ارزیابی تجمع نیترات و فعالیت نیترات ردوکتاز در مراحل مختلف رشد در برخی توده‌های اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) بومی ایران

معصومه عالمیان[۱]، سیدعبداله افتخاری[۱*]، مختار حیدری[۲] و ناصر عالم‌زاده انصاری[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۶/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱)

چکیده

یک آزمایش گلدانی در هوای آزاد در بستر شن+ کوکوپیت (نسبت ۸۰:۲۰) انجام شد تا فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و تجمع نیترات در ریشه‌ها و برگ‌های پانزده توده بومی اسفناج ایرانی (*Spinacia oleracea*) در مراحل مختلف نمو گیاه مورد بررسی قرار گیرد. گیاهان در سه دوره زمانی از مراحل ۲۲، ۳۰ و ۳۸ روز پس از ظهور اولین برگ‌های حقیقی و قبل از گلدهی مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان دادند بیشترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بخش هوایی گیاهان توده تبریز در اولین مرحله رشد رویشی (۵۱/۲۹ میکرومول نیتریت/گرم وزن تازه برگ/ ساعت) و در ریشه‌های گیاهان توده‌های قزوین، صالح‌آباد قم و قم در مرحله سوم رشد رویشی (به‌ترتیب ۲۰/۷۱، ۱۵/۳۴ و ۱۵/۲۷ میکرومول نیتریت/گرم وزن تازه برگ/ ساعت) وجود داشت. کمترین فعالیت آنزیم در بخش هوایی (۱/۵۶ میکرومول نیتریت/گرم وزن تازه برگ/ ساعت) در توده شیراز در مرحله سوم رشد رویشی وجود داشت. فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه‌های توده بیرجند در اولین مرحله رشد رویشی (۳/۸۵ میکرومول نیتریت/گرم وزن تازه برگ/ ساعت) به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر توده‌ها بود. در بخش هوایی توده قزوین در مرحله سوم رشد بیشترین غلظت نیترات وجود داشت (۷۱۲۲ میکروگرم در گرم وزن خشک). تجمع نیترات در بخش هوایی توده اراک-۱ در مرحله دوم رشدی به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر توده‌ها بود (۲۹۶۱ میکروگرم در گرم وزن خشک). توده ورامین-۱ در مرحله دوم رشدی در مقایسه با سایر توده‌ها غلظت نیترات بیشتری را در ریشه نشان داد (۳۷۴۱ میکروگرم در گرم وزن خشک). نتایج نشان دادند فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و غلظت نیترات در ریشه و یا بخش هوایی توده‌های اسفناج ایرانی دارای تفاوت معنی‌داری بود. با توجه به این‌که میزان نیترات در اسفناج بایستی تا حد امکان پایین نگهداشته شود در حالی‌که تقریباً حداکثر عملکرد حفظ شود، کاشت توده‌های بومی گزینش شده اسفناج که بر اساس بررسی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و تجمع نیترات گزینش شده‌اند، می‌تواند در این زمینه مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: اسفناج(*Spinacia oleracea* L.)، آنزیم، رشد، نیتروژن

۱. گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲. گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، ملاثانی، خوزستان

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: eftekhari_9t@ yahoo.com

مقدمه

سبزی‌ها به سبب ارزش غذایی فراوان در بسیاری از کشورهای دنیا از منابع غذایی اصلی به شمار می‌آیند. بخش کشاورزی باید راهبردهایی را اتخاذ کند که در نهایت به تولید کافی با کیفیت بالای مواد غذایی، همراه با حفظ محیط زیست و امنیت غذایی جامعه و زندگی سالم در کیفیت قابل قبول منتهی شود. تجمع بیش از حد نیترات، از معیارهای کاهش‌دهنده کیفیت در سبزیجات محسوب می‌شود و یکی از عوامل نامناسبی که می‌تواند کیفیت سبزی‌ها (به‌خصوص سبزی‌های برگی) را تحت تأثیر قرار دهد، تجمع نیترات در اندام‌های قابل مصرف آنها می‌باشد (۳۳). قسمت عمده نیترات و نیتریتی که به بدن انسان وارد می‌شود، از طریق مصرف سبزی‌ها می‌باشد، به‌طوری‌که در حدود ۸۵ درصد نیترات و ۴۳-۱۶ درصد نیتریت موجود در رژیم غذایی از این طریق وارد سیستم گوارشی می‌گردد (۱).

نیترات در اثر فعالیت باکتری‌های موجود در دهان، معده و روده به نیتریت تبدیل می‌شود. نیتریت تولید شده جذب و وارد جریان خون شده و سلامت انسان را تهدید می‌کند. نیترات برای انسان سمی نیست ولی نیتریت حاصل از احیاء آن می‌تواند با آمین‌ها ترکیب شده و تشکیل نیتروزآمین را بدهد که یک ماده سرطان‌زا برای بدن محسوب می‌شود. در گیاهان نیترات توسط آنزیم نیترات ردوکتاز به نیتریت احیا شده و نیتریت نیز بلافاصله توسط آنزیم نیتریت ردوکتاز به آمونیم احیا شده و می‌تواند وارد مسیر تولید اسیدهای آمینه گردد. در گیاهان آنزیم نیترات ردوکتاز نقش کلیدی در سلسله فرآیندهای مربوط به مصرف نیترات دارد. شواهد متعدد نشان‌دهنده از پیچیدگی تنظیم این آنزیم می‌باشد (۸، ۱۹و۳۷). نقصان در فعالیت این آنزیم یا عوامل مؤثر بر چرخه‌های مربوط به آن سبب تجمع نیترات در اندام‌های مختلف گیاهان می‌گردد (۸). هم‌چنین گزارش گردیده است گیاهان رشد یافته در شرایط بدون نیترات، میزان دریافت نیترات کم و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز پایین دارند ولی پس از قرارگیری در معرض نیترات، سرعت فعالیت این فرآیندها افزایش یافته تا به یک نقطه حداکثر رسیده و سپس به‌تدریج کاهش می‌یابد تا این‌که به یک میزان ثابت می‌رسد. اگرچه این الگو در میان بیشتر گیاهان عمومی است، ولی بسته به گونه تفاوت‌هایی در زمان وقوع هر یک از مراحل فوق وجود دارد و پیشنهاد گردیده است این تفاوت‌ها ژنتیکی است (۸). با توجه به این‌که گزارش گردیده است تجمع نیترات در گیاه به رقم، گونه و قسمت‌های مختلف گیاه و نیز سن آن بستگی دارد و گیاهان خانواده چغندریان نیز از ظرفیت تجمع نیترات بیشتری برخوردارند (۶ و۲۳) و هم‌چنین پیشنهاد گردیده است یکی از دلایل مهم در تفاوت تجمع نیترات در ارقام مختلف یک گیاه، وجود تفاوت در میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز (آنزیم احیاکننده نیترات) است (۹، ۲۶و۲۹)، در تقسیم‌بندی سبزی‌ها و میوه‌ها بر اساس مقادیر نیترات، سبزی‌های برگی مثل اسفناج و کاهو دارای بیشترین مقادیر نیترات بوده و در گروه محصولاتی با نیترات زیاد دسته‌بندی می‌شوند (۱۲).

