

Optimization of Planting Date and Plant Density for Maximizing Indigocarmine Content and Improving Photosynthetic Traits of Medicinal-Industrial Indigo (*Indigofera tinctoria* L.) under Khuzestan Climatic Conditions

Pages
99-115

M.R. Zargaran Khouzani¹, M. H. Gharineh^{*2}, A. Koochakzadeh³ and A.Lotfi Jalalabadi⁴

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

*Corresponding author: m.gharineh@asnrukh.ac.ir

Received date: 2025.10.04

Accepted date: 2026.01.10

Abstract

Indigofera tinctoria L. is one of the most important medicinal-industrial plants, valued for its indigo carmine pigments and valuable phenolic compounds, which have extensive applications in the pharmaceutical and dyeing industries. As a natural source of plant-based dyes, it holds high economic value & exhibits moderate tolerance to environmental stresses such as drought and heat. This study was conducted in Shahid Bahonar Agricultural High School, Shushtar with the aim of evaluating the effects of planting date and plant density on photosynthetic traits and indigo carmine content of Indigo plant, using a split-plot design based on a randomized complete block design with three replications over two consecutive growing seasons (2022–2023). Treatments in the first year included six planting dates (April 29, May 19, June 8, June 28, July 17 and August 6) and four plant densities (30, 40, 50 and 60 plants per square meter). In the second year, two planting dates (July 17 and August 6) were excluded, and only four planting dates (April 29, May 19, June 8 and June 28) along with the same four plant densities were tested. Analysis of variance revealed that planting date, plant density, and their interaction significantly affected all qualitative traits at the 1% probability level. Mean comparison results showed that early planting in spring (April 29) yielded the highest values for chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll (1.82, 0.73 and 2.55 mg/g, respectively), as well as indigo carmine content (5.91 g/m²). Delaying planting, especially during the hotter months, significantly reduced all qualitative traits. A plant density of 40 plants per square meter was identified as the optimal level, at which the highest photosynthetic indices and indigocarmine content were observed. A significant positive correlation between chlorophyll content and indigocarmine concentration indicated a direct relationship between photosynthetic activity and secondary metabolite production in this plant. Overall, early planting in April and a plant density of 40 plants/m² are recommended as the best treatments for maximizing both the quality and quantity of indigo carmine in the indigo plant.

Keywords: Agronomic practices, Chlorophyll content, Cultivation management, Natural dyes and Secondary metabolites.

بهینه‌سازی زمان کاشت و تراکم بوته برای حداکثرسازی محتوای ایندیگوکارمین و بهبود صفات فتوسنتزی گیاه دارویی-صنعتی نیل (*Indigofera tinctoria* L.) تحت شرایط اقلیمی خوزستان

شماره صفحات

۹۹-۱۱۵

محمد رضا زرگران خوزانی^۱، محمدحسین قرینه*^۲، احمد کوچک زاده^۳ و امین لطفی جلال آبادی^۴^{۱، ۲، ۳ و ۴} گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، شهر ملاثانی، ایران.* نویسنده مسئول: m.gharineh@asnruk.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۲

چکیده

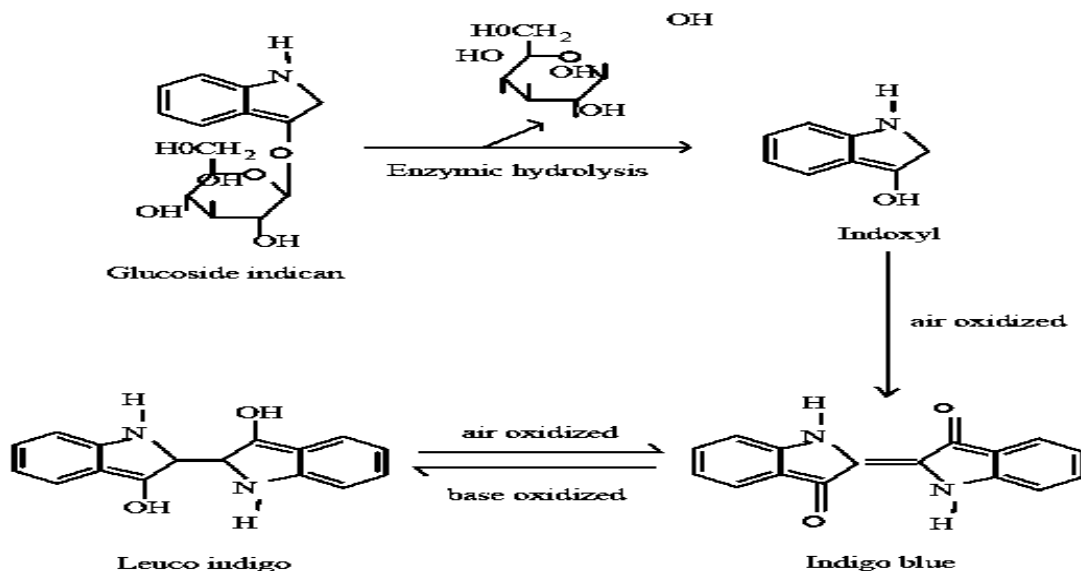
گیاه نیل (*Indigofera tinctoria* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی-صنعتی است که به دلیل داشتن رنگدانه ایندیگو کارمین و ترکیبات فنولی ارزشمند، کاربردهای متعددی در صنایع داروسازی و رنگرزی دارد. این گیاه به عنوان یک منبع طبیعی رنگزا، علاوه بر ارزش اقتصادی بالا، از تحمل نسبی به تنش‌های محیطی مانند خشکی و گرما برخوردار است. این پژوهش با هدف بررسی اثر زمان کاشت و تراکم بوته بر صفات فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین گیاه نیل در هنرستان کشاورزی شهید باهنر شوشتر در قالب طرح کرت‌های یک‌بار خردشده بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و در دو سال زراعی (۱۴۰۱-۱۴۰۲) اجرا گردید. تیمارها در سال اول شامل شش تاریخ کاشت (۹ و ۲۹ اردیبهشت، ۱۸ خرداد، ۷ و ۲۷ تیر، ۱۶ مرداد) و چهار تراکم بوته (۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ بوته در متر مربع) بودند که در سال دوم، دو تاریخ کاشت (۲۷ تیر و ۱۶ مرداد) حذف و تنها چهار تاریخ کاشت (۹ و ۲۹ اردیبهشت، ۱۸ خرداد و ۷ تیر) در کنار چهار سطح تراکم مورد آزمایش قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تاریخ کاشت، تراکم بوته و اثر متقابل آن‌ها بر تمامی صفات کیفی در سطح ۱٪ معنی‌دار بودند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کاشت در اوایل فصل بهار (۹ اردیبهشت) بیشترین مقادیر را برای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل (۱/۸۲، ۰/۷۳، ۲/۵۵ میلی‌گرم بر گرم) و محتوای ایندیگو کارمین (۵/۹۱ گرم بر مترمربع) فراهم کرد. در مقابل، تأخیر در کاشت، به‌ویژه در ماه‌های گرم سال، باعث کاهش معنی‌دار تمامی صفات کیفی شد. همچنین، تراکم ۴۰ بوته در متر مربع به‌عنوان بهینه‌ترین سطح تعیین شد که در آن بالاترین مقادیر شاخص‌های فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین مشاهده شد. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین کلروفیل‌ها و محتوای ایندیگو کارمین نشان داد که فعالیت فتوسنتزی و تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه به‌طور مستقیم مرتبط هستند. در مجموع، کاشت زود هنگام در اردیبهشت و استفاده از تراکم ۴۰ بوته در متر مربع به عنوان بهترین تیمار در جهت دستیابی به حداکثر کیفیت و مقدار ایندیگو کارمین پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: رنگ‌های طبیعی، عملیات زراعی، محتوای کلروفیل، متابولیت‌های ثانویه و مدیریت کشاورزی.

