

## بهینه‌سازی فاکتورهای کود نیتروژن و فاصله بوته روی ردیف در گیاه اسفناج رقم Harrier به روش سطح پاسخ

فرناز گودرزی<sup>۱</sup>، مجتبی دلشاد<sup>۲\*</sup>، حامد منصوری<sup>۳</sup> و فروزنده سلطانی<sup>۴</sup>

۱ و ۲. دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران  
۳. استادیار، بخش تحقیقات چغندرقد، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۳۰)

### چکیده

در این پژوهش بهینه‌سازی دو فاکتور موثر بر تولید سبزی برگی اسفناج، کود نیتروژن و فاصله بوته روی ردیف کاشت براساس اهداف چهار سناریوی اقتصادی، سلامت غذایی، بازارپسندی و حد مطلوب تولید اسفناج رقم "Harrier" با کمک تکنیک آماری سطح پاسخ انجام گرفت. متغیرهای مستقل شامل فاصله بوته روی ردیف کاشت (۷، ۱۱ و ۱۵ سانتی‌متر) و سطوح کود نیتروژنی (صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ کیلوگرم اوره بر هکتار) در قالب طرح مرکب مرکزی در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تهران بررسی شدند. صفات وزن تر برگ، زیست‌توده، شاخص سطح برگ، کارایی مصرف نیتروژن، غلظت نترات و کلروفیل کل به عنوان متغیرهای وابسته مورد مطالعه قرار گرفتند. برازش داده‌ها با معادله چند جمله‌ای درجه دو و بهینه‌سازی پاسخ‌ها با نرم‌افزار Minitab16 انجام شد. نتایج نشان داد افزایش فاصله بوته روی ردیف تنها بر محتوای کلروفیل اثر مثبت گذاشت. سطوح بالای کود نیتروژن بر تمام متغیرهای وابسته مورد مطالعه، بجز کارایی مصرف نیتروژن، اثر افزایشی داشت. ترکیب بهینه تیمارهای متغیر مستقل و شاخص مطلوبیت برای هر یک از سناریوهای اقتصادی، سلامت غذایی، بازارپسندی و حد مطلوب به ترتیب برای فاصله بوته روی ردیف ۷، ۷/۴۸، ۷/۲۴ و ۷ سانتی متر، کود نیتروژن ۱۸۹/۹، ۶۰/۶، ۱۸۹/۹ و ۱۴۹/۵ کیلوگرم بر هکتار و شاخص مطلوبیت ۰/۹۷، ۰/۷۷، ۰/۸۲ و ۰/۸۲ به دست آمد. بر اساس نتایج شاخص مطلوبیت، مدل سناریوی اقتصادی را در مقایسه با سناریوهای دیگر در تعیین بهینه‌ترین متغیر مستقل با توان بالاتری شبیه‌سازی می‌کند.

واژه‌های کلیدی: طرح مرکب مرکزی، کارایی مصرف نیتروژن، نترات.

## Optimization of nitrogen fertilizer and plant spacing on the row parameters in spinach cv. "Harrier" using response surface methodology

Farnaz Goodarzi<sup>1</sup>, Mojtaba Delshad<sup>2\*</sup>, Hamed Mansouri<sup>3</sup> and Forouzandeh Soltani<sup>4</sup>

1, 2, 4. Ph. D. Candidate, Associate Professor and Assistant Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Assistant Professor, Sugar Beet Research Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran

(Received: Jun. 19, 2019- Accepted: Sept. 21, 2019)

### ABSTRACT

In this study, optimum level of nitrogen fertilizer and plant spacing on the row were investigated in spinach cv. "Harrier" based on the aims of four scenarios: economic, health of food, marketable and optimum production, using statistical response surface methodology. The independent variables including plant spacing on the row (7, 11 and 15 cm) and nitrogen fertilizer (0, 200 and 400 kg urea ha<sup>-1</sup>), were evaluated using central composite design at Research Field of University of Tehran. Leaf fresh weight, biomass, leaf area index, nitrogen use efficiency, nitrate concentration and total chlorophyll traits were considered as dependent variables. The fitting of data to second order polynomial equation and optimization of responses was performed using Minitab16 software. Increasing of plant spacing on the row had alone a significant effect on total chlorophyll traits. High levels of nitrogen fertilizer had an increasing effect on dependent variables, except nitrogen use efficiency. The optimum combination of variables and desirability function for economic, environmental, marketable and optimal production limit scenarios were at plant spacing on the row of 7, 7.48, 7.24 and 7 cm, nitrogen fertilizer of 189.9, 60.6, 189.9 and 149.5 kg ha<sup>-1</sup>, and 0.97, 0.77, 0.9 and 0.82, respectively. Based on desirability function results, the model possesses a high power to simulate optimum level of independent variables at economic scenario than the others.

**Keywords:** Central composite design, nitrogen use efficiency, nitrate.

\* Corresponding author E-mail: delshad@ut.ac.ir

### مقدمه

نیتروژن یکی از رایج‌ترین عناصر غذایی محدودکننده رشد در سیستم‌های کشاورزی در سراسر جهان است. گیاهان برای دستیابی به عملکرد مطلوب و محتوای کافی پروتئین، نیاز به مقادیر کافی از این عنصر دارند. نیتروژن از طریق اثرگذاری بر توسعه سطح برگ و دستگاه فتوسنتزی به طور مستقیم بر تولید ماده خشک اثر می‌گذارد، از این‌رو کاربرد مقدار بهینه نیتروژن برای جلوگیری در تعویق رشد و عملکرد گیاه لازم است (Taftah & Sepaskhah, 2001). تحقیقات نشان می‌دهد که کمتر از ۵۰ درصد نیتروژن در دسترس گیاه، توسط گیاهان مصرف می‌شود (Peoples *et al.*, 1995). Kant *et al.* (2010) اظهار داشتند، معمولاً بیش از ۶۰ درصد از نیتروژن در خاک از طریق آبشویی (Leaching)، شستشوی سطحی (Surface run-off)، نیترات زدایی (Denitrification)، تبخیر و مصرف میکروبی از بین می‌رود از این رو تولیدکنندگان تنها بخش کوچکی از هزینه‌های کود را در محصول برداشت شده، مشاهده می‌کنند.

از سوی دیگر، یکی از مهمترین استراتژی‌های مدیریتی در به حداکثر رساندن استفاده از منابع طبیعی از جمله تابش فعال فتوسنتزی و افزایش ظرفیت فتوسنتزی کانوپی گیاه، تعیین فاصله بین گیاهان در مزرعه، می‌باشد. در سبزی‌های برگی افزایش تراکم گیاه تا محدوده‌ای خاصی، باعث افزایش عملکرد می‌شود و در نهایت اثر مثبتی بر سود اقتصادی تولید برای کشاورزان خواهد داشت. از این رو افزایش تراکم تا زمانی مطلوب تلقی می‌گردد که ضمن افزایش عملکرد، بر کیفیت سبزی برگی اثر منفی نگذارد. در نتیجه تعیین تراکم بهینه باتوجه به اهداف مختلف تولید یک گیاه همواره حائز اهمیت می‌باشد (Bansal *et al.*, 1995).

اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) همانند بسیاری از سبزی‌های برگی که در آنها میزان زیست‌توده تولیدشده تقریباً معادل عملکرد می‌باشد، به مقادیر بالایی از نیتروژن برای رشد مطلوب نیاز دارد (Cantliffe, 1973; Stagnari *et al.*, 2007). نیتروژن علاوه بر عملکرد، کیفیت ظاهری و خوراکی اسفناج را نیز تحت تأثیر قرار

می‌دهد و کمبود این عنصر منجر به تولید گیاهان ضعیف و به رنگ روشن و در نهایت کاهش کیفیت ظاهری محصول می‌شود (Biemond, 1995). براساس گزارش‌های منتشرشده، کارایی مصرف نیتروژن در مزارع اسفناج پایین است. مطالعه‌های انجام‌شده توسط Neeteson & Carton (1999) نشان داد که از ۲۹۰-۲۱۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار که برای تغذیه اسفناج استفاده گردید، در حدود ۲۲۰ - ۱۶۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار توسط محصول برداشت نشده‌است، نتایج مشابه‌ای نیز توسط Heins & Schenk, (1987) گزارش شده‌است. مازاد نیتروژن موجود در خاک منجر به تخریب اکوسیستم‌های آبی، آلودگی خاک و آب‌های سطحی و تخریب محیط زیست می‌شود (Wolfe & Patz, 2002). سطوح بالای تغذیه نیتروژنی تجمع یون نیترات در گیاه اسفناج را به همراه دارد که تأثیر منفی بر کیفیت محصول و سلامت مصرف‌کنندگان بر جای می‌گذارد (Santamaria, 2006). بین رقم‌های اسفناج از نظر میزان رشد و تقاضا برای نیتروژن تفاوت‌های زیادی وجود دارد و تعیین میزان نیتروژن و فواصل کشت برای هر یک از رقم‌های اسفناج به منظور تولید بهینه باید مورد بررسی قرارگیرد (Lefsrud *et al.*, 2007, Okazaki *et al.*, 2008).

در بررسی اثر تراکم بوته بر عملکرد اسفناج گزارش شد در فاصله بوته روی ردیف ۲۵ سانتی متر و بین ردیف ۴۰ سانتی متر بالاترین عملکرد حاصل شد (Bracey *et al.*, 1990). در تحقیق صورت گرفته توسط Imani (2012) اثر تاریخ کاشت پاییزه و روش کاشت بر عملکرد و اجزای عملکرد اسفناج رقم ورامین ۸۸ در منطقه ورامین مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بهترین تاریخ کشت ۱۵ شهریور و مناسب ترین روش کاشت با بیشترین تولید، کاشت دو طرف پشته ۶۰ سانتی متری توصیه شد. Sharma (1994) با ارزیابی اثر تراکم بوته (۲۰×۷/۵، ۴۰×۷/۵ و ۳۰×۷/۵) و کود نیتروژنی (۲۴، ۷۵، ۱۲۵ و ۱۷۵ کیلوگرم در هکتار) بر صفات کیفی اسفناج، بیشترین معنی داری عملکرد را در تراکم کشت ۴۰×۷/۵ سانتی متر و سطح کود ازته ۱۷۵ کیلوگرم بر هکتار مشاهده نمود.