اسفناج(*Spinacia oleracae* L.) گیاهی یکساله، مقاوم به سرما، از نظر گلدهی یک پایه یا دو پایه، متعلق به خانواده کنوپودیاسه(Chenopodiaceae) می‌باشد. این سبزی به‌علت دارا بودن املاح معدنی، پروتئین، ویتامین‌های آ، ب، ث، آنتی اکسیدان‌ها و پتانسیل جذب رادیکال‌های اکسیژن، در بین سبزی‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است (۷). در برگ‌های گیاه اسفناج احتمال تجمع زیاد نیترات و اگزالات وجود دارد و میزان تجمع آنها در اندام هوایی از شاخص‌های تعیین‌کننده کیفیت اسفناج می‌باشد (۱۸و ۳۳).گزارش شده است غلظت نیترات در بخش قابل مصرف گیاه اسفناج می‌تواند بین ۱۳۰ تا ۴۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تازه متغیر باشد (۲۸). با توجه به این‌که پیشنهاد گردیده است عوامل ژنتیکی از موارد مهمی هستند که باید در بررسی تجمع نیترات در اسفناج (۳۱) و سایر سبزی‌های برگی (۳۲) مورد توجه قرار گیرند و هم‌چنین گزارش شده است میزان تجمع نیترات در سبزی‌ها بسته به گونه، رقم و یا حتی تفاوت‌های ژنوتیپی خاص مانند سطح پلوییدی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۱۰)، به نظر می‌رسد موضوع

تجمع نیترات در ژنوتیپ‌های اسفناج می‌تواند اطلاعات مفیدی در زمینه انتخاب ژنوتیپ‌های دارای توانایی تجمع کمتر نیترات فراهم سازد. زیرا پیشنهاد گردیده است یکی از مواردی که به نحو مؤثر و با هزینه پایین‌تر نسبت به روش‌های دیگر در کاهش تجمع نیترات در سبزی‌های برگی مؤثر است، معرفی ژنوتیپ‌هایی است که توانایی تجمع کمتر نیترات را در اندام‌های قابل مصرف دارند (۱۰).

گیاه اسفناج بومی آسیای مرکزی و به احتمال زیاد ایران می‌باشد (۳). توده‌های متنوعی از این گیاه در حال حاضر در کشور یافت می‌شود (۲و۱۴)، با توجه به این‌که اسفناج در گروه محصولات سبزی با تجمع نیترات زیاد دسته‌بندی می‌شود و با توجه به عدم وجود اطلاعات در مورد تجمع نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در توده‌های اسفناج بومی ایران، آزمایش حاضر به منظور مقایسه تجمع نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بخش هوایی و ریشه ۱۵ توده اسفناج بومی ایران در سه مرحله رشد رویشی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز اجرا گردید. مزرعه تحقیقاتی در جنوب غربی شهر اهواز و در حاشیه غربی رود کارون با عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۱۹ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۴۰ دقیقه شرقی با ارتفاع ۲۰ متر از سطح دریا قرار دارد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو عامل شامل ۱۵ توده بومی اسفناج (توده‌های تبریز، ارومیه، قزوین، ورامین-۱، ورامین-۲، ورامین-۳، کرج، قم، صالح آباد قم، شیراز، شیروان، قوچان، بیرجند، کوهبنان کرمان، اراک-۱) و مرحله رشد رویشی (سه مرحله رشد رویشی شامل ۲۲، ۳۰ و ۳۸ روز پس از تولید اولین برگ حقیقی و قبل از وارد شدن بوته‌ها به مرحله گلدهی) و سه تکرار (هر تکرار شامل سه گلدان و هر گلدان یک گیاه) در مجموع با ۴۵ تیمار اجرا شد. بذرهای توده‌های اسفناج مورد استفاده در این آزمایش از کلکسیون توده‌های اسفناج جمع‌آوری شده توسط افتخاری و همکاران (۱۴) تهیه شد. خصوصیات بذر و بخش رویشی گیاهان در ۴۵ توده اسفناج ایرانی توسط افتخاری و همکاران (۱۴) تشریح گردیده است. در هفته سوم بهمن ماه ۱۳۸۹، بذرها پس از ضدعفونی سطحی به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ و سه بار آبکشی با آب مقطر، در سینی کاشت حاوی پرلیت کاشته شده و در گلخانه با میانگین دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. پس از کاشت تا زمان جوانه‌زنی آبیاری با آب آبیاری حاوی ۲٪ ترکیب محلول غذایی هوگلند تغییر یافته (۱۷) انجام شد.

محلول غذایی هوگلند تغییریافته شامل ترکیبات تشکیل‌دهنده زیر بود (بر اساس میلی‌گرم در لیتر): نیتروژن (۲۲۴)، پتاسیم (۲۳۵)، کلسیم (۱۶۰)، فسفر (۱۶۰)، گوگرد (۳۲)، منیزیم (۲۴)، فسفر (۶۲)، کلر (۱/۷۷)، بر (۰/۲۷)، منگنز (۰/۱۱)، روی (۰/۱۳)، مس (۰/۰۳)، مولیبدن (۰/۰۵)، آهن (۱). پس از ظهور گیاهچه‌ها در سطح بستر، غلظت محلول هوگلند تغییر یافته در آب آبیاری به‌تدریج افزایش یافته و تا حد ۵۰ درصد افزایش یافت. پس از تولید اولین برگ‌های حقیقی در هفته سوم پس از کاشت بذر(۸۹/۱۲/۱۳)، گیاهچه‌ها به کیسه‌های گلدانی پلاسیتکی حاوی پنج کیلوگرم بستر کاشت شامل ۲۰ درصد کوکوپیت و ۸۰ درصد شن شسته (با ابعاد کمتر از ۴ میلی‌متر) انتقال یافتند. گلدان‌ها در هوای آزاد در معرض نور طبیعی و در دمای متوسط روز ۲۳/۵ و شب ۱۲/۵۵ درجه سانتی‌گراد، متوسط رطوبت نسبی ۳۱/۲ درصد قرار داده شدند. پس از انتقال به گلدان، گیاهچه‌ها به‌مدت یک هفته با محلول غذایی نیم قدرت هوگلند تغییر یافته تغذیه شدند. پس از یک هفته از انتقال گیاهان به بستر اصلی، آبیاری با محلول غذایی تمام قدرت هوگلند تغییر یافته انجام شد. هر گلدان در هر روز با ۴۰۰ میلی‌لیتر محلول غذایی آبیاری می‌شد. حجم محلول غذایی به نحوی تنظیم شده بود که در هر دور آبیاری حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول غذایی از بخش تحتانی گلدان خارج گردد. هم‌چنین به منظور جلوگیری از تجمع نمک‌ها

