



Terra Latinoamericana

E-ISSN: 2395-8030

terra@correo.chapingo.mx

Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo,
A.C.
México

Pliego, Lina; Ocaña, Antonio; Lluch, Carmen
CRECIMIENTO, FIJACIÓN DE NITRÓGENO, ACUMULACIÓN Y ASIMILACIÓN DE NITRATOS CON
DOSIS DE NITRÓGENO EN FRIJOL

Terra Latinoamericana, vol. 21, núm. 2, abril-junio, 2003, pp. 213-223

Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C.

Chapingo, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57315595008>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

CRECIMIENTO, FIJACIÓN DE NITRÓGENO, ACUMULACIÓN Y ASIMILACIÓN DE NITRATOS CON DOSIS DE NITRÓGENO EN FRIJOL

Growth, Nitrogen Fixation, Nitrate Accumulation and Assimilation with Nitrogen Levels in Common Bean

Lina Pliego¹, Antonio Ocaña² y Carmen Lluch²

RESUMEN

Se inocularon plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. África con *Rhizobium tropici* (CIAT 899) y se cultivaron en condiciones controladas en una cámara de crecimiento. Se ensayaron cinco dosis de KNO₃ (0, 1, 2, 5 y 10 mM) que se adicionaron al medio de cultivo inmediatamente después de la siembra y durante el desarrollo del experimento. Se estudió el efecto de la adición del nitrato en cuatro muestreos (18, 28, 34 y 40 días después de la siembra), registrando variables de crecimiento, fijación de nitrógeno estimada por la actividad reductora de acetileno, la acumulación de NO₃⁻ y su asimilación, en raíz y nódulo. El crecimiento de las plantas resultó favorecido al aplicar el nitrato al medio de cultivo, haciéndose más evidente con la edad de la planta. La cantidad de biomasa nodular (PSN, peso seco de nódulos) se incrementó desde los 18 días del cultivo con las dosis 1 y 2 mM. La adición de 1 mM de KNO₃ aumentó la actividad de la nitrogenasa (ARA) en el periodo vegetativo. Dosis elevadas de nitrato estimularon la acumulación de nitrato en hoja, raíz y nódulo. La actividad nitrato reductasa en raíz (NRr) resultó inducida con los tratamientos 5 y 10 mM, mientras que en el nódulo (NRn) la máxima actividad ocurrió con 1 mM de KNO₃. La actividad nitrito reductasa en raíz (NiRr) también se estimuló con los tratamientos 5 y 10 mM. Los resultados obtenidos indican que existe una relación entre la actividad de la nitrogenasa y nitrato reductasa en el nódulo. Además, aplicaciones tempranas de dosis bajas de KNO₃, etapa en la que la planta no está aún en posibilidades de beneficiarse del N₂ que procede de

la fijación simbiótica, favorecen el desarrollo del nódulo, la fijación de nitrógeno y la actividad nitrato reductasa. La contribución de la actividad NRn en la reducción del NO₃⁻ fue considerable. Las leguminosas tienen la posibilidad de beneficiarse del nitrógeno (NO₃⁻) del suelo y del procedente de la fijación biológica del nitrógeno.

Palabras clave: Fertilización nitrogenada, nitrato reductasa, nitrito reductasa, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium tropici*.

SUMMARY

Common bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Africa were inoculated with *Rhizobium tropici* strain CIAT-899 and grown in an environment-controlled chamber. Five concentrations of KNO₃ (0, 1, 2, 5, and 10 mM) were added to the growth medium immediately after sowing and during all the experiment. The effect of nitrate was studied at four sampling dates (18, 28, 34, and 40 days after sowing). Plant growth, nitrogen fixation, accumulation and assimilation of nitrate, in root and nodule were registered. Plant growth was stimulated with the application of nitrate to the growth medium. The nodular biomass (NDW) increased 18 days after sowing with 1 and 2 mM. The supply of 1 mM KNO₃ increased nitrogenase activity (ARA) during vegetative stage. The highest dose of nitrate stimulated nitrate accumulation in leaves, root, and nodule. Nitrate reductase activity in root (NRr) was enhanced with 5 and 10 mM NO₃⁻, while in nodule the maximum activity was recorded with 1 mM KNO₃. Nitrite reductase activity in root (NiRr) was also stimulated with treatments of 5 and 10 mM KNO₃. The results indicated that there is a relationship between ARA and NR in nodules. In addition, a supply of early and low doses of KNO₃ favored nodule growth, nitrogenase activity, and NR in nodule. The contribution of NRn in the reduction of NO₃⁻ was significant. In legumes it is possible to

¹ Instituto Tecnológico Agropecuario No. 23 de Oaxaca. Apartado Postal 273, 68000 Oaxaca, Oaxaca. México. (linapliego@hotmail.com)

² Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Campus Fuentenueva, Universidad de Granada. 18071 Granada, España.

obtain benefits from soil-N and N-N₂ from biological fixation.

Index words: Nitrogen fertilization, nitrate reductase, nitrite reductase, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium tropici*.

INTRODUCCIÓN

Para las leguminosas en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, las principales fuentes de nitrógeno son: aquélla que procede del suelo y la que se genera durante la fijación biológica del nitrógeno (FBN). No obstante, la FBN resulta más costosa en términos energéticos, por lo que la planta utiliza preferentemente el N inorgánico del suelo, y es el nitrato la forma más común de aportar este nutrimento (Becana y Bedmar, 1991).

La primera enzima que interviene en la reducción del nitrato es la nitrato reductasa. En leguminosas como *Glycine* y *Vigna* se ha observado esta actividad, tanto en el citosol nodular, como bacteroidal; mientras que *Phaseolus*, *Lotus*, *Pisum* y *Vicia* sólo la expresan en el citosol nodular (Becana y Bedmar, 1991). En una segunda etapa, el nitrito generado es reducido por la nitrito reductasa a amonio. Esta enzima se localiza en la fracción soluble de los nódulos y aumenta su actividad con el contenido de nitrito, presumiblemente inducida por éste (Caba *et al.*, 1991).

Phaseolus vulgaris presenta una amplia distribución que va desde América hasta Asia. Su importancia radica en el hecho de que representa la mayor fuente de proteínas vegetales para la población de bajos recursos económicos, como es el caso de otras leguminosas (Mahé *et al.*, 1994). Un porcentaje importante de la superficie destinada a este cultivo corresponde a suelos marginales, donde el nitrógeno es el nutrimento que limita la productividad de esta leguminosa (Bliss, 1993). Además, como en el caso de otras leguminosas, el frijol se cultiva en zonas destinadas a rotación de cultivos, donde se incluyen los cereales a los que generalmente se aplican elevadas concentraciones de nitrógeno, razón por la que suelen encontrarse altas cantidades de nitrato en estos suelos (Herridge *et al.*, 1994) y que, como se ha probado, afecta de manera negativa la FBN. De manera general, esta leguminosa es considerada pobre para la FBN (Bliss, 1993). No obstante, estudios previos muestran que algunos genotipos son capaces de fijar cantidades elevadas de nitrógeno (Hardarson, 1993).