"سطح پاسخ" یکی از روش‌های رایج در بهینه‌سازی

بررسی شدند. تعداد تیمارهای طراحی شده با استفاده از تابع فوق (رابطه ۱) برآورده شد:

$$Y = 2^k + 2K + r \quad \text{رابطه ۱}$$

Y: تعداد تیمارهای طراحی شده، K: تعداد متغیر مستقل مورد بررسی و r: تعداد تکرار برای نقطه مرکزی. تعداد تکرار در نقطه مرکزی به دلیل سنجش خطای آزمایشی مهم می‌باشد. تعداد تکرار برای نقطه مرکزی با ۲ فاکتور برابر ۵ می‌باشد (Box & Hunter, 1957; Aslan, 2007). برطبق رابطه (۱)، در این پژوهش ۱۳ تیمار آزمایشی طراحی شد (جدول ۱). تیمارهای آزمایش شامل سطوح مختلف کود نیتروژن از منبع اوره (۴۶٪ نیتروژن) در ۳ سطح (صفر، ۲۰۰ و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار) و سه سطح فاصله بوته روی ردیف کاشت (۷، ۱۱ و ۱۵ سانتی‌متر) تنظیم شد. فاصله بین خطوط کشت در تمام تیمارها ثابت و ۲۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد و فاصله بین بلوک‌های آزمایشی ۵۰ سانتی‌متر بود. مساحت هر کرت معادل (۸۰×۲۵۰ سانتی‌متر) بود. آزمایش در مزرعه تحقیقاتی گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران با طول و عرض جغرافیایی (۵۸° ۵۰' E و ۳۵° ۵۶' N) در سال زراعی ۹۶-۱۳۹۵، بر روی رقم Harrier که از شرکت رکزوان هلند (Rijkzwa) تهیه گردید، انجام گرفت. قبل از تهیه بستر کشت بذرها، جهت ارزیابی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه نمونه خاکی از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری خاک به صورت تصادفی انتخاب و آنالیز شد (جدول ۲).

منابع می‌باشد و شامل مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و عددی پیشرفته مبتنی بر مدل غیر خطی چند متغیره است (Goel et al., 2006). از تکنیک سطح پاسخ در بهینه‌سازی عوامل موثر بر رشد همانند آب، کود نیتروژن و تراکم کشت در گیاهان کلزا (Koocheki et al., 2012)، موسیر (Mansouri et al., 2014a) و پیاز (Mansouri et al., 2014b) استفاده شده است.

با وجود اهمیت اقتصادی و زیست محیطی کود نیتروژن، هنوز تحقیقات کافی در خصوص میزان مصرف کود نیتروژن در ارتباط با فواصل بوته با در نظر گرفتن ملاحظات اقتصادی، کیفی و زیست محیطی برای بسیاری از گیاهان از جمله اسفناج صورت نگرفته است. در این تحقیق، تلاش گردیده با کمک تکنیک سطح پاسخ بهترین توصیه کود نیتروژن و فواصل بوته بر روی ردیف کاشت اسفناج رقم Harrier براساس سناریوهای اقتصادی، سلامت غذایی، بازآرپسندی و حد مطلوب پیشنهاد گردد.

## مواد و روش‌ها

به منظور مدل‌سازی و بهینه‌کردن فرآیندها، از طرح آزمایشی مرکب مرکزی (Central Composite Design) استفاده شد. در این پژوهش متغیرهای مستقل شامل فاصله بوته بر روی ردیف کاشت (X1) و کود نیتروژنی (X2) می‌باشد و هر کدام به صورت کدهای بدون واحد در سه سطح (+۱، ۰، -۱) که به ترتیب بیانگر سطوح بالا، میانگین و پایین متغیرهای مستقل کدبندی و

جدول ۱. کدها و سطوح متغیر مستقل به وسیله طرح مرکب مرکزی

Table 1. Experimental codes and levels of independent variables by Central Composite Design

Run order	Coded variable		Actual variable	
	Plant spacing on the row (x <sub>1</sub> )	Nitrogen fertilizer (x <sub>2</sub> )	Plant spacing on the row (cm)	Nitrogen fertilizer (kg ha <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	7	0
2	-1	0	7	200
3	-1	+1	7	400
4	0	-1	11	0
5	0	0	11	200
6	0	0	11	200
7	0	0	11	200
8	0	0	11	200
9	0	0	11	200
10	0	+1	11	400
11	+1	-1	15	0
12	+1	0	15	200
13	+1	+1	15	400

جدول ۲. برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک منطقه از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متر

Table 2. Some soil physical and chemical properties of experiment site of 0 to 30 cm depth

Soil texture	% N	P (mg/kg)	K (mg/kg)	EC (ds/m)	Ph	
Soil field	Clay loam	0.12	41.2	399	1.8	7.6

گردید و پس از ۷۲ ساعت توزین شدند. استخراج و سنجش میزان کلروفیل کل برگ بر اساس روش Arnon (1949) و تعیین غلظت عنصر نترات نمونه‌های برگ پس از برداشت به روش اسید سولفوسالیسیلیک سود (دستگاه اسپکتروفوتومتر) (Cataldo et al., 1975) انجام گرفت. شاخص سطح برگ (Leaf Area Index) در هر تیمار با معادله Heuvelink (2005) محاسبه شد.

کارایی مصرف نیتروژن (NUE) براساس رابطه (۲)

محاسبه گردید:

$$NUE = \frac{Y_s}{(N_{fertilizer} + N_{soil})} \quad \text{رابطه ۲}$$

$Y_s$ : زیست‌توده اسفناج (کیلوگرم در هکتار)،  $N_{fertilizer}$ : میزان نیتروژن مصرفی از طریق کود اوره (کیلوگرم نیتروژن در هکتار)،  $N_{soil}$ : میزان نیتروژن موجود در خاک قبل از کاشت (کیلوگرم نیتروژن در هکتار).

### تکنیک سطح پاسخ (Response Surface Methodology) در بهینه‌سازی

در تکنیک سطح پاسخ برای هر متغیر وابسته یا پاسخ یک مدل چند جمله‌ای درجه دو کامل توسعه می‌یابد که بهترین برازش را با داده‌های حاصل شده از نتایج طرح آزمایشی داشته باشد. سپس پیدا کردن مجموعه ای بهینه از متغیرهای مستقل که حداکثر یا حداقل مقدار پاسخ بهینه را برای متغیر وابسته تولید کنند و سپس نمایش اثرات مستقیم و متقابل پارامترها انجام می‌گیرد. سطح پاسخ را می‌توان به صورت رابطه (۳) بیان نمود:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad \text{رابطه ۳}$$

$x_i$ : متغیر مستقل که ورودی سیستم و به صورت کمی، پیوسته و تکرارپذیر می‌باشد.  $y$ : متغیر پاسخ که همان پاسخ و هدف سیستم بهینه‌سازی می‌باشد. تابع  $f$  را می‌توان به صورت یک معادله چندجمله‌ای درجه دو کامل به صورت زیر (رابطه ۴) بیان نمود:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad \text{رابطه ۴}$$

کاشت بذرها در ۱۱ شهریورماه در عمق ۲ سانتی‌متر انجام گرفت. جهت اعمال دقیق فاصله بوته بر روی ردیف و مابین ردیف‌های کاشت برای هر تیمار تراکمی با کمک شاخص‌هایی همانند خطکش حفرهای قرارگیری بذر به صورت دقیق مشخص گردید و در هر حفره حدود ۴ عدد بذر قرار گرفت. میزان بذر قابل استفاده در زمان کاشت برای فاصله بوته روی ردیف ۷، ۱۱ و ۱۵ سانتی متر در یک مترمربع به ترتیب در حدود ۳/۹۴، ۲/۵ و ۱/۸۵ گرم بود. اولین آبیاری بلافاصله بعد از کشت بذرها در زمین انجام شد و تا مرحله استقرار گیاهچه‌ها، به فاصله هر ۲ روز یکبار آبیاری صورت می‌گرفت. پس از استقرار گیاهچه‌ها دور آبیاری هر ۴ روز یکبار شد. عملیات تنک بوته به منظور حفظ تراکم بوته بر روی ردیف کاشت پس از ظهور اولین برگ‌های حقیقی انجام گرفت و در هر حفره یک بوته نگهداری شد. اولین کوددهی بلافاصله پس از تنک کردن به صورت سرک انجام گرفت مابقی کود هر تیمار در دو قسط به گیاهان داده شد. برداشت محصول و اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر در ۲ بهمن ماه (۵۳ روز پس از کشت بذرها) به صورت خروج کامل بوته به همراه ریشه انجام گرفت. بر اساس منابع علمی منتشر شده، صفات گیاهی که تحت تأثیر نیتروژن در گیاه اسفناج قرار می‌گیرند شامل وزن تر برگ، زیست‌توده، سطح برگ، کارایی مصرف نیتروژن، غلظت نترات برگ و میزان کلروفیل کل برگ می‌باشند که مولفه‌های برای ارزیابی کارایی مصرف نیتروژن نیز می‌باشند (Biomond 1995, Chan Navarrete et al., 2014)، ازاین‌رو، به جهت اهمیت صفات ذکرشده، در تحقیق ما نیز مورد بررسی قرارگرفتند. بلافاصله پس از برداشت نمونه‌ها (۲ بهمن ماه) در هر تیمار وزن تازه برگ‌ها سنجیده شد، همچنین سطح برگ در تمامی تیمارها با استفاده از دستگاه برگ‌سنج مدل DELAT-TDEVICESlat-England برآورده شد، سپس اجزای گیاهی جهت اندازه‌گیری زیست‌توده در داخل پاکت و درجه حرارت ۷۰ درجه سلسیوس در داخل آون خشک

ارزیابی خواهد شد (Jamieson et al., 1991). محدوده کارایی مدل (ME) از  $-\infty$  تا ۱ متغیر می‌باشد و مقادیر بالاتر نشان‌دهنده کارایی بهتر مدل (Nash & Sutcliffe, 1970) است. سنجش معادله رگرسیونی برازش داده شده بین داده‌های شبیه‌سازی شده و مشاهده شده ((Simulated = a + (b × Observed)) با خط ۱:۱ از طریق آزمون t انجام شد. از این رو، اگر فرض صفر (b = 1) و  $H_0: a = 0$  پذیرفته شود، یعنی تفاوت بین داده‌های شبیه‌سازی شده و مشاهده شده معنی‌دار نخواهد بود و مدل از دقت کافی در پیش‌بینی مشاهدات برخوردار می‌باشد (Mansouri et al., 2015).