در گلدان، در هفته، یک مرتبه شستشوی گلدان‌ها با آب مقطر انجام گردید. با توجه به این‌که پایان مرحله رشد رویشی و شروع مرحله گلدهی در اسفناج، فاصله زمانی بین کاشت تا تولید ساقه گلدهنده به ارتفاع حداقل ۵ سانتی‌متر در ۱۰٪ بوته‌های اسفناج در نظر گرفته می‌شود (۳) و بررسی‌های اولیه نشان داده بود به‌طور عمومی در شرایط آب و هوایی اهواز، بوته‌های اسفناج در اواخر فروردین وارد مرحله تولید ساقه گلدهنده می‌شوند، در مراحل زمانی ۲۲، ۳۰ و ۳۸ روز پس از انتقال نشاها به محیط کشت (به‌ترتیب تاریخ‌های ۹۰/۱/۶، ۹۰/۱/۱۴ و ۹۰/۱/۲۲) و قبل از رسیدن گیاهان به مرحله تولید ساقه گل‌دهنده، گیاهان از گلدان‌های کاشت خارج گردیده و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز بر اساس روش پیشنهادی استوارت و همکاران (۳۶) در برگ و ریشه اندازه‌گیری شد. در هر مرحله برای اندازه‌گیری از برگ‌های بالغ هر بوته (برگ هفتم) نمونه‌برداری گردید. مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم نمونه پهنک برگ یا بخش انتهایی ریشه در محلول بافر فسفات (۱۰۰ میلی‌مول،pH= ۷/۵)، حاوی پروپانول ۴٪ و نیترات پتاسیم قرار داده شده و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد. سپس یک میلی‌لیتر محلول سولفانیلیک اسید محلول در اسید کلریدریک ۲ نرمال و یک میلی‌لیتر محلول نفتیل اتیلن دی آمید (۰/۰۲ درصد) افزوده شده و پس از گذشت ۲۰ دقیقه، میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. برای تهیه محلول استاندارد از نیتریت سدیم ($NaNO_2$) استفاده شد و فعالیت آنزیم بر اساس میکرومول نیتریت در گرم وزن تازه بافت در ساعت محاسبه گردید. نمونه‌های ریشه و بخش هوایی در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت در آون خشک شدند. سپس نمونه‌ها آسیاب گردیده و میزان نیترات بر اساس روش پیشنهادی کاتالدو و همکاران (۱۱) اندازه‌گیری شد. برای تهیه منحنی استاندارد از نیترات پتاسیم(KNO_3) استفاده گردید.

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mstat-C انجام شده و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گردید.

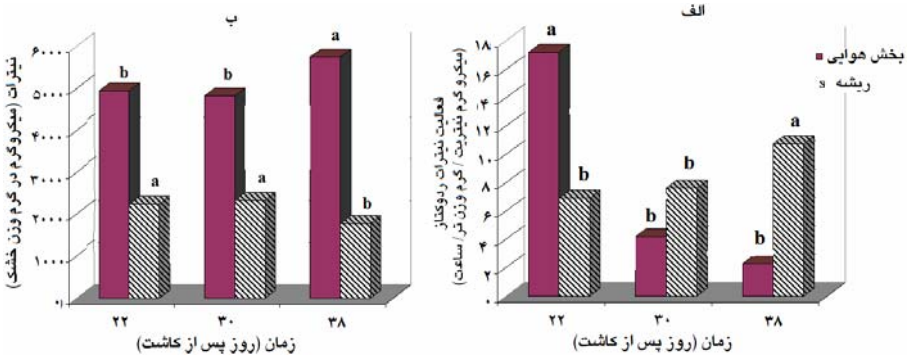
نتایج

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز

بررسی اثر زمان برداشت بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز بخش هوایی توده‌های اسفناج (نمودار ۱- الف) نشان داد با پیشرفت رشد گیاه اسفناج، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بخش هوایی کاهش معنی‌داری داشت. بیشترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز (۱۷/۲۴ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت) در بخش هوایی در اولین مرحله اندازه‌گیری (۲۲ روز پس از کاشت) وجود داشت که به‌طور معنی‌داری بیشتر از فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بخش هوایی در مرحله‌های دوم و سوم اندازه‌گیری بود (به‌ترتیب ۴/۲ و ۲/۳۳ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت). فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بخش هوایی در مرحله دوم و سوم برداشت تفاوت معنی‌داری نداشتند.

