



Investigation of Below-Ground Interspecific Interaction in the Intercropping Culture of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and Niger (*Guizotia abyssinica* Cass.)

Meisam Namdari¹, Rahmat Abbasi^{2*}, Hemmatolaah Pirdashti³ and Faezeh Zaefarian²

Received: 06-06-2021
Revised: 11-09-2021
Accepted: 22-09-2021
Available Online: 22-09-2021

How to cite this article:

Namdari, M., Abbasi, R., Pirdashti, H., & Zaefarian, F. (2022). Investigation of below-ground interspecific interaction in the intercropping culture of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.). *Journal of Agroecology*, 15(3), 447-465.
DOI: [10.22067/agry.2021.70707.1048](https://doi.org/10.22067/agry.2021.70707.1048)

Introduction

Most research on intercropping cultivation in the past has focused on seed yield and yield components, and less attention has been paid to below-ground interaction processes. However, the connection of plants in the below-ground sector is a vital issue in identifying the mechanism of competition and productivity in intercropping cultivation. Meanwhile, the selection of a legume plant due to the biological nitrogen fixation (BNF) increases the productivity in intercropping cultivation. However, the component crop in intercropping cultivation can affect the BNF by the legume component component. Therefore, creating the optimum conditions for the BNF in planting ratios plays an essential role in the dynamics of inter-species interaction. Therefore, this study aimed to evaluate the interactions of the below-ground sector and the percentage of nitrogen derived from the atmosphere in different ratios of intercropping cultivation.

Material and Methods

A field experiment was conducted for two years (2018-19) at the research farm of Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Iran (33°, 36' N, 53°, 03' E with 43 m altitude). The experimental design was a randomized complete block with four replications. The experimental treatment was 75% soybean + 25% niger, 50% soybean + 50% niger, and 25% Soybean+75% niger based on the replacement method and monoculture. For example, a 25:75 combination consisted of three rows of planting a soybean and one row of niger, and vice versa in the 75:25 combinations. The 50:50 also included planting two rows of each of the studied plants. This study investigated the percentage of nitrogen derived from the atmosphere, nitrogen yield, total enzymatic activity of the soil, and root activity in different planting ratios.

1-Ph.D. Student of Agronomy, Department of Agronomy, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

2- Assistant Professor, Professor and Associate Professor, Agronomy, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran, respectively.

3-Department of Genetic & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran

(*- Corresponding author's Email: r.abasi@sanru.ac.ir)

Results and Discussion

The percentage of nitrogen derived from the atmosphere (Ndfa) in all different planting ratios was higher than in a single soybean crop. This trend continued until it reached 90 days after planting. At 75 and 90 days after planting, the highest Ndfa is related to 50:50 and 75:25 planting ratios in both cultivation years. Also, the yield of Ndfa was higher than expected in planting ratios, and its value increased further as it approached the final stages of growth. In addition to the above, soil's total microbial activity in different intercropping cultivation ratios was higher than the monoculture of the studied plants. Its amount in a 50:50 planting ratio was 16.38 and 31.69% higher than monoculture soybean (0: 100) and niger (0: 100) at 60 days after planting, respectively. The most increased total microbial activity of the ground in niger and soybean plants in the middle and late stages of growth was observed at a depth of 0-20 and 10-30 cm, respectively. Also, niger plant in different ratios of intercropping cultivation, while increasing root activity, have a higher number of secondary compounds in root extract. In general, the increase in root activity in the late stages of growth was accompanied by a decrease in the number of rows of niger plants, especially in the planting ratio of 75:25. Also, the total phenol and flavonoids in the niger root extract increased to 105 days after planting and then decreased. Thus, in general, different ratios of intercropping cultivation were more successful in producing secondary compounds than the monoculture of niger.

Conclusion

Increasing the significance of nitrogen derived from the atmosphere and the other activity of niger root as a complementary plant in intercropping cultivation ratios can play an essential role in the dynamics of underground sector interactions in intercropping cultivation patterns. In addition to the above results and based on the total microbial activity of the soil, the complementary structure of niger and soybean root in intercropping cultivation can affect the ability of interspecific competition in intercropping cultivation by distinguishing ecological niches even in a short period.

Keywords: Nitrogen derived from the atmosphere, Root extract, Secondary compounds, Total microbial activity



مقاله پژوهشی

جلد ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲، ص ۴۶۴-۴۴۷

بررسی تعاملات بین گونه‌ای بخش زیرزمینی در کشت مخلوط گیاه سویا
(*Guizotia abyssinica* Cass.) و دان‌سیاه (*Glycine max* (L.) Merrill)

میثم نامداری^۱، رحمت عباسی^{۲*}، همت‌الله پیردشتی^۳ و فائزه زعفریان^۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۳۱

چکیده

ارتباط بین گونه‌ای گیاهان در بخش زیرزمینی یک موضوع کلیدی جهت شناسایی ساز و کار رقابت و بهره‌وری در کشت مخلوط است. بنابراین، به منظور ارزیابی تعاملات بخش زیرزمینی در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط گیاه دان‌سیاه (*Guizotia abyssinica* Cass.) و سویا (*Glycine max* (L.) Merrill) آزمایشی در دو سال زراعی (۹۷-۱۳۹۶ و ۹۸-۱۳۹۷) و به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل نسبت‌های کاشت ۱:۱۰۰، ۲:۷۵، ۵:۵۰، ۷۵:۲۵ و ۱۰۰:۰ (به ترتیب دان‌سیاه-سویا) به روش جایگزینی بودند. بر اساس نتایج به دست آمده، نسبت‌های مختلف کاشت اثر معنی‌داری بر درصد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی، میزان فعالیت کل میکروبی خاک، فعالیت ریشه و مقدار فنول و فلاونوئید موجود در عصاره ریشه گیاه دان‌سیاه داشتند. تمامی نسبت‌های مختلف کشت مخلوط در مقایسه با تیمار کشت خالص دارای قابلیت تثبیت بیولوژیکی نیتروژن بیشتری بودند. بیشترین افزایش درصد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی در هر دو سال زراعی مربوط به مرحله ۹۰ روز پس از کاشت بود. در این مرحله نسبت کاشت ۵۰:۵۰ به ترتیب در سال‌های مورد مطالعه با میانگین ۸۵/۴۶ و ۹۱/۵۸ درصد بیشترین درصد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی را در اختیار داشت. علاوه بر مطالب مذکور مجموع فعالیت کل میکروبی خاک در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط بیشتر از کشت خالص گیاهان مورد مطالعه بود و در مرحله ۶۰ روز پس از کاشت نسبت کاشت ۵۰:۵۰ با میانگین $34/56 \mu\text{g.Fluoresceine.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ دارای بیشترین میزان فعالیت میکروبی خاک بود. همچنین گیاه دان‌سیاه در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط ضمن افزایش فعالیت ریشه از میزان فنل و فلاونوئید بیشتری نیز در عصاره ریشه برخوردار بود. نسبت‌های مختلف کشت مخلوط نیز از نظر تولید ترکیبات ثانویه موفق‌تر از کشت خالص گیاه دان‌سیاه عمل کردند. در نهایت، افزایش معنی‌داری درصد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی و علاوه بر آن فعالیت بیشتر ریشه گیاه دان‌سیاه به عنوان گیاه مکمل در نسبت‌های کشت مخلوط می‌تواند نقش مهمی در پویایی تعاملات بین گونه‌ای در بخش زیرزمینی در الگوی کشت مخلوط داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات ثانویه، عصاره ریشه، فعالیت کل میکروبی خاک، نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی

مقدمه

علاقه به کشت مخلوط در کشاورزی پایدار در حال افزایش و

۳- استاد، پژوهشگر ژنتیک و زیست فناوری طبستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

(Email: r.abasi@sanru.ac.ir)

(*) نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/agry.2021.70707.1048

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

۲- به ترتیب استادیار و دانشیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

بستگی داشته و افزایش کاربرد میزان کود نیتروژنه می‌تواند منجر به اثرات بازدارندگی در ترشح فلاونوئیدها از ریشه‌های گیاه شود (Cesco et al., 2010). همچنین نتایج مطالعات نشان داد، در کشت مخلوط تعاملات گیاهان در بخش زیرزمینی می‌تواند باعث افزایش فعالیت ریشه گیاهان شود (Zhang et al., 2013). علاوه بر آن افزایش فعالیت کل میکروبی خاک در عمق‌های مختلف خاک (۴۰-۰ سانتی‌متر) در کشت مخلوط سیب زمینی با لوبیا لیم (Phaseolus lumatus) و لوبیا پیچک (Lablab purpureus) در مقایسه با کشت خالص توسط برخی دیگر از محققان مشاهده شده است (Nyawade et al., 2019).

به‌طور کلی، اتکای بیشتر سیستم کاشت به تثبیت بیولوژیکی گیاه لگوم می‌تواند ضمن بهبود عملکرد و اجزای عملکرد باعث افزایش درصد نیتروژن موجود در بخش زیرزمینی شود. بر این اساس، نتایج مطالعه نسبت‌های کشت مخلوط نخودفرنگی (*Pisum sativum* L.) - جو (*Hordeum vulgare* L.) در اراضی ارگانیک اروپای مرکزی نشان داد در هر سه فصل کاشت، نیتروژن بخش بالایی گیاه نخودفرنگی حاصل از تثبیت بیولوژیکی در کشت مخلوط بیشتر از کشت خالص بود و کشت مخلوط به‌طور میانگین ۴۰-۳۰ درصد کارایی بیشتری در استفاده از نیتروژن در مقایسه با کشت خالص هر یک از گیاهان مذکور داشت. آن‌ها دلیل این امر را تسهیل در تعاملات ریشه گیاهان مذکور در کشت مخلوط دانستند (Hauggaard et al., 2009). برخی دیگر از پژوهشگران نیز افزایش تعداد و وزن خشک گره‌تثبیت‌کننده نیتروژن باقلا را در کشت مخلوط با گندم (*Triticum aestivum* L.)، ناشی از افزایش میزان فلاونوئیدها دانستند و دلیل این امر را به تسهیل رقابت بین گونه‌ای و آزادسازی ترشحات غنی‌تر نسبت دادند که منابع کربن بیشتری را برای رشد و تکثیر باکتری ریزوبیوم در ریزوسفر فراهم می‌نماید (Liu et al., 2017). در همین راستا، افزایش ترشحات فلاونوئیدها در کشت مخلوط باقلا- گندم و نقش تأثیرگذار الگوی کشت مخلوط، کاربرد نیتروژن و برهم‌کنش گیاهان به‌ویژه در مرحله گل‌دهی بر مقدار آن نیز توسط برخی دیگر از محققان گزارش شده است (Yingchao et al., 2019). نتایج به‌دست آمده از یک مطالعه بلندمدت در خصوص کشت مخلوط باقلا با گندم نیز، افزایش ۱۱ درصدی میزان نیتروژن آلی، تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، میانگین زیست‌توده ریشه و مقدار کربن آلی خاک را در کشت مخلوط نشان داد (Cong et al., 2014).