مناسب‌ترین مقادیر فاصله بوته روی ردیف کاشت و همچنین مصرف نیتروژن اسفناج بر اساس اهداف هر سناریوی با استفاده از روش بهینه‌سازی عددی (Numerical optimization) ارزیابی شد.

برای ارزیابی میزان دقت مدل در تعیین ترکیب تیمارهای مورد بررسی به منظور برآورده کردن هدف موردنظر در هر سناریو از تابع مطلوبیت (Desirability Function Method) یا رضایت مندی استفاده شد. محدوده این شاخص بین ۰ تا ۱ می‌باشد،  $DI \geq 1$  بیانگر توانمندی بالای مدل در فرایند بهینه‌سازی مقدار متغیرهای مستقل تحت تأثیر متغیر وابسته می‌باشد (Kalavathy et al., 2009).

تجزیه و تحلیل آماری، تعیین ضرایب رگرسیون معادله و بهینه‌سازی با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 و رسم نمودارها با نرم‌افزار Sigma plot 10 انجام شد.

## نتایج و بحث

### ارزیابی مدل

تجزیه واریانس یکی از روش‌های مهم در تعیین میزان کیفیت مدل رگرسیونی برازش داده شده در توانایی پیش‌بینی پاسخ‌ها می‌باشد. آنالیز واریانس (Anova) هر یک از مدل‌های رگرسیونی درجه ۲ کامل (خطی، درجه ۲، و اثر متقابل) مورد استفاده برای پیش‌بینی هر یک از متغیرهای وابسته یا پاسخ (وزن تر برگ، زیست‌توده، شاخص سطح برگ، کارایی مصرف نیتروژن، غلظت نیترات و میزان کلروفیل کل) در جدول ۳ نشان داده شده است.

در این معادله y: متغیر وابسته یا پاسخ (پیش‌بینی شده)، k: تعداد متغیر، i: ثابت خطی؛ j: ثابت درجه دوم،  $\beta_0$ : عرض از مبدا،  $\beta_i$ : ضریب خطی،  $\beta_{ij}$ : ضریب توان دوم،  $\beta_{ij}$ : ضریب اثر متقابل،  $X_i$  و  $X_j$ : متغیر مستقل گذشته می‌باشند که عبارتند از رابطه خطی برای هر متغیر ( $X_1, X_2, \dots, X_n$ ); توان دوم برای هر متغیر ( $X_1^2, X_2^2, \dots, X_n^2$ ); اثرات متقابل دوگانه بین متغیرها ( $X_1X_2, X_1X_3, \dots, X_{n-1}X_n$ ). در این تکنیک برای هر متغیر وابسته (y) مدلی طراحی می‌شود که اثرات اصلی و متقابل فاکتورها (x) بر روی هر متغیر را به صورت جداگانه بیان می‌کند.

در این پژوهش معادله سطح پاسخ با دو متغیر مستقل به صورت رابطه (۵) می‌باشد:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (5)$$

Y: متغیر وابسته (وزن تر برگ، زیست‌توده، شاخص سطح برگ، کارایی مصرف نیتروژن، غلظت نیترات برگ و میزان کلروفیل کل)،  $X_1$  و  $X_2$  به ترتیب فاصله بوته روی ردیف کاشت و کود نیتروژنی؛  $\beta_0, \dots, \beta_{12}$ : ضرایب معادله می‌باشند.

میزان دقت، کیفیت و معنی‌داری معادله مدل‌های برازش داده شده با استفاده از آزمون عدم برازش مشخص گردید. همچنین برای سنجش و مقایسه نتایج مقادیر برازش داده‌شد مدل با مقادیر مشاهده‌شد از معیارهای ضریب تبیین (Coefficient of Determination) (رابطه ۶) جذر میانگین مربع خطا (Root Mean Square of Error) (رابطه ۷)، کارایی مدل (Model Efficiency) (رابطه ۸) و خط ۱:۱ استفاده گردید.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (O_i - P_i)^2}{\sum (O_i - \bar{O})^2} \quad (6)$$

$$RMSE = \frac{100}{\bar{O}} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (P_i - O_i)^2}{n}} \quad (7)$$

$$ME = \frac{\sum_{i=1}^n (O_i - \bar{O})^2 - \sum_{i=1}^n (P_i - O_i)^2}{\sum_{i=1}^n (O_i - \bar{O})^2} \quad (8)$$

$P_i$ : مقادیر پیش‌بینی شده،  $O_i$ : مقادیر اندازه‌گیری شده،  $\bar{O}$ : میانگین داده‌های اندازه‌گیری شده و n: تعداد مشاهدات می‌باشند.

مقادیر RMSE کمتر از ۱۰ درصد به مفهوم شبیه‌سازی بسیار خوب، بین ۱۰ تا ۲۰ درصد خوب، بین ۲۰ تا ۳۰ درصد متوسط و بیشتر از ۳۰ درصد ضعیف

۱:۱ برای نتایج هر متغیر وابسته مشاهده شده و شبیه‌سازی شده در جدول ۴ و شکل ۱ ارائه شده‌است. نتایج آزمون t مربوط به مقایسه خط رگرسیون برازش داده شده برای هر متغیر وابسته با خط ۱:۱ نشان داد که شیب و عرض از مبدا خط رگرسیون برازش داده شده با شیب خط ۱:۱ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشده است، هرچه پراکنش نقاط در اطراف خط ۱:۱ کمتر باشد کارایی مدل در برازش قوی‌تر می‌باشد. همانگونه که به وضوح دیده می‌شود، در معادله خطی رسم شده بین نقاط هر یک از متغیرهای وابسته مشاهده شده با شبیه‌سازی شده نشان داد که پراکنش نقاط در اطراف خط ۱:۱ بسیار کم است و معادله‌های خطی کشیده شده کمترین اریب را از خط ۱:۱ دارد، که خود تصدیقی بر نتایج ذکر شده می‌باشد. در نهایت، نتایج شاخص‌های ارزیابی، اعتبار و صحت مدل رگرسیون را برای شبیه‌سازی متغیرهای وابسته در اسفناج رقم Harrier تأیید می‌کند.

#### وزن تر برگ، زیست‌توده و شاخص سطح برگ

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) اثر خطی متغیرهای مستقل فاصله بوته روی ردیف و کود نیتروژنی بر وزن تر برگ، زیست‌توده و شاخص سطح برگ معنی‌داری بود، اما اثرات درجه دو و برهمکنش هیچ یک از متغیرهای مستقیم معنی‌دار نشد ( $P < 0.01$ ). بنابراین می‌توان گفت در تولید این مدل‌ها تأثیر جمله‌های خطی بسیار بیشتر و قوی‌تر از جمله‌های درجه دو و برهمکنش می‌باشد.

در آزمون عدم برازش برای تمامی متغیرهای وابسته، P-value بزرگ‌تر از ۰/۰۵ مشاهده شد که به مفهوم غیر معنی‌دار شدن آزمون می‌باشد. در واقع، تغییرات متغیر وابسته در محدوده مدل برازش شده را توصیف می‌کند و بیانگر توانایی بالای مدل رگرسیونی درجه دو کامل در برازش مناسب متغیر وابسته با خطای کمتر از ۵ درصد می‌باشد. مقادیر ضریب تبیین برای متغیر وابسته وزن تر برگ، زیست‌توده گیاه، شاخص سطح برگ، کارایی مصرف نیتروژن، غلظت نترات و کلروفیل کل به ترتیب برابر با ۹۸/۲، ۹۸/۱۳، ۹۹، ۹۹، ۹۶/۶۱ و ۹۹/۲۳ درصد بود که بیانگر تطابق بالای مقادیر برازش داده شده با مقادیر واقعی می‌باشد.

هرچقدر جذر میانگین مربع خطاها کوچک‌تر و شاخص کارایی نزدیک به یک باشد نشان‌دهنده برازش بهتر مدل دو جمله درجه دو در توصیف متغیر وابسته (پاسخ) می‌باشد. مقادیر جذر میانگین مربع خطاها و شاخص کارایی مدل هر یک از متغیرهای وابسته: وزن تر برگ، زیست‌توده گیاه، شاخص سطح برگ، کارایی مصرف نیتروژن، غلظت نترات و کلروفیل کل به ترتیب (۹۸/۶۴-۰/۹۸)، (۹۶/۲۳-۰/۹۸)، (۷/۲۷-۰/۹۹)، (۹/۵۳-۰/۹۹)، (۱۹/۹۴-۰/۹۶) و (۴/۶۴-۰/۹۹) به دست آمد. مقادیر نشان می‌دهد مدل رگرسیون درجه دو با توان و دقت بالایی متغیرهای وابسته میزان کلروفیل کل و شاخص سطح برگ را نسبت به متغیر غلظت نترات شبیه‌سازی می‌کند.