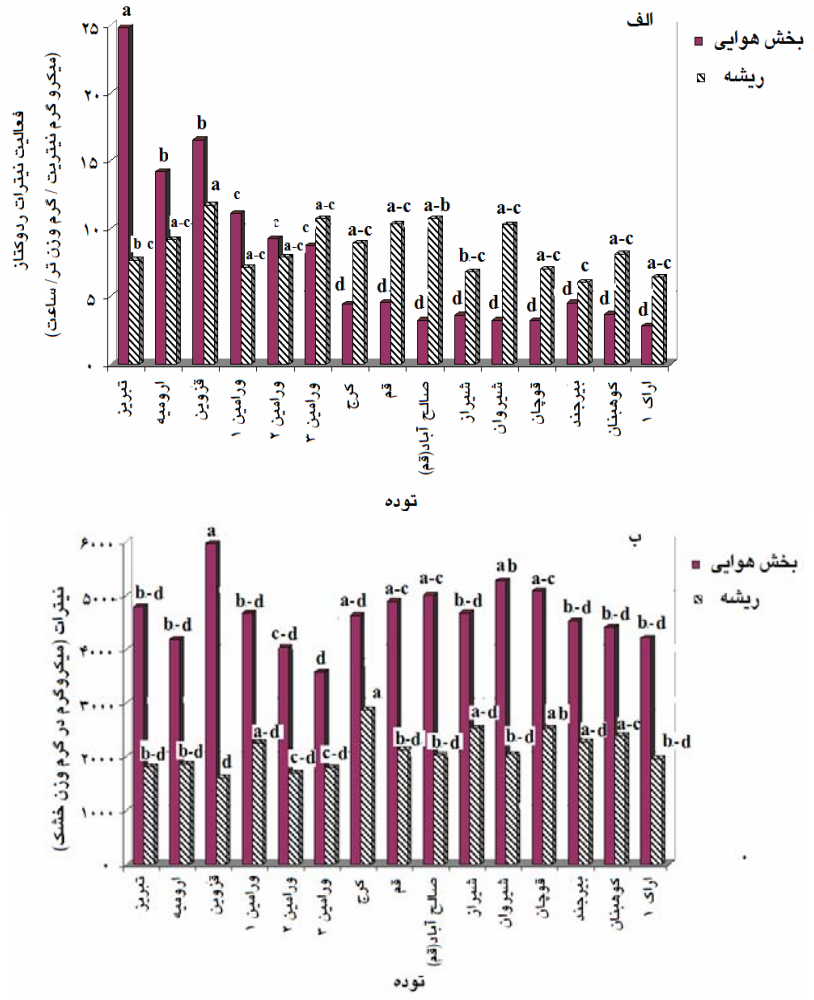
مقایسه فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه در مرحله‌های برداشت (نمودار ۱- الف) نشان داد بیشترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه اسفناج در مرحله سوم (۳۸ روز پس از کاشت) وجود داشت (۱۰/۷۷ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت) که به‌طور معنی‌داری بیشتر از فعالیت آنزیم در ریشه در مراحل اول و دوم برداشت بود (به‌ترتیب ۶/۹۲ و ۷/۶۶ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت). فعالیت آنزیم در ریشه توده‌های اسفناج در مرحله اول و دوم برداشت تفاوت معنی‌داری نداشتند.

بررسی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بخش هوایی توده‌های اسفناج (نمودار ۲-الف) نشان داد فعالیت آنزیم در بخش هوایی توده تبریز (۲۴/۸۶ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت) به‌طور معنی‌داری بیشتر از فعالیت آنزیم در بخش هوایی سایر توده‌های اسفناج بود. پس از آن بیشترین فعالیت آنزیم در بخش هوایی گیاهان توده ارومیه و قزوین وجود داشت (۱۴/۲ و ۱۶/۵۶ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت) که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ولی بیشتر از فعالیت آنزیم در بخش هوایی سایر توده‌ها



نمودار ۱. اثر زمان برداشت بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز (الف) و غلظت نیترات (ب) ریشه و بخش هوایی اسفناج

*: در هر نمودار، میانگین‌های ریشه یا بخش هوایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.



نمودار ۲. فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز (نمودار الف) و غلظت نیترات (نمودار ب) در ریشه و بخش هوایی اسفناج

*: در هر نمودار، میانگین‌های ریشه یا بخش هوایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند، در سطح احتمال ۵ درصد آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۱. فعالیت نیترات ردوکتاز (میکرومول نیتریت/گرم وزن تازه برگ/ ساعت) در مراحل رشد رویشی در بخش هوایی و ریشه توده‌های اسفناج بومی ایران

توده	مرحله اندازه‌گیری (روز پس از کاشت)			مرحله اندازه‌گیری (روز پس از کاشت)		
	۲۲	۳۰	۳۸	۲۲	۳۰	۳۸
	نیترات بخش هوایی			نیترات ریشه		
تبریز	۵۱/۲۹ a*	۱۱/۰۴ d	۲/۹۷ d	۶/ ۰۸ c-e*	۶/۱۶ c-e	۷/۷۹ b-e
ارومیه	۴۲/۹۹ b	۳/۵۶ d	۲/۹۰ d	۵/۸۶ c-e	۸/۹۰ b-e	۱۰/۰۱ b-e
قزوین	۴۷/۱۵ b	۳/۸۶ d	۳/۷۱ d	۶/۰۹ c-e	۷/۵۷ b-e	۲۰/۷۱ a
ورامین ۱	۲۷/۱۱ c	۲/۹۶ d	۳/۲۶ d	۴/۷۵ c-e	۷/۲۰ b-e	۹/۴۳ b-e
ورامین ۲	۲۱/۶۸ c	۳/۶۴ d	۲/۴۴ d	۴/۴۵ de	۹/۴۳ b-e	۹/۸۰ b-e
ورامین ۳	۲۲/۲۳ c	۲/۴۴ d	۱/۵۳ d	۶/۳۷ c-e	۱۲/۳۸ c-d	۱۳/۱۲ b-c
کرج	۷/۳۳ d	۴/۰۸ d	۱/۸۵ d	۷/۰۴ b-e	۸/۳۸ b-e	۱۱/۴۱ b-e
قم	۵/۷۸ d	۴/۵۹ d	۳/۳۳ d	۷/۰۴ b-e	۸/۷۴ b-e	۱۵/۲۷ ab
صالح آباد(قم)	۳/۷۰ d	۴/۳۷ d	۱/۶۳ d	۱۱/۰۴ b-e	۵/۸۵ c-e	۱۵/۳۴ ab
شیراز	۳/۳۳ d	۶/۰۰ d	۱/۵۶ d	۵/۱۹ c-e	۷/۶۳ b-e	۷/۵۵ b-e
شیروان	۳/۷۱ d	۴/۳۷ d	۱/۶۳ d	۱۲/۸۲ b-d	۹/۴۸ b-e	۸/۵۲ b-e
قوچان	۵/۴۱ d	۱/۹۳ d	۲/۲۲ d	۷/۶۳ b-e	۷/۰۴b-e	۶/۲۹ c-e
بیرجند	۶/۳۰ d	۴/۹۶ d	۲/۳۰ d	۳/۸۵ e	۶/۰۰ c-e	۸/۳۰ b-e
کوهبنان	۶/۸۹ d	۲/۳۰ d	۱/۸۵ d	۹/۶۳ b-e	۵/۲۶ c-e	۹/۶۳ b-e
اراک ۱	۳/ ۷۱d	۳/۰۴ d	۱/۷۱ d	۶/۰۰ c-e	۴/۸۲ c-e	۸/۳۸ b-e

*: در ریشه یا بخش هوایی، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح ۵ درصد آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

بود. فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بخش هوایی توده‌های اراک-۱، کوهبنان، بیرجند، قوچان، شیروان، شیراز، صالح آباد قم و کرج تفاوت معنی‌داری نداشتند ولی به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر توده‌ها بودند. مقایسه فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه توده‌های اسفناج (نمودار ۲- الف) نشان داد بیشترین فعالیت آنزیم در ریشه‌های گیاهان توده قزوین (۱۱/۷۳ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت) وجود داشت که با فعالیت آنزیم در ریشه‌های گیاهان توده‌های ارومیه، ورامین-۱، ورامین-۲، ورامین-۳، کرج، قم، صالح‌آباد قم، شیروان، قوچان، کوهبنان و اراک تفاوت معنی‌داری نداشت ولی بیشتر از فعالیت آنزیم در ریشه سایر توده‌ها بود.

