

ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN RAÍCES Y HOJAS DE FRIJOL EJOTERO: DEFICIENCIA VS TOXICIDAD DE NITRÓGENO

NITROGEN ASSIMILATION IN ROOTS AND LEAVES OF GREEN BEAN PLANTS: DEFICIENCY VS TOXICITY OF NITROGEN

Esteban Sánchez^{1*}, Juan Manuel Soto¹, Juan Manuel Ruiz² y Luis Romero²

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Chihuahua. Ciudad Universitaria s/n (Campus Universitario I). 31310, Chihuahua, Chih. México. Apdo. Postal 24, Tel. y Fax: 01 (614) 439-1844 Ext. 3117. ²Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 18071, Granada, España.

* Autor para correspondencia (ecsanchez@uach.mx)

RESUMEN

El crecimiento de las plantas depende, entre otros factores, de un adecuado suplemento de nitrógeno para sintetizar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares necesarios para el desarrollo. Un factor que influye en la regulación de las enzimas responsables de la asimilación del N, es el propio estado nutricional de N en las plantas, por lo que en este trabajo se estudiaron las respuestas de estos procesos fisiológicos ante condiciones desde deficiencia hasta toxicidad de N. El nitrógeno fue aplicado a la solución nutritiva en la forma de NH_4NO_3 y en dosis crecientes: N1 = 1.5 mM, N2 = 3.0 mM, N3 = 6.0 mM, N4 = 12.0 mM, N5 = 18.0 mM y N6 = 24.0 mM de N. La deficiencia de N (N1 y N2) se caracterizó por producir una disminución significativa de la asimilación de N, y tanto en raíces como en hojas las actividades de las enzimas NR, NiR, GS, GOGAT y PEPCasa fueron inferiores a las observadas en el tratamiento N3, que correspondió a la dosis óptima. La inferior asimilación de N en los tratamientos N1 y N2 fue la causa de que las plantas tratadas con estas dosis produjeran mínimas concentraciones de compuestos orgánicos nitrogenados (aminoácidos, proteínas y N orgánico), lo que explica su baja producción de biomasa respecto al tratamiento N3. Por el contrario, la toxicidad de N (N4, N5 y N6) se caracterizó por favorecer concentraciones elevadas de NO_3^- y NH_4^+ en raíces y hojas, sin que ello repercutiera de forma negativa en la asimilación de N; esos tratamientos presentaron las máximas actividades enzimáticas y las mayores concentraciones de compuestos nitrogenados orgánicos (tratamiento N6), pero esto no se reflejó en una mayor producción de biomasa. Se concluye que la toxicidad de N tiene un efecto más negativo sobre la producción de biomasa que la deficiencia.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., asimilación de nitrógeno, deficiencia, frijol ejotero, nitrógeno, toxicidad.

SUMMARY

Plant growth depends, among other factors, of an adequate supply of nitrogen to produce amino acids, proteins, nucleic acids and other cell components needed for plant development. One of the factors influencing the enzyme regulation system responsible for N as-

similation, is the nutritional status of N in the plant; hence the objective of this research was to study this physiological process under a range of N rates varying from deficiency to toxicity. Nitrogen was applied in the nutrient solution in the form of NH_4NO_3 , at increasing N doses N1=1.5 mM, N2=3.0 mM, N3=6.0 mM, N4=12.0 mM, N5=18.0 mM, N6=24.0 mM of N. Nitrogen deficiency (N1 and N2) produced a significant reduction of N assimilation in roots and leaves. The enzymatic activities of NR, NiR, GS, GOGAT and PEPCasa were lower than in N treatment (N3) which corresponded to the optimum rate. The lower N assimilation in treatments N1 and N2 caused minimum concentrations of N-organic compounds (amino acids, proteins and organic N) and reduced plant biomass compared to N3. On the other hand, N toxicity (N4, N5 and N6) was characterized for higher concentrations of NO_3^- and NH_4^+ in roots and leaves, but without having a negative effect on N assimilation; these treatments showed the maximum enzymatic activity and higher N-organic compounds (N6 treatment), although this was not reflected on higher biomass production. We concluded that N toxicity had a higher adverse effect on biomass production than N-deficiency.

Index words: *Phaseolus vulgaris* L., nitrogen assimilation, deficiency, green bean plants, nitrogen, toxicity.

INTRODUCCIÓN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es cultivado y consumido en casi todo el mundo. En algunos países desarrollados, 20 % de la proteína disponible es proporcionada por esa leguminosa. El frijol representa también una parte integral de la dieta proteica para 50 % de la población mundial (Deshpande *et al.*, 1984), y producido en grandes cantidades en el sur, centro y norte de América, y el este de África (Singh, 1999).

El crecimiento de las plantas depende, entre otros factores, de un adecuado suplemento de nitrógeno para sintetizar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros

constituyentes celulares necesarios para el desarrollo. En la biosfera el N está disponible para las plantas en diferentes formas, que incluyen el N₂ molecular, amoníaco (NH₃) volátil y el N mineral (NO₃⁻ y NH₄⁺) y orgánico; en suelos agrícolas bien aireados el N nitrato es la forma más abundante y disponible de N (von Wirén *et al.*, 1997). El N es el fertilizante más usado en la agricultura actual debido a que es relativamente barato, pero puede contribuir a contaminar el agua superficial y subterránea a través de la lixiviación y la erosión del suelo.

La asimilación de N por las plantas requiere la absorción de NO₃⁻, su reducción a NO₂⁻, la conversión de NO₂⁻ a NH₄⁺, y la incorporación de NH₄⁺ a compuestos orgánicos (Sivasankar y Oaks, 1996; Stitt, 1999). Los factores que influyen en la regulación de las enzimas responsables de la asimilación del N son: etapa fenológica de la planta (Ireland y Lea, 1999); relación luz/obscuridad (Migge *et al.*, 1996); concentración de sacarosa (Lam *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2005); fuente nitrogenada: NO₃⁻ y NH₄⁺ (Ruiz y Romero, 1999); nivel de CO₂ (Edwards y Coruzzi, 1989); temperatura (Woodall *et al.*, 1996); nutrientes (López-Lefebre *et al.*, 2000; Ruiz y Romero, 2002); reguladores del crecimiento (Ruiz *et al.*, 2000); productos de la asimilación de N (Padgett y Leonard, 1996); y variabilidad genética (Ruiz y Romero, 1998).

