پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۸ شمارهٔ۲، نیمهٔ دوم ۱۳۹۶، صفحهٔ ۵۶-۴۴

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 8, No. 2, 2017, p. 44-56
DOI: 10.22067/ijpr.v8i2.50917

بهبود خصوصیات کیفی دو رقم لوبیا با مصرف تلفیقی کودهای زیستی و شیمیایی فسفاتی و روی

محمود محمدی[1*]، کاظم خاوازی[2]، محمدجعفر ملکوتی[3] و فرهاد رجالی[4]

۱- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شهرکرد، ایران

۲- استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب، بخش تحقیقات بیولوژی خاک مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور

۳- استاد گروه خاکشناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران

۴- دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، بخش تحقیقات بیولوژی خاک، مؤسسه تحقیقات خاک و آب

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۸/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۰۴

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر کاربرد کودهای زیستی محتوی فسفر و روی بر کاهش ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای لوبیاچیتی (*Phaseolus vulgaris* L.)، آزمایش مزرعه‌ای به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای این آزمایش شامل دو رقم لوبیاچیتی (تلاش و صدری)، چهار سطح فسفر (P_0: شاهد، P_1: مصرف سوپرفسفات تریپل بر اساس آزمون خاک، P_2: مصرف کود زیستی فسفاتی و سوپرفسفات تریپل به‌میزان ۵۰درصد توصیه بر اساس آزمون خاک و P_3: کود زیستی فسفاتی) و سه سطح روی (Zn_0: شاهد، Zn_1: مصرف ۵۰ کیلوگرم در هکتار سولفات روی وZn_2: کود زیستی روی) بود.کود زیستی فسفاتی شامل تلقیح با قارچ‌های میکوریزی و باکتری *Azotobacter* و تیمار زیستی روی تلقیح با باکتری‌های*Pseudomonas* بود. نتایج تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری در ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای بین دو رقم نشان نداد. کمترین مقدار این ویژگی‌ها (به‌جز اسید فیتیک) در رقم صدری مشاهده شد. تیمار فسفر و روی، تفاوت معنی‌دار در ویژگی‌های مورد بررسی ایجاد نمودند. کمترین میزان این ویژگی‌ها در تیمار فسفری از تیمار P_2 و در تیمار روی از تیمارهای Zn_1 و Zn_2 به‌دست آمد. اثر متقابل تیمارهای فسفر و روی بر صفات مورد بررسی به‌جز بازدارنده‌های تریپسین معنی‌دار شد. کمترین میزان اسید فیتیک، اسید فنلیک، تانن از تیمار P_2Zn_1 و بازدارنده‌های تریپسین ازتیمار P_2Zn_2 حاصل شد.کودهای زیستی فسفاتی مورد استفاده در این تحقیق با افزایش رشد و جذب عناصر غذایی و غنی‌سازی زیستی بذر با روی و آهن باعث بهبود کیفیت تغذیه‌ای دو رقم لوبیاچیتی شدند.

واژه‌های کلیدی: اسید فیتیک، تانن، روی، لوبیا، میکوریزا

مقدمه

لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) با داشتن ۲۵-۲۰درصد پروتئین ۶۰درصد کربوهیدرات، ویتامین‌ها، فیبر، آنتی‌اکسیدان و ترکیبات آمینواسیدی حاوی آهن و روی اهمیت ویژه‌ای در رژیم غذایی دارد (Fageria & Santos, 2008). عوارض و پیامدهای زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی رویه و نامتعادل کودهای شیمیایی و افزایش هزینه‌های تولید و تخریب منابع آب و خاک، منجر به ترغیب تولید و مصرف کودهای زیستی و به‌کارگیری نظام‌های زراعی سالم و پایدار شده است (Vessey, 2003). کودهای زیستی فرآورده‌های حاوی موجودات زنده کارآمدی هستند که برآیند اثرات متقابلشان با محیط خاک و ریشه موجب جذب عناصر غذایی، افزایش عملکرد، تعدیل اثرات نامطلوب انواع تنش‌های زنده و غیرزنده و بهبود ویژگی‌های خاک می‌گردد (Vessey, 2003). ازجمله این کودها می‌توان به کودهای زیستی حاوی قارچ‌های میکوریزی(Marschner & Dell, 1994; Rejali, 2005) و باکتری‌های حل‌کننده اشکال نامحلول فسفر و روی اشاره نمود (Sarathambalm *et al.*, 2010). قارچ‌های میکوریزی و باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه مثل باکتری *Azotobacter* و*Pseudomonas* توان افزایش رشد گیاه و جذب عناصر غذایی، به‌ویژه زمانی که با هم مصرف می‌شوند را دارند (Smith & Read, 2008). باکتری‌های حل‌کننده روی[2]

*نویسنده مسئول: تلفن همراه: ۰۹۱۳۳۸۲۲۶۶۵، m.mohamadi@areeo.ac.ir

[2] Zinc solubilizing bacteria

یکی از راهکارهای مفید در آزادکردن روی از ترکیبات نامحلول روی در خاک‌های آهکی و قلیایی می‌باشند (Abbas-Zade; Sarathambalm *et al.*, 2010 *et al.*, 2012).

لوبیا با داشتن ارزش غذایی بالا دارای یک‌سری ویژگی‌های نامطلوب تغذیه‌ای[1] می‌باشد که باعث کاهش ارزش غذایی آن می‌شوند. مهم‌ترین این فاکتورها، اسید فیتیک (میو اینوزیتول هگزافسفات)، اسید فنلیک، تانن، لکتین، فلاونوئیدها و بازدارنده‌های تریپسین[2] می‌باشند (Xu & Chang, 2008; Campion *et al.*, 2013). اسید فیتیک شکل اصلی ذخیره فسفات در دانه غلات و حبوبات است (Coelho & Benedito 2008; Kaya *et al.*, 2009). با وجود بالابودن میزان عناصر معدنی آهن، روی، کلسیم و منیزیم در لوبیا، اما قابلیت جذب و استفادهٔ این عناصر به‌دلیل ایجاد نمک فیتات به‌شدت کاهش می‌یابد (Cakmak *et al.*, 2010; Malakouti, 2011; Coelho & Benedito, 2008). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که رابطه مستقیمی بین میزان جذب فسفر از خاک و غلظت اسید فیتیک و رابطه غیرمستقیمی بین فراهمی روی در خاک و افزایش مقدار آن در دانه با غلظت اسید فیتیک وجود دارد(Balakrishnan & Subramanian, 2012; Motashare-zade & Savaghebi, 2012). کوددهی روی باعث افزایش غلظت روی دانه و کاهش نسبت مولی اسید فیتیک به روی در ژنوتیپ‌های مختلف نخود شده است (Kaya *et al* ., 2009). همزیستی میکوریزی از طریق افزایش کلونیزاسیون ریشه، ترشح ترکیبات سیدروفوری، افزایش تولید اسیدهای کلات‌کننده آهن و روی نظیر اسید موجنئیک[3] باعث اسیدی‌کردن ریزوسفر و آزادسازی روی نامحلول و روی شدید پیوندیافته در کنار انتقال از طریق هیف قارچی می‌گردد و به‌واسطه افزایش میزان روی دانه، غلظت اسید فیتیک کاهش پیدا می‌کند (Subramanian *et al*. 2009).