بررسی اثر مرحله رشد بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بخش هوایی توده‌های اسفناج (جدول ۱) نشان داد بیشترین فعالیت آنزیم در بخش هوایی گیاهان توده تبریز در اولین مرحله اندازه‌گیری وجود داشت (۵۱/۲۹ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت) که به‌طور معنی‌داری بیشتر از فعالیت آنزیم در سایر تیمارها بود. پس از آن بیشترین فعالیت آنزیم در بخش هوایی گیاهان توده قزوین و ارومیه در اولین مرحله اندازه‌گیری بود (به‌ترتیب ۴۲/۹۹ و ۴۷/۱۵ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت) که با فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بخش هوایی سایر توده‌های اسفناج در هر سه مرحله رشد تفاوت معنی‌داری داشت. کمترین فعالیت آنزیم در بخش هوایی

توده شیراز در مرحله سوم اندازه‌گیری بود (۱/۶۳ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت) که با فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بخش هوایی سایر توده‌ها به‌جزء توده‌های تبریز، قزوین، ارومیه، ورامین-۱، ورامین-۲، و ورامین-۳ تفاوت معنی‌داری نداشت.

بیشترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه گیاهان توده قزوین در مرحله سوم اندازه‌گیری وجود داشت (۲۰/۷۱ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت) که با فعالیت آنزیم در ریشه گیاهان توده قم و صالح‌آباد قم در مرحله سوم اندازه‌گیری تفاوت معنی‌داری نداشت (به‌ترتیب ۱۵/۲۷ و ۱۵/۳۴ میکرومول نیتریت در گرم وزن بافت در ساعت) ولی به‌طور معنی‌داری بیشتر از فعالیت آنزیم در ریشه توده‌های اسفناج در سایر مراحل رشد بود.

غلظت نیترات

بررسی نیترات در مراحل رشد در بخش هوایی (نمودار ۱- ب) نشان داد، غلظت نیترات در مرحله سوم (۵۷۵۰ میکروگرم در گرم وزن خشک) به‌طور معنی‌داری بیشتر از نیترات بخش هوایی در مرحله‌های رشد اول و دوم بود(به‌ترتیب ۴۹۵۰ و ۴۸۲۰ میکروگرم در گرم وزن خشک). غلظت نیترات در بخش هوایی در مرحله‌های اول و دوم رشد تفاوت معنی‌داری نداشتند.

مقایسه غلظت نیترات ریشه در مرحله‌های مختلف اندازه‌گیری (نمودار ۱- ب) نشان داد غلظت نیترات ریشه توده‌های اسفناج در مرحله اول و دوم اندازه‌گیری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (به‌ترتیب ۲۲۵۱/۵ و ۲۳۲۸ میکروگرم در گرم وزن خشک) ولی به‌طور معنی‌داری بیشتر از غلظت نیترات ریشه در مرحله سوم اندازه‌گیری بود(۱۷۸۳/۵ میکروگرم در گرم وزن خشک).

مقایسه غلظت نیترات در بخش هوایی توده‌های اسفناج (نمودار ۲- ب) نشان داد بیشترین غلظت نیترات بخش هوایی در توده قزوین وجود داشت (۵۹۷۱/۵ میکروگرم در گرم وزن خشک) که با غلظت نیترات در بخش هوایی توده‌های کرج، قم، صالح آباد قم، شیروان و قوچان اختلاف معنی‌داری نداشت ولی به‌طور معنی‌داری بیشتر از غلظت نیترات در بخش هوایی سایر توده‌های اسفناج بود. کمترین غلظت نیترات بخش هوایی در توده ورامین-۳ وجود داشت (۳۷۳۲ میکروگرم در گرم وزن خشک)که با غلظت نیترات بخش هوایی توده‌های قزوین، قم، صالح آباد قم و قوچان تفاوت معنی‌داری داشت.

بررسی غلظت نیترات در ریشه توده‌های اسفناج (نمودار ۲- ب) نشان داد بیشترین غلظت نیترات در ریشه گیاهان توده کرج وجود داشت (۲۸۷۸/۵ میکروگرم در گرم وزن خشک) که با غلظت نیترات ریشه توده‌های ورامین-۱، قم، شیراز، قوچان، بیرجند و کوهبنان تفاوت معنی‌داری نداشت ولی به‌طور معنی‌داری بیشتر از غلظت نیترات ریشه سایر توده‌ها بود. کمترین غلظت نیترات ریشه در گیاهان توده قزوین (۱۶۰۸ میکروگرم در گرم وزن خشک) وجود داشت که با غلظت نیترات ریشه توده کرج اختلاف معنی‌داری داشت.

بررسی غلظت نیترات بخش هوایی در توده‌های اسفناج در مرحله‌های مختلف اندازه‌گیری (جدول ۲) نشان داد بیشترین غلظت نیترات در بخش هوایی توده قزوین در مرحله سوم اندازه‌گیری وجود داشت (۷۱۲۲ میکروگرم در گرم وزن خشک) که با غلظت نیترات بخش هوایی توده‌های ورامین- ۱، قم، شیروان، قوچان و بیرجند در مرحله سوم اندازه‌گیری و یا غلظت نیترات بخش هوایی توده‌های قزوین، قوچان در مرحله دوم اندازه‌گیری و یا غلظت نیترات بخش هوایی توده‌های کرج، قم، صالح آباد قم، شیراز و شیروان در مرحله اول تفاوت معنی‌داری نداشت ولی بیشتر از غلظت نیترات در بخش هوایی سایر توده‌های اسفناج در مرحله‌های مختلف اندازه‌گیری بود.