تعداد تحقیقات علمی در این خصوص به‌شدت افزایش یافته است (Stomph et al., 2020). بیشتر تحقیقات در زمینه کشت مخلوط در گذشته مربوط به عملکرد و اجزای عملکرد گیاه بوده و فرآیندهای درون‌گیاهی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. این در حالی است که مزیت و برتری کشت مخلوط به درک فیزیولوژی گونه‌ها در طی رشد، سازگاری، ساختار ریشه، کانوبی و در مجموع، اثرات متقابل در دو بخش بالایی و زیرزمینی بستگی دارد (Machado, 2009). از آنجا که اثرات متقابل و کارایی بخش زیرزمینی در ارتباط با موجودات زنده متأثر از سیستم‌های کشت و شرایط محیطی رشد می‌باشد، لذا کاربرد گیاه لگوم در کشت مخلوط می‌تواند ضمن افزایش کارایی تثبیت نیتروژن، رویکردی پایدار برای برطرف کردن نیازهای نیتروژن گیاه زراعی به‌خصوص در سیستم‌های کشت کم‌نهاد و محیط‌های محدودکننده باشد (Corre-Hellou et al., 2007; Islam & Adjesiwor, 2018). علاوه بر مطالب مذکور در کشت مخلوط اثر آشیان‌های جداگانه اکولوژیکی به افزایش بهره‌وری به‌خصوص در گونه‌های غیر تثبیت‌کننده نیز کمک می‌کند. در این راستا، نتایج مطالعه پژوهشگران نشان داد، ایجاد شرایط مناسب برای تثبیت بیولوژیکی نیتروژن گیاه لگوم، نکته کلیدی در پویایی تعامل بین گونه‌ای است. به نحوی که تحت شرایط کمبود نیتروژن، کشت مخلوط باقلا (*Vicia faba* L.) با کلزا (*Brassica napus* L.) اثر مثبتی بر ماده خشک و تجمع میزان نیتروژن کلزا در مقایسه با کشت خالص داشت. بنابراین، برای درک کامل چگونگی برهم‌کنش بین گیاهان، شناخت و عکس‌العمل به گیاهان مجاور بسیار مهم است (Jamont et al., 2013). بیشتر گزارش‌ها در خصوص شناسایی و پاسخ به گیاهان مجاور بر ساز و کار اجتناب متمرکز شده است. هر چند یافته‌های اخیر محققان یک نقش جدید اکولوژیکی برای رفتار غیرمنطقی گیاهان را در بخش زیرزمینی آشکار می‌سازد (Callaway, 2002). در طول دوره رشد، ریشه گیاهان ترکیبات آلی را در محیط اطراف خود آزاد می‌کنند. این فرآیند که رسوبات یا ترشحات ریشه نامیده می‌شود، به لحاظ اکولوژیکی اهمیت زیادی در برقراری ارتباط با ریزجانداران، تحرک و انتقال عناصر غذایی در گیاهان مجاور دارد (Islam & Adjesiwor, 2018). بخشی از این ارتباط می‌تواند از طریق ترکیبات آلی مانند فلاونوئیدها انجام شود که نقش مؤثری در دسترسی به عناصر غذایی از طریق تغییرات در خصوصیات شیمیایی خاک دارند. ترشح فلاونوئیدها به‌میزان ذخیره نیتروژن بیرونی نیز

همراه کشت خالص گیاه سویا ۱۰۰۰:۰ (۴:۰) و دان سیاه ۱۰۰:۰ (۰:۴) به‌روش جایگزینی قرار گرفتند. چهار ردیف از هر کرت به‌عنوان مینا در تعیین نسبت‌های مختلف در نظر گرفته شد و اعداد داخل پرانتز به ترتیب نشان‌دهنده تعداد ردیف کاشت گیاه دان سیاه-سویا است. پس از تهیه بذور گیاهان سویا و دان سیاه به‌ترتیب از مرکز تحقیقات شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی شهرستان ساری و شرکت پاکان بذور اصفهان، عملیات کاشت در هر دو سال زراعی در تاریخ ۱۵ اردیبهشت به‌صورت هیرم‌کاری و به‌طریقه دستی انجام شد. بذور سویا پیش از کاشت با باکتری *رایزوبیوم ژاپونیکوم* (با تراکم سلولی 2×10^7) تلقیح گردید. تعداد خطوط کاشت در هر کرت ۱۲، فاصله بین خطوط ۳۵ سانتی‌متر، طول خطوط چهار متر و تراکم نهایی برای هر دو گیاه به‌طور ثابت ۲۸ بوته در مترمربع بود (Kasle et al., 2020; Carciochi et al., 2019). ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک آزمایش از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متری پیش از کاشت تعیین و بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل آزمون خاک (جدول ۱) در سال زراعی ۹۸-۱۳۹۷ به‌میزان ۹۰ کیلوگرم فسفر و ۶۶ کیلوگرم پتاس و در سال زراعی ۹۹-۱۳۹۸ به‌میزان ۳۳ کیلوگرم فسفر از منبع سوپرفسفات تریپل و سولفات پتاسیم تأمین شد. قابل ذکر است آزمایش در سال زراعی دوم نیز در زمین کشت شده در سال اول انجام شد. آبیاری گیاهان به‌صورت قطره‌ای به‌کمک دستگاه تانسیموتر در پتانسیل ماتریک ۰/۴ - بار و عملیات وجین به‌صورت دستی در چهار مرحله و با فاصله زمانی ۱۴ روز انجام شد. عملیات برداشت در تاریخ پنجم آبان ماه و پس از حذف ردیف‌های طرفین و ۰/۵ متر از دو طرف هر کرت به‌عنوان اثرات حاشیه، با دست و به‌وسیله قیچی باغبانی از چهار ردیف میانی و سطحی معادل ۴/۲ مترمربع انجام شد.

در نهایت، ارتباط بین گونه‌ای گیاهان در بخش زیرزمینی اکنون به‌عنوان یک موضوع کلیدی مورد توجه قرار گرفته و این امر به تحقیقات جهت افزایش درک و فهم در مدیریت سیستم‌های کشت مخلوط نیازمند است. در این بین، گیاه دارویی-روغنی دان سیاه خانواده گل‌ستاره با قدرت سازگاری بالا و نیاز اقلیمی پایین (Ranganatha et al., 2016) می‌تواند به‌عنوان یک گیاه مکمل نقش مهمی در برقراری ارتباط و رقابت در کشت مخلوط با گیاه سویا (*Glycine max* (L.) Merrill) داشته باشد که در بین گیاهان لگوم دانه‌ای بیشترین میزان فعالیت تثبیت بیولوژیکی نیتروژن را در اختیار دارد (Hangria & Mendes, 2015). از آنجا که کاربرد گیاهان با خصوصیات و پتانسیل رقابتی مختلف می‌تواند نقش مهمی در شناسایی ارتباط بین‌گونه‌ای در کشت مخلوط داشته باشد، لذا این پژوهش به‌منظور بررسی تعاملات در بخش زیرزمینی و نقش آن بر تثبیت بیولوژیکی گیاه سویا و همچنین میزان فعالیت ریشه، ترشحات برخی ترکیبات ثانویه و میزان کل فعالیت میکروبی خاک در گیاه همراه انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در طی دو سال زراعی (۹۷-۱۳۹۶ و ۹۸-۱۳۹۷) در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری با عرض جغرافیایی ۳۳'، ۳۶° شمالی و طول جغرافیایی ۰۳'، ۵۳° شرقی و ارتفاع ۴۳ متر از سطح دریا به‌صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری اجرا شد. گیاه دان سیاه و سویا رقم ساری (J.K.695) در نسبت‌های کاشت ۲۵:۷۵ (۱:۳)، ۵۰:۵۰ (۲:۲) و ۷۵:۲۵ (۳:۱) به

جدول ۱- نتایج تجزیه خاک محل آزمایش

Table 1- Result of soil analysis of experimental field

سال Year	عمق نمونه‌برداری Depth (cm)	شن Sand (%)	سیلت Silt (%)	رس Clay (%)	بافت Texture	ماده آلی Organic matter (%)	نیتروژن N (%)	فسفر P ₂ O ₅ mg.kg ⁻¹	پتاسیم K ₂ O mg.kg ⁻¹	هدایت الکتریکی EC×10 ⁻³ (dS.m ⁻¹)	اسیدیته pH
2018	0-30	28	39	33	لوم رسی	1.21	0.06	1.3	95	0.51	8.04
2019	0-30	26	40	34	Clay-loam	1.83	0.09	4	163	0.61	7.74

پس از کاشت با فاصله زمانی هر ۱۵ روز یک بار و در مراحل ۴۵ (V₁₂ انتهای رشد رویشی)، ۶۰ (R₁ آغاز گل‌دهی)، ۷۵ (R₂ پایان گل‌دهی)، ۹۰ (R₃ آغاز غلاف‌دهی)، ۱۰۵ (R₄ پایان غلاف‌دهی) و

جهت محاسبه درصد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی گیاه سویا از تکنیک استخراج اورئید از آوند چوب (Unkovich et al., 2008) استفاده شد. این عملیات در طی شش مرحله از زمان ۴۵ روز

غلظت محلول رقیق شده، Ru-N: فراوانی نسبی اورئید و Ndfa: درصد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی می‌باشند.

