ درصد بیشتر از کمترین مقدار مشاهده شده در شرایط نامطلوب است. این پدیده را می‌توان با هم‌افزایی فرآیندهای فیزیولوژیک تبیین کرد. نیتروژن کافی از طریق تقویت فتوسنتز، سنتز پیش‌ماده‌های کربنی را افزایش می‌دهد؛ در همین حال، تراکم بهینه پایه‌ها با ایجاد تعادل بین جذب نور و تبادل گازها، شرایط مطلوبی برای تبدیل این ترکیبات به متابولیت‌های ثانویه فراهم می‌آورد. در مقابل، ترکیب سطوح بالای نیتروژن (۱۰۰ کیلوگرم) و تراکم زیاد (۶۰ بوته) موجب کاهش محسوس تمامی شاخص‌ها می‌شود که بیانگر ایجاد تنش ترکیبی است. این یافته‌ها با مطالعات متعددی در سایر گیاهان دارویی و زراعی از جمله آویشن (Noroozi et al., 2024)، آلوئه‌ورا (Nematiyan & Ghouschi, 2011) و ذرت (Fateh et al., 2011) همسو است که نشان می‌دهند در این شرایط، گیاه همزمان با سمیت احتمالی نیتروژن و رقابت شدید برای نور و مواد غذایی مواجه می‌شود که منجر به

فعال‌سازی مسیرهای دفاعی به جای مسیرهای تولید متابولیت‌های ارزشمند می‌گردد. این مشاهدات به خوبی با مدل جامع تنش‌های زیستی و غیرزیستی ناکابا باشی و سایت (۲۰۱۵) همخوانی دارد که بر اهمیت اجتناب از ترکیب فاکتورهای تنش‌زا تأکید می‌نماید. ماتریس همبستگی، شبکه پیچیده‌ای از روابط متقابل بین شاخص‌های مختلف را آشکار می‌سازد که درک آن برای مدل‌سازی فیزیولوژیک ضروری است (شکل ۴).

جدول ۵: مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح کود نیتروژن و تراکم کاشت بر صفات کیفی

Table 5: Mean comparison of the interaction effect of nitrogen levels and planting density on qualitative traits