بررسی غلظت نیترات ریشه توده‌های اسفناج در مرحله‌های مختلف اندازه‌گیری نشان داد بیشترین فعالیت نیترات در ریشه توده ورامین- ۱ در مرحله دوم اندازه‌گیری وجود داشت (۳۷۴۱ میکروگرم در گرم وزن خشک) که با غلظت نیترات ریشه در توده‌های ورامین – ۲، کرج و قم در مرحله دوم اندازه‌گیری یا غلظت نیترات ریشه در توده‌های کرج، قم، صالح آباد قم،

جدول ۲. غلظت نیترات (میکروگرم در گرم وزن خشک) در مراحل رشد رویشی در بخش هوایی و ریشه توده‌های اسفناج

توده	مرحله اندازه‌گیری (روز پس از کاشت)			مرحله اندازه‌گیری (روز پس از کاشت)		
	۲۲	۳۰	۳۸	۲۲	۳۰	۳۸
	نیترات بخش هوایی			نیترات ریشه		
تبریز	۴۶۱۷ b-j *	۴۴۳۲/۵ c-j	۵۳۳۴ a-i	۹۳۴/۸ i *	۱۹۶۳/۵ b-i	۲۵۵۴/۵ a-f
ارومیه	۳۵۷۰ h-j	۴۱۳۸ d-j	۴۸۶۶ b-j	۱۸۷۳/۵ c-i	۱۵۲۱ d-i	۲۱۹۰ b-i
قزوین	۴۴۸۲ c-j	۶۳۰۹ a-d	۷۱۲۲ a	۹۹۳/۴۵ i	۲۷۶۷/۵ a-e	۱۰۶۵/۷۵ g-i
ورامین ۱	۳۸۲۳/۵ g-j	۴۹۷۸/۵ b-j	۵۲۱۷ a-i	۲۰۶۲/۵ b-i	۳۷۴۱ a	۹۷۵/۴۵ i
ورامین ۲	۳۶۴۶/۵ h-j	۳۸۶۸/۵ f-j	۴۶۰۳/۵ b-j	۹۳۴/۸ i	۳۱۲۷/۵ a-c	۱۰۱۱/۴۵ hi
ورامین ۳	۳۸۵۹/۵ f-j	۳۹۵۴ f-j	۳۳۸۳/۵ ij	۲۰۱۷/۵ b-i	۲۱۳۹ b-i	۱۲۵۰/۷ f-i
کرج	۶۰۲۵/۵ a-f	۴۳۳۲ c-j	۴۳۴۲/۵ c-j	۳۳۰۹ ab	۳۱۰۹۵ a-c	۲۲۱۷۰ b-i
قم	۴۶۲۹ a-h	۲۹۷۴/۵ j	۶۳۴۰/۵ a-c	۲۴۵۵/۵ a-g	۲۴۲۸/۵ a-h	۱۵۳۰ d-i
صالح آباد(قم)	۶۲۴۶ a-e	۴۵۹۹ b-j	۴۰۹۸ e-j	۲۷۸۱ a-e	۱۶۱۵/۵ d-i	۱۶۷۵/۵ d-i
شیراز	۵۶۴۱/۵ a-h	۳۵۵۶/۵ h-j	۴۸۴۶/۵ b-j	۳۳۱۸ ab	۲۳۲۰/۵ b-i	۱۹۳۶/۵ b-i
شیروان	۵۹۳۱ a-g	۴۳۰۳/۵ c-j	۵۵۹۲ a-h	۲۶۲۶/۵ a-f	۲۰۵۸ –i	۱۴۶۷/۳ e-i
قوچان	۳۵۴۳ h-j	۵۰۳۲/۵ a-j	۶۷۱۱ ab	۲۹۲۹/۵ a-d	۲۲۸۹ b-i	۲۳۵۶/۵ b-i
بیرجند	۳۵۵۲ h-j	۴۸۹۳ b-j	۵۱۰۴/۵ a-j	۲۵۹۰/۵ a-f	۲۳۳۴ b-i	۱۸۹۱/۵ b-i
کوهبنان	۴۱۷۶ c-j	۴۵۵۸/۵ b-j	۴۵۰۴/۵ c-j	۲۶۲۲ a-f	۱۹۵۴/۵ b-i	۲۶۲۲ a-f
اراک ۱	۴۴۷۳ c-j	۲۹۶۱ j	۵۴۵۲/۵ a-i	۲۳۳۴ b-i	۱۵۵۷ d-i	۲۰۰۴ b-i

*: در ریشه یا بخش هوایی، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح ۵ درصد آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

شیراز، شیروان، قوچان، کوهبنان در مرحله اول اندازه‌گیری و یا غلظت نیترات ریشه در توده‌های تبریز و کوهبنان در مرحله سوم اندازه‌گیری تفاوت معنی‌داری نداشت ولی به‌طور معنی‌داری بیشتر از غلظت نیترات در ریشه سایر توده‌های اسفناج بود.

بحث

در این پژوهش اثر مرحله رشد بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و تجمع نیترات در ریشه و بخش هوایی ۱۵ توده اسفناج ایران مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد مرحله رشد گیاه اسفناج اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بخش هوایی و ریشه توده‌های اسفناج بومی ایران داشت (جدول ۱). هم‌چنین بررسی میزان تجمع نیترات در توده‌های اسفناج در طول زمان نشان داد تفاوت معنی‌داری در میزان تجمع نیترات در سه زمان نمونه‌برداری وجود داشت (جدول ۲).

اگرچه در مورد مقایسه فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه یا بخش هوایی ارقام یا ژنوتیپ‌های اسفناج و یا تأثیر مرحله نمو گیاه اسفناج بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه یا بخش هوایی گیاه اسفناج گزارشی منتشر نگردیده است ولی نتایج آزمایش حاضر در مورد تفاوت در تجمع نیترات در توده‌های اسفناج با گزارش کانیکی و همکاران (۲۲) در مورد تفاوت در تجمع نیترات بین ارقام اسفناج در لهستان و نتایج عرفانی و همکاران (۱۵) در مورد تفاوت در تجمع نیترات در هفت رقم اسفناج ایرانی موافقت دارد. هم‌چنین نتایج این تحقیق در مورد تفاوت تجمع نیترات در مراحل مختلف رشد رویشی توده‌های اسفناج ایران با نتایج کامینیشی و کیتا (۲۱) که

