نشریه دانش آب و خاک / جلد ۲۶ شماره ۴/۱ صفحه‌های ۶۷ تا ۷۸ / سال ۱۳۹۵

تأثیر نیترات آمونیوم و اسیدهای آمینه آزاد بر تجمع نیترات در تربچه قرمز

اکبر حسنی*[1] ، مهدی نورزاده حداد [2]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۴/۲۸

۱- استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۲- استادیار گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Akbar.Hassani@znu.ac.ir

چکیده

مصرف بیش از حد کود نیتروژنی ممکن است باعث تجمع نیترات در سبزیجات گردد. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر کود نیترات آمونیوم و محلول‌پاشی مخلوط اسیدهای آمینه بر عملکرد و تجمع نیترات در تربچه قرمز (*Raphanus sativus*) بود. بدین‌منظور یک آزمایش فاکتوریل برپایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در گلدان‌های پر شده با یک خاک زراعی انجام شد. سه سطح کود نیتروژنی نیترات آمونیوم، N_1 صفر میلی‌گرم، N_2 ٤٥ میلی‌گرم و N_3 ۹۰ میلی‌گرم نیتروژن بر یک کیلوگرم خاک و سه سطح محلول‌پاشی با مخلوط اسید آمینه شرکت ایناگروسا اسپانیا با غلظت، A_1 صفر و A_2 ۱/۵ میلی‌لیتر و A_3 ۳ میلی‌لیتر اسید آمینه در یک لیتر آب اعمال شد. بر اساس نتایج، اثرات متقابل کاربرد کود نیترات آمونیوم و محلول‌پاشی اسیدهای آمینه بر عملکرد و غلظت نیترات معنی‌دار بود. تیمار N_3A_3 با مقدار ۲٤۸۹ گرم در هر گلدان بیشترین عمکرد نسبت به بقیه تیمارها را داشت. با افزایش نیترات آمونیوم، غلظت نیترات در برگ‌ها و غده تربچه افزایش یافت. بیشترین غلظت نیترات در برگ‌ها در تیمار N_3A_1 (٤۳۱ mg kg^{-1} FW) و در غده در تیمار N_3A_2 (۱۳۳۱ mg kg^{-1} FW) مشاهده شد. کاربرد اسیدهای آمینه باعث افزایش نیتروژن کل و کاهش غلظت نیترات در برگ‌ها شد. محلول‌پاشی اسیدهای آمینه با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز و گلوتامین سنتتاز در آسیمیلاسیون نیترات، تجمع نیترات در برگ‌های تربچه را کاهش داد ولی بر غلظت نیترات غده تأثیر معنی‌دار نداشت.

واژه‌های کلیدی: اسید آمینه، تجمع نیترات، سبزیجات، گلوتامین سنتتاز، نیترات ردوکتاز

Effect of Ammonium Nitrate and Free Amino Acids on the Nitrate Accumulation in Radish

A Hassani[1*], M Nourzadeh Haddad[2]

Received: 17 December 2014 Accepted: 18 July 2016
[1-] Assist. Prof., Soil Sci. Dept., Faculty of Agriculture, Univ. of Zanjan, Iran
[2-] Assist. Prof., Dept. of Agriculture, Payame Noor University, Iran
[*]Corresponding Author, Email: Akbar.hassani@znu.ac.ir

Abstract
Overuse of nitrogen fertilizer may result in nitrate accumulation in vegetables. The objective of this study was to determine the effect of Ammonium nitrate fertilizer and foliar application of mixed amino acids on the yield and nitrate accumulation in radish (*Raphanus sativus*). The experiment was based on the randomized complete blocks design and was carried out in pots filled with 6 kg of agricultural soil in factorial form with three replications. Three levels of nitrogen fertilizer (ammonium nitrate), N_1: 0 mg, N_2: 45 mg, N_3:90 mg per one kg of soil and three levels of mixed amino acids (provided by Inagrosa company, Spain) A_1: 0, A_2: 1.5 and A_3: 3 ml per one liter of water were used. Based on the results, the interaction effects of N fertilizer and amino acid application were significant on the yield and nitrate concentration. The results showed that the highest yield was in treatment N_3A_3 (2489 gr per pot) compared with the other treatments. Nitrate concentration in leaves and glands was increased with increasing the amount of ammonium nitrate. The highest concentration of nitrate in leaves was in treatment N_3A_1 (431 mg kg^{-1}FW) and in glands was in treatment N_3A_2 (1331 mg kg^{-1}FW). In leaves, foliar application of amino acid increased the total N and decreased the nitrate concentration. Foliar application of amino acids affected the nitrate reductase and glutamine synthetase and decreased the nitrate accumulation in leaves but had no effect on nitrate concentration of glands.

Keywords: Amino acid, Glutamine synthetase, Nitrate accumulation, Nitrate reductase, Vegetables

مقدمه

وجود نیتروژن برای انجام اغلب فرایندهای حیاتی گیاه لازم و ضروری است. مصرف کود نیتروژنی معمولاً با افزایش سریع و آشکار رشد گیاه همراه است. در صورت مصرف بهینه کود نیتروژنی غیرآلی، مشکلی در کیفیت محصولات کشاورزی دیده نخواهد شد (استفانلی و همکاران ۲۰۱۲)، ولی مصرف بی‌رویه کود نیتروژنی معدنی، بر چرخه نیتروژن در محیط زیست اثر گذاشته و موجب برخی نابسامانی‌ها می‌شود. تجمع نیترات در گیاهان یکی از این نابسامانی‌ها است (پاولسون و همکاران ۲۰۰۸).