برای تعیین میزان کل فعالیت میکروبی خاک نیز طی دو مرحله (۶۰ روز پس از کاشت و رسیدگی) نمونه خاک به کمک لوله حفاری دستی^۲ از عمق ۰-۱۰، ۱۰-۲۰ و ۲۰-۳۰ سانتی‌متری جمع‌آوری شد. بدین ترتیب که از چهار ردیف میانی در کرت‌های آزمایش شش نمونه‌برداری با فاصله ۲۰ سانتی‌متر انجام و نمونه‌ها از الک نمره ۱۸ (یک میلی‌متری) عبور داده شد. پس از آن، میزان فعالیت کل میکروبی با استفاده از فلورسئین استات^۳ (FDA) اندازه‌گیری شد (Adam & Duncan, 2001). به‌طور خلاصه، دو گرم از نمونه خاک تهیه شده با ۱۵ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۶۰ میلی‌مولار مخلوط و مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر محلول (1000 μg.ml⁻¹) FDA برای شروع واکنش به آن اضافه شد. همچنین محلول بلانک بدون اضافه کردن FDA تهیه شد. سپس به هر یک از نمونه‌ها پس از قرار گرفتن روی شیکر با دور ۱۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه، ۱۵ میلی‌لیتر محلول حجمی (۲:۱) متانول/کلروفرم اضافه گردید و به مدت سه دقیقه درون سانتریفیوژ^۴ با دور ۲۰۰۰ قرار گرفت. پس از عبور نمونه‌ها از کاغذ صافی نمره دو، تراکم بصری به کمک دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس میزان فعالیت میکروبی خاک بر اساس میکروگرم فلورسئین در هر گرم خاک در ساعت به کمک ترسیم منحنی کالیبراسیون (y=0.0109x+0.0426, R²=0.94) مشخص گردید.

جهت تعیین میزان فلاونوئید و فنول در عصاره ریشه گیاه همراه، ابتدا پس از انجام عملیات آبیاری تعداد دو گیاه از هر تیمار انتخاب و با توجه به نوع ریشه گیاه دان‌سیاه، به کمک بیلچه و فشار کنترل شده آب، ریشه‌ها از خاک مرطوب جدا و سپس برای پاک کردن خاک چسبیده به آن به دقت شسته شدند. در نهایت، عملیات شستشوی نهایی نیز با آب مقطر انجام شد. عملیات مذکور ۴۵ روز پس از کاشت و در شش مرحله با فاصله زمانی ۱۵ روز انجام گردید. پس از آن، ریشه‌ها در آون الکتریکی تهویه‌دار با درجه حرارت ۷۰°C به مدت دو روز خشک و سپس ۰/۵ گرم از پودر با پنج میلی‌لیتر حلال در لوله سانتریفیوژ ریخته شد. مخلوط ابتدا به مدت سه ساعت روی شیکر با دور ۳۰۰ قرار گرفته و سپس به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی نگهداری شد. پس از آن، عصاره‌ها به سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور به مدت

۱۲۰ (R_s: آغاز دانه‌بندی) روز پس از کاشت (Fehr et al., 1971) انجام شد. به‌طور خلاصه جهت انجام عملیات مذکور، ابتدا با استفاده از قیچی باغبانی ساقه‌های با قطر بیشتر از سه میلی‌متر، نزدیک به سطح زمین قطع و بلافاصله ساقه جدا شده به درون لوله‌های لاستیکی سیلیکون یا لاتکس با قطر داخلی کوچک‌تر از ساقه وارد و با استفاده از یک اتصال‌دهنده با اندازه مناسب روی یک سوزن سرنگ دو طرفه قرار گرفت. سپس سوزن از طریق پیستون لاستیکی به لوله آزمایش پنج میلی‌لیتری که از طریق یک اتصال سوزن سرنگ و یک خط پلاستیکی لوله انعطاف‌پذیر به یک پمپ خلأ متصل است، وارد و سپس خلأ (۶۰-۷۰ کیلو پاسکال) اعمال و نمونه‌های شیره آوند چوب استخراج شد. به‌طور خلاصه، سنجش میزان اورئید با دستگاه اسپکتوفتومتر^۱ و به کمک ترسیم منحنی استاندارد آلانتوئین (y=7.3215x+0.0725, R²=0.99) در طول موج ۵۲۵ نانومتر (Yong & Conway, 1942)، آمینو-نیتروژن با معرف نین‌هیدرین و با ترسیم منحنی استاندارد آسپارازین/گلوآمین (y=1.2222x+0.0010, R²=0.99) در طول موج ۵۷۰ نانومتر (Herridge, 1984) و در نهایت، نیترات نیز به کمک ترسیم منحنی استاندارد نیترات پتاسیم (y=0.0576x+0.0368, R²=0.99) در طول موج ۴۱۰ نانومتر (Cataldo et al., 1975) تعیین گردید. در نهایت، مقدار اورئید، آمینو و نیترات از معادله ۱، فراوانی اورئید (Ru-N) از معادله ۲ و نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی با کالیبراسیون میزان فراوانی نسبی اورئید در مراحل رشد مذکور با مقادیر ایزوتوپ ¹⁵N از طریق معادله ۳ تعیین شد (Unkovich et al., 2008).

$$\text{Sac} = \text{St.c.} \times (\text{O.D.s} / \text{O.D.s}) \times D_i \quad (1) \text{ معادله}$$

$$(2) \text{ معادله}$$

$$\text{Ru-N (\%)} = [4 \times \text{ureide} / (4 \times \text{ureide} + \text{nitrate} + \text{amino-N})] \times 100$$

$$(3) \text{ معادله}$$

$$\text{Ru-N(\%)} = 0.64 \text{ Ndfa} + 7.7 \quad (\text{گل‌دهی})$$

$$\text{Ru-N(\%)} = 0.64 \text{ Ndfa} + 15.9 \quad (\text{پس از گل‌دهی})$$

در معادله‌های فوق، Sa.c: غلظت نمونه، St.c: غلظت استاندارد،

O.D.Sa: تراکم بصری نمونه، O.D.St: تراکم بصری استاندارد، D_i:

2- Auger

3- Fluorescein diacetate (FDA)

4- Universal, 4000 rpm

1- Hanon, i3 UV-VIS

واریانس‌ها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها از نرم افزار سیستم آنالیز آماری (SAS ۹/۱) استفاده شد. مقایسات میانگین داده‌ها با آزمون کم‌ترین تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح پنج درصد و رسم نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel و Sigma Plot انجام شد.

نتایج و بحث

نسبت‌های مختلف کاشت اثر معنی‌داری بر درصد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی سویا در طی دوره رشد داشتند (شکل ۱). بیشترین افزایش درصد نیتروژن در هر دو سال زراعی مربوط به مرحله ۹۰ روز پس از کاشت بود. تمامی نسبت‌های مختلف کشت مخلوط در مقایسه با تیمار کشت خالص دارای قابلیت تثبیت بیولوژیکی نیتروژن بیشتری بودند. این روند تا مرحله آغاز غلاف‌دهی (۹۰ روز پس از کاشت) ادامه داشت. در هر دو سال زراعی در مراحل ۶۰، ۷۵ و ۹۰ روز پس از کاشت بیشترین میزان درصد تثبیت بیولوژیکی مربوط به نسبت‌های کاشت ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵ (دان‌سیاه-سویا) بود. در مرحله ۹۰ روز پس از کاشت این مقدار در نسبت‌های کاشت مذکور در سال‌های ۹۷ و ۹۸ به ترتیب ۸۵/۴۶، ۸۲/۹۴ و ۹۱/۵۸، ۸۱/۵۱ درصد بود (شکل ۱). پس از عبور از این مرحله به دلیل افزایش سن گره‌های تثبیت‌کننده میزان درصد تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در نسبت‌های مختلف کاشت، کاهش یافت، به نحوی که مقدار آن در سال ۱۳۹۷ در مرحله ۱۲۰ روز پس از کاشت، تغییر معنی‌داری با تیمار کشت خالص سویا نداشت. به‌طور کلی، حداکثر فعالیت تثبیت بیولوژیکی در گیاه سویا مربوط به مرحله آغاز غلاف‌دهی است و این قابلیت پس از مرحله آغاز دانه‌بندی کاهش می‌یابد (Salvagiotti et al., 2008). نکته قابل تأمل میزان درصد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی سویا در نسبت کاشت ۲۵:۷۵ (دان‌سیاه-سویا) پس از مرحله ۹۰ روز پس از کاشت بود. به نظر می‌رسد، نسبت کاشت مذکور به دلیل در اختیار داشتن کمترین تعداد ردیف سویا در بین نسبت‌های مختلف کاشت، توانایی بیشتری در حفظ قابلیت تثبیت بیولوژیکی در مراحل ۱۰۵ و ۱۲۰ روز پس از کاشت داشت.

کاهش قابلیت تثبیت بیولوژیکی گیاه لگوم در کشت مخلوط پس از گل‌دهی توسط برخی از محققان گزارش شده است (Jamont et al., 2013). نتایج مطالعات در این زمینه افزایش میزان تثبیت بیولوژیکی گیاهان لگوم در کشت مخلوط را به افزایش تعداد و وزن گره‌های تثبیت‌کننده نیتروژن نسبت دادند (Cardoso et al., 2007; Weisany et al., 2016; Maikhuri et al., 2016). در این بین، کاهش قابلیت تثبیت بیولوژیکی گیاه لگوم در کشت مخلوط پس از گل‌دهی توسط برخی از پژوهشگران گزارش شده است (Jamont et al., 2013). برخی از محققان، افزایش میزان تثبیت بیولوژیکی

۱۰ دقیقه منتقل و مایع رویی (سوپرناتانت) برداشت و وارد لوله‌های جدید شده و باقی‌مانده‌ها با پنج میلی‌لیتر حلال برای بار دوم استخراج شدند (Xu & Chang, 2007). میزان فلاونوئید در عصاره ریشه در هر یک از تیمارها با معرف آلومینیوم کلراید در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری و به کمک ترسیم منحنی کالیبراسیون کرسین ($y=0.0034x+0.0378$, $R^2=0.99$) بر اساس میکروگرم کرسین در هر میلی‌لیتر عصاره تعیین شد (Heimler et al., 2005). میزان کل فنول در عصاره ریشه نیز در هر یک از تیمارها به کمک معرف فولین سیوکالتیو در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت و با ترسیم منحنی استاندارد اسید گالیک ($y=0.0011x+0.0329$, $R^2=0.99$) معادل میکرو گرم اسید گالیک در هر میلی‌لیتر عصاره ثبت شد (Waterhouse, 2002).