No es posible generalizar una dosis de nitrato adecuada en los cultivos de leguminosas, ya que diversos factores están involucrados: el genotipo (Cherney y Duxbury, 1994; Ocaña *et al.*, 1998); la forma de aplicar el nitrato (Tanacka *et al.*, 1985; Da Silva *et al.*, 1993); la etapa de desarrollo en que se aporta el nitrógeno y se realiza la cosecha (Truchet y Dazzo, 1982; Tirado *et al.*, 1990); el tiempo del tratamiento (Caba *et al.*, 1995); la especie de leguminosa (Sagan *et al.*, 1993); la cepa de *Rhizobium* utilizada (Hervás *et al.*, 1991); las condiciones nutricionales del suelo (Tsai *et al.*, 1993), entre otros factores. El objetivo del presente estudio fue analizar las variaciones e interrelaciones observadas por exposición al KNO₃ aplicado a lo largo del desarrollo del cultivo, en el crecimiento, la fijación de nitrógeno, la asimilación de nitratos y la relación entre estas variables, en plantas de frijol inoculadas con bacterias del género *Rhizobium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* var. África (proporcionadas por Interlagasa, S.A. Valencia, España) que se esterilizaron con hipoclorito de sodio a 5% por 3 min y se germinaron en condiciones estériles en charolas con vermiculita húmeda por 48 h a 26 °C. Las plántulas seleccionadas por el tamaño de la radícula (3 cm) se transfirieron a jarras de Leonard, utilizando vermiculita como sustrato. Enseguida, se inocularon con 1 mL de la suspensión de 10⁹ cél mL⁻¹ de *Rhizobium tropici* (CIAT 899). Esta suspensión se obtuvo por inoculación en medio líquido de extracto de levadura manitol (ELM) e incubación a 26 °C durante 48 h y en agitación constante. El número de células viables en el inóculo se logró determinar por medición de la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Spectronic 301, previa elaboración de una curva de crecimiento, relacionando densidad óptica con población, permitiendo así, estimar el tiempo necesario para lograr tener la población bacteriana especificada. Las jarras se colocaron, con una distribución completamente al azar, en una cámara de cultivo en condiciones controladas (fotoperiodo: 16 h luz/8 h oscuridad; intensidad lumínica: 450 µmol m⁻² s⁻¹; temperatura: 26 °C día/18 °C noche; humedad relativa 55% día/75% noche). Se regaron con solución nutritiva estéril (Rigaud y Puppo, 1975) que contenía nitrato de potasio en las dosis 0, 1, 2, 5 y 10 mM durante todo el desarrollo del cultivo. Se realizaron cuatro cosechas: a

18, 28, 34 y 40 días después de la siembra (DDS), las que coincidieron con diferentes etapas fenológicas del cultivo (período vegetativo, inicio de floración, inicio de fructificación y plena fructificación, respectivamente). Cada tratamiento incluyó seis repeticiones.

En cada cosecha se registraron las variables: peso seco de planta (PSP), área foliar (AF), peso seco de nódulos (PSN), actividad reductora de acetileno (ARA), contenido de nitrato en hoja (Nith), raíz (Nitr) y nódulo (Nitrn), actividad nitrato reductasa en raíz (NRr) y en el nódulo (NRn) y actividad nitrito reductasa en raíz (NiRr) y en el nódulo (NiRn). El área foliar registrada se obtuvo por medio de un planímetro foto electrónico LICOR 3000.

La actividad de la nitrogenasa (EC 1.7.99.2) se determinó por medio de la prueba de la actividad reductora de acetileno (Herdina y Silsbury, 1991). Porciones de raíces noduladas (2 a 4 g) de seis plantas se incubaron en viales perfectamente sellados a los que se les extrajo 10% del volumen de aire y se sustituyó con acetileno; enseguida, los viales se colocaron en la oscuridad a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas (0.2 mL) del medio de incubación a 10 y 20 min, valorándose el etileno formado por medio de un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer 8600) equipado con un detector de ionización de llama y una columna de Poropak de 2 mm de diámetro interno y 2 m de longitud.

Para la determinación de nitrato se realizó una extracción acuosa, de acuerdo con Soares *et al.* (1985) con ligeras modificaciones. El material vegetal se maceró en agua hirviente (1:5 p/v) y después de filtrar el extracto se centrifugó utilizando una centrífuga Sorvall Superspeed RC-5B (Dupont Instruments) y se determinó el nitrato de acuerdo con Cataldo *et al.* (1975).

La actividad NR (EC 1.6.6.2) en raíz y nódulo se determinó *in vitro* por el método descrito por Caba *et al.* (1990). Porciones de 1 g de nódulos o raíces se homogeneizaron en un mortero con arena, PVPP y 10 mL de tampón fosfato 50 mM y pH 7.5, Na₂-EDTA 2 mM, DTT 2 mM, caseína a 1.5% (p/v). El filtrado se centrifugó dos veces (la primera a 2500 g durante 5 min y la segunda a 30 000 g por 30 min). En este caso se valoró la actividad con el nitrito generado en el medio de reacción (2 mL) de acuerdo con Snell y Snell (1949), utilizando tampón fosfato 50 mM y pH 7.5, KNO₃ 10 mM, cisteína 1 mM y NADH 0.2 mM y un volumen de extracto de 0.4 mL, incubando la mezcla por 30 min en un baño

con temperatura regulada (30 °C). La actividad de la enzima se expresó en micromoles de nitrito generados en el medio de reacción por gramo de peso fresco y por hora.

Para la determinación *in vitro* de la actividad nitrito reductasa (EC 1.6.6.4) en raíz y nódulo, se siguió la metodología de Caba *et al.* (1990), valorándose la desaparición de nitrito en el medio de reacción. El medio de extracción utilizado a razón de 1:12 para el caso de nódulos y 1:6 en raíz fue: tampón maleico-KOH 100 mM, β-mercaptoetanol a 2% (v/v) y etilenglicol a 15% (v/v). Después de centrifugar de acuerdo con lo sugerido por Caba *et al.* (1990), el extracto vegetal se incubó con tampón fosfato 50 mM pH 7.5, KNO₂ 2 mM, metil viológeno 0.75 mM y Na₂S₂O₄ 21 mM a 28 °C durante 30 min, la reacción se detuvo por agitación vigorosa de los tubos hasta la completa oxidación del ditionito de sodio, tras lo cual se adicionaron 8 mL de agua y se determinó el contenido de nitrito en la mezcla. Para la determinación del nitrato y de las actividades enzimáticas, se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603.

