

The effect of different molybdenum levels on some biochemical traits and nitrate accumulation in the spinach plant (*Spinacea oleracea* L.)

Leila Mafton¹, Mahmood Esna-Ashari^{2*}, Masoomeh Amerian³

1- MSc. graduate of Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2- Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences and Engineering, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran

*Corresponding author: m.esnaashari@basu.ac.ir

(Received: 15 October 2023

Revise: 29 November 2023

Accepted: 02 December 2023)

Extended Abstract

- 1. Introduction:** There is significant concern regarding the occurrence of diseases caused by the consumption of vegetables high in nitrate and nitrite, such as spinach. Nitrate accumulation is a common problem in most leafy vegetables and it happens when the amount of nitrate (NO_3^-) absorption exceeds the amount consumed by the plant. Different nitrogen (N) levels significantly affect the activities and expressions of N metabolism enzymes and concentration of mineral elements in crop plants. Molybdenum (Mo) is an essential micronutrient for plants, playing a critical role in various physiological processes, growth, and development. Although plants require molybdenum in very small amounts compared to macronutrients, it is crucial for several key functions within plants. Molybdenum is an essential component of enzymes involved in nitrogen metabolism and other biochemical processes. Molybdenum deficiency affects the amount of nitrogen in plants, and its presence reduces nitrate accumulation in their tissues. This element is an essential part of the nitrate reductase enzyme necessary to reduce nitrate nitrogen to the amino form, resulting in more and effective utilization of nitrogen by plants. Nitrogenase and nitrate reductase, two enzymes crucial to nitrogen-fixing and nitrogen reduction, need molybdenum to carry out their respective activities. Molybdenum is required as a co-factor for nitrogenase enzymes in symbiotic N fixation, where it catalyzes the redox process that transforms elemental N into ammonium (NH_4^+) ions. In this study, the effect of different molybdenum concentration on nitrate accumulation in spinach plant under soilless conditions was investigated.
- 2. Materials and Methods:** This study was conducted as a factorial experiment with two factors in a completely randomized design with three replications. The first factor was the concentration of nitrogen in the form of calcium nitrate salt [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] at three levels including 0 (control), 10 and 20%, and the second factor was molybdenum concentration in the form of sodium molybdate salt [$\text{Na}_2\text{Mo}_4\text{O}$] at four levels including 0 (control), 0.5, 1.5 and 3 μM , all added to the Hoagland's standard solution. Therefore, 12 treatments were applied, and three plants were considered for each replication, so that 108 plants were totally used. Depending on the plants growth rate, the nutrient solution was applied once a day at the beginning of the experiment, but it was increased to 2 times a day at the end of the experiment, when the plants biomass had been increased. The harvesting index in spinach were the size and the number of leaves before flowering, which is recognized as the commercial harvesting stage. Finally, the measured traits included certain biochemical properties, some mineral elements, and the amount of nitrate as well as the activity of nitrate reductase enzyme in root and leaf.
- 3. Results and Discussion:** Based on the obtained results, titratable acidity (TA), soluble solids contents (TSS) and pH increased with increasing molybdenum up to the level of 3 μM , and the simultaneous application of molybdenum and nitrate did not have a significant effect on the mentioned traits. The interaction effect between nitrate and molybdenum on leaf and root nitrate levels, and leaf nitrate reductase enzyme activity was significant at the probability level of 1%. The highest amount of nitrate in leaf (3.2474 g kg^{-1} FW) and root (2.9191 g kg^{-1} FW) was observed in the combined treatment of 20% nitrate and control molybdenum. On the other hand, the highest level of nitrate reductase enzyme activity was observed when 3 and 1.5 μM molybdenum applied for each of three level nitrate. The highest amount

of nitrogen (3.14%), phosphorus (0.064%), iron (0.004%) and potassium (0.78%) elements was obtained from the combined treatment of 3 μM molybdenum and 20% nitrate. The amount of molybdenum element in the control nitrate and 3 μM molybdenum treatment was at its highest level (0.549 mg kg^{-1} FW).

- 4. Conclusion:** In general, the use of sodium molybdate can be recommended as the way to reduce the accumulation of nitrate and, besides, molybdenum enrichment in spinach increases the nutritional value of this plant. Based on the results, the use of molybdenum in nutrient solution had a reducing effect on nitrate accumulation and an increasing effect on nitrate reductase enzyme activity inside the spinach plant. Therefore, adding 3 μM sodium molybdate to the Hoagland nutrient solution in the hydroponic system, can be recommended for growing spinach to achieve the minimum amount of nitrate accumulation.

Keywords: Nitrate reductase, Nitrogen, Soluble solids, Titratable acidity.

Citation: Mafton, I., Esna-Ashari, M & Amerian, M. (2025). The effect of different molybdenum levels on some biochemical traits and nitrate accumulation in the spinach plant (*Spinacea oleracea* L.). *Journal of Vegetables Sciences*, 16(2), 135-152. doi:10.22034/IUVS.2023.2013641.1324

Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).





اثر سطوح مختلف مولیبدن بر برخی صفات بیوشیمیایی و تجمع نیترات در گیاه اسفناج (*Spinacea oleracea* L.)

لیلا مفتون^۱، محمود اثنی عشری^{۲*} و معصومه عامریان^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

*نویسنده مسئول: m.esnaashari@basu.ac.ir

تاریخ پذیرش: (۱۴۰۲/۰۹/۱۱)

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۳

چکیده

نگرانی قابل توجهی در مورد بروز بیماری‌های ناشی از مصرف سبزی‌های حاوی نیترات و نیتريت زياد مانند اسفناج وجود دارد و این هنگامی اتفاق می‌افتد که میزان جذب نیترات از میزان مصرف آن توسط گیاه فراتر رود. در این پژوهش اثر سطوح مختلف مولیبدن بر میزان انباشت نیترات در اسفناج در شرایط کشت بدون خاک بررسی شد. این مطالعه به صورت یک آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گردید. فاکتور اول شامل نیترات به صورت نمک نیترات کلسیم $[Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O]$ در سه سطح شامل صفر (نیترات هوگلند)، ۱۰ و ۲۰ درصد نیترات هوگلند و فاکتور دوم نیز شامل غلظت مولیبدن به صورت نمک مولیبدات سدیم (Na_2MoO_4O) در چهار سطح شامل صفر، ۰/۵، ۱/۵ و ۳ میکرومولار بودند. صفات بیوشیمیایی مورد مطالعه شامل pH، اسیدیته قابل تیتراسیون و مواد جامد محلول) و عناصر غذایی (نیتروژن، فسفر، آهن، پتاسیم و مولیبدن) میزان نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه و برگ بودند. براساس نتایج اسیدیته قابل تیتراسیون، مواد جامد محلول و pH با افزایش مولیبدن تا سطح ۳ میکرومولار افزایش یافت، اما کاربرد هم‌زمان مولیبدن و نیترات اثر معنی‌داری بر صفات مذکور نداشت. بیش‌ترین میزان نیترات برگ (۳/۲۴ گرم در کیلوگرم وزن تر) و ریشه (۲/۹۱ گرم در کیلوگرم وزن تر) در تیمار ترکیبی نیترات ۲۰ درصد و مولیبدن شاهد مشاهده گردید. از طرفی بیشترین میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برگ در مولیبدن ۳ و ۱/۵ میکرومولار و هر سه سطح نیترات بود. بیشترین میزان عناصر نیتروژن (۳/۱۴ درصد)، فسفر (۰/۰۶۴ درصد)، آهن (۰/۰۰۴ درصد) و پتاسیم (۰/۷۸ درصد) در تیمار ترکیبی مولیبدن ۳ و نیترات ۲۰ درصد اضافی مشاهده گردید و میزان عنصر مولیبدن در تیمار مولیبدن ۳ میکرومولار و نیترات شاهد در بیش‌ترین حالت خود (۰/۵۴۹ میلی‌گرم در کیلوگرم) بود. به‌طور کلی کاربرد مولیبدن در محلول غذایی اثر کاهنده روی تجمع نیترات و اثر افزایش‌دهنده روی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در داخل گیاه اسفناج داشت، بنابراین افزودن ۳ میکرومولار مولیبدات سدیم به محلول غذایی هوگلند در سیستم هیدروپونیک برای تولید اسفناج جهت دست‌یابی حداقل میزان انباشت نیترات توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: اسیدیته قابل تیتراسیون، مواد جامد محلول، نیترات ردوکتاز، نیتروژن.

استناد: مفتون، ل.، اثنی عشری، م و عامریان، م. (۱۴۰۳). اثر سطوح مختلف مولیبدن بر برخی صفات بیوشیمیایی و تجمع نیترات در گیاه اسفناج (*Spinacea oleracea* L.). علوم سبزی‌ها، ۱۶(۲)، ۱۳۵-۱۵۲.

حق چاپ:



حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل دسترس است.

مقدمه

نتیجه ظرفیت حمل اکسیژن کاهش و موجب رنگ قهوه‌ای خون، تنگی نفس و تنفس سریع در حیوانات و سندرم کشنده رنگ آبی در کودکان (blue baby syndrome) به‌ویژه کودکان زیر شش ماه شود (Baharipoor et al., 2021). اتحادیه اروپا حداکثر غلظت نیترات برای کشت‌های مزرعه‌ای اسفناج و کاهو (*Lactuca sativa*) را به‌ترتیب ۳۰۰۰-۲۵۰۰ و ۴۵۰۰-۲۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تازه تعیین کرده است. نیترات به‌دلیل پویایی زیاد داخل خاک، آبخوبی شده و اثرات نامطلوبی بر سلامت انسان خواهد داشت (Luetic et al., 2023). طبق تحقیقات انجام شده کود نیتروژن پارامترهای رشد گیاه و تولید بیشتر محصولات را بهبود می‌بخشد (Boussadia et al., 2010). کشاورزانی که از کودهای نیتروژن بالا به‌منظور افزایش عملکرد محصول استفاده می‌کردند، تعادل عناصر غذایی خاک را از بین می‌برند و در نتیجه کیفیت محصول را کاهش می‌دهند (Najm et al., 2013). اسفناج به کود نیتروژن بسیار حساس است و یکی از بالاترین انباشته‌کننده‌های نیترات است (Zeka et al., 2014). Hassani Moghaddam و همکاران (۲۰۱۹) میزان تجمع نیترات در ۴ گونه سبزی شامل تره ایرانی (*Ocimum basilicum*)، نعناع (*Mentha piperita*) و تربچه (*Raphanus sativus*) را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه حاکی از معنی‌دار بودن اثر نوع سبزی بر میزان تجمع نیترات بود و میزان نیترات اندازه‌گیری شده در ۱۰۰ گرم بافت سبزی به‌ترتیب در هیپوکوتیل تربچه (۷/۳۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ریحان (۳/۳۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، تره ایرانی (۲/۷۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، برگ تربچه (۲/۶۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و نعناع (۱/۹۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیشتر از حد مجاز سازمان بهداشت جهانی بود. بخش‌های مختلف سبزی‌ها بر اساس کاهش میزان نیترات به‌ترتیب ساقه، دمبرگ، برگ، ریشه، غده، پیاز و میوه است (Wang et al., 2019).