همچنین پس از جداسازی و شستشوی نهایی ریشه گیاه همراه، جهت تعیین میزان فعالیت ریشه از روش احیای تری‌فنیل‌ترازولیوم کلراید (TTC) استفاده شد (Zhang et al., 2013). بدین منظور، ۰/۵ گرم از ریشه پس از جداسازی در پنج میلی‌لیتر محلول بافر فسفات و پنج میلی‌لیتر محلول TTC چهار درصد به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس جهت توقف واکنش دو میلی‌لیتر از اسید سولفوریک یک مولار با آن مخلوط گردید. پس از آن ریشه‌ها با کاغذ صافی خشک و به درون لوله آزمایش منتقل و ۱۰ میلی‌لیتر استیل استات به آن اضافه شد. همچنین محلول آب مقطر به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. میزان TTC توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری و به کمک ترسیم منحنی استاندارد ($y=0.0015+0.0050$, $R^2=0.94$) تعیین گردید. در نهایت، فعالیت ریشه حاصل از مقدار احیای تری‌فنیل‌ترازولیوم کلراید بر وزن ریشه در مدت زمان انکوباسیون تعیین شد.

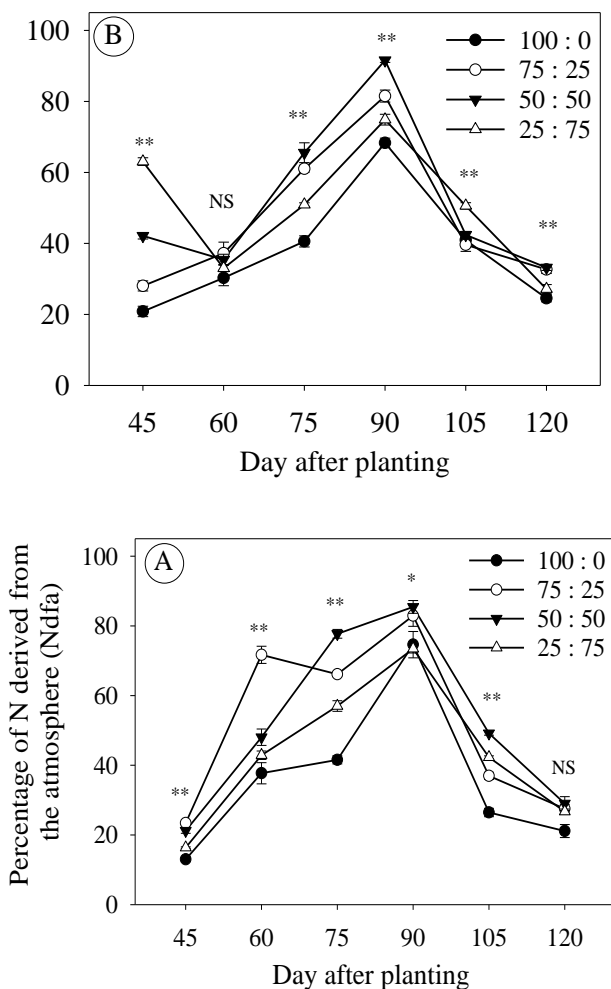
جهت تعیین مقدار نیتروژن در گیاه سویا پس از انجام نمونه-برداری تخریبی درصد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی در شش مرحله مذکور، اندام‌های گیاه سویا به تفکیک در آون الکتریکی تهویه-دار با درجه حرارت ۷۰°C به مدت ۴۸ ساعت خشک و پس از آن به کمک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ توزین شدند. در نهایت، آماده سازی نمونه‌ها به کمک آسیاب آزمایشگاهی^۲ انجام و مقدار نیتروژن توسط دستگاه نیتروژن دumas آنالایزر^۳ اندازه‌گیری شد. عملکرد نیتروژن گیاه سویا بر اساس کیلوگرم در هکتار در مراحل مختلف از حاصل‌ضرب میزان کل ماده خشک در مقدار نیتروژن (گرم در گرم ماده خشک) تعیین گردید.

در نهایت، جهت تجزیه آماری داده‌ها، شامل آزمون یکنواختی

- 1- Triphenyl tetrazolium chloride (TTC)
- 2- A11, IKA, rpm 28000
- 3- NDA 701 Dumas Nitrogen Analyzer

برخی دیگر از مطالعات کاهش تثبیت بیولوژیکی گیاه لگوم در کشت مخلوط به دلیل افزایش ارتفاع و سایه‌اندازی گیاه همراه گزارش شده است (Nambiar et al., 1983).

گیاهان لگوم در کشت مخلوط را به افزایش تعداد و وزن گره‌های تثبیت‌کننده نیتروژن نسبت دادند (Cardoso et al., 2007; Weisany et al., 2016; Maikhuri et al., 2016). هر چند در



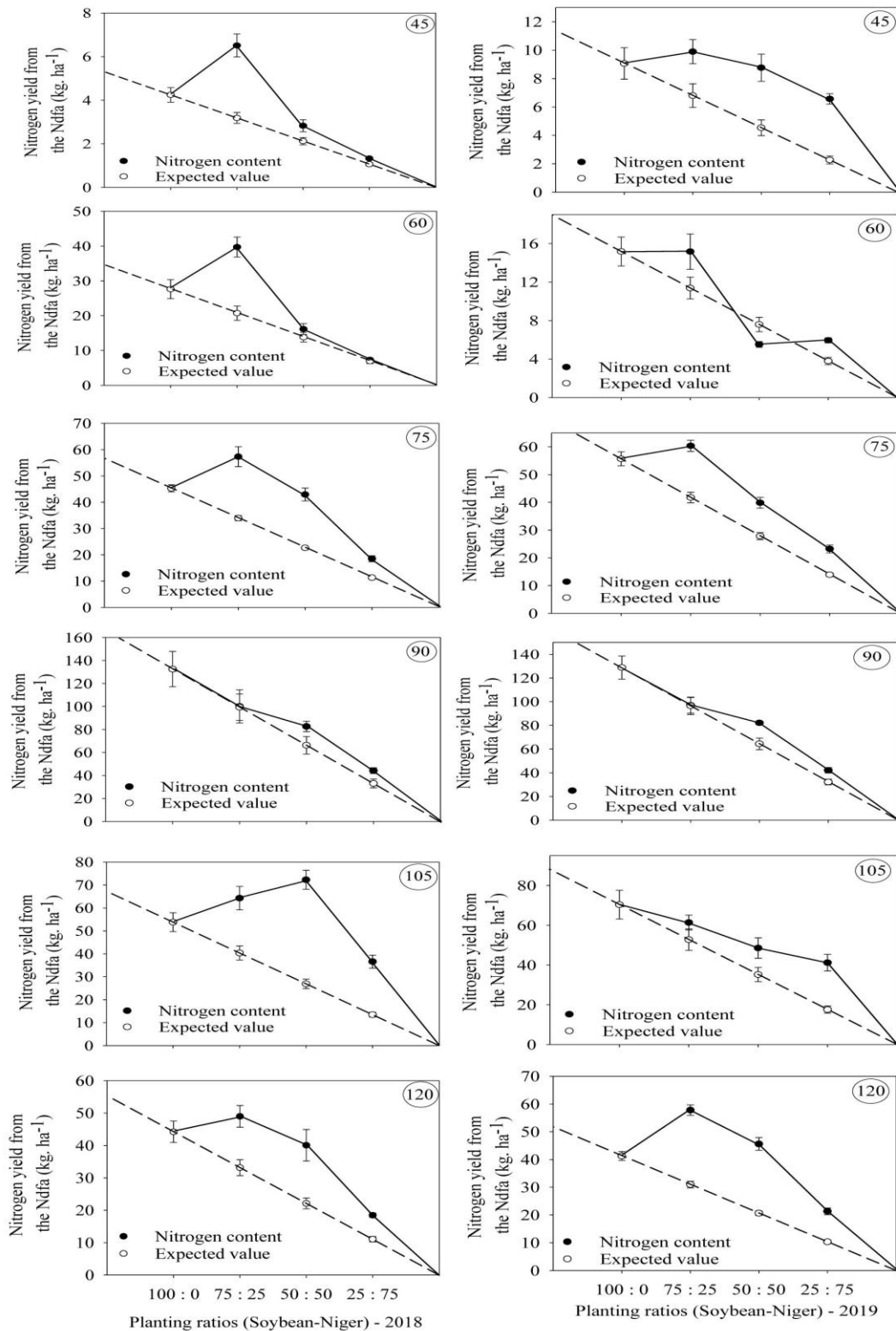
شکل ۱- میانگین درصد نیتروژن تثبیت شده سویا در طی دوره رشد و در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط با دان سیاه
Fig. 1- The average percentage of N derived from the atmosphere (Ndfa) of soybean during the growing season and at different intercropping ratios with niger

خطوط عمودی بر روی نقاط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE)، حروف A و B به ترتیب نشان‌دهنده سال ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸

NS، *، **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد می‌باشد.

Vertical bars on the points and the letters A, B represent the standard error (SE) and studied years, 2018-2019.

NS, * and **: insignificant, Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.



شکل ۲- عملکرد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی سویا در طی دوره رشد و در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط با دان سیاه
Fig. 2- Nitrogen yield from the Ndfa in soybean during the growing season and at different intercropping ratio with niger
 خطوط عمودی بر روی نقاط نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) و اعداد داخل دایره مربوط به تعداد روز پس از کاشت می‌باشد.
 Vertical bars on the points represent the standard error (SE) and the numbers inside the circle in the pictures are related to the day after planting.

در مجموع، به نظر می‌رسد گیاه سویا در نسبت کاشت ۲۵:۷۵ (دان‌سیاه-سویا) به دلیل دریافت بیشتر نور توسط تاج‌پوشش کشت مخلوط در مراحل پایانی دارای ثبات بیشتری از نظر قابلیت تثبیت بیولوژیکی است. به عبارت دیگر، روند نزولی درصد نیتروژن حاصل از فرآیند تثبیت بیولوژیکی در نسبت کاشت ۲۵:۷۵ در مقایسه با سایر نسبت‌های کشت مخلوط دارای سرعت کمتری می‌باشد. به طور کلی، بهبود قابلیت تثبیت بیولوژیکی گیاه لگوم در کشت مخلوط توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (Ruhlemann & Schmidtke, 2016; Maikhuri et al., 2016; Hu et al., 2016).