در بیشتر گونه‌های گیاهی، سلول‌های ریشه، ساقه و برگ قادر به تبدیل نیترات به اسید آمینه هستند. میزان و سرعت تبدیل، به نوع گیاه، مقدار نیترات، سن گیاه و شرایط محیطی بستگی دارد. وقتی غلظت نیترات جذب شده پایین باشد، بخش عمده آن در درون ریشه احیا شده و به ترکیباتی همچون اسیدهای آمینه تبدیل می‌شود که در نهایت ساختار اصلی پروتئین را می‌سازند. با افزایش میزان جذب نیترات، ظرفیت احیای آن در ریشه‌ها

کاهش یافته و بخشی از نیتروژن کل به‌صورت نیترات به اندام‌های هوایی منتقل می‌گردد. به‌همین ترتیب ظرفیت احیای نیترات در اندام‌های هوایی نیز محدود بوده و با افزایش فراهمی نیترات، مقداری از نیتروژن کل گیاه به‌شکل نیترات در گیاه باقی می‌ماند (به نقل از ملکوتی و همایی ۱۳۸۳). با مصرف گیاهانی که مقدار نیترات آن‌ها بالا باشد، ممکن است مقدار دریافت آن از حد مجاز دریافت روزانه انسان (٤٢٠ میلی‌گرم در روز) بر اساس استاندارد USEPA فراتر رود که در این حالت زیان‌بار است (پاولسون و همکاران ۲۰۰۸). تبدیل نیترات به نیتریت در دستگاه گوارش، منجر به سمیت نیتریت به‌ویژه در نشخوارکنندگان و نوزادان می‌گردد. مشخص‌ترین علائم مسمویت حاد بیماری مت‌هموگلوبینمیا است که در آن هموگلوبین خون به مت‌هموگلوبین تبدیل می‌گردد و درنتیجه انتقال اکسیژن در بدن مختل شده و مشکل خفگی به‌ویژه در نوزادان بروز می‌کند و ممکن است به مرگ نیز منجر شود. همچنین در اثر تداوم مصرف سبزیجات محتوی نیترات زیاد، در داخل معده نیتریت با ترکیبات آمینی تولید نیتروزآمین می‌نماید که یک ماده سمی و سرطان‌زا است (ملکوتی و همایی ۱۳۸۳).

به طور کلی عوامل زیادی همچون نوع و سن گیاه، نور کم و دمای زیاد، مقدارکود، نوع کود و سرعت آزاد شدن و روش مصرف کود بر تجمع نیترات اثر می‌گذارند (سکرک و کایا ٢٠١٤). با اصلاح و تغییر در هریک از این عوامل می‌توان تجمع نیترات در گیاهان را کنترل کرد. استفاده از اسیدهای آمینه به‌عنوان یکی از محصولات اولیه احیای نیترات با عملکرد خودتنظیمی بر آنزیم‌های مؤثر در آسیملاسیون نیتروژن می‌تواند بر جذب و تجمع نیترات مؤثر باشد. با توجه به تولید انبوه اسیدهای آمینه در کارخانجات از منابع متعدد گیاهی و جانوری و کاهش قیمت تمام شده محصول، کاربرد اسیدهای آمینه در کشاورزی گسترش یافته است (ملکوتی و همایی ۱۳۸۳).

تأثیر کاربرد اسیدهای آمینه در گیاهان توسط پژوهش‌گران مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. اکنون مشخص شده است که گیاهان قادرند از اسیدهای آمینه به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده کنند (تساوالتزیس و همکاران ٢٠١٤). اسیدهای آمینه بر جذب نیترات از خاک تأثیر گذاشته و با تغییر فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز، نیتریت ردوکتاز و گلوتامین سنتتاز باعث کاهش و یا افزایش آن می‌شوند (اسلام و همکاران ۲۰۰۱). لیو و همکاران (٢٠١٤ و ۲۰۰۸) گزارش کردند که این ترکیبات بر فعالیت آنزیم‌های مؤثر در آسیمیلاسیون نیتروژن در گیاه تأثیر گذاشته و منجر به کاهش تجمع نیترات در گیاه می‌شوند.

تربچه قرمز (*Raphanus sativus*) از سبزیجاتی است که مصرف تازه‌خوری دارد و در سفره بیشتر ایرانیان موجود است. این گیاه دوره رشد کوتاهی داشته و به‌راحتی می‌توان فرآیند تجمع نیترات در برگ‌ها و ریشه‌های آن را با تکرارپذیری بالا مورد بررسی قرار داد. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر کاربرد کود نیترات آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن معدنی و محلول‌پاشی اسیدهای آمینه به‌طور هم‌زمان بر تجمع نیترات و فعالیت آنزیم‌های مؤثر بر آسیمیلاسیون آن در گیاه تربچه قرمز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش بر روی گیاه تربچه قرمز به‌روش گلدانی در جعبه‌های پلاستیکی با عمق ۳۰ سانتی‌متر انجام شد. برای پر کردن جعبه‌ها از یک نمونه خاک زراعی واقع در شهرستان اسلامشهر استان تهران استفاده شد. برخی ویژگی‌های خاک مورد آنالیز و توصیه کودی در جدول ۲ ارائه شده است. بذرها در تاریخ ۲۵ مرداد کاشته شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. استفاده از طرح بلوک‌های کامل به‌دلیل توزیع ناهمگن نور بر سطح گلدان‌ها بود. سه سطح نیتروژن، N_1 صفر میلی‌گرم، N_2 ٤٥ میلی‌گرم و N_3 ۹۰ میلی‌گرم نیتروژن در هر کیلوگرم خاک (معادل با صفر، ۲۰۰ و ٤٠٠ کیلو گرم نیتروژن در هر هکتار خاک) از منبع نیترات آمونیوم در چهار قسط روز هفتم پس از کشت، روز پانزدهم (ابتدای غده‌دهی)، روز بیست و پنجم (بزرگ شدن غده‌ها) و روز سی و دوم (ابتدای برداشت) اعمال

شد. کاربرد کود نیتروژنی در ابتدای برداشت در سبزیجاتی که محصول آن‌ها اندام رویشی است به منظور افزایش عملکرد رایج می‌باشد. همچنین سه سطح محلول‌پاشی با مخلوط اسید آمینه محصول شرکت ایناگروسا اسپانیا با غلظت A_1 صفر (بدون محلول‌پاشی)، A_2 ۱/۵ میلی‌لیتر در لیتر و A_3 ۳ میلی‌لیتر در لیتر اعمال شد. در هر بار محلول‌پاشی مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول رقیق و آماده برای هر گلدان مورد استفاده قرار گرفت. این محلول‌پاشی در شش مرتبه ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۲ روز پس از کشت اعمال شد. ترکیب و نسبت انواع اسیدهای آمینه در فرآورده مایع محتوی مخلوط اسیدهای آمینه در جدول ۱ نشان داده شده است. کوددهی سایر عناصر با توجه به توصیه کودی و آزمون خاک انجام شد. بر این اساس مقدار ٦٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم گوگرد عنصری، ١٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم کلات آهن EDDHA و ۲۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات پتاسیم مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). توصیه کودی بر اساس اختلاف از حد بحرانی و نتایج آزمایش-های محلی محاسبه شد (ملکوتی و همایی ۱۳۸۳). برخی ویژگی‌های خاک مورد استفاده در این پژوهش همراه با توصیه کودی در جدول ۲ دیده می‌شود.

