
HORTICULTURA

Efecto de la radiación y la temperatura sobre la concentración de nitrato en espinaca orgánica

Doñate, M.T.^{1*}, Rodríguez. R.A.², Sidoti Hartmann , B.¹

¹ EEA Valle Inferior convenio Provincia de Río Negro- INTA. Ruta Nacional N°3, Km 971, Camino 4, IDEVI. * donate.maria@inta.gob.ar.

² Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur.

Recibido: 30/08/2016

Aceptado: 15/12/2016

RESUMEN

Doñate, M.T., Rodríguez. R.A., Sidoti Hartmann, B. 2016. Efecto de la radiación y la temperatura sobre la concentración de nitrato en espinaca orgánica. Horticultura Argentina 35 (88): 5-15.

Los factores ambientales y las prácticas de fertilización pueden afectar la acumulación de nitrato en hortalizas de hojas. Esta investigación se realizó bajo invernadero en forma orgánica, en los ciclos productivos otoño-invierno y primavera, entre 2007 y 2008 en el Valle Inferior del Río Negro, Patagonia Argentina. Se utilizaron varios abonos a diferentes dosis, incluyendo estiércol vacuno compostado, compost de cebolla- estiércol y fertilizante orgánico comercial. Se evaluó la acumulación de nitrato en láminas y pecíolos. Se relacionó la concentración de

NO⁻³ con la radiación solar incidente y la temperatura. Los resultados obtenidos indican que en esta región es factible la producción orgánica de espinaca en invernadero, en ambos ciclos de cultivo, manteniendo el contenido de nitrato por debajo de los límites establecidos internacionalmente. La concentración de nitrato en espinaca respondió a la radiación incidente con una correlación de -0,34 en primavera y de -0,58 en otoño-invierno. Los mayores contenidos se observaron en los períodos de menor radiación, durante el ciclo de otoño invierno los menores durante primavera.

Palabras clave adicionales: *Spinacia oleracea* L, inocuidad alimentaria, Río Negro, invernadero.

ABSTRACT

Doñate, M.T., Rodríguez. R.A., Sidoti Hartmann, B. 2016. Effect of radiation and temperature on the concentration of nitrate in organic spinach. Horticulture Argentina 35 (88): 5-15.

Environmental factors and fertilization practices can affect the accumulation of nitrate in leafy vegetables. This research was carried out under an organic greenhouse, in the autumn - winter and spring production cycles, between 2007 and 2008 in Bajo Valle del Río Negro, Patagonian Argentina. Various fertilizers with different doses were used, including composted bovine manure, onion-manure compost and commercial organic fertilizer. The accumulation of nitrate in leaves and

petioles was evaluated. The concentration of NO_3^- was related to temperature and incident solar radiation. The results indicate that organic production of spinach in the greenhouse is feasible in this region, in both crop cycles, keeping the nitrate content below the internationally established limits. The concentration of nitrate in spinach responded to the incident radiation with a correlation of -0.34 in spring and of -0.58 in autumn-winter. The highest contents were observed in periods of lower radiation during the autumn winter and lowest during spring.

Additional keywords: *Spinacia oleracea* L., safety food, Río Negro, greenhouse.

1. Introducción

Con la necesidad de aumentar la producción, se utilizan prácticas que pueden facilitar la acumulación de sustancias potencialmente tóxicas, como lo son los nitratos en vegetales, principalmente en las hortalizas de hoja (Maynard *et al.*, 1976). Los vegetales son la fuente principal de incorporación de nitratos a la dieta de los seres humanos, alrededor del 72 al 94% del total aportado por la alimentación (Anjana *et al.*, 2007). Un exceso de consumo de nitratos por parte del hombre puede provocar toxicidad en el organismo, generando diferentes respuestas. El principal mecanismo de toxicidad del nitrato es la oxidación del ion ferroso a férrico en la hemoglobina, transformándose en metahemoglobina, que en altos niveles produce el llamado “Síndrome de los niños azules” (ESFA, 2010). La metahemoglobina provoca una distribución heterogénea del oxígeno en el tejido de su organismo. Otro riesgo lo constituye la reducción del nitrato y su combinación para formar compuestos como nitrosaminas y nitrosamidas, sustancias reconocidas como cancerígenas (IARC, 2010), acompañado de una disminución hepática de vitaminas A, B y carotenos (Salunkhe y Kadam, 2004). La Unión Europea (UE) ha fijado límites máximos admisibles en hortalizas de hoja, que para el caso de la espinaca cultivada en otoño-invierno es de 3000 mg kg^{-1} y en primavera verano 2500 mg kg^{-1} en base a peso fresco, para el caso de la espinaca congelada un límite de 2000 mg kg^{-1} (Reglamentación N° 1258/2011). En Argentina, no se ha reglamentado los límites de nitrato se toma como referencia el utilizado por la UE. El contenido de nitrato en hoja está determinado por factores ambientales (luz, temperatura y humedad), nutricionales (nitrógeno, fósforo y potasio) y propios del cultivo (genotipo, órgano vegetativo y edad de la planta) que interactúan entre sí. Los factores más importantes son la fertilización nitrogenada y la intensidad de luz, que influyen directamente en el contenido de nitrato en vegetales, especialmente en hortalizas de hojas (Tamme, *et al.*, 2010). La cantidad y la fuente mineral u orgánica, en que el nitrógeno está disponible para la planta afecta la concentración de nitrato que se acumula tanto en hortalizas de hojas principalmente en espinaca y acelga como así también en zanahoria y remolacha (AESAN 2011; Ahmadil, *et al.*, 2010; Mubashir, 2010;

Gairola *et al.*, 2009). La espinaca es una quenopodiácea y tradicionalmente ha sido consumida en fresco o procesada mediante cocción. A nivel mundial, es una de las hortalizas con mayor proceso industrial e integra el grupo de hortalizas que acumulan elevada cantidad de nitrato, con valores que pueden superar los 2500 mg.kg⁻¹ en base a peso fresco (Santamaría *et al.*, 2006).