فلاونوئیدها و اسیدهای فنلیک از عمده ترکیبات فنلیکی موجود در گیاه می‌باشند. اسید فنلیک باعث ایجاد طعم نامطلوب، کاهش جذب مواد غذایی و کاهش هضم فیبر و پروتئین می‌شود (Khattab & Arntfield, 2009; Xu & Chang, 2008). این اسید قابلیت ترکیب‌شدن با دیگر ترکیبات از قبیل کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها را دارد (Saharan *et al.*, 2002). مطالعات نشان می‌دهند مقدار فنل کل در لوبیاهای پوست تیره از لوبیاهای پوست روشن بیشتر است (Takahashi *et al.*, 2005). تحقیقات نشان می‌دهد با مصرف کودهای زیستی حاوی سوش‌های *Bradyrhizobium japonicum*، باکتری‌های حل‌کننده فسفات *Bacillus megaterium* var. phosphaticum، *Azospirillum* spp. و *Psudomonas* spp. در سویا غلظت روی و فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها افزایش و میزان ترکیبات فنلی کاهش پیدا می‌کند (Hanan *et al.*, 2008). بررسی‌ها در باقلا نشان می‌دهد که بیشترین رشد و کمترین میزان فنل کل در نتیجه کاربرد کودهای زیستی حاوی میکروارگانیسم‌های *Rhizobium leguminosarum var.faba* و *Aphanocapsu dlbida* و *Laurencia obtuse* به‌دست آمده است (Farfour, 2013 & Hamouda). تانن‌ها موادی با وزن مولکولی بالا می‌باشند که با داشتن تعداد قابل‌ملاحظه‌ای گروه هیدروکسیل فنلیک پیوند قوی با پروتئین، پلی‌ساکاریدها و سایر ماکرومولکول‌ها تشکیل می‌دهند (Aura *et al.*, 2010). غلظت تانن همبستگی معنی‌داری با رنگدانه‌های موجود در پوسته بذر دارد (Caldas & Blair, 2009). بازدارنده‌های تریپسین از شناخته‌ترین مواد بازدارنده پروتئازها می‌باشند و حضور آن‌ها در رژیم غذایی منجر به تشکیل کمپلکس غیرقابل‌برگشت آنزیم تریپسین بازدارنده تریپسین می‌گردد. این کمپلکس باعث کاهش تریپسین در روده و کاهش قابلیت هضم پروتئین موجود در رژیم غذایی می‌شود. این بازدارنده‌ها، رهاسازی اسیدآمینه ضروری مثل متیونین را کاهش می‌دهند (Gupta *et al.*, 2000). بازدارنده‌های تریپسین موجود در لگوم‌ها مانع هیدرولیز پروتئین به آمینواسید شده و به‌خصوص هنگامی‌که لگوم‌ها پخته می‌شوند دارای اثرات مخربی هستند. این بازدارنده‌ها به‌میزان معنی‌داری باعث کاهش قابلیت هضم و استفاده از اسیدهای آمینه می‌شوند (Umeta *et al.*, 2005; Khattab & Arntfield, 2009). مقدار این بازدارنده‌ها در لوبیای سفید و سیاه به‌ترتیب به‌میزان ۴/۱۳ و ۴/۳۷ واحد تریپسین در هر میلی‌گرم بذر گزارش شده است (Machado& Sangronis, 2007). کاهش و حذف صفات نامطلوب تغذیه‌ای برای بهبود کیفیت تغذیه‌ای لوبیا و سهولت استفاده از آن در رژیم غذایی ضرورت دارد. روش‌های مختلفی از قبیل حرارت‌دهی، خیساندن در آب، جوشاندن و جوانه‌دارکردن برای ازبین‌بردن ترکیبات ضدتغذیه‌ای استفاده می‌شود که همگی درمراحل بعد از برداشت محصول می‌باشد (Baojin *et al.*, 2009). اما بر روی روش‌های زراعی و زیستی کاهش‌دهنده این صفات قبل از برداشت محصول تحقیقات چندانی صورت نگرفته است. مطالعات نشان می‌دهد همه این ترکیبات به‌طور کامل توسط روش‌های فوق از بین نمی‌روند (Baojin *et al.*, 2009).

[1] Antiutritional factors

[2] Trypsin inhibitors

[3] Mugineic acid

بررسی‌ها نشان می‌دهد ۸۵درصد از اسید فنلیک بعد از پخته شدن باقی می‌ماند (Luthria & Pastor-Corrales, 2006). با توجه به مطالب ذکرشده و اهمیت موضوع، این تحقیق در راستای افزایش عملکرد کمی و کیفی لوبیا با هدف بررسی اثرات کاربرد کودهای زیستی فسفاتی و روی در مقیاس مزرعه ای بر کاهش ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای در دو رقم لوبیاچیتی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در اراضی لوبیاکاری بخش کیار استان چهارمحال و بختیاری واقع در کیلومتر ۴۵ جنوب شرقی شهرکرد با ۲۰۹۶متر ارتفاع از سطح دریا و مختصات جغرافیایی ۳۲درجه و۲۰دقیقه عرض شمالی و ۵۱ درجه و ۱۷دقیقه طول شرقی انجام شد. رده‌بندی خاک این منطقه Fine, mixed, mesic, Typic Calcixerepts بود (Mohammadi, 1986). فاکتورهای این آزمایش عبارت بودند از: فاکتور اول ارقام لوبیاچیتی شامل C_1: تلاش و C_2: صدری؛ فاکتور دوم کاربرد فسفر در چهار سطح P_0: شاهد، P_1: استفاده از کود شیمیایی سوپرفسفات تریپل بر اساس آزمون خاک، P_2: استفاده از کود زیستی فسفاتی و مصرف ۵۰درصد کود سوپر فسفات تریپل بر اساس آزمون خاک و P_3: استفاده از کود زیستی فسفاتی؛ فاکتور سوم کاربرد روی در سه سطح شامل Zn_0: شاهد، Zn_1: استفاده از کود شیمیایی سولفات روی مطابق آزمون خاک و Zn_2: استفاده از کود زیستی حاوی روی بود. تیمار کود زیستی فسفاتی مورد استفاده شامل مایه تلقیح حاوی باکتری حل‌کننده فسفات از جنس *Azotobacter chroococcum strain 5* و سه گونه قارچ میکوریزا *Glomus etunicatum*، *Glomus intraradices* و *Glomus mosseae* بود. کود زیستی روی حاوی باکتری‌هایی از جنس *Pseudomonas aeruginosa strain MPFM* و *Pseudomonas fluorescens strain 187* بود. در هر بلوک آزمایشی ۲۴کرت آزمایشی ایجاد شد. تیمارها به‌صورت تصادفی در کرت‌ها و بلوک‌ها اختصاص داده شدند. قبل از اجرای آزمایش نمونه مرکب خاک از عمق صفر-۳۰سانتی‌متری تهیه و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن در آزمایشگاه تعیین شد (جدول۱).

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

Table 1. Soil chemical and physical characteristics of the research site

Depth عمق	Sand شن	Silt سیلت	Clay رس	TNV مواد خنثی شونده	OC کربن آلی	N نیتروژن	Cu مس	Mn منگنز	Zn روی	Fe آهن	K پتاسیم	P فسفر	pH	EC هدایت هیدرولیکی
Cm				(%)			(mg Kg^{-1})							(dS m^{-1})
0-30	20	54	26	24.5	0.92	0.073	0.93	8.96	0.58	4.11	311	6	7.81	0.88

خاک مزرعه دارای بافت لوم سیلتی و فاقد محدودیت شوری بود و با توجه به بالاتربودن غلظت پتاسیم و منگنز قابل استفاده نسبت به حد بحرانی، نیازی به مصرف کودهای پتاسیمی و منگنزی نبود. این خاک از نظر فسفر و روی قابل‌جذب در زیر حد بحرانی قرار داشت (جدول ۱). پس از آماده‌سازی قطعه زمین، کشت محصول به‌صورت خطی کشت به‌صورت خطی با فاصله بین دو ردیف ۵۰ و فاصله دو بوته روی ردیف ۱۰سانتی‌متر در تاریخ ۱۳خردادماه ۱۳۹۲ انجام گرفت. هر کرت آزمایشی (به ابعاد ۱۲=۴×۳ مترمربع) شامل شش خط به طول چهار متر و دو خط به‌صورت نکاشت درنظر گرفته شد. کشت بر روی خطوط به‌صورت دستی و به روش هیرم‌کاری انجام شد. کودهای فسفر (سوپرفسفات تریپل) به‌میزان ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار در تیمار P_1 و ۵۰کیلوگرم در هکتار در تیمار P_2، روی (سولفات روی) به‌میزان ۵۰کیلوگرم در هکتار در تیمار Zn_1 و اوره ۵۰کیلوگرم در هکتار قبل از کاشت مصرف شدند. نحوه مصرف کودهای کاربردی به‌صورت مصرف خاکی و مخلوط نمودن با خاک سطحی بود. بذور مورد استفاده در این آزمایش از مرکز تحقیقات ملی لوبیا (ایستگاه تحقیقات کشاورزی خمین استان مرکزی) و مایه‌های تلقیح و کودهای زیستی از بخش تحقیقات بیولوژی خاک مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور تهیه شد. کود زیستی فسفاتی شامل قارچ‌های میکوریزی (با جمعیت ۶۰ اسپور در هر گرم) و باکتری‌های حل‌کننده فسفات از جنس *Azotobacter* حاوی ۱۰^{۸} × ۱/۸سلول باکتری در هر گرم بود. به ازای هر بذر مقدار دو گرم از این کود در چاله کاشت زیر بذر قرار گرفت. در مورد کود زیستی روی، بذرها قبل از کشت با مایهٔ تلقیح حاوی باکتری‌های حل‌کننده اشکال کم‌محلول روی از جنس *Pseudomonas* با تراکم جمعیت ۱۰^{۸}× ۲/۳باکتری در هر گرم با نسبت پنج درصد تلقیح شدند