مقدمه

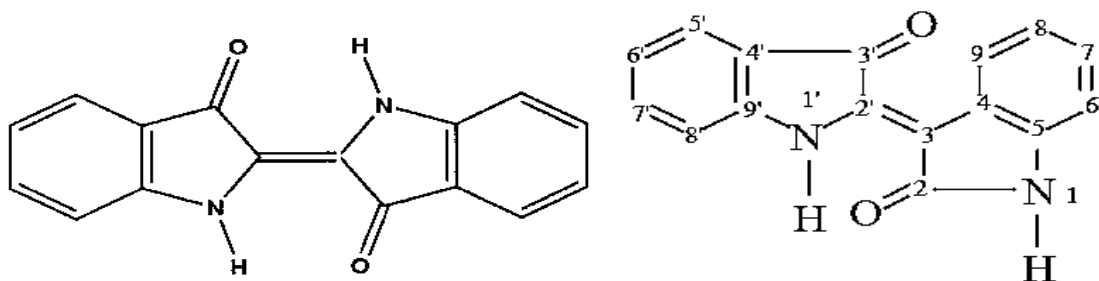
در سال‌های اخیر، به واسطه تأثیرات منفی فرآورده‌های مصنوعی، تمایل به استفاده از محصولات گیاهی در جوامع مختلف به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. به همین دلیل، زراعت برخی از گیاهان با کاربردهای خاص که به‌طور طبیعی در عرصه‌های وحشی رشد می‌کنند، به‌عنوان گزینه‌های جدید در بسیاری از مناطق جهان رواج یافته است. یکی از این گیاهان، نیل با نام علمی *Indigofera tinctoria* L. است که به‌عنوان یک گیاه دارویی و صنعتی از خانواده بقولات محسوب می‌شود. سابقه کشت این گیاه در ایران طولانی است و از برگ‌های آن ماده‌ای به‌نام ایندیگو یا نیل استخراج می‌شود. رنگ آبی ناشی از نیل دارای ثبات بسیار بالایی است و در رنگرزی پارچه و اشیاء به‌کار می‌رود. استفاده از رنگ‌های طبیعی به‌جای رنگ‌های مصنوعی باعث شده که این نوع گیاهان به فراموشی سپرده شوند (Modafeh Beyzadi et al., 2018). منبع این گیاه به آسیای شرقی برمی‌گردد (Sarhadi et al., 2014)، اما در حال حاضر در جنوب شرقی و برخی مناطق مرکزی اروپا نیز یافت می‌شود. نیل به‌طور خاص در مناطق حاره‌ای رشد می‌کند و بهترین شرایط برای آن آب‌وهوای گرم و مرطوب است. این گیاه تا ارتفاع ۱۲۵۰ متر از سطح دریا سازگاری خوبی را نشان می‌دهد. مناطق با ابرناکی زیاد در طول دوره رشد برای این گیاه مناسب نیستند. میانگین دمای مطلوب برای رشد نیل ۳۰ درجه سانتی‌گراد است و حداقل دمای خاک برای جوانه‌زنی آن بین ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. این گیاه برای رشد و نمو به یک دوره حداقل ۱۲۰ روزه بدون سرما و یخبندان نیاز دارد و دماهای زیر صفر می‌توانند به آن آسیب جدی وارد کنند (Modafeh Beyzadi et al., 2018). تاریخ کاشت یکی از عوامل کلیدی تأثیرگذار بر طول دوره رشد رویشی و زایشی و توازن میان آن‌ها و دیگر عوامل تولید، کیفیت برداشت و در نهایت عملکرد است. کاشت در زمان مناسب به مهار آسیب‌های ناشی از سرمای دیررس بهاره و زودرس پاییزی، آفات و بیماری‌ها و علف‌های هرز کمک می‌کند. همچنین، تطابق زمان گلدهی با دمای مطلوب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Alizadeh et al., 2023). هدف از تعیین زمان کاشت، شناسایی زمان مطلوب برای کاشت یک گیاه است که در آن شرایط محیطی برای جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه مناسب باشد و گیاه از تأثیرات منفی شرایط نامساعد محیطی در امان بماند. زمان کاشت به‌دلیل تغییرپذیری طول روز، دما و رطوبت نسبی، تأثیر زیادی بر رشد، نمو و تولید گیاه در طول فصل رشد دارد و یکی از مهم‌ترین عوامل مدیریتی در تولید تمامی محصولات به‌شمار می‌رود. 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 (Sajed Gollojeh et al., 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 Bighi, 2021؛ Koocheki *et al.*, 2020) گیاه نیل حاوی ترکیبات شیمیایی متنوعی است که از جمله آن‌ها می‌توان به اندیکال، اندوکسیل، ایزاتان و لابنزم اشاره کرد. اجزای مؤثر این گیاه شامل آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، ترکیبات فنولیک، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها و ترکیبات معدنی است. همچنین، نیل شامل خاکستر و خاکستر محلول در اسید و آب نیز می‌باشد (Jain *et al.*, 2010). ایندیگو کارمین به‌عنوان یک متابولیت ثانویه طبیعی به‌حساب می‌آید (Sales *et al.*, 2016). این گیاه دارای گلوکوزید بدون رنگ از فرم انول است که از ایندیکال‌ها، مانند ایندیکان، تشکیل می‌شود و به‌وسیله آنزیم‌ها به اندوکسیل هیدرولیز می‌شود، سپس به‌شکل نیل آبی (ایندیگو) از طریق اکسیداسیون هوازی تبدیل می‌شود (شکل ۱) (Kun Lestari, 1998). اجزای اصلی عصاره خام نیل شامل دو رنگدانه آبی رنگ ایندیگو کارمین و رنگدانه قرمز ایندیروبین است. ایندیروبین رنگدانه‌ای صورتی-قرمز است (شکل ۲) که مشابه ایندیگو کارمین آبی رنگ، از گیاهانی مانند نیل ژاپنی (*Persicaria tinctoria* Ait.) تولید می‌شود (Shin & Lee, 1993؛ Maier *et al.*, 1991).



شکل ۱- تغییرات رنگدانه ایندیگو از مواد شیمیایی (Chanayath *et al.*, 2002)

Figure 1- Indigo pigment changes from chemicals (Chanayath *et al.*, 2002)



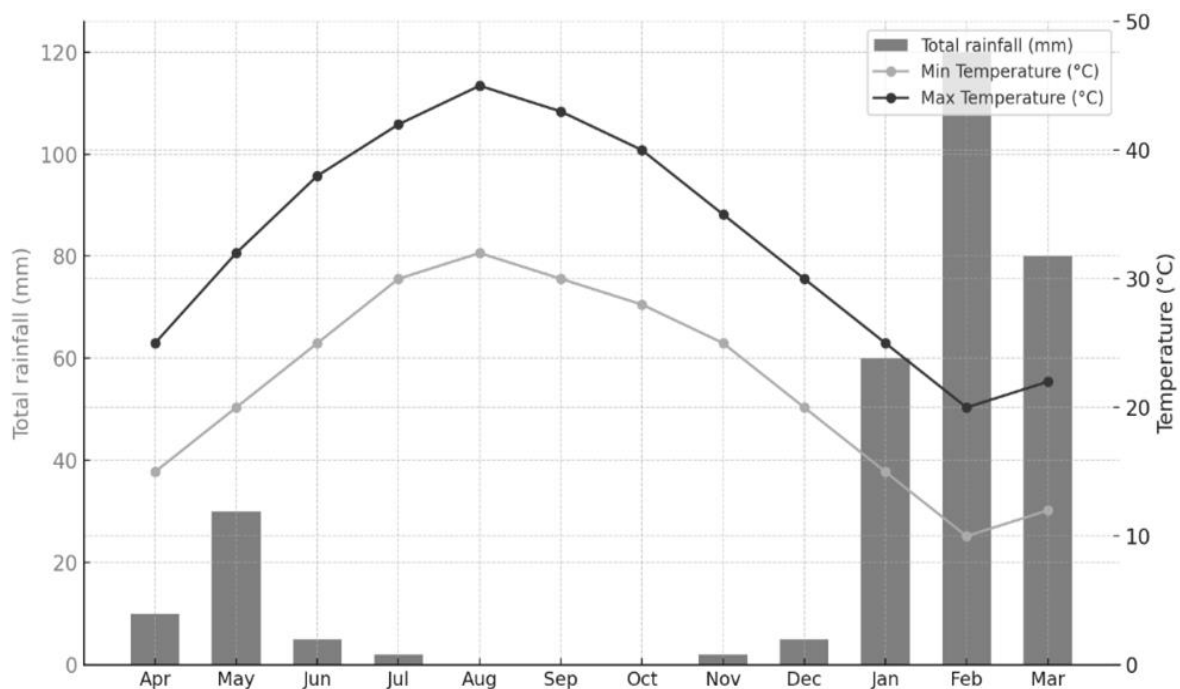
شکل ۲- ساختار ترکیب شیمیایی ایندیگو کارمین (Strobel, D. Gröger, 1989) و ایندیروبین (Chanayath *et al.*, 2002)