La fertilización nitrogenada también juega un papel significante en la calidad de los cultivos (Sisson *et al.*, 1991). Bajo deficiencia de N las plantas pueden sufrir alteraciones en su crecimiento y rendimiento final, alteraciones que pueden ser particularmente severas durante los estados críticos de crecimiento (Jones, 1997). Por otro lado, el crecimiento de la planta disminuye con un suplemento de N en forma de NH₄⁺ que excede de 10 mM, valor considerado tres veces superior al de la toxicidad para algunas especies (Cao y Tibbets, 1999). Muchas especies vegetales muestran reducción del crecimiento, hojas pequeñas y sistema radicular raquíctico cuando son expuestas a altas concentraciones de N, y en casos severos conduce a la muerte de la planta (Jones, 1997).

En general, existe escasa literatura disponible sobre este tema, por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar la influencia que tiene la aplicación de dosis deficientes de N versus dosis tóxicas sobre la producción de biomasa, actividad enzimática y compuestos nitrogenados, en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo del cultivo y diseño experimental

Las semillas del frijol cv. 'Strike' fueron germinadas

en una cámara a 28 °C durante 48 h. Posteriormente, las plantas de frijol ejotero fueron cultivadas en cámara de cultivo en abril de 2000, en Granada, España, bajo condiciones ambientales controladas: humedad relativa de 60-80 %, temperatura 28/22 °C (día/noche), fotoperiodo de 16/8 h (día/noche) e intensidad luminosa de 350 μmol m⁻² s⁻¹. Las plantas crecieron en macetas individuales (25 cm de diámetro superior y 25 cm de altura) de 8 L, llenas completamente con vermiculita. Durante 30 d a partir del trasplante y antes de la aplicación de los tratamientos experimentales, las plantas recibieron una solución nutritiva completa de Hoagland (pH 6.0-6.1), la cual fue renovada cada 3 d. Posteriormente, 30 d después de la germinación, se aplicaron los siguientes tratamientos de N (durante 30 d) en la forma de NH₄NO₃: N1 = 1.5 mM, N2 = 3.0 mM, N3 = 6.0 mM, N4 = 12 mM, N5 = 18 mM y N6 = 24 mM, y se consideró la dosis N3 como la óptima, según Carbonell-Barrachina *et al.* (1997). El diseño experimental consistió en la distribución al azar de los distintos tratamientos y de sus repeticiones. Cada tratamiento tuvo seis repeticiones con cuatro plantas tratadas por repetición.

Muestreo vegetal

Las plantas completas fueron muestreadas a los 60 d después de germinadas, en la etapa fenológica de desarrollo completo y madurez del fruto. Las raíces y hojas fueron lavadas tres veces con agua destilada y detergente no iónico a 1 % (Wolf, 1982). Una parte del material vegetal muestreado (5 g de raíz y hoja) fue utilizado en fresco para el análisis de la nitrato reductasa (NR, EC 1.6.6.1), nitrito reductasa (NiR, EC 1.7.7.1), glutamina sintetasa (GS, EC 6.3.1.2), glutamato sintasa (GOGAT, EC 1.4.1.14), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa, EC 4.1.1.31), nitratos (NO₃⁻), amonio (NH₄⁺), aminoácidos y proteínas. La producción de biomasa radical y foliar se obtuvo como un promedio de cada órgano estudiado, con base en materia seca. Para cada variable analizada se utilizaron seis repeticiones por tratamiento.

Ensayo de las actividades enzimáticas *in vitro* de NR, NiR, GS, GOGAT y PEPCasa. Para la determinación de las actividades enzimáticas de NR, NiR y GOGAT, tanto en raíces como en hojas, se utilizó un medio de extracción adaptado para nuestras condiciones experimentales específicas, con base en los métodos empleados por Farnden y Roberston (1980), Groat y Vance (1981), Lillo (1984), Kaiser y Lewis (1984), y Singh y Srivastava (1986).

Extracción de las enzimas NR, NiR y GOGAT. Una cantidad de 1 g de material vegetal fresco (hojas y raíces) fue homogeneizado en una solución amortiguadora (buffer) fosfato (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.5) que contenía 2

mM de EDTA, caseína soluble a 1.5 % (p/v), 2 mM de DTT y PVP soluble a 1 % (p/v). El homogenado resultante fue filtrado y centrifugado a 5000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 15000 rpm durante 20 min; de esta manera se obtuvo el extracto enzimático utilizado para medir las actividades NR, NiR y GOGAT.

Ensayo de la actividad NR. La actividad NR se hizo con la metodología de Kaiser y Lewis (1984). En un volumen final de 2 mL, la mezcla de reacción contenía: 0.6 mL de solución amortiguadora fosfato (100 mM de K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.5), 0.2 mL de KNO₃ 100 mM, 0.2 mL de cisteína 10 mM, 0.2 mL de NADH 2 mM, y 0.6 mL de extracto enzimático. La actividad NR fue detenida por la adición de 0.1 mL de acetato de zinc 1 M después de incubar las muestras en oscuridad a 30 °C por 30 min. En seguida, para eliminar el precipitado formado tras la adición del acetato de zinc, se centrifugaron las muestras a 2000 rpm durante 15 min.

Finalmente, los NO₂⁻ del sobrenadante procedente de la última centrifugación fueron cuantificados por el método de Hageman y Hucklesby (1971). Además, se preparó un blanco con todos los reactivos, en el que se sustituyó el volumen del extracto enzimático por solución amortiguadora fosfato. La actividad NR se expresó como μmol de NO₂⁻ formados mg⁻¹ proteína min⁻¹.

Ensayo de la actividad NiR. La actividad de esta enzima fue determinada a través de la desaparición de los NO₂⁻ del medio de reacción (Lillo, 1984). El medio de reacción contenía 0.25 mL de solución amortiguadora fosfato (50 mM disuelto K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.5), 50 μL de KNO₂ 20 mM, 75 μL de dimetil-viológeno 5 mM, 75 μL de ditionito sódico 145 mM disuelto en NaHCO₃ 300 mM, y 50 μL de extracto enzimático. Despues de incubar en oscuridad a 30 °C por 30 min, la mezcla de reacción se agitó vigorosamente hasta la oxidación del dimetil-viológeno (variación del color azul a blanco) que conlleva detener la actividad NiR. Finalmente, y tras la adición de 5 mL de agua desionizada (Millipore RX-21), se tomó una alícuota de 1 mL y se procedió a la cuantificación de los NO₂⁻ no transformados por la actividad NiR, por el método de Hageman y Hucklesby (1971).