Se utilizó un diseño completamente al azar y los datos registrados se sometieron a análisis estadístico con el programa Statgraphics plus (STSC Inc., Rockville, Maryland USA) por medio del cual se realizaron: a) Análisis de varianza multifactorial; b) Prueba de mínimas diferencias significativas (MDS) entre medias ($P \leq 0.05$); c) Coeficiente de correlación simple entre variables; y d) Análisis de regresión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nitrato promovió significativamente el crecimiento de la planta desde la segunda cosecha, acentuándose el efecto con el tiempo, no siendo proporcional a la dosis de NO₃ aplicada, ya que el PSP a 28 DDS con las dosis 5 y 10 mM de KNO₃ resultó sólo 50 y 86% mayor. En todos los muestreos, la magnitud del área foliar fue del doble con 10 mM en comparación a los controles (Cuadro 1). El efecto promotor observado de la aplicación de nitrato sobre el crecimiento de las plantas de frijol se conservó a lo largo de todo el desarrollo del cultivo, esto coincidió con lo reportado por Müller *et al.* (1993). Sin embargo, en algunas especies de leguminosas la inducción del crecimiento no se aprecia, lo cual indica que esas especies son capaces de adquirir suficiente N a través de la FBN (Blumenthal *et al.*, 1997).

Cuadro 1. Efecto del nitrato de potasio aplicado desde la siembra sobre el crecimiento (PSP y AF) y la fijación biológica de N₂ (PSN y ARA), en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. África inoculadas con la cepa CIAT 899 de *Rhizobium tropici*.

DDS	KNO ₃ mM	PSP g	AF cm ² planta ⁻¹	PSN g	ARA μmol C ₂ H ₄ g PF ⁻¹ h ⁻¹ †
18	0	1.00	147	0.030	17.5
	1	1.62	208	0.066	74.8 *
	2	1.53	245	0.070	53.6 *
	5	1.54	266	0.018	52.1 *
	10	1.89	317	0.014	45.5 *
28	0	2.80	440	0.200	103.1
	1	2.93	515	0.185	102.7
	2	3.02	534	0.170	69.2
	5	4.19	804 *	0.105 *	60.5 *
	10	5.22 *	1038 *	0.033 *	38.8 *
34	0	3.43	796	0.209	68.0
	1	3.88	835	0.189	66.4
	2	4.07	742	0.177	56.1
	5	5.91 *	1351 *	0.110 *	24.8 *
	10	6.82 *	1857 *	0.090 *	18.0 *
40	0	4.31	961	0.312	30.7
	1	5.14	1076	0.288	26.4
	2	5.97 *	1317 *	0.254 *	21.3
	5	7.84 *	1483 *	0.195 *	14.6
	10	9.03 *	2420 *	0.089 *	2.1
MDS (0.05)		1.18	232	0.055	40.2

DDS: días después de la siembra; PSP: peso de la planta; AF: área foliar; PSN: peso seco de nódulos; ARA: actividad reductora de acetileno. * Diferencias significativas a 0.05. † Actividad por gramo de peso fresco de nódulos (PF).

Se ha reportado al área foliar como la variable que se correlaciona mejor con el contenido de N total en plantas noduladas de *Pisum sativum*, en tanto que en

Vicia faba se correlaciona mejor con el PSP (Caba *et al.*, 1994); esta última aseveración coincide con lo observado en el presente trabajo (Cuadro 2). Del análisis de regresión realizado para las variables de crecimiento, PSP y AF, se deduce que tienen una estrecha relación con la aplicación de KNO₃ (Cuadro 3).

Para las variables directamente relacionadas con la fijación de nitrógeno: PSN y ARA, su respuesta al nitrato en el medio de cultivo dependió de la dosis y del estado fenológico del cultivo (Cuadro 1). A 18 días, las dosis 1 y 2 mM incrementaron el PSN en 100%; no obstante, este incremento no fue significativo. Sin embargo, a partir de 28 DDS con todas las dosis se redujo el PSN, efecto que fue más notorio con las dosis 5 y 10 mM con las que se registraron reducciones de 50 a 84% en comparación con el control. En concordancia con estos resultados, el análisis de regresión indica una relación lineal negativa con la aplicación del KNO₃ (Cuadro 3). A 18 DDS, la aplicación de nitrato incrementó la actividad de la nitrogenasa, resultando las dosis 1 y 2 mM de KNO₃ con los valores más altos. Para todos los tratamientos, excepto 10 mM, el máximo de actividad de la nitrogenasa ocurrió a 28 DDS, en el resto de las cosechas la aplicación de las dosis altas de NO₃ (5 y 10 mM) la inhibieron. La variable ARA respondió a la aplicación del nitrato siguiendo una tendencia parabólica, como lo indica el modelo de regresión (Cuadro 3). El comportamiento observado de la evolución del PSN y ARA corrobora el hecho de que en el frijol, durante el establecimiento de la

Cuadro 2. Matriz de coeficiente de correlación simple entre las variables relacionadas con el crecimiento, la fijación de nitrógeno y el metabolismo del nitrato en plantas de *Phaseolus vulgaris* de la var. África inoculadas con la cepa CIAT 899 de *Rhizobium tropici* tratadas con nitrato potásico.

	PSP	AF	PSN	ARA	Nith	Nitr	Nitn	NRr	NRn	NiRr	NiRn
PSP	1.00										
AF	0.97	1.00									
PSN	0.23	0.14	1.00								
ARA	-0.61	-0.64	0.12	1.00							
Nith	0.19	0.22	0.56	-0.23	1.00						
Nitr	0.20	0.26	-0.67	-0.29	0.81	1.00					
Nitn	0.68	0.55	0.28	-0.21	-0.05	-0.03	1.00				
NRr	0.70	0.74	-0.44	-0.50	0.70	0.72	0.74	1.00			
NRn	-0.19	-0.27	0.07	0.51	-0.02	-0.04	0.05	-0.17	1.00		
NiRr	0.28	0.31	-0.55	-0.28	0.47	0.48	0.16	0.58	-0.05	1.00	
NiRn	0.03	0.04	-0.18	-0.08	0.21	0.18	-0.03	0.03	-0.01	0.42	1.00

Variables: PSP, peso seco de la planta; AF, área foliar; PSN, peso seco de nódulos; ARA, actividad reductora de acetileno, Nith, concentración de nitrato en hoja; Nitr, concentración de nitrato en raíz; Nitn, concentración de nitrato en nódulo; NRr, actividad nitrato reductasa en raíz; NRn actividad nitrato reductasa en nódulo; NiRr, actividad nitrito reductasa en raíz; NiRn, actividad nitrito reductasa en nódulo.

Cuadro 3. Análisis de regresión entre los niveles de KNO₃ y las variables dependientes relacionadas con el crecimiento, la fijación biológica del N₂ y la asimilación de nitratos.