کارایی برازش مدل‌های مختلف به صورت خط

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس مدل رگرسیون درجه دو برای متغیرهای وابسته (پاسخ) در اسفناج

Table 3. Results of variance analysis for the second order polynomial model for dependent variables (response) in spinach

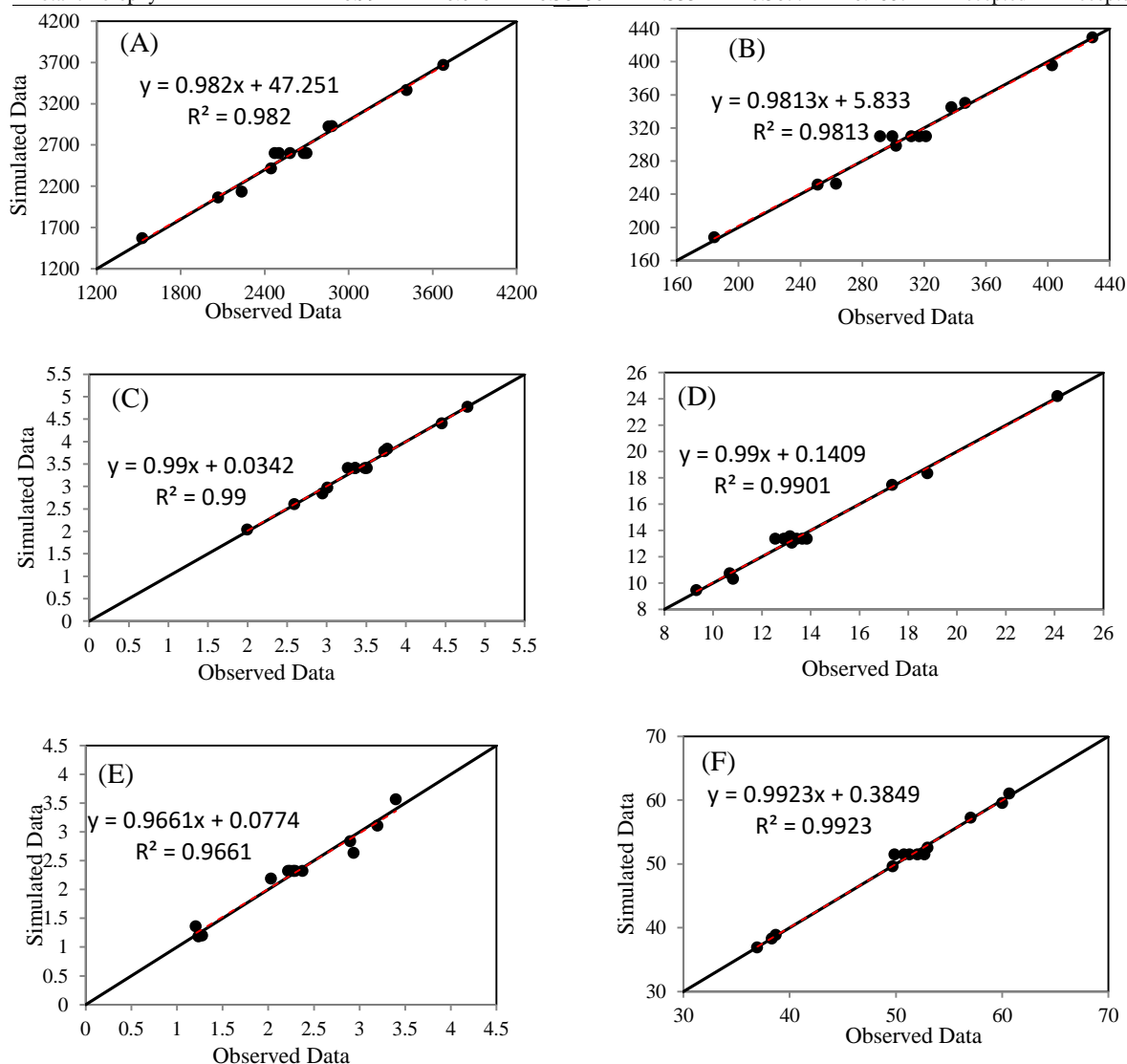
Source of variation	df	Mean of squares					
		Leaf fresh weight	Biomass	Leaf area index	Nitrogen use efficiency	Nitrate concentration	Total chlorophyll
Regression	5	706050**	9210.5**	1.24231**	36.5167**	1.20301**	142.980**
Linear	2	1745207**	22660.6**	3.08805**	81.6581**	2.92485**	344.894**
A	1	2543684**	31091.4**	4.86355**	76.3960**	0.29704 ns	12.529**
B	1	946730**	14229.8**	1.31256**	86.9202**	5.55266**	677.259**
Square	2	18634ns	277.6ns	0.01771ns	3.4338**	0.04234ns	12.120**
A*A	1	34828 ns	523.9 ns	0.02272 ns	0.7580 ns	0.02447 ns	0.428 ns
B*B	1	13634 ns	193.0 ns	0.02612 ns	3.8170**	0.08207 ns	18.168**
Interaction	1	2571ns	175.6ns	0.00000ns	12.4000**	0.08066ns	0.872ns
Error	4	10284	153.7	0.00953	0.2855	0.00388	1.194
Lack of Fit	3	7902ns	87.4ns	0.00826ns	0.2310ns	0.06527ns	0.253ns
R <sup>2</sup> (%)	-	98.20	98.13	99.00	99.00	96.61	99.23
RMSE (%)	-	9.64	9.423	7.27	9.53	19.97	4.65
ME	-	0.98	0.98	0.99	0.99	0.96	0.99

ns, \* and \*\*: به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد. ns, \* and \*\*: Non-significantly difference and significantly different at the 5% and 1% of probability levels, respectively.

جدول ۴. نتایج آماری آزمون t مربوط به مقایسه شیب خط (b) و عرض از مبدا (a) خط ۱:۱ با خط رگرسیون برازش داده شده بین مقادیر مشاهده شده و برآورد شده متغیرهای وابسته ( $\text{Simulated} = a + b \times \text{Observed}$ )

Table 4. Estimated statistics results of the t-test for comparing the slope (b) and intercept (a) of the 1:1 line against the fitted linear regression between the dependent variables of observed and simulated data ( $\text{Simulated} = a + b \times \text{Observed}$ )

Variable	B		A		T-value		H0	
	Value	SE	Value	SE	tb	Ta	a=0	b=1
Leaf fresh weight	0.982	0.04	47.251	107.216	0.45	0.4407	Accepted	Accepted
Biomass	0.981	0.41	5.833	12.98	0.4634	0.4494	Accepted	Accepted
Leaf area index	0.99	0.03	0.034	0.104	0.3333	0.3269	Accepted	Accepted
Nitrogen use efficiency	0.99	0.03	0.141	0.438	0.333	0.3219	Accepted	Accepted
Nitrate concentration	0.966	0.055	0.077	0.13	0.6182	0.5923	Accepted	Accepted
Total chlorophyll	0.992	0.026	0.38486	1.333	0.3077	0.2887	Accepted	Accepted



شکل ۱. مقایسه مقادیر مشاهده شده و برازش داده شده وزن تر برگ (A)، زیست توده (B)، شاخص سطح برگ (C)، کارایی مصرف نیتروژن (D)، غلظت نیترات (E) و میزان کلروفیل کل (F) اسفناج به وسیله خط ۱:۱.

Figure 1. Comparison of observed and simulated data of leaf fresh weight (A), biomass (B), leaf area index (C), nitrogen use efficiency (D), nitrate concentration (E) and total chlorophyll (F) of spinach by 1:1 line.

به صورتی که افزایش فاصله بوته روی ردیف کاشت تأثیر منفی و کاهش بر وزن تر برگ، زیست توده و شاخص سطح برگ اسفناج دارد، حال آنکه سطوح کود نیتروژن باعث اثر مثبت بر پاسخ این سه متغیر می‌گردد. در کلیه

باتوجه به ضرایب رگرسیونی، همانگونه که در شکل ۲ و رابطه‌های (۹)، (۱۰) و (۱۱) مشخص است شیب افزایش وزن تر برگ، زیست توده و شاخص سطح برگ اسفناج در پاسخ به متغیرهای مستقل متفاوت می‌باشد،

برگ، زیست‌توده و شاخص سطح برگ اسفناج مشاهده شده و برازش داده شده به ترتیب در حدود (۳۶۷۶/۹۱ و ۳۶۶۵/۳۵ گرم بر مترمربع)، (۴۲۸/۹۴ و ۴۲۹/۱۱۷ گرم بر مترمربع) و (۴/۷۸ و ۴/۷۷ مترمربع بر مترمربع) مشاهده شد که در تیمار کمترین فاصله بوته روی ردیف (۷ سانتی متر) و بالاترین سطح تیمار کودی (۴۰۰ کیلوگرم کود نیتروژن در هکتار) حاصل شد. همچنین کمترین مقدار وزن تر برگ، زیست‌توده و شاخص سطح برگ مشاهده شده و برازش داده شده در بیشترین فاصله بوته روی ردیف (۱۵ سانتی متر) و تیمار کود نیتروژنی صفر (بدون اعمال کود) حاصل شد (جدول ۵).

فواصل بوته بر روی ردیف با افزایش سطوح کود نیتروژن بهبود در منغیرهای وابسته مشاهده می‌شود. تأثیر تغییر فاصله بوته روی ردیف به نسبت بیشتر از اثر سطوح کود نیتروژن بر پاسخ‌ها می‌باشد.