Se midió también un blanco en el que se omitió el KNO₂ del ensayo y extracto enzimático, un estándar de KNO₂ 20 mM que consistió en la mezcla de ensayo sin extracto enzimático, y también se midió un control para cada muestra sin KNO₂, con el fin de averiguar la cantidad de KNO₂ presente en el extracto enzimático. La actividad NiR se expresó como μmol NO₂⁻ transformados mg⁻¹ proteína min⁻¹.

Ensayo de la actividad GOGAT. Esta actividad fue ensayada espectrofotométricamente a 30 °C por medio de la oxidación de NADH a una longitud de onda de 340 nm, como indican Groat y Vance (1981) y Singh y Srivastava (1986). La disminución de la absorbancia, lineal al menos durante 10 min, fue registrada durante 5 min. La mezcla de reacción consistió de 0.75 mL de solución amortiguadora fosfato (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.5) que contenía mercaptoetanol a 0.1% (v/v) y 1 mM de EDTA, 0.2 mL de 2-oxoglutarato 18.75 mM, 0.1 mL de amino-oxiacetato 15 mM, 0.1 mL de NADH 1.5 mM, 0.15 mL de extracto enzimático, y finalmente 0.2 mL de L-glutamina 75 mM que inicia la reacción enzimática. Se midieron dos controles, el primero sin 2-oxoglutarato y el segundo sin L-glutamina, con el fin de corregir la oxidación endógena del NADH. La actividad GOGAT se expresó como μmol NADH oxidados mg⁻¹ proteína min⁻¹.

Extracción y ensayo de la actividad GS. La extracción de la enzima se realizó con el método de Ress *et al.* (1995). Una cantidad de 0.5 g de material vegetal fresco se homogeneizó con 5 mL de solución amortiguadora HEPES 0.2 M, pH 7.9. El homogenado se centrifugó a 16 000 rpm durante 20 min, y el sobrenadante obtenido se utilizó para medir la actividad GS.

El análisis de la actividad GS se basó en el método descrito por Slawky y Rodier (1988). La mezcla de reacción contenía: 0.6 mL de MgCl₂ 50 mM, 0.2 mL de EDTA-Na 5 mM, 0.4 mL de glutamato potásico 100 mM, 0.15 mL acetato amónico 50 mM, 0.4 mL de extracto enzimático, y 0.25 mL de ATP 8 mM que inició la reacción. La mezcla de reacción fue incubada en luz en un baño de agua a 30 °C durante 15 min, tras lo cual se inhibió la reacción enzimática por la adición de 0.25 mL de H₂SO₄ 1 N. La mezcla fue luego centrifugada (11 000 rpm, 2 min), y del sobrenadante resultante se tomó una alícuota de 50 μL para cuantificar el Pi procedente de la utilización enzimática del ATP.

La concentración del Pi se determinó con el método colorimétrico del vanadomolibdofósforo (Hogue *et al.*, 1970), a una longitud de onda de 430 nm y frente a una curva patrón de K₂HPO₄ (5-100 μM).

Se midió un blanco que consistió en la omisión del extracto enzimático y del glutamato, cuyos volúmenes correspondientes fueron sustituidos por solución amortiguadora HEPES. La actividad GS se expresó como nmol Pi mg⁻¹ proteína min⁻¹.

Extracción y ensayo de la actividad PEPCasa. La extracción y actividad de la PEPCasa se hizo con el método de Vance y Stade (1984), modificado por Ocaña *et al.*

(1996). Se homogeneizaron 0.5 g de material vegetal fresco en 5 mL de solución amortiguadora maleico-KOH 100 mM, pH 6.8, que contenía 100 mM de sacarosa, B-mercaptopetanol a 2 % (v/v) y etilenglicol a 20 % (v/v). El homogenizado fue centrifugado a 4500 rpm durante 5 min, se desechó el residuo y se sometió al sobrenadante a una segunda centrifugación de 16 000 rpm durante 20 min. El sobrenadante obtenido en la última centrifugación se utilizó para determinar la actividad de PEPCasa.

La actividad de PEPCasa se determinó espectrofotométricamente por oxidación del NADH a una longitud de onda de 340 nm durante 3 min, al adicionar 25 μ L de extracto enzimático a 0.975 mL de solución amortiguadora bicina-KOH 0.1 M, pH 8.5, que contiene 10 mM de NaHCO₃, 5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de NADH y 2 mM de PEP.

Se preparó un blanco que consistió en la omisión del extracto enzimático en el ensayo, y el volumen correspondiente fue sustituido por solución amortiguadora bicina-KOH. La actividad de PEPCasa se expresó en μ mol NADH oxidado mg⁻¹ proteína min⁻¹.

Determinación de aminoácidos y proteínas solubles. Los aminoácidos y las proteínas solubles se cuantificaron con los métodos propuestos por Yemm y Cocking (1955) y Bradford (1976), respectivamente.

Una cantidad de 0.5 g de material vegetal fresco (raíces y hojas) fue homogeneizada con 5 mL de solución amortiguadora fosfato (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.0). El homogenizado fue filtrado y centrifugado a 10 000 rpm durante 15 min, y el sobrenadante se utilizó para cuantificar estos compuestos nitrogenados. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo entre 0 y 4 °C.

Para la cuantificación de los aminoácidos solubles, se adicionó 0.1 mL de extracto a 1.5 mL de reactivo de ninhidrina [1:1 (v/v) cloruro de estaño (80 mg de cloruro de estaño disueltos en 50 mL de solución amortiguadora citrato 200 mM, pH 5); ninhidrina (2 g de ninhidrina disueltos en 50 mL de etilenglicol)]; esta mezcla se introdujo en un baño de agua a 100 °C durante 20 min. A continuación y una vez enfriada la mezcla, se le añadió 8 mL de propanol a 50 %; pasados 30 min se procedió a la lectura de las muestras a una longitud de onda de 570 nm, frente a curva patrón de glicina (solución madre de glicina: 10 mg/50 mL).

En la cuantificación de las proteínas solubles se tomó 0.1 mL de sobrenadante y se adicionó a 0.9 mL de solución amortiguadora fosfato (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7.0) y a 5 mL de azul cromassie 10 % (p/v) más etanol de 96 % a 5 % (v/v) + H₃PO₄ de 85% a 10 % (v/v). Trans-

curridos 20 min, las muestras se midieron colorimétricamente a una longitud de onda de 595 nm, frente a una curva patrón de albúmina (solución madre de albúmina: 10 mg/50 mL). La concentración de aminoácidos y de proteínas solubles se expresó en mg g⁻¹ p.f.