جدول۱- غلظت انواع مختلف اسیدهای آمینه در فراورده مایع بکارگرفته شده در این پژوهش.*

اسید آمینه	غلظت (٪)	اسید آمینه	غلظت (٪)
لوسین	١٦/٥	متیونین	٤/٢
گلایسین	١١/٣	سرین	٣/٩
آلانین	١٣/٢	ترئونین	٣/٠
پرولین	٨/٤	هیستیدین	٣/٠
آرژینین	٨/٤	تیروزین	١/٢
لیزین	٥/١	اسیدگلوتامیک	٠/٩
والین	٥/١	گلوتامین	٠/٩
فنیل آلانین	٥/١	سیستئین	٠/٣
اسید اسپارتیک	٤/٥	آسپارژین	٠/٤
ایزولوسین	٤/٥	تریپتوفان	٠/١

***غلظت کل اسیدآمینه در فرآورده مایع ۳۰ درصد می‌باشد.**

جدول ۲- برخی ویژگی‌های خاک مورد استفاده همراه با توصیه کودی بر اساس اختلاف از حد بحرانی و نتایج آزمایش‌ها (ملکوتی و همایی ۱۳۸۳).

ویژگی	مقدار	کود مورد استفاده	مقدار توصیه کودی($mg\ kg^{-1}$)
EC	٠/٩١ $dS\ m^{-1}$	–	–
pH	٧/٣٤	گوگرد	٦٠
کربنات کلسیم معادل	١٤/١ ٪	–	–
بافت	لوم شنی	–	–
کربن آلی	٠/٣٨ ٪	کمپوست	٤٥٠٠
فسفر قابل جذب	٢١ $mg\ kg^{-1}$	–	–
پتاسیم قابل جذب	١٩٥ $mg\ kg^{-1}$	سولفات پتاسیم	٢٢٠
نیتروژن کل	٠/٠٢٨ ٪	طبق تیمارها	طبق تیمارها
آهن قابل جذب	٨/٥١ $mg\ kg^{-1}$	کلات آهنEDDHA	١٦
روی قابل جذب	١/٥٤ $mg\ kg^{-1}$	–	–
منگنز قابل جذب	١٢/٤٥ $mg\ kg^{-1}$	–	–

مس قابل جذب	۲/۲٦ mg kg^{-1}	–	–
بور قابل جذب	۰/۷ mg kg^{-1}	اسید بوریک	۳

اولین نمونه‌برداری به شکل تصادفی در روز شانزدهم از برگ‌ها انجام شد. دومین نمونه‌برداری در روز سی و سوم برای بررسی عملکرد کل ماده تر و همچنین بررسی غلظت نیترات و سایر عوامل مؤثر بر آن در برگ‌ها و غده‌ها انجام شد. وزن تر کل شاخسار هوایی و غده‌ها تحت عنوان عملکرد کل ماده تر بررسی شد.

نمونه‌ها پس از برداشت ابتدا با آب معمولی و سپس با آب دیونیزه به‌دقت شسته شده و صفات عملکرد کل ماده تر، طول بوته و محیط غده اندازه‌گیری شد. محیط غده با دونیم کردن غده‌ها و اندازه‌گیری بزرگترین قطر آن به‌دست آمد. درنهایت میانگین محیط غده‌های هر گلدان مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری نیتروژن کل در غده‌ها و برگ‌ها به‌طور جداگانه به‌روش کجدال انجام شد (کارلا ۱۹۹۸). نیترات نیز در غده‌ها و برگ‌ها به‌روش عصاره‌گیری با اسید استیک و قرائت به‌روش رنگ‌سنجی و ایجاد کمپلکس رنگی آمینوآزو و با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد (کارلا ۱۹۹۸).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها، تکه‌های تازه نمونه‌ها همراه با محلول عصاره‌گیری با نسبت ۱ به ۵ جرمی ـ حجمی در دمای صفر درجه سلسیوس توسط آسیاب خرد شدند. محلول عصاره‌گیری شامل محلول فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار بافر شده در pH برابر با ۷/۵ و محتوی ۲ میلی‌مولار EDTA، ۱/۵ درصد کازئین محلول، ۲ میلی‌مولار دی تیوتریتول(DTT) و یک درصد پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون (PVP) بود. مخلوط حاصل صاف شده و به‌مدت ۵ دقیقه و ۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد. محلول صاف رویی مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه و ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا شده و فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز (NR)، نیتریت ردوکتاز (NiR) و گلوتامین سنتتاز (GS) در این عصاره اندازه‌گیری شد.

فعالیت آنزیم NR به‌روش کایزر و لویس (۱۹۸٤) انجام شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم NR، ۰/۲ میلی-لیتر از عصاره به‌دست آمده همراه با ۰/۱ میلی‌لیتر بافر پتاسیم‌فسفات (pH=7.5)، ۰/۱ میلی‌لیتر NADH (mg ml^{-1}) و ۰/۲ میلی‌لیتر نیترات پتاسیم ۰/۱ مولار با آب دیونیزه به حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوباتور نمودن در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، واکنش با اضافه نمودن یک میلی‌لیتر سولفانامید (یک درصد جرمی – حجمی در اسید هیدروکلریک ۱/۵ مولار) و یک میلی‌لیتر اِن‌یک‌نفتیل‌اتیلن‌دی‌آمین‌دی‌هیدروکلراید متوقف شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و محلول رویی جمع‌آوری شد. غلظت نیتریت تولید شده در این محلول به‌روش رنگ سنجی در طول موج ٥٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سه تکرار از هر نمونه انجام شد. فعالیت آنزیم NR بر اساس میکروگرم نیتریت تولید شده در یک گرم بافت تازه گیاهی در مدت یک ساعت بیان شد.