(بذر مال). به‌منظور چسبندگی بهتر سلول‌های باکتری بر روی بذرها از محلول صمغ عربی استفاده شد. بعد از اندکی خشک شدن سطوح بذور در هوا بلافاصله اقدام به کشت شد. در طول فصل رشد مراقبت‌های زراعی لازم شامل آبیاری، مبارزه با علف های‌هرز، آفات و بیماری‌ها به‌طور یکنواخت برای همه تیمارها اعمال شد. در پایان فصل رشد برداشت محصول با حذف دو خط کناری و نیم‌متر از ابتدا و انتها در سطح شش مترمربع انجام و پس از اندازه‌گیری عملکرد، دانه‌ها آسیاب شدند و از الک ۶۰مشی عبور داده شدند و برای اندازه‌گیری خصوصیات کیفی نامطلوب آماده گردیدند.

آماده‌سازی نمونه

برای آماده‌سازی نمونه، ابتدا بذور توسط آسیاب پودر گردیدند و از الک با اندازه ۶۰مش عبور داده شدند و در یخچال جهت اندازه‌گیری خصوصیات کیفی نامطلوب تغذیه‌ای نگهداری گردیدند.

اسید فیتیک

میزان اسید فیتیک دانه به روش Haug & Lantzsch (1983) اندازه‌گیری شد. اساس این روش بر مبنای رسوب فیتات آهن و اندازه‌گیری آهن باقیمانده در محلول می‌باشد. بدین‌منظور نیم‌گرم بذر آسیاب شده لوبیا با ۲۵۰میلی‌لیتر اسید کلریدریک (pH=۳) به‌مدت سه ساعت عصاره‌گیری شد و با استفاده از آب‌مقطر به حجم ۵۰میلی‌لیتر رسانده شد. سپس یک میلی‌لیتر از این عصاره به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل شده و یک میلی‌لیتر از محلول آهن فریک به آن اضافه گردید. لوله‌های مورد آزمایش روی پایه‌ای مناسب روی حمام آب گرم ثابت شده و به‌مدت ۳۰دقیقه در حمام آب جوش نگهداری شدند. پس از اتمام این دوره و سردشدن لوله‌ها و رسیدن به دمای اتاق، محتوای لوله‌ها مخلوط و در دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در ادامه یک میلی‌لیتر از محلول صاف‌شده رویی به لوله دیگری منتقل شده و با افزودن ۱/۵ میلی‌لیتر محلول بی‌پیریدین به نمونه‌ها جذب نوری در طول‌موج ۵۱۹نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج (مدل Shimadzu UV 3100) قرائت شد.

اسید فنلیک و تانن

برای اندازه‌گیری این دو ویژگی کیفی ابتدا آماده‌سازی نمونه به روش Xu & Chang (2008) انجام شد. در این روش ابتدا ۲۰۰میلی‌گرم از نمونه پودرشده در تیوب سانتریفیوژ یا لوله آزمایش ریخته و ۱۰میلی‌لیتر محلول استن-آب‌مقطر اسید استیک با نسبت حجمی ۷۰- ۲۹/۵- ۰/۵ بر روی آن ریخته و به‌مدت سه ساعت نمونه‌ها شیک شد. در ادامه نمونه به‌مدت ۱۲ساعت در تاریکی نگه داشته و قبل از سانتریفیوژ مرحله دوم نمونه به‌مدت ۱۰دقیقه در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد گذاشته شد و در ادامه نمونه‌ها برای بار دوم به‌مدت ۱۵دقیقه سانتریفیوژ شده و عصاره صاف‌شده استحصالی در یخچال نگهداری شد. اندازه‌گیری اسید فنلیک به روش فولین-سیوکالتو[۱] بر اساس قطبیت گروه‌های هیدروکسیل فنلی که قدرت احیاءکنندگی زیادی دارند، انجام شد (Makkar *et al.*, 1993). در این روش از اسید گالیک[۲] به‌عنوان استاندارد استفاده شد. برای این کار محلول فولین‌سیوکالتو و کربنات سدیم هفت درصد به عصاره استخراجی اضافه شده و در ادامه جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵نانومتر قرائت گردید. غلظت اسید فنلیک بر اساس معادل میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم نمونه[۳] بیان می‌شود. تانن از روش Makkar *et al.*, (1993) با استفاده از پلی‌وینیل‌پلی پیرولیدون[۴] (PVPP) اندازه‌گیری شد. این ماده شیمیایی با تانن واکنش داده و آن را رسوب می‌دهد. جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۷۶۵نانومتر قرائت گردید. در این روش ابتدا میزان ترکیبات تاننی غیرفنل اندازه‌گیری شد و از میزان ترکیبات فنلی کم شد تا میزان تانن به‌دست آید. واحد بیان‌کننده تانن نیز مانند اسید فنلیک برحسب معادل میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم نمونه است.

بازدارنده‌های تریپسین

این بازدارنده‌ها به روش Kakade *et al*, (1974) اندازه‌گیری شدند. در این روش فعالیت بازدارنده‌های تریپسین به‌طور غیرمستقیم از طریق متوقف‌کردن فعالیت تریپسین اندازه‌گیری شد. در این روش یک ماده سنتزی به‌نام BAPNA[۵] مورد استفاده قرار گرفت که به‌وسیله تریپسین هیدرولیز شده و تولید ماده زردرنگ نیتروآنیلید[۶] می‌نماید. میزان توقف در عصاره از طریق قرائت دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۴۱۰نانومتر به‌عنوان فعالیت بازدارنده‌های تریپسین

[۱] Folin - Ciocalteu

[۲] Gallic Acid

[۳] mg GAE g-1 sample

[۴] polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)

[۵] Benzoyl-Dl-arginine-para-nitroanilide hydrochloric (BAPNA)

[۶] P-nitroanilide

شناخته می‌شود. بیان نتایج بر حسب میلی‌گرم تریپسین خالص متوقف شده[1] در هر گرم بذر است.

داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS(9.2) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چنددامنه ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