Determinación de las formas nitrogenadas. Las concentraciones de NO₃⁻ y NH₄⁺ se analizaron a partir de una extracción acuosa del material seco. El análisis de NO₃⁻ se hizo con el método de Cataldo *et al.* (1975). A 100 μ L de la extracción acuosa se le añadió 0.4 mL de una solución a 10 % (p/v) de ácido salicílico en ácido sulfúrico a 96 %, y 9.5 mL de NaOH 2 N. La concentración de NO₃⁻ se cuantificó por colorimetría a una longitud de onda de 410 nm, frente a una curva patrón de KNO₃ (50-500 μ g/mL). Para el NH₄⁺ se tomó un volumen de 100 μ L de la extracción acuosa, y la concentración de esta forma nitrogenada se determinó con el método de Krom (1980). Las concentraciones de NO₃⁻ y de NH₄⁺ se expresaron en mg g⁻¹ p.s.

En relación al análisis de N orgánico (Norg), 0.15 g de material seco fue sometido a un proceso de mineralización. A 100 μ L del mineralizado se le añadió 1 mL del reactivo A [8.5 % (p/v) de salicilato sódico + 0.06 % (p/v) de nitroprusiato sódico] y 1 mL del reactivo B [4 % (p/v) de NaOH + 0.625 % (p/v) de dicloroisocianurato sódico]; transcurridos 45 min se procedió a la medición colorimétrica a una longitud de onda de 630 nm, frente a una curva patrón de (NH₄)₂SO₄ (0-20 μ g/mL) (Krom, 1980). La concentración de N orgánico se expresó en mg g⁻¹ p.s. La concentración de N total (Nt) se obtuvo mediante la suma de las concentraciones de NH₄⁺, NO₃⁻ y de N orgánico, y se expresó en mg g⁻¹ p.s.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron sometidos a análisis de varianza. Para la diferencia entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de LSD a 95 % (SAS, 1987). Además, se hizo un análisis de correlación entre las diferentes variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El N es el nutriente más ampliamente usado como fertilizante y demandado para el crecimiento de las plantas cultivadas (Weinhold *et al.*, 1995). En el presente experimento, el tratamiento N3 presentó la máxima producción de biomasa foliar, con un incremento de 43 %, en relación al tratamiento N6 donde se presentó el valor mínimo (Figura 1). En producción de biomasa radicular, el tratamiento N1 presentó el mayor valor con un incremento de 51 %

en relación a N6, que de nuevo dio lugar a la menor cantidad de biomasa radical.

La aplicación de 6 mM de N (N3) resultó ser el mejor tratamiento para maximizar la producción de biomasa foliar y radical en plantas de frijol ejotero. Así, los tratamientos por debajo de N3 (N1 y N2) pueden ser considerados como deficientes en N, y se caracterizaron por aumentar el crecimiento radical y reducir el crecimiento de la parte aérea y, por tanto, incrementan el cociente raíz/parte aérea. Por otro lado, las dosis por encima del óptimo, es decir N4, N5 y N6, se podrían considerar como de elevadas a tóxicas por la disminución que provocaron de crecimiento radical y, sobre todo de la parte aérea.

Las plantas absorben N del suelo en dos formas inorgánicas: NO_3^- y NH_4^+ (Chiallou *et al.*, 1986), pero la absorción de NO_3^- es el principal factor que determina su posterior asimilación e integración en el metabolismo nitrogenado (Crawford, 1995; Glass y Siddiqi, 1995; Sivasankar y Oaks, 1996; Stitt, 1999). En nuestro experimento se observó como a medida que aumentó la aplicación de N al medio, se incrementó la concentración de NO_3^- en raíces y hojas ($P \leq 0.05$; Figura 2); el tratamiento N6 presentó la máxima concentración con incrementos de 66 % y 72 % respectivamente, en relación al tratamiento N1 en el que se encontró la mínima concentración de NO_3^- en raíces y hojas. La acumulación excesiva de NO_3^- en N6 podría indicar “*a priori*” que la absorción y translocación de NO_3^- hacia la parte aérea excede la capacidad de asimilación de las plantas (Mackown *et al.*, 1990).

Se ha indicado que una acumulación excesiva de NO_3^- podría causar una disminución del crecimiento y desarrollo de las plantas. Por ejemplo, Andreeva *et al.* (1998) encontraron que aplicaciones elevadas de NO_3^- a la solución nutritiva (> 10 mM de N), dieron lugar a un efecto estresante para las plantas, al reducir sustancialmente procesos clave para el desarrollo vegetal, tales como fotosíntesis, síntesis y acumulación de almidón, y asimilación de N, lo que condujo a una importante reducción de la productividad. En nuestra experiencia, la concentración foliar de NO_3^- observada en los tratamientos N4, N5, y especialmente en N6, podría interferir o alterar los procesos mencionados anteriormente y provocar una reducción de la producción de biomasa foliar. Efectivamente, la acumulación excesiva de NO_3^- coincidió con una disminución drástica de la producción de biomasa foliar y radical.

La otra forma nitrogenada inorgánica que puede ser asimilada por las plantas es el NH_4^+ . En nuestro estudio se observó como a medida que aumentó la aplicación de N al medio también incrementó la concentración de NH_4^+ en

raíces y hojas ($P \leq 0.01$; Figura 3), y el tratamiento N6 presentó la máxima concentración con incrementos de 65 % y 71 % respectivamente, en relación al tratamiento N1 en el que hubo la mínima concentración de NH_4^+ en raíces y hojas.

Con respecto al NH_4^+ , se ha demostrado que un elevado aporte de este catión al medio perjudica el crecimiento y producción de las plantas, en comparación con plantas que han sido fertilizadas con NO_3^- (Harada *et al.*, 1968; Wilcox *et al.*, 1985; Cramer y Lewis, 1993). La toxicidad de NH_4^+ puede ser producida por las siguientes causas: 1) Inducción de deficiencias por acción antagonista con otros nutrientes, especialmente cationes; 2) Inhibición del crecimiento secundario originado por la acidificación del medio radicular; 3) Alteraciones en el pH intracelular y balance osmótico; 4) Desacoplamiento del transporte de electrones en la fotofosforilación; y 5) Alteración del metabolismo de las poliaminas y fitohormonas (Gerendás *et al.*, 1997).