اسفناج یکی از مهم‌ترین سبزی‌های برگی با نام علمی (*Spinacea oleracea* L.) متعلق به تیره‌ی Chenopodiaceae است. اسفناج می‌تواند تا ۷ درجه سانتی‌گراد زیر صفر را تحمل نماید. در مناطقی که زمستان ملایم است، رشد آن در زمستان بسیار عالی است. در این مناطق کشت اسفناج در اوایل پاییز صورت می‌گیرد (Jalali & Salehi Chegeni, 2020). این سبزی به‌صورت تازه، کنسرو شده یا منجمد استفاده می‌شود که منبع خوبی از ویتامین‌های محلول در آب و محلول در چربی (A, B, C) و مواد معدنی به‌ویژه آهن (Fe) است (Seilsepour, 2020).

در دهه‌های اخیر افزایش تولید محصولات کشاورزی به کودهای شیمیایی به‌ویژه کودهای نیتروژن وابسته بوده است (Ashoori et al., 2024). افزایش روزافزون جمعیت از یکسو و محدودیت منابع غذایی از سوی دیگر موجب گردیده تا جهت تولید بیشتر محصولات کشاورزی روزبه‌روز بر مصرف کودهای شیمیایی افزوده شود و این در حالی است که نه‌تنها مصرف بیش‌ازحد آن‌ها تأثیر مثبتی بر عملکرد نداشته، بلکه سبب تجمع نیترات در آب آشامیدنی، گوشت و مواد غذایی گیاهی به‌ویژه سبزی‌ها می‌گردد. همچنین مصرف بیش‌ازحد کودهای نیترات‌ها سبب ورود نیترات اضافی به آب زهکشی و آب آشامیدنی می‌شود (Amerian, 2023). اهمیت اندازه‌گیری نیترات در سبزی‌های از آنجا ناشی می‌شود که ۸۰ درصد نیترات وارده به بدن از طریق سبزی‌ها تأمین و اندازه‌گیری آن یکی از فاکتورهای مهم در ارزیابی سبزی‌های و خطر استفاده از آن‌ها در انسان و حیوان می‌باشد. پس از خوردن محصولات آلوده به نیترات، این ماده توسط باکتری‌های احیاکننده روده به ماده‌ای سمی و سرطان‌زا به نام نیتروزآمین تبدیل که این ماده نیز می‌تواند سبب سرطان، مخصوصاً سرطان معده در انسان شود (Seilsepour, 2022). نیترات با تبدیل به نیتريت می‌تواند از طریق خون وارد شده و با اکسید نمودن و تبدیل آهن ۲ ظرفیتی هموگلوبین به آهن ۳ ظرفیتی، هموگلوبین را به مت‌هموگلوبین و در

گیاه می‌شود. به طوری که کمبود این عنصر افزایش تجمع نیترات در بافت‌ها و کاهش عملکرد گیاهان را در پی دارد. به عبارت دیگر افزایش مولیبیدن سبب کاهش تجمع نیترات می‌شود (Min et al., 2010). مصرف زیاد نیتروژن در محلول غذایی نه تنها عملکرد را کاهش می‌دهد بلکه تأثیر منفی بر کیفیت محصولات گلخانه‌ای داشته و باعث تجمع نیترات در بافت‌های گیاه می‌شود. در حالی که مصرف میزان مناسب مولیبیدن باعث افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز شده که باعث احیای نیترات و تبدیل آن به اسیدهای آمینه و در نهایت پروتئین می‌شود و تجمع نیترات را در بافت‌های گیاهی کاهش می‌دهد. لذا در این تحقیق هدف بررسی غلظت‌های مختلف مولیبیدن همراه با نیترات اضافی در محلول غذایی هوگلند بود که میزان تجمع نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه و برگ اسفناج مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

طرح و نحوه اجرای آزمایش

این پژوهش به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول شامل سه سطح نیترات (نیترات هوگلند، ۱۰ و ۲۰ درصد نیترات هوگلند) به صورت نمک نیترات کلسیم و فاکتور دوم نیز شامل چهار سطح مولیبیدن (صفر، ۰/۵، ۱/۵ و ۳ میکرومولار مولیبیدات سدیم) بود که در مجموع ۱۲ تیمار در سه تکرار اعمال شد. در هر واحد آزمایشی یک بوته و برای هر تکرار سه گلدان در نظر گرفته شد که مجموعاً ۱۰۸ بوته مورد استفاده قرار گرفت. میزان نیترات در محلول هوگلند به صورت ۳۳۷/۰۰ گرم نیترات کلسیم (۴۰۰۰ میکرومولار نیتروژن) است. در نتیجه ۱۰ درصد و ۲۰ درصد نیترات هوگلند به ترتیب شامل ۳۹۴/۹۵ گرم نیترات کلسیم (۴۶۸۸ میکرومولار نیتروژن) و ۴۵۲/۹۰ گرم نیترات کلسیم (۵۳۷۶ میکرومولار نیتروژن) است.

بذر اسفناج رقم سناتور (Senator) از مؤسسه فردین کشت البرز تهیه گردید و بذر اسفناج در تاریخ

مولیبیدن یک ریزمغذی ضروری برای گیاهان و حیوانات است و در متابولیسم نیتروژن در گیاهان شرکت می‌کند، زیرا مولیبیدن در سنتز نیترات ردوکتاز و احیای نیترات به نیتريت نقش دارد و کمبود آن بر میزان نیتروژن در گیاهان تأثیر می‌گذارد (Bambara & Ndakidemi, 2010). در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) محلول‌پاشی مولیبیدن (۴۰ گرم در هکتار) به طور قابل توجهی فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز و نیتروژناز را بهبود بخشید که باعث افزایش کل نیتروژن انباشته شد (Biswas et al., 2020). آنزیم نیترات ردوکتاز به عنوان یک آنزیم تنظیمی و محدودکننده مقدار نیترات گیاهی شناخته شده است. نیترات در سیتوزول سلولی گیاهان به وسیله آنزیم نیترات ردوکتاز به نیتريت تبدیل می‌شود. سپس نیتريت به وسیله آنزیم نیتريت ردوکتاز به آمونیوم یا آمونیاک احیا می‌گردد و این ترکیبات به ساختار ترکیبات آلی وارد می‌شوند. از این رو هر عاملی که منجر به کاهش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در گیاه شود، به نحوی با تجمع نیترات در اندام هوایی گیاه ارتباط دارد (Song et al., 2023). در تحقیقی کود دهی توأم نیتروژن همراه با مولیبیدن و منگنز باعث کاهش تجمع نیترات و افزایش عملکرد اسفناج و بهبود کیفیت آن شد (Gadallah et al., 2022). Moncada و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر ۴ سطح مولیبیدن (صفر، ۰/۵، ۱/۵ و ۳ میکرومولار) بر عملکرد و کیفیت خوراکی کاهو، کاسنی (*Cichorium intybus*) و جعفری (*Petroselinum crispum*) را در سیستم هیدروپونیک مورد مطالعه قرار دادند و طبق نتایج به دست آمده کاهش تجمع نیترات در هر سه گیاه به ترتیب به میزان ۱۰۳۹/۲، ۱۰۴۷/۳ و ۱۱۸۱/۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر بود. هم‌چنین افزایش مولیبیدن تا حداکثر ۳ میکرومول در لیتر می‌تواند بدون کاهش عملکرد و صفات مورفولوژیکی باعث افزایش کیفیت خوراکی و کاهش تجمع نیترات در سه سبزی برگی فوق شود. گزارش شده است که تغذیه مولیبیدن باعث افزایش کارایی نیتروژن و کاهش تجمع نیترات در

گرم، مونوپتاسیم فسفات ۱۰۹/۳۹ گرم، سولفات منگنز ۰/۱۳ گرم، سولفات روی ۰/۱۶ گرم، سولفات مس ۰/۰۵ گرم و بوراکس ۰/۹۸ گرم استفاده شد. تغذیه گیاهان با محلول‌های غذایی به صورت روزانه انجام می‌شد و از تاریخ ۱۳۹۹/۱۰/۸ تیماردهی گیاهان آغاز شد. با توجه به میزان رشد بوته‌ها در ابتدا محلول‌دهی یک‌بار در روز صورت می‌گرفت، اما در انتهای دوره رشد به دلیل افزایش توده گیاهی به ۲ بار در روز افزایش یافت. شاخص برداشت گیاه اسفناج اندازه و تعداد برگ‌هاست که مرحله برداشت تجاری و قبل از به گل رفتن این گیاه می‌باشد. محلول‌دهی به مدت ۴۰ روز انجام گرفت که پس از اتمام آن در تاریخ ۱۳۹۹/۱۱/۲۰ نمونه‌های برگ برای اندازه‌گیری صفات مورد نظر شامل صفات بیوشیمیایی (مواد جامد محلول، اسیدیته و pH)، نیترات، نیترات ردوکتاز و برخی از عناصر غذایی (نیتروژن، فسفر، آهن، پتاسیم و مولیبدن) به آزمایشگاه منتقل شدند.