فعالیت آنزیم NiR بر اساس میزان کاهش غلظت نیتریت در محیط واکنش اندازه‌گیری شد. غلظت نیتریت پس از انکوباتور کردن محلول بالا در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه، به‌روش رنگ‌سنجی و پس از تشکیل کمپلکس آزو با سولفانیل آمید و اِن‌یک‌نفتیل‌اتیلن-دی‌آمین‌دی‌هیدروکلراید در طول موج ٥٤۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم NiR نیز بر مبنای مقدار نیتریت کاسته شده در هر گرم بافت گیاهی تازه در یک ساعت بیان شد (کایزر و لویس ۱۹۸٤).

فعالیت آنزیم GS نیز به‌روش رنگ‌سنجی پس از ایجاد کمپلکس گلوتامیل هیدروکسیمات در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (کایزر و لویس ۱۹۸٤). فعالیت این آنزیم بر مبنای میکروگرم گلوتامیل هیدروکسیمات در یک گرم وزن تازه بافت گیاهی در یک ساعت بیان شد.

تجزیه آماری نمونه‌ها با نرم‌افزارهای SAS و MSTATC و همچنین مقایسه میانگین‌ها به‌روش دانکن در سطح یک درصد انجام شد.

نتایج

برخی ویژگی‌های مرتبط با عملکرد

نتایج تجزیه واریانس تیمارها در جدول ۳ دیده می‌شود. اثر متقابل نیتروژن و اسیدآمینه بر وزن کل ماده تر در سطح یک درصد معنی‌دار بود. همچنین میانگین نتایج حاصل از بررسی صفات کمّی تیمارهای مختلف در جدول ٤ دیده می‌شود.

جدول ۳- تجزیه واریانس برخی صفات برگ و غده در روز سی و سوم تحت تاثیر تیمارهای اعمال شده.

	منابع تغییرات	بلوک	نیتروژن	اسید آمینه	نیتروژن × اسیدآمینه	خطا	ضریب تغییرات
	درجه آزادی	۲	۲	۲	٤	١٦	
میانگین مربعات	GS غده	٥١/٦٧^{ns}	٨٩٧**	٠/٢٣^{ns}	٠/٤٥^{ns}	٦٥/٥٨	٨/١٢
	NiR غده	٢/٢^{ns}	١١/٧**	٠/٠٠٧^{ns}	٠/٠٢^{ns}	١/٤٩	٩/٩٠
	NR غده	١/٣٥^{ns}	٩/٨**	٠/١٤^{ns}	٠/٠٠٩^{ns}	١/٤٥	١٠/١١
	N کل غده	٠/٣٢^{ns}	١/٩٢**	٠/٠٦٨^{ns}	٠/٠٠٣^{ns}	٠/٢٣	٩/٦٧
	نیترات غده	٤/٥^{ns}	٢٣/٢**	٠/٢١^{ns}	٠/٠٥٦^{ns}	٣/١٢	٨/٥٨
	GS برگ	٢١١/٣١^{ns}	٢٤٢٦**	١٢٣٤**	١٠٥٦**	١٥٤/١٢	١١/٢١
	NiR برگ	٤/٢٣^{ns}	٣٤/٧**	٠/٠٤^{ns}	٠/٠٨^{ns}	٥/٢٣	٦/٣٤
	NR برگ	١/٦٨^{ns}	١٩/٨**	٢١/٣**	١٥/١**	٢/٢٧	٩/٨٩
	N کل برگ	١/١^{ns}	٢/٣٢**	١/٢٤*	١/١١*	٠/٣٤	٥/٣١
	نیترات برگ	٩/١^{ns}	٧٢/٣**	٥٣/١**	٣٣/٨**	٤/٩٨	٦/٦٨
	محیط غده	١/٠١^{ns}	٤/٤٣**	٠/٠٠١^{ns}	٠/٠٠٣^{ns}	٠/٦٨	١١/٧٦
	ارتفاع بوته	٣/١^{ns}	١١/٥**	٠/٠٠٤^{ns}	٠/٠٠١^{ns}	١/٨	٧/٥٩
	عملکرد	١٥٧٤/١^{ns}	٨٤٧٧٨**	٦٥٣٤**	٢٤٧٧**	٨٢٢/٠٩	٨/٢١

***، ** و ns: بترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و غیر معنی‌دار.**

جدول ۴- نتایج برخی ویژگی‌های مرتبط با عملکرد در تیمارهای مختلف.*

تیمار	وزن کل ماده تر (gr pot^{-1})	ارتفاع بوته (cm)	محیط غده (cm)
N_1A_1	١١٤٣ a	١٣/٤ a	٥/٣ a
N_1A_2	١٣٣٣ b	١٣/٦ a	٥/٣ a
N_1A_3	١٣٢١ b	١٣/٢ a	٥/٦ a
N_2A_1	١٩٠٨ c	١٧/٨ b	٨/٠ b
N_2A_2	٢٢٩٨ d	١٧/٨ b	٧/٣ b
N_2A_3	٢٢٨٢ d	١٧/٥ b	٧/٣ b
N_3A_1	٢٣٥٤ d	٢٢/٠ c	٧/٧ b
N_3A_2	٢٤٨٩ e	٢١/٧ c	٨/٠ b
N_3A_3	٢٤٢٦ e	٢١/٩ c	٨/٦ b

***اختلاف بین تیمارهای با حروف متفاوت در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد.**

در سطح اول نیترات آمونیوم، مصرف اسیدهای آمینه منجر به افزایش عملکرد شد. در سطح دوم نیتروژنی، محلول‌پاشی با اسیدهای آمینه با غلظت یک و نیم میلی‌لیتر بهترین نتیجه حاصل گردیده است. در سطح سوم نیترات آمونیوم، مقدار بالای محلول‌پاشی با اسید آمینه (سه در هزار) نتیجه مطلوب‌تری داده است. از میان تیمارهای نه‌گانه، تیمار N_3A_3 بیشترین عملکرد و تیمار N_1A_1 کمترین عملکرد را داشته‌اند. به نظر می‌رسد با افزایش دسترسی گیاه به نیتروژن، افزایش غلظت اسید آمینه مؤثرتر باشد. تأثیر نیتروژن در سطح یک درصد در افزایش طول بوته‌ها مؤثر بود و بیشترین مورد در سطح سوم کود نیترات آمونیوم دیده شد. مصرف کود نیتروژنی باعث بزرگ‌تر شدن محیط غده گردید. در این مورد بین سطح دوم و سوم کاربرد نیترات آمونیوم اختلاف معنی‌دار وجود نداشت.