El contenido de nitrato se distribuye heterogéneamente en las diferentes partes de la planta, Santamaría *et al.* (1999) mencionaron que los órganos de los vegetales se pueden clasificar por orden decreciente: pecíolo, hojas, raíz, tallos, inflorescencias, tubérculos, bulbos, frutos, semillas.

Los objetivos del presente trabajo fueron investigar la evolución de los niveles de nitrato en partes comestibles de espinaca y su relación con los parámetros ambientales (radiación y temperatura) y con el tipo y dosis de la enmienda orgánica utilizada.

2. Materiales y métodos

El estudio se realizó en la Estación Experimental Agropecuaria del Valle Inferior del Río Negro (40° 48' S; 36° 05' O), durante el período 2007-2008. Los ensayos se llevaron a cabo en invernadero, construido con caño galvanizado, techo parabólico, ventanas laterales con apertura manual cubierto por polietileno de tipo larga duración térmica (LDT), de 150 micrones de espesor. El material vegetal evaluado fue espinaca (*Spinacia oleracia* L.) Bolero F1. La siembra se realizó en bandejas germinación de polietileno con 128 alvéolos de 20 ml de capacidad, usando sustrato comercial. Las bandejas permanecieron en invernadero con riego por aspersión hasta que los plantines desarrollaron 3 a 4 hojas verdaderas, momento en que se trasplantaron.

El trasplante se realizó a una densidad de 44 pl.m⁻². La superficie efectiva de cada parcela fue de 2,25 m². Todas las enmiendas se aplicaron durante la preparación del suelo antes del trasplante, realizando posteriormente análisis de suelo en cada parcela al inicio de cada ciclo productivo. Los tratamientos fueron: testigo (T: sin enmienda); compost de cebolla y estiércol (CE) a razón de 37 t.ha⁻¹; estiércol vacuno (E) compostado durante un período de 6 meses equivalente de 33 t.ha⁻¹; doble dosis de estiércol vacuno (DE) a razón de 66 t.ha⁻¹; y fertilizante orgánico Bio Organutsa (B), en dosis de 3,3 t.ha⁻¹. Las distintas enmiendas incorporadas fueron calculadas para suministrar 300 kg de nitrógeno por hectárea a excepción del doble estiércol. Variables ambientales: durante el cultivo, se registraron en el invernadero diariamente las temperaturas máximas, mínimas; los valores de radiación incidente media diaria se tomó a través de la estación meteorológica que se encuentra en la Estación Experimental Agropecuaria Valle Inferior del Río Negro (Convenio Provincia de Río Negro-INTA). Transcurrido un mes del trasplante se comenzó con el muestreo semanal donde se eligieron 10 plantas al azar por repetición en cada uno de los tratamientos, de las cuales se tomaron 20 hojas externas, desarrolladas, de calidad comercial. Se lavaron con agua destilada, secaron con papel absorbente y se separó la lámina del pecíolo. Se registró el peso fresco y luego se llevaron a estufa a 65 °C durante 48 horas para determinar peso seco. La determinación de nitrato en tejido vegetal se realizó mediante extracción acuosa y posterior lectura por espectrofotometría UV- visible (Cataldo *et al.*, 1975). Las unidades experimentales fueron distribuidas en un diseño completamente aleatorizado en 5 tratamientos y 3 réplicas por tratamiento (N=15). Los datos de contenido de nitrato, se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias se efectuó mediante el test de DMS al 5 %.

Las correlaciones significativas entre la concentración media de nitrato y variaciones en la radiación y la temperatura ambiental, para cada ciclo, se analizaron a través de la prueba de correlación de Pearson (InfoStat, 2011).

3. Resultados y discusión

3.1. Efecto de distintas enmiendas orgánicas sobre la concentración de nitrato en pecíolo y lámina en función de la radiación incidente.

La concentración de nitrato en pecíolo y lámina para los ciclos otoño- invierno (2007, 2008) varió según la radiación incidente en todos los tratamientos a lo largo del período de evaluación; a medida que ésta esta aumento, la concentración de nitrato disminuyo, estos resultados fueron confirmados mediante la prueba de Pearson que determinó una correlación negativa (-0,58) siendo altamente significativa ($p < 0,01$) a excepción del tratamiento Bio-Organutsa para el ciclo 2008 que aumentó la concentración de nitrato cuando la radiación incidente fue mayor (Figuras 1 a 4).