Al igual que ocurrió con NO_3^- , se produjo una acumulación importante de NH_4^+ en las hojas de plantas tratadas con las dosis N4, N5 y especialmente con N6, lo que podría explicar la reducción de biomasa observada en estas plantas. De hecho, el coeficiente de correlación entre ambas variables fue negativo y significativo ($r = -0.94^{***}$).

En relación con las elevadas concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ encontradas en N6, Sánchez *et al.* (2000) han sugerido que la acumulación excesiva de estos iones podría ser la causa de la formación y acumulación de H_2O_2 , lo que contribuiría de forma decisiva en una reducción de la biomasa por la aparición de un estrés oxidativo, como lo señalan Okuda *et al.* (1991) y García *et al.* (2001).

Como se indicó antes, el crecimiento de la planta depende del aporte adecuado de N para formar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. En muchos estudios se ha comprobado que la etapa limitante para la asimilación de N es la reducción de los NO_3^- a NO_2^- catalizada por la enzima NR (Huber *et al.*, 1996; Sivasankar y Oaks, 1996). Posteriormente, la enzima NiR convierte el NO_2^- a NH_4^+ (Sivasankar y Oaks, 1996; Migge y Becker, 1996), y ambas enzimas, NR y NiR, son inducidas por los mismos factores (Oaks, 1994). Un factor importante que regula tanto la actividad NR como la de NiR es la disponibilidad de NO_3^- (Campbell, 1996).

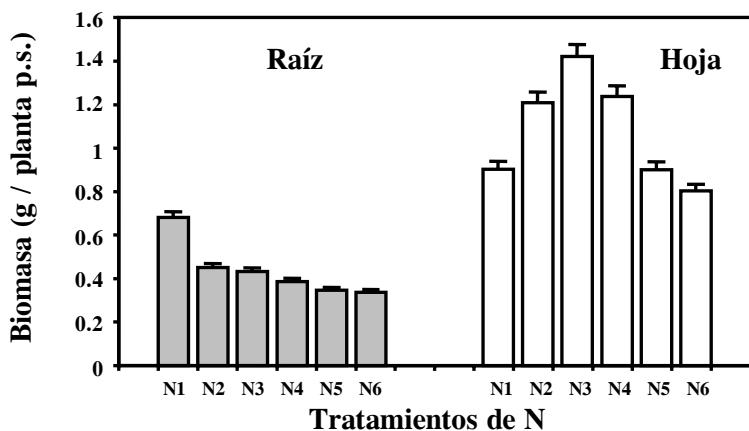


Figura 1. Efecto de los tratamientos de N ($N_1 = 1.5 \text{ mM}$, $N_2 = 3.0 \text{ mM}$, $N_3 = 6.0 \text{ mM}$, $N_4 = 12.0 \text{ mM}$, $N_5 = 18.0 \text{ mM}$ y $N_6 = 24.0 \text{ mM}$ de N) sobre la producción de biomasa radicular y foliar (expresada en g de p.s.) en plantas de frijol ejotero. Los datos son medias \pm error estándar ($n=6$).

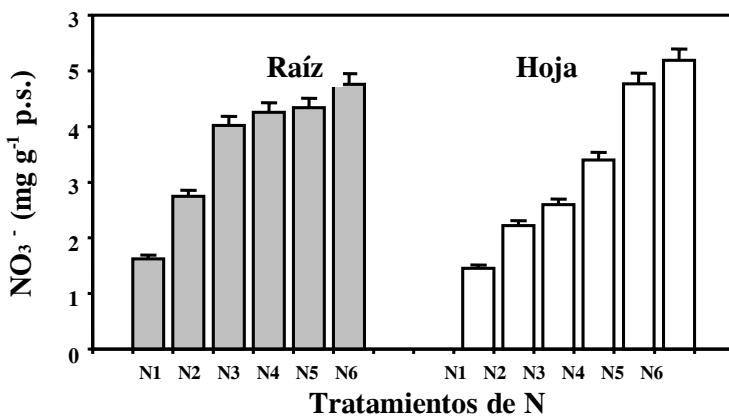


Figura 2. Acumulación de NO_3^- en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero en respuesta a los tratamientos de N ($N_1 = 1.5 \text{ mM}$, $N_2 = 3.0 \text{ mM}$, $N_3 = 6.0 \text{ mM}$, $N_4 = 12.0 \text{ mM}$, $N_5 = 18.0 \text{ mM}$ y $N_6 = 24.0 \text{ mM}$ de N). Los datos son medias \pm error estándar ($n=6$).

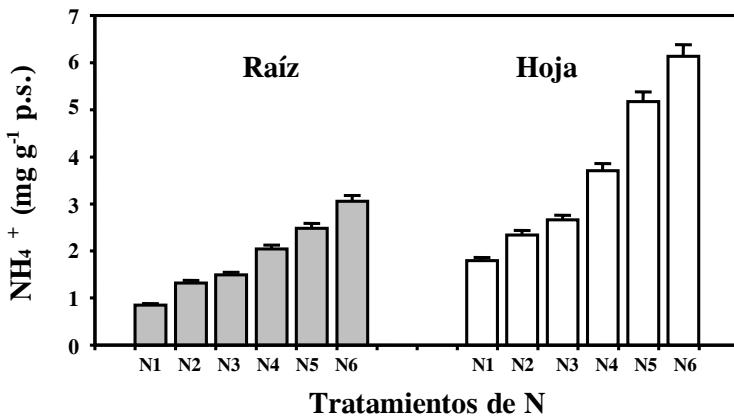


Figura 3. Acumulación de NH_4^+ en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero en respuesta a los tratamientos de N ($N_1 = 1.5 \text{ mM}$, $N_2 = 3.0 \text{ mM}$, $N_3 = 6.0 \text{ mM}$, $N_4 = 12.0 \text{ mM}$, $N_5 = 18.0 \text{ mM}$ y $N_6 = 24.0 \text{ mM}$ de N). Los datos son medias \pm error estándar ($n=6$).