۱۳۹۹/۹/۱۰ پس از ضدعفونی به مدت ۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم یک درصد، به مدت ۴ ساعت در آب مقطر با نسبت (۱:۵) (وزن:حجم) خیسانده شد و سپس در سینی‌های نشاء حاوی کوکوپیت و پرلیت با نسبت حجمی ۱:۱ کشت شدند و نشاءها به مدت تقریباً سه هفته، یک روز در میان با آب مقطر آبیاری شدند تا به مرحله انتقال به گلدان‌ها رسیدند. گیاهان سالم و یکسان پس از جوانه‌زنی و تنک کردن در مرحله دو برگی جهت اعمال تیمارها انتخاب شدند و در تاریخ ۱۳۹۹/۱۰/۴ در گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۵ و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر حاوی بستر کوکوپیت و پرلیت به نسبت مساوی ۱:۱ به صورت نشاکاری واکشت شدند. پس از اطمینان از شروع رشد یکسان و سازگاری گیاهان تیمارهای آزمایش اعمال شدند. در جدول ۱ مقادیر نمک‌های مصرفی جهت تهیه تیمارهای آزمایش ذکر شده است. برای کلیه تیمارها نیترات آمونیوم ۳۲/۹۴ گرم، EDDHA ۱۴/۸۸ گرم، نیترات پتاسیم ۸۵/۷۲ گرم، سولفات پتاسیم ۷۱/۴۵ گرم، نیترات منیزیم ۱۰۳/۳۱

جدول ۱- مقادیر نمک‌های مصرف‌شده (گرم) برای ساخت ۴۰۰ لیتر محلول غذایی

Table 1- The amount of salts used (g) to make 400 L of nutrient solution

Treatment تیمار	Ca(NO ₃) ₂ نمک نیترات کلسیم	Na ₂ MoO ₄ نمک مولیبدات سدیم
Mo ₀ NO ₀	337.00	0
Mo ₀ NO ₁₀	394.95	0
Mo ₀ NO ₂₀	452.90	0
Mo _{0.5} NO ₀	337.00	0.048
Mo _{0.5} NO ₁₀	394.95	0.048
Mo _{0.5} NO ₂₀	452.90	0.048
Mo _{1.5} NO ₀	337.00	0.144
Mo _{1.5} NO ₁₀	394.95	0.144
Mo _{1.5} NO ₂₀	452.90	0.144
Mo ₃ NO ₀	337.00	0.288
Mo ₃ NO ₁₀	394.95	0.288
Mo ₃ NO ₂₀	452.90	0.288

صافی رد شد و آب اسفناج‌ها گرفته شد. سپس چند قطره از آب اسفناج برداشته و روی قسمت شیشه‌ای دستگاه ریخته شد پس از چند لحظه عدد رفاکتومتر قرائت گردید برای نمونه‌های بعدی نیز دستگاه با آب مقطر کالیبره گردید.

اسیدیته کل با استفاده از روش پتانسیل‌سنجی تیتراسیون (Potentionmetric titration) با کمک

صفات بیوشیمیایی

میزان مواد جامد محلول با استفاده از رفاکتومتر دستی آتاگو (مدل N1، ژاپن) در دمای اتاق (۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری شد و مقدار آن برحسب درجه بریکس بیان گردید. بدین‌صورت که مقدار مشخصی از برگ اسفناج توزین و در هاون کوبیده شد تا مرحله‌ای که کاملاً له شدند پس از آن از توری و

خنک شدن نمونه‌ها (۲۰ دقیقه) به آن‌ها ۱۹ میلی‌لیتر سود (NaOH) دو نرمال اضافه شد. پس از آن که نمونه‌ها کاملاً سرد شدند، مقدار جذب آن‌ها در طول موج ۴۱۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (شیماتزو ژاپن، یو وی ۱۲۰۰) قرائت شد و مقدار نیترات بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر به دست آمد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در برگ و ریشه

برای سنجش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ابتدا نیم گرم ماده تر برگ و ریشه اسفناج که در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند، وزن شد. نمونه‌های گیاهی به سرعت با ازت مایع له شد و در لوله‌ی آزمایش ریخته شدند و به لوله‌های آزمایش ۵ میلی‌لیتر محلولی که حاوی نیترات پتاسیم ۱۵۰ میلی‌مولار، پروپانول ۰/۳ درصد و بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار بود اضافه شد. سپس لوله‌ها در بن ماری با درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند، سپس محلول با کاغذ واتمن شماره ۱۴ صاف گردید. یک میلی‌لیتر از محلول برداشته شد و ۰/۵ میلی‌لیتر سولفانلیک اسید (۰/۵ گرم سولفانلیک آمید در ۵۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۳ مولار) به آن اضافه شد و بلافاصله بعد از تکان دادن، ۰/۵ میلی‌لیتر نفتیل اتیلن دی آمید (۰/۲ گرم نفتیل اتیلن دی آمین در ۵۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۳ مولار) برای تولید رنگ صورتی به نمونه‌ها اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه محلول رنگی با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و به مدت ۳ دقیقه با دور ۲۰۵۰ سانتریفیوژ شد تا مایع شفاف به دست آید. سپس جذب در ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل شیماتزو ژاپن، یو وی ۱۲۰۰) خوانده شد. بلانک دستگاه شامل یک میلی‌لیتر عصاره‌ی گیاهی، ۰/۵ میلی‌لیتر نفتیل اتیلن دی آمین و ۵/۵ میلی‌لیتر آب مقطر بود. فعالیت نیترات ردوکتاز بر حسب میکرو مول نیتريت در گرم وزن تر در ساعت محاسبه گردید (Sym, 1984 & Daniel et al., 1981).

هیدروکسید سدیم تعیین گردید. ابتدا ۲ میلی‌لیتر عصاره برگ اسفناج داخل بشر ریخته و با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس تا رسیدن به پی‌اچ نهایی ۸/۱، سود ۰/۱ نرمال اضافه گردید. برای محاسبه مقدار اسیدیته قابل تیتراسیون از فرمول زیر استفاده شد و مقدار عددی آن بر حسب درصد اسید غالب اسفناج (اسید اگزالیک) بیان شد. اسیدیته قابل تیتراسیون با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد و مقدار عددی آن بر حسب درصد اسید اگزالیک بیان گردید (Mohammadi et al., 2017). V : حجم سود مصرفی برای تیتراسیون بر حسب میلی‌لیتر، N : نرمالیت سود مصرفی (۰/۱ نرمال)، $meq.wt$: میلی‌اکی والان اسید اگزالیک (۶۳) و v : حجم نمونه آب اسفناج بر حسب میلی‌لیتر را نشان می‌دهند.

رابطه (۱)

$$TA = ((V \times N \times (meq.wt.) \times 100)) / ((v \times 1000))$$

pH آب برگ اسفناج با استفاده از دستگاه pH متر (مدل AG، ساخت شرکت متروهم، سوئیس) اندازه‌گیری شد. در هر نوبت اندازه‌گیری ابتدا دستگاه با بافرهای ۴ و ۷ کالیبره گردید. سپس الکتروود دستگاه، درون آب اسفناج قرار داده شد و هنگامی که عدد نمایش داده شده ثابت گردید، میزان pH ثبت گردید.

اندازه‌گیری میزان نیترات در برگ و ریشه

برای اندازه‌گیری نیترات از روش اسید سولفوسالسیلیک-سود (Cataldo et al., 1975) استفاده شد. ابتدا نیم گرم ماده تر گیاهی (نمونه‌های برگ و ریشه اسفناج) توزین و در هاون چینی به همراه ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر کوبیده در لوله‌ی آزمایش ریخته شد، سپس ۴۰ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از صاف کردن با کاغذ واتمن شماره ۱۴، ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره‌رویی را برداشته و ۰/۸ میلی‌لیتر معرف سولفوسالسیلیک ۵ درصد (w/v) که از حل شدن ۵ گرم اسیدسالیسیلیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ (۹۶ درصد) تهیه شده بود، اضافه گردید و خوب هم زده شد. بعد از

۰/۵ میکرومولار مولیدات سدیم (۰/۲۷۱٪) نداشت. کمترین میزان اسیدیته قابل در تیمارهای ۱/۵ و ۳ میکرومولار مولیدات سدیم (۰/۱۲۹ و ۰/۱۲۳ درصد) مشاهده شد (شکل ۱). نتایج مقایسه میانگین‌های اثر مولیدین بر مواد جامد محلول اسفناج نشان داد که در هر سه غلظت ۰/۵، ۱/۵ و ۳ میکرومولار مولیدات سدیم میزان مواد جامد محلول نسبت به شاهد افزایش یافته است. بیشترین میزان مواد جامد محلول در تیمار ۳ میکرومولار مولیدات سدیم (۲/۸۰ درج بریکس) و کمترین میزان آن در تیمار شاهد (۰/۹۴ درج بریکس) مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌های اثر مولیدین بر میزان pH مشخص شد که کمترین میزان pH (۶/۶۸) در تیمار شاهد مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار ۰/۵ میکرومولار مولیدات سدیم (۶/۸۱) نداشت و بیشترین pH در تیمار ۳ میکرومولار مولیدات سدیم (۷/۲۲) بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار ۱/۵ میکرومولار مولیدات سدیم (۷/۱۰) نداشت (شکل ۱).

اندازه‌گیری میزان برخی از عناصر در برگ و ریشه در نمونه‌های برگ و ریشه اسفناج، سنجش میزان نیتروژن کل با دستگاه کجدال (KJELDATHERM) کمپانی (gerhardt)، میزان آهن و مولیدین با دستگاه ICP (Optima 7300DV) ساخت شرکت Perkin Elmer کشور آمریکا، فسفر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل شیماتزو ژاپن، یو وی ۱۲۰۰) و پتاسیم با دستگاه فلیم فتومتر (مدل BWB XP کمپانی BWB انگلیس) انجام شد (AOAC, 1990).

