

ACUMULACION DE NITRATOS Y ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN DIFERENTES CULTIVARES DE *VICIA FABA* L.

J. M. Caba, C. Lluch, A. Hervás y F. Ligeró

Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Granada. 18071. Granada.

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto del nitrato y del genotipo en la distribución de la actividad nitrato reductasa (NR) en diferentes órganos de plantas de 8 cultivares de *Vicia faba* L. inoculadas con *Rhizobium leguminosarum*. Todos los órganos ensayados mostraron actividad NR, aunque el nivel detectado varió ampliamente. En general, el nitrato estimuló la actividad NR en parte aérea y raíz, pero la inhibió en nódulos. Sin embargo, el genotipo fue el factor que en mayor medida afectó la expresión de esta actividad en todos los órganos, excepto en raíz, donde lo hizo el nitrato. Aunque las hojas mostraron la mayor actividad NR potencial, la actividad real (es decir, la que se da a expensas del nitrato endógeno) se localizó fundamentalmente en raíz, sobre todo, y en tallo (tallo más peciolo). Esto indica que debería considerarse un papel más importante de estos órganos en la metabolismo del nitrato en *V. faba*. No se ha encontrado una relación directa entre el contenido en nitrato de los tejidos y el nivel de actividad expresado en los distintos cultivares. Por otra parte, los genotipos mutantes mostraron mayores concentraciones de NO_3^- en raíces, tallos y peciolo que los cultivares comerciales, mientras que en hojas se observó lo contrario. Se discuten las posibles relaciones entre patrones de reducción de nitrato y potencial de crecimiento y eficiencia simbiótica de los distintos cultivares de *V. faba* empleados.

Palabras clave: cultivar, nitrato, nitrato reductasa, *Vicia faba*.

SUMMARY

NITRATE ACCUMULATION AND NITRATE REDUCTASE ACTIVITY IN SEVERAL CULTIVARS OF *VICIA FABA* L.

The effect of nitrate and plant genotype on the distribution of nitrate reductase activity (NRA) along plant organs has been studied in *Vicia faba* inoculated with *Rhizobium leguminosarum*. All plant organs assayed expressed NRA at appreciable levels though varying over a wide range. In general, nitrate stimulated NRA in aerial organs and in roots of *V. faba* but depressed this activity in nodules. However, plant genotype was the main factor affecting NRA expression in all tissues, except for roots. Although leaves showed the highest potential NR activity, actual nitrate reduction (that is, activity only depending on endogenous NO_3^- content) appeared as mainly provided by roots and stems (stem plus petioles), in this order. This indicates that a more important role of these organs in nitrate metabolism in *V. faba* would be considered. No direct relationship between the nitrate content of tissues and the level of NRA expressed was observed

across cultivars. On the other hand, mutant genotypes showed higher concentrations of NO_3^- in roots, stems and petioles as compared with commercial cultivars while the contrary was observed for leaves. Possible relationships between patterns of nitrate reduction and growth potential and symbiotic efficiency of the different cultivars in *V. faba* are discussed.

Key words: cultivar, nitrate, nitrate reductase, *Vicia faba*.

INTRODUCCION

En un programa de mejora encaminado a incrementar la calidad de la semilla y cosecha de leguminosas grano, a menudo se requiere información sobre la distribución y removilización del nitrógeno en los distintos órganos de la planta durante su ontogenia, puesto que estos factores pueden modificar los parámetros comentados. Ello, junto a la distribución del nitrógeno del suelo y de fertilizantes y el procedente de la fijación biológica permite, no sólo la selección de los más eficientes sistemas simbióticas, sino también determinar el momento y la dosis más efectiva del nitrógeno mineral aplicado (Pate y Herridge, 1978).

Aunque el efecto del nitrógeno inorgánico en la nodulación, fijación simbiótica del nitrógeno, crecimiento vegetativo y cosecha ha sido estudiado en diversas leguminosas grano

(Evans, 1982), no se describe de forma cuantitativa la sensibilidad de la simbiosis a las dosis de nitrógeno combinado, frecuentemente elevadas, lo que va en detrimento de la efectividad de la misma. Se ha observado que concentraciones bajas de nitrato pueden mejorar significativamente la fijación de nitrógeno, nodulación y cosecha (Eaglesham *et al.*, 1983). Por otra parte, puede diferir según el genotipo de la planta (Ruschel *et al.*, 1982) y la raza de *Rhizobium* (Morris y Weaver, 1983).