اسید فیتیک

در این آزمایش، اختلاف معنی‌داری در میزان اسید فیتیک دو رقم مورد استفاده مشاهده نشد (جدول۲). مقدار اسید فیتیک در رقم تلاش و صدری به‌ترتیب ۴/۵۶ و ۵/۴۶گرم در کیلوگرم بود (جدول ۳). تیمار فسفری بر میزان اسید فیتیک تأثیر معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۵$) داشت. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد بیشترین میزان اسید فیتیک در نتیجه کاربرد تیمارP_1 به‌میزان ۵/۷۵گرم در کیلوگرم به‌دست آمد که نسبت به تیمار شاهد ۱۷درصد افزایش را نشان داد. بررسی‌ها نشان می‌دهد با مصرف کود فسفاتی میزان اسید فیتیک افزایش پیدا می‌کند (Malakouti, 2011). در این آزمایش با مصرف کودهای شیمیایی فسفاتی، فسفر دانه و میزان اسید فیتیک افزایش پیدا می‌کند. این نتیجه با نتایج بررسی‌های Kaya *et al*, (2009) و Motashare-Zade & Savaghebi (2012) مطابقت دارد. تیمار روی باعث تفاوت معنی‌دار بر میزان اسید فیتیک دانه شد ($P \leq ۰/۰۱$) (جدول۲). کمترین میزان اسید فیتیک از تیمار Zn_2 به‌میزان ۴/۹۲گرم در کیلوگرم به‌دست آمد که با Zn_1 در یک گروه مشترک آماری قرار گرفتند و نسبت به تیمار شاهد (Zn_0) ۱۳درصد کاهش را نشان داد (جدول۳). از بین اثرات متقابل، اثرات متقابل فسفر با روی و رقم با روی بر میزان اسید فیتیک معنی‌دار شدند (جدول ۱). کمترین میزان اسید فیتیک از P_2Zn_1 به‌میزان ۳/۹۰گرم در کیلوگرم به‌دست آمد که در مقایسه با تیمار P_1Zn_0 با ۶/۶۶گرم در کیلوگرم اسید فیتیک، ۴۲درصد کاهش را نشان داد (جدول۴). در خصوص اثر متقابل رقم با روی بیشترین و کمترین میزان اسید فیتیک از تیمارهای C_2Zn_0 و C_1Zn_1 به‌ترتیب به‌میزان ۵/۹۲ و ۴/۱۰گرم در کیلوگرم به‌دست آمد. در این تحقیق کاهش مقدار اسید فیتیک دانه به‌دلیل افزایش میزان روی دانه با مصرف کود شیمیایی سولفات روی (تیمار Zn_1) و آزادسازی و افزایش جذب روی با مصرف تیمار زیستی روی (تیمار Zn_2) می‌باشد. این نتیجه با نتایج تحقیقات Motashare-Zade & Savaghebi (2012) و Balakrishnan & Subramanian (2012) مطابقت دارد. Ryan *et al*, (2008) گزارش نمودند در ژنوتیپ‌های مختلف گندم با مصرف کود فسفری به‌طور متوسط ۳۶درصد کاهش در غلظت روی، ۱۷درصد افزایش در غلظت فسفر و ۱۹درصد افرایش در میزان اسید فیتیک دانه مشاهده می‌شود. Erdal *et al*, (2002) با تحقیق بر روی ۲۰رقم گندم در ترکیه گزارش نمودند که در شرایط کمبود روی، غلظت روی دانه ۷-۱۱میلی‌گرم در کیلوگرم بود که با مصرف تیمار کود روی، به‌میزان ۲۳-۱۴میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش پیدا کرد. در ضمن با کاربرد روی، غلظت فسفر از ۰/۳۹درصد به ۰/۳۵درصد و غلظت اسید فیتیک از ۱۰/۷ به ۱۰/۱میلی‌گرم درگرم کاهش پیدا کرد. بررسی‌های Balakrishnan & Subramanian (2012) در ذرت نشان داد که همزیستی میکوریزی باعث تولید دانه‌هایی با ۱۵-۱۰درصد غلظت بیشتر آهن و روی نسبت به تیمار شاهد شد و غلظت اسید فیتیک را به‌میزان ۱۰درصد کاهش داد. باکتری‌های حل‌کننده روی توانایی انحلال روی را از منابع نامحلول و کم‌محلول روی توسط مکانیسم‌های مختلفی از قبیل افزایش میزان پروتون و کاهش pH، تولید اسیدهای آلی مانند اسید گلوکونیک و مخصوصاً اسید دوکتوگلوکونیک و ترشح مواد کلات‌کننده و سیدروفور، تولید اسیدهای معدنی مانند اسید سولفوریک، نیتریک و کربنیک و تولید هورمون اکسین به‌صورت محلول دارا می‌باشند (Marschner & Dell, 1994; Shahab & Ahmed, 2008; Abbaszade).

از دلایل کاهش میزان اسید فیتیک در تیمارهای زیستی افزایش آزادسازی، جذب و انتقال روی در داخل گیاه و در تیمارهای مصرف روی فراهمی و تأمین نیاز روی گیاه و اثر ضدیتی[2] روی با فسفر می‌باشد. با افزایش غلظت روی، جذب فسفر کاهش یافته و باعث کاهش غلظت اسید فیتیک نیز می‌گردد. از راه‌های اساسی در برطرف‌کردن سوءتغذیه ناشی از کمبود آهن و روی، افزایش مقدار این عناصر در غلات و حبوبات و یا افزایش جذب آهن و روی از طریق کاهش مقدار اسید فیتیک، ترکیبات فنلی، تانن و لکتین می‌باشد (Welch, 2002).

اسید فنلیک

طبق نتایج جدول تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری در میانگین غلظت اسید فنلیک در ارقام مورد مطالعه مشاهده نگردید (جدول ۲). مقدار این اسید در رقم تلاش۵/۶۷ و در رقم صدری۵/۴۷میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه[3] بود (جدول ۲).

[1] mg TI g-1 sample

[2] Antagonistic

[3] mgGAE g-1seed

میزان اسید فنلیک در رقم صدری ۴/۵درصد کمتر از رقم تلاش بود. بررسی‌ها نشان می‌دهد که مقدار ترکیبات فنلی با توجه به نوع ژنوتیپ لوبیا متغیر است و مقدار این ترکیبات در لوبیاهای سیاه و پوست تیره از لوبیاهای با رنگ روشن بیشتر است (Heimler *et al.*, 2005). تیمار فسفری باعث ایجاد تفاوت معنی‌دار ($P \leq ۰/۰۱$) در مقداراسید فنلیک شد، به‌طوری‌که کمترین مقدار در نتیجه تیمار P_2 به‌میزان ۴/۲۸میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه به‌دست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد، ۳۵درصد کاهش را نشان داد (جدول ۳).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تأثیر استفاده از کودهای زیستی فسفاتی و روی بر ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای در دو رقم لوبیا
Table 2. Analysis of variance of the effects of phosphate and Zn bio-fertilizer on the antinutritional factors of two cultivars of bean

منابع تغییرات (Source of variance)	درجه آزادی(Df)	میانگین مربعات (Mean of squares)			
		اسید فیتیک Phytic Acid	اسید فنلیک Phenolic Acid	تانن Tannin	بازدارنده‌های تریپسین Trypsin Inhibitors
رقم(Cultivar)	1	14.4 ns	0.75 ns	0.1 ns	0.3 ns
تکرار (رقم)(Replication) (Cultivar)	4	4.1	20	8	22.8
فسفر(Phosphorus) (A)	3	6*	20**	16**	10.7**
روی(Zinc) (B)	2	0.14**	7.6**	7**	9.3**
فسفر × روی (A×B)	6	3.7*	2.8*	1.7*	0.7 ns
رقم × فسفر(Cultivar×A)	3	2.1 ns	0.4 ns	0.3 ns	0.2 ns
رقم × روی (Cultivar×B)	2	18.7**	3*	2 ns	0.1 ns
رقم × فسفر × روی (Cultivar×A×B)	6	3 ns	1.6 ns	2*	0.8 ns
خطا(Error)	4	1.6	0.8	0.7	0.4
کل(Total)	71				
ضریب تغییرات (درصد) (CV%)		4.8	12.7	11	9.5

ns و * و ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد.

ns, * and **: Non significant and significant $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$ respectively.

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای فسفری و روی بر ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای در دانه دو رقم لوبیاچیتی
Table 3. Mean comparison of phosphate and Zn bio-fertilizers simple effects on the antinutritional factors of two cultivars of bean

رقم (Cultivar)	اسید فیتیک Phytic Acid	اسید فنلیک Phenolic Acid	تانن Tannin	بازدارنده‌های تریپسین Trypsin Inhibitors
	گرم در کیلوگرم	میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه		میلی‌گرم تریپسین در گرم دانه
	(g kg^{-1})	(mg GA g^{-1} Seed)		(mg Tryp g^{-1} Seed)
C_1- تلاش (Talash)	4.56a	5.67a	4.34a	6.60a
C_2-صدری (Sadri)	5.46a	5.47a	4.42a	6.47a
P_0	4.91ab	6.57a	5.28a	7.24a
P_1	5.75a	6.29a	5.0ba	6.91ab
P_2	4.35b	4.28c	3.28c	5.46b
P_3	5.04b	5.15b	3.91b	6.52b
Zn_0	5.68a	6.18a	4.94a	7.24a
Zn_1	5.07b	5.47b	4.32b	6.30b
Zn_2	4.92b	5.0b	3.87b	6.10b

در هر ستون میانگین‌هایی که در هر قسمت حداقل در یک حرف مشترک هستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

C_1:رقم تلاش، C_2:رقم صدری، P_0: شاهد، P_1: مصرف ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار سوپر فسفات تریپل، P_2: مصرف ۵۰ کیلوگرم در هکتار سوپر فسفات تریپل به همراه کود زیستی فسفاتی، P_3: مصرف کود زیستی فسفاتی، Zn_0: شاهد، Zn_1: مصرف ۵۰ کیلوگرم در هکتار سولفات روی و Zn_2: کود زیستی روی

Means in each column and part by a different letter are significantly different ($P \leq 0.05$) by Duncan's Multiple range test.