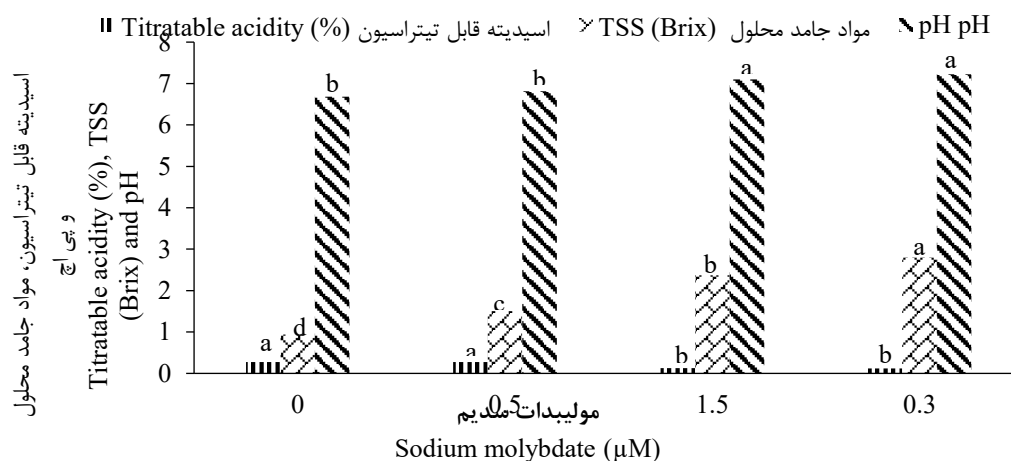
تجزیه آماری داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه شدند و مقایسه میانگین تیمارها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های بیوشیمیایی اسفناج

بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها (شکل ۱)، بیشترین میزان اسیدیته قابل تیتراسیون در تیمار شاهد (۰/۲۷۵٪) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار



شکل ۱- اثر سطوح مختلف مولیدین روی برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی برگ اسفناج

Figure 1- The effect of different levels of molybdenum on some biochemical characteristics of spinach leaf

برخلاف نتایج حاصل از این تحقیق، Sabatino و همکاران (۲۰۱۹) تأیید کردند که کاربرد مولیدین در غلظت‌های ۰/۵، ۲ و ۴ میکرومولار تأثیری بر میزان اسیدیته و محتوای مواد جامد محلول در گوجه‌فرنگی

(*Solanum lycopersicum*) نداشت که می‌تواند ناشی از اثر متقابل مولیدین و ژنوتیپ‌های مختلف بر گیاه باشد. Olfati chirani و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که کاربرد مولیدین با غلظت‌های صفر، ۰/۰۵، ۱ و ۰/۱۵

۳ میکرومولار در لیتر منجر به دستیابی به بالاترین مقدار مواد جامد محلول در کاهو و آندیو شد. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از تأثیر متفاوت دسترسی گیاه به مولیبدن در متابولیسم‌های مختلف گیاهی باشد (Kaiser et al., 2005).

میزان نیترات و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برگ و ریشه

بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیش‌ترین میزان نیترات ریشه (۰/۹۱ گرم در کیلوگرم وزن تر) و برگ (۳/۲۴ گرم در کیلوگرم وزن تر) در تیمار صفر میکرومولار مولیبدات سدیم همراه با ۲۰ درصد نیترات اضافی مشاهده شد. درحالی‌که کم‌ترین میزان نیترات ریشه و برگ در تیمارهای ۱/۵ و ۳ میکرومولار مولیبدات سدیم همراه با صفر درصد نیترات اضافی بود (جدول ۲).

میلی‌گرم در لیتر در سیستم کشت هیدروپونیک خیار (*Cucumis sativus*) تأثیر معنی‌داری بر میزان مواد جامد محلول و اسیدیته قابل تیتراسیون نداشت. La Bella و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند که کاربرد مولیبدن در غلظت‌های ۰/۵، ۲، ۴ و ۸ میکرومولار در گیاه اسفناج تأثیری بر افزایش محتوای مواد جامد محلول نداشت به طوری‌که گیاهان شاهد دارای بالاترین میزان مواد جامد محلول بودند. بر اساس پژوهش Moncada و همکاران (۲۰۱۸) کاربرد مولیبدن (غلظت‌های ۱/۵ و ۳ میکرومولار) در کاهو و آندیو (*Cichorium endivia*) منجر به افزایش میزان مواد جامد محلول و کاهش اسیدیته نسبت به تیمار شاهد (غلظت صفر) شد که مطابق نتایج حاصل از این تحقیق بود. افزایش غلظت مولیبدن در محلول غذایی به میزان

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر مولیبدن و نیتروژن روی میزان نیترات و نیترات ردوکتاز در برگ و ریشه اسفناج

Table 2- The comparison of the average effect of molybdenum and nitrogen on the amount of nitrate and nitrate reductase in spinach leaf and root

تیمار	نیترات برگ	نیترات ریشه	نیترات ردوکتاز برگ
Treatment	Leaf nitrate (g Kg ⁻¹ FW)	Root nitrate (g Kg ⁻¹ FW)	Nitrate reductase leaf (μmol No ⁻² g FW h)
Mo ₀ NO ₀	1.04 ^g	0.90 ^c	602.95 ^f
Mo ₀ NO ₁₀	2.77 ^b	2.63 ^b	615.77 ^f
Mo ₀ NO ₂₀	3.24 ^a	2.919 ^a	602.95 ^f
Mo _{0.5} NO ₀	1.06 ^g	9.21 ^c	3077.39 ^c
Mo _{0.5} NO ₁₀	2.22 ^d	2.08 ^c	2570.96 ^c
Mo _{0.5} NO ₂₀	2.45 ^c	2.31 ^c	2763.28 ^d
Mo _{1.5} NO ₀	1.07 ^g	0.93 ^c	3917.16 ^a
Mo _{1.5} NO ₁₀	1.75 ^{ef}	1.62 ^d	3615.87 ^b
Mo _{1.5} NO ₂₀	1.79 ^c	1.65 ^d	3801.77 ^a
Mo ₃ NO ₀	1.09 ^g	0.95 ^c	3833.83 ^a
Mo ₃ NO ₁₀	1.60 ^{ef}	1.46 ^d	3814.60 ^a
Mo ₃ NO ₂₀	1.56 ^f	1.43 ^d	3795.36 ^a

Mo₀ = صفر میکرومولار مولیبدات سدیم، Mo_{0.5} = ۰/۵ میکرومولار مولیبدات سدیم، Mo_{1.5} = ۱/۵ میکرومولار مولیبدات سدیم و Mo₃ = ۳ میکرومولار مولیبدات سدیم. NO₀ = صفر نیترات کلسیم، NO₁₀ = ۱۰٪ نیترات کلسیم و NO₂₀ = ۲۰٪ نیترات کلسیم

Mo₀ = 0 μmol sodium molybdate, Mo_{0.5} = 0.5 μmol sodium molybdate, Mo_{1.5} = 1.5 μmol sodium molybdate and Mo₃ = 3 μmol sodium molybdate. NO₀ = 0 calcium nitrate, NO₁₀ = 10% calcium nitrate and NO₂₀ = 20% calcium nitrate

حروف همسان در هر ستون و در هر تیمار بیانگر نبود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

The numbers with the same letters in each column are not statistically different at 5 % probability levels.

انتظار می‌رود که محلول‌پاشی مولیبدن باعث بهبود جذب نیتروژن در گیاهان و به دنبال آن کاهش تجمع نیترات در بافت‌های گیاهی و در نهایت منجر به افزایش کمیت و کیفیت عملکرد اسفناج شود (Gadallah et al., 2022). بر اساس گزارش Moncada و همکاران

یکی از روش‌های کشاورزی برای کاهش تجمع نیترات در بافت‌های گیاهی استفاده از مولیبدن است که نقش ارزنده‌ای در متابولیسم نیتروژن در گیاه از طریق تثبیت نیتروژن و انتقال نیتروژن به ترکیبات موجود در گیاهان و در نهایت کاهش تجمع نیترات دارد. بنابراین،

دلیل تأثیر مثبت مولیبدن بر تجمع نیترات اسفناج بوده است. سطوح مولیبدن به‌طور قابل‌توجهی بر تجمع نیترات تأثیر می‌گذارد. کاهش نیترات می‌تواند در دو قسمت گیاه انجام شود، در برگ‌ها، قدرت کاهنده موردنیاز از واکنش نوری فتوسنتز تأمین می‌شود، درحالی‌که در ریشه، یون‌های هیدروژن فعال از تنفس حاصل می‌شود. غلظت‌های بالاتر مولیبدن و آهن مشاهده شده در ریشه‌های ذرت (*Zea mays*) نشان می‌دهد که جذب نیتروژن ممکن است در ریشه‌ها شدیدتر از اندام هوایی باشد. نهال‌های ذرت رشد کرده در محلول غذایی با کمبود مولیبدن فقط دارای ذخایر مولیبدن درون‌زا هستند که امکان فعالیت پایه نیتروژن ردوکتاز را فراهم می‌کند. بر این اساس، غلظت نیتريت در اندام هوایی نسبتاً بالا و غلظت آمونیوم در این شرایط نسبتاً پایین بود. غلظت بالای نیترات در گیاه به‌نوبه خود باعث ایجاد نیترات ردوکتاز می‌شود که منجر به افزایش غلظت آمونیوم می‌شود. این نتایج می‌تواند نشان دهد که علاوه بر مکانیسم جذب نیترات با میل ترکیبی بالا، مقادیر قابل‌توجهی از نیترات توسط مکانیسم‌های جایگزین، مانند واکنش وابسته به ATP از طریق غشای پلاسمایی سلول‌های مویین ریشه گرفته‌شده است؛ بنابراین به نظر می‌رسد که ریشه‌ها در جذب نیتروژن فعال‌تر از اندام‌های هوایی در نهال‌های ذرت هستند (Kovács *et al.*, 2015).