Los resultados de este trabajo informan sobre la sensibilidad y respuesta de la simbiosis *Vicia faba* - *Rhizobium leguminosarum* a diversas concentraciones de nitrato, así como de la distribución de la actividad nitrato reductasa en los distintos órganos vegetativos de la planta.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico y condiciones de cultivo

Se han utilizado 8 cultivares de *Vicia faba* L. var. minor: cinco genotipos mutantes (VFM31, VFM132, VFM22, VFM72 y VFM109), suministrados por el Dr. A. Martín (Departamento de Genética, ETSIA, Universidad de Córdoba), y tres

variedades comerciales (HA-200, Alameda y Alborea), suministradas por semillas Pacífico, S. A. (Sevilla). Los genotipos VFM han sido caracterizados para algunos parámetros (morfología, color de semilla, contenido en taninos) por Cabrera y Martín (1986).

Las semillas fueron esterilizadas en superficie y germinadas en vermiculi-

ta estéril durante 72 h a 26 °C en oscuridad. Las plántulas fueron transplantadas a jarras Leonard estériles que contenían vermiculita y solución nutritiva (Rigaud y Puppo, 1975) adicionada de KNO_3 2 mM. Todas las plántulas, 2 por jarra, fueron inoculadas con 1 ml de una suspensión bacteriana ($\approx 10^9$ células ml^{-1}) procedente de cultivos frescos de *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae*, crecidos en medio sólido Allen 79 durante 72 h. La raza de *R. leguminosarum* empleada fue la GRL19, raza infectiva y efectiva aislada de nódulos de plantas de haba crecidas en suelo de la localidad granadina de Loja (Hervás, 1988).

El cultivo se desarrolló en cámara de ambiente controlado (fotoperiodo de 16 h, 23/16 °C día/noche, humedad relativa 65/80 % día/noche, intensidad luminosa 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) hasta el inicio de floración de cada uno de los cultivares (Tabla 5), momento en el que se procedió a su recogida y posterior estudio.

Tratamientos

Una semana antes de la recogida de las plantas, fueron separadas en tres grupos (6 plantas por grupo). Al primero se le mantuvo la misma solución nutritiva con 2 mM NO_3^- mientras que a los otros dos les fue sustituida por 4 y 8 mM de nitrato, respectivamente.

Determinación de la actividad nitrato reductasa

La actividad nitrato reductasa (NR) se midió *in vivo* según el método de Crafts-Brandner y Harper (1982) y Ligeró *et al.* (1987b), con modificaciones. Muestras de 0.5 g de mate-

rial vegetal (hoja, peciolo, tallo, raíz y nódulos), obtenido de plantas en floración y homogéneamente troceado (salvo en nódulos, que se usaban enteros), fueron colocadas en tubos que contenían 5 ml de medio de incubación. En el caso de los órganos aéreos estaba compuesto de tampón fosfato-K 0.1 M, pH 7.5, KNO_3 50 mM, EDTA- Na_2 1 mM, 1% (v/v) n-propanol y 0.01% (v/v) Triton X-100; en el caso de raíz y nódulos el medio fue esencialmente el mismo, excepto el pH que era 7.0, y el propanol que fue adicionado al 2%. Con este ensayo se determina la actividad nitrato reductasa potencial, al hacerlo en un medio en el que el nitrato no es limitante. Algunos ensayos no incluyeron NO_3K en el medio (ensayos - NO_3^-), al objeto de determinar la actividad real, la que se da a expensas del nitrato y poder reductor endógenos. Las muestras se infiltraron al vacío a 67 kPa en dos periodos de 5 min, y se incubaron a 30 °C en oscuridad durante 1 h. La reacción se detuvo mediante ebullición durante 4 min, tomándose alícuotas para determinar el nitrito formado mediante el método colorimétrico de Hageman y Hucklesby (1971).

Determinación de nitratos

La determinación del contenido en nitratos de los distintos órganos se realizó, previa extracción de los mismos según describen Soares *et al.* (1985), por el método de la brucina (Standard Methods, 1976). El contenido en nitrógeno reducido de raíz y parte aérea se determinó mediante análisis Kjeldahl sobre material vegetal secado a 70 °C durante 24 h.

Análisis estadístico

Todos los datos son media de cinco repeticiones. Los resultados fueron sometidos a un análisis de la varianza de doble entrada. A partir de este análisis se calcularon las mí-

nimas diferencias significativas (M.D.S.) entre medias y la influencia (en %) de cada una de las fuentes de variación sobre la variabilidad observada.