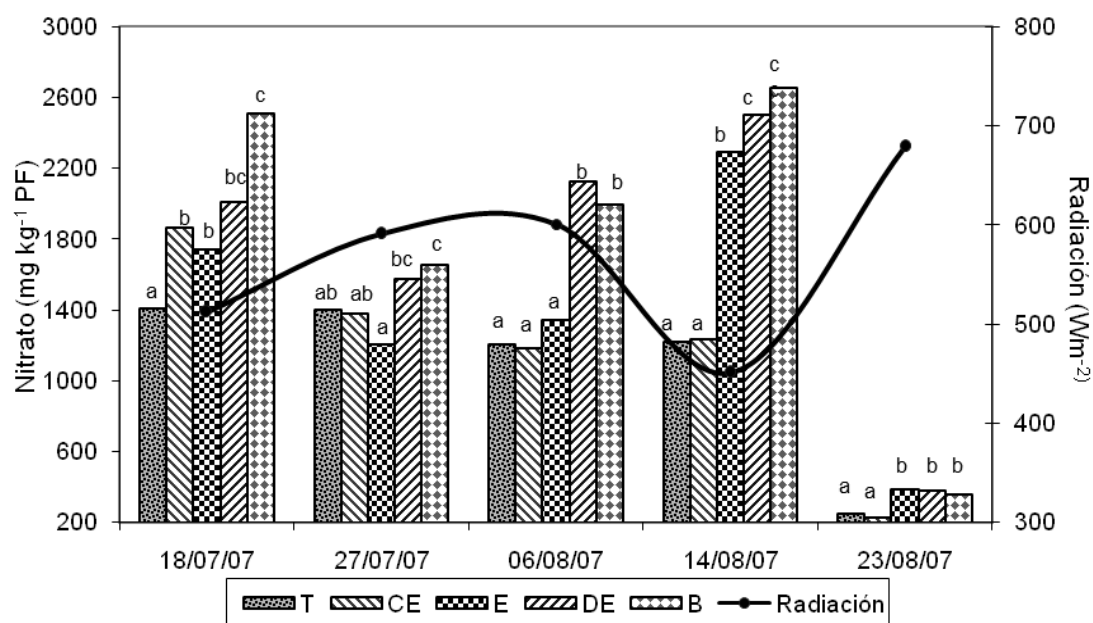


Figura 1. Variación de la concentración media de nitrato en pecíolo y su relación con la radiación incidente para el ciclo otoño-invierno 2007 en cada fecha de muestreo. T, testigo; CE, compost de cebolla-estiércol; E, estiércol; DE, doble estiércol; B, Bio-Organutsa. Letras diferentes en cada fecha indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

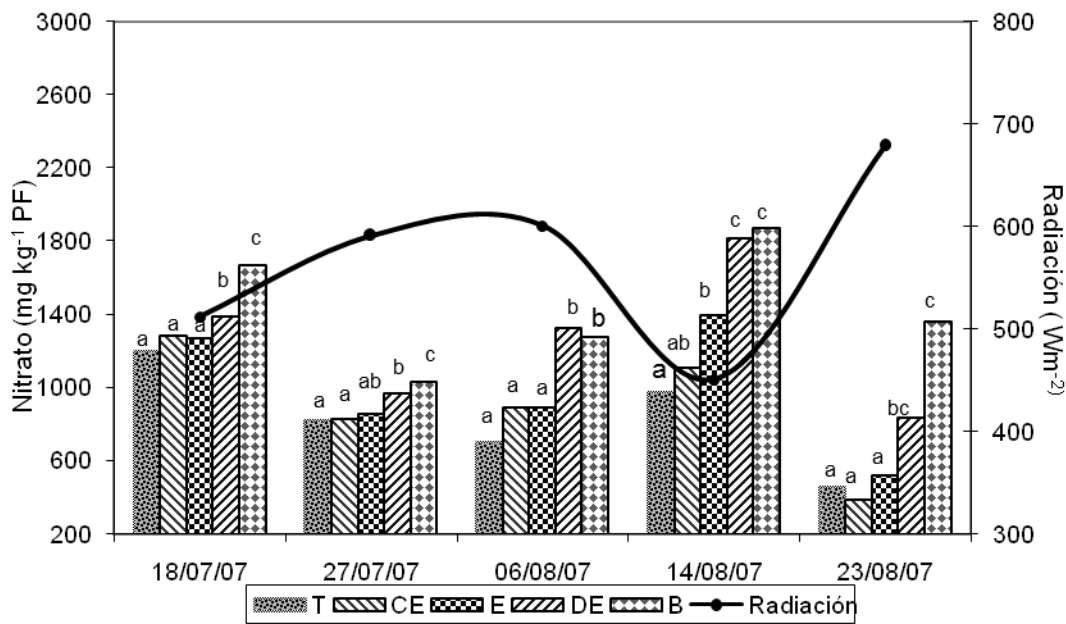


Figura 2. Variación de la concentración de nitrato en lámina y su relación con la radiación incidente para el ciclo otoño-invierno 2007 en cada fecha de muestreo. T, testigo; CE, compost de cebolla-estiércol; E, estiércol; DE, doble estiércol; B, Bio-Organutsa. Letras diferentes en cada fecha indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre tratamientos.