Figure 2- Structure of the chemical compound of Indigo carmine (Strobel, D. Gröger, 1989) and Indirubin (Chanayath *et al.*, 2002)

ایندیگو کارمین به عنوان ماده‌ای رنگی در مناطق گرمسیر از گیاه نیل به دست می‌آید و تا قرون وسطی در اروپا بخش قابل توجهی از نیاز به رنگ آبی را تأمین می‌کرد. با این حال، از قرن ۱۷ به بعد، مصرف نیل به تدریج کاهش یافت و جای خود را به گونه‌های دیگر جنس ایندیگوفر داد. تا قرن ۱۹، نیل و دیگر منابع طبیعی گیاهی تولید ایندیگو کارمین به رنگ‌های مصنوعی واگذار شدند، که این روند همچنان ادامه دارد. استخراج رنگ آبی از گیاه نیل یک فرایند پیچیده است که نیاز به دقت و رعایت مراحل خاصی دارد. با توجه به اهمیت روزافزون رنگ‌های طبیعی، این فرآیند می‌تواند ارزش تجاری و فرهنگی زیادی داشته باشد و در صنایع مختلف، مورد استفاده قرار گیرد (Zargaran Khouzani & Daei Naseri, 2025). با توجه به اهمیت این گیاه در تأمین رنگ‌های طبیعی و همچنین کاربردهای دارویی آن، شناسایی بهترین زمان کاشت 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.

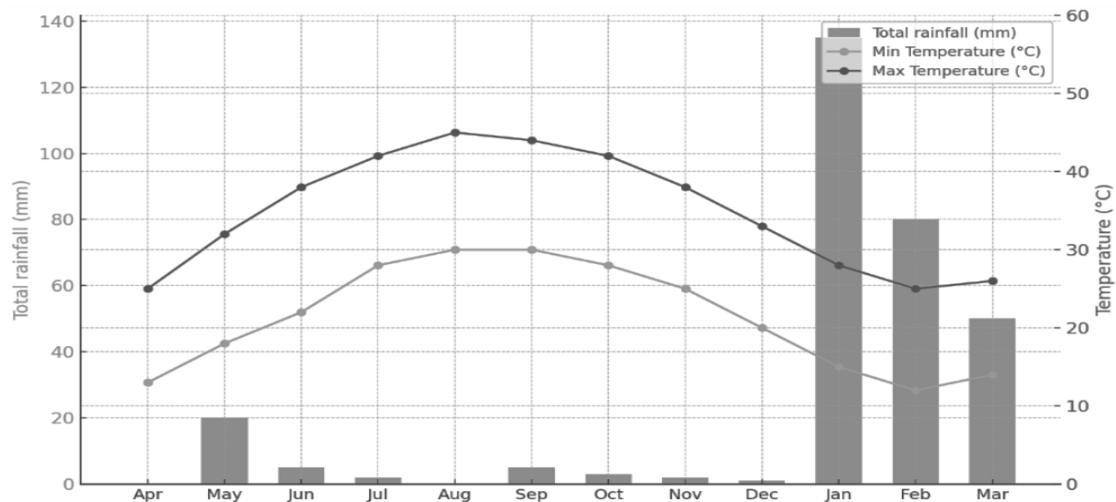
مواد و روش‌ها

این پژوهش در هنرستان کشاورزی شهید باهنر واقع در شهر شوشتر طی سال‌های زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۲ به اجرا درآمد. شوشتر با 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 و ۴) در استان خوزستان واقع شده است.



شکل ۳- میانگین درجه دما حداقل و حداکثر و میزان بارندگی در سال ۱۴۰۱ شهرستان شوشتر

Figure 3- Average minimum and maximum temperatures and rainfall in 2022 in Shushtar County



شکل ۴- میانگین دما حداقل و حداکثر و میزان بارندگی در سال ۱۴۰۲ شهرستان شوشتر

Figure 4- Average minimum and maximum temperatures and rainfall in 2023 in Shushtar County

آزمایش به صورت کرت‌های یک بار خرد شده و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) با سه تکرار در سال‌های زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۲ صورت پذیرفت. متغیرهای آزمایشی در سال اول شامل ۶ تاریخ کاشت (۹ اردیبهشت، ۲۹ اردیبهشت، ۱۸ خرداد، ۷ تیر، ۲۷ تیر و ۱۶ مرداد) به‌عنوان عامل اصلی و چهار سطح تراکم بوته (۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ بوته در متر مربع) به‌عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شد؛ که در سال دوم با حفظ سطوح تراکم ۲ تاریخ کاشت (۲۷ تیر، ۱۶ مرداد) حذف و آزمایش با ۴ تاریخ کاشت و تراکم تکرار شد. برای ارزیابی کیفیت و ویژگی‌های خاک، نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی برای تعیین از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی متر در هر دوسال انجام و نتایج به صورت جداول (۱) ارائه گردید.

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

Table 1- Physical and chemical properties of the soil before planting (depth: 0–30 cm) in the first and second years

سال	پی‌اچ	هدایت الکتریکی	نیترژن کل	فسفر قابل جذب	پتاسیم قابل جذب	رس	لای	ماسه
Year	pH	Electrical Conductivity (dS/m)	Total Nitrogen (%)	Available Phosphorus (ppm)	Available Potassium (ppm)	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)
2021	7.56	2.04	0.20	7	480	13	48	39
2022	7.78	2.3	0.25	15	420	13	48	39

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 به‌صورت برنامه‌ریزی شده طبق تاریخ‌های تعیین شده انجام پذیرفت. 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. 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 ۴۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی و فرابنفش Hach DR6000 قرائت شد. ایندیگو کارمین یکی از رنگدانه‌های طبیعی موجود در گیاه نیل است که دارای ویژگی‌های خاص رنگی می‌باشد و به عنوان یک رنگدانه در صنعت پوشاک و رنگ آمیزی استفاده می‌شود. 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. (Laitonjam & Wangkheirakpam, 2011).