همچنین تمامی نسبت‌های مختلف کاشت (به غیر از نسبت کاشت ۵۰:۵۰ در سال ۱۳۹۸) مقدار نیتروژن بیشتری را در مقایسه مقدار قابل انتظار تولید کردند (شکل ۲). بیشترین مقدار افزایش تثبیت بیولوژیکی سویا (کیلوگرم در هکتار) مربوط به مرحله ۹۰ روز پس از کاشت بود. در این مرحله میزان درصد افزایش نیتروژن در مقایسه با مقادیر پیش‌بینی شده در نسبت‌های کاشت ۷۵:۲۵، ۵۰:۵۰ و ۲۵:۷۵ (دان‌سیاه-سویا) در سال‌های ۱۳۹۷ به ترتیب ۰/۷۲، ۲۴/۷۶، ۳۴/۳۵ و در سال ۱۳۹۸ به طور میانگین ۰/۳۶، ۲۷/۶۰، ۳۰/۷۶ درصد بود. این در حالی است که در هر دو سال زراعی با نزدیک شدن به مراحل انتهایی رشد، درصد عملکرد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی در هکتار بیشترین افزایش را در مقایسه با مقادیر پیش‌بینی شده نشان داد. این افزایش در نسبت کاشت ۷۵:۲۵ (دان‌سیاه-سویا) به مراتب بیشتر از سایر نسبت‌های کشت مخلوط بود. اما در نقطه مقابل، در مراحل ابتدایی رشد نسبت کاشت ۲۵:۷۵ (دان‌سیاه-سویا) به خصوص در سال ۱۳۹۷ دارای بیشترین درصد افزایش در مقایسه با سایر نسبت‌های کاشت بود (شکل ۲). با توجه به نتایج مذکور، عملکرد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی با کاهش ردیف کاشت سویا در نسبت کاشت ۲۵:۷۵ (دان‌سیاه-سویا) در مقایسه با سایر نسبت‌های کشت مخلوط در مراحل ابتدایی رشد دارای یک شیب صعودی ملایم بوده که با نزدیک شدن به مراحل ۱۰۵ و ۱۲۰ روز پس از کاشت درصد عملکرد تثبیت بیولوژیکی گره‌های ریشه در مقایسه با مقادیر قابل پیش‌بینی با سرعت بیشتری نسبت به آرایش کاشت ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵ (دان‌سیاه-سویا) افزایش یافت. هر چند مقدار آن کمتر از نسبت کاشت ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵ (دان‌سیاه-سویا) در هر دو سال مورد مطالعه بود (شکل ۲). اما به طور کلی، به نظر می‌رسد در نسبت کاشت

۲۵:۷۵ (دان‌سیاه-سویا) ایجاد تعادل در رقابت بین گونه‌ای گیاه سویا برخلاف دوره ابتدایی رشد، پس از مرحله ۹۰ روز پس از کاشت برای دستیابی به یک رابطه مکملی در کشت مخلوط اتفاق می‌افتد. این موضوع در کنار ثبات بیشتر قابلیت تثبیت بیولوژیکی در مراحل ۱۰۵ و ۱۲۰ روز پس از کاشت نقش قابل توجهی در افزایش میزان عملکرد نیتروژن نسبت کاشت ۲۵:۷۵ (دان‌سیاه-سویا) در مقایسه با مقدار قابل انتظار داشته است (شکل ۲). به طور کلی، در سیستم کشت مخلوط، مقدار نیتروژن تثبیت شده توسط ریشه گیاه لگوم به فنولوژی، مورفولوژی گونه یا رقم، تراکم گیاه لگوم و سهم آن در کشت مخلوط بستگی دارد (Stern, 1993). بیشترین عملکرد نیتروژن گیاه سویا در مرحله ۹۰ روز پس از کاشت در سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ مربوط به کشت خالص (۱۰۰:۰) به ترتیب با میانگین ۱۳۲/۵۲ و ۱۲۸/۷۹ کیلوگرم در هکتار بود. اما نکته قابل توجه افزایش عملکرد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی در نسبت کاشت ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵ (دان‌سیاه-سویا) پس از مرحله ۹۰ روز پس از کاشت بود. نتایج نشان داد، با گذشت زمان عملکرد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی در نسبت کاشت ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵ (دان‌سیاه-سویا) از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با کشت خالص (۱۰۰:۰) نداشت. این موضوع نشان‌دهنده افزایش قابلیت، پایداری و تداوم تثبیت بیولوژیکی سویا در الگوی کشت مخلوط با گیاه دان‌سیاه می‌باشد.

همچنین نسبت‌های مختلف کشت مخلوط اثر معنی‌داری بر فعالیت ریشه گیاه دان‌سیاه در کشت مخلوط داشتند (جدول ۲). نتایج نشان داد، در هر دو سال زراعی میزان فعالیت ریشه گیاه دان‌سیاه در نسبت‌های مختلف کاشت در مراحل ابتدایی رشد دارای روند صعودی است و پس از نزدیک شدن به مرحله گل‌دهی (۹۰ روز پس از کاشت) مقدار آن کاهش می‌یابد. هر چند آغاز سیر نزولی فعالیت ریشه در سال ۱۳۹۷ در مقایسه با سال ۱۳۹۸ زودتر انجام شد. به طور کلی، نسبت‌های مختلف کشت مخلوط گیاه دان‌سیاه در مقایسه با کشت خالص (۱۰۰:۰) دارای بیشترین میزان فعالیت ریشه بودند (جدول ۲). این روند در مراحل ابتدایی رشد بیشتر مربوط به نسبت‌های کاشت ۲۵:۷۵ (دان‌سیاه-سویا) و ۵۰:۵۰ بود. اما با گذشت زمان و پس از سپری شدن مرحله گل‌دهی در گیاه دان‌سیاه فعالیت ریشه گیاه در نسبت‌های مختلف کاشت اختلاف معنی‌داری با تیمار کشت خالص (۱۰۰:۰) داشت. در این بین، نکته قابل تأمل افزایش فعالیت ریشه در

میکروبی به ترتیب مربوط به نسبت کاشت ۵۰:۵۰، ۷۵:۲۵ و ۲۵:۷۵ (دان سیاه- سویا) بود. هر چند از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین نسبت کاشت ۲۵:۷۵ (دان سیاه- سویا) و کشت خالص سویا (۱۰۰:۰) وجود نداشت (جدول ۳). کمترین میزان فعالیت کل میکروبی خاک در این قسمت مربوط به کشت خالص دان سیاه (۰:۱۰۰) بود. بررسی میزان فعالیت کل میکروبی خاک در مرحله رسیدگی گیاه در نسبت-های مختلف کاشت نیز نشان داد در عمق ۱۰-۰ سانتی‌متر از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری میان نسبت‌های مختلف کاشت وجود ندارد. اما در عمق ۲۰-۱۰ سانتی‌متر کشت خالص سویا (۱۰۰:۰) دارای بیشترین میزان فعالیت میکروبی است. پس از آن نیز نسبت کاشت ۷۵:۲۵ (دان سیاه- سویا) رتبه بعدی را در اختیار داشتند. هر چند از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری میان نسبت‌های مختلف کشت مخلوط وجود نداشت. کمترین میزان فعالیت کل میکروبی خاک در این قسمت مربوط به کشت خالص دان سیاه (۰:۱۰۰) بود (جدول ۳). سرانجام، در عمق ۳۰-۲۰ سانتی‌متر بیشترین فعالیت میکروبی خاک متعلق به نسبت‌های کاشت ۷۵:۲۵ و ۲۵:۷۵ (دان سیاه- سویا) بود. کمترین مقدار فعالیت نیز در کشت خالص دان سیاه (۰:۱۰۰) مشاهده شد (جدول ۳).

به طور کلی، در عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری خاک و در مرحله ۶۰ روز پس از کاشت میزان فعالیت کل میکروبی خاک در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط بیشتر از کشت خالص هر یک از گیاهان مورد مطالعه بود (جدول ۳) و بیشترین میزان فعالیت میکروبی در نسبت کاشت ۵۰:۵۰ مشاهده شد. میزان فعالیت کل میکروبی در نسبت کاشت مذکور به ترتیب ۱۶/۳۸ و ۳۱/۶۹ درصد بیشتر از کشت خالص گیاه سویا (۱۰۰:۰) و کشت خالص گیاه دان سیاه (۰:۱۰۰) بود. در این بین، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری میان نسبت‌های کاشت ۲۵:۷۵ و ۷۵:۲۵ (دان سیاه- سویا) وجود نداشت. فعالیت بیشتر ریشه گیاه دان-سیاه به عنوان گیاه مکمل در نسبت‌های کشت مخلوط می‌تواند نقش مهمی در افزایش فعالیت تثبیت بیولوژیکی گیاه سویا و در نتیجه پویایی تعاملات بخش زیرزمینی در الگوی کشت مخلوط داشته باشد. همچنین نتایج فعالیت کل میکروبی در عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری خاک در مرحله رسیدگی گیاه نیز نشان داد نسبت‌های کشت مخلوط در مقایسه با تیمار کشت خالص دان سیاه (۰:۱۰۰) از فعالیت میکروبی بیشتری برخوردارند (جدول ۳).

مراحل انتهایی رشد با کاهش تعداد ردیف‌های کشت گیاه دان سیاه به خصوص در نسبت کاشت ۷۵:۲۵ (دان سیاه- سویا) بود. تداوم این فعالیت در مراحل انتهایی رشد در نسبت کاشت مذکور نشان از توانایی و قدرت رقابت گیاه دان سیاه دارد. این قابلیت باعث ایجاد رقابت مطلوب به‌ویژه در نسبت‌های کاشت ۷۵:۲۵ (دان سیاه- سویا) و ۵۰:۵۰ در مراحل ۱۰۵ و ۱۲۰ روز پس از کاشت شد. نتایج نشان داد، میزان افزایش فعالیت ریشه در نسبت‌های کشت مذکور در مرحله ۱۰۵ روز پس از کاشت، در سال ۱۳۹۷ به ترتیب ۱۱۰ و ۸۸ درصد و در سال ۱۳۹۸ به میزان ۶۷ و ۴۶ درصد بیشتر از کشت خالص دان سیاه (۰:۱۰۰) بود. کاهش فعالیت ریشه در سیستم کشت مخلوط پس از گل‌دهی توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (Ghosh et al., 2016; Kong et al., 2016). از آنجا که درصد نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی عمدتاً می‌تواند تحت تأثیر اثر متقابل بخش زیرزمینی در کشت مخلوط قرار گیرد (Du et al., 2019)، بنابراین، چندان دور از ذهن نیست که فعالیت بیشتر ریشه گیاه دان سیاه به عنوان گیاه همراه در کشت مخلوط نقش تأثیرگذاری در افزایش قابلیت تثبیت بیولوژیکی گیاه سویا داشته باشد. بر اساس نتایج مطالعه پژوهشگران، افزایش فعالیت ریشه گیاه مکمل در کشت مخلوط می‌تواند از طریق افزایش جذب میزان نیتروژن قابل دسترس باعث بهبود قابلیت تثبیت بیولوژیکی گیاه لگوم شود (Du Pelzer et al., 2014; et al., 2019).