Variable dependiente	Ecuación de regresión	Coefficiente de determinación (R ²)	Nivel de significancia
PSP	$y = 3.087 + 0.284x$	96.22	0.0032 **
AF	$y = 568.613 + 83.107x$	99.75	0.0001 **
PSN	$y = 0.192 - 0.0148x$	98.56	0.0007 **
ARA	$y = 66.75 - 5.51x + 0.34x^2$	98.34	0.0166 *
Nith	$y = 5.022 + 1.144x$	97.19	0.0020 **
Nitr	$y = -0.617 + 3.689x$	97.34	0.0019 **
Nitrn	$y = 2.88 + 0.17x - 0.016x^2$	99.16	0.0084 **
NRr	$y = 0.0399 + 0.0211x$	96.94	0.0023 **
NiRr	$y = 29.811 + 2.147x$	93.64	0.0069 **
NiRn	$y = 234.57 - 40.2x + 3.85x^2$	99.87	0.0012 **

PSP: peso seco de la planta; AF: área foliar; PSN: peso seco de nódulos; ARA: actividad reductora de acetileno; Nith: contenido de nitrato en hoja; Nitr: concentración de NO₃ en raíz; Nitrn: contenido de NO₃ en nódulo; NRr: actividad nitrato reductasa en raíz; NiRr: actividad nitrito reductasa en raíz; NiRn: actividad nitrito reductasa en nódulo.

* P ≤ 0.05. ** P ≤ 0.01.

simbiosis, la planta sufre un período de deficiencia de nitrógeno, que hace necesario el aporte de N-NO₃ en esa etapa (Hungria *et al.*, 1991; Pacovsky y Fuller, 1991). En adición, se puede decir que para esta leguminosa en etapas tempranas de desarrollo, la planta puede beneficiarse de una acción cooperativa entre el N₂ fijado simbióticamente y el aportado a través de la fertilización nitrogenada.

Resultó claro que la estimulación del crecimiento vegetativo como consecuencia de la aplicación del nitrato ocurrió en detrimento de la producción de biomasa nodular (Cuadros 1 y 3) y, en consecuencia, de la fijación de N₂, como lo reportaron Arrese-Igor *et al.* (1997), mostrando un efecto sinérgico entre el NO₃⁻ y la fijación de N₂ (Stamford *et al.*, 1995), pero que en el presente estudio no se vio reflejado en la correlación entre ambas variables (Cuadro 2). El efecto benéfico de la aplicación de dosis bajas de KNO₃ sobre la FBN se evidenció cuando aún no había un abundante crecimiento nodular (18 DDS) y la planta por sí misma no era capaz de fijar cantidades apreciables de nitrógeno atmosférico.

Kaiser *et al.* (1997) propusieron que el efecto del nitrato en la fijación simbiótica en nódulos de *P. sativum* conlleva dos mecanismos separados, uno inicial relacionado con la limitación de oxígeno (Wycoff *et al.*, 1998) y otro inducido por la presencia prolongada del nitrato, relacionado con su metabolismo. Bacanamwo y Harper (1997) propusieron que el control de la nodulación y de la fijación de nitrógeno en nódulos de soya está mediado por un mecanismo de retroalimentación en el que se involucra la acumulación de asparagina y glutamato en el nódulo. De acuerdo con lo propuesto por Parsons

et al. (1993), si un aminoácido en especial es exportado desde el xilema a la parte aérea, de donde nuevamente podrá retornar a la raíz y nódulo, en estos tejidos y en el sistema vascular, su concentración será dependiente de la tasa de producción, liberación y utilización dentro del nódulo.

En el control, el mayor contenido de nitrato en hojas se registró en la etapa vegetativa, triplicando su valor con la aplicación de 5 y 10 mM de KNO₃ (Figura 1) y declinando el contenido con la edad de la planta en el caso de la dosis más elevada. En raíz, para todos los tratamientos, la mayor acumulación del nitrato ocurrió al inicio de la fructificación y alcanzó su máximo [50.04 μmol (g PF)⁻¹] con la dosis más alta. Sin embargo, los mayores porcentajes de incremento con respecto al control se observaron al inicio de la floración (cuatro a 50 veces), el valor máximo se alcanzó con la dosis 10 mM al inicio de la fructificación. En las plantas control y en las tratadas con 1 mM de KNO₃, el contenido de nitrato en nódulo fue similar. El resto de las dosis, a excepción de 10 mM, provocaron un incremento en el contenido de nitrato en la tercera y cuarta cosecha. Con base en estos resultados, la acumulación de nitrato en los tejidos de plantas de frijol ocurrió en el orden: raíz < hoja < nódulo. La acumulación de nitrato en diferentes tejidos vegetales como consecuencia de la fertilización nitrogenada se reporta en diversos estudios (Caba *et al.*, 1995; Svenning *et al.*, 1996), con un comportamiento que coincide con lo observado en este trabajo. La exposición prolongada a nitrato provoca que la absorción de éste decaiga, lo que indica que el proceso está controlado por un mecanismo de retroalimentación negativo (Siddiqui *et*

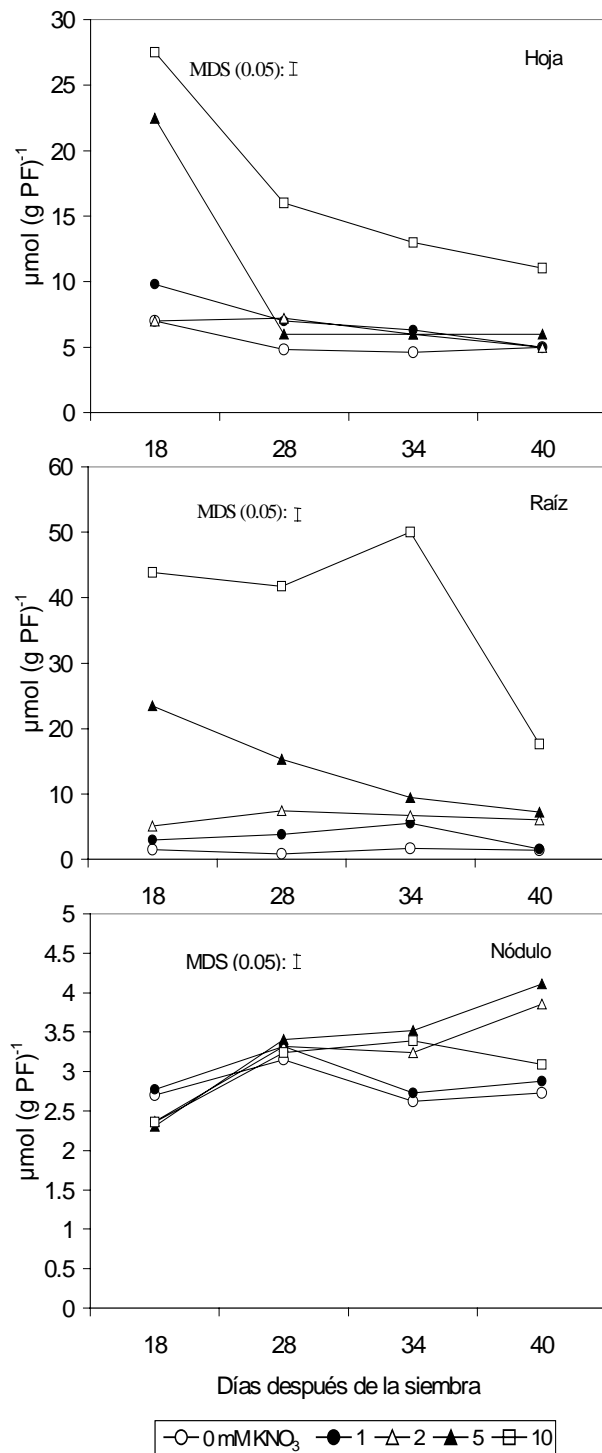


Figura 1. Concentración de nitrato en hoja (Nith), raíz (Nitr) y nódulo (Nitr) en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Africa inoculadas con la cepa CIAT 899 de *Rhizobium tropici*, tratadas nitrato de potasio.