C_1: Talash cultivar, C_2: Sadri cultivar, P_0: Blank, P_1: Use of 100 kg ha^{-1} TSP, P_2: Use of 50 kg ha^{-1} TSP + Phosphate bio-fertilizer P_3: Use of phosphate bio-fertilizer, Zn_0: Control, Zn_1: 50 kg ha^{-1} $ZnSO_47H_2O$, and Zn_3: Use of Zn bio-fertilizer

تیمار روی بر این ویژگی در سطح یک درصد تفاوت معنی‌دار ($P \leq$۰/۰۱) نشان داد. کمترین مقدار اسید فنلیک به‌میزان پنج میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه از تیمار Zn_2 حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد (Zn_0)با ۶/۱۸ میلی‌گرم اسید گالیک ۲۴درصد کاهش را نشان داد (جدول ۳). اثر متقابل تیمارهای فسفر با روی بر این صفت معنی‌دار شد ($P \leq$۰/۰۵) (جدول ۲). حداقل مقدار این صفت از تیمار P_2Zn_1 به‌میزان ۳/۱۳میلی‌گرم اسید گالیک در هر گرم دانه به‌دست آمد که نسبت به تیمار شاهد، ۱۲۷درصد کاهش را نشان داد (جدول ۴). این کاهش در اسید فنلیک از تیمار Zn_2 می‌تواند ناشی از آزادسازی روی به‌دلیل استفاده از باکتری‌های آزادکننده روی باشد (Marschner & Dell, 1994; Abbaszade *et al*., 2012 ;Shahab & Ahmed, 2008). این نتیجه با نتایج Aura *et al*, (2010) و Cárdenas *et al*, (2010) در لوبیا مطابقت دارد. این محققان نشان دادند که در بذرهای لوبیا تولیدی با استفاده از کودهای زیستی غلظت ترکیبات فنلی و فلاونوئیدهای کل در مقایسه با بذرهای تولیدی با مصرف کود شیمیایی کمتر است. همچنین با مصرف کودهای زیستی غلظت آنتی‌اکسیدانت‌ها افزایش پیدا می‌کند. بررسی‌های Chong *et al*, (2007) نشان داد در شرایط کمبود آهن و روی، غلظت ترکیبات فنلی در شبدر افزایش پیدا کرد. اسید فنلیک به‌دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیلی با کاتیون‌های دوظرفیتی عمدتاً آهن و روی تشکیل کلات داده و منجر به کاهش قابلیت دسترسی به این عناصر می گردند و با کاهش غلظت روی و آهن در دانه، غلظت اسید فنلیک افزایش پیدا می‌کند (Hanan *et al*., 2008;Cárdenas *et al*., 2010). قارچ‌های میکوریزی نقش مهمی در تأمین عناصر با تحرک پایین در خاک از قبیل فسفر، روی و مس دارند (Smith & Read, 2008 ; Rejali, 2005).

جدول ۴- تأثیر تیمارهای آزمایشی بر ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای و گروه‌بندی میانگین‌ها

Table 4. Effect of experiment treatments on the antinutritional factors and mean groups

بازدارنده‌های تریپسین Trypsin Inhibitors	تانن Tannin	اسید فنلیک Phenolic Acid	اسید فیتیک Phytic Acid	تیمار (Treatment)
میلی‌گرم تریپسین در گرم دانه	میلی‌گرم اسید گالیک گرم دانه		گرم در کیلوگرم	
(mg Tryp g^{-1} Seed)	(mgGA g^{-1} Seed)		(g kg^{-1})	
8.00a	5.70a	7.10a	4.56cd	P_0Zn_0
6.91a	5.44ab	6.70b	4.74cd	P_0Zn_1
6.81a	4.70b	5.91b	5.42c	P_0Zn_2
7.31a	5.09ab	6.23b	6.66a	P_1Zn_0
6.68a	5.22ab	6.73ab	6.21b	P_1Zn_1
6.74a	4.80b	5.91b	4.38cd	P_1Zn_2
6.66a	4.34bc	5.45bc	4.33cd	P_2Zn_0
5.03a	2.45d	3.13d	3.90d	P_2Zn_1
4.70a	3.05cd	4.28cd	4.21cd	P_2Zn_2
7.00a	4.63ab	5.95b	5.07bc	P_3Zn_0
6.59a	4.18bc	5.34bc	5.00bc	P_3Zn_1
6.00a	2.93cd	4.15cd	5.06bc	P_3Zn_2

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

C_1:رقم تلاش، C_2:رقم صدری، P_0: شاهد، P_1: مصرف ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار سوپر فسفات تریپل، P_2: مصرف ۵۰ کیلوگرم در هکتار سوپر فسفات تریپل به همراه کود زیستی فسفاتی، P_3: مصرف کود زیستی فسفاتی، Zn_0: شاهد، Zn_1: مصرف ۵۰ کیلوگرم در هکتار سولفات روی و Zn_2: کود زیستی روی

Means in each column by a different letter are significantly different ($P \leq 0.05$) by Duncan's Multiple range test.

C_1: Talash cultivar, C_2: Sadri cultivar, P_0: Blank, P_1: Use of 100 kg ha^{-1} TSP, P_2: Use of 50 kg ha^{-1} TSP + Phosphate bio-fertilizer P_3: Use of phosphate bio-fertilizer, Zn_0: Control, Zn_1: 50 kg ha^{-1} $ZnSO_47H_2O$, and Zn_3: Use of Zn bio-fertilizer

مطالعات Marschner & Dell (1994) نشان می‌دهد حدود ۲۵درصد از روی گیاه میزبان از همزیستی گیاهان با قارچ‌های میکوریزی تأمین می‌شود. افزایش جذب آهن و روی در دانه در اثر استفاده از کودهای زیستی فسفاتی در نتایج تحقیقات متعددی گزارش شده است (Subramanian *et al*., 2009; Sarathambalm ;*et al*., 2010; Mohammadi *et al*., 2015). این افزایش می‌تواند ناشی از انتقال توسط هیف قارچی، اسیدی‌شدن ریزوسفر، تولید سیدروفورهای آهن و روی و بهبود شرایط کلات نمودن و افزایش فراهمی این دو عنصر

باشد. باکتری‌های سودوموناس می‌توانند با ترشح سیدروفورها، هورمون‌های گیاهی، ترکیبات با وزن مولکولی پایین و برخی آنزیم‌ها به افزایش جذب آهن و روی در دانه کمک می‌کنند (Abbaszade *et al*., 2012; Shahab & Ahmed, 2008; Sarathambalm *et al*., 2010). کاهش نسبی در غلظت اسید فنلیک در نتیجه کاربرد تیمارهای زیستی حاوی روی، می‌تواند به‌دلیل نقش آن‌ها در افزایش رشد گیاه و بهبود شرایط غنی‌سازی زیستی عناصر غذایی کاهش‌دهنده ترکیبات فنلی مانند آهن و روی باشد. در این تحقیق با افزایش غلظت آهن و روی در دانه غلظت اسید فنلیک کاهش یافت.