غلظت نیترات و فعالیت آنزیم‌های مرتبط در روز شانزدهم

غلظت نیترات و نیتروژن کل در برگ‌ها در روز شانزدهم در جدول ۵ دیده می‌شود. رابطه معنی‌دار در سطح یک درصد بین اثر متقابل نیتروژن و اسیدآمینه وجود دارد. بیشترین سطح نیترات در تیمار N_3A_1 دیده شد که در آن بیشترین مقدار کود نیتروژنی مصرف شده و هیچ‌گونه محلول‌پاشی اسید آمینه صورت نگرفته است. کمترین مقدار نیز متعلق به تیمارهای N_1A_2 و N_1A_3 می‌باشد که در آن کود نیتروژنی مصرف نشده و فقط محلول‌پاشی اسیدهای آمینه انجام شده است. تجزیه آماری در این مرحله نشان می‌دهد که مصرف اسیدهای آمینه به‌طور هم‌زمان باعث افزایش نیتروژن کل در برگ‌ها و کاهش مقدار نیترات در آن‌ها شده است. در تیمار N_3A_2 این مسئله به خوبی دیده می‌شود که با وجود مصرف مقدار زیاد کود نیتروژنی، با محلول‌پاشی اسیدهای آمینه از سطح تجمع نیترات کاسته شده و تقریباً به کمتر از نصف تیمار N_3A_1 رسیده است که در آن با همین مقدار مصرف نیتروژن هیچ‌گونه محلول‌پاشی کود نیتروژنی صورت نگرفته است.

جدول ۵- تأثیر تیمار با مخلوط اسیدهای آمینه و کود نیتروژنی بر غلظت نیتروژن کل (وزن خشک)، نیترات (وزن تر) و فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز(NR)، نیتریت ردوکتاز(NiR) و گلوتامین سینتتاز (GS) بر مبنای وزن تر در برگ‌ها در روز شانزدهم پس از کشت.*

تیمار	نیتروژن کل (%)	نیترات ($mg\ NO_3\ kg^{-1}$)	NR ($\mu g\ NO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$)	NiR ($\mu g\ NO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$)	GS ($\mu g C_5H_{10}N_2O_4\ g^{-1}\ h^{-1}$)
N_1A_1	۱/۰۹ a	۲۰۱ b	٦۲/٦ a	۱٤۸/۳ c	٥۱۲۲ a
N_1A_2	۱/۱۲ a	۱۸٥ a	٦۲/۳ a	۱۲۷/٤ a	٦۷۹۰ c
N_1A_3	۱/۰۸ a	۱۸۲ a	٦۱/٥ a	۱۲۷/۷ a	٥٥٦۳ b
N_2A_1	۱/۲۰ b	۳٦۸ e	٦۹/۸ b	۱٥٥/٦ d	٥۲۱۰ a
N_2A_2	۱/۳۷ c	۳۰۲ d	۷٦/۸ c	۱٤۲/٦ b	٦۸۳۱ c
N_2A_3	۱/٤٤ c	۲۷۷ c	٦۲/٥ a	۱۲۹/۰ a	٦۸۹۲ c
N_3A_1	۱/٥۸ d	٦٥٤ h	۷۳/۷ c	۱٥۳/۸ d	٥٥٤۲ b
N_3A_2	۱/٥٦ d	۳۰۲ d	۸٤/۹ d	۱٦٥/۲ c	۷۳۲۳ d
N_3A_3	۱/٦۲ d	٥۸۸ g	۷٤/٤ c	۱۳۰/۸ a	۷٥٤٦ d

***اختلاف بین تیمارهای با حروف متفاوت در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد.**

در این جدول همچنین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در سلول‌های برگی در روز پانزدهم پس از کشت بر اثر تیمارهای مختلف دیده می‌شود. بیشترین فعالیت این آنزیم در تیمار N_3A_2 می‌باشد که ۳۸ درصد بیشتر از تیمار N_1A_3 (کمترین غلظت) است. غلظت نیترات به‌عنوان یک سیگنال عمل می‌کند. هنگامی که غلظت نیترات در محلول خاک افزایش می‌یابد، جذب آن توسط ریشه‌ها زیاد شده و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در سلول‌ها نیز افزایش می‌یابد. همچنین بر اساس نتایج به‌دست آمده محلول‌پاشی اسیدهای آمینه نیز فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد.

نیتریت تولید شده، از طریق آنزیم نیتریت ردوکتاز به آمونیوم تبدیل می‌شود. داده‌های این آزمایش نتایج مشابه با غلظت NR را در مورد NiR نشان می‌دهد. بیشترین غلظت در تیمار N_3A_2 و کمترین غلظت در تیمار N_1A_3 دیده می‌شود. افزایش غلظت نیترات در خاک و تیمار با اسیدهای آمینه باعث افزایش غلظت آنزیم NiR در برگ‌ها گشته است.

در مرحله بعدی از آسیمیلاسیون نیترات، آمونیوم تولید شده از طریق آنزیم گلوتامین سنتتاز به گلوتامین تبدیل می‌شود که با مصرف ATP همراه است. آنزیم گلوتامین سنتتاز کلیدی‌ترین آنزیم آسیمیلاسیون نیترت در گیاه می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، بیشترین فعالیت این آنزیم در تیمار N_3A_3 به‌دست آمده است. افزایش فراهمی نیترات همراه با محلول‌پاشی اسیدهای آمینه فعالیت آنزیم GS را افزایش داد. با مصرف یکسان کود نیتروژنی، محلول‌پاشی اسید آمینه فعالیت این آنزیم را افزایش داد که بیشترین فعالیت در سطح سوم مصرفی دیده شد.

غلظت نیترات و فعالیت آنزیم‌های مرتبط در روز سی و سوم

نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌ها در روز سی و سوم بر روی برگ و غده تربچه در جدول ٦ و ٧ دیده می‌شود. اثر متقابل نیتروژن و اسیدهای آمینه در غلظت نیتروژن کل و نیترات برگ در سطح یک درصد معنی‌دار است. با افزایش مصرف نیتروژن، غلظت نیتروژن کل و نیترات افزایش یافته است. محلول‌پاشی با اسیدهای آمینه باعث افزایش غلظت نیتروژن کل شده ولی غلظت نیترات را کاهش داده است. بهترین نتیجه در تیمار N_3A_2 دیده می‌شود که در آن غلظت نیتروژن کل افزایش و غلظت نیترات کاهش یافته است.