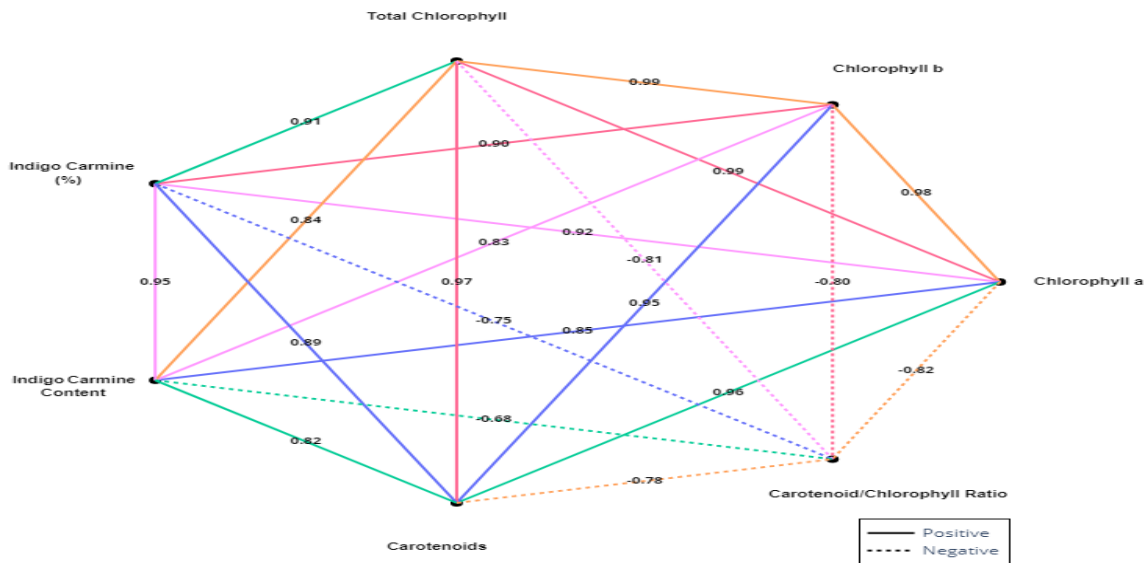
نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content (g/m <sup>2</sup> )	ایندیگو کارمین Indigo carmine (%)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg/g)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g)	تراکم Density (plants per m <sup>2</sup> )	نیتروژن Nitrogen (Kg/ha)
0.19 ± 0.01a	0.47 ± 0.02d	3.50 ± 0.14d	0.77 ± 0.02d	2.44 ± 0.09d	0.69 ± 0.03d	1.75 ± 0.07d	30	25
0.21 ± 0.01a	0.44 ± 0.02d	5.10 ± 0.20c	0.74 ± 0.02d	2.38 ± 0.09d	0.67 ± 0.03d	1.71 ± 0.07d	40	
0.23 ± 0.01b	0.41 ± 0.01e	4.20 ± 0.16d	0.71 ± 0.01e	2.30 ± 0.08e	0.64 ± 0.03e	1.66 ± 0.06e	50	
0.25 ± 0.01b	0.38 ± 0.01e	3.30 ± 0.13e	0.67 ± 0.01e	2.20 ± 0.07e	0.60 ± 0.02e	1.60 ± 0.05e	60	
0.18 ± 0.01a	0.48 ± 0.02c	3.75 ± 0.15c	0.79 ± 0.02c	2.51 ± 0.10c	0.71 ± 0.03c	1.80 ± 0.07c	30	50
0.20 ± 0.01a	0.45 ± 0.02c	5.45 ± 0.21b	0.76 ± 0.02c	2.45 ± 0.10c	0.69 ± 0.03c	1.76 ± 0.07c	40	
0.22 ± 0.01b	0.42 ± 0.01d	4.45 ± 0.17c	0.73 ± 0.01d	2.37 ± 0.09d	0.66 ± 0.03d	1.71 ± 0.06d	50	
0.24 ± 0.01b	0.39 ± 0.01d	3.50 ± 0.14d	0.69 ± 0.01d	2.27 ± 0.08d	0.62 ± 0.02d	1.65 ± 0.05d	60	
0.17 ± 0.01a	0.50 ± 0.02b	3.95 ± 0.16b	0.81 ± 0.02b	2.58 ± 0.11b	0.73 ± 0.03b	1.85 ± 0.08b	30	75
0.19 ± 0.01a	0.47 ± 0.02b	5.75 ± 0.22a	0.78 ± 0.02b	2.52 ± 0.11b	0.71 ± 0.03b	1.81 ± 0.08b	40	
0.21 ± 0.01a	0.44 ± 0.01c	4.75 ± 0.18b	0.75 ± 0.01c	2.44 ± 0.10c	0.68 ± 0.03c	1.76 ± 0.07c	50	
0.23 ± 0.01b	0.41 ± 0.01c	3.80 ± 0.15c	0.71 ± 0.01c	2.34 ± 0.09c	0.64 ± 0.02c	1.70 ± 0.06c	60	
0.18 ± 0.01a	0.49 ± 0.02a	3.84 ± 0.15a	0.80 ± 0.02a	2.54 ± 0.11a	0.72 ± 0.03a	1.82 ± 0.08a	30	100
0.20 ± 0.01a	0.46 ± 0.01a	5.62 ± 0.21a	0.77 ± 0.02a	2.48 ± 0.10a	0.70 ± 0.03a	1.78 ± 0.07a	40	
0.22 ± 0.01b	0.43 ± 0.01b	4.62 ± 0.18a	0.74 ± 0.01b	2.40 ± 0.09b	0.67 ± 0.03b	1.73 ± 0.06b	50	
0.24 ± 0.01b	0.40 ± 0.01b	3.62 ± 0.14a	0.70 ± 0.01b	2.30 ± 0.07b	0.63 ± 0.02b	1.67 ± 0.05b	60	

وجود حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد است.

The presence of similar letters in each column indicates no significant difference at the 5% statistical level