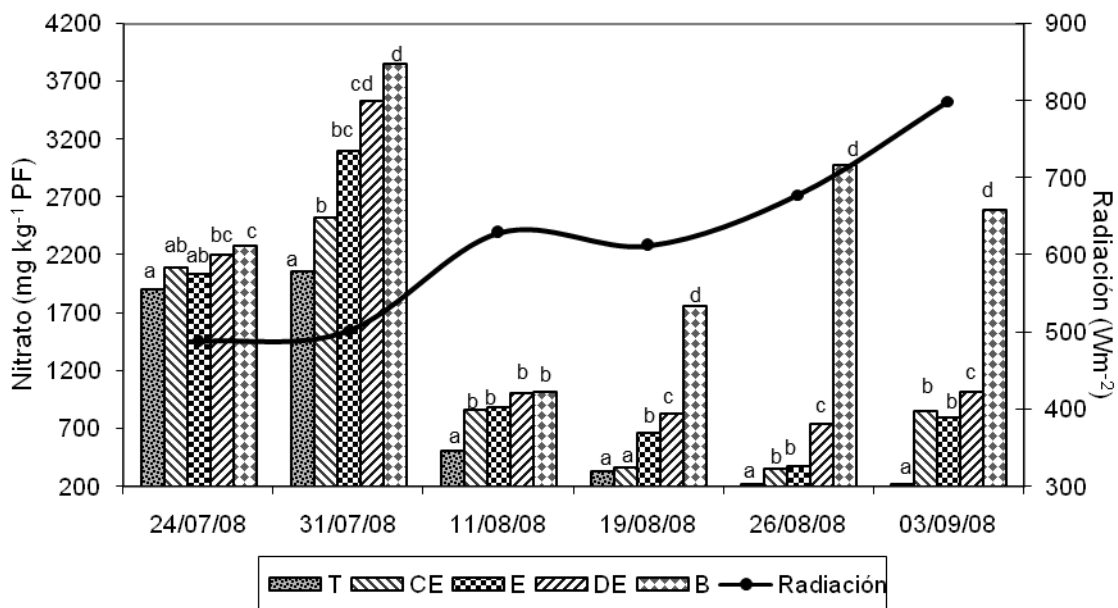


Figura 3. Variación de la concentración media de nitrato en pecíolo y su relación con la radiación incidente para el ciclo otoño-invierno 2008 en cada fecha de muestreo. T, testigo; CE, compost de cebolla-estiércol; E, estiércol; DE, doble estiércol; B, Bio-Organutsa. Letras diferentes en cada fecha indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre tratamientos.

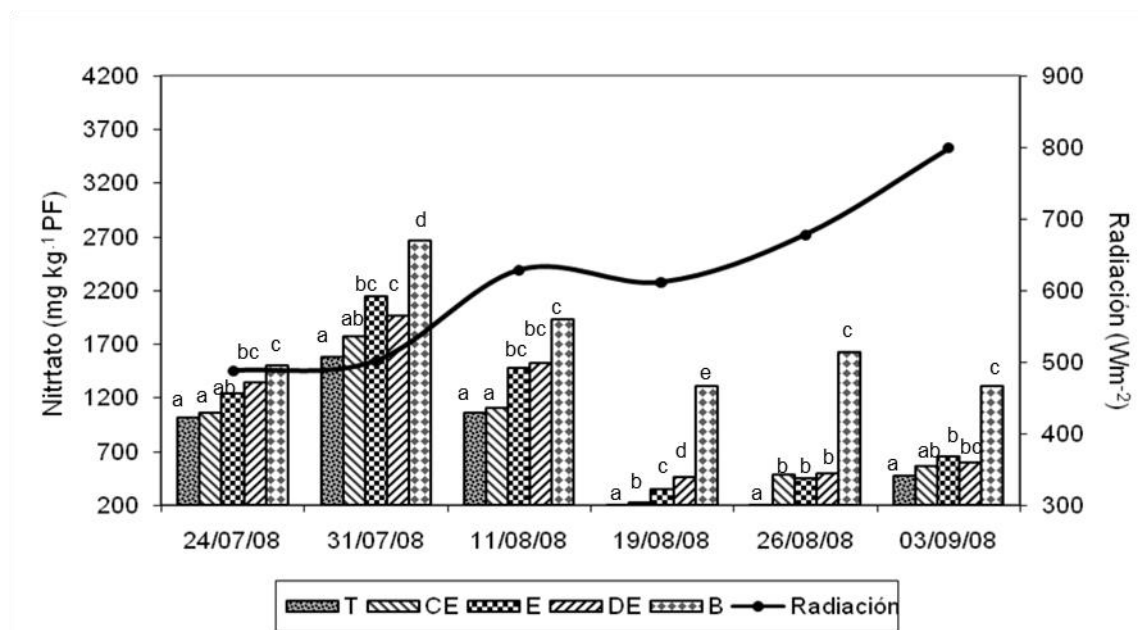


Figura 4. Variación de la concentración de nitrato en lámina y su relación con la radiación incidente para el ciclo otoño-invierno 2008 en cada fecha de muestreo. T, testigo; CE, compost de cebolla-estiércol; E, estiércol; DE, doble estiércol; B, Bio-Organutsa. Letras diferentes en cada fecha indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

La radiación afecta varios procesos relacionados con la absorción y asimilación de nitrato. Al disminuir la intensidad lumínica, se reduce la actividad de la enzima nitrato reductasa elevando las concentraciones de nitrato en planta e incrementando la concentración de ácidos orgánicos (Blom - Zandstra y Lampe, 1985). A su vez, la radiación aporta la energía necesaria para la absorción de nitrógeno y la síntesis de proteínas. El primer paso en la asimilación del nitrato consiste en su reducción a nitrito por medio de la actividad de la enzima nitrato reductasa (NR). Salisbury y Ross (1999) explicaron que la hoja, al recibir más luz aumenta la fotosíntesis y produce mayor cantidad de trifosfato de adenosina (ATP), lo que permite que se incremente la concentración de nitratos en el citosol ya que incrementa su salida desde las vacuolas con la consiguiente inducción de la síntesis de NR, dado que esta es inducida por su sustrato. Por otro lado, la luz activa el sistema fitocromo, que indirectamente activa el gen que codifica el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que a su vez codifica la NR. Por último, a través de la fotosíntesis, la radiación promueve la actividad de la NR ya que incrementa el aporte de carbohidratos, mientras que la coenzima nicotinamida adenina (NADH) que se necesita para la reducción de nitrato se produce a partir de estos carbohidratos cuando la planta respira.