در این تحقیق، تجزیه‌ی آماری برای تحلیل داده‌ها در دو سال متوالی انجام پذیرفت. برای بررسی اثر متغیرها و مقایسه میانگین‌ها، از تجزیه‌ی واریانس (ANOVA) استفاده شد. پس از انجام تجزیه‌ی واریانس و در صورت معنی‌دار بودن نتایج، میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال خطای ۵ درصد مقایسه شدند. نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ و SPSS نسخه ۲۶ برای انجام تجزیه‌ی واریانس و تحلیل‌های آماری استفاده شد و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها به‌کار گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس سال اول آزمایش (جدول ۲) نشان داد که تمامی عوامل شامل تاریخ کاشت، تراکم بوته و اثر متقابل آن‌ها بر تمامی صفات کیفی معنی‌دار بودند بر اساس داده‌های به‌دست آمده (جدول ۶)، کاشت زود هنگام (اردیبهشت ماه) منجر به حداکثر مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی و درصد ایندیگو کارمین شد، در حالی که تأخیر در کاشت، به‌ویژه در ماه‌های گرم سال، باعث کاهش معنی‌دار تمامی صفات کیفی گردید. این موضوع می‌تواند به دلیل افزایش تنش حرارتی و کاهش رطوبت خاک در دوره رشد گیاه باشد (Izadi et al., 2022). در میان تراکم‌های مختلف، تراکم ۴۰ بوته در مترمربع به عنوان بهینه‌ترین سطح تعیین شد، که در این تراکم، بالاترین مقادیر شاخص‌های فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین مشاهده شد. این یافته با مطالعات خرم دل و همکاران (۲۰۱۶) روی گیاه نیل نیز همخوانی دارد که در آن بهینه‌ترین تراکم برای حداکثر عملکرد و کیفیت

متابولیت‌های ثانویه گزارش شده بود. افزایش تراکم بوته بیش از این حد منجر به افزایش رقابت گیاهان با یکدیگر برای دسترسی به نور، آب و مواد مغذی شد و در نتیجه باعث کاهش فتوسنتز و سنتز متابولیت‌های ثانویه شد. همچنین، همبستگی مثبت و قوی بین محتوای کلروفیل و ایندیگو کارمین (۰/۹۵) مشاهده شد که نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین فرآیندهای فتوسنتزی و سنتز متابولیت‌های ثانویه در این گیاه است. این موضوع توسط عبدالجلیل و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش شده است که در مطالعه‌ای بر روی گیاه دارویی پروانش (*Catharanthus roseus*) مشاهده کردند که تنش‌های محیطی می‌توانند همزمان بر سنتز کلروفیل و متابولیت‌های ثانویه تأثیر بگذارند. همچنین، همبستگی بسیار بالای بین کلروفیل a و b (۰/۹۸) نیز نشان‌دهنده این است که تغییرات این دو شاخص در واکنش به تنش‌ها بسیار هماهنگ است (جدول ۸). داده‌های به‌دست آمده از جداول میانگین اثر متقابل تراکم و تاریخ کاشت (جدول ۶ و ۷) نشان داد که بیشترین مقدار محتوای ایندیگو کارمین (۶/۱۵) گرم بر مترمربع) در تاریخ کاشت زودهنگام (اردیبهشت ماه) و تراکم ۴۰ بوته در متر مربع به دست آمد. کاهش تدریجی این شاخص در تاریخ‌های دیرتر و تراکم‌های بالاتر می‌تواند ناشی از کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی این ترکیب باشد (Modafeh Beyzadi *et al.*, 2018). همچنین، تفاوت معنی‌دار بین دو سال آزمایش نشان‌دهنده تأثیر شرایط محیطی و مدیریتی بود، اما الگوی پاسخ گیاه به تیمارها در هر دو سال یکسان بود. نتایج اثر متقابل نیز در سطح ۵٪ معنی‌دار بود که نشان‌دهنده تأثیر ترکیبی این دو عامل بر صفات کیفی است. این موضوع اهمیت مدیریت توأم زمان کاشت و تراکم بوته را در دستیابی به حداکثر کیفیت و مقدار ایندیگو کارمین برجسته می‌کند. بر اساس داده‌های جدول ۶، بیشترین مقدار کلروفیل a (۱/۸۲ میلی‌گرم بر گرم)، کلروفیل b (۰/۷۳ میلی‌گرم بر گرم) و کلروفیل کل (۲/۵۵ میلی‌گرم بر گرم) در تاریخ کاشت ۹ اردیبهشت مشاهده شد، در حالی که کمترین مقدار آن‌ها در تاریخ کاشت ۱۶ مرداد به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد که شرایط مساعد دما و رطوبت در اواسط فصل بهار، سنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی را تسهیل می‌کند (Modafeh Beyzadi *et al.*, 2018). همچنین، تراکم بوته نیز تأثیر معنی‌داری بر رنگدانه‌های فتوسنتزی داشت. کمترین مقدار کلروفیل کل (۱/۵۸ میلی‌گرم بر گرم) در تراکم ۶۰ بوته در متر مربع مشاهده شد، در حالی که بیشترین مقدار (۲/۴۲ میلی‌گرم بر گرم) در تراکم ۳۰ بوته در متر مربع به دست آمد (جدول ۵). این نتیجه می‌تواند ناشی از افزایش رقابت گیاهان برای نور، آب و مواد مغذی در تراکم‌های بالا باشد. این یافته‌ها با پناهنده و همکاران (۲۰۲۲) همخوانی دارد که نشان دادند افزایش تراکم گیاهی در گیاه شیکوره ویتلوف (*Cichorium intybus* L.) موجب کاهش فتوسنتز و عملکرد شد. همچنین پژوهش کوچکی و همکاران (۲۰۲۰) بر روی گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) نشان داد تراکم بالای گیاهان می‌تواند منجر به کاهش دسترسی به نور و در نتیجه کاهش سنتز کلروفیل شود. محتوای کاروتنوئیدها در تاریخ کاشت زودهنگام (اردیبهشت ماه) بیشترین مقدار را داشت (۰/۴۸ میلی‌گرم بر گرم)، اما در تاریخ‌های دیرتر به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۶). کاهش حدود ۲۰ درصدی کاروتنوئیدها در تاریخ کاشت مرداد ماه نشان‌دهنده تخریب این رنگدانه‌ها تحت تنش گرمایی است. در تاریخ‌های دیررس (مرداد ماه) و تراکم‌های