تانن

بین دو رقم استفاده‌شده در این تحقیق اختلاف معنی‌داری در غلظت تانن مشاهده نشد (جدول ۲). میزان تانن در رقم تلاش و صدری ۴/۳ و ۴/۴میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه بود (جدول۳). اثرات تیمار فسفر، روی و اثر متقابل رقم در فسفر و رقم در روی در سطح یک درصد ($P \leq ۰/۰۱$) و اثرات متقابل فسفر در روی و رقم در فسفر در روی در سطح پنج درصد ($P \leq ۰/۰۵$) بر این صفت معنی‌دار شدند (جدول۲). تیمار فسفر باعث ایجاد تفاوت معنی‌دار در مقدار تانن شد، به‌طوری‌که حداقل مقدار تانن از تیمار P_2 به‌میزان۳/۳ به‌دست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد، ۳۷/۷درصد کاهش را نشان داد (جدول۳). کمترین مقدار تانن به‌میزان ۳/۸۷میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه از تیمار Zn_2 به‌دست آمد که نسبت به تیمار شاهد ۲۲درصد کاهش داشت (جدول۳). حداقل مقدار تانن در نتیجه کاربرد تیمار P_2Zn_1 به‌میزان ۲/۴۵میلی‌گرم اسید گالیک در گرم دانه حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد ۵۷درصد کاهش را نشان داد (جدول ۴). مقدار تانن در بین انواع مختلف لوبیا متفاوت است. در لوبیا این مواد عمدتاً در پوسته بذر قرار دارند و تعیین‌کننده رنگ کلی و طیف غالب رنگی دانه می‌باشند (Caldas & Blair, 2009). غلظت تانن همبستگی معنی‌داری با رنگدانه‌های موجود در پوسته بذر دارد. لوبیاهای با پوست تیره در مقایسه با لوبیاهای با پوست روشن مقدار تانن بیشتری دارند (Aura *et al*., 2010). لوبیاهای قرمز دارای میانگین تانن ۸/۵میلی‌گرم در هر گرم بذر می‌باشند (Aura *et al*., 2010). تانن موجود در لوبیا به‌صورت تانن متراکم می‌باشد. تانن متراکم میل بالایی برای ترکیب با پروتئین از طریق پیوند هیدروژنی دارد و باعث رسوب آنزیم‌های میکروبی و هضمی می‌شود (Saharan *et al*., 2002; Aura *et al*., 2010). بررسی‌های Ariza-Nieto *et al*, (2007) در لوبیا نشان داد که غلظت تانن متراکم تأثیر زیادی بر دسترسی آهن داشته و باعث کاهش فراهمی آن می‌گردد و با افزایش غلظت آهن، میزان آنتی‌اکسیدانت‌ها افزایش و غلظت تانن کاسته می‌شود. غنی‌سازی زیستی[1] باعث افزایش غلظت عناصر غذایی در لوبیا شده و افزایش عناصر غذایی مانند آهن و روی منجر به کاهش فاکتورهای ضدتغذیه‌ای از قبیل تانن‌ها، فیتازها واکسالات‌ها شده و از این طریق فراهمی عناصرغذایی را برای مصرف کننده افزایش می‌دهند (Welch, 2002). تیمارهای زیستی استفاده‌شده در این تحقیق علاوه بر جذب آب، مواد غذایی، بهبود رشد و عملکرد کمی و کیفی گیاه توانستند از طریق افزایش جذب و فرآهمی عناصر آهن و روی به‌طور غیر مستقیم غلظت تانن را کاهش داده و از این طریق بر افزایش کیفیت لوبیا و کاهش ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای تأثیر گذاشتند.

بازدارنده‌های تریپسین

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که میانگین غلظت بازدارنده‌های تریپسین در دو رقم تفاوت معنی‌داری نداشت(جدول ۲). مقدار این بازدارنده در رقم تلاش ۶/۶ و در رقم صدری ۶/۴میلی‌گرم واحد تریپسین در گرم دانه بود (جدول ۳). تیمار فسفری باعث ایجاد تفاوت معنی‌دار در روی در سطح یک درصد ($P \leq ۰/۰۱$) در مقدار این صفت شد، به طوری‌که کمترین میزان از تیمار P_2به‌میزان ۵/۴۶میلی‌گرم تریپسین در گرم دانه به‌دست آمد که در مقایسه باتیمار شاهد ۲۵درصد کاهش را نشان داد و با تیمار P_3 در یک گروه آماری مشترک قرار گرفت (جدول ۳). از دلایل کاهش این ویژگی در تیمارهای زیستی P_2 و P_3 افزایش رشد و بهبود جذب عناصر غذایی از قبیل آهن و روی با مکانیسم‌های منحصربه‌خود می‌باشد (نتایج ارائه نشده‌اند). اثر تیمار روی بر این ویژگی در سطح یک درصد ($P \leq ۰/۰۱$) معنی‌دار شد. کمترین مقدار بازدارنده تریپسین در نتیجه کاربرد تیمار Zn_2 به‌میزان ۶/۱ میلی‌گرم تریپسین در گرم دانه حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد ۱۶درصد کاهش را نشان داد. با وجود کمتربودن میزان بازدارنده تریپسین در تیمار Zn_1، این تیمار با تیمار Zn_2 در یک گروه مشترک آماری قرار گرفتند و تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر شان ندادند (جدول ۳). این کاهش در میزان بازدارنده تریپسین در نتیجه تأثیر تیمارZn_1 ناشی از افزایش جذب روی دانه با تأمین روی مورد نیاز گیاه از طریق افزودن کود سولفات روی به خاک و در تیمار Zn_2 ناشی از آزادسازی روی به‌دلیل استفاده از باکتری‌های آزادکننده روی بود. اثر متقابل مصرف

[1] Bio-enrichment

تیمارهای فسفر و روی بر این خصوصیت معنی‌دار نگردید. مقایسه میانگین‌ها نشان داد کمترین مقدار بازدارنده از تیمار P_2Zn_2 به‌میزان ۴/۷میلی‌گرم تریپسین در گرم دانه حاصل شد که نسبت به شاهد ۴۱درصد کاهش را نشان داد. مصرف کود شیمیایی فسفاتی باعث افزایش میزان فسفر دانه و به‌دلیل اثر رقابتی فسفر با عناصر آهن و روی باعث کاهش مقدار این عناصر و افزایش مقدار بازدارنده تریپسین می‌گردد. اما در تیمارهایی که مقدار روی و آهن افزایش می‌یابد، میزان بازدارنده تریپسین کاهش پیدا می‌کند. برای خنثی‌کردن اثر بازدارنده‌های تریپسین و دیگر خصوصیات کیفی نامطلوب از روش‌های متعدد حرارت‌دهی همچون برشته‌کردن، پختن، جوشاندن در آب، تشعشع با اشعه گاما و مادون قرمز و جوانه‌دار کردن استفاده می‌شود (Khattab & Arntfield, 2009). وضعیت تغذیه مناسب گیاه از نظر عناصر غذایی به‌ویژه عناصری که خاصیت آنتی‌اکسیدانتی می‌باشند مانند آهن و روی باعث کاهش ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای در لوبیا خواهد شد (Ariza-Nieto *et al*., 2007; Cárdenas *et al*., 2010; Khattab &Arntfield, 2009). میکروارگانیسم‌های استفاده‌شده در تیمارهای کودهای زیستی فسفاتی و روی می‌توانند از طریق همزیستی میکوریزی و افزایش کلونیزاسیون ریشه (Rejali, 2005)، ترشح ترکیبات سیدروفوری و تولید اسیدهای آلی و کلات‌کننده (Subramanian *et al*., 2009) باعث افزایش فرآهمی و جذب عناصر غذایی فسفر، نیتروژن، آهن و روی برای گیاه شوند. همچنین ترشح هورمون‌های گیاهی و آنزیم‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه با کاربرد این تیمارها افزایش پیدا خواهد نمود. غنی‌سازی زیستی بذر با روی و آهن که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی می‌باشند، به‌طور غیر مستقیم باعث کاهش ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای و افزایش کیفیت و ارزش غذایی در دو رقم لوبیا مورد مطالعه شد.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که کاربرد کودهای زیستی فسفاتی و روی به‌طور جداگانه و یا به‌صورت ترکیبی سبب کاهش ویژگی‌های کیفی نامطلوب در دو رقم لوبیاچیتی مورد مطالعه شدند. میکروارگانیسم‌های استفاده‌شده در تیمارهای زیستی می‌توانند از طریق همزیستی میکوریزی و افزایش کلونیزاسیون ریشه، ترشح ترکیبات سیدروفوری و تولید اسیدهای کلات‌کننده باعث افزایش فرآهمی و جذب عناصر غذایی فسفر، نیتروژن، آهن و روی برای گیاه شوند. همچنین ترشح هورمون‌های گیاهی و آنزیم‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه با کاربرد این تیمارها افزایش پیدا کرد. غنی‌سازی زیستی بذر با روی و آهن که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی می‌باشند، به‌طور غیرمستقیم باعث کاهش مقدار اسید فیتیک و دیگر ویژگی‌های کیفی نامطلوب تغذیه‌ای در لوبیا شد. در شرایط این تحقیق بهترین تیمار استفاده از مایه تلقیح *Azotobacter* و قارچ‌های میکوریزی به همراه مصرف ۵۰کیلوگرم در هکتار سوپرفسفات تریپل و ۵۰کیلوگرم در هکتار سولفات روی (تیمار P_2Zn_1) بود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه بخش تحقیقات بیولوژی خاک مؤسسه تحقیقات خاک و آب برای دراختیارگذاشتن قارچ‌های میکوریزی و مایه تلقیح‌های مورد نیاز و آقای مهندس فرزان برای کمک در انجام تجزیه‌های آزمایشگاهی سپاسگزاری می‌نماید.