al., 1989). El efecto se revierte cuando se elimina la aplicación de nitrato (Teyker *et al.*, 1988). La molécula señal responsable de este mecanismo, en primera instancia, pudiera ser el propio nitrato, o bien otras especies de nitrógeno como lo son el amonio y nitrito (Aslam *et al.*, 1996; King *et al.*, 1993). Esto explicaría el hecho de que la concentración de nitrato en hoja y raíz, en especial con las dosis más elevadas de nitrato, decayera con el tiempo, sobre todo en la última cosecha (Figura 1). Los modelos de regresión indican una relación lineal significativa de las variables contenido de nitrato en hoja y raíz, y parabólica de la variable en nódulos, con respecto a la aplicación de KNO₃ (Cuadro 3).

La actividad nitrato reductasa en raíz (NRr), en ausencia de KNO₃, presentó dos picos de actividad máxima, al iniciar de la floración y en plena fructificación (Figura 2). La aplicación de 5 y 10 mM de KNO₃ estimuló la actividad NRr (dos a cinco veces), acentuándose el efecto a 34 días, sin embargo, decae en la última evaluación, lo que coincide con lo reportado por Traore y Maranville (1999). Se registró correlación significativa ($P \leq 0.05$) entre el PSP y la NRr, lo que refleja la contribución de estos tejidos al metabolismo del nitrato y al desarrollo de la planta, en especial con los valores más altos de KNO₃ y en las dos últimas evaluaciones, etapas en las que existe un metabolismo intenso dado el estado fenológico en el que se encuentra el cultivo (etapa reproductiva). Además, la correlación negativa entre NRr y ARA (Cuadro 2), sugiere la preferencia de la planta por metabolizar el NO₃⁻ en lugar del N₂ atmosférico, por el alto costo energético que representa la reducción de este último.

La determinación de la actividad de la enzima NRn en la variedad África de *Phaseolus vulgaris* indica que ésta no es constitutiva. A 18 DDS con la dosis 10 mM no fue posible determinar la actividad de la enzima NRn, dado el escaso desarrollo nodular causado por el efecto inhibitorio del NO₃⁻. De manera contraria a lo que ocurrió en raíz, los valores más altos de actividad de esta enzima se alcanzaron con la dosis 1 mM de nitrato, en tanto que con dosis moderadas y altas, los valores encontrados fueron entre una a cuatro veces menores (Figura 2). El valor de actividad máximo se obtuvo a 28 días después de la siembra lo que coincide con el valor alcanzado en ARA.

Se ha detectado actividad inducida y constitutiva de la enzima NRn en diferentes leguminosas. Así, en

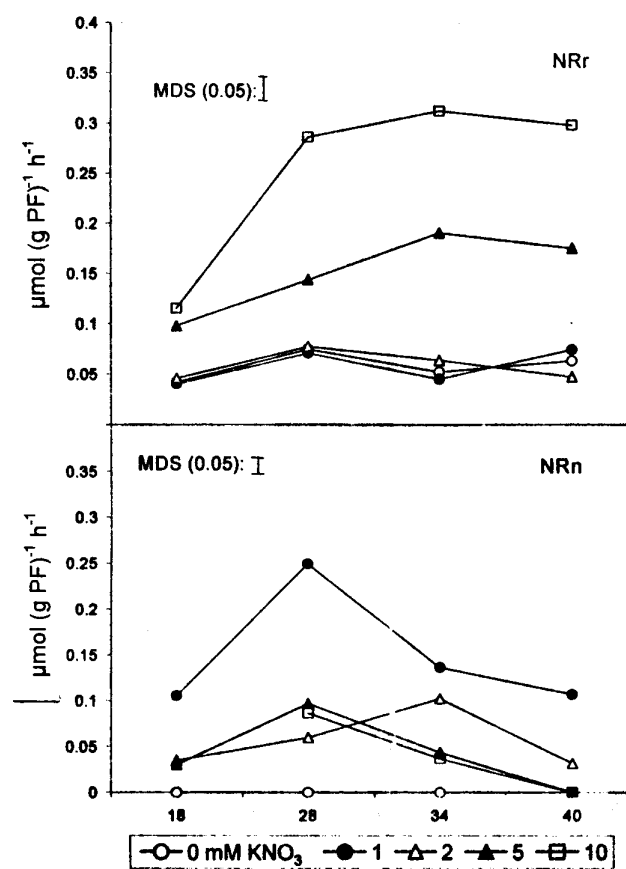


Figura 2. Actividad de la nitrato reductasa en raíz (NRr) y nódulo (NRn) en plantas de *Phaseolus vulgaris*, tratadas con nitrato de potasio aplicado desde la siembra.

nódulos de alfalfa se ha comprobado que esta enzima es inducida (Becana *et al.*, 1988), en tanto que en nódulos de soja fue constitutiva (Evans, 1954). De los estudios llevados a cabo con diferentes genotipos de *Vicia faba* puede deducirse que la actividad *in vitro* de la enzima NR nodular puede ser constitutiva (en la mayoría de los genotipos), inhibida por la aplicación de NO_3^- aun en bajas concentraciones (2 mM de KNO_3), independientemente de que el tratamiento sea de corta o mediana duración y su actividad casi nula (Caba *et al.*, 1990; 1994; 1995). No obstante, sólo en algunas de las líneas se estimuló la actividad NRn con la dosis mínima (2 mM). De ésta y otras investigaciones se deduce que debido a la gran variabilidad en las condiciones experimentales, así como la leguminosa tratada y la cepa de *Rhizobium* utilizada, se han obtenido resultados que resultan contradictorios. Esto en cierta forma explica el aumento en la actividad NRn por 1 mM de KNO_3 observado en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos indican que la actividad de la NRn fue considerable (41 a 78%) con la aplicación de bajas dosis de KNO_3 (1 mM), lo mismo se observó para la fijación biológica de nitrógeno medida como actividad de la nitrogenasa, en particular antes de que se tenga un buen desarrollo de masa nodular (Cuadro 1). Esto corrobora el hecho de que la planta puede aprovechar ambas fuentes de nitrógeno para tener un buen desarrollo y crecimiento (N-inorgánico) y, finalmente, una buena producción de grano (N-atmosférico) de acuerdo con lo reportado por Tirado *et al.* (1990).