میزان فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز برگ
براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲)، بیش‌ترین فعالیت آنزیم ردوکتاز در برگ اسفناج در تیمار ۳ میکرومولار مولیبدات سدیم (۳۸۳۳/۸۳ میکرومول نیتريت در گرم وزن تر در ساعت) همراه با صفر درصد نیترات اضافی (شاهد) بود که تفاوت معنی‌داری با تیمارهای ۱/۵ میکرومولار مولیبدات سدیم همراه با ۲۰ درصد نیترات اضافی، ۳ میکرومولار مولیبدات سدیم همراه با ۱۰ درصد و ۲۰ درصد نیترات اضافی نداشت. کم‌ترین فعالیت آنزیم ردوکتاز در برگ اسفناج صفر میکرومولار مولیبدات سدیم همراه با ۲۰ درصد نیترات اضافی مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار صفر

(۲۰۱۸) کمبود مولیبدن می‌تواند باعث افزایش تجمع نیترات در بافت‌های گیاهی و کاهش رشد و عملکرد گیاه شود. Gadallah و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که محلول‌پاشی مولیبدن به‌طور قابل‌توجهی فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز و نیتروژناز را بهبود می‌بخشد و کارایی نیتروژن قابل‌دسترس را افزایش می‌دهد. نتایج آن‌ها نشان داد که محلول‌پاشی مولیبدن با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به کاهش محتوای نیترات در گیاه اسفناج شد. بر اساس پژوهش Abbasifar و همکاران (۲۰۲۰) محلول‌پاشی اسفناج با مولیبدن در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر منجر به کاهش غلظت نیترات در برگ‌ها شد و بیش‌ترین تجمع نیترات در برگ گیاهان شاهد به‌دست آمد. Brengi and Abouelsaad (۲۰۱۹) بیان کردند که محلول‌پاشی گیاه اسفناج با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به کاهش محتوای نیترات در برگ‌ها شد. از طرفی آن‌ها بیان کردند که گیاهان از مولیبدن در ساختار آنزیم‌هایی مانند نیترات ردوکتاز برای انجام واکنش‌های ردوکس در متابولیسم نیتروژن استفاده می‌کنند. در پژوهشی در کاهو گزارش شد که محلول‌پاشی مولیبدن بر کاهش محتوای نیترات در برگ‌ها مؤثر بود، به‌طوری‌که با افزایش غلظت مولیبدن میزان نیترات برگ حدود ۳۰ درصد کاهش یافت (Steiner *et al.*, 2018). کاهش تجمع نیترات با کاربرد مولیبدن ناشی از نقشی است که مولیبدن به‌عنوان یک کوفاکتور در فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ایفا می‌کند که منجر به افزایش فعالیت این آنزیم و تبدیل نیترات به نیتريت می‌شود که به دنبال آن تجمع نیترات در برگ گیاه کاهش می‌یابد (Steiner *et al.*, 2018).

مولیبدن نقش کلیدی در سنتز آنزیم نیترات ردوکتاز دارد و کمبود آن منجر به افزایش تجمع نیترات در بسیاری از گیاهان می‌شود. طبق نتایج به‌دست آمده از این تحقیق کاربرد هم‌زمان مولیبدن و نیتروژن باعث کاهش تجمع نیترات در اسفناج شده است که می‌تواند با توجه به توضیحات بالا نتیجه گرفت این کاهش به

قابل توجه در فعالیت نیترات ردوکتاز شود (Abbasifar *et al.*, 2020).

نیتروزن برگ

طبق نتایج مقایسه میانگین بیشترین میزان نیتروزن (۲/۰۸٪) در تیمار ۳ میکرومولار مولیبدات سدیم همراه با ۲۰ درصد نیترات اضافی مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (صفر میکرومولار مولیبدات سدیم همراه با صفر درصد نیترات اضافی) نداشت. کمترین درصد نیتروزن مربوط به تیمارهای ترکیبی مولیبدن صفر (شاهد) و ۰/۵ میکرومولار در هر سه غلظت نیترات اضافی بود که بین تیمارهای مذکور اختلاف معنی‌دار از نظر آماری وجود نداشت (جدول ۳). کشت اسفناج به مقادیر قابل توجهی نیتروزن نیاز دارد تا محصول به‌خوبی رشد کند و برگ‌ها رنگ سبز تیره که مورد نظر مصرف‌کنندگان هست را داشته باشند.

نیتروزن نقش مهمی در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند فنل‌ها، آسکوربات و گلوکاتینون و همچنین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوکاتینون ردوکتاز ایفا می‌کند (Machado *et al.*, 2020). مولیبدن در متابولیسم نیتروزن شرکت می‌کند، علاوه بر این، آن را نمی‌توان با هیچ عنصر دیگری در این فرآیند فیزیولوژیکی جایگزین کرد. به‌طور کلی، نتایج پژوهش حاضر ارتباط بین تغذیه مولیبدن و جذب نیتروزن را نشان داد. در غیاب مولیبدن، کاهش نیترات نیز کاهش می‌یابد که منجر به تجمع نیترات در گیاهان می‌شود. کمبود مولیبدن منجر به متابولیسم نیتروزن نامتعادل می‌شود که با غلظت بسیار بالاتر نیتروزن کل و نیترات مشخص می‌شود. بنابراین، متابولیسم نیتروزن تحت تأثیر وضعیت مولیبدن گیاه قرار می‌گیرد (Kovács *et al.*, 2015). طبق مطالعه Gadallah و همکاران (۲۰۲۲) محلول‌پاشی اسفناج با مولیبدن (غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، میزان عناصر نیتروزن، آهن و پتاسیم را در برگ گیاه نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. Biscaro و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که استفاده از نیتروزن تنها در صورتی می‌تواند عملکرد

میکرومولار مولیبدات سدیم همراه با ۱۰ درصد نیترات اضافی نشان نداد (جدول ۲).

مولیبدن به‌عنوان یک کوفاکتور در سنتز نیترات ردوکتاز است که نقش حیاتی در متابولیسم نیتروزن گیاهان، از جمله فرآیندهای تثبیت نیتروزن، کاهش نیترات و انتقال ترکیبات نیتروزن ایفا می‌کند (Pandey & Dawson, 2023). یک جنبه ضروری مولیبدن به‌عنوان یک ماده مغذی گیاه نقش مهمی است که در کاهش نیترات به‌عنوان یک عامل کمکی به فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ایفا می‌کند (Liu *et al.*, 2020). نیترات ردوکتاز مانند سایر آنزیم‌های مولیبدن در گیاهان یک پروتئین همودایمر (Homodimer Protein) است. هر زیر واحد یکسان قادر است به روشی مستقل در کاهش نیترات عمل کند (Rana *et al.*, 2020) و به‌عنوان یک کاتالیزور در اولین مرحله از مسیر احیا نیترات عمل کرده و نیتريت تولید می‌کند که به‌نوبه خود به آمونیوم احیا می‌شود (Wang *et al.*, 2021). القای نیترات ردوکتاز در گیاهان هم به نیترات و هم به مولیبدن نیاز دارد. اگر هر یک از مواد مغذی کمبود داشته باشد، آنزیم یا وجود ندارد یا فعالیت کمتری دارد. در گیاهان دارای کمبود، القای فعالیت آنزیم توسط مولیبدن بسیار سریع‌تر از القای فعالیت نیترات ردوکتاز توسط نیترات است این نشان می‌دهد که مولیبدن مستقیماً بر مولکول نیترات ردوکتاز تأثیر می‌گذارد زیرا حاوی یک دامنه موکو پترین است. این دامنه برای همه آنزیم‌های موکو به‌استثنای نیتروزناز مشترک است (Rohilla & Yadav, 2020). Elrys و همکاران (۲۰۱۸) بیان کرد که با کمبود مولیبدن در گیاهان، فعالیت نیترات ردوکتاز اغلب کاهش می‌یابد که منجر به ایجاد غلظت بالای نیترات می‌شود. در پژوهشی روی اسفناج بالاترین فعالیت نیترات ردوکتاز در تیمار ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در گرم مولیبدن مشاهده شد و کمترین فعالیت نیترات ردوکتاز در تیمار شاهد بود. استفاده از سطوح مختلف مولیبدن به‌ویژه در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر می‌تواند منجر به افزایش

آنزیم‌ها در جذب اولیه نیتروژن (نیترات ردوکتاز) و متابولیسم گوگرد (سولفیت اکسیداز) دخیل هستند. از آنجایی که مولیبدن در تعدادی از فرآیندهای آنزیمی مختلف دخیل است، پاسخ تعریف شده‌ی گیاه به مولیبدن می‌تواند بسیار پیچیده باشد.