ارتباط بین میزان نیترات بخش هوایی و مرحله رشد در ۱۸۲ رقم اسفناج در ژاپن را گزارش دادند، موافقت دارد. اگرچه در مطالعات انجام شده توسط افتخاری و همکاران (۱۴) و اسدی و همکاران (۲) خصوصیات رویشی و زایشی توده‌های اسفناج ایران مورد بررسی قرار گرفته است ولی تجمع نیترات یا فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و یا سایر ترکیبات بیوشیمیایی در این توده‌ها تعیین نگردیده است. با توجه به این‌که پیشنهاد گردیده است گونه‌های گیاهی از نظر توانایی جذب و اسیمیلاسیون فرم‌های مختلف نیتروژن با یکدیگر تفاوت دارند و این موضوع با رویشگاه‌های طبیعی گونه در ارتباط است (۵)، به نظر می‌رسد نتایج آزمایش حاضر در رابطه با تفاوت فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و تجمع نیترات در بخش هوایی و ریشه توده‌های مختلف اسفناج ایران می‌تواند با پاسخ متفاوت هر توده به شرایط درجه حرارت، شدت نور و طول دوره نوری اهواز (خوزستان) در ارتباط باشد. کامینیشی و کیتا (۲۱) که میزان تجمع نیترات و اگسالات در ۱۸۲ رقم اسفناج در چهار فصل رشد بهار، تابستان، پاییز و زمستان در ژاپن را مورد مطالعه قرار دادند، اهمیت تأثیر طول دوره نوری و درجه حرارت را بر تجمع نیترات در ارقام مختلف اسفناج مورد تأیید قرار داده‌اند و عنوان داشتند هر رقم اسفناج خصوصیات رشدی متفاوتی نشان می‌دهد که به‌طور اختصاصی در پاسخ به فتوپریود و درجه حرارت وابستگی دارد.

کانتکلیف (۹) نیز اهمیت تأثیر فتوپریود و درجه حرارت بر تجمع نیترات در اسفناج را مورد تأیید قرار داده‌اند. البته در آزمایش حاضر نمونه‌برداری در هر پانزده توده به‌صورت یکسان انجام گردید ولی با توجه به تفاوت در خصوصیات ریخت‌شناسی و رشد رویشی توده‌های اسفناج که از مناطق مختلف جغرافیایی ایران جمع‌آوری گردیده‌اند (۲و۱۴)، پیشنهاد می‌گردد در مطالعات بعدی میانگین تعداد روزهای لازم برای برداشت [(Avarage days required for harvest (AveDHs))] در هر توده تعیین گردیده و در اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی و آنزیمی این توده‌ها مورد بررسی قرار گیرد. زیرا این شاخص با درجه حرارت محیط رشد در ارتباط است (۲۱) ولی در مورد این شاخص در ارقام و یا توده‌های اسفناج ایران اطلاعاتی وجود ندارد. کانیکی و همکاران (۲۲) نیز پیشنهاد دادند زمان برداشت مهم‌ترین فاکتور در تعیین عملکرد و میزان ماده خشک اسفناج می‌باشد. به همین دلیل بررسی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و روند تغییرات آن در طول زمان می‌تواند از نظر تعیین پتانسیل تجمع نیترات و روند تغییرات تجمع نیترات در توده‌های اسفناج بومی ایران در رابطه با زمان برداشت مهم باشد زیرا به خوبی مشخص شده است دریافت نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز فرآیندهای مرتبط با هم هستند (۸).

نتایج این بررسی نشان داد نشان دادند فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و میزان تجمع نیترات در ریشه و یا بخش هوایی در هر سه مرحله نمونه‌گیری تفاوت داشت (جدول ۱). در مورد ارتباط بین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه و برگ ژنوتیپ‌های اسفناج تاکنون گزارشی منتشر نگردیده است ولی وجود ارتباط بین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه و برگ در گونه‌ای از صنوبر(*Populus tremuloides*) و کاج (*Pinus contorta*) (۲۷) و سایرگونه‌های صنوبر (۱۳) گزارش گردیده است. پیشنهاد گردیده است افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ، در افزایش پتانسیل استفاده از نیترات مؤثر است. با افزایش تجمع نیترات در واکوئل سلول‌های ریشه، ورود نیترات به واکوئل سلول‌های ریشه کاهش یافته و به موازات آن نیترات بیشتری برای انتقال به بخش هوایی فراهم می‌گردد (۳۴). هم‌چنین گزارش گردیده است اندام گیاهی (ریشه یا برگ) و نسبت رشد ریشه به شاخساره (۲۷) نیز بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز تأثیر دارد. بنابراین در بررسی تجمع نیترات در توده‌های اسفناج، باید نسبت نیترات ریشه به بخش هوایی نیز به‌عنوان یک شاخص تجمع نیترات مورد توجه قرار گیرد.

با توجه به این‌که پیشنهاد گردیده است توانایی دریافت نیترات توسط سلول‌های ریشه با میزان نیترات موجود در محیط ارتباط دارد (۲۳و۳۴)، به نظر می‌رسد لازم است پتانسیل جذب نیترات در ریشه و شاخساره در توده‌های اسفناج ایرانی در

پاسخ به تیمارهای مختلف نیتروژن یا ترکیبات حاوی نیترات مورد بررسی قرار گیرد. در این رابطه اسفندیاری و همکاران (۱۶) فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه و بخش هوایی ده توده اسفناج بومی ایران را در پاسخ به سطوح مختلف نیتروژن در محلول غذایی مورد بررسی قرار داده و گزارش دادند افزایش نیتروژن در محلول غذایی به‌طور مؤثری فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و تجمع نیترات در ریشه‌ها و بخش هوایی این توده‌های اسفناج را تغییر داد.

در مجموع نتایج آزمایش حاضر نشان داد توده‌های اسفناج بومی ایران از نظر جذب نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه و بخش هوایی تفاوت معنی‌داری دارند. این ویژگی‌ها می‌تواند در کسب اطلاعات بیشتر در مورد نحوه تجمع نیترات در اسفناج و یا روشن شدن عوامل ژنتیکی کنترل‌کننده تجمع نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در توده‌های اسفناج ایران مفید باشد. هم‌چنین می‌توان توده‌های اسفناج ایرانی که نیترات کمتری در بخش‌های رویشی تجمع می‌دهند را شناسایی نموده و در برنامه‌های بهنژادی مربوط به معرفی ارقام اسفناج با توانایی تجمع کمتر نیترات مورد استفاده قرار داد.