En el presente experimento, las actividades NR y NiR (Cuadro 1) presentaron una respuesta similar a la concentración de NO_3^- , en el que el tratamiento N6 produjo las máximas actividades con incrementos de 76 y 70 % respectivamente, en relación al tratamiento N1 en el que se registraron las mínimas actividades NR y NiR en raíces y hojas. Los datos de las actividades NR y NiR y de las concentraciones de NO_3^- en raíces y hojas confirman el exceso de absorción y traslocación de NO_3^- encontrada en el tratamiento N6. Además, como ha sido observado en otros trabajos (Sivasankar y Oaks, 1996; Ruiz *et al.*, 1998), la máxima reducción de NO_3^- se produce en hojas (Cuadro 1), lo que sugiere que la mayor parte de los NO_3^- son absorbidos y traslocados hacia las hojas donde son reducidos.

*Cuadro 1. Efecto de los tratamientos de N (N1 = 1.5 mM, N2 = 3.0 mM, N3 = 6.0 mM, N4 = 12.0 mM, N5 = 18.0 mM y N6 = 24.0 mM de N) sobre las actividades enzimáticas de NR, NiR, GS, GOGAT y PEPCasa, en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero. Los datos son medias (n=6), y los niveles de significancia están representados por * a P ≤ 0.05, ** a P ≤ 0.01, *** a P ≤ 0.001.*

Tratamiento	NR	NiR	GS	GOGAT	PEPCasa
Raíces					
N1	0.018	0.48	0.10	0.15	1.64
N2	0.028	0.67	0.16	0.17	2.80
N3	0.035	0.82	0.22	0.26	3.94
N4	0.042	1.15	0.24	0.45	4.96
N5	0.051	1.18	0.26	1.03	10.72
N6	0.075	1.24	0.32	1.22	15.39
Significación	*	*	***	***	***
Hojas					
N1	0.048	0.81	0.28	0.08	2.21
N2	0.060	1.20	0.58	0.11	5.39
N3	0.071	1.54	0.76	0.56	7.87
N4	0.080	4.64	0.83	0.73	9.04
N5	0.140	5.78	0.97	1.01	11.42
N6	0.165	6.36	1.36	1.47	16.77
Significación	**	***	***	***	***

Nitrato reductasa (NR) expresada en $\mu\text{M } \text{NO}_3^-$ formados mg^{-1} prot. min^{-1} ; Nitrito reductasa (NiR) expresada en $\mu\text{M } \text{NO}_2^-$ transformados mg^{-1} prot. min^{-1} ; Glutamina sintetasa (GS) expresada en $\mu\text{M P}_i \text{ mg}^{-1}$ prot. min^{-1} ; Glutamato sintasa (GOGAT) expresada en $\mu\text{M NADH oxidados } \text{mg}^{-1}$ prot. min^{-1} ; Fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa) expresada en $\mu\text{M NADH oxidados } \text{mg}^{-1}$ prot. min^{-1} .

Tanto el NH_4^+ originado en las plantas por la reducción de NO_3^- como el suministrado vía fertilización, son incorporados a formas orgánicas, principalmente a través del ciclo GS/GOGAT (Sivasankar y Oaks, 1996; Migge y Becker, 1996). La enzima GS cataliza la conversión del aminoácido glutamato hacia la amida glutamina. Luego, la enzima GOGAT cataliza la reducción del grupo amida de la glutamina para formar dos moléculas de glutamato. Una de las moléculas de glutamato puede ser incorporada de nuevo al ciclo GS/GOGAT, mientras que la otra se utiliza para formar otros aminoácidos o para incorporarse a proteínas (Sivasankar y Oaks, 1996). En el presente estudio, las actividades GS y GOGAT se incrementaron con el aumento de la fertilización nitrogenada, y las máximas acti-

vidades ocurrieron en el tratamiento N6, tanto en raíces como en hojas, con incrementos superiores a 65 % para la actividad GS y de 85 % para la actividad GOGAT, con respecto a la mínima actividad encontrada en N1 (Cuadro 1). Un factor que determina la actividad de las enzimas GS y GOGAT es la presencia de NH_4^+ (Oaks, 1994).

Se encontró una relación positiva y significativa entre el contenido de NH_4^+ y las actividades enzimáticas GS y GOGAT en ambos órganos (raíces: NH_4^+ -GS, $r = 0.75^{**}$; NH_4^+ -GOGAT, $r = 0.80^{**}$; hojas: NH_4^+ -GS, $r = 0.81^{**}$; NH_4^+ -GOGAT, $r = 0.92^{***}$). Al igual que las actividades NR y NiR (Cuadro 1), las máximas actividades encargadas de la asimilación del NH_4^+ (GS y GOGAT) ocurrieron en las hojas, lo que indica que la mayor asimilación de NH_4^+ se llevó a cabo en este órgano.

La actividad PEPCasa refleja la relación entre el metabolismo nitrogenado y el metabolismo carbonado (Champigny y Foyer, 1992). En el presente trabajo, la aplicación de las diferentes dosis de N conllevó un aumento significativo de la actividad PEPCasa en raíces y hojas (Cuadro 1), y la máxima actividad se registró en el tratamiento N6, con aumentos de 89 y 87 % respectivamente, en relación a N1 que dio lugar a la mínima actividad. La actividad de PEPCasa siguió un comportamiento similar a la GS y GOGAT, lo que confirma la relación estrecha que existe entre el metabolismo nitrogenado y carbonado (Champigny y Foyer, 1992).

La relación entre ambas vías metabólicas en plantas superiores ha sido reconocida por diferentes investigadores (Naik y Nicholas, 1984; Champigny y Foyer, 1992). En este estudio también se encontró dicha relación, ya que a medida que se aumentaron las dosis de N se incrementó la actividad enzimática de PEPCasa, lo que puede indicar que los esqueletos carbonados proporcionados por esta actividad enzimática se destinaron en buena medida a la formación de compuestos nitrogenados.

Los productos finales de la asimilación del N en las plantas son principalmente aminoácidos, proteínas y N orgánico (Barneix y Causin, 1996). Los presentes resultados muestran que estos compuestos nitrogenados se incrementaron con las dosis de N, al presentar las máximas concentraciones en el tratamiento N6 en raíces y hojas (Cuadro 2), y las mínimas en el tratamiento N1. En cuanto a la concentración del N total, éste presentó el mismo comportamiento que el anteriormente descrito para el N orgánico. Los máximos contenidos de estas formas nitrogenadas se registraron en las hojas.