$$Y = 2600.33 - 651.11X_1 + \quad \text{رابطه (۹)}$$

$$397.23X_2 + 112.29X_1^2 - 70.26X_2^2 + 25.35X_1X_2$$

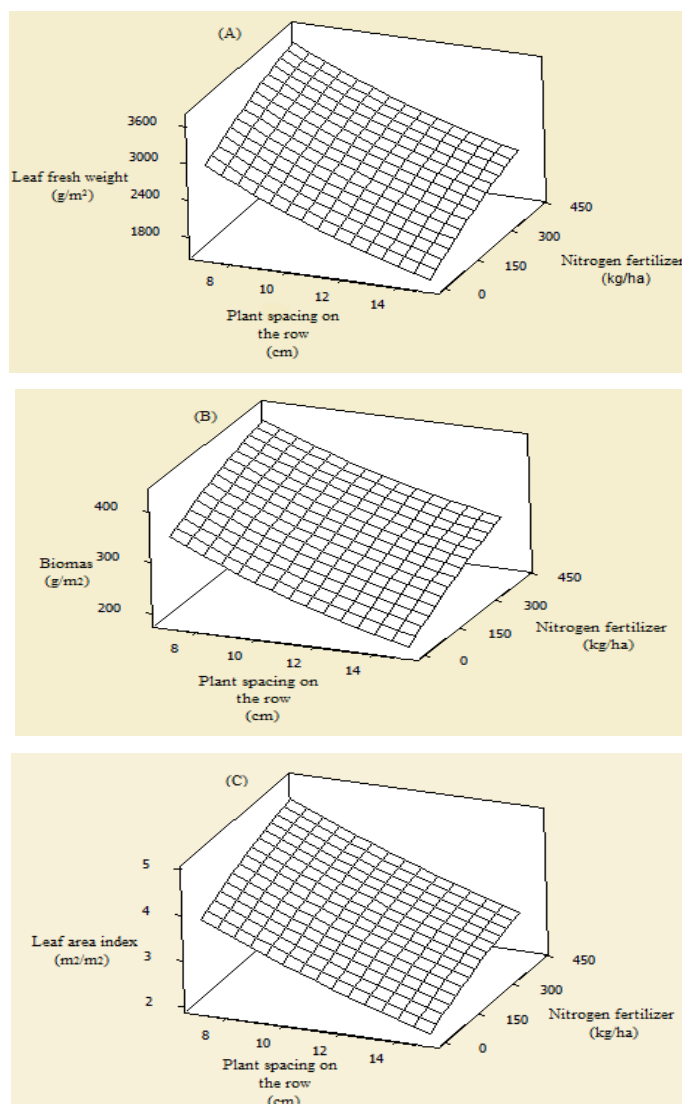
$$Y = 309.644 - 71.985X_1 + \quad \text{رابطه (۱۰)}$$

$$48.699X_2 + 13.773X_1^2 - 8.359X_2^2 + 6.625X_1X_2$$

$$Y = 3.409 - 0.9X_1 + 0.4677X_2 + \quad \text{رابطه (۱۱)}$$

$$0.09X_1^2 - 0.097X_2^2 - 0.006X_1X_2$$

براساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان وزن تر



شکل ۲. نمایش سه بعدی سطح پاسخ وزن تر برگ (A)، زیست‌توده (B) و شاخص سطح برگ (C) اسفناج متأثر از متغیرهای

مستقل فاصله بوته روی ردیف و کود نیتروژنی

Figure 2. 3D response surface plot of the leaf fresh weight (A), biomass (B), leaf area index of spinach (C) to independent variables of plant spacing on the row and nitrogen fertilizer



جدول ۵. نتایج مقادیر شبیه‌سازی‌شده و مشاهده‌شده هر یک از متغیرهای وابسته اسفناج متأثر از متغیرهای مستقل فاصله بوته روی ردیف و کود نیتروژن

Table 5. Result of observed and simulated data the each of independent variables of spinach to independent variables of plant spacing on the row and nitrogen fertilizer

Run	Variables		Leaf fresh weight (g m <sup>-2</sup> )		Biomass (g m <sup>-2</sup> )		Leaf area index (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )		Nitrogen use efficiency (kg kg <sup>-1</sup> )		Nitrate concentration (mg g <sup>-1</sup> dry matter)		Total chlorophyll (mg g <sup>-1</sup> FW)	
	X1	X2	Observed	Simulated	Observed	Simulated	Observed	Simulated	Observed	Simulated	Observed	Simulated	Observed	Simulated
1	7	0	2857.917	2921.60	337.81	344.969	3.7694	3.83667	24.1296	24.2012	1.21	1.3552	36.9543	36.8903
2	7	200	3415.853	3363.73	402.734	395.402	4.4584	4.40102	17.3592	17.4588	2.94	2.6316	49.7136	49.6125
3	7	400	3676.905	3665.35	428.940	429.117	4.7807	4.77085	13.2389	13.0676	3.4	3.5632	57.04	57.2051
4	11	0	2238.245	2132.84	263.128	252.585	2.9487	2.84502	18.7949	18.3484	1.24	1.1806	38.3249	38.2623
5	11	200	2474.432	2600.33	291.540	309.644	3.3655	3.40999	12.5664	13.3667	2.24	2.3149	52.6946	51.4514
6	11	200	2581.780	2600.33	311.782	309.644	3.3655	3.40999	13.4389	13.3667	2.22	2.3149	52.0353	51.4514
7	11	200	2699.849	2600.33	321.333	309.644	3.5087	3.40999	13.8506	13.3667	2.38	2.3149	49.8738	51.4514
8	11	200	2504.167	2600.33	299.504	309.644	3.2713	3.40999	12.9096	13.3667	2.3	2.3149	50.7885	51.4514
9	11	200	2681.061	2600.33	316.933	309.644	3.4859	3.40999	13.6609	13.3667	2.28	2.3149	51.2812	51.4514
10	11	400	2882.222	2927.29	346.571	349.984	3.7299	3.78045	10.6966	10.7361	3.2	3.1046	60.0319	59.5110
11	15	0	1526.944	1568.67	184.359	187.747	1.9983	2.03476	13.1685	13.5433	1.28	1.1942	38.72	38.8466
12	15	200	2069.722	2061.51	251.229	251.431	2.5962	2.60036	10.8288	10.3223	2.033	2.1866	52.985	52.5026
13	15	400	2447.333	2413.82	301.987	298.396	3.0121	2.97145	9.3206	9.4524	2.902	2.8342	60.6733	61.0291

مزرعه و شرایط محیطی در اثر کاهش فاصله بین بوته‌ها از سوی دیگر در به حداکثر رساندن تولید محصول نقش به‌سزایی داشته‌اند، که توسط سایر محققین نیز به آن اشاره شده است (Lefsrud, 2007; Zhang *et al.*, 2015).

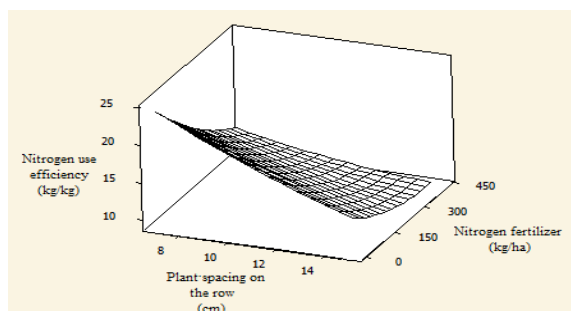
#### کارایی مصرف نیتروژن

اثر خطی، متقابل و درجه دو متغیرهای مستقل فاصله بوته روی ردیف و کود نیتروژن (جدول ۳) بر کارایی مصرف نیتروژن معنی‌دار شده است ( $P < 0.001$ ). از این رو در تولید این مدل تأثیر جمله‌های خطی، جمله‌های درجه ۲ و برهمکنش بسیار قوی می‌باشد. براساس شکل ۳ و تابع رگرسیونی (رابطه ۱۲) شیب افزایش کارایی مصرف نیتروژن اسفناج در پاسخ به افزایش فاصله بوته روی ردیف و سطوح کود نیتروژنی منفی و کاهشی می‌باشد، همچنین میزان تأثیر هر دو متغیر بر پاسخ کارایی مصرف نیتروژن تا حد زیادی مشابه می‌باشند.

$$Y = 13.3667 - 3.568X_1 - 3.806X_2 + 0.5239X_1^2 + 1.1756X_2^2 + 1.7607X_1X_2$$

تأثیر بر همکنش فاصله بوته روی ردیف کاشت و سطوح نیتروژن بر منحنی پاسخ کارایی مصرف نیتروژن نشان‌داد که افزایش فاصله بوته روی ردیف کاشت و سطح نیتروژن باعث کاهش کارایی مصرف نیتروژن می‌گردد و در مقادیر نیتروژن بالاتر از ۳۰۰ کیلوگرم اوره در هکتار این روند کاهشی ثابت باقی می‌ماند.

کودهای نیتروژنی یکی از مهمترین عناصر پر مصرف در تغذیه اسفناج می‌باشد که بر عملکرد اسفناج اثر مثبتی دارند (Hirel *et al.*, 2007). پژوهش‌های متعدد میزان بهینه سطوح کود نیتروژن را با هدف بیشترین عملکرد اسفناج در تیمار کود ۲۴۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار (Mondal & Nad, 2012)، ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار (Stagnari *et al.*, 2007) و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار (Ahmadil, 2010) ذکر نموده‌اند. افزایش نیتروژن در دسترس اسفناج منجر به تحریک تقسیم سلول‌های برگ و افزایش سطح برگ می‌شود (Dreccer, 2006) و کمبود نیتروژن بر روی نمو کانوپی، اندازه برگ و جذب نور تأثیر می‌گذارد، که در نهایت منجر به کاهش سطح برگ و میزان فتوسنتز در واحد سطح گیاه می‌شود (Sinclair & Muchow, 1995) که دلیل اصلی کاهش عملکرد نیز به حساب می‌آید. تراکم کشت بر ویژگی‌های ساختاری کانوپی گیاهی تأثیر می‌گذارد و کلیه این عوامل با یکدیگر به طور قابل توجهی توانایی فتوسنتز کانوپی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Dong *et al.*, 2006). کاهش فاصله بوته منجر به افزایش شاخص سطح برگ میزان جذب تابش خورشید و استفاده بهینه از نور و بهبود در عملکرد گیاه می‌شود (Andrade *et al.*, 2002). براساس نتایج این پژوهش، افزایش وزن تر برگ‌ها، زیست‌توده و شاخص سطح برگ در اثر افزایش سطوح کود از یک‌سو و استفاده بهینه گیاهان از واحد سطح



شکل ۳. نمایش سه بعدی سطح پاسخ کارایی مصرف نیتروژن اسفناج متأثر از متغیرهای مستقل فاصله بوته روی ردیف و کود نیتروژنی  
Figure 3. 3D response surface plot of the nitrogen use efficiency of spinach to independent variables of plant spacing on the row and nitrogen fertilizer

(Majeed *et al.*, 2008)، برنج (Sun *et al.*, 2009)، گندم (Majeed *et al.*, 2015) نشان داد کود نیتروژنی باعث افزایش عملکرد گیاهان می‌شود اما کارایی مصرف نیتروژن کاهش می‌یابد. در این پژوهش کاهش کارایی مصرف نیتروژن در اسفناج با افزایش فاصله بوته روی ردیف کاشت (کاهش بوته در واحد سطح) و افزایش سطوح نیتروژن مشابه با یافته‌های سایر محققین در گیاهان دیگر همانند ذرت (Hamidi & Dabagh, 1995) و پنبه (Li *et al.*, 2017) می‌باشد. در نتیجه میزان کاربرد کود نیتروژن و تراکم کشت از راهکارهای مناسب برای دستیابی به مدیریت پایدار و کاهش آلودگی محیطی به‌شمار می‌آیند.