منابع

1. Abbas-Zadeh, P., Ŝavaghebi, G.R., Asadi-Rahmani, H., Rejali, F., Farahbakhsh, M., Motashare-Zaade, B., and Omidvari, M. 2012. The effect of pseudomonas fluorescent on increasing of zinc compounds dissolution and improve its uptake by bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Irannian Journal of Soil Research 26(20): 195-205. (In Persian).
2. Ariza-Nieto, M., Blair, M.W., Welch, R.M., and Glahn, R.P. 2007. Screening of iron bioavailability patterns in eight bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes using the Caco-2 cell in vitro model. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 7950-7956.
3. Aura, M.D., Gina, V.C., and Mathew, W.B. 2010. Concentrations of condensed tannins and anthocyanins in common bean seed coats. Journal of Food Research 43: 595-601.
4. Balakrishnan, N., and Subramanian, K. 2012. Mycorrhizal symbiosis and bioavailability of micronutrients in maize grain. Mydica Journal 57: 129-138.
5. Baojin, X., Sam, K., and Chang, C. 2009. Total Phenolic, Phenolic Acid, Anthocyanin, Flavan-3-ol, and Flavonol Profiles and Antioxidant properties of Pinto and Black Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. Journal of Agricultural Food Chemistry 57: 4754-4764.
6. Cakmak, I., Pfeiffer, W.H., and Mcclafferty, B. 2010. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. Cereal Chemistry 87: 10-2.

7. Caldas, G.V., and Blair, M.W. 2009. Inheritance of condensed tannin content andrelationship with seed color and pattern genes in common bean (*Phaseolusvulgaris* L). Journal of Theoretical and Applied Genetics 119: 131-142.
8. Campion, B., Raymond, P.G., Aldo, T., Domenico, P., Enrico, D., Francesc, S., Roberto, C., Valeria, D., and Erik, N. 2013. Genetic reduction of antinutrients in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed, increases nutrients and in vitro iron bioavailability without depressing main agronomic traits. Field Crops Research 141: 27-37.
9. Cárdenas, L.A., Leonel, J., Costa, M.B., and Reis, F.P. 2010. Zinc bioavailability in different bean as affected by cultivar type and cooking conditions. Journal Food Research 43: 573-581.
10. Chong, W.J., Xiu, X.H., and Shao, J.Z. 2007. The iron-deficiency induced phenolics accumulation may involve in regulation of Fe (III) chelate reductas. Plant Signaling and Behavior 2,5: 327-332.
11. Coelho, C.M.M., and Benedito, V.A. 2008. Seed development and reserve compound accumulation in common been (*Phaseolus vulgaris* L.). Seed Science Biotechnology 2: 42-52.
12. Erdal, I., Yilmaz, A., Taban, S., Eker, S., Torun, B., and Cacmak, I. 2002. Phytic acid and phosphorous concentrations in seeds of wheat cultivars grown with and without zinc fertilization. Journal of Plant Nutrition 25: 113-127.
13. Fageria, N.K., and Santos, A.B. 2008. Yield physiology of dry Bean. Journal of Plant Nutrition 31: 983: 1004.
14. Gupta, P., Dhawan, K., Malhotra, S.P., and Singh, R. 2000. Purification and characterization of trypsin inhibitor from seeds of faba bean (*Vicia faba* L.). Journal of Acta Physiologiae Plantarum 22: 433-438.
15. Hamouda, R., and Farfour, S. 2013. Enhancement the growth and phenolic content of faba bean (*Vicia faba* L.) by applying some biofertilizer agents. Journal of Food Studies 2(2): 20-30.
16. Haug, W., and Lantzsch, H. J. 1983. Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereal products. Journal of Science Food Agriculture 34: 1423-1426.
17. Hanan, A., Taie, A., El-Mergawi, R., and Radwan, S. 2008. Isoflavonoids, Flavonoids, Phenolic Acids Profiles and Antioxidant Activity of soybean seeds as affected by organic and bioorganic fertilization. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environment Science 4: 207-213.
18. Heimler, D., Vignolini, Dini, P.M.G., and 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.
19. Kaya, M., Küçükyumuk, Z., and Erdal, I. 2009. Phytase activity, phytic acid, zinc, phosphorus and protein contents in different chickpea genotypes in relation to nitrogen and zinc fertilization. African Journal of Biotechnology 8: 4508-4513.
20. Kakade, M.L., Rackis, J., McGhee, J.J.E., and Puski, G. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy bean products: a collaborative analysis of an improved procedure. Journal of Cereal Chemistry 51: 376-382.
21. Khattab, R.Y., and Arntfield, SD. 2009. Nutritional quality of legume seeds as affected by some physical treatments 2. Antinutritional factors. Journal of Food Science and Technology 42: 1113-1118.
22. Luthria, D.L., and Pastor-Corrales, M.A. 2006. Phenolic acids profiles of beans commonly consumed in United States. Bean Improvement Cooperative Annual Report 49: 6-7.
23. Makkar, H.P.S., Bluemmel, M., Borowy, N.K., and Becker, K. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. Journal of the Science of Food and Agriculture 61: 161-165.
24. Malakouti, M. J. 2011. Towards improving the quality of consumed breads in Iran: A Review, Iranian Journal Food Science and Technology 8(31): 11-22. (In Persian With English Summery).
25. Marschner, H., and Dell, B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant and Soil 159: 89-102.
26. Mohammadi, M. 1986. Report of soil science of Chaharmahal-Va-Bakhtiari (Shahrekord and Brojen regions). Soil and Water Research, Technical Publication p.: 696 & 239.
27. Mohammadi, M., Malakouti, M.J., Khavazi, K., Rejali, F., and Davoodi, M.H. 2015. The effect of bio-fertilizer and chemical fertilizers (phosphate and zinc) on yield, nutrient concentration and phytic acid/zinc molar ratio of two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Iranian Journal of Soil biology 2(2): 99-110. (In Persian).
28. Motashare-Zadeh, B., and Savaghebi, Gh. R. 2012. The effect of balanced fertilization on nutrients, concentration and phytic acid to zinc molar ratio in Iranian red bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars at different stages of seed development. Iranian Journal of Science and Technology. Greenhouse Culture 3(9): 73-84. (In Persian With English Summary).