Cuadro 2. Efecto de los tratamientos de N ($N1 = 1.5 \text{ mM}$, $N2 = 3.0 \text{ mM}$, $N3 = 6.0 \text{ mM}$, $N4 = 12.0 \text{ mM}$, $N5 = 18.0 \text{ mM}$ y $N6 = 24.0 \text{ mM}$ de N) sobre la concentración de aminoácidos, proteínas, N orgánico y N total, en raíces y hojas de plantas de frijol ejotero. Los datos son medias ($n=6$), y los niveles de significancia están representados por * a $P \leq 0.05$, ** a $P \leq 0.01$, *** a $P \leq 0.001$.

Tratamiento	Aminoácidos	Proteínas	N orgánico	N total
Raíces				
N1	0.25	1.32	26.68	27.53
N2	0.33	1.41	29.48	30.80
N3	0.62	1.74	34.20	39.82
N4	0.68	2.77	37.23	43.53
N5	1.48	3.48	39.35	46.17
N6	1.88	4.64	39.75	47.59
Significación	***	**	**	**
Hojas				
N1	0.95	5.66	28.12	29.91
N2	1.33	7.03	31.10	33.44
N3	1.92	7.20	40.51	45.83
N4	4.32	8.33	43.47	50.58
N5	5.83	12.21	63.47	73.41
N6	7.18	14.67	65.00	76.33
Significación	***	**	***	***

Aminoácidos y proteínas expresados en mg g⁻¹ p.f.; N orgánico y N total expresados en mg g⁻¹ p.s.

Con base en estos resultados, se postula que las plantas de frijol ejotero carecen de mecanismos eficaces que eviten la absorción y asimilación de N cuando la acumulación intracelular de fracciones nitrogenadas inorgánicas (NO_3^- y NH_4^+) sobrepasan el poder de asimilación de éstas. Por tanto, la acumulación de NO_3^- y NH_4^+ que se produce a partir del tratamiento N4, y en especial en el tratamiento N6, podría ser la causa de la toxicidad detectada en estas plantas, lo cual se reflejó en reducción de biomasa y productividad, como se describió anteriormente.

CONCLUSIONES

La deficiencia de N (1.5 y 3.0 mM; N1 y N2) se caracterizó por disminuir significativamente la asimilación de N, y tanto en raíces como en hojas las actividades de las enzimas NR, NiR, GS, GOGAT y PEPCase fueron inferiores a las observadas en la dosis de 6.0 mM (N3), en la que se obtuvo el máximo crecimiento. La menor asimilación de N en los tratamientos N1 y N2 fue la causa de que las plantas tratadas con estas dosis produjeran mínimas concentraciones de compuestos orgánicos nitrogenados (aminoácidos, proteínas y N orgánico), lo que explicaría su inferior producción de biomasa respecto al tratamiento N3.

Por el contrario, la toxicidad de N (12 y 18 mM; N5 y N6) se caracterizó por favorecer concentraciones elevadas de NO_3^- y NH_4^+ en raíces y hojas, sin que ello repercutiera de forma negativa en la asimilación de N. Esos tratamientos presentaron las máximas actividades enzimáticas y las mayores concentraciones de compuestos nitrogenados orgánicos (tratamiento N6). Sin embargo, esto no se reflejó en una mayor producción de biomasa. Se concluye que la

toxicidad de N tiene un efecto más negativo en la producción de biomasa que la deficiencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Andreeva T F, S N Maevskaya, S Y Voevudska (1998) The relationship between photosynthesis and nitrogen assimilation in Mustard plants exposed to elevated nitrate rates in nutrient solutions. Russian J. Plant Physiol. 45:702-705.
- Barneix A J, H F Causin (1996) The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. J. Plant Physiol. 149:358-362.
- Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. Anal. Biochem. 72:248-254.
- Campbell W H (1996) Nitrate reductase biochemistry comes on age. Plant Physiol. 111:355-361.
- Cao W, T W Tibbets (1999) Response of potatoes to nitrogen concentrations differ with nitrogen concentrations differ with nitrogen forms. J. Plant Nutr. 21:615-623.
- Carbonell-Barrachina A C, F Burló-Carbonell, J Mataix-Beneyto (1997) Effect of sodium arsenite and sodium chloride on bean plant nutrition (macronutrients). J. Plant Nutr. 20:1617-1633.
- Cataldo D A, M Haroon, L E Schrader, V L Young (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Comm. Soil Sci. Plant Anal. 6:71-80.
- Champigny M L, C Foyer (1992) Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis: basis for a new concept. Plant Physiol. 100:7-12.
- Chiallou S, J F Morot-Gaudry, L Salsac, C Lesaint, E Jolivet (1986) Compared effects of NO_3^- and NH_4^+ on growth and metabolism on French bean. Physiol. Vég. 24: 679-687.
- Cramer M D, O A M Lewis (1993) The influence of nitrate and ammonium nutrition on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) plants. Ann. Bot. 72: 359-365.
- Crawford N M (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. Plant Cell 7:859-868.
- Deshpande S, S K Styhe, D K Salunkhe (1984) Interrelationships between certain physical and chemical properties of dry bean. Qual. Plant Foods Hum. Nutr. 34:53-65.
- Edwards J W, G M Coruzzi (1989) Photorespiration and light act in concert to regulate expression of the nuclear gene for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. Plant Cell 1:241-248.
- Farnden K J F, J G Robertson (1980) Methods for studying enzymes involved in metabolism related to nitrogenase. In: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. F J Bergersen (ed). Jonh Wile & Sons, New York. pp:265-314.
- García P C, J M Ruiz, R M Rivero, L R López-Lefebre, E Sánchez, L Romero (2001) Direct action of biocide carbendazim on phenolic metabolism in tobacco plants. J. Agric. Food Chem. 49:131-137.
- Gerendás J, Z Zhu, R Bendixen, G Rateliffe, B Sattelmacher (1997) Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. Z. Pflanzenernähr. Bodenkd. 160:239-251.
- Glass A D M, M Y Siddiqi (1995) Nitrogen absorption by plant roots. In: Nitrogen Nutrition in Higher Plants. H S Srivatava, R P Singh (eds). Associated Publishing Co. of New Delhi, India. pp:155-163.
- Groat R G, C P Vance (1981) Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Physiol. 32:169-204.
- Hageman R H, D P Hucklesby (1971) Nitrate reductase. Meth. Enzymol. 23:497-503.
- Harada T, H Takaki, Y Yamada (1968) Effect of nitrogen sources on the chemical components of young plants. Soil Sci. Plant Anal. 14:47-55.