منابع مورد استفاده

1. Amr, A. and N. Hadidi. 2001. Effect of cultivar and harvest date on nitrate and nitrite content of selected vegetable grow under open field and greenhouse conditions in jordan. *Journal of Food Composition and Analysis* 14: 59-67.
2. Asadi, H. and M. Hasandokht. 2007. Study of genetic diversity on Iranian spinach genotypes. *Iranian Journal of Agricultural Sciences* 38(2): 257-265.
3. Avsar, B. 2011. Genetic diversity of Turkish spinach cultivars (*Spinacia oleracea* L.). MSc. Thesis in Molecular Biology and Genetics. Izmir Institute of Technology, Turkey. 27 p.
4. Balkaya, A., R. Yanmaz and A. Apaydin. 2005. Morphological characterisation of white head cabbage (*Brassica oleracea* Var. *capitata subvar. alba*) genotypes in Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 33: 333– 34.
5. Bledsoe, C. S. and P. T. Rygeiwicz. 1986. Ectomycorrhizas affect ionic balance during ammonium uptake by douglas-fir root. *New Phytologyist* 106: 271-283.
6. Brown, J. R. 1966. Soil fertilization and nitrate accumulation in vegetables. *Agronomy Journal* 58: 209- 212.
7. Bunea, A., M. Andjelkovic, C. Socaciu, O. Bobis, M. Neacsu, R. Verhé and J. V. Camp. 2008. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry* 108(2): 649-656.
8. Campbell, W. H. 1999. Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between Biochemistry and Physiology. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 50: 277–303.
9. Cantiliffe, D. J. 1992. Nitrate accumulation in vegetable crops as affected by photoperiod and light duration. *Journal of American Society for Horticultural Science* 97: 414- 418.
10. Cantliffe, D. J. 1972. Nitrate accumulation in spinach cultivars and plant introductions. *Canadian Journal of Plant Science* 53: 365-367.
11. Cataldo, D. A., L. E. Schrader and V. L. Youngs. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6: 71-80.
12. Dejonckheere W., W. Steurbaut, S. Drieghe, R. Verstraeten and H. Braeckman. 1994. Nitrate in food commodities of vegetable origin and the total diet in Belgium (1992–1993). *Microbiology, Foods and Nutrition* 12: 359–370.
13. Dykstra, G. F. 1974. Nitrate reductase activity and protein concentration of two populus clones. *Plant Physiology* 53: 632- 634.
14. Eftekhari, S. A., M. R. Hasandokht, M. R. Fatahi Moghadam and A. Kashi. 2010. Genetic Diversity of Some Iranian Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Landraces Using Morphological Traits. *Iranian Journal of Horticultural Science* 41(1): 83-93.
15. Erfani, F., M. R. Hasandokht, M. Barzegar and A. Jabari. 2006. Determination and Comparison of some nutrients in seven Iranian spinach cultivars. *Iranian Journal of Food Science* 3(2): 27-33.
16. Esfandiari, S., S. A. Eftekhari and M. Heidari. 2011. Influence of nitrogen on nitrate reductase activity in some Iranian land race of spinach (*Spinacia oleracea* L.). 7 th Iran. Cong. of Hort. Sci., Isf. Univ.Technol., Isfahan, Iran.
17. Epstein, E. 1972. Mineral Nutrient of Plants: Principles and Perspectives. John Wiley Pub., New York.
18. Grevsen K. and K. Kaack. 1996. Quality attributes and morphological characteristics of spinach (*Spinacia oleracea* L.) cultivars for industrial processing. *Journal of Vegetable Crop Production* 2(2): 15-29.

19. Huber, S. C. and J. L. Huber. 1995. Metabolic activity of spinach leaf nitrate reductase. Effects on enzymatic activity and de-phosphorylation endogenous phosphatase. *Planta* 196: 180-189.
20. Jaworska, G. 2005. Content of nitrates, nitrites and oxalates in New Zealand spinach. *Food Chemistry* 89: 235-242.
21. Kaminishi, A. and N. Kita. 2006. Seasonal changes of nitrate and oxalate concentration in relation to the growth rate of spinach cultivars. *HortScience* 41(7): 1589-1595.
22. Kunicki, E., A. Grabowska1, A. Sękar and R. Wojciechowska. 2010. The effect of cultivar type, time of cultivation, and biostimulant treatment on the yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Folia Horticulturae* 22 (2): 9-13.
23. Lorenz, O. A. 1978. Potential nitrate levels in edible plant parts. PP.201-219. *In:* Nielsen, D. R. and J. G. Mac Donald (Eds.), Nitrogen in Environment. Academic Press., London.
24. Malakooti, M. 1992. Effect of nitrogen fertilizer on nitrate accumulation in vegetable farms of Iran. Final Report. Agricultural Research and Education Organization Publication. Tehran, Iran. 36 P.
25. May, A. 2007. Plant density and nitrogen and potassium fertilization rates on yield of onion hybrids. *Horticultura Brasileria* 25(1): 53-59.
26. Maynard, D. N. and A. V. Barker. 1979. Regulation of Nitrate accumulation in vegetable. *Acta Horticulturae* 93: 123- 129.
27. Min, X., M. Y. Siddigi, R. D. Guy, A. D. M. Glass and H. J. Kronzucker. 1998. Induction on nitrate uptake and nitrate reductase activity in trembling aspen and lodge pole pine. *Plant, Cell and Environment* 21: 1039-1046.
28. Muramato, J. 1999. Comparison of nitrate content in leafy vegetables from organic and conventional farms in California, Santa Cruse, CA 95064,U. S. A. 831/459-2506.
29. Olday, F. C., A. V. Barker and D. N. Maynard. 1976. A physiological basis for different patterns of nitrate accumulation in two spinach cultivars. *Journal of American Society for Horticultural Science* 101(3): 217-219.
30. Olfati – Chirani, J. A., M. Babalar, A. Kashi, A. Dadash Poor and KH. Shahmoradi. 2008. The effects of ammonium and molybdenum on nitrate concentration in two cultivars (species) of greenhouse cucumbers. *Journal of Horticulture Science* 22(1): 69-77.
31. Ramachandran, A., W. Hrycan, J. Bantle and D.Waterer. 2005. Seasonal Changes in Tissue Nitrate Levels in Fall-Planted Spinach (*Spinacia oleracea*). University of Saskatchewan Pub., Canada.
32. Reinin, K., R. Groenwold and A. Bootsma. 1987. Genotypic difference in nitrate content in *Lactuca sativa* L. and related species and correlation with dry matter. *Euphytica* 36: 11-18.
33. Santamaria, P., A. Elia, S. Francesco and E. Tadaro. 1999. A survey of nitrate and oxalate content in fresh vegetable. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:1882-1888.
34. Siddiqi, M. Y., A. D. Glass, T. J. Ruth and T. W. Rufty. 1990. Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of $^{13}NO_3$- influx. *Plant Physiolog* 93: 1426-1432.
35. Staugaitis, G. and R. Dris. 2002. Nitrate levels in vegetables grown in Lithuvani and factors influencing their accumulation. *Plant Nutrition* 12: 187-196.
36. Stewart, G. R., J. A. Lee and T. O. Orebamjo. 1972. Nitrogen metabolism of halophyte: Nitrate reductase activity and utilization. *New Phytologyist* 72: 539- 546.
37. Werner, M., E. Kaiser and N. Behnisch. 1995. Acid- base modulation of nitrate reductase in leaf tissue. *Planta* 196: 1-6.