گیاه لوبیا را افزایش دهد که همراه با محلول‌پاشی مولیبدن باشد. به‌طور کلی، نتایج نشان می‌دهد که کمبود مولیبدن می‌تواند متابولیسم نیتروژن را در گیاهان مختل کند و عملکرد را کاهش دهد. مولیبدن توسط آنزیم‌های خاص گیاهی برای شرکت در واکنش‌های اکسیداسیون و احیاء استفاده می‌شود. این

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های اثر غلظت‌های مولیبدن و نیترات روی برخی از عناصر اسفناج

Table 3- Comparison of the averages of the effect of different levels of molybdenum and nitrate on some elements of spinach leaf

تیمار	نیتروژن	فسفر	آهن	پتاسیم	مولیبدن
Treatment	Nitrogen (%)	Phosphorus (%)	Iron (%)	Potassium (%)	Molybdenum (mg Kg ⁻¹ DW)
Mo ₀ NO ₀	2.08 ^g	0.038 ^c	0.001 ^e	0.51 ^e	0.00013 ^f
Mo ₀ NO ₁₀	2.09 ^g	0.037 ^c	0.001 ^e	0.51 ^e	0.00017 ^f
Mo ₀ NO ₂₀	2.09 ^g	0.037 ^c	0.001 ^e	0.52 ^e	0.00013 ^f
Mo _{0.5} NO ₀	2.10 ^g	0.39 ^{bc}	0.002 ^e	0.54 ^e	0.037 ^c
Mo _{0.5} NO ₁₀	2.13 ^{fg}	0.038 ^c	0.002 ^e	0.52 ^e	0.035 ^c
Mo _{0.5} NO ₂₀	2.14 ^{fg}	0.039 ^{bc}	0.002 ^e	0.51 ^e	0.035 ^c
Mo _{1.5} NO ₀	2.20 ^f	0.046 ^{bc}	0.002 ^d	0.59 ^d	0.275 ^c
Mo _{1.5} NO ₁₀	2.54 ^d	0.049 ^b	0.003 ^c	0.65 ^c	0.243 ^d
Mo _{1.5} NO ₂₀	2.85 ^c	0.067 ^a	0.003 ^c	0.70 ^b	0.224 ^d
Mo ₃ NO ₀	2.30 ^e	0.062 ^a	0.002 ^d	0.63 ^c	0.549 ^a
Mo ₃ NO ₁₀	3.04 ^b	0.063 ^a	0.004 ^b	0.72 ^b	0.513 ^b
Mo ₃ NO ₂₀	3.14 ^a	0.064 ^a	0.004 ^a	0.78 ^a	0.503 ^b

Mo₀ = صفر میکرومولار مولیبدات سدیم، Mo_{0.5} = ۰/۵ میکرومولار مولیبدات سدیم، Mo_{1.5} = ۱/۵ میکرومولار مولیبدات سدیم، Mo₃ = ۳ میکرومولار مولیبدات سدیم. NO₀ = صفر نیترات کلسیم، NO₁₀ = ۱۰٪ نیترات کلسیم و NO₂₀ = ۲۰٪ نیترات کلسیم. حروف همسان در هر ستون و در هر تیمار بیانگر نبود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

Mo₀ = 0 μmol sodium molybdate, Mo_{0.5} = 0.5 μmol sodium molybdate, Mo_{1.5} = 1.5 μmol sodium molybdate and Mo₃ = 3 μmol sodium molybdate. NO₀ = 0 calcium nitrate, NO₁₀ = 10% calcium nitrate and NO₂₀ = 20% calcium nitrate. The numbers with the same letters in each column are not statistically different at 5% probability levels.

میزان نیتروژن دیده شد و در غلظت ۱/۵ و ۳ میکرومولار مولیبدات سدیم بیش‌ترین میزان عنصر مذکور ثبت شد، این افزایش احتمالاً به دلیل اثر تیمار مولیبدن بر نیتروژن بوده است و می‌توان گفت که کاربرد مولیبدن تا حدودی توانسته است اثرات منفی نیترات بر کاهش نیتروژن مورد استفاده اسفناج را خنثی کند.

فسفر برگ

طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۳)، در سطوح صفر، ۰/۵، ۱/۵ و ۳ میکرومولار مولیبدات سدیم تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف نیترات اضافی از نظر میزان فسفر برگ اسفناج مشاهده نشد. طبق نتایج Mondal و Nad (۲۰۱۲) جذب فسفر با افزایش سطح نیتروژن در اسفناج افزایش یافت. Rocha و همکاران

هنگام برنامه‌ریزی برای غنی‌سازی مولیبدن، عواقب بالقوه خطرناک این تیمار نیز باید در نظر گرفته شود. اگرچه تجمع بیش از حد مولیبدن منجر به مشکلات متابولیکی یا اثرات سمی گیاهی در گیاهان نمی‌شود. همان غلظت بالای مولیبدن می‌تواند باعث مولیبدنوز شود. در حیوانات خطر ابتلا به این بیماری زمانی که محتوای مولیبدن بیش از ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم باشد به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و این اثر مضر هنگام تغذیه حیوانات مزرعه با گیاهانی که در محیط‌های غنی‌شده با مولیبدن رشد می‌کنند باید در نظر گرفته شود. در این مطالعه عملکرد کاربرد نیتروژن اضافی و مولیبدن باعث افزایش میزان نیتروژن شد که می‌توان گفت با توجه به نتایج بالا که در تیمار شاهد کم‌ترین

افزایش داد نتایج تحقیقات مذکور با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

پتاسیم برگ

با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۳)، بیش‌ترین میزان پتاسیم در تیمار ۳ میکرومولار مولیبیدات سدیم همراه با ۲۰ درصد نیترات اضافی بود. کم‌ترین میزان پتاسیم برگ اسفناج در تیمارهای صفر و ۰/۵ میکرومولار مولیبیدات سدیم همراه با تیمارهای صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد نیترات اضافی مشاهده شد (جدول ۳).

در تحقیق حاضر جذب پتاسیم برگ اسفناج به‌طور قابل‌توجهی با کاربرد نیتروژن اضافی در محلول غذایی هوگلند افزایش یافت (جدول ۳). La Bella و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند که کاربرد مولیبیدن در غلظت‌های مختلف در گیاه اسفناج تأثیری بر غلظت عناصر فسفر و پتاسیم ندارد نتایج تحقیق مذکور با نتایج تحقیق حاضر مغایرت دارد. در پژوهشی به‌منظور تعیین اثرات افزایش مصرف مولیبیدن روی برخی عناصر غذایی گیاه کاهو پیچ در خاک اسیدی که در شرایط گلخانه انجام شد. سه غلظت مختلف مولیبیدن صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵۰ میلی‌گرم در لیتر به گیاهان اعمال شد. بر اساس نتایج، با افزایش کاربرد مولیبیدن، میزان پتاسیم در کاهو پیچ افزایش یافت (Adiloglu et al., 2011). نتایج تحقیق مذکور با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. محلول‌پاشی با مولیبیدات آمونیوم ۰/۵ درصد منجر به افزایش عنصر پتاسیم در نخود (*Cicer arietinum*) و ازگیل ژاپنی شد (Ali et al., 2021; Swami et al., 2021).

مولیبیدن برگ

براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۳)، با افزایش غلظت نیتروژن در محلول غذایی میزان مولیبیدن برگ اسفناج کاهش نشان داد و بیش‌ترین میزان مولیبیدن (۰/۵۴۹ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک) در غلظت ۳ میکرومولار مولیبیدات سدیم همراه با صفر درصد نیترات اضافی (شاهد) مشاهده شد. در سطوح صفر و ۰/۵ میکرومولار مولیبیدات سدیم در هر سه سطح نیترات

(۲۰۲۰) گزارش دادند که کاربرد مولیبیدن با غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر به محلول غذایی هیدروپونیک منجر به افزایش محتوای فسفر برگ در کاهو شد. طبق نتایج تحقیق حاضر، Gadallah و همکاران (۲۰۲۲) تأیید کردند که از مولیبیدن برای تبدیل فسفر معدنی به فسفر آلی در گیاهان استفاده می‌شود، در نتیجه، با محلول‌پاشی مولیبیدن در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان نیتروژن و فسفر در گیاه اسفناج افزایش یافت. Soltani و همکاران (۲۰۰۶) طی تحقیقی مشاهده کردند که با افزایش سطح نیتروژن آمونیومی در محلول غذایی، میزان نیتروژن کل و فسفر بافت‌های برگ افزایش یافت. ایشان اظهار نمودند که حضور آمونیوم در محلول‌ها باعث اسیدی شدن محیط ریشه شده و بر جذب فسفر تأثیر داشته است. آن‌ها هم‌چنین مشاهده کردند که میزان پتاسیم با افزایش نیتروژن آمونیومی کاهش یافت که اثر آنتاگونیسمی عناصر را نشان می‌دهد.

آهن برگ

طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۳)، بیش‌ترین میزان آهن (۰/۰۰۴٪) در تیمار ۳ میکرومولار مولیبیدات سدیم همراه با ۲۰ درصد نیترات اضافی مشاهده شد. کم‌ترین میزان آهن (۰/۰۰۱٪) در تیمارهای صفر میکرومولار مولیبیدات سدیم همراه با صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد نیترات اضافی بود که تفاوت معنی‌داری با تیمارهای ۰/۵ میکرومولار مولیبیدات سدیم همراه با صفر، ۱۰ و ۲۰ درصد نیترات اضافی نداشت (جدول ۳).

غلظت آهن برگ ذرت با افزایش سطح مولیبیدن تغییر معنی‌داری نداشت، اما غلظت آهن ریشه در تیمارهای ۰/۹۶ و ۹/۶ میکروگرم در کیلوگرم مولیبیدن دو برابر شد (Kovács et al., 2015). کاربرد مولیبیدن با غلظت ۲ میکرومولار منجر به افزایش غلظت آهن در برگ‌های گوجه‌فرنگی شد (Sabatino et al., 2019). بر اساس یافته‌های Ali و همکاران (۲۰۲۱) تیمار مولیبیدن با غلظت ۰/۰۵ درصد میزان آهن را در برگ‌های ازگیل ژاپنی (*Eriobotrya japonica*)

و ریشه نیز انجام می‌شود و نشان می‌دهد که مولیبدیت یک ترکیب بسیار متحرک است که بین بافت‌های مختلف گیاه جابه‌جا می‌شود. علاوه بر این، سولفات یک مهارکننده قوی جذب مولیبدات است و غلظت کم سولفات در خاک باعث جذب مولیبدات می‌شود. تنها فرآیندی که به‌طور مستقیم توسط گیاهان به مولیبدن یا مولیبدات نیاز دارد، بیوسنتز موکو است که در میتوکندری آغاز شده و در سیتوزول نهایی می‌شود (Mendel, 2013). بر اساس گزارش Rocha و همکاران (۲۰۲۰) اضافه کردن مولیبدن با غلظت ۰/۱۲ میلی‌گرم در لیتر به محلول غذایی هیدروپونیک، محتوای مولیبدن را در برگ کاهو افزایش داد، نتایج تحقیق مذکور با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. محلول پاشی مولیبدن می‌تواند به‌طور مؤثری در دسترس بودن مولیبدن را برای گیاه افزایش دهد و عملکرد آنزیم‌های مولیبدیک را بهبود بخشد (Gadallah et al., 2022). Steiner و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که محلول پاشی مولیبدن در کاهو میانگین غلظت مولیبدن برگ را در گیاه به میزان ۶۸ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. استفاده از مولیبدن در غلظت‌های ۲ و ۴ میکرومولار میزان مولیبدن را در گوجه‌فرنگی نسبت به شاهد افزایش داد (Sabatino et al., 2019). Li و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده کردند که کاربرد مولیبدن می‌تواند غلظت آهن را در توت‌فرنگی (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. Akihime) افزایش دهد. در واقع بر اساس فرضیه‌ای مکانیسم‌های جذب مولیبدن و آهن ممکن است بر یکدیگر تأثیر بگذارد اکثر آنزیم‌هایی که وابسته به مولیبدن هستند نیز نیاز به آهن دارند. کاربرد مولیبدن به‌صورت برون‌زا منجر به بهبود غلظت مولیبدن در گلابی (*Pyrus communis*) (Abd-El- Latif et al., 2020)، انگور (*Vitis vinifera*) (Longbottom et al., 2010) و بادام‌زمینی (*Arachis hypogaea*) (Soares Filho et al., 2020) شد.