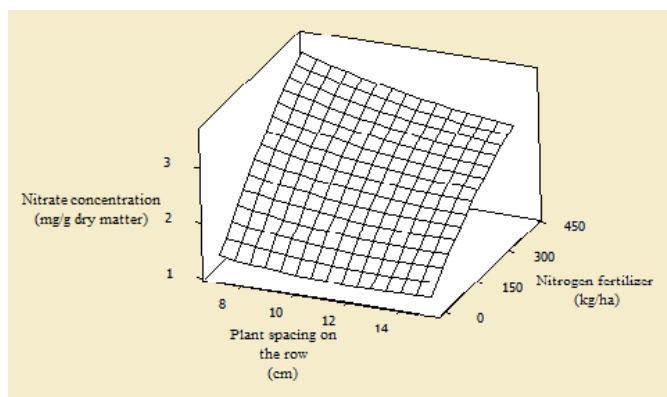
#### غلظت نیترات

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد اثرات خطی متغیر مستقل سطح کود نیتروژنی بر روی میزان غلظت نیترات برگ معنی‌دار شده است و هیچ یک از اثرات خطی، متقابل و درجه دوم فاصله بوته روی ردیف بر این صفت معنی‌دار نبود ( $P < 0.001$ ). همچنین نقش جمله خطی در مقایسه با جمله‌های درجه دو و برهمکنش در ایجاد مدل، بسیار قوی‌تر می‌باشد.

با توجه به ضرایب رگرسیونی در رابطه (۱۳) و شکل ۴، شیب افزایش غلظت نیترات برگ اسفناج در پاسخ به سطوح بالای کود نیتروژن مثبت و افزایشی می‌باشد، در حالی که افزایش فاصله بوته روی ردیف تأثیر منفی و کاهش بر پاسخ غلظت نیترات برگ دارد. همچنین تأثیر کود نیتروژنی بر افزایش غلظت نیترات برگ در مقایسه با فاصله بوته روی ردیف کشت بسیار قوی‌تر می‌باشد.

فاصله بوته ۷ سانتی‌متری و تیمار کودی صفر دارای بالاترین مقدار مشاهده شده (۲۴/۱۳) کیلو گرم ماده خشک به ازای یک کیلو گرم کود نیتروژن و برازش داده شده (۲۴/۲) کیلو گرم ماده خشک به ازای یک کیلوگرم کود نیتروژن) کارایی مصرف نیتروژن بودند. کمترین میزان مشاهده و برازش داده شده این شاخص به ترتیب ۹/۳۲ و ۹/۴۶ کیلو گرم ماده خشک به‌ازای یک کیلوگرم کود نیتروژن، در فاصله بوته ۱۵ سانتی‌متر و سطح کود ۴۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار مشاهده شد (جدول ۵).

کارایی مصرف نیتروژن که به‌صورت واحد محصول برداشت شده (در اینجا وزن زیست‌توده اسفناج) در مقابل واحد وزن نیتروژن عرضه شده، تعریف می‌شود (Moll *et al.*, 1982)، یک ویژگی گیاهی پیچیده است، که تحت کنترل عوامل ژنتیکی می‌باشد و به عنوان یک مشخصه گیاهی مطرح است (Chardon *et al.*, 2010, Xu *et al.*, 2012). سبزی‌های برگی همانند اسفناج که دوره رشد کوتاهی دارند در مقایسه با گیاهان یکساله با چرخه رشد کامل و تولید دانه مانند ذرت، برنج و گندم، فیزیولوژی متفاوتی در متابولیسم نیتروژن نشان می‌دهند، از این رو کارایی مصرف نیتروژن در این محصولات کمتر است (Stagnari *et al.*, 2007). گیاه اسفناج به مقدار قابل توجهی نیتروژن برای رشد و ایجاد رنگ سبز تیره، نیاز دارد (Zhang *et al.*, 2015) (Biemond *et al.*, 1996). با بررسی سطوح مختلف نیتروژن و آب در گیاه اسفناج مشاهده نمودند افزایش کوددهی کارایی مصرف نیتروژن را به شدت کاهش می‌دهد. مطالعه اثر کود نیتروژن بر روی گیاهان پیاز (Halvorson *et al.*,



شکل ۴. نمایش سه بعدی سطح پاسخ غلظت نیترات اسفناج متأثر از متغیرهای مستقل فاصله بوته روی ردیف و کود نیتروژن.  
Figure 4. 3D response surface plot of the nitrate concentration of spinach to independent variables of plant spacing on the row and nitrogen fertilizer.

توسعه سطح برگ در واحد سطح زمین و کاهش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و افزایش سطوح نیترات در گیاه تأکید کرده‌اند (Machado *et al.*, 2018). از این رو تعیین مقدار بهینه مصرف نیتروژن گیاه برای دستیابی به حداکثر پتانسیل رشد رویشی و کیفیت خوراکی گیاه اسفناج بسیار ضروری می باشد.

#### میزان کلروفیل کل

با توجه به نتایج آنالیز واریانس جدول ۳ تنها اثرات خطی و درجه دو فاصله بوته روی ردیف و اثر خطی کود نیتروژنی بر میزان کلروفیل برگ معنی دار شد و اثر متقابل این دو متغیر بر میزان کلروفیل معنی دار نشد. همچنین جمله‌های خطی و درجه ۲ در ساختار این مدل تأثیر قوی تری در مقایسه با جمله برهمکنش دارد.

باتوجه به رابطه (۱۴) و شکل ۵ مشاهده می شود که شیب افزایش میزان کلروفیل برگ اسفناج در پاسخ به افزایش فاصله بوته روی ردیف و سطوح بالای کود نیتروژنی مثبت و افزایشی می باشد. میزان شیب خط در متغیر کود نیتروژنی بیشتر از فاصله بوته روی ردیف است که بیانگر تأثیر بیشتر متغیر کود نیتروژنی در مقایسه با فاصله بوته روی ردیف بر پاسخ میزان کلروفیل برگ می باشد.

$$Y = 51.451 + 1.445X_1 + 10.624X_2 - 0.3939X_1^2 - 2.5648X_2^2 + 0.669X_1X_2$$

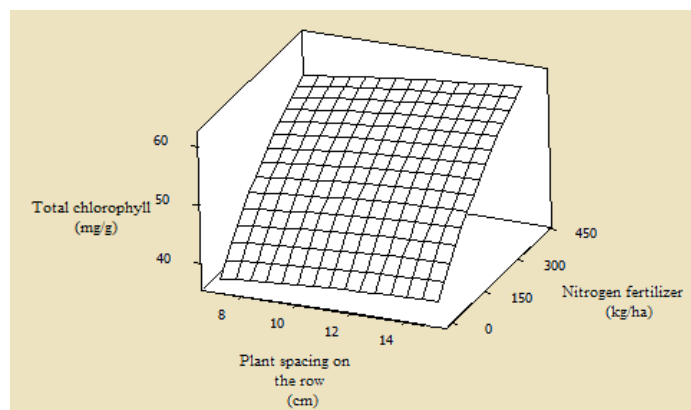
رابطه (۱۴)

$$Y = 2.315 - 0.223X_1 + 0.962X_2 + 0.094X_1^2 - 0.172X_2^2 - 0.142X_1X_2$$

رابطه (۱۳)

کمترین غلظت نیترات برگ اسفناج مشاهده شده و برازش داده شده به ترتیب در حدود ۱/۲۱ و ۱/۱۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد که در تیمار فاصله بوته روی ردیف ۱۱ سانتی متر با کمترین سطح تیمار کودی (صفر) حاصل شد. بیشترین غلظت نیترات برگ مشاهده شده و برازش داده شده در کمترین فاصله بوته روی ردیف (۷ سانتی متر) و بالاترین تیمار کود نیتروژن (۴۰۰ کیلوگرم بر هکتار) در حدود ۳/۴ و ۳/۵۶ میلی گرم بر گرم وزن خشک مشاهده شد (جدول ۴).

تجمع نیترات در گیاه اسفناج به شدت متأثر از نوع رقم، تغذیه نیتروژنی، دما، طول روز و شدت نور می باشد (Stagnari *et al.*, 2007). در این پژوهش مقادیر بالای تغذیه نیتروژن و کاهش فاصله بوته روی ردیف (تراکم بالای بوته در واحد سطح)، منجر به افزایش زیست توده گیاه، توسعه سطح برگ و تراکم شاخ و برگ در واحد سطح زمین و تشدید کاهش شدت نور دریافتی توسط گیاه گردید که در نهایت باعث افزایش سطوح غلظت نیترات در اسفناج شد. تأثیر مثبت افزایش غلظت نیتروژن تغذیه ای بر تجمع نیترات توسط سایر محققین در اسفناج (Lefsrud *et al.*, 2007; Gutiérrez-; Rodríguez *et al.*, 2013)، کاهو (Lui *et al.*, 2014) و کلم برگ (Wang & Li, 2007) نیز اشاره شده است. همچنین محققین به کاهش شدت نور دریافتی توسط گیاه در اثر افزایش سایه اندازی برگها بر روی هم در اثر



شکل ۵. نمایش سه بعدی سطح پاسخ کلروفیل کل اسفناج متأثر از متغیرهای مستقل فاصله بوته روی ردیف و کود نیتروژن  
Figure 5. 3D response surface plot of the total chlorophyll of spinach to independent variables of plant spacing on the row and nitrogen fertilizer

مطلوب‌ترین پاسخ بسته به نوع هدف قیدهایی برای متغیرهای وابسته به منظور کسب مطلوب‌ترین پاسخ تعیین می‌شود. در هر سناریو ممکن است تعدادی از متغیرهای وابسته به عنوان بیشترین عامل تأثیر گذار مثبت برای رسیدن به هدف سناریو مطرح باشند که میزان بیشینه یا کمینه و بالاترین ضریب تأثیر را به خود اختصاص می‌دهند. از سوی دیگر بعضی از متغیرهای وابسته ممکن است تأثیر منفی و کاهنده بر هدف سناریو داشته باشند با مقادیر بیشینه و کمینه درحالی که کمترین ضریب تأثیر را نیز دریافت می‌کنند.