Los resultados obtenidos en este trabajo acuerdan con los publicados por Citak y Sonmez, (2010); Samih *et al.* (2010) y Doñate, *et al.*, (2015) quienes mencionan que los mayores contenidos de nitrato se produce con las menores intensidades de radiación incidente, en períodos invernales.

Dadas las variaciones en las concentraciones medias de nitrato para cada tratamiento, tanto en pecíolo como lámina, se puede decir que los tratamientos T y CE fueron los que menos acumularon nitrato y DE y B los que presentaron mayor concentración; observando diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para cada fecha de muestreo en ambas partes comestibles. Estos resultados concuerdan con Anjana *et al.* (2006), quienes indicaron que la acumulación de nitrato en los vegetales es diferencial según los distintos tipos de enmiendas utilizadas; por su parte Zhou *et al.* (2002) mencionó que la correcta aplicación de

fertilizantes a base de nitrógeno, fósforo y potasio, así como de abonos verdes y estiércoles, podría reducir la acumulación de nitratos en vegetales.

La edad fisiológica de la planta es otro factor que influye en la acumulación de nitrato (Santamaría *et al.* 2006; Anjana *et al.*, 2007). Otro autor sostiene que el contenido de nitrato disminuye con la edad de la planta debido a que ésta, a medida que va envejeciendo, pierde su capacidad de asimilar nitratos debido a una reducción en la síntesis de proteínas, aumentando así la concentración de nitritos (Carrasco *et al.*, 1994). Esta disminución no es independiente de los factores ambientales y nutricionales (Irigoyen Iriarte, 2001).

Para los dos ciclos estudiados se encontraron mayores concentraciones en pecíolo que en lámina, a excepción del momento de cosecha para el año 2007 que presentó mayores niveles en lámina. Esto concuerda con Irigoyen Iriarte (2001) y Anjana e Iqbal (2006), quienes mencionaron que la espinaca concentra mayor cantidad de nitrato en pecíolo que en lámina. Sólo se detectaron valores superiores al máximo admisible en los tratamientos E, DE y B en el muestreo del 31/07/08 en pecíolo.

En los ciclos de primavera la correlación entre la radiación incidente y la concentración de nitrato fue negativa (-0,34), altamente significativa ($p < 0,01$). Entre los tratamientos se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), los valores más altos se registraron en el tratamiento Bio-Organutsa y el testigo presentó los valores más bajos. Las concentraciones de nitrato se encontraron muy por debajo de 3000 mg.Kg^{-1} .

3.2. Efecto de distintas enmiendas orgánicas sobre la concentración de nitrato en pecíolo y lámina en función de la temperatura.

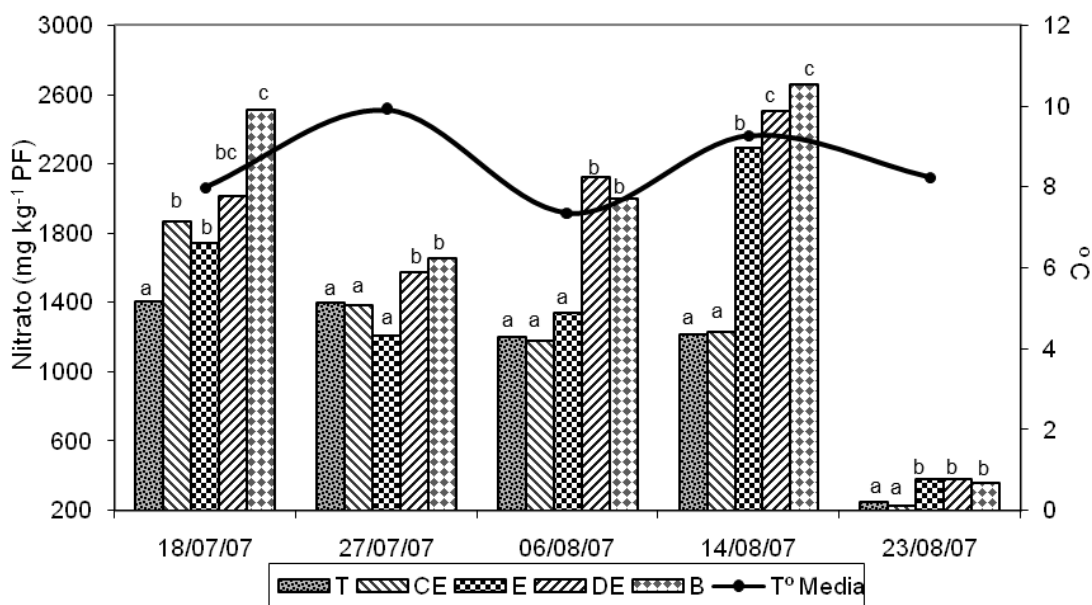


Figura 5. Variación de la concentración de nitrato en pecíolo y su relación con la temperatura media para el ciclo otoño-invierno 2007 en cada fecha de muestreo. T, testigo; CE, compost de cebolla-estiércol; E, estiércol; DE, doble estiércol; B, Bio-Organutsa. Letras diferentes en cada fecha indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