جدول ۶- تأثیر تیمار با مخلوط اسیدهای آمینه و کود نیتروژنی بر غلظت نیتروژن کل (وزن خشک)، نیترات (وزن تر) و فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز(NR)، نیتریت ردوکتاز(NiR) و گلوتامین سینتتاز (GS) بر مبنای وزن تر در برگ‌ها در روز سی و سوم پس از کشت.*

تیمار	نیتروژن کل (%)	نیترات (mg NO_3 kg^{-1})	NR (µg NO_2 g^{-1} h^{-1})	NiR (µg NO_2 g^{-1} h^{-1})	GS (µg$C_5H_{10}N_2O_4$ g^{-1} h^{-1})
N_1A_1	۰/۸۲ a	۱۲٦ a	٦۸/۳ a	۱۲۱/۹ a	٦۷۲۲ a
N_1A_2	۰/٦٤ a	۱۲۱ a	٦۷/۹ a	۱۲۱/۲ a	۷٤۳۱ b
N_1A_3	۰/۹٤ a	۱۱۸ a	٦۸/۱ a	۱۲۰/٥ a	۷٤۲۰b
N_2A_1	۱/۰۲ b	٤۷٤ c	۷۱/۸ b	۱۳۲/۲ b	۸۷۲۳ c
N_2A_2	۱/۲٥ c	۳٦۸ b	۸۰/۱ c	۱۳۱/۷ b	۹٥٦۷ d
N_2A_3	۱/۰۸ b	۳۸۲ b	۷۹/۰ c	۱۳۲/٦ b	۸۸٥٦ c
N_3A_1	۱/۲٤ c	٦۲۳ d	۷۸/۲ c	۱۳۱/۳ b	۸٤٦۷ c
N_3A_2	۱/٤۸ c	۳٦۳ b	۹٤/٥ d	۱۳۳/٤ b	۹۸٤٦ d
N_3A_3	۱/٤۳ c	٤۳۱ c	۸۲/۷ c	۱۳۰/۱ b	۹۲۳٤ d

***اختلاف بین تیمارهای با حروف متفاوت در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد.**

اثر متقابل نیتروژن و اسیدهای آمینه در مورد آنزیم NR نیز معنی‌دار است. فعالیت این آنزیم با افزایش فراهمی نیتروژن و محلول‌پاشی اسیدهای آمینه افزایش یافته است. در سطح اول تیمار کودی (تیمار شاهد)، محلول‌پاشی اسید آمینه تأثیر چندانی در فعالیت NR نداشته است اما با مصرف کود نیتروژنی، تأثیر محلول-پاشی اسیدهای آمینه روی فعالیت آنزیم NR نیز معنی‌دار شد. سطح دوم محلول‌پاشی اسیدهای آمینه بیشترین فعالیت آنزیم را ایجاد کرد. این در حالی است که اثر متقابل مصرف کود نیتروژنی و محلول‌پاشی اسیدهای آمینه در فعالیت آنزیم NiR معنی‌دار نبود. در این مورد تنها مصرف کود نیتروژنی باعث افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم شد.

اثر متقابل مصرف کود نیتروژنی و محلول‌پاشی اسید آمینه روی فعالیت آنزیم GS در هر سه سطح معنی-دار شد. با مصرف کود نیتروژنی و محلول‌پاشی اسید آمینه، فعالیت این آنزیم افزایش یافت. بیشترین فعالیت در تیمارهای N_3A_2، N_3A_3 و N_2A_2 دیده شد. به نظر می‌رسد سطح دوم محلول‌پاشی اسید آمینه در افزایش فعالیت این آنزیم مؤثرتر باشد.

در مورد غده‌ها، فقط مصرف نیتروژن تأثیر معنی‌دار در غلظت نیتروژن کل و نیترات و فعالیت آنزیم‌های مرتبط با آسیمیلاسیون نیترات داشته است. افزایش مصرف کود نیتروژنی باعث افزایش غلظت نیتروژن کل و غلظت نیترات در غده‌ها شده است اما محلول‌پاشی با اسیدهای آمینه تأثیر معنی‌داری در این روند نداشته است. افزایش فراهمی نیتروژن فعالیت آنزیم‌های مرتبط با آسیمیلاسیون نیترات را افزایش داده است اما محلول‌پاشی برگی اسیدهای آمینه تأثیر معنی‌داری در فعالیت این آنزیم‌ها نداشت.

بحث

بر اساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، کاربرد همزمان مخلوط اسیدهای آمینه و نیترات آمونیوم باعث افزایش رشد و عملکرد شده است. نیتروژن به‌عنوان عنصر کلیدی در رشد رویشی گیاهان مطرح می‌باشد. تأثیر اسیدهای آمینه در افزایش عملکرد نیز توسط پژوهش‌گران گزارش شده است. این افزایش محصول احتمالاً به‌دلیل تأثیر اسیدهای آمینه در تنظیم رشد و افزایش کارآیی مصرف نیتروژن باشد. اسیدهای آمینه به احتمال زیاد در افزایش تولید و فعالیت برخی آنزیم‌های محرک رشد در گیاه نقش مثبت داشته‌اند. از نقش تأثیر اسیدهای آمینه می‌توان به مواردی همچون تنظیم انتقال یون‌ها، تنظیم باز شدن روزنه‌ها، کاهش سمیت فلزات سنگین، انجام عمل سیگنالینگ (ها سلر و همکاران ۲۰۱٤) و عمل به‌عنوان اسمولیت اشاره کرد (انجام و همکاران ۲۰۱٤).

جایگزین کردن نیتروژن آلی بجای نیتروژن معدنی قادر به تأمین بخشی از نیتروژن مورد نیاز گیاه می‌باشد. اسیدهای آمینه از طریق ریشه و سطح برگ جذب می-شوند و بدون انجام عمل احیا وارد ساختار پروتئین‌ها می‌گردند (تساوالتزیس و همکاران ۲۰۱٤). در پژوهشی لیو و همکاران (۲۰۰۸) در آزمایش روی تربچه برگی افزایش ۱٤-۳۲ درصدی در مقدار نیتروژن کل در گیاهانی که با اسیدهای آمینه در غلظت‌های پایین (۰/۷۵ گرم در متر مربع) تیمار شده بود را گزارش کردند. همچنان لیو و همکاران(۲۰۰۷) در آزمایش دیگری نشان دادند که تیمار فلفل قرمز با مخلوط اسیدهای آمینه باعث افزایش ۳/۵ برابری در جذب نیتروژن می‌شود. در پژوهش دیگری چن و گائو (۲۰۰۲) گزارش دادند که تیمار کلم چینی و کاهو با اسیدهای آمینه باعث افزایش غلظت نیتروژن کل در گیاه می‌شود. نتیجه مشابهی در گیاه *Catasetum fimbriatum* (خانواده ارکیده) نیز دیده شده است (ماجروویکز و همکاران ۲۰۰۰).