29. Rejali, 2005. A brief review on mycorrhiza symbiosis: Part 1: Principales and practices. Agricultural Research and Education Organization. Soil and Water Research Institute. Technical Bulletin No.468, 35 Pages.
30. Ryan, M.H., McInerney, J.K., Record, I.R., and Angus, J.F. 2008. Zinc bioavailability in wheat grain in relation to phosphorus fertilizer, crop sequence and mycorrhizal fungi. Journal of Science Food Agriculture 88: 1208-1216.
31. Saharan, K., Khetarpaul, N., and Bishnoi, S. 2002. Antinutrients and protein digestibility of faba bean and rice bean as affected by soaking, dehulling and germination. Journal of Food Science and Technology 39: 418-422.
32. Sangronis, E., and Machado, C.J 2007. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan.* Journal of LWT 40: 116-120
33. Sarathambalm, C., Thangaraju, M., Paulraj, C., and Gomathy, M. 2010. Assessing the Zinc solubilization ability of Gluconacetobacter diazotrophicus in maize rhizosphere using 65 labelled Zn compounds. Indian Journal of Microbiology 50(1):103-109.
34. Shahab, S., and Ahmed, N. 2008. Effect of various parameters on the efficiency of zinc phosphate solubilization by indigenous bacterial isolates. Africam Journal of Biotechnology 7(10): 1543-1549.
35. Smith, S.E., and Read, D.J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis, Third Ed. Academic Press, London. UK.
36. Subramanian, K.S., Tenshia, V., Jayalakhshmi, K., and Ramachandran, V. 2009. Role of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*)-(fungus aided) in zinc nutrition of maize. Journal of Agriculture Biotechnology Sustainable Development 1: 029-038.
37. Takahashi, R., Ohmori, R., Kiyose, C., Momiyama, Y. Ohsuzu, F., and Kondo, K. 2005. Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprotein oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 4578-4582.
38. Umeta, M., Clive, E.W., and Habtamu, F. 2005. Content of zinc, iron, calcium and their absorption inhibitors in foods commonly consumed in Ethiopia. Journal of Food Composition and Analysis 18: 803-817.
39. Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255: 571-586.
40. Welch, R.M. 2002. Breeding strategies for biofortified staple plant foods to reduce micronutrient malnutrition globally. Journal of Nutrition.132: 495-499.
41. Xu, B.J., and Chang, S.K.C. 2008. Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. Journal of Food Science 73: 19 -27.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 8, No. 2, 2017, p. 44-56

Improve the quality of two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with using Phosphate and Zinc biofertilizers

Mohammadi[1*], M., Khavazi[2], K., Malakouti[3], M.J. & Rejali[4], F.

1. Assistant Professor, Department of Soil and Water Research, Chaharmahal and Bakhtiari Agricultural and Natural Resources Research and Education Center; Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shahrekord, Iran
2. Professor, Soil and Water Research Institute of Iran, kkhavazi@yahoo.com
3. Professor, Soil Fertility and Plant Nutrition, Tarbiat Modares University, mjmalakouti@hotmail.com
4. Associate Professor, Soil and Water Research Institute of Iran, frejali@yahoo.com

Received: 2 November 2015
Accepted: 23 February 2016

DOI: 10.22067/ijpr.v8i2.50917

Introduction

Bean *(Phaseolus vulgaris* L.) is one of the richest seeds in legumes. It has special importance in the diet because it contains 20-25 percent protein, 60 percent carbohydrates, vitamins, dietary fiber, antioxidants, trace minerals and amino acids containing Zinc (Zn) and Iron (Fe). Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) such as *Azotobacter* spp., and *Pseudomonas* spp. are able to increase uptake of nutrient elements particularly when they are applied with others. P solubilizing fungus and bacteria facilitate uptake of slowly diffusing nutrient ions such as phosphorus (P), Zn, Fe and increase their availability usually by increasing volume of soil exploited by plants, spreading external mycelium, secreting organic acids, production of dehydrogenase and phosphates enzymes and reducing rhizosphere acidity. Despite the high nutritional value of bean, it contains some antinutritional factors that caused to decrease this nutritional value with reducing the digestion and absorption of protein, minerals and trace elements. The main is phytic acid (PA), phenolic acid, tannin and trypsin inhibitors. PA has the ability to form bonds with divalent cations such as Fe, Zn, calcium (Ca) and magnesium (Mg). The high chelating capacity of PA reduces strongly availability of these elements and causes disturbances in the human gastrointestinal system. PA, phenolic compounds, tannin, and trypsin inhibitors can form bond with protein, fiber, carbohydrates, polysaccharides and other macromolecules and hence reduce enzyme activities, absorption and digestion of proteins and minerals. The main objective of this farm study was to evaluate the effect of P and Zn bio-fertilizers on decrease of antinutritional factors and improve seed quality in two cultivars of bean in Chaharmahal-va- Bakhtiari province.

Material & Methods

This field experiment was carried out as a factorial based on a randomized complete block design (RCBD) with three replications. The treatments of this research consisted of two cultivars of Chiti bean (Talash and Sadri), four levels of P (P_0: Control, P_1: Chemical fertilizer on the basis of soil test, P_2: 50 percent of recommended P + bio-fertilizer (P), and P_3: bio-fertilizer (P)), three levels of Zn (Zn_0: Control, Zn_1: 50 kg ha^{-1} Zinc sulphate, and Zn_3: bio-fertilizer (Zn)). Bio-fertilizer (P) treatment consisted of using inoculum of P solubilizing bacteria from Azotobacter chroococcum strain 5 and three species of mycorrhizal fungi from Glomus species (Glomus etunicatum, Glomus intraradices and Glomus mosseae). Bio-fertilizer (Zn) treatment consisted of using inoculum of Pseudomonas aeruginosa strain MPFM and Pseudomonas

[*]**Corresponding Author:** m.mohamadi@areeo.ac.ir, Mobile: 09133822665

fluorescent strain 187. Grain inoculation (5%) was done in shadow and after drying, inoculated grains were immediately cultivated. Two g of mycorrhizal fungus was applied under the grain hole just prior to sowing. Chemical fertilizers were applied from TSP at a rate of 100 and 50 kg ha^{-1} in P_1 and P_2 respectively, 50 kg ha^{-1} $ZnSO_4.7H_2O$ in Zn_1. After harvesting, seeds were prepared to measure antinutritional factors after grounding and passing from 60 mesh sieve. Phytic acid was measured by Haug and Lantzsch (1983), phenolic acid and Tannin by Makkar *et al*. (1993) and trypsin inhibitors by Kakade *et al*. (1974). Statistical analysis was done with SAS statistical software. Duncan's multiple range test was used to compare means.

Results & Discussion

The results revealed that there were not significant difference between two cultivars on studying factors. The least of these characteristics except of phytic acid (PA) were obtained from Sadri cultivar. The effect of P treatment was significant on studying parameters, in a way P_2 treatment in comparison with control treatment caused to decrease PA (11.5%), phenolic acid (35%), Tannin (38%) and trypsin inhibitors (25%). The effect of Zn treatment was also significant on studying parameters. The minimum of studying factors were obtained from Zn_1 and Zn_2 treatments. The effect of interaction between P and Zn was significant on these anti-nutritional factors except the trypsin inhibitors. The least rate of PA, phenolic acid, tannin were obtained 3.90 g kg^{-1}, 3.13 and 2.45 mg GAE g^{-1} sample respectively from P_2Zn_1 and the rate of trypsin inhibitor 4.70 mg TI g^{-1} sample from P_2Zn_2. In this study, the dual inoculation with phosphate and Zn bio-fertilizers caused to increase nutrient uptake and improve in seed enrichment especially nutrients with antioxidant capacity such as Zn and Fe. It can be done with increasing mycorrhizal symbiosis, root colonization phytosiderophores secretion, organic acids and chelated compounds production. Our results were similar to findings of other researches. Reducing in antinutritional factors related to production of enriched seeds with using phosphate and Zn bio-fertilizers.

Conclusion

The results of this research revealed that individual and dual using of phosphate and Zn bio-fertilizers caused to decrease antinutritional factors in two studied cultivars of bean. Microorganisms used in biological treatments caused to increase the availability and uptake of nutrient elements such as N, P, Fe and Zn. It can be done with increasing mycorrhizal symbiosis, root colonization and enhance secretion of siderophore compounds, organic acids and chelate compounds. Also, plant hormones and enzymes promoting growth increased with using of these bio treatments. Application of bio-fertilizers in this study caused to decrease antinutritional factors in both cultivars with increase of growth and nutrient uptake and seed bioenrichment with iron (Fe) and Zn Seed bio-enrichment with Fe, Zn and other nutrients caused to indirectly decrease in PA and other antinutritional factors. In this research, the best treatment was using of mycorrhizal fungi with *Azotobacter* inoculant and 50 kg ha^{-1} TSP and 50 kg ha^{-1} $ZnSO_4.7H_2O$, (P_2Zn_1 treatment).

Key words: Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Mycorrhizal fungi, Phytic acid, Tannin, Zinc