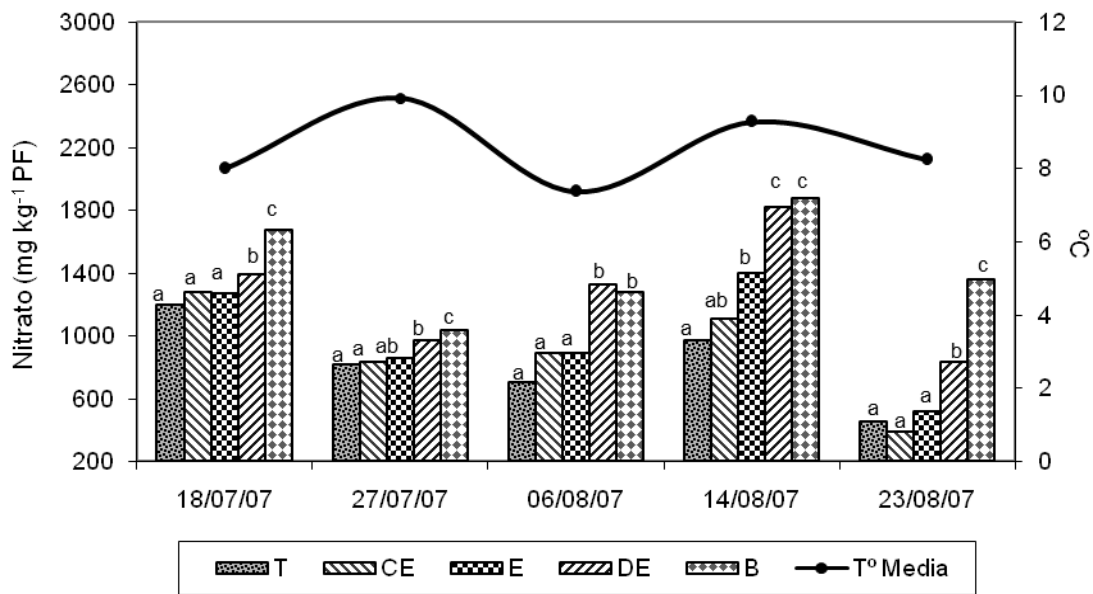


Figura 6. Variación de la concentración de nitrato en lámina y su relación con la temperatura media para el ciclo otoño-invierno 2007 en cada fecha de muestreo. T, testigo; CE, compost de cebolla-estiércol; E, estiércol; DE, doble estiércol; B, Bio-Organutsa. Letras diferentes en cada fecha indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

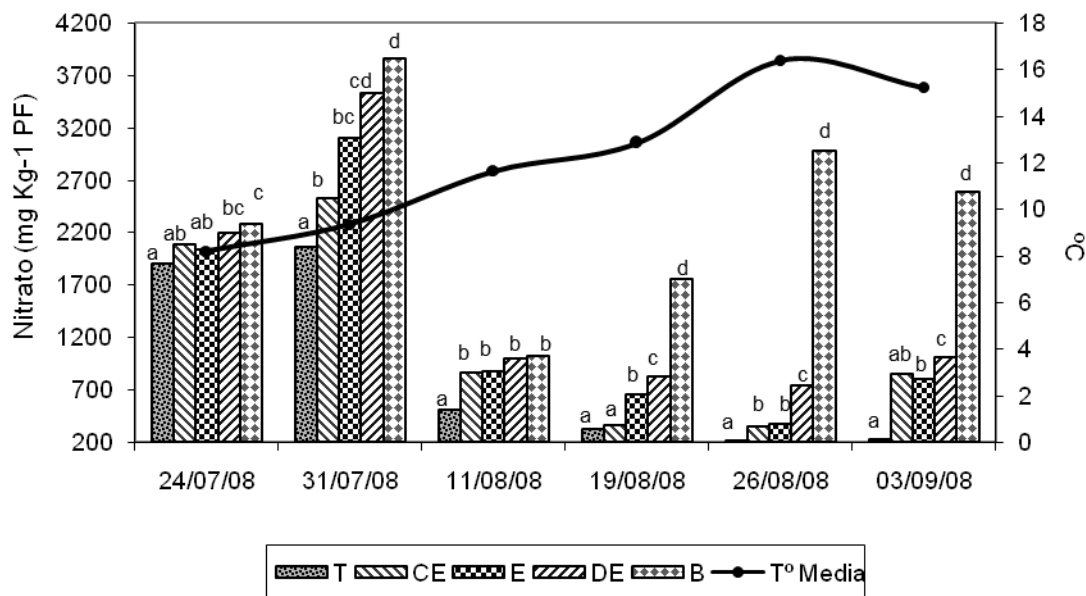


Figura 7. Variación de la concentración de nitrato en pecíolo y su relación con la temperatura media para el ciclo otoño-invierno 2008 en cada fecha de muestreo. T, testigo; CE, compost de cebolla-estiércol; E, estiércol; DE, doble estiércol; B, Bio-Organutsa. Letras diferentes en cada fecha indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