نسبت‌های مختلف کاشت اثر معنی‌داری بر فعالیت کل میکروبی خاک داشتند (جدول ۳). بر اساس نتایج به‌دست آمده از فعالیت کل میکروبی خاک در مرحله ۶۰ روز پس از کاشت، نسبت کاشت ۵۰:۵۰ در عمق ۱۰-۰ سانتی‌متری دارای بیشترین و کشت خالص سویا (۱۰۰:۰) و دان سیاه (۰:۱۰۰) دارای کمترین میزان فعالیت بودند. در عمق ۲۰-۱۰ سانتی‌متری کشت خالص دان سیاه (۰:۱۰۰) و سویا (۱۰۰:۰) به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار فعالیت را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). در این قسمت، در بین نسبت‌های کشت مخلوط، نسبت کاشت ۵۰:۵۰ بیشترین فعالیت میکروبی را در اختیار داشت، هر چند از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین نسبت کاشت فوق و نسبت کاشت ۲۵:۷۵ (دان سیاه- سویا) مشاهده نشد. در نهایت، در عمق ۳۰-۲۰ سانتی‌متری نیز تمامی نسبت‌های مختلف کشت مخلوط از فعالیت کل میکروبی بیشتری در مقایسه با کشت خالص هر یک از گیاهان برخوردار بودند. در این قسمت، بیشترین فعالیت

جدول ۲- مقایسه میانگین فعالیت ریشه (میکروگرم تری‌فیل‌تر ازولوم در گرم وزن تر ریشه) دان‌سیاه در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط با سویا
 Table 2- Mean comparison of niger root activity (TTC reduction (μg . root F.W. (g). h^{-1}) in different intercropping ratio with soybean
 روز پس از کاشت سال ۱۳۹۸
 روز پس از کاشت سال ۱۳۹۷

نسبت‌های کاشت Planting ratios (Soybean-Niger)	روز پس از کاشت سال ۱۳۹۷ Day after planting in 2018					روز پس از کاشت سال ۱۳۹۸ Day after planting in 2019						
	45	60	75	90	105	120	45	60	75	90	105	120
0 : 100	72.50	101.99	201.96	68.49	35.08	26.22	42.71	91.05	113.01	99.10	96.14	28.76
25 : 75	99.68	131.27	92.11	62.13	43.43	36.55	86.42	176.72	105.01	116.80	135.42	39.01
50 : 50	90.96	169.74	158.78	93.67	66.06	58.03	37.34	124.71	154.64	154.30	81.04	63.98
75 : 25	59.95	106.16	203.23	108.35	73.71	62.87	34.45	79.79	107.16	134.03	118.66	71.38
حداقل اختلاف معنی‌دار LSD (0.05)	6.86 **	7.70 **	12.36 **	13.28 **	11.48 **	5.63 **	3.66 **	13.13 **	9.62 **	3.57 **	3.21 **	5.67 **
ضریب تغییرات C.V (%)	5.31	3.78	4.71	9.98	13.16	7.67	4.55	6.95	5.01	1.77	1.86	6.98

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد فاقد تفاوت معنی‌داری بوده و اعداد پس از میانگین نشان‌دهنده انحراف استاندارد است.

** : significant at 1% probability level

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability, using LSD test, and values are means \pm standard deviation ($\bar{X} \pm \text{SD}$).

جدول ۳- مقایسه میانگین مقدار فعالیت کل میکروبی خاک (میکروگرم فلورسین در گرم خاک) در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط دان سیاه-سویا
 Table 3- Mean comparison of total soil microbial activity ($\mu\text{g. Fluorescein.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) in the different intercropping ratios of soybean-niger

نسبت‌های کاشت Planting ratios (Soybean-Niger)	۶۰ روز پس از کاشت 60 days after planting (60 D.A.P)				مرحله برداشت Harvest stage			
	عمق خاک Soil depth (cm)				عمق خاک Soil depth (cm)			
	0-10	10-20	20-30	0-30	0-10	10-20	20-30	0-30
0 : 100	8.03	11.71	7.08	26.24	12.62	10.38	9.72	32.73
25 : 75	8.72	8.79	14.47	32.01	13.02	11.89	15.96	40.88
50 : 50	9.66	9.21	15.69	34.56	11.99	12.28	10.95	35.23
75 : 25	8.22	8.38	15.07	31.68	12.73	12.34	16.53	41.60
100 : 0	8.19	7.23	14.27	29.69	12.72	14.10	13.96	40.79
حداقل اختلاف معنی‌دار LSD (0.05)	0.65 **	0.49 **	0.55 **	0.98 **	1.16 ns	0.98 **	0.75 **	2.05 **
ضریب تغییرات C.V (%)	7.43	5.32	4.06	3.08	8.97	7.45	5.43	5.19

ns: غیر معنی‌دار و * و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

ns: Not significant and * and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

مختلف کشت مخلوط به دلیل تنوع بیشتر و تمایل به رقابت ضمن ایجاد زیست‌توده میکروبی پویا در افزایش فعالیت میکروبی خاک نقش مهمی داشتند. از طرف دیگر، مشارکت در افزایش رقابت، سبب آزادسازی مقدار زیادی از کربن سهل‌الوصول در داخل ریزوسفر می‌شود. این موضوع ضمن افزایش فراوانی، فعالیت و رشد ریزجانداران در ریزوسفر باعث تخلیه مواد غذایی قابل دسترس باقی‌مانده از طریق جذب میکروبی و فعالیت بیشتر آنزیمی می‌شود (Kuzuyakov & Xu, 2013). افزایش فعالیت میکروبی خاک در کشت مخلوط توسط برخی از محققان گزارش شده است (Azam Khan et al., 2014). در مقابل، عدم تغییر معنی‌دار فعالیت میکروبی خاک نیز در کشت مخلوط در مقایسه با کشت خالص توسط برخی از پژوهشگران گزارش شده است، هر چند، آن‌ها علت این موضوع را به حاصلخیزی خاک زراعی نسبت دادند (Wang et al., 2015). بنابراین، اهمیت تعاملات در بخش زیرزمینی در الگوی کشت مخلوط می‌تواند در سیستم‌های کشاورزی کم‌نهاده بیشتر نمایان شود.

نسبت‌های مختلف کاشت اثر معنی‌داری بر مقدار فنول و فلاونوئید کل ریشه گیاه دان سیاه در طی مراحل مختلف رشد داشتند (جدول ۴ و ۵). بر اساس نتایج به‌دست آمده، مقدار فنول و فلاونوئید کل ریشه تا مرحله پایان گل‌دهی گیاه دان سیاه افزایش یافته و سپس، از مقدار آن کاسته می‌شود.

بیشترین فعالیت میکروبی در مراحل انتهایی رشد متعلق به نسبت کاشت ۷۵:۲۵ (دان سیاه- سویا) بود که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با نسبت کاشت ۲۵:۷۵ (دان سیاه- سویا) و کشت خالص سویا (۱۰۰:۰) نداشت. نتایج برخی مطالعات نشان داد، قابلیت بیشتر انعطاف‌پذیری مورفولوژیکی در ریشه‌های گیاه لگوم می‌تواند فرصت لازم را برای اکتشاف فیزیکی خاک امکان‌پذیر نماید (Giles et al., 2017). هر چند این موضوع می‌تواند برای گیاه لگوم هزینه‌بر باشد، ولی با توجه به بهبود قابلیت تثبیت بیولوژیکی گیاه سویا در کشت مخلوط این امر چندان دور از ذهن نیست. همچنین بیشترین فعالیت کل میکروبی خاک در گیاه دان سیاه در مراحل میانی و انتهایی رشد بیشتر معطوف به عمق ۲۰-۳۰ سانتی متری خاک بود، در مقابل افزایش میزان فعالیت کل میکروبی گیاه سویا در عمق ۳۰-۱۰ سانتی متری مشاهده شد. بنابراین، به نظر می‌رسد ساختار مکملی ریشه گیاه دان سیاه و سویا در کشت مخلوط می‌تواند از طریق تمایز آشیان اکولوژیکی حتی در بازه زمانی کوتاه‌مدت، بر قابلیت رقابت بین‌گونه‌ای در مراحل مختلف رشد و در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط تأثیرگذار باشد. اثر تمایز آشیان اکولوژیکی در ساختار ریشه گیاهان و نقش آن در رقابت و بهبود قابلیت تثبیت بیولوژیکی گیاه لگوم در کشت مخلوط توسط برخی از محققان گزارش شده است (Jamont et al., 2013; Tsialtas et al., 2018a). به‌طور کلی، با توجه به نتایج مذکور، چنین استنباط می‌شود که افزایش تنوع، باعث بهبود فعالیت زیست‌توده میکروبی شده و این موضوع از نرخ بالاتر فعالیت آنزیمی پشتیبانی می‌کند (King, 2014). لذا، می‌توان گفت نسبت‌های

جدول ۴- مقایسه میانگین مقدار کل فلاونوئید ریشه دان سیاه (میکروگرم اکی والانت کرسین در میلی لیتر) در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط با سویا
 Table 4- Mean comparisons of the total amounts of niger root flavonoids ($\mu\text{g QUE equivalent/ml}$) in different intercropping ratio with soybean

نسبت‌های کاشت Planting ratios (Soybean-Niger)	روز پس از کاشت سال ۱۳۹۷						روز پس از کاشت سال ۱۳۹۸					
	Day after planting in 2018						Day after planting in 2019					
	45	60	75	90	105	120	45	60	75	90	105	120
0 : 100	10.38	38.62	18.67	26.92	80.87	21.36	43.90	80.19	19.01	38.67	60.69	17.46
25 : 75	2.92	49.74	41.18	25.38	52.32	18.48	37.41	132.07	27.97	105.22	128.01	16.23
50 : 50	16.45	38.16	26.29	22.52	38.04	55.57	39.18	83.41	41.83	74.26	56.33	14.96
75 : 25	2.97	38.78	26.29	23.53	30.23	113.26	13.23	120.86	22.74	90.17	55.39	11.78
حداقل اختلاف معنی‌دار LSD (0.05)	2.17	7.24 *	9.42	5.13 ns	3.56	2.97	3.17	4.20	2.34	2.94	6.81	3.11 *
C.V (%)	16.56	10.95	4.25	13.05	4.43	3.56	5.92	2.52	11.87	5.39	5.67	12.85

** : معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد فاقد تفاوت معنی‌داری بوده و اعداد پس از میانگین نشان‌دهنده انحراف استاندارد است.