همبستگی بسیار قوی بین کلروفیل a و b ( $R=0/98$ ) و کلروفیل کل ( $R=0/99$ ) نشان‌دهنده هم‌تنظیمی دقیق این پیگمان‌ها در سطح مولکولی است. این یافته تأیید می‌کند که این شاخص‌ها نه به صورت مجزا، بلکه به عنوان بخشی از یک نظام یکپارچه فتوسنتزی عمل می‌نمایند. همبستگی مثبت بالا بین کلروفیل کل و کاروتنوئید ( $R=0/97$ ) نیز بیانگر هماهنگی در سنتز پیگمان‌های کلروپلاستی است. از سوی دیگر، همبستگی قابل توجه کلروفیل کل با ایندیگو کارمین ( $R=0/91$ ) شواهدی قوی بر اتصال متابولیک بین فتوسنتز و تولید متابولیت‌های ثانویه است که فرضیه اصلی پژوهش‌های فاضلی و همکاران (۲۰۱۹) را تأیید می‌نماید. این الگو نشان می‌دهد که تحت شرایط تنش، گیاه با تغییر اولویت‌های متابولیک، منابع را از سنتز کلروفیل به تولید کاروتنوئیدها جهت حفاظت از دستگاه فتوسنتزی معطوف می‌نماید. این پژوهش به روشنی نشان می‌دهد که مدیریت همزمان کود نیتروژن و تراکم بوته، عاملی کلیدی در بهینه‌سازی کیفیت گیاه نیل محسوب می‌شود. ترکیب بهینه ۷۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار با تراکم ۴۰ بوته در مترمربع نه تنها باعث حداکثر تولید ایندیگو کارمین می‌گردد، بلکه تعادل فیزیولوژیک مطلوبی در گیاه ایجاد می‌نماید که از ایجاد تنش‌های متابولیک جلوگیری می‌کند. این یافته‌ها با مطالعات متعددی در سایر گیاهان دارویی و صنعتی از جمله آویشن (Noroozi et al., 2024)، گلرنگ (Karimi Farzegi & Manoumi Zadeh, 2014) و گیاهان خانواده شب بو (Zarei et al., 2021) همسو است که نشان می‌دهند کاربرد مناسب نیتروژن و کنترل تراکم نقش کلیدی در افزایش کیفیت و مقدار متابولیت‌های ثانویه دارند. کاروتنوئیدها یک شاخص مهم در ارزیابی وضعیت فتوسنتزی

و استرس اکسیداتیو در گیاهان هستند.



شکل ۴: همبستگی (ضریب پیرسون) بین صفات کیفی

Figure 4: Correlation (Pearson coefficient) between qualitative attributes

کاروتنوئیدها به عنوان پیگمان‌های محافظ در گیاه نیل، نقش کلیدی در حفظ دستگاه فتوسنتزی و افزایش کارایی متابولیسم ثانویه دارند. بنابراین، مدیریت بهینه تراکم گیاهی و نیتروژن می‌تواند به افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی و تولید بالاتر ایندیگو کارمین منجر شود. در شرایط تنش ملایم، هماهنگی بین پیگمان‌های فتوسنتزی و محافظتی به خوبی مشاهده شد. این یافته‌ها با پژوهش‌های پیشین در زمینه فیزیولوژی گیاهی لیختنالتال (۱۹۸۷)، ژانگ و همکاران (۲۰۱۴)، گوپتا و همکاران (۲۰۰۳)، جین و همکاران (۲۰۱۳) ستیانینگروم و همکاران (۲۰۲۰) و مودانلو و همکاران (۲۰۲۱) همخوانی دارد. سلیمانی ساردو و همکاران (۱۳۹۶) مشاهده کردند که افزایش تراکم گیاهی منجر به تغییر در تعادل سوخت و سازی گیاه و افزایش نسبت کاروتنوئید به کلروفیل می‌شود. همچنین، مدافع بهزادی و همکاران (۱۳۹۷) در مطالعه‌ای روی گیاه نیل مشاهده کردند که این نسبت یک شاخص مناسب برای پایش وضعیت استرس فیزیولوژیکی در گیاه است. نسبت کاروتنوئید به کلروفیل یک شاخص حساس و مهم در ارزیابی وضعیت فتوسنتزی و تنشی گیاه است. در شرایط بهینه مدیریتی (تراکم ۴۰ بوته و ۷۵ کیلوگرم نیتروژن)، گیاه نیل قادر به حفظ تعادل مناسب بین پیگمان‌های فتوسنتزی و محافظ بوده و می‌تواند حداکثر محتوای ایندیگو کارمین را در واحد سطح تولید کند. بنابراین، کنترل تراکم گیاهی و مدیریت صحیح نیتروژن ضروری است تا گیاه تحت شرایط تنش قرار نگیرد و کیفیت و کمیت محصول بهینه شود.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه، اثر سطوح کود نیتروژن و تراکم بوته بر صفات فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین گیاه نیل در شوشتر بررسی شد. کاشت بهاره (اردیبهشت) با بالاترین میزان کلروفیل و رنگدانه طبیعی همراه بود، در حالی که کاشت تأخیری در تابستان عملکرد فتوسنتزی و کیفیت را کاهش داد. کاربرد نیتروژن تا ۷۵ کیلوگرم در هکتار، صفات فتوسنتزی و محتوای کلروفیل را