RESULTADOS Y DISCUSION

En los cultivares de *V. faba* empleados, todos los órganos mostraron actividad NR cuando se utilizó un ensayo *in vivo* +NO₃⁻ (Tabla 1). El nivel de actividad y su respuesta al aporte de nitrato varió ampliamente entre cultivares y órganos. Las diferencias observadas se deben fundamentalmente al efecto del genotipo en hoja (74%), peciolo (64%), tallo (58%) y nódulo (80%). Sin embargo, en el caso de la raíz el efecto del tratamiento es más claro, siendo responsable del 73% de la variabilidad encontrada. En cuanto a la respuesta de la actividad frente al nitrato, en nódulos fué diferente a la del resto de órganos estudiados: salvo en VFM72 y VFM109, cultivares con muy baja actividad NR nodular, la actividad disminuye al aumentar la concentración de NO₃⁻, siendo la inhibición por lo general mayor de un 50% en 8 mM (respecto a 2 mM) en todos los cultivares y alcanzando más de un 80% en HA-200. Sin embargo, en los demás órganos 4 mM NO₃⁻ incrementó los niveles de actividad detectados, siendo la respuesta ante 8 mM diferente según el órgano y cultivar considerado.

En el caso de la actividad real (ensayo *in vivo* - NO₃⁻, Tabla 2), las fuentes de variación invierten su orden de importancia en los órganos

aéreos, siendo el tratamiento el que presenta un mayor efecto, fundamentalmente en peciolo y tallo, donde no baja del 80%. En raíz y nódulos mantienen su influencia el tratamiento y el genotipo, respectivamente. En este ensayo, y cuando se suministró a las plantas 2 mM de NO₃⁻, la actividad sólo fue detectada en raíz y en los nódulos de cinco de los ocho cultivares ensayados; en los otros tres, VFM72, VFM109 y Alameda, tampoco fue detectada en los dos tratamientos restantes. Al igual que en nódulo, en dos cultivares, Alameda y Alborea, la actividad no pudo ser detectada en hoja con ninguno de los tratamientos.

De los resultados obtenidos cabe destacar que en los nódulos de los cultivares VFM72 y VFM109 no pudo detectarse actividad nitrato reductasa real en ninguno de los tres tratamientos, mientras que en la actividad potencial sólo se apreciaron pequeñas tasas en VFM72. Estos mismos cultivares fueron también los que presentaron por término medio mayores valores de actividad radical (tanto potencial como real) y de los más bajos en los órganos aéreos.

La nitrato reductasa es considerada como el enzima clave en la asimilación del nitrato por la planta

TABLA 1

Actividad nitrato reductasa, ensayo in vivo + NO₃⁻ expresada en μmol NO₂⁻ g⁻¹ PF h⁻¹, en hoja, peciolo, tallo, raíz y nódulos de los 8 cultivares de Vicia faba empleados y para los tres tratamientos ensayados.

CULTIVARES								
Tto.	VFM 31	VFM132	VFM 22	VFM 72	VFM109	HA200	ALAMEDA	ALBOREA
<i>Hoja</i>								
2 mM	1.40	1.10	3.69	0.82	0.23	2.46	0.22	0.42
4 mM	2.07	1.65	4.02	1.55	0.66	2.50	0.59	2.00
8 mM	2.92	2.78	3.56	1.14	0.42	1.55	1.67	0.73
M. D. S. (0.05)	0.12							
<i>Peciolo</i>								
2 mM	0.42	0.70	1.34	0.13	0.05	0.73	0.10	0.17
4 mM	0.71	0.77	1.61	0.45	0.57	0.66	0.27	0.61
8 mM	0.85	0.73	1.61	0.71	0.46	0.63	0.75	0.47
M. D. S. (0.05)	0.07							
<i>Tallo</i>								
2 mM	0.34	0.30	0.80	0.08	0.03	0.38	0.05	0.09
4 mM	0.45	0.47	1.00	0.27	0.28	0.29	0.16	0.11
8 mM	0.44	0.75	0.84	0.52	0.37	0.34	0.44	0.21
M. D. S. (0.05)	0.06							
<i>Raíz</i>								
2 mM	0.42	0.47	0.51	0.67	0.46	0.44	0.23	0.13
4 mM	0.50	0.89	0.62	1.20	1.03	0.32	0.34	0.50
8 mM	0.55	0.78	0.77	1.25	0.94	0.54	0.51	0.62
M. D. S. (0.05)	0.11							
<i>Nódulos</i>								
2 mM	0.80	1.95	1.15	0.31	0.06	1.49	1.10	1.60
4 mM	0.75	1.14	0.66	0.31	0.05	0.78	0.66	0.69
8 mM	0.38	0.63	0.39	0.25	0.05	0.26	0.48	0.57
M. D. S. (0.05)	0.09							

TABLA 2

Actividad nitrato reductasa, ensayo in