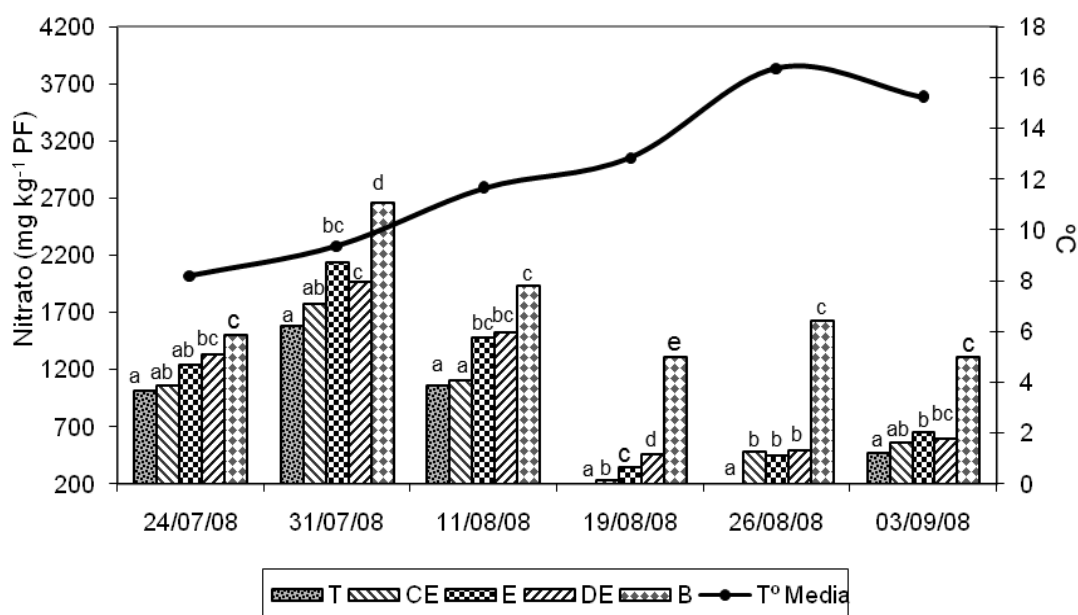


Figura 8. Variación de la concentración de nitrato en lámina y su relación con la temperatura media para el ciclo otoño-invierno 2008 en cada fecha de muestreo. T, testigo; CE, compost de cebolla-estiércol; E, estiércol; DE, doble estiércol; B, Bio-Organutsa. Letras diferentes en cada fecha indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Se observó que la concentración de nitrato tanto en pecíolo como en lámina para los ciclos de otoño invierno tuvo una tendencia inversa en relación a la temperatura media (Figuras 5 a 8). Estos resultados fueron confirmados a través del análisis de correlación, entre la concentración de nitrato y la temperatura, siendo altamente significativo ($p < 0,01$), con un coeficiente de $-0,38$.

El incremento de la temperatura, según la investigación realizada por Cantliffe, (1972), provoca mayor concentración de nitrato en espinaca. La temperatura aumenta la transpiración, lo que provoca un flujo ascendente de nitratos desde la raíz, donde son más abundantes, hacia la parte aérea. A su vez, al aumentar la demanda de azúcares con fines respiratorios y para síntesis de moléculas estructurales, se limita su disponibilidad para fines osmóticos, por lo cual son reemplazados por aniones como nitrato (Seginer *et al.* 1998). Sin embargo, los resultados obtenidos en los ensayos durante los dos ciclos productivos, indican que la concentración de nitrato tanto en pecíolo como en lámina respondió a la temperatura media de forma inversa, en contraposición a los resultados obtenidos por Cantliffe, (1972). Similares resultados obtuvo Villalba (2006), quien realizó estudios sobre la concentración de nitrato en lechuga durante el ciclo invierno primaveral. Si se observa el comportamiento de la temperatura y la radiación a lo largo del período analizado, se podría afirmar que el efecto de la temperatura sobre la acumulación de nitrato estaría encubierto por la radiación, puesto que el aumento de la radiación incidente sobre el cultivo suele conllevar un incremento de la temperatura (Irigoyen Iriarte, 2001). Por ello, para estudiar su efecto, es recomendable desarrollar ensayos en condiciones estrictamente controladas.

Durante los ciclos de primavera, las temperaturas oscilaron entre 19 y 27 °C, en este período se observó el mismo comportamiento que en los ciclos anteriores a altas temperaturas, la concentración de nitrato disminuyó tanto en lámina como en pecíolo, este comportamiento es coincidente con el efecto producido por la radiación incidente.

4. Conclusiones

El factor ambiental de mayor influencia en la concentración de nitrato en planta es la radiación, los niveles más altos se observaron en los períodos de menor radiación, durante el ciclo de otoño invierno. En primavera las concentraciones detectadas fueron muy bajas, sin superar las 600 mg.kg⁻¹ en el momento de cosecha del cultivo. Las mayores concentraciones se registraron en pecíolo a mediados del ciclo de cultivo invernal, donde se superaron las 3000 mg.kg⁻¹ en los tratamientos estiércol (doble dosis) y Bio-Organutsa.

Los contenidos de nitratos en el momento de cosecha, para los ciclos otoño invierno y primavera, tanto en pecíolo como lámina, no superaron los límites máximos admisibles establecidos por la Unión Europea. Las concentraciones más bajas se detectaron en lámina en el ciclo primaveral. Con respecto a la temperatura, en los ensayos realizados no se pudo determinar el efecto directo de la misma sobre la acumulación de nitrato en el cultivo, probablemente debido a que el mismo estaría encubierto por la radiación incidente.