بهبود بخشید، که نشان‌دهنده نقش کلیدی این عنصر در فعالیت فتوسیستم‌ها است؛ اما مصرف بیش‌ازحد (۱۰۰ کیلوگرم) با کاهش کارایی فتوسنتز و هدر رفت منابع همراه بود. همچنین، همبستگی مثبت و معنی‌دار بین کلروفیل و ایندیگو کارمین، ارتباط مستقیم ظرفیت فتوسنتزی با تولید متابولیت‌های ثانویه را تأیید کرد. افزایش تراکم بوته از ۳۰ به ۶۰ بوته در مترمربع به دلیل رقابت برای منابع، منجر به کاهش صفات فتوسنتزی شد، در حالی که تراکم ۴۰ بوته در مترمربع با حداکثر محتوای ایندیگو کارمین و حفظ عملکرد فتوسنتزی همراه بود. بنابراین، تلفیق کاشت بهاره، مصرف بهینه نیتروژن (۷۵ کیلوگرم در هکتار) و تراکم ۴۰ بوته در مترمربع، الگوی مناسبی برای دستیابی به حداکثر عملکرد کمی و کیفی نیل است.

### منابع

- Alizadeh Sahzabi, M., Khoshkhui, M., & Tavili, A. (2007). Effect of nitrogen levels on growth and yield of *Indigofera tinctoria* L. under greenhouse conditions. *Journal of Agricultural Sciences*, 13(3), 25–34.
- Arnon, D. I. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23(1), 112–121.
- Bagherpour, E., et al. (2015). Influence of planting date and nitrogen fertilizer on biomass and indigo content in *Isatis tinctoria*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 31(2), 223–234.
- Dadkhah, A., et al. (2009). Optimization of agronomic practices for *Indigofera tinctoria*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11(3), 215–225.
- Ebrahimi, R., Heidari, M., & Paknejad, F. (2015). The effect of different nitrogen levels on physiological characteristics and yield of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. *Journal of Crop Production*, 8(2), 235–252.
- Fateh, M., Kazemi Arababadi, H., Mohammadi, S., Farhbkh, F., & Zand, E. (2013). Effect of plant density and different levels of nitrogen fertilizer on yield components, leaf area, chlorophyll and grain protein of maize (*Zea mays* L.) and biomass (*Amaranthus retroflexus* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 29(2), 261–268.
- Fazeli, R., Amini, M., & Nikooye, B. (2019). Effect of planting date and plant density on growth indices and essential oil content of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 18(1), 101–112.
- Gupta, S. K., Singh, R. P., & Singh, R. (2003). Influence of nitrogen and phosphorus on growth and yield of *Indigofera tinctoria*. *Indian Journal of Agronomy*, 48(3), 178–181.
- Hajmirzaei, M. S., Ansari, H., Hashemnia, S. M., & Azizi, M. (2019). Investigation of the interactive effects of organic fertilizer and irrigation on some morphological and physiological indices of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Iranian Journal of Irrigation and Drainage*, 13(6), 1794–1805.
- Hernández-Cruz, J. A., Peña-Valdivia, C. B., Sánchez-Reyes, O. O., & Cruz-Ortega, R. (2002). Photosynthetic pigments, phenols and antioxidant activity in *Opuntia* spp. under saline stress. *Agrociencia*, 36(5), 583–591.
- Jain, S., Nayak, S., & Joshi, P. (2011). Phytochemical study and physical evaluation of *Indigofera tinctoria* leaves. *Pharmacie Global*, 1, 1–2.
- Karimi Farzegi, M., & Manoumi Zadeh, Z. (2014). Effect of planting density and planting date on yield and yield components of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) in Torbat-e Heydariyeh. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 9(36), 71–85.
- Khoshtnam, Z., Amiri-Nejad, M., Ayeen, A., & Parsamotlagh, B. (2021). Evaluation of intercropping system of indigo (*Indigofera tinctoria* L.) and roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) on yield, biodiversity and weed population dynamics. *Journal of Crop and Horticultural Production*, 10(2), 109–121.
- Koocheki, A., Joorabian, S., & Nassiri Mahallati, M. (2020). Effect of planting date and plant density on growth and yield of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under Mashhad conditions. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.22049/ijfcr.2020.26735.1450>
- Laitonjam, W. S., & Wangkheirakpam, S. (2011). Comparative study of the major components of the indigo dye obtained from *Strobilanthes flaccidifolius* Nees. *And Indigofera tinctoria* Linn. *Journal of Natural Dyes*, 3(1), 15–22.