بالا (۶۰ بوته در متر مربع) افزایش نسبت کاروتنوئید به کلروفیل مشاهده شد (جدول ۵)، که شاید ناشی از فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی گیاه در پاسخ به شرایط نامساعد است. همبستگی منفی قوی این شاخص با کلروفیل‌ها (۰/۸۲-) تأیید می‌کند که تحت تنش، گیاه منابع خود را به سمت تولید کاروتنوئیدها سوق می‌دهد (جدول ۸). این یافته از این نظر مهم است که نشان می‌دهد گیاه نیل در شرایط تنش، متابولیسم‌های تنظیمی دقیقی برای حفظ تعادل بین رنگدانه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه دارد. در جدول ۸، ضریب همبستگی پیرسون بین صفات کیفی گیاه نیل نشان داد که تمامی صفات مربوط به رنگدانه‌های فتوسنتزی با محتوای ایندیگو کارمین همبستگی مثبت و قوی دارند. برای مثال، همبستگی بین کلروفیل کل و ایندیگو کارمین برابر با ۰/۹۴ و بین محتوای ایندیگو کارمین و کاروتنوئیدها ۰/۹۲ بود. این موضوع اهمیت ارتباط بین فرآیندهای فتوسنتزی و سنتز متابولیت‌های ثانویه را در گیاه نیل برجسته می‌کند. این امر می‌تواند به عنوان یک شاخص زیستی در برنامه‌های به‌نژادی و مدیریت زراعی گیاهان دارویی-صنعتی مورد استفاده قرار گیرد (Annie Felicia & Muthulingam, 2012; Pramod *et al.*, 2010). نتایج این پژوهش نشان داد که کاشت زود هنگام (اردیبهشت ماه) و استفاده از تراکم ۴۰ بوته در متر مربع به‌عنوان مهم‌ترین راهبردهای زراعی در جهت دستیابی به حداکثر کیفیت و مقدار ایندیگو کارمین پیشنهاد می‌گردد. این نتایج از این نظر اهمیت دارند که نشان می‌دهند حتی در شرایط تنش، گیاه نیل متابولیسم‌های تنظیمی دقیقی برای حفظ تعادل بین رنگدانه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه دارد که می‌تواند در برنامه‌های بهره‌وری و توسعه گیاهان دارویی-صنعتی مورد استفاده قرار گیرد (Zargarani Khouzani *et al.*, 2022). این موضوع با مطالعات آئی فلیسیا و موثولینگام (۲۰۱۲) نیز هم‌خوانی دارد که در مطالعه‌ای بر روی گیاه نیل مشاهده کردند که تغییرات در محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی با تغییرات در محتوای ایندیگو کارمین همراه است. همچنین، پژوهش‌های پیشین روی گیاهان دارویی دیگر مانند توت طلائی (*Physalis peruviana* L.) و عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi* L.) و گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) نیز نشان داده‌اند که تغییرات زراعی می‌تواند به‌طور مستقیم بر محتوای متابولیت‌های ثانویه تأثیر بگذارد (Siahmansour *et al.*, 2020; Saremi *et al.*, 2021; Ali *et al.*, 2022). در جدول ۴ و ۵، مقایسه میانگین اثرات ساده تاریخ کاشت و تراکم بوته نشان داد که کاشت در اردیبهشت ماه باعث بهبود قابل توجه تمامی صفات فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین شد. همچنین، تراکم ۴۰ بوته در مترمربع در مقایسه با سایر تراکم‌ها، بهترین نتایج را از لحاظ محتوای کلروفیل و ایندیگو کارمین به‌دست آورد. این یافته‌ها اهمیت تطبیق زمان کاشت با شرایط اقلیمی محلی و انتخاب مناسب تراکم بوته در افزایش کیفیت و مقدار متابولیت‌های ثانویه را برجسته می‌کند. داده‌های جدول ۳ نیز نشان دادند که در تراکم ۴۰ بوته در مترمربع، هم‌زمان با حداکثر کلروفیل و ایندیگو کارمین، نسبت کاروتنوئید به کلروفیل نیز بهینه حفظ شده بود. این نسبت به‌عنوان یک شاخص مهم در سلامت گیاه و توانایی آن در تحمل تنش‌های محیطی مطرح است. بنابراین، حفظ این تعادل در تیمارهای بهینه زراعی بسیار حائز اهمیت است. در جدول ۶، محتوای ایندیگو کارمین در تاریخ کاشت زود هنگام و تراکم ۴۰ بوته در متر مربع به ۵/۹۱ گرم بر مترمربع رسید، در

حالی که در تراکم ۶۰ بوته، این مقدار به ۳/۶۷ گرم بر مترمربع کاهش یافت. این اختلاف معنی‌دار نشان‌دهنده نقش مهم مدیریت صحیح تراکم بوته در حفظ تعادل بین رقابت گیاهی و بهره‌مندی از منابع محیطی است. این یافته‌ها با مطالعات خورشیدی و همکاران (۲۰۰۹) نیز هم‌خوانی دارد که نشان دادند افزایش تراکم گیاهی می‌تواند منجر به کاهش کیفیت و کمیت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی شود. علاوه بر این، کلروفیل کل در تاریخ کاشت زود هنگام (اردیبهشت ماه) بیشترین مقدار را داشت (۲/۵۵ گرم بر مترمربع) در حالی که در تاریخ‌های دیرتر به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. این کاهش می‌تواند ناشی از کاهش طول روز، کاهش دسترسی به نور و افزایش تنش حرارتی در ماه‌های گرم سال باشد (Abouseidi *et al.*, 2021). همچنین، بر اساس داده‌های به‌دست آمده از جدول ۶، در تاریخ کاشت ۹ اردیبهشت و تراکم ۴۰ بوته در متر مربع، محتوای ایندیگو کارمین به ۵/۹۱ گرم بر مترمربع رسید، در حالی که در تراکم ۶۰ بوته، این مقدار به ۳/۶۷ گرم بر مترمربع کاهش یافت. این اختلاف معنی‌دار نشان‌دهنده نقش مهم مدیریت صحیح تراکم بوته در حفظ تعادل بین رقابت گیاهی و بهره‌مندی از منابع محیطی است. این یافته‌ها با مطالعه صابری و همکاران (۲۰۱۰) نیز هم‌خوانی دارد که نشان دادند افزایش تراکم گیاهی در ذرت موجب کاهش فتوسنتز و عملکرد شد. نتایج این پژوهش نشان دادند که گیاه نیل در شرایط تنش، متابولیسم‌های تنظیمی دقیقی برای حفظ تعادل بین رنگدانه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه دارد. این موضوع اهمیت استفاده از این گیاه در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران و دیگر کشورهای دارای اقلیم مشابه را برجسته می‌کند. این گیاه با داشتن ارزش دارویی و صنعتی بالا، می‌تواند در توسعه کشاورزی پایدار و افزایش ارزش افزوده محصولات کشاورزی ایران نقش مؤثری ایفا کند (Pramod *et al.*, 2010; Zargaran Khouzani *et al.*, 2022). همچنین، نتایج تحلیل آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین دو سال آزمایش وجود داشت که این امر به‌خوبی با تغییرات شرایط اقلیمی در دو سال مرتبط بود. با این حال، الگوی پاسخ گیاه به تیمارها در هر دو سال یکسان بود، که نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری بالای گیاه نیل در پاسخ به تغییرات زراعی و محیطی است. این یافته اهمیت استفاده از این گیاه در مناطق با شرایط محیطی متغیر را برجسته می‌کند (Khoramdel *et al.*, 2016). در نهایت، با توجه به افزایش تقاضا برای رنگ‌های طبیعی و داروهای گیاهی، احیای ظرفیت‌های اکولوژیک و ارتقای کیفیت محصولات گیاه نیل می‌تواند فرصت‌های اقتصادی قابل توجهی برای کشور به همراه داشته باشد (Zargaran Khouzani & *et al.*, 2022). این گیاه با داشتن ارزش دارویی و صنعتی بالا، می‌تواند در توسعه کشاورزی پایدار و افزایش ارزش افزوده محصولات کشاورزی ایران نقش مؤثری ایفا کند.

جدول ۲: تجزیه واریانس اثر تراکم و تاریخ کاشت بر صفات کیفی گیاه نیل (سال ۱۴۰۱)

Table 2: Analysis of variance of the effect of density and planting date on indigo plant quality traits (2022)

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
0.003	0.15	0.005	0.020	0.008	0.012	2	بلوک (Block)
0.08**	5.82**	0.12**	0.63**	0.18**	0.45**	5	تاریخ کاشت (T) Planting date
0.002	0.18	0.004	0.021	0.006	0.015	10	خطای کرت اصلی (Ea) Main plot error
0.06**	4.75**	0.09**	0.44**	0.12**	0.32**	3	تراکم (D) Density
0.01*	1.24*	0.02*	0.11*	0.03*	0.08*	15	T × D
0.001	0.12	0.003	0.014	0.004	0.010	36	خطای کرت فرعی (Eb) Subplot error

*Significant at the 5% level ($p < 0.05$) ** Significant at the 1% level ($p < 0.01$)*معنی دار در سطح ۵٪ ($p < 0.05$) ** معنی دار در سطح ۱٪ ($p < 0.01$)

جدول ۳: تجزیه واریانس اثر تراکم و تاریخ کاشت بر صفات کیفی گیاه نیل (سال ۱۴۰۲)

Table 3: Analysis of variance of the effect of density and planting date on indigo plant quality traits (2023)

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
0.002	0.14	0.004	0.018	0.007	0.011	2	بلوک (Block)
0.09**	6.15**	0.14**	0.68**	0.20**	0.48**	3	تاریخ کاشت (T) Planting date
0.002	0.16	0.003	0.019	0.005	0.014	6	خطای کرت اصلی (Ea) Main plot error
0.07**	5.02**	0.10**	0.49**	0.14**	0.35**	3	تراکم (D) Density
0.02*	1.37*	0.03*	0.13*	0.04*	0.09*	9	T × D
0.001	0.10	0.002	0.012	0.003	0.009	24	خطای کرت فرعی (Eb) Subplot error