A modo de recomendación se debería realizar fertilización nitrogenada teniendo en cuenta el nivel de nitrógeno del suelo al momento de la siembra, así como el nitrógeno potencialmente mineralizable a lo largo del ciclo de cultivo; se debería reducir las dosis de nitrógeno aplicadas, especialmente en los ciclos otoño invierno y en suelos pesados y cosechar cultivos en otoño y primavera cuando normalmente la radiación y temperatura son más adecuadas para el cultivo de espinaca.

5. Bibliografía

- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), 2011. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a la evaluación del riesgo de la exposición de lactantes y niños de corta edad a nitratos por consumo de acelgas en España. Revista del Comité Científico de la AESAN N°14. Madrid, España.
- Ahmadil H., Akbarpour V., Dashti F., Shojaeian A., 2010. Effect of different levels of nitrogen fertilizer on yield, nitrate accumulation and several quantitative attributes of five Iranian spinach accessions. *Journal of Agriculture & Environmental Science*, 8: 468-473.
- Anjana S.U., Iqbal M., 2006. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. *Agronomy for Sustainable*. New Delhi, India, 45-57.
- Anjana S.U., Iqbal M., Abrol Y.P., 2007. Are nitrate concentrations in leafy vegetables within safe limits? *Current Science*, 92 (3): 355-360.
- Blom- Zandstra, M., Lampe J., 1985. The role of nitrate in the osmoregulation of lettuce (*Lactuca sativa L.*) grown at different light intensities *Journal Experimental Botany*, 36: 1043-1052.
- Cantliffe D.J., 1972. Nitrate accumulation in spinach crops at different temperatures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 97: 674 - 676.
- Carrasco G., Burrage S., Kazakidou D., 1994. Nitrate accumulation in red chicory (*Cichorium intybus L.*) grown at a low level of light intensity. *Acta Horticulturae*, 61: 274-281.
- Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E., Youngs V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*.6: 71-80.
- Citak S., Sonmez S., 2010. Effects of conventional and organic fertilization on spinach (*Spinacia oleracea L.*) growth, yield, vitamin C and nitrate concentration during two successive seasons. *Scientia Horticulturae*, 126: 415-420.

- Doñate, M.T; Baffoni, P.; Sidoti Hartmann, B.; Bastías, N.; Abrameto, M.; Huenumil, S., 2015. Nitrato en hortalizas de hojas cultivadas en el Valle Inferior del Río Negro. XXXVIII Congreso Argentino de Horticultura. Bahía Blanca 2014. Argentina. En CD.
- EFSA, 2010. Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. The EFSA Journal, 8 (12), pp: 1935.
- Gairola S., Umar S., Suryapani S., 2009. Nitrate accumulation, growth and leaf quality of spinach beet (*Beta vulgaris L.*) as affected by NPK fertilization with special reference to potassium. Indian Journal of Science and Technology, 2: 35-40.
- IARC (International Agency of Research in Cancer), 2010. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Ingested Nitrate and Nitrite and Cyanobacterial Peptide Toxins. Volume 94, 1-325 Francia. Consultado en: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol94/mono94.pdf>
- INFOSTAT, 2011. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Irigoyen Iriarte I., 2001. Acumulación de nitrato en espinaca para congelado: Influencia de la fertilización nitrogenada. Tesis doctoral. Universidad Pública de Navarra, España, pp 173.
- Maynard D.N., Barker A.V., Minotti P.L., Peck N.H., 1976. Nitrate accumulation in vegetables. Advances in Agronomy, 28: 71-118.
- Mubashir M., Malik S.A., Khan A.A., Ansari T.M., Wright S., Brown M.V. and Islam K.R., 2010. Growth, yield and nitrate accumulation of irrigated carrot and okra in response to nitrogen fertilization. Pakistan Journal Botanical, 42: 2513-2521.
- Reglamentación N° 1258/2011. Diario oficial de la Unión Europea. <https://www.boe.es/doue/2011/320/L00015-00017.pdf>
- Salisbury F.B., Ross C.W., 1999. Fisiología vegetal. Ed. Iberoamericana. pp 757.
- Salunke D.K., Kadan S.S., 2004. Tratado de ciencia y tecnología de las hortalizas. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp 739.
- Samih M.A., Taleb R., Yasin A., Tarek A. and Alaeddin B., 2010. Nitrate accumulation in spinach (*Spinacia oleracea L.*) tissues under different fertilization regimes. Journal of Food Agriculture and Environment Vol. 8 (2):778 -780.
- Santamaria P., 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content and EC regulation. Journal of the Science Food and Agriculture, 86: 10-17.
- Santamaria P., Elia A., Serio F., Todoro E., 1999. A survey of nitrate and oxalate content in retail fresh vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79: 1882-1888.
- Seginer I., Van Straten J. and Buwalda F. 1998. Nitrate concentration in greenhouse lettuce: A modeling study. Acta Horticulturae, 456: 189-197.
- Tamme T., Reinik M., Roasto M., Meremäe J., Kiis, A., 2010. Nitrate in leafy vegetables, culinary herbs, and cucumber grown under cover in Estonia: content and intake. Food Additives and Contaminants. 2: 108-113.
- Villalba S., 2006. Fertilización y contenido de nitrato en lechuga de ciclo invierno primaveral al aire libre en la región de Bahía Blanca. Trabajo de intensificación. Dpto. de UNS. pp 44.
- Zhou Z.Y., Wang M.J., Wang J.S., 2002. Nitrate and nitrite contamination in vegetables in China. Food. Rev. Int. 16: 61-76. En: Anjana, Umar S., Iqbal M., 2006. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. Agronomy for Sustainable Development, Agronomy. New Delhi, India, 27: 45-57.