- Hogue E, G E Wilcow, D J Cantliffe (1970)** Effect of soil P on phosphate fraction in tomato leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95:174-176.
- Huber S C, M Bachmann, J L Huber (1996)** Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca^{2+} and 14-3-3 proteins. *Trends Plant Sci.* 1:432-438.
- Ireland R J, P J Lea (1999)** The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. In: *Plant amino acids. Biochemistry and Biotechnology*. B K Singh (ed). Marcell Dekker, Inc. New York. pp:49-109.
- Jones B J Jr (1997)** The essential elements. In: *Hydroponics: A Practical Guide for the Soilless Grower*. B Jones J Jr (ed). St. Lucie Press, Boca Raton, Florida. pp:30-32.
- Kaiser J J, O A H Lewis (1984)** Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in leaves and roots of nitrate fed *Helianthus annuus* L. *Plant Soil* 70:127-130.
- Krom M D (1980)** Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst* 105:305-316.
- Lam H M, K T Coschigano, I C Oliveira, R Melo-Oliveira, G M Coruzzi (1996)** The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:569-593.
- Lillo C (1984)** Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate in barley leaves. *Physiol. Plant.* 61:214-218.
- López-Lefebre L R, J M Ruiz, R M Rivero, P C García, E Sánchez, L Romero (2000)** Role of CaCl_2 in ammonium assimilation in roots of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). *J. Plant Physiol.* 156:672-677.
- Mackown C T, T G Sutton, L P Bush (1990)** Nitrogen compositional changes in xylem exudates and leaves of burley tobacco. *Crop Sci.* 30:133-138.
- Migge A, G Meya, E Carayol, B Hirel, T W Becker (1996)** Regulation of the subunit composition of tomato plastidic glutamine synthetase by light and the nitrogen source. *Planta* 200:213-220.
- Migge A, T W Becker (1996)** In tobacco leaves, the genes encoding the nitrate-reducing or the ammonium-assimilating enzymes are regulated differently by external nitrogen-sources. *Plant Physiol. Biochem.* 34:665-671.
- Naik M S, D J D Nicholas (1984)** Origin of NADH for nitrate reduction in wheat roots. *Plant Sci. Lett.* 35:91-96.
- Oaks A (1994)** Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* 72:739-750.
- Ocaña A, M P Cordovilla, F Ligero, C Lluch (1996)** Phosphoenolpyruvate carboxylase in root nodules of *Vicia faba*: Partial purification and properties. *Physiol. Plant.* 97: 724-730.
- Okuda T, Y Matsuda, A Yamamoto, S Sagisaka (1991)** Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* 97: 1265-1267.
- Padgett P E, R T Leonard (1996)** Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 47:871-883.
- Ress T A V, T R Larson, J W G Heldens, F G J Huning (1995)** *In situ* glutamine synthetase activity in a marine unicellular alga. Development of a sensitive colorimetric assay and the effects of nitrogen status on enzyme activity. *Plant. Physiol.* 109:1405-1410.
- Ruiz J M, L Romero (1998)** Calcium impact on phosphorus and its main bioindicators: response in the roots and leaves of tobacco. *J. Plant Nutr.* 21:2273-2285.
- Ruiz J M, L Romero (1999)** Cucumber yield and nitrogen metabolism in response to nitrogen supply. *Sci. Hort.* 82:309-316.
- Ruiz J M, L Romero (2002)** Relationship between potassium fertilization and nitrate assimilation in leaves and fruits of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Assoc. Appl. Biol.* 140:241-249.
- Ruiz J M, M Baghour, G Bretones, A Belakir, L Romero (1998)** Nitrogen metabolism in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.): Role of Boron as a possible regulatory factor. *Int. J. Plant Sci.* 159:121-126.
- Ruiz J M, N Castilla, L Romero (2000)** Nitrogen metabolism in pepper plants applied with different bioregulators. *J. Agric. Food Chem.* 48:2925-2929.
- Sánchez E, J M Soto, A Núñez, J M Ruiz, L Romero (2005)** Biosynthesis of non-structural carbohydrates and their distribution in greenbean plants (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Strike): deficiency vs toxicity of nitrogen. *Rev. Fitotec. Mex.* 28:55-61.
- Sánchez E, J M Soto, P C García, L R López-Lefebre, R M Rivero, J M Ruiz, L Romero (2000)** Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. *Aust. J. Plant Physiol.* 27:272-277.
- SAS (1987)** SAS/STAT Guide for Personal Computers. Version 6; Statistical Analysis System Institute, Inc.: Cary, NC. pp:1028-1056.
- Singh R P, H S Srivastava (1986)** Increase in glutamate synthase activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiol. Plant.* 66:413-416.
- Singh S P (1999)** Production and utilization. In: *Common Bean Improvement in the Twenty-First Century. Developments in Plant Breeding*. Vol. 7. Kluwer Acad., Dordrecht. The Netherlands. pp:1-24.
- Sisson V A, T W Rufty, R E Williamson (1991)** Nitrogen-use efficiency among flue-cured tobacco genotypes. *Crop Sci.* 31:1615-1620.
- Sivasankar S, A Oaks (1996)** Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiol. Biochem.* 34:609-620.
- Slawsky G, M Rodier (1988)** Biosynthetically active glutamine synthetase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*: optimization of the forward-reaction assay. *Mar. Biol.* 97:269-274.
- Stitt M (1999)** Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Op. Plant Biol.* 2:178-186.
- Vance C P, S Stade (1984)** Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. II. Partial purification and characterization of root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 75:261-264.
- von Wirén N, S Gazzarrini, W B Frommer (1997)** Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant Soil* 196:191-199.
- Weinhold B J, P T Todd, G A Reichman (1995)** Yield and nitrogen efficiency of irrigated corn in Northern great plains. *Agron. J.* 87:842-846.
- Wilcox G E, J R Magalhaes, F L I M Silva (1985)** Ammonium and nitrate concentration as factors in tomato growth and nutrient uptake. *J. Plant Nutr.* 8:989-998.
- Wolf B (1982)** A comprehensive system of leaf analysis and its use for diagnosis crop nutrients status. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 13:1035-1059.
- Woodall J, J B Boxall, B G Forde, J Pearson (1996)** Changing perspectives in plant nitrogen metabolism: The central role of glutamine synthetase. *Sci. Prog.* 79:1-26.
- Yemm E W, E C Cocking (1955)** The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst* 80:209-213.