En ocasiones, la actividad de la enzima NRn no es inducida por el nitrato, lo cual se explica por el hecho de que esta enzima pudiera estar involucrada en el metabolismo de ureidos (Li y Gresshoff, 1990). Los ureidos son compuestos orgánicos (principalmente alantoína y ácido alantoico) que resultan ser los primeros productos de la fijación de nitrógeno en leguminosas tropicales, como es el caso del frijol (Schubert y Boland, 1990). Después de su síntesis en el nódulo, los ureidos son exportados a la parte aérea, donde serán utilizados para la síntesis de aminoácidos y proteínas (Herridge *et al.*, 1978; Streeter, 1979; Pate *et al.*, 1980). Li y Gresshoff (1990) observaron que, en soja, el ácido alantoico inhibe la actividad de la enzima nitrato reductasa constitutiva en hojas, pero no la inducida, hecho que en parte explicaría lo acontecido en *P. vulgaris*, en donde ocurrió el máximo valor de ARA, pero una nula actividad de la enzima NR constitutiva. Sin embargo, persiste la interrogante respecto a los resultados obtenidos de la enzima NRn inducible por NO_3^- , ya que con la dosis 1 mM presentó su máxima actividad en cada una de las evaluaciones y también para la evolución de ARA, que tuvo valores similares al control.

En estudios realizados por Khadri (1997) se encontró que, para esta misma variedad de frijol, la aplicación de NO_3^- no favoreció la acumulación de ureidos en nódulos y savia, pero sí incrementó la concentración de aminoácidos, lo que pudiera explicar que, para esta variedad, NRn no haya sido afectada por ARA, hecho que se puso de manifiesto por la correlación positiva que muestran ambas variables (Cuadro 2). Puesto que la fijación de N_2 fue muy sensible a la presencia de NO_3^- en el medio, es lógico suponer que exista una estrecha relación entre la actividad de las enzimas NR y ARA (Stamford *et al.*, 1995). Sin embargo, como lo señalaron Salsac *et al.* (1984), esto no descarta la posibilidad de que en la planta pueda haber competencia entre ambos procesos

por los substratos energéticos, como puede apreciarse en la tendencia de la NRr, lo que se corrobora por la correlación negativa entre esta variable y ARA (Cuadro 2).

En raíz, la actividad de la enzima NiRr fue constitutiva, mostrando dos picos de actividad máxima, a 18 DDS y a 34 DDS, lo que pudiera deberse al estado fenológico del cultivo. A 18 DDS había un escaso desarrollo de los nódulos y, por lo tanto, no se presentaría la competencia que pudiera darse entre la reducción del nitrato y la fijación de N_2 . Este hecho se ve reflejado en la correlación significativa ($P \geq -0.55$) que presentan el PSN y NiRr (Cuadro 2). A 34 DDS había una intensa actividad metabólica como consecuencia de la formación del fruto, concentrándose toda energía en este sumidero de materiales y energía, razón por la cual la reducción del NO_3^- ocurriría de preferencia en la fijación de N_2 , que resulta más costosa desde un punto de vista energético. Las tendencias mostradas por el patrón de comportamiento de NiRr en plantas tratadas fueron similares a las observadas en el control; se aprecia, además, que la actividad de esta enzima resultó promovida por la aplicación de nitrato (Figura 3). Esta respuesta se evidenció con mayor claridad desde el inicio de la floración, donde las dosis de 2 a 10 mM aumentaron su actividad de 29 a 77%. Los valores más altos de actividad de esta enzima, tanto en el control, como en los diferentes tratamientos de nitrato, se obtuvieron en el inicio de la fructificación. Este efecto positivo se ha reportado en otras leguminosas (Chalifour y Nelson, 1988). La actividad NiRr se correlacionó de manera positiva con el contenido de nitrato en este órgano, así como su actividad NR (Cuadro 2). El análisis de regresión muestra que existe una relación lineal significativa en la respuesta de la actividad NiRr y la aplicación de KNO_3 (Cuadro 3).

A diferencia de lo observado en raíz, la respuesta de la actividad NiR en nódulo no fue clara, ya que los valores de actividad de esta enzima no correlacionaron con la dosis de KNO_3 aplicada ni con el contenido del nitrato del tejido en cuestión (Cuadro 2). En todos los tratamientos, incluyendo al control, se presentaron dos puntos de actividad máxima: a 18 DDS, es decir, en el estado vegetativo, y a 34 DDS o inicio de fructificación. Además, los valores registrados de NiR fueron mayores en nódulo que en raíz (Figura 3). La actividad NiR, tanto en nódulo, como en raíz, fue mucho mayor que la registrada para la actividad de la enzima NR, lo que coincide con lo reportado por Becana y Sprent (1987)

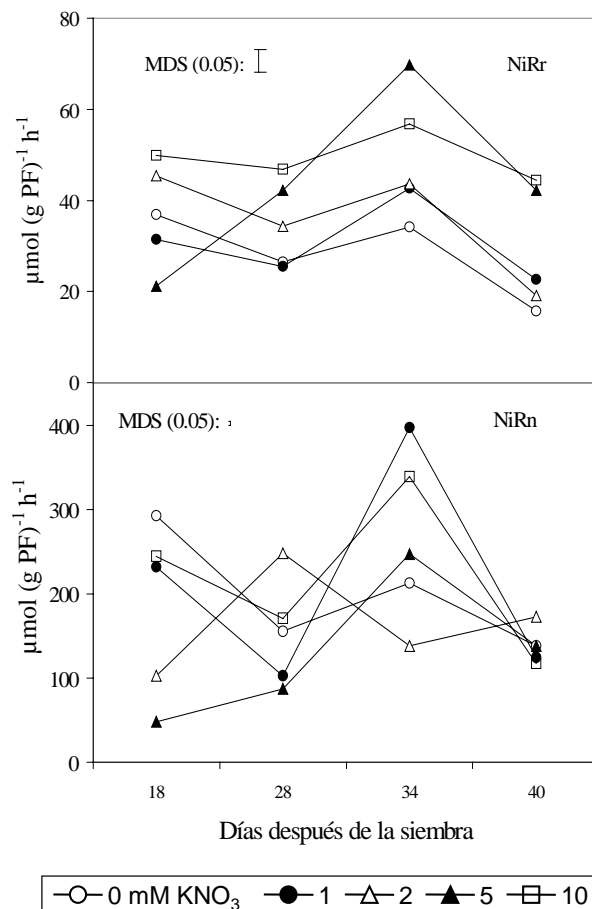


Figura 3. Actividad nitrito reductasa en raíz (NiRr) y nódulo (NiRn) en plantas de *Phaseolus vulgaris* tratadas con nitrato de potasio aplicado desde la siembra.

y Barro *et al.* (1994), por lo que se considera que el paso limitativo en la reducción del nitrato es el que involucra a la NR, además de descartar la posibilidad de una acumulación de nitrito en el nódulo que pudiera afectar directamente la fijación de nitrógeno (Arrese-Igor *et al.*, 1997).