جدول۷- تأثیر تیمار با مخلوط اسیدهای آمینه و کود نیتروژنی بر غلظت نیتروژن کل (وزن خشک)، نیترات (وزن تر) و فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز(NR)، نیتریت ردوکتاز(NiR) و گلوتامین سینتتاز (GS) بر مبنای وزن تر در غده‌ها در روز سی و سوم پس از کشت.*

تیمار	نیتروژن کل (٪)	نیترات ($mg\ NO_3\ kg^{-1}$)	NR ($\mu g\ NO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$)	NiR ($\mu g\ NO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$)	GS ($\mu gC_5H_{10}N_2O_4\ g^{-1}\ h^{-1}$)
N_1A_1	۰/۷۲ a	۸۱٤ a	۱۲/۸ a	۲۲/٥ a	۱۳٥۱ a
N_1A_2	۰/۷۷ a	۸۱۸ a	۱۲/٦ a	۲۲/۳ a	۱۳۱٤ a
N_1A_3	۰/۸۱ a	۸۲۷ a	۱۲/۷ a	۲۲/۱ a	۱۳۰۸ a
N_2A_1	۰/۸۰ a	۱۰٥٤ b	۱٥/۹ b	۲۸/۸ b	۱٥۸۷ b
N_2A_2	۰/۸۲ ab	۱۰٥٦ b	۱٥/۰ b	۲۸/۹ b	۱٥۲۷ b
N_2A_3	۰/۸۳ ab	۱۰۳۸ b	۱٦/۰ b	۲۸/۰ b	۱٥۲۱ b
N_3A_1	۰/۹۱ c	۱۳۱۱ c	۱٦/٤ b	۳٥/۸ c	۱۸۹۷ c
N_3A_2	۰/۸۷ b	۱۳۳۱ c	۱٦/۳ b	۳٥/۹ c	۱۸۹۱ c
N_3A_3	۰/۸٤ ab	۱۳۰٥ c	۱٦/٤ b	۳٥/۳ c	۱۸٦۳ c

***اختلاف بین تیمارهای با حروف متفاوت در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد.**

کاربرد کود نیترات آمونیوم اگرچه در افزایش عملکرد مؤثر بود اما هم‌زمان تجمع نیترات در برگ و غده را نیز افزایش داد. در یک پژوهش موباشیر و همکاران (۲۰۱۰) گزارش دادند که با افزایش کاربرد کود نیتروژنی از صفر به ۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در محصول هویج، غلظت نیترات از ۸۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به ۱۳۹۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش یافت. در پژوهشی تساوالتزیس و همکاران (۲۰۱٤) گزارش دادند با مصرف هم‌زمان محلول‌پاشی و مصرف خاکی مخلوط اسیدهای آمینه، غلظت نیترات در برگ‌های کاهو در تیمار شاهد (بدون مصرف کود نیتراتی) و تیمار اسید آمینه تفاوت معنی‌دار نداشتند؛ در حالی‌که در تیمار مصرف کود نیتروژنی نیترات آمونیوم، تجمع نیترات به طور معنی‌دار دیده شد.

تحقیقات نشان داده است که بیشترین مصرف نیترات در غذای روزانه انسان‌ها (بین ٤۰ تا ۹۰ درصد) از طریق سبزیجات صورت می‌گیرد (زیمنس و همکاران ۲۰۰۰). اگر تربچه پرورش یافته در تیمار N_3A_1 (٤۰۰ کیلوگرم نیتروژن) تنها سبزی مصرفی یک فرد بر اساس ٥۰۰ گرم در روز باشد، مقدار ٦۰۰ میلی‌گرم نیترات وارد بدن وی می‌شود. برای یک فرد با وزن ٦۰ کیلوگرم این مقدار بالاتر از حد مجاز (٤۲۰ میلی‌گرم در روز) بر اساس استاندارد USEPA می‌باشد (منزینگا و همکاران ۲۰۰۳). اگرچه در مورد مصرف برگ تربچه این نگرانی وجود نخواهد داشت.

تفسیر تأثیر اسیدهای آمینه در کاهش تجمع نیترات در سبزیجات در میان پژوهش‌گران متفاوت می‌باشد. برخی محققان گزارش کرده‌اند که اسیدهای آمینه به شکل نیتروژن احیا شده در جذب توسط گیاهان نسبت به نیترات ترجیح داده می‌شوند (گونس و همکاران ۱۹۹٤ و ۱۹۹٦) در حالی‌که برخی دیگر نقش اصلی تأثیر آسید آمینه در جذب و آسیمیلاسیون نیترات را به‌دلیل تأثیر آن بر آنزیم‌های مؤثر در متابولیسم نیترات می‌دانند (لیو و همکارن ۲۰۱٤ و ۲۰۰۸).

غالبیت غلظت نیتروژن غیر معدنی در سلول‌ها مانند اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها مرتبط با فعالیت آنزیم‌های اصلی احیای نیترات و آسمیلاسیون آن می‌باشد. نیترات در سیتوزول سلول‌ها از طریق آنزیم نیترات ردوکتاز به

نیتریت تبدیل می‌شود و اولین مرحله از مسیر متابولیکی آسیمیلاسیون نیترات در گیاهان است که با کمک آنزیم انجام می‌گردد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش افزایش فراهمی نیترات در خاک تأثیر مثبت در افزایش غلظت آنزیم NR در برگ‌ها و غده‌ها داشت، در حالی‌که محلول‌پاشی مخلوط اسیدهای آمینه فقط در برگ‌ها تأثیر مثبت در افزایش غلظت آنزیم NR داشت. موبینی و همکاران (۲۰۱٤) گزارش کردند که اضافه نمودن مخلوطی از آرژنین، هیستیدین و اسید آمینه تهیه شده از پودر خون باعث کاهش تجمع نیترات در سوخ گیاه پیاز می‌شود. این کاهش همراه با افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و گلوتامین سنتتاز و افزایش تولید آمونیوم و اسید آمینه در سوخ پیاز می‌باشد. آنان همچنین تاکید کردند که مخلوطی از اسیدهای آمینه تهیه شده از پودر خون در کاهش تجمع نیترات در بالب پیاز مؤثرتر از تیمار جداگانه آرژنین و هیستدین بود. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نظریه تأثیر اسیدآمینه بر فعالیت آنزیم‌های مؤثر بر متابولیسم نیترات را تایید می‌کند.