- Lichtenthaler, H. K. (1987).** Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350–382.
- Lootfalizadeh, H., et al. (2011).** Effects of nitrogen fertilizer on chlorophyll content in legumes. *Journal of Plant Nutrition*, 34(10), 1452–1463.
- Modafe Behzadi, N., Rashed Mohammadi, P., & Jahan, M. (2018).** Influence of planting date and plant density on morphological characteristics and yield of indigo (*Indigofera tinctoria* L.). *Agricultural Ecology*, 10(4), 1067–1079.
- Modanlo, M., Amiri, M. B., & Ghanbari, A. (2021).** Effects of planting date and nitrogen levels on morphological traits and essential oil content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 24(2), 321–331.
- Nakabayashi, R., & Saito, K. (2015).** Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 24, 10–16.
- Nematiyan, A., & Ghouschi, F. (2011).** Effect of planting density and nitrogen fertilizer on yield and yield components of medicinal plant Aloe vera (*Aloe barbadensis* Mill). *Journal of Crop Ecophysiology (Islamic Azad University, Ahvaz Branch)*, 3(10), 85–93.
- Nohong, M., et al. (2019).** Growth response of *Indigofera zollingeriana* to nitrogen fertilization. *Tropical Agriculture Research*, 31(2), 123–132.
- Noroozi, Y., Ghobadi, M., Saedi, M., Rezadoust, H., Kahrizi, D., & Dougan, H. (2024).** Effect of nitrogen application and harvest cutting on yield, quality, and essential oil composition of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Medicinal Plant Eco-Phytochemistry*, 2(12), 27–44.
- Omid Beigi, A. (2021).** Comprehensive guide to the production and processing of medicinal plants (Vol. 1). Behnashr Publications (Astān-e Quds Razavi).
- Sajed Gollojeh, K., Khomari, S., Shekhzadeh, P., Sabaghnia, N., & Mohebodini, M. (2020).** The effect of foliar spray of Nano silicone and salicylic acid on physiological traits and seed yield of spring rapeseed at water limitation conditions. *Journal of Crop Production*, 12(4), 137–156. <https://doi.org/10.22069/ejcp.2020.16396.2221>
- Sales, P. J., Da Silva, J. B., & De Souza Filho, A. P. S. (2016).** Light competition and plant spacing affect biomass production and essential oil composition in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Industrial Crops and Products*, 87, 209–216.
- Setyaningrum, D., Budiastuti, M. T. S., Pujiasmanto, B., Purnomo, D., & Supriyono. (2020).** Light intensity and biofertilizers effect on natural indigo production and nutrient uptake of *Indigofera tinctoria* L. *Indian Journal of Agricultural Research*, 54(5), 578–584.
- Shabahang, J., Radmehr, M., & Ahmadvand, R. (2014).** The effect of planting density on growth indices and grain yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Journal of Crop Production and Processing*, 4(12), 133–143.
- Soleimani Sardo, M., Afsharmanesh, Gh. R., & Roodbari, Z. (2018).** Evaluation of planting date and plant density on yield and yield components of mung bean (*Vigna radiata* L.) in Jiroft region. *Journal of Agronomy and Plant Breeding in Dry Regions*, 1(1), 27–34.
- Tahmasebi, A., Kamali, H. R., & Zakari Darbaghi, Z. (2025).** Evaluation of plant density effect on the nutritional quality of seeds in four quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) cultivars under hot and humid conditions *Journal of Research in Plant Metabolites*, 3(1), 5–19. <https://doi.org/10.22034/jrpsm.2025.517031.1064>
- Torrecilla, J. M., et al. (2011).** Secondary metabolite accumulation under nitrogen stress in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(10), 1123–1130.
- Zahedifar, M., et al. (2022).** Soil chemical analysis in agricultural research. *Iranian Journal of Soil Research*, 36(4), 450–460.
- Zarei, Sh., Hosseibi, P., Kahrizi, D., & Safi Aldin Ardabili, S. M. (2021).** Effect of nitrogen on yield and yield components of camelina (*Camelina sativa*) under different planting dates. *Iranian Journal of Crop Research*, 19(4), 311–325.
- Zargaran Khouzan, M. R., & Daei Naseri, S. M. A. (2025).** Nile: A deep dive into the history of natural and synthetic indigo. Arshak Publishing.
- Zhang, Y., Wang, X., Liu, Y., & Zhao, W. (2014).** Leaf photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence parameters of *Paeonia lactiflora* under different light intensities. *Photosynthetica*, 52(3), 447–455.