** : significant at 1% probability level

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability, using LSD test, and values are means±standard deviation ($\bar{X}\pm\text{SD}$).

بیولوژیکی نیتروژن گیاه سویا را در کشت مخلوط تقویت کرده و یکی از مهم‌ترین دلایل ایجاد رقابت و افزایش تنوع در سیستم‌های کشت مخلوط محسوب شود. در این بین، گیاهانی که قادر به برقراری ارتباط و قدرت رقابت بالاتری هستند از ظرفیت بیشتری برای تولید مواد آنتی‌اکسیدانی برخوردار می‌باشند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد، نسبت‌های مختلف کشت مخلوط با گیاه دان‌سیاه دارای قابلیت تثبیت بیولوژیکی بیشتری در مقایسه با کشت خالص گیاه سویا بودند و بیشترین میزان فعالیت بیولوژیکی مذکور در نسبت کاشت ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵ (دان‌سیاه- سویا) مشاهده شد. علاوه بر آن، نسبت کاشت ۲۵:۷۵ (دان‌سیاه- سویا) در مراحل ۱۲۰ و ۱۰۵ روز پس از کاشت از نظر صفت مذکور دارای ثبات بیشتری بود و تمامی نسبت‌های مختلف کاشت (به‌غیر از نسبت کاشت ۵۰:۵۰ در سال ۱۳۹۸) مقدار نیتروژن بیشتری را در مقایسه مقدار قابل انتظار تولید کردند. در این بین، عملکرد مقدار نیتروژن حاصل از تثبیت بیولوژیکی (کیلوگرم در هکتار) در کشت خالص با گذشت زمان کاهش یافت و در مرحله ۱۲۰ روز پس از کاشت (آغاز دانه‌بندی) از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با نسبت کاشت ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵ (دان‌سیاه- سویا) نشان نداد. این موضوع مربوط به پایداری، تداوم و افزایش قابلیت تثبیت بیولوژیکی نیتروژن گیاه سویا در کشت مخلوط می‌باشد. همچنین نتایج نشان داد، گیاه دان‌سیاه در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط ضمن افزایش فعالیت ریشه از میزان ترکیبات ثانویه بیشتری نیز در عصاره ریشه برخوردار است. به‌طور کلی، افزایش فعالیت ریشه در مراحل انتهایی رشد با کاهش تعداد ردیف‌های کشت گیاه دان‌سیاه به‌خصوص در نسبت کاشت ۷۵:۲۵ (دان‌سیاه- سویا) همراه بود و این قابلیت باعث ایجاد رقابت مطلوب به‌ویژه در نسبت‌های کاشت ۷۵:۲۵ (دان‌سیاه- سویا) و ۵۰:۵۰ در مراحل ۱۰۵ و ۱۲۰ روز پس از کاشت شد. علاوه بر آن، مقدار فنول و فلاونوئید کل موجود در عصاره ریشه گیاه دان‌سیاه تا مرحله پایان گل‌دهی افزایش یافته و سپس از مقدار آن کاسته شد. در این بین، نسبت‌های مختلف کشت مخلوط از نظر تولید ترکیبات ثانویه موفق‌تر از کشت خالص گیاه دان‌سیاه عمل کردند. بنابراین، افزایش فعالیت ریشه و همچنین تولید بیشتر ترکیبات ثانویه به‌خصوص میزان

در سال ۱۳۹۷ و در مرحله ۱۰۵ روز پس از کاشت بیشترین مقدار فلاونوئید کل ریشه مربوط به کشت خالص گیاه دان‌سیاه (۰:۱۰۰) بود. نسبت کاشت ۲۵:۷۵ (دان‌سیاه- سویا) نیز رتبه بعدی را در اختیار داشت. اما در سال ۱۳۹۸ و در مرحله مذکور تمامی نسبت‌های کشت مخلوط از مقدار فلاونوئید کل بیشتری در مقایسه با شاهد برخوردار بودند. به نحوی که مقدار افزایش فلاونوئید کل ریشه در نسبت‌های کاشت ۲۵:۷۵، ۵۰:۵۰ و ۷۵:۲۵ (دان‌سیاه- سویا) به‌ترتیب ۶۴/۷۰، ۵۰/۷۲ و ۴/۰۲ درصد بیشتر از کشت خالص دان‌سیاه (۰:۱۰۰) بود (جدول ۴). این روند در خصوص مراحل ۹۰ و ۷۵ روز پس از کاشت در هر دو سال زراعی نیز صادق بود. تغییرات مقدار کل فنول ریشه نیز از این قاعده مستثنی نبود و با نزدیک شدن به مراحل انتهایی رشد مقدار آن کاهش یافت. بیشترین مقدار فنول کل ریشه در مراحل ابتدایی مربوط به نسبت کاشت ۲۵:۷۵ (دان‌سیاه- سویا) و ۵۰:۵۰ بود. اما در مرحله ۱۰۵ روز پس از کاشت بیشترین مقدار فنول کل ریشه متعلق به کشت خالص دان‌سیاه (۰:۱۰۰) بود (جدول ۵). با توجه به اینکه ترکیبات فنول و فلاونوئید به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در نظر گرفته می‌شوند (Granato et al., 2018) و با وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار ترکیبات مذکور با فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه (Benabdallah et al., 2016) به نظر می‌رسد، افزایش مقدار ترکیبات ثانویه (فنول و فلاونوئید تام) و قابلیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به‌شدت تحت تأثیر نسبت‌های مختلف کشت مخلوط قرار گیرد. علاوه بر آن، نکته قابل توجه دیگر فرضیه ارتباط گیاهان از طریق بزرگراه‌های زیرزمینی است. در همین راستا، نتایج مطالعات برخی از پژوهشگران در خصوص نقش تعاملات زیرزمینی در کشت مخلوط نشان داد، فلاونوئید موجود در ترشحات ریشه گیاه مکمل، سیگنال‌های کلیدی مؤثر در ایجاد ارتباط بین گره‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و فلاونوئید مؤثر بر آن را در گیاه لگوم افزایش می‌دهند (Li et al., 2016). بنابراین، می‌توان احتمال تأثیر و افزایش تولید ترکیبات ثانویه به‌خصوص فلاونوئیدها توسط گیاه دان‌سیاه را بر فعالیت بیشتر گره‌های تثبیت‌کننده نیتروژن سویا در نظر گرفت. از آنجا که بیشترین مقدار فلاونوئید موجود در عصاره ریشه گیاه دان‌سیاه در مراحل ۹۰ و ۷۵ روز پس از کاشت منطبق با حداکثر فعالیت تثبیت بیولوژیکی در نسبت‌های مختلف کشت مخلوط می‌باشد لذا این موضوع می‌تواند احتمال تأثیر ترشحات بیشتر ترکیبات ثانویه بر قابلیت تثبیت

میکروبی خاک در گیاه دان‌سیاه و سویا در مراحل میانی و انتهایی رشد به ترتیب مربوط به عمق ۲۰-۰ و ۳۰-۱۰ سانتی‌متری خاک بود. در نهایت، گیاهان در کشت مخلوط از طریق شناسایی استراتژی‌های مکمل مانند ایجاد آشیان اکولوژیکی مناسب، می‌توانند بهره‌وری را در سیستم کشت مخلوط به حداکثر برسانند.

فلاونوئید توسط گیاه دان‌سیاه می‌تواند از طریق افزایش جذب عناصر غذایی مانند نیتروژن و تحریک سیگنال‌های کلیدی مؤثر در ایجاد قابلیت تثبیت بیولوژیکی، نقش مهمی در ایجاد تعاملات و تسهیل در رقابت داشته باشد. علاوه بر آن، کشت مخلوط سویا با دان‌سیاه با تنظیم تقاضا برای نیتروژن در بخش زیرزمینی باعث افزایش بیشتر فعالیت کل میکروبی خاک شد. در این بین، بیشترین فعالیت کل

References

1. Adam, G., & Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 943-951. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00244-3)
2. Azam Khan, M., Chen, J., Li, Q., Zhang, W., Wu, L., Li, Z., & Lin, W. (2014). Effect of interspecific root interaction on soil nutrition, enzymatic activity and rhizosphere biology in maize-peanut intercropping system. *Pakistan Journal Agricultural Science*, 51(2), 395-406.
3. Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendjel, M., Aissi, O., & Messaoud, C. (2016). Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(9), 760-766. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.06.016>
4. Callaway, R.M. (2002). The detection of neighbors by plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 17(3), 104-105. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02438-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02438-7)
5. Carciocchi, W.D., Schwalbert, R., Andrade, F.H., Corassa, G.M., Carter, P., Gasper, A.P., Schmidt, J., & Ciampitti, A. (2019). Soybean seed yield response to plant density by yield environmental in North America. *Agronomy Journal*, 111(4), 1-10. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.10.0635>
6. Cardoso, E.J.B.N., Nogueira, M.A., & Ferraz, S.M.G. (2007). Biological N₂ fixation and mineral N in common bean-maize intercropping or sole cropping in southeastern Brazil. *Experimental Agriculture*, 43, 319-330. <https://doi.org/10.1017/S0014479707005029>
7. Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., & Youngs, V.L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6, 71-80. <https://doi.org/10.1080/00103627509366547>
8. Cesco, S., Neumann, G., Tomasi, N., Pinton, R., & Weiskopf, L. (2010). Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant and Soil*, 329, 1-25. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0266-9>
9. Cong, W.F., Hoffland, E., Li, L., Six, J., Haosun, J., Bao, X., Zhang, F., & Werf, W. (2014). Intercropping enhances soil carbon and nitrogen. *Global Change Biology*, 21(4), 1715-1726. <https://doi.org/10.1111/gcb.12738>
10. Corre-Hellou, G., Brisson, N., Launay, M., Fustec, J., & Crozat, Y. (2007). Effect of root depth penetration on soil N sharing and dry matter in pea-barley intercrops given different soil N supplies. *Field Crops Research*, 103, 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2007.04.008>
11. Crews, T.E., Blesh, J., Culman, S.W., Hayes, R.C., Jensen, E.S., Mark, M.C., Peoples, M.B., & Schipanski, M.E. (2016). Going where no grains have gone before: From early to mid-succession. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, 223, 223-238. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.03.012>
12. Du, Q., Zhou, L., Chen, P., Liu, X., Song, C., Yang, F., Wang, X., Liu, W., Sun, X., Du, J., Liu, J., Shu, K., Yang, W., & Yong, T. (2019). Relay-intercropping soybean with maize maintains soil fertility and increases nitrogen recovery efficiency by reducing nitrogen input. *The Crop Journal*, 8(1), 140-152.