در این مطالعه کاربرد هم‌زمان نیتروژن و مولیبدن باعث افزایش در میزان مولیبدن و سایر عناصر نیتروژن،

اضافی تفاوت معنی‌داری از نظر میزان مولیبدن برگ اسفناج مشاهده نشد (جدول ۳). تیمارهای ترکیبی مولیبدن صفر (شاهد) در هر سه غلظت نیترات اضافی کم‌ترین میزان مولیبدن را داشتند (۰/۰۰۰۱۳، ۰/۰۰۰۱۷ و ۰/۰۰۰۱۳ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک). به‌طور کلی می‌توان چنین گفت که کاربرد مولیبدن در سه غلظت ۰/۵، ۱/۵ و ۳ میکرومولار به همراه نیترات کلسیم در غلظت‌های صفر (شاهد) ۱۰ و ۲۰ درصد توانستند میزان مولیبدن را نسبت به عدم کاربرد مولیبدن در اسفناج بهبود بخشند (جدول ۳).

مولیبدن یک فلز واسطه است که در لیتوسفر با فراوانی متوسط ۱/۲ میلی‌گرم در کیلوگرم در کیلوگرم وجود دارد و یکی از کمیاب‌ترین عناصر کمیاب در سیستم‌های بیولوژیکی است (Kaiser et al., 2005). مولیبدن به‌عنوان یک ریزمغذی ضروری برای گیاهان عالی شناخته شده است. اگرچه فقط در مقادیر کم مورد نیاز است، اما نقش زیادی در سیستم گیاهی دارد؛ مانند سایر فلزات مورد نیاز برای رشد گیاه، مولیبدن توسط آنزیم‌های گیاهی خاص در فرآیند کاهش و واکنش‌های اکسیداتیو استفاده شده است (Mendel, 2013). مولیبدن عمدتاً به شکل مولیبدات وجود دارد که به کوفاکتور مولیبدن (Moco) تبدیل می‌شود. هنگامی که Moco به‌عنوان گروه پروتزی گنجانده شد، به بخشی از محل فعال آنزیم‌های مولیبدو تبدیل می‌شود، جایی که مولیبدن می‌تواند حالت اکسیداسیون خود را بین Mo(IV)، Mo(V) و Mo(VI) تغییر دهد و در آنجا با فعال کردن پروتئین مربوطه به آن می‌تواند تغییر کند. الکترون‌ها و در بیشتر موارد نیز اکسیژن را به یک بستر منتقل می‌کند (Hille, 2013). مولیبدن به‌خودی‌خود از لحاظ بیولوژیکی فعال نیست در نتیجه بخشی جدایی‌ناپذیر از یک کمپلکس آلی پترین به نام مولیبدن کوفاکتور (موکو) است. موکو به مولیبدو آنزیم‌ها (آنزیم‌هایی که به مولیبدن نیاز دارند) که در بیشتر گیاهان عالی یافت می‌شود، متصل می‌شود (Bittner, 2014). قابل ذکر است، زمانی که مولیبدیت صرفاً روی برگ‌ها استفاده می‌شود، انتقال به سمت پایین به ساقه

کاربرد مولیبدن در غلظت‌های ۱/۵ و ۳ میکرومولار مولیبدات سدیم تا حدودی توانست از طریق افزایش فعالیت مولیبدوآنزیم‌ها از جمله نیترات ردوکتاز، میزان تجمع نیترات را اندام هوایی کاهش دهد و از این طریق سمیت نیترات اضافی را خنثی کند. در مجموع کاربرد مولیبدات سدیم، می‌تواند یکی از راه‌های قابل توصیه به منظور کاهش تجمع نیترات و در کنار آن غنی‌ساز مولیبدن در گیاه اسفناج و افزایش ارزش غذایی این گیاه باشد. مکانیسم‌های اثر عنصر مولیبدن در رابطه با ویژگی‌های ذکر شده به نظر پیچیده بوده و مستلزم انجام تحقیقات عمیق در این زمینه می‌باشد. در نهایت می‌توان چنین بیان کرد که در این پژوهش کاربرد مولیبدن به‌ویژه در غلظت ۱/۵ و ۳ میکرومولار روی اسفناج توانست خواص کمی و کیفی گیاه را بهبود ببخشد و سبب کاهش تجمع نیترات در محصول مذکور شود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از تمامی حمایت‌ها و همکاری‌های دانشگاه بوعلی سینا و دانشگاه رازی کرمانشاه جهت فراهم آوردن امکانات مورد نیاز برای اجرای این پایان نامه کارشناسی ارشد، تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

References

- Abasifar, A.R, ValizadehKaji, B. & Iravani, M. A. (2020). Effect of green synthesized molybdenum nanoparticles on nitrate accumulation and nitrate reductase activity in spinach. *Journal of Plant Nutrition*, 43, 13-2.
<https://doi.org/10.1080/01904167.2019.165934>
- Abd-El-Latif, F. M., Bakry, K. A., El-Gioushy, S. F., Hussein, A. M. & Mohamed, M. S. (2020). Effect of foliar spray with molybdenum and iron on vagative growth and nutritional status of pear trees. *Journal of Plant Production*, 11, 655-659.
<https://doi.org/10.21608/jpp.2020.110574>
- Adiloglu, S., Adiloglu, A., Sümer, A. & Satana, A. (2011). Molybdenum Application on the Growth and Nutrient Element Contents of Head Lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Acid Soils. *Asian Journal of Chemistry*, 23, 937-938.
- Ali, M. M. Li, B. Zhi, C. Yousef, A. F. & Chen, F. (2021). Foliar-Supplied Molybdenum Improves Phyto-Nutritional Composition of Leaves and Fruits of Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl). *Agronomy*, 11, 1-16.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11050892>
- Amerian, M. (2023). Health risk assessment due to heavy metals and nitrates in greenhouse okra of Kermanshah county. *Journal of Research in Environmental Health*, 8, 406-418.
<https://doi.org/10.22038/jreh.2023.67299.1539>

فسفر، آهن و پتاسیم شد. در نتیجه با توجه به نتایج به‌دست آمده، در مقدار مولیبدن شاهد (صفر) کم‌ترین میزان عناصر فسفر، پتاسیم، مولیبدن و آهن دیده شد و در غلظت ۱/۵ و ۳ میکرومولار مولیبدن بیش‌ترین میزان عناصر ثبت شد، این افزایش احتمالاً به‌دلیل اثر مثبت تیمار مولیبدن بر عناصر مذکور بوده است و می‌توان گفت که کاربرد مولیبدن تا حدودی توانسته است اثرات منفی تجمع نیترات را بر کاهش مولیبدن، فسفر، پتاسیم و آهن خنثی کند.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر تأثیر مولیبدن بر تجمع نیترات در اسفناج و هم‌چنین برخی ویژگی‌های غذایی این گیاه در شرایط کشت هیدروپونیک بررسی شد. به‌طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزایش غلظت مولیبدن در کشت هیدروپونیک، ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه اسفناج را تحت تأثیر قرار داد. افزایش غلظت مولیبدن و نیترات توانست میزان عناصر آهن، فسفر، پتاسیم، نیتروژن و مولیبدن برگ را در گیاه اسفناج افزایش دهد از طرفی با بهبود میزان مواد جامد محلول توانست کیفیت اسفناج را افزایش دهد و گیاهی با ارزش غذایی بالاتر تولید کند. مهم‌ترین نکته در این تحقیق استفاده از مولیبدن جهت کنترل تجمع نیترات بود که