En *Glycine max*, la actividad nitrito reductasa nodular incrementó en la zona bacteroidal y en la corteza al exponerse durante cuatro días al NO_3^- , después de lo cual su actividad decayó (Arrese-Igor *et al.*, 1998). La mayor actividad NiR en nódulo comparada con la de raíz puede atribuirse a una diferencia en la sensibilidad a la toxicidad del nitrito entre estos órganos. Mientras que el nódulo presenta capacidad de detoxificar el nitrito y, por lo tanto, impide que interfiera con la leghemoglobina. Esta capacidad no es observada en la raíz (Kanayama *et al.*, 1990).

Del análisis de los resultados referentes a las variables relacionadas con la fijación simbiótica del N₂: PSN y ARA, y de aquéllas relativas a la reducción del nitrato: NRn y NiRn, se apreció que la aplicación temprana (18 días del cultivo) de dosis bajas de nitrato permitió que la planta se beneficiara de ambas fuentes, si bien, esto no se reflejó en las correlaciones que tales variables presentaron (Cuadro 2). Este comportamiento no se registró en etapas tardías, como fueron el inicio y la plena fructificación, en las que los valores para las referidas variables declinaron.

CONCLUSIONES

- Los resultados registrados en el presente estudio indican que, en el caso concreto de *Phaseolus vulgaris*, la aplicación de KNO₃ favoreció el crecimiento a lo largo del desarrollo del cultivo y con todos los valores utilizados. Este efecto benéfico ocurrió en detrimento de la nodulación y la fijación biológica de N₂ (medida como actividad de la nitrogenasa). No obstante, ambas variables aumentaron notablemente con la aplicación de 1 mM de KNO₃, en especial en el estado vegetativo cuando aún no existe un abundante desarrollo de la masa nodular. La acumulación de nitrato resultó favorecida de forma proporcional con las dosis de fertilización nitrogenada, de forma más notoria en el nódulo, seguido en la hoja y en menor proporción en la raíz.

- En raíz, la enzima NRr fue constitutiva, además, respondió positivamente a la fertilización nitrogenada, en particular a dosis elevadas de KNO₃. Por otro lado, este cultivo no presentó actividad NRn constitutiva, en tanto que la inducida alcanzó su valor máximo con la dosis 1 mM y en el inicio de la etapa reproductiva, lo que coincidió también con la tasa más alta de ARA. La contribución del nódulo a la reducción del nitrato fue considerable, pero la participación de la raíz (NRr) fue mayor. Los procesos de reducción de nitratos y fijación biológica de N₂ ocurren de manera simultánea en el nódulo, e incluso los valores más altos de las actividades de las enzimas involucradas en los mismos (ARA y NRn) pueden coincidir. Sin embargo, no puede descartarse una posible competencia entre ambos procesos, en especial en el inicio y plena fructificación. Por lo tanto, dosis bajas de nitrato durante el periodo vegetativo favorecen el desarrollo de los nódulos, la fijación de nitrógeno y la actividad nitrato reductasa en nódulos de frijol, permitiendo a la planta beneficiarse, tanto de la fijación biológica de N₂, como de la reducción de nitratos.

AGRADECIMIENTOS

El autor responsable del presente trabajo agradece al CONACYT por la beca otorgada para la realización de estudios de Doctorado. Este estudio fue financiado por los proyectos PB95-1159 de la DGICYT (España) e INCO-9507 de la Comunidad Europea.

LITERATURA CITADA

- Arrese-Igor, C., F.R. Minchin, A.J. Gordon y A.K. Nath. 1997. Possible causes of the physiological decline in soybean nitrogen fixation in the presence of nitrate. *J. Exp. Bot.* 48: 905-913.
- Arrese-Igor, C., A.J. Gordon, F.R. Minchin y R.F. Denison. 1998. Nitrate entry and nitrite formation in the infected region of soybean nodules. *J. Exp. Bot.* 49: 41-48.
- Aslam, M., R.I. Travis, D.W. Rains y R.C. Huffaker. 1996. Effect of ammonium on the regulation of nitrate and nitrite transport systems in root of intact barley seedlings. *Plant Physiol.* 99: 1124-1133.
- Bacanawo, M. y J.E. Harper. 1997. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagine and/or products of its metabolism. *Physiologia Plantarum* 100: 371-377.
- Barro, F., A.G. Fontes y J.M. Maldonado. 1994. Nitrate uptake and reduction by durum wheat (*Triticum turgidum*) and tritordeum (*Hordeum chilense* X *Triticum turgidum*). *Plant Physiol.* 143: 313-317.
- Becana, M. y E.J. Bedmar. 1991. Metabolismo del nitrato y oxígeno en nódulos de leguminosas. pp. 19-23. *In: Olivares, J. y J.M. Barea* (eds.). Fijación y movilización de nutrientes VII. Colección Nuevas Tendencias. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España.
- Becana, M. y J.I. Sprent. 1987. Nitrogen fixation and nitrate reductase in the root nodules of legumes. *Physiologia Plantarum* 70: 757-765.
- Becana, M., P.M. Aparicio-Tejo y M. Sánchez-Díaz. 1988. Nitrate and hydrogen peroxide metabolism in *Medicago sativa* nodules and possible effect of leghemoglobin function. *Physiol. Plant.* 82: 755-761.
- Bliss, F.A. 1993. Utilizing the potential for increased nitrogen fixation in common bean. *Plant Soil* 152: 157-160.
- Blumenthal, J.M., M.P. Russilli y C.P. Vance. 1997. Localized and internal effect of nitrate on symbiotic dinitrogen fixation. *Physiologia Plantarum* 101: 59-66.
- Caba, J.M., C. Lluch, A. Hervás y F. Ligeró. 1990. Nitrate metabolism in roots and nodules of *Vicia faba* in response to exogenous nitrate. *Physiologia Plantarum* 79: 531-539.
- Caba, J.M., C. Lluch, A. Hervás y F. Ligeró. 1991. Acumulación de nitratos y actividad nitrato reductasa en diferentes cultivares de *Vicia faba* L. *Suelo y Planta* 1: 105-116.
- Caba, J.M., C. Lluch y F. Ligeró. 1994. Variability in symbiotic performance of *Vicia faba* genotypes. *Soil Science (Trends in Agric. Sci.)* 2: 37-43.
- Caba, J.M., C. Lluch y F. Ligeró. 1995. Distribution of nitrate activity in *Vicia faba*: Effect of nitrate and plant genotype. *Physiology Plantarum* 93: 667-672.
- Cataldo, D.A., M. Haroon, L.E. Schrader y V.L. Youngs. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by

- nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6: 71-80.
- Chalifour, F.P. y L.M. Nelson. 1988. Short-term effects of nitrate reductase activity and symbiotic dinitrogen fixation of faba bean and pea. *Can. J. Bot.* 66: 1639-1645.
- Cherney, J.H. y J.M. Duxbury. 1994. Inorganic nitrogen supply and symbiotic dinitrogen in alfalfa. *J. Plant Nutr.* 17: 2053-2067.
- Da Silva, P.M., S.M. Tsai y R. Bonetti. 1993. Response to inoculation and N fertilization for increased yield and biological nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 152: 123-130.
- Evans, H.J. 1954. Diphosphopiridine nucleotide nitrate reductase from soybean nodules. *Plant Physiol.* 29: 298-301.
- Hardarson, G. 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant Soil* 152: 1-17.
- Herdina, J.A. y J.H. Silsbury. 1991. Estimating nitrogenase activity of faba bean (*Vicia faba* L.) by acetylene reduction (AR) assay. *Austr. J. Plant Physiol.* 17: 489-502.
- Herridge, D.F., C.A. Atkins, J.S. Pate y R. Rainbird. 1978. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Physiol.* 62: 495-498.
- Herridge, D.F., O.P. Rupela, R. Serraj y D.P. Back. 1994. Screening techniques and improved biological nitrogen fixation in cool season food legumes. *Euphytica* 73: 95-108.
- Hervás, A., F. Ligeró y C. Lluch. 1991. Nitrate reduction in pea plants: Effects of nitrate application and *Rhizobium* strains. *Soil Biol. Biochem.* 23: 695-699.
- Hungria, M., C.A.A. Barradas y R.M. Wallsgrave. 1991. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris*. *J. Exp. Bot.* 42: 839-844.
- Kaiser, B.N., D.B. Layzell y B.J. Shelp. 1997. Role of oxygen limitation and nitrate metabolism in the nitrate inhibition of nitrogen fixation by pea. *Physiologia Plantarum* 101: 45-50.
- Kanayama, Y., I. Watanabe y Y. Yamamoto. 1990. Inhibition of nitrogen fixation in soybean plants supplied with nitrate. I. Nitrite accumulation and formation of nitrosylhemoglobin in nodules. *Plant Cell Physiol.* 31: 341-346.
- Khadri, M. 1997. Metabolismo de los ureidos en nódulos de judía. pp. 235-242. *In: Vega, J.M., P.J. Aparicio, F. Castillo, J.M. Maldonado (eds.). Avances en el metabolismo de nitrógeno: De la fisiología a la biología molecular.* Sevilla, España.
- King, B.J., M. Siddiqui, T.J. Ruth, L.R. Warner y A.D.M. Glass. 1993. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite and ammonium. *Plant Physiol.* 102: 1279-1286.
- Li, Z.Z. y P.M. Gresshoff. 1990. Developmental and biochemical regulation of "constitutive" nitrate reductase activity in leaves of nodulating soybean. *J. Exp. Bot.* 231: 1231-1238.
- Mahé, S., N. Gausseres y D. Tome. 1994. Legume proteins for human requirements. *Grain Legumes (Paris)* 7: 15-17.
- Müller, S., P.A.A. Pereira y P. Martín. 1993. Effect of different levels of mineral nitrogen on nodulation and N₂ fixation of two cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 152: 139-143.
- Ocaña, A., J.M. Caba, F. Ligeró y C. Lluch. 1998. Effect of plant genotype on nitrogen fixation and carbon metabolism in *Vicia faba* root nodules. *Agr. Med.* 128: 241-249.
- Pacovsky, R.S. y G. Fuller. 1991. Nitrogen assimilation and partitioning in two nitrogen-fixing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* 132: 139-148.
- Parsons, R., A. Stanforth, J.A. Raven y J.J. Sprent. 1993. Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant, Cell Environ.* 16: 125-136.
- Pate, J.S., C.A. Atkins, S.T. White, R.M. Rainbird y K.C. Woo. 1980. Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in a ureid-producing grain legume. *Plant Physiol.* 65: 961-965.
- Rigaud, J. y A. Puppo. 1975. Indol-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Genet. Microbiol.* 88: 223-228.
- Sagan, M., A. Messenger y G. Duc. 1993. Specificity of the *Rhizobium*-legume symbiosis obtained after mutagenesis in pea (*Pisum sativum* L.). *New Phytol.* 125: 757-761.
- Salsac, L., J.J. Drevon, M. Zengbé, J.C. Cleyet-Marel y M. Obaton. 1984. Energy requirements of symbiotic nitrogen fixation. *Physiol. Végétal* 22: 509-521.
- Schubert, K.R. y M.J. Boland. 1990. The ureides. *Biochem. Plant* 16: 197-282.
- Siddiqui, M.Y., A.D.M. Glass y T.J. Ruth. 1989. Studies of the regulation of nitrate influx by barley seedlings using ¹⁵NO₃. *Plant Physiol.* 90: 806-813.
- Snell, F.D. y C.T. Snell. 1949. *Colorimetric methods of analysis.* Van Nostrand, New York.
- Soares, M.I., S.H. Lips y C.F. Cresswell. 1985. Endogenous nitrate loss as an assay for nitrate reduction in vivo. *Physiologia Plantarum* 64: 487-491.
- Stamford, N.P., M. Chamber-Pérez y M. Camacho Martínez. 1995. Symbiotic effectiveness of several tropical *Bradyrhizobium* strains on cowpea under a long-term exposure to nitrate: Relationships between nitrogen fixation and nitrate reduction activities. *J. Plant Physiol.* 147: 378-382.
- Streeter, J.G. 1979. Allantoin and allantoic acid in tissues and stem exudates from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.* 63: 478-480.
- Svenning, M., O. Junttila y J.H. Macduff. 1996. Differential rates of inhibition of N₂ fixation by sustained low concentrations of NH₄ and NO₃ in northern ecotypes of white clover (*Trifolium repens* L.). *J. Exp. Bot.* 47: 729-738.
- Tanacka, A., K. Fujita e I. Terasawa. 1985. Growth and dinitrogen fixation of soybean root system affected by partial exposure to nitrate. *Soil Sci. Plant Nutr.* 31: 637-645.
- Teyker, R.H., W.A. Jackson, R.J. Volk y R.H. Moll. 1988. Exogenous ¹⁵NO₃ influx and endogenous ¹⁴NO₃ efflux by two maize inbreds during nitrogen deprivation. *Plant Physiol.* 86: 778-781.
- Tirado T., J.L., G. Conejero y G. Alcántar. 1990. Efecto del nitrógeno mineral y el déficit hídrico sobre las dos vías de asimilación del nitrógeno en plantas de soya. *Terra* 8: 182-192.
- Traore, A. y J.A. Maranville. 1999. Nitrate reductase activity of diverse grain sorghum genotypes and its relationship to nitrogen use efficiency. *Agron. J.* 91: 863-869.
- Truchet, G.L. y F.B. Dazzo. 1982. Morphogenesis of lucerne root nodules incited by *Rhizobium meliloti* in the presence of combined nitrogen. *Planta* 154: 352-360.
- Tsai, S.M., R. Bonetti, S.M. Agabala y R. Rossetto. 1993. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. *Plant Soil* 152: 131-138.

Vance, C.P. y G.H. Heichel. 1991. Carbon in N₂ fixation: Limitation or exquisite adaptation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 373-392.

Wycoff, K.L., S. Hunt, M.B. Gonzalez, K.A. Layzell y A.M. Hirsch. 1998. Effects of oxygen on nodule physiology and expression of nodulins in alfalfa. *Plant Physiol.* 117: 385-395.