*Significant at the 5% level ($p < 0.05$) ** Significant at the 1% level ($p < 0.01$)*معنی دار در سطح ۵٪ ($p < 0.05$) ** معنی دار در سطح ۱٪ ($p < 0.01$)

جدول ۴: مقایسه میانگین اثر ساده تاریخ کاشت بر صفات کیفی در سال‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲

Table 4: Comparison of the mean simple effects of planting date on qualitative traits in the years 2022 and 2023

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content (g/m ²)	ایندیگو کارمین Indigo carmine (%)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg/g)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g)	تاریخ کاشت Planting Date	سال Year
0.21 ± 0.01a	0.44 ± 0.02a	4.57 ± 0.17a	0.77 ± 0.02a	2.48 ± 0.11a	0.70 ± 0.03a	1.78 ± 0.08a	۹ اردیبهشت/ March 30	2022-۱۴۰۱
0.22 ± 0.01b	0.42 ± 0.01b	4.24 ± 0.16b	0.73 ± 0.02b	2.37 ± 0.10b	0.66 ± 0.03b	1.71 ± 0.07b	۲۹ اردیبهشت/ April 19	
0.24 ± 0.01c	0.39 ± 0.01c	3.48 ± 0.13c	0.65 ± 0.02c	2.17 ± 0.09c	0.60 ± 0.02c	1.57 ± 0.06c	۱۸ خرداد به ۸ May	
0.26 ± 0.01d	0.35 ± 0.01d	3.16 ± 0.12d	0.60 ± 0.02d	1.97 ± 0.08d	0.54 ± 0.02d	1.43 ± 0.05d	۷ تیر/ June 28	
0.28 ± 0.01e	0.32 ± 0.01e	3.12 ± 0.12e	0.55 ± 0.01e	1.82 ± 0.06e	0.48 ± 0.02e	1.34 ± 0.04e	۲۷ تیر/ July 17	
0.30 ± 0.01f	0.29 ± 0.01f	2.88 ± 0.11f	0.51 ± 0.01f	1.71 ± 0.05f	0.43 ± 0.01f	1.28 ± 0.04f	۱۶ مرداد به ۷ August	
0.20 ± 0.01a	0.48 ± 0.02a	4.80 ± 0.18a	0.80 ± 0.02a	2.55 ± 0.11a	0.73 ± 0.03a	1.82 ± 0.08a	۹ اردیبهشت/ March 30	2023-۱۴۰۲
0.21 ± 0.01b	0.45 ± 0.01b	4.43 ± 0.17b	0.75 ± 0.02b	2.43 ± 0.10b	0.68 ± 0.03b	1.75 ± 0.07b	۲۹ اردیبهشت/ April 19	
0.23 ± 0.01c	0.41 ± 0.01c	3.66 ± 0.14c	0.68 ± 0.02c	2.22 ± 0.08c	0.62 ± 0.02c	1.60 ± 0.06c	۱۸ خرداد به ۸ May	
0.25 ± 0.01d	0.37 ± 0.01d	3.35 ± 0.13d	0.63 ± 0.02d	2.03 ± 0.07d	0.55 ± 0.02d	1.48 ± 0.05d	۷ تیر/ June 28	

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.

جدول ۵: مقایسه میانگین اثر ساده تراکم کاشت بر صفات کیفی در سال‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲

Table 5: Comparison of the mean simple effects of planting density on qualitative traits in the years 2022 and 2023

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content (g/m ²)	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 ²)	سال Year
0.23 ± 0.01a	0.40 ± 0.01a	3.12 ± 0.12a	0.68 ± 0.02a	2.29 ± 0.10a	0.63 ± 0.03a	1.66 ± 0.07a	30	1401 2022
0.25 ± 0.01b	0.38 ± 0.01b	4.83 ± 0.18b	0.65 ± 0.02b	2.21 ± 0.08b	0.60 ± 0.02b	1.61 ± 0.06b	40	
0.27 ± 0.01c	0.36 ± 0.01c	3.80 ± 0.15c	0.62 ± 0.01c	2.13 ± 0.07c	0.57 ± 0.02c	1.56 ± 0.05c	50	
0.29 ± 0.01d	0.34 ± 0.01d	2.89 ± 0.11d	0.59 ± 0.01d	2.03 ± 0.06d	0.53 ± 0.02d	1.50 ± 0.04d	60	
0.21 ± 0.01a	0.44 ± 0.01a	3.46 ± 0.13a	0.73 ± 0.02a	2.37 ± 0.10a	0.67 ± 0.03a	1.70 ± 0.07a	30	1402 2023
0.23 ± 0.01b	0.42 ± 0.01b	5.12 ± 0.19b	0.70 ± 0.02b	2.29 ± 0.08b	0.64 ± 0.02b	1.65 ± 0.06b	40	
0.25 ± 0.01c	0.39 ± 0.01c	4.10 ± 0.16c	0.67 ± 0.01c	2.21 ± 0.07c	0.61 ± 0.02c	1.60 ± 0.05c	50	
0.27 ± 0.01d	0.37 ± 0.01d	3.18 ± 0.12d	0.64 ± 0.01d	2.11 ± 0.06d	0.57 ± 0.02d	1.54 ± 0.04d	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.

جدول ۶: مقایسه میانگین اثر متقابل تراکم و تاریخ کاشت بر صفات کیفی (۱۴۰۱)

Table 6: Mean comparison of the interaction effect of planting density and planting date on qualitative traits (2022)