افزایش فراهمی نیترات موجود در خاک باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آسمیلاسیون نیترات می‌گردد ولی چنانچه نرخ جذب نیترات از نرخ آسیمیلاسیون بیشتر باشد، سلول‌های برگی مقداری نیترات در خود تجمع می‌دهند و در این شرایط محلول‌پاشی اسیدهای آمینه احتمالاً با افزایش غلظت آنزیم‌های درگیر در متابولیسم احیای نیترات، از تجمع آن در سلول‌های برگی می‌کاهند.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از کود نیتروژنی و محلول‌پاشی با مخلوط اسیدهای آمینه باعث افزایش عملکرد در گیاه تربچه می‌شود. با افزایش کاربرد کود نیتراتی، غلظت نیترات در برگ‌ها و غده تربچه افزایش می‌یابد. تجمع نیترات در غده‌ها بیشتر از برگ‌ها بود و مصرف بیش از حد آن باعث ورود بیش از حد مجاز نیترات به بدن انسان می‌شود. کاربرد برگی مخلوط اسیدهای آمینه با تأثیر بر غلظت آنزیم‌های مؤثر در آسیمیلاسیون نیترات، تجمع نیترات در برگ‌های تربچه را کاهش می‌دهد ولی بر غلظت نیترات در غده تأثیر معنی‌دار ندارد.

منابع مورد استفاده

ملکوتی مج و همایی م، ۱۳۸۳. حاصلخیزی خاک‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک، مشکلات و راه‌حل‌ها. تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دفتر نشر آثار علمی، صفحه‌های ٤٥٧ تا ٤٦٣.

Anjum NA, Gill SS, and Gill R, 2014. Plant Adaptation to Environmental Change: Significance of Amino Acids and their Derivatives. Published by CABI, Oxfordshire, UK.

Aslam A, Robert L, Travis D and Rains W, 2001. Differential effect of amino acids on nitrate uptake and reduction systems in barley roots. Plant Science 160: 219–228.

Chen G and Gao X, 2002. Effect of partial replacement of nitrate by amino acid and urea on nitrate content of nonheading Chinese cabbage and lettuce in hydroponics (Chinese). Scientia Agricultura Sinica, 35: 187–191.

Gunes A, Post WNK, Kirkby EA and Aktas M, 1994. Influence of partial replacement of nitrate by amino acid nitrogen or urea in the nutrient medium on nitrate accumulation in NFT grown winter lettuce. Journal of Plant Nutrition. 17: 1929–1938.

Gunes A, Inal A and Aktas M, 1996. Reducing nitrate content of NFT grown winter onion plants (Allium cepa L.) by partial replacement of NO_3^- with amino acid in nutrient solution. Scientia Horticultura 65: 203–208.

Hausler RE, Ludewig F and Krueger S, 2014. Amino acids - A life between metabolism and signaling. Plant Science 229: 225-237.

Kaiser JJ and Lewis OAM, 1984. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate-fed *Helianthus annuus* L. Plant and Soil 70: 127–130.

Karla YP, 1998. Handbook of Reference Methods for Plant Analysis. CRC Press, Washington DC, US.

Liu XQ, Ko KY, Kim SH and Lee KS, 2007. Enhancement of nitrate uptake and reduction by treatment with mixed amino acids in red pepper (*Capsicum annuum* L.). Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science 57: 167-172.

Liu XQ, Ko KY, Kim SH and Lee KS, 2008. Effect of amino acid fertilization on nitrate assimilation of leafy radish and soil chemical properties in high nitrate soil. Communications in Soil Science and Plant Analysis 39: 269–281.

Liu CW, Sung Y, Chen B and Lai H, 2014. Effects of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). International Journal of Environment Research. Public Health 11(4): 4427-4440.

Majerowicz N, Kerbauy GB, Nievola CC and Suzuki RM, 2000. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (orchidaceae) grown with different nitrogen source. Environmental and Experimental Botany 44: 195–206.

Mensinga TT, Speijer S and Meulenbelt GJ, 2003. Implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. Health J. Toxicol. Rev 22: 41–51.

Mobini M, Khoshgoftarmanesh AH and Ghasemi S, 2014. The effect of partial replacement of nitrate with arginine, histidine and a mixture of amino acids extracted from blood powder on yield and nitrate accumulation in onion bulb. Scientia Horticulturae. 176: 232–237.

Mubashir M, Malik SA, Khan AA, Ansari TM, Wright S, Brown MV and Islam KR, 2010. Growth, yield and nitrate accumulation of irrigated carrot and okra in response to nitrogen fertilizer. Pak. J. Bot. 42(4): 2513-2521.

Powlson DS, Addiscott TM and Benjamin N, 2008.When does nitrate become a risk for humans? J. Environ. Qual. 37: 291–5.

Sekerc S and Kaya C, 2014. Nitrate and phytochemicals: may these vary in red and green lettuce by application of organic and inorganic fertilizers? Biological Agriculture and Horticulture 30 (3): 173-182.

Stefanelli DS, Brady S, Winkler RB, Jones J, and Tomkins BT, 2012. Lettuce (Lactuca sativa L.) growth and quality response to applied nitrogen under hydroponic conditions. Acta Agriculturae 927: 353–360.

Tsouvaltzis P, Koukounaras A and Siomos AS, 2014. Application of amino acids improves lettuce crop uniformity and inhibits nitrate accumulation induced by the supplemental inorganic nitrogen fertilization. Int. J. Agric. Biol. 16: 951–955.

Ximenes MIN, Rath S and Reyes FGR, 2000. Polar graphic determination of nitrate in vegetables. Talanta 51: 49–56.