- <https://doi.org/10.1016/j.cj.2019.06.010>
13. Fehr, W.R., Caviness, C.E., Burmood, D.T., & Pennington, J.S. (1971). Stage of development descriptions for soybean, *Glycine max* L. *Crop Science*, 11(6), 929-931. <https://doi.org/10.2135/cropsci1971.0011183X001100060051x>
 14. Ghosh, P.K., Tripathi, A.K., Bandyopadhyay, K.K., & Manna, M.C. (2009). Assessment of nutrient competition and nutrient requirement intercropping system. *European Journal of Agronomy*, 31, 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.03.002>
 15. Giles, C.D., Brown, L.K., Adu, M.O., Mezeli, M.M., Sandral, G.A., Simpson, R.J., Wendler, R., Shand, C.A., Menezes, D., Darch, T., Stutter M.I., Lumsdon D.G., Zhang H., & George, T.S. (2017). Response-based selection of barley cultivars and legume species for complementarity: Root morphology and exudation in relation to nutrient source. *Plant Science*, 255, 12-28. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.11.002>
 16. Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L.D., Hidalgo, F.J., Miyashita, K., Camp, J., Alasalvar, C., Ismail, A.B., Elmore, S., Birch, G.G., Charalampopoulos, D., Astley, S.B., & Pegg, R. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods? *Food Chemistry*, 264, 471-475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.012>
 17. Hangria, M., & Mendes, I.C. (2015). Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis. In F.J. de Bruijn (Eds). *Biological Nitrogen Fixation, Volume 2, First Edition*. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. p. 1009-1023.
 18. Hauggaard-Nielsen, H., Gooding, M., Ambus, P., Corre-Hellou, G., Crozat, Y., Dahlmann, C., Dibet, A., Fragstein, P., Pristeri, A., Monti, M., & Jensen, E.S. (2009). Pea–barley intercropping for efficient symbiotic N₂ fixation, soil N acquisition and use of other nutrients in European organic cropping systems. *Field Crop Research*, 113, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.04.009>
 19. Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M.G., & Romani, A. (2005). Rapid tests to assess the antioxidant activity of *Phaseolus vulgaris* L. dry beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3053–3056. <https://doi.org/10.1021/jf049001r>
 20. Herridge, D.F. (1984). Effects of nitrate and plant development on the abundance of nitrogenous solutes in root-bleeding and vacuum extracted exudates of soybean. *Crop Science*, 25, 173-179.
 21. Hu, F., Gan, Y., Chai, Q., Feng, F., Zhao, C., Yu, A., Mu, Y., & Zhang, Y. (2016). Boosting system productivity through the improved coordination of interspecific competition in maize pea strip intercropping. *Field Crops Research*, 198, 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.08.022>
 22. Islam, M.A. & Adjesiwor, A.T. (2018). Nitrogen fixation and transfer in agricultural production systems. In A. Khan and S. Fahad (Eds.) *Nitrogen in Agriculture*. INTECH. Press, London. p. 95-110.
 23. Jamont, M., Guillaume, P., & Fustec, J. (2013). Sharing N resources in the early growth of rapeseed intercropped with faba bean: Does N transfer matter? *Plant and Soil*, 371(1-3), 651-653. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1712-2>
 24. Kasle, S.V., Gaikeard, S.R., Bhusari, S.A., & Kalegore, N.K. (2020). Studies on growth, yield and quality of niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) as influenced by graded levels of fertilizer and plant density. *The Pharma Innovation Journal*, 9(11), 314-316.
 25. King, A. (2014). Multifunctional agriculture: root and nitrogen dynamics in two alternative systems. Graduate PhD Dissertations, Faculty of Ecology and Evolutionary Biology, Iowa State University, United States.
 26. Kong, L., Xie, Y., Hu, L., Feng, B., & Li, S. (2016). Remobilization of vegetative nitrogen to developing grain in wheat, review. *Field Crops Research*, 196, 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.06.015>
 27. Kuzyakov, Y., & Xu, X. (2013). Competition between roots and microorganisms for nitrogen: Mechanisms and

- ecological relevance. *New Phytologist*, 198, 656-669. <https://doi.org/10.1111/nph.12235>
28. Li, B., Li, Y.Y., Wu, H.M., Zhang, F.F., Li, C.J., Li, X.X., Lambers, H. & Li, L. (2016). Root exudates drive interspecific facilitation by enhancing nodulation and N₂ fixation. *PNAS*, 113(23), 1-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523580113>
 29. Liu, Y.C., Qin, X., Xiao, J., Tang, L., Wei, C.Z., Wei, J.J., & Zheng, Y. (2017). Intercropping influences component and content change of flavonoids in root exudates and nodulation of Faba bean. *Plant Interactions*, 12(1), 187-192. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1308569>
 30. Machado, S. (2009). Does intercropping have a role in modern agriculture? *Soil and Water Conservation Society*, 64(2), 55-57. <https://doi.org/10.2489/jswc.64.2.55A>
 31. Maikhuri, R.K., Dangwal, D., & Negi, V.S. (2016). Evaluation of symbiotic nitrogen fixing ability of legume crops in Central Himalaya. *India. Rhizosphere*, 1, 26-18. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.06.001>
 32. Nambiar, P.T.C., Rao, M.R., & Reddy, M.S. (1983). Effect of intercropping on nodulation and N₂-fixation by groundnut. *Experimental Agriculture*, 19, 79-86. <https://doi.org/10.1017/S001447970001053X>
 33. Nyawade, S.O., Karanja, N.N., Gachene, C.K.K., Gitari, H.I., Geldermann, E.S., & Parker, M.L. (2019). Short-term dynamics of soil organic matter fractions and microbial activity in smallholder potato-legume intercropping systems. *Applied Soil Ecology*, 142, 123-135. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.04.015>
 34. Pelzer, E., Hombert, N., Jeuffroy, M.H., & Makowski, D., (2014). Meta-analysis of the effect of nitrogen fertilization on annual cereal-legume intercrop production. *Agronomy Journal*, 106(5), 1775-1786. <https://doi.org/10.2134/agronj2015.0440>
 35. Ranganatha, A.R.G., Panday, A.K., Bisen, R., Jain, S., & Sharma, S. (2016). Niger. In: S.K. Gupta (Ed), *Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production, opportunities and constraints*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts. p. 169-199.
 36. Ruhlemann, L., & Schmidtke, K. (2015). Evaluation of monocropped and intercropped grain legumes for cover cropping in no-tillage and reduced tillage organic agriculture. *European Journal of Agronomy*, 65, 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.01.006>
 37. Salvagiotti, F., Cassman, K.G., Specht, J.E., Walters, D.T., Weiss, A., & Dobermann, A. (2008). Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crop Research*, 108, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2008.03.001>
 38. Stern, W.R. (1993). Nitrogen fixation and transfer in intercrop systems. *Field Crops Research*, 34, 335-356. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(93\)90121-3](https://doi.org/10.1016/0378-4290(93)90121-3)
 39. Stomph, T., Dordas, C., Baranger, A., de Rijk, J., Dong, B., Evers, J., Gu, C., Li, L., Simon, J., Jensen, E.S., Wang, Q., Wang, Y., Wang, Z., Xu, H., Zhang, C., Zhang, L., Zhang, W., Bedoussac, L., & Werf, W.V. (2020). Designing intercrops for high yield, yield stability and efficient use of resources: Are there principles? *Advances in Agronomy*. In D.L. Sparks (Eds), *Advances in Agronomy*. Academic Press, London. p. 1-50.
 40. Tsialtas, I.T., Baxevanos, D., Vlachostergios, D.N., Dordas, C., & Lithourgidis, A. (2018). Cultivar complementarity for symbiotic nitrogen fixation and water use efficiency in pea-oat intercrops and its effect on forage yield and quality. *Field Crop Research*, 226, 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.07.005>
 41. Unkovich, M., Herridge, D.F., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, B., Giller, K., Alves, B., & Chalk, P. (2008). Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR). p. 136-258.
 42. Wang, Z., Bao, X., Li, X., Jin, X., Zhao, J., Sun, J., Christie, P., & Li, L. (2015). Intercropping maintains soil fertility in terms of chemical properties and enzyme activities on a timescale of one decade. *Plant and Soil*, 391(1-2), 265-282. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2428-2>

43. Waterhouse, A.L. (2002). Determination of total phenolic. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, *11*, 1-8.
44. Weisany, W., Salmasi, S., Raei, Y., & Shorabi, Y. (2016). Can arbuscular mycorrhizal fungi improve competitive ability of dill + common bean intercrops against weeds? *European Journal of Agronomy*, *75*, 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.01.006>
45. Xu, B.J., & Chang, S.K.C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, *72*(2), 159-166. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>
46. Yingchao, L., Yin, X., Xiao, J., Tang, L., & Zheng, Y. (2019). Interactive influences of intercropping by nitrogen on flavonoid exudation and nodulation in faba bean. *Scientific Reports*, *9*, 4818-4829. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41146-9>
47. Young, E.G., & Conway, C.F. (1942). On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *Journal of Biological Chemistry*, *142*, 839-853. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45082-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45082-X)
48. Zhang X, Huang, G., Bian, X., & Zhao, Q. (2013). Effects of root interaction and nitrogen fertilization on the chlorophyll content, root activity, photosynthetic characteristics of intercropped soybean and microbial quantity in the rhizosphere. *Plant Soil and Environment*, *59*(2), 80-88. <https://doi.org/10.17221/613/2012-PSE>