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content (g/m ²)	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 ²	تاریخ کاشت Planting Date
0.18 ± 0.01a	0.48 ± 0.02a	3.98 ± 0.15a	0.82 ± 0.02a	2.60 ± 0.15a	0.75 ± 0.05a	1.85 ± 0.10a	30	۹ اردیبهشت March 30
0.20 ± 0.01ab	0.45 ± 0.02ab	5.91 ± 0.22a	0.79 ± 0.02ab	2.52 ± 0.12ab	0.72 ± 0.04ab	1.80 ± 0.08ab	40	
0.22 ± 0.01bc	0.43 ± 0.01bc	4.73 ± 0.18ab	0.75 ± 0.02bc	2.45 ± 0.10bc	0.69 ± 0.03bc	1.76 ± 0.07bc	50	
0.24 ± 0.01c	0.40 ± 0.01c	3.67 ± 0.14b	0.70 ± 0.01c	2.35 ± 0.09c	0.65 ± 0.03c	1.70 ± 0.06c	60	
0.19 ± 0.01a	0.45 ± 0.02a	3.71 ± 0.14a	0.78 ± 0.02a	2.48 ± 0.13a	0.70 ± 0.04a	1.78 ± 0.09a	30	۲۹ اردیبهشت April 19
0.21 ± 0.01ab	0.43 ± 0.01ab	5.41 ± 0.20a	0.74 ± 0.02ab	2.42 ± 0.10ab	0.68 ± 0.03ab	1.74 ± 0.07ab	40	
0.23 ± 0.01bc	0.40 ± 0.01bc	4.42 ± 0.17ab	0.71 ± 0.01bc	2.33 ± 0.09bc	0.64 ± 0.03bc	1.69 ± 0.06bc	50	
0.25 ± 0.01c	0.38 ± 0.01c	3.42 ± 0.13b	0.68 ± 0.01c	2.23 ± 0.07c	0.60 ± 0.02c	1.63 ± 0.05c	60	
0.21 ± 0.01a	0.42 ± 0.01a	2.93 ± 0.11a	0.70 ± 0.02a	2.30 ± 0.12a	0.65 ± 0.04a	1.65 ± 0.08a	30	۱۸ خرداد May 8
0.23 ± 0.01ab	0.40 ± 0.01ab	4.70 ± 0.18a	0.67 ± 0.02ab	2.22 ± 0.10ab	0.62 ± 0.03ab	1.60 ± 0.07ab	40	
0.25 ± 0.01bc	0.37 ± 0.01bc	3.62 ± 0.14ab	0.64 ± 0.01bc	2.14 ± 0.09bc	0.59 ± 0.03bc	1.55 ± 0.06bc	50	
0.27 ± 0.01c	0.35 ± 0.01c	2.66 ± 0.10b	0.60 ± 0.01c	2.03 ± 0.07c	0.55 ± 0.02c	1.48 ± 0.05c	60	
0.23 ± 0.01a	0.38 ± 0.01a	2.64 ± 0.10a	0.65 ± 0.02a	2.08 ± 0.10a	0.58 ± 0.03a	1.50 ± 0.07a	30	۷ تیر June 28
0.25 ± 0.01ab	0.36 ± 0.01ab	4.32 ± 0.16a	0.62 ± 0.02ab	2.00 ± 0.08ab	0.55 ± 0.02ab	1.45 ± 0.06ab	40	
0.27 ± 0.01bc	0.34 ± 0.01bc	3.28 ± 0.13ab	0.59 ± 0.01bc	1.92 ± 0.07bc	0.52 ± 0.02bc	1.40 ± 0.05bc	50	
0.29 ± 0.01c	0.32 ± 0.01c	2.41 ± 0.09b	0.56 ± 0.01c	1.83 ± 0.06c	0.48 ± 0.02c	1.35 ± 0.04c	60	
0.25 ± 0.01a	0.35 ± 0.01a	2.42 ± 0.09a	0.60 ± 0.02a	1.94 ± 0.09a	0.52 ± 0.03a	1.42 ± 0.06a	30	۲۷ تیر July 17
0.27 ± 0.01ab	0.33 ± 0.01ab	3.99 ± 0.15a	0.57 ± 0.01ab	1.87 ± 0.07ab	0.49 ± 0.02ab	1.38 ± 0.05ab	40	
0.29 ± 0.01bc	0.31 ± 0.01bc	3.03 ± 0.12ab	0.54 ± 0.01bc	1.77 ± 0.06bc	0.45 ± 0.02bc	1.32 ± 0.04bc	50	
0.31 ± 0.01c	0.29 ± 0.01c	2.16 ± 0.08b	0.51 ± 0.01c	1.68 ± 0.04c	0.42 ± 0.01c	1.26 ± 0.03c	60	
0.28 ± 0.01a	0.32 ± 0.01a	2.12 ± 0.08a	0.55 ± 0.01a	1.83 ± 0.07a	0.48 ± 0.02a	1.35 ± 0.05a	30	۱۶ مرداد August 7
0.30 ± 0.01ab	0.30 ± 0.01ab	3.66 ± 0.14a	0.52 ± 0.01ab	1.75 ± 0.06ab	0.45 ± 0.02ab	1.30 ± 0.04ab	40	
0.32 ± 0.01bc	0.28 ± 0.01bc	2.72 ± 0.10ab	0.49 ± 0.01bc	1.66 ± 0.04bc	0.41 ± 0.01bc	1.25 ± 0.03bc	50	
0.34 ± 0.01c	0.26 ± 0.01c	2.01 ± 0.08b	0.46 ± 0.01c	1.58 ± 0.04c	0.38 ± 0.01c	1.20 ± 0.03c	60	

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

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

جدول ۷: مقایسه میانگین اثر متقابل تراکم و تاریخ کاشت بر صفات کیفی (۱۴۰۲)

Table 7: Mean comparison of the interaction effect of planting density and planting date on qualitative traits (2023)

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content (g/m ²)	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 ²	تاریخ کاشت Planting Date
0.17 ± 0.01a	0.52 ± 0.02a	4.25 ± 0.16a	0.85 ± 0.02a	2.68 ± 0.13a	0.78 ± 0.04a	1.90 ± 0.09a	30	۹ اردیبهشت March 30
0.19 ± 0.01ab	0.49 ± 0.02ab	6.15 ± 0.23a	0.82 ± 0.02ab	2.60 ± 0.11ab	0.75 ± 0.03ab	1.85 ± 0.08ab	40	
0.21 ± 0.01bc	0.46 ± 0.01bc	4.92 ± 0.19ab	0.78 ± 0.02bc	2.52 ± 0.10bc	0.72 ± 0.03bc	1.80 ± 0.07bc	50	
0.23 ± 0.01c	0.43 ± 0.01c	3.86 ± 0.15b	0.73 ± 0.01c	2.42 ± 0.09c	0.68 ± 0.03c	1.74 ± 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	۲۹ اردیبهشت April 19
0.20 ± 0.01ab	0.46 ± 0.01ab	5.62 ± 0.21a	0.77 ± 0.02ab	2.48 ± 0.10ab	0.70 ± 0.03ab	1.78 ± 0.07ab	40	
0.22 ± 0.01bc	0.43 ± 0.01bc	4.62 ± 0.18ab	0.74 ± 0.01bc	2.40 ± 0.09bc	0.67 ± 0.03bc	1.73 ± 0.06bc	50	
0.24 ± 0.01c	0.40 ± 0.01c	3.62 ± 0.14b	0.70 ± 0.01c	2.30 ± 0.07c	0.63 ± 0.02c	1.67 ± 0.05c	60	
0.20 ± 0.01a	0.45 ± 0.01a	3.06 ± 0.12a	0.73 ± 0.02a	2.35 ± 0.10a	0.67 ± 0.03a	1.68 ± 0.07a	30	۱۸ خرداد May 8
0.22 ± 0.01ab	0.42 ± 0.01ab	4.90 ± 0.19a	0.70 ± 0.02ab	2.27 ± 0.08ab	0.64 ± 0.02ab	1.63 ± 0.06ab	40	
0.24 ± 0.01bc	0.39 ± 0.01bc	3.82 ± 0.15ab	0.67 ± 0.01bc	2.19 ± 0.07bc	0.61 ± 0.02bc	1.58 ± 0.05bc	50	
0.26 ± 0.01c	0.36 ± 0.01c	2.86 ± 0.11b	0.63 ± 0.01c	2.08 ± 0.06c	0.57 ± 0.02c	1.51 ± 0.04c	60	
0.22 ± 0.01a	0.41 ± 0.01a	2.77 ± 0.11a	0.68 ± 0.02a	2.15 ± 0.08a	0.60 ± 0.02a	1.55 ± 0.06a	30	۷ تیر June 28
0.24 ± 0.01ab	0.38 ± 0.01ab	4.52 ± 0.17a	0.65 ± 0.02ab	2.07 ± 0.07ab	0.57 ± 0.02ab	1.50 ± 0.05ab	40	
0.26 ± 0.01bc	0.35 ± 0.01bc	3.48 ± 0.13ab	0.62 ± 0.01bc	1.99 ± 0.06bc	0.54 ± 0.02bc	1.45 ± 0.04bc	50	
0.28 ± 0.01c	0.33 ± 0.01c	2.61 ± 0.10b	0.59 ± 0.01c	1.90 ± 0.04c	0.50 ± 0.01c	1.40 ± 0.03c	60	

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

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

جدول ۸: همبستگی (ضریب پیرسون) بین صفات کیفی

Table 8: Correlation (Pearson coefficient) between qualitative attributes

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content	ایندیگو کارمین Indigo carmine	کلروفیل کل Total Chlorophyll	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a	صفات Attributes
						1	کلروفیل a Chlorophyll a
					1	0.98**	کلروفیل b Chlorophyll b
				1	0.99**	0.99**	کلروفیل کل Total Chlorophyll
			1	0.94**	0.93**	0.95**	ایندیگو کارمین Indigo carmine
		1	0.91**	0.86**	0.85**	0.87**	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content
	1	0.83**	0.92**	0.95**	0.94**	0.96**	کاروتنوئیدها Carotenoids
1	-0.78**	-0.68**	-0.75**	-0.81**	-0.80**	-0.82**	نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، واکنش گیاه دارویی-صنعتی نیل به زمان کاشت و تراکم بوته در شرایط اقلیمی شمال استان خوزستان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو عامل زراعی تأثیر معنی‌داری بر صفات فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین دارند. کاشت در اوایل فصل بهار (اردیبهشت) حداکثر مقدار کلروفیل و رنگدانه طبیعی را فراهم کرد، در حالی که تأخیر در کاشت به‌ویژه در تابستان، با کاهش معنی‌دار این صفات همراه بود. بهترین نتیجه از نظر محتوای فتوسنتزی و ثانویه در تراکم ۴۰ بوته در مترمربع به دست آمد. افزایش تراکم بیش از حد منجر به رقابت بین بوته‌ها و کاهش عملکرد کیفی شد. همبستگی مثبت بین کلروفیل و ایندیگو کارمین نشان داد که فعالیت فتوسنتزی و سنتز متابولیت‌های ثانویه در این گیاه مرتبط است. در مجموع، کاشت زود هنگام و تراکم بهینه ۴۰ بوته در متر مربع به‌عنوان مهم‌ترین راهبردهای زراعی در جهت افزایش کیفیت و مقدار محصول پیشنهاد می‌شوند.