در سناریوی اقتصادی اسفناج متغیرهای وزن تر و زیست‌توده که در سودآوری تولید اسفناج نقش اساسی دارند به عنوان عوامل اصلی و بیشینه با ضریب تأثیر ۲ در نظر گرفته شدند و سایر متغیرها ضریب تأثیر ۱ می‌گیرند. نتایج حاصل برای این سناریو نشان داد که بهترین ترکیب تیماری برای دستیابی به هدف ذکرشده، فاصله بوته روی ردیف ۷ سانتی متر و سطح کودی ۱۸۹/۹ کیلوگرم نیتروژن در هکتار می‌باشد، در این حالت میزان هر یک از متغیرهای وابسته پیش‌بینی شده برای وزن تر برگ ۳۳۴۴/۷۷ گرم بر مترمربع، میزان زیست‌توده ۳۹۳/۲۶ گرم بر مترمربع، شاخص سطح برگ ۴/۳۸ مترمربع بر مترمربع، کارایی مصرف نیتروژن ۱۷/۷۴ کیلوگرم بر کیلوگرم، میزان غلظت نیترات ۲/۵۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک و میزان کلروفیل برگ ۴۹/۱ میلی گرم بر گرم وزن تر خواهد بود. شاخص مطلوبیت در فرایند بهینه‌سازی در حدود ۰/۹۷ به‌دست آمد.

براساس نتایج به‌دست‌آمده بیشترین میزان کلروفیل برگ اسفناج مشاهده‌شده و برازش داده‌شده به ترتیب در حدود ۶۰/۶۷ و ۶۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که در تیمار بیشترین فاصله بوته روی ردیف (۱۵ سانتی‌متر) با بالاترین سطح تیمار کود (۴۰۰ کیلوگرم کود نیتروژن در هکتار) حاصل شد. همچنین کمترین میزان کلروفیل برگ مشاهده‌شده و برازش داده شده در کمترین فاصله بوته روی ردیف (۷ سانتی‌متر) و تیمار کود نیتروژنی صفر (بدون اعمال) به‌دست آمد (جدول ۵).

نیتروژن در ساختار لیپیدها، پروتئین‌های رشد و کلروفیل‌ها که به عنوان مهم‌ترین ترکیبات دریافت کننده نور می‌باشند نقش مهمی ایفا می‌کند. بنابراین تغذیه نیتروژن در تعیین ظرفیت فتوسنتزی و رشد گیاهان بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Abrol *et al.*, 1999). سطوح پایین نیتروژن (Evans & Terashima, 1987, Zhang *et al.*, 2015) و تراکم بالا (Dimri & Gulshal, 1997) بطور قابل توجهی محتوای کلروفیل اسفناج را کاهش می‌دهد که مطابق با یافته‌های این پژوهش است. تراکم های بالا به دلیل سایه اندازی برگ‌ها و افزایش رقابت بیشتر برای جذب مواد مغذی، آب و استفاده از فضای پیرامون گیاه در نهایت منجر به کاهش محتوای کلروفیل برگ‌ها می‌شود (Law & Egharevba, 2009).

#### بهینه‌سازی منابع براساس سناریوها

در بهینه‌سازی و سناریو سازی برای دستیابی به

برگ ۳۲۹۲/۰۴ گرم بر مترمربع، میزان زیست توده ۳۸۷/۲۵ گرم بر مترمربع، شاخص سطح برگ ۴/۳۱ مترمربع بر مترمربع، کارایی مصرف نیتروژن ۱۷/۴۶ کیلوگرم بر کیلوگرم، میزان غلظت نیترات ۲/۵۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک و میزان کلروفیل برگ ۴۹/۲۳ میلی گرم بر گرم وزن تر. میزان شاخص مطلوبیت در حدود ۰/۸۹ حاصل شد که توانایی بالای مدل در پیش بینی متغیرهای مستقل برای هدف بازارپسندی اسفناج را نشان می دهد.

در سناریوی حد مطلوب تولید اسفناج هدف اصلی تولید محصولی قابل قبول می باشد. از این رو می توان همه متغیرهای وابسته را با ضریب تأثیر و ارزش یکسان در نظر گرفت. ترکیب تیماری فاصله بوته روی ردیف ۷ سانتی متر و میزان کود نیتروژن ۱۴۹/۵ کیلوگرم در هکتار مناسب ترین پاسخ را ارائه می دهد. در این حالت میزان هر یک از متغیرهای وابسته به صورت، وزن تر برگ ۳۲۶۵/۳۴ گرم بر مترمربع، زیست توده ۳۸۴/۲۴ گرم بر مترمربع، شاخص سطح برگ ۴/۲۸ مترمربع بر مترمربع، کارایی مصرف نیتروژن ۱۸/۹۴ کیلوگرم بر کیلوگرم، میزان غلظت نیترات ۲/۳۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک و میزان کلروفیل برگ ۴۶/۸۸ میلی گرم بر گرم وزن تر برآورد گردید. میزان شاخص مطلوبیت در این سناریو در حدود ۰/۸۲ می باشد.

#### نتیجه گیری کلی

نتایج آنالیز واریانس و شاخص های ارزیابی مدل، صحت و دقت بالای مدل های به دست آمده در بهینه سازی منابع تولید را تأیید می کنند با توجه به پژوهش انجام شده می توان اظهار داشت که سناریو اقتصادی بالاترین میزان وزن تر برگ، زیست توده، شاخص سطح برگ و کلروفیل کل را دارا می باشد و همچنین میزان غلظت نیترات پایین تر از حد استاندارد جهانی را تخمین می زند، از سوی دیگر بالاترین شاخص مطلوبیت (۰/۹۷) را نسبت به سایر سناریوها دارد که حاکی از توان بالاتر شبیه سازی در تعیین بهینه منابع می باشد. در نتیجه در سناریوی اقتصادی اهداف سودآوری اسفناج به خوبی تأمین گردید، ضمن آنکه تا حد بالایی

در سناریوی سلامت غذایی، هدف کاهش غلظت نیترات برگ به منظور تولید محصول سالم می باشد از این رو متغیرهای تأثیرگذار برای این سناریو، شامل کمینه شدن میزان غلظت نیترات برگ می باشد که با ضریب تأثیر ۲ در نظر گرفته شد. سایر متغیرها بیشینه و ضریب تأثیر ۱ گرفتند. براساس نتایج، مطلوب ترین ترکیب تیمارهای متغیر مستقل توصیه شده مدل برای سناریوی سلامت غذایی با فاصله بوته روی ردیف ۷/۴۸ سانتی متر و میزان کود ۶۰/۶ کیلوگرم در هکتار به دست آمد. سطوح پاسخ متغیرهای وابسته به این شرح بود: برای وزن تر برگ ۲۹۶۳/۷۸ گرم بر مترمربع، زیست توده ۳۴۹/۶ گرم بر مترمربع، شاخص سطح برگ ۳/۹ مترمربع بر مترمربع، کارایی مصرف نیتروژن ۲۱/۲۱ کیلوگرم بر کیلوگرم، غلظت نیترات ۱/۷۴ میلی گرم بر گرم وزن خشک و میزان کلروفیل برگ ۴۱/۵۱ میلی گرم بر گرم وزن تر. شاخص مطلوبیت به دست آمده برای پاسخ به این سناریو در حدود ۰/۷۷ بود و حاکی از توان متوسط مدل در برآورد متغیر وابسته می باشد. اتحادیه اروپا حداکثر محدوده نیترات مجاز برای اسفناج تازه برداشت را ۳۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک تعیین نموده است (Santamaria, 2006). براساس نتایج همان گونه که مشخص است در ترکیب تیماری فوق (۷/۴۸ سانتی متر فاصله بوته روی ردیف و ۶۰/۶ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) غلظت نیترات برآورد شده و میزان کارایی مصرف نیتروژن بخوبی اهداف این سناریو را تأمین می نماید، اگر چه شاخص سطح برگ در مقایسه با دیگر سناریوها کاهش شدیدی را نشان می دهد.

در سناریوی بازار پسندی محصول اسفناج، متغیر مهم و تأثیرگذار بر کیفیت ظاهری، محتوای کلروفیل برگ است که به عنوان عامل اصلی و بیشینه با ضریب تأثیر ۲ در نظر گرفته شد و سایر متغیرها ضریب تأثیر ۱ گرفتند. از این رو شرایط ایده آل و بهینه متغیرهای مستقل برای حصول پاسخ مورد نظر، ترکیب تیماری فاصله بوته روی ردیف ۷/۲۴ سانتی متر و میزان کود نیتروژن ۱۸۹/۹ کیلوگرم در هکتار می باشد. در این حالت ترکیب بندی تیمارهای مستقل میزان هر یک از متغیرهای وابسته به این شرح حاصل می گردد: وزن تر

دسته از مدل‌ها تنها در منطقه و شرایط مورد بررسی صادق می‌باشد. از این‌رو توصیه ترکیب تیمار ایده‌آل (فاصله بوته روی ردیف و کود نیتروژن) پیشنهادی به تولیدکنندگان براساس نتایج این پژوهش برای منطقه کرج و مناطق مشابه از نظر شرایط محیطی و در کشت پاییزه رقم Harrier معتبر می‌باشد.