- AOAC. Official method of analysis. Association of official analytical. *Chemists, washington, DC*. 1990, USA.
- Ashoori, S., Abdollahi, F., Jafari, L. (2024). Effect of fertilizer and seed inoculation with *Pantoea agglomerans* on pigments, vegetative, qualitative, and quantitative characteristics of lettuce (*Lactuca sativa*). *Journal of Vegetables Sciences*, 8(1), 50-67.
<https://doi.org/10.22034/iuvs.2023.200384.9.1292>
- Bambara, S. & Ndakidemi, P. A. (2010). The potential roles of lime and molybdenum on the growth, nitrogen fixation and assimilation of metabolites in nodulated legume: A special reference to *Phaseolus vulgaris* L. *African Journal of Biotechnology*, 9, 2482–2489.
- Biscaro, G. A., Freitas Junior, N. A. D., Soratto, R. P., Kikuti, H., Goulart Junior, S. A. R. & Aguirre, W. M. (2011). Nitrogênio em cobertura e molibdênio via foliar no feijoeiro irrigado cultivado em solo de cerrado. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33, 665-670.
<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i4.6387>
- Biswas, S., Banerjee, A., Acharyya, P. & Chakraborty, N. (2020). Response of French bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Arka Arjun) to *Rhizobium* inoculation under varied levels of nitrogen and molybdenum. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9, 2759-67.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.903.316>
- Bittner, F. (2014). Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. *Frontiers in plant science*, 5, 1-6.
<https://doi.org/3389/fpls.2014.00028>
- Boussadia, O., Steppe, K., Zgallai, H., Ben El Hadj, S., Braham, M., Lemeur, R. & Van Labeke, M. C. (2010). Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthesis, carbohydrate status and biomass production in two olive cultivars 'Meski' and 'Koroneiki'. *Scientia Horticulturae*, 123, 336–342.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.023>
- Brengi, S. H. & Abouelsaad, I. A. (2019). The role of different nitrogen sources combined with foliar applications of molybdenum, selenium or sucrose in improving growth and quality of edible parts of spinach (*Spinacia oleracea* L). *Alexandria Science Exchange Journal*, 40, 156-168.
<https://doi.org/10.21608/asejaiqjsae.2019.2.9731>
- Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E. & Youngs, V. L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil and Science Plant Analysis*, 6, 71–80.
<https://doi.org/10.1080/00103627509366547>
- Daniel, R. M. & Curran, M. P. (1981). A method for the determination of nitrate reductase. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*, 4, 131-132.
[https://doi.org/10.1016/0165022X\(81\)90026-9](https://doi.org/10.1016/0165022X(81)90026-9)
- Elrys, A. S., Abdo, A. I. E. & Desoky, E. S. M. (2018). Potato tubers contamination with nitrate under the influence of nitrogen fertilizers and spray with molybdenum and salicylic acid. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 7076–89.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-1075-y>
- Hassani Moghaddam, E., Bazdar, A. R. & Shaaban, M. (2019). Study of nitrate rate in some vegetables cultivated in Poldokhtar and Khorramabad, Lorestan province. *Iranian Journal of Health and Environment*, 12, 101-112. (In Persian).
- Hille, R. (2013). The molybdenum oxotransferases and related enzymes. *Dalton Transactions*, 42, 3029–3042.
- Jalali, M. & Salehi Chegeni, N. (2020). The Positive Effect of Selenium on Nitrate Accumulation in Spinach (*Spinacia oleracea* L.) and Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Horticultural Science*, 34, 321-334.
<https://doi.org/10.22067/jhorts4.v34i2.85540>

- Kaiser, B. N., Gridley, K. L., Ngair Brady, J., Phillips, T. & Tyerman, S. D. (2005). The role of molybdenum in agricultural plant production. *Annals of botany*, 96, 745-754. <https://doi.org/10.1093/aob/mci226>
- Kovács, B., Puskás-Preszner, A., Huzsvai, L., Lévai, L. & Bódi, É. (2015). Effect of molybdenum treatment on molybdenum concentration and nitrate reduction in maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.07.013>
- La Bella, S., Consentino, B. B., Roupheal, Y., Ntatsi, G., De Pasquale, C., Iapichino, G., & Sabatino, L. (2021). Impact of ecklonia maxima seaweed extract and mo foliar treatments on biofortification, spinach yield, quality and nue. *Plants (Basel)*, 10, 1-15. <https://doi.org/10.3390/plants10061139>
- Li, L. I. U., Wei, X. I. A. O., Ji, M. L., Chao, Y. A. N. G., Ling, L. I., GAO, D. S. & FU, X. L. (2017). Effects of molybdenum on nutrition, quality, and flavour compounds of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch. cv. Akihime) fruit. *Journal of integrative agriculture*, 16, 1502-1512.
- Liu, L., Shi, H., Li, S., Sun, M., Zhang, R., Wang, Y. & Ren, F. (2020). Integrated analysis of molybdenum nutrition and nitrate metabolism in strawberry. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01117>
- Longbottom, M. L., Dry, P. R. & Sedgley, M. (2010). Effects of sodium molybdate foliar sprays on molybdenum concentration in the vegetative and reproductive structures and on yield components of *Vitis vinifera* cv. Merlot. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 477-490.
- Lutic, S., Knezovic, Z., Jurcic, K., Majic, Z., Tripkovic, K. & Sutlovic, D. (2023). Leafy Vegetable Nitrite and Nitrate Content: Potential Health Effects. *Foods*, 12, 1655.
- Machado, R. M. A., Alves-Pereira, I., Lourenço, D. & Ferreira, R. M. A. (2020). Effect of organic compost and inorganic nitrogen fertigation on spinach growth, phytochemical accumulation and antioxidant activity. *Heliyon*, 6, e05085. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05085>
- Mendel, R. R. (2013). The molybdenum cofactor. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 13165–13172. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.455311>
- Min, Y. U., Hu, C. X., Sun, X. C. & Wang, Y. H. (2010). Influences of Mo on nitrate reductase, glutamine synthetase and nitrogen accumulation and utilization in Mo-efficient and Mo-inefficient winter wheat cultivars. *Agricultural Sciences in China*, 9, 355–361.
- Mohammadi, H., Kashefi, B. & Khosh ghalb, H. (2017). Investigation of Salicylic acid effect in different growth stages on quality and quantity of Grape varieties rish baba in Shahrood. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 29, 886-895. (In Persian). <https://doi.org/20.1001.1.23832592.1395.29.4.18.6>
- Moncada, A., Miceli, A., Sabatino, L., Iapichino, G., D'Anna, F. & Vetrano, F. (2018). Effect of molybdenum rate on yield and quality of lettuce, escarole, and curly endive grown in a floating system. *Agronomy*, 8, 1-16. <https://doi.org/10.3390/agronomy8090171>
- Mondal, S. & Nad, B. K. (2012). Nitrate accumulation in spinach as influenced by sulfur and phosphorus application under increasing nitrogen levels. *Journal of plant nutrition*, 35, 2081-2088.
- Najm, A. A., Hadi, M. R. H. S., Darzi, M. T. & Fazeli, F. (2013). Influence of nitrogen fertilizer and cattle manure on the vegetative growth and tuber production of potato. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 5, 147–154.
- Olfati Chirani, J.A., Babalar, M., Kashi, A. A. K., Dadashpour, A. & Shahmoradi, K. (2008). The Effect of ammonium and molybdenum on nitrate concentration in two cultivars (species) of greenhouse cucumbers. *Journal of Horticultural Science (Agricultural Sciences and Technology)*, 22, 69-77. (In Persian).

- Pandey, S. & Dawson, J. (2023). Response of Boron and Molybdenum on Growth and Yield of Black Gram (*Vigna mungo* L.). *International Journal of Plant & Soil Science*, 35, 1214-1220.
- Rana, M., Bhantana, P., Sun, X. C., Imran, M., Shaaban, M., Moussa, M., Saleem, M. H., Elyamine, A., Binyamin, R., Alam, M. & Afzal, J. (2020). Molybdenum as an essential element for crops: an overview. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 25, 18535-18547.
- Rocha, D. C., da Silva, B. F. I., Moreira dos Santos, J. M., Tavares, D. S., Pauletti, V. & Gomes, M. P. (2020). Do nitrogen sources and molybdenum affect the nutritional quality and nitrate concentrations of hydroponic baby leaf lettuce? *Journal of food science*, 85, 1605-1612.
- Rohilla, P. & Yadav, J. P. (2020). Nitrate reductase structure, role and factors affecting its regulation: a review. *Plant Archives*, 20, 5787-5793. doi:
- Sabatino, L., D'Anna, F., Iapichino, G., Moncada, A., D'Anna, E. & De Pasquale, C. (2019). Interactive effects of genotype and molybdenum supply on yield and overall fruit quality of tomato. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1-10.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01922>
- Seilsepour, M. (2020). Study of nitrate concentration in Varamin plain leafy vegetables and evaluation of its risk for human. *Horticultural Plants Nutrition*, 3, 69- 86.
- Seilsepour, M. (2022). Study of the Effect of Municipal Solid Waste Compost and Nitrogen on Spinach Yield, Soil and Spinach Nitrate Content and Evaluation of Its Risk Aversion for Human Health, *Journal of Vegetables Sciences*, 6(1),. 158-175.
- Soares Filho, S. I. B., Lazarini, E., Júnior, V. O. & Bernardes, J. V. S. (2020). Sowing dates and molybdenum foliar application for two peanut cultivars. *Revista Ciência Agrícola*, 18, 27-34.
- Soltani, A., Robertson, M. J. & Manschadi, A. M. (2006). Modeling chickpea growth and development: Nitrogen accumulation and use. *Field Crops Research*, 99, 24-34.
<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2006.02.006>
- Song, W., Yue, L., Fan, X., Luo, Y., Ying, B., Sun, S., Zheng, D., Liu, Q., Hamdy, M. S. & Sun, X. (2023). Recent progress and strategies on design of catalysts for electrochemical ammonia synthesis from nitrate reduction. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 10, 3489-3514.
<https://doi.org/10.1039/D3QI00554B>
- Steiner, F., Zoz, T., Zuffo, A. M., Pereira-Machado, P., Zoz, J. & Zoz, A. (2018). Foliar application of molybdenum enhanced quality and yield of crisp leaf lettuce (*Lactuca sativa* L., cv. Grand Rapids). *Acta Agronómica*, 67, 73-78.
<https://doi.org/10.15446/acag.v67n1.59272>
- Swami, Y. P., Waikar, S. L. & Sallawar, S. C. (2021). Impact of ammonium molybdate supplementation on growth, yield and nutrient uptake of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10, 2145-2150.
- Sym, G. J. (1984). Optimisation of the in-vivo assay conditions for nitrate reductase in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Igri). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 725-730.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740350703>
- Wang, M., Hasegawa, T., Beier, M., Hayashi, M., Ohmori, Y., Yano, K., Teramoto, S., Kamiya, T. & Fujiwara, T. (2021). Growth and nitrate reductase activity are impaired in rice osnlp4 mutants supplied with nitrate. *Plant and Cell Physiology*, 62, 1156-1167. doi: 10.1093/pcp/pcab035
- Wang, Y., Gong, Z., Friml, J. & Zhang, J. (2019). Nitrate Modulates the Differentiation of Root Distal Stem Cells. *Plant Physiology*, 180, 22-25.
<https://doi.org/10.1104/pp.18.01305>
- Zeka, N., Mero, G., Skenderasi, B. & Gjançi, S. (2014). Effects of nitrogen sources and levels on yield and nutritive values of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Journal of International Academic Research for Multidisciplinary*, 2, 327-337.