منابع

- Abouseidi, N., Jokar, M., Ayin, A., & Tayyi Samirmi, J. (2021). Evaluation of some quantitative and qualitative traits of hyssop medicinal plant under the influence of nitrogen fertilizer and heat stress (Case study: Semi-warm climatic conditions of Jiroft). *Journal of Sustainable Agriculture and Production*, 31(2), 93–109. <https://doi.org/10.22034/saps.2021.13100>
- Ali, W. N., & Atrakchii, A. O. Al. (2022). Effect of Gibberellic, Salicylic Acids, and NPK Fertilizers on growth and chemical constituents of Rosemary plants (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 1842–1850. <https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.S03.281>.

- Alizadeh, P., Sodaizadeh, H., Mosleh Arani, A., & Hakimzadeh, M. A. (2023). The effect of cultivation system on the morphological, physiological and biochemical characteristics of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *Journal of Arid Biome*, 13 (1), 1–19. <https://doi.org/10.29252/ARIDBIOM.2023.20304.1938>
- Annie Felicia, A., & Muthulingam, M. (2012). Biochemical and pharmacological evaluation of *Indigofera tinctoria* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 17 (2), 215–220. <https://www.ijpsrr.com>
- Arnon, D. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23, 112–112.
- Chanayath, N., Lhieochaiphant, S., & Phutrakul, S. (2012). Pigment extraction techniques from the leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. And *Baphicacanthus cusia* Brem. And chemical structure analysis of their major components. *CMU Journal*, 1 (2), 149–161. http://www.cmu.ac.th/cmu_journal/
- Izadi, Z., Biabani, A., Sabouri, H., Bahreininejad, B., & Qolizadeh, A. L. (2022). Evaluation of changes in alkaloid content and some physiological traits of *Datura stramonium* L. under the influence of planting date and plant density levels. *Journal of Horticultural Science*, 36(3), 657–669. (In Persian with English abstract) <https://doi.org/10.22067/jhs.2021.72958.1095>
- Jain, S., Nayak, S., & Joshi, P. (2011). Phytochemical study and physical evaluation of *Indigofera tinctoria* leaves. *Pharmacie Global*, 1, 1–2.
- Khoramdel, S., Rezvani Moghaddam, P., Hooshmand, M., & Moalem Benhangi, F. (2016). Effect of manure levels and plant density on grain yield and its components, leaf yield and indigo content of *Indigofera tinctoria*. Paper presented at the 3rd National Congress on Applied Research in Agricultural Sciences: Healthy Food from Farm to Table. <https://civilica.com/doc/953979>
- Khorshidi, J., Fakhr Tabatabaei, M., Omidbaigi, R., & Sefidkon, F. (2009). Effect of densities of planting on yield and essential oil components of *Pimpinella affinis*. *Journal of Agricultural Science*, 1 (1), 152–157.
- 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.
- Maier, W., Schumann, B., & Gröger, D. (1991). Biosynthesis of indoxyl derivatives in *Isatis tinctoria* and *Polygonum tinctorium*. *Phytochemistry*, 29 (1), 117–119. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85031-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85031-5)
- Modafeh Beyzadi, N., Rezvani Moghaddam, P., & Jahan, M. (2018). Effect of sowing date and plant density on morphological traits and yield of medicinal plant *Indigofera tinctoria* L. *Agroecology Journal*, 10 (4), 1067–1079. <https://doi.org/10.22069/agroecology.2018.14203.1481>
- Omid Bighi, A. (2021). *Comprehensive guide to the production and processing of medicinal plants* (Vol. 1). Behnashr Publications (Astān-e Quds Razavi).
- Panahandeh, J., Ammari Pardaz, J., & Abdollahi, Sh. (2022). Effect of plant density on dry matter accumulation, chlorophyll index, and root inulin content in two varieties of Witloof chicory. *Journal of Sustainable Agriculture and Production*, 32(3), 149–158. <https://doi.org/10.22034/saps.2022.48776.2764>
- Pramod, K. T., Vishnu, K. R., Ashish, S., Sambath, K., Yogendra, S., Manoj, S., & Manoj, G. (2010). Preliminary phytochemical screening and evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. *Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3 (1), 47–50.
- Saberi, R., Feyzbakhsh, M. T., Mokhtarpour, H., Mosavat, S. A., & Askar, M. (2010). Effect of plant density and planting pattern on grain yield and yield components in grain maize cv. KSC704. *Seed and Plant Production Journal*, 26 (2), 123–136.
- Sales, E., Kanhonou, R., Baixauli, C., Giner, A., Cooke, D., Gilbert, K., Arrilaga, I., Segura, J., & Ros, R. (2016). Sowing date, transplanting, plant density and nitrogen fertilization affect indigo production from *Isatis* species in a Mediterranean region of Spain. *Industrial Crops and Products*, 23, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.036>
- 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>
- Sani Khani, M., Akbari, A., & Khairi, A. (2021). The effect of phenylalanine and tryptophan on morphological and physiological traits of Abu Jahl watermelon (*Citrullus colocynthis* L.). *Journal of Plant Process and Function*, 35 (9), 317–327.
- Saremi, S., Gholipour, M., Abbasdokht, H., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., & Asghari, H. R. (2021). Phytochemical response of *Physalis alkekengi* L. to foliar application of amino acids. *Ecophytochemical Journal of Medicinal Plants* (2), 39–52. <https://doi.org/10.30495/ejmp.2021.694469>
- Siahmansour, S., Ehtesham-Nia, A., & Rezaeinejad, A. (2020). Effect of salicylic acid foliar application on Morphophysiological and biochemical traits of Goldenberry (*Physalis peruviana* L.) under salinity stress condition. *Journal of Plant Production Research*, 27 (1), 165–178. <https://doi.org/10.22069/jopp.2020.16087.2448>

Strobel, J., & Gröger, D. (1989). Über das Vorkommen von Indigovorstufen in *Isatis* -species. *Biochem Physiology Pflanzen*, 114, 321–327.

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 (Case study: Minab County). *Journal of Research in Plant Metabolites*, 3(1), 5–19.

<https://doi.org/10.22034/jrpsm.2025.517031.1064>

Zargaran Khouzan, M. R., & Daei Naseri, S. M. A. (2025). Nile: A deep dive into the history of natural and synthetic indigo. Arshak Publishing. (Based on the book *Indigo in Culture, Science, and Technology* by Professor Matthias Seidel). Arshak Publishing. Arak: Iran.

Zargaran Khouzani, M. R., Zargaran, S., & Daei Naseri, S. M. A. (2022). A review on biochemical and pharmacological properties of medicinal indigo plant (*Indigofera tinctoria* L.). Paper presented at the 1st National Congress on Medicinal Plants, Traditional Medicine and Community Health, Damghan, Iran.

<https://civilica.com/doc/1582008>.