اهداف کیفی و بازاریابی نیز، برآورده شد. از این رو در سناریوی فوق مناسب‌ترین ترکیب تیماری کود نیتروژنی ۱۸۹/۹ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و فاصله بوته روی ردیف ۷ سانتی متر در جهت استفاده بهینه از منابع را نسبت به دیگر سناریوها را نشان می‌دهد. نکته قابل توجه درباره مدل‌های رگرسیونی، اعتبار این

## REFERENCES

1. Abrol, Y. P., Chatterjee, S. R., Kumar, P. A. & Jain, V. (1999). Improvement in nitrogen use efficiency: physiological and molecular approaches. *Current Science*, 76, 1357-1364.
2. 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. *American-Eurasian journal of Agriculture and Environmental Science*, 8(4), 468-473.
3. Andrade, F. H., Calvino, P., Cirilo, A. & Barbieri, P. (2002). Yield responses to narrow rows depend on increased radiation interception. *Agronomy Journal*, 94: 975-980.
4. Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1-15.
5. Aslan, N. (2007). Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling the influence of some operating variables of a Multi-gravity Separator for coal cleaning. *Fuel*, 86, 769-776.
6. Bansal, G. L., Rana, M. C. & Upadhyay, R. G. (1995). Response of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) to plant density. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 65(11), 818-820.
7. Biemond, H. (1995). Effects of nitrogen on development and growth of the leaves of vegetables. 3. Appearance and expansion growth of leaves of spinach. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 43, 247-260.
8. Biemond, H., Vos, J. & Struik, P. C. (1996). Effects of nitrogen on accumulation and partitioning of dry matter and nitrogen of vegetables. 3. Spinach. *Journal of Agricultural Science*, 44, 227-239.
1. Box, G. E. P. & Hunter, J. S. (1957). Multi-factor experimental design for exploring response surfaces. *Annals of Mathematical Statistics*, 28, 195-241.
9. Bracey, R.P., Parish, R. L., Bergeron, P. E. & Constantin, R. J. (1990). High density planting for maximizing yields in greens. *Louisiana Agriculture*, 34(2), 6-7.
10. Cantliffe, D. J. (1973). Nitrate accumulation in table beets and spinach as affected by nitrogen, phosphorus, and potassium nutrition and light intensity. *Agronomy Journal*, 65, 563-565.
11. Cataldo, D. A., Haroon, M., Schrader, L. E. & Youngs, V. L. (1975). Rapid colorimetric of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic. *Soil Science and Plant Analysis*, 6 (1), 71-80.
12. Chardon, F., Barthélémy, J., Daniel-Vedele, F. & Masclaux-Daubresse, C. (2010). Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis thaliana* cultivated with limiting and ample nitrogen supply. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2293-2302.
13. Dimri, D. C. & Gulshan, L. A. L. (1997). Effect of nitrogen fertilization spacing and method of planting on yield parameters and quality of tomato cultivar 'Pant Banar'. *Vegetable Science*, 15(2), 105-112.
14. Dong, H., Li, W., Tang, W., Li, Z., Zhang, D. & Niu, Y. (2006). Yield, quality and leaf senescence of cotton grown at varying planting dates and plant densities in the Yellow River Valley of China. *Field Crops Research*, 98, 106-115.
15. Dreccer, M. F. (2006). Nitrogen use at the leaf and canopy level: A framework to improve crop N use efficiency. *Journal of Crop Improvement*, 15(2), 97-125.
16. Evans, J. R. & Terashima, I. (1987). Effects of nitrogen nutrition on electron transport components and photosynthesis in spinach. *Functional Plant Biology*, 14, 59-68.
17. Gutierrez-Rodriguez, E., Lieth, H. J., Jernstedt, J. A., Labavitch, J. M., Suslow, T. V. & Cantwell, M. I. (2013). Texture, composition and anatomy of spinach leaves in relation to nitrogen fertilization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 227-237.
18. Goel, J., Kadirvelu, K., Rajagopal, C. & Garg V. K. (2006). Cadmium (II) uptake from aqueous solution by adsorption onto carbon aerogel using a response surface methodological approach. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45(19), 6531-6537.
19. Hamidi A. & A. Dabagh Mohamadinasab. (1996). Evaluation of grain yield and its components, biomass and harvest index in two corn hybrids in plant density and nitrogen rates. *Agricultural Science Journal*, 10, 39-53.
20. Heuvelink, E. (2005). *Tomatoes*. (pp. 339). CABI Publishing.

21. Heins, B. & Schenk, M. (1987). Nitrogen. *Journal of Plant Nutrition*, 10(9), 1743-1751.
22. Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B. & Gallais, A. (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany*, 58(9), 2369-2387.
23. Jamieson, P. D., Porter, J. R., & Wilson, D. R. (1991). A test of the computer simulation model ARCWHEAT1 on wheat crops grown in New Zealand. *Field Crops Research*, 27, 337-350.
24. Kant, S., Bi, Y.M. & Rothstein, S. (2011). Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), 1499-1509.
25. Kalavathy, H. M., Regupathib, I., Pillai, M. G. & Miranda, L. R. (2009). Modelling, analysis and optimization of adsorption parameters for H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> activated rubber wood sawdust using response surface methodology (RSM). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 70, 35-45.
26. Koocheki, A., Nassiri Mahallati, M., Moradi, R., Mansouri, H. (2012). Optimization of water, nitrogen and density in canola cultivation by central composite design. *Journal of Agroecology*, 1(3), 1-16. (in Farsi).
27. Law-Ogbomo, K. E. & Egharevba, R. K. A. (2009). Effects of planting density and NPK fertilizer application on yield and yield components of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) in forest Location. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(2), 152-158.
28. Lefsrud, M. G., Kopsell, D. A. & Kopsell, D. E. (2007). Nitrogen levels influence biomass, elemental accumulations, and pigment concentrations in spinach. *Journal of Plant Nutrition*, 30(2), 171-185.
29. Li, P., Dong, H., Zheng, C., Sun, M., Liu, A., Wang, G., Liu, S., Zhang, S., Chen, J., Li, Y., Pang, C. & Zhao, X. (2017). Optimizing nitrogen application rate and plant density for improving cotton yield and nitrogen use efficiency in the North China Plain. *Plos One*, 12(10), 1-15.
30. Liu, C., Sung, Y., Chen, B. & Lai, H. (2014). Effects of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, 4427-4440.
31. Machado, R. M. A., Alves-Pereira, I. & Ferreira, R. M. A. (2018). Plant growth, phytochemical accumulation and antioxidant activity of substrate-grown spinach. *Heliyon*, 4, e00751.
32. Majeed, A., Muhmood, A., Niaz, A., Javid, S., Ashfaq Ahmad, Z., Hussain Shah, S. S., Hussain Shah, A. (2015). Bed planting of wheat (*Triticum aestivum* L.) improves nitrogen use efficiency and grain yield compared to flat planting. *The Crop Journal*, 3, 118-124.
33. Mansouri, H., Banayan Aval, M., Rezvani Moghaddam, P. & Lakzian, A. (2014a). Management of nitrogen, irrigation and planting density in persian shallot (*Allium hirtifolium*) by using central composite optimizing method. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, 41-60. (in Farsi).
34. Mansouri, H., Banayan, M., Rezvani Moghaddam, P. & Lakzian, A. (2014b). Management of nitrogen fertilizer, irrigation and plant density in onion production using response surface methodology as optimization approach. *African Journal of Agricultural Research*, 9(7), 676-687.
35. Mansouri, H., Rael, Y., Nokhbe Zaeim, A. (2015). Simulating future wheat yield under climate change, carbon dioxide enrichment and technology improvement in Iran. Case study: Azarbaijan region. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13(4), 1-12.
36. Moll, R. H., Kamprath, E. J. & Jackson, W. A. (1982). Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. *Agronomy Journal*, 74, 562-564.
37. Mondal, S. & Nad, B. K. (2012). Nitrate accumulation in spinach as influenced by sulphur and phosphorus application under increasing nitrogen levels. *Journal of Plant Nutrition*, 35 (14), 2081-2088.
38. Nash, J. E. & Sutcliffe, J. V. (1970). River flow forecasting through conceptual models. Part I: A discussion of principles. *Journal Hydrology*, 10, 282-290.
39. Neeteson, J. J. & Carton, O. T. (1999). The environmental impact of nitrogen in field vegetable production. *Acta Horticulturae*, 563, 21-28.
40. Okazaki, K., Oka, N., Shinano, T., Osaki, M. & Takebe, M. (2008). Differences in the metabolite profiles of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaf in different concentrations of nitrate in the culture solution. *Plant Cell Physiology*, 49(2), 170-177.
41. Peoples, M. B., Freney, J. R. & Mosier, A. R. (1995). Grapes. In: P.E. Bacon (Ed), *Nitrogen fertilization in the environment*. (pp. 565-602.) New York: Marcel Dekker Inc.
42. Santamaria, P. (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 10-17.
43. Sharma, S. K. (1994). Effect of nitrogen and spacing on plant growth seed yield and quality of spinach seed. *Annals of Agricultural Research*, 15, 462-464.
44. Sinclair, T. R. & Muchow, R. C. (1995). Effect of nitrogen supply on maize yield: I. modeling physiological responses. *Agronomy Journal*, 87(4), 632-641.

45. Stagnari, F., Bitetto, V. D. & Pisante, M. (2007). Effects of N fertilizers and rates on yield, safety and nutrients in processing spinach genotypes. *Scientia Horticulturae*, 114, 225-233.
46. Sun, Y. J., Sun, Y. Y., Li, X. Y., Guo, X. & Ma, J. (2009). Relationship of nitrogen utilization and activities of key enzymes involved in nitrogen metabolism in rice under water-nitrogen interaction. *Acta Agronomica Sinica*, 35, 2055-2063.
47. Tafteh, A. & Sepaskhah, A. (2012). Yield and nitrogen leaching in maize field under different nitrogen rates and partial root drying irrigation. *International Journal of Plant Production*, 6, 93-113.
48. Wang, Z. & Li, S. (2007). Effects of nitrogen and phosphorus fertilization on plant growth and nitrate accumulation in vegetables. *Journal of Plant Nutrition*, 27(3), 539-556.
49. Wolfe, A. & Patz, J. A. (2002). Reactive nitrogen and human health: acute and long-term implications. *Journal of the Human Environment*, 31(2), 120-125.
50. Xu, G., Fan, X. & Miller, A. J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 153-182.
51. Zhang, J., Sha, Z., Zhang, Y., Bei, Z. & Cao, L. (2015). The effects of different water and nitrogen levels on yield, water and nitrogen utilization efficiencies of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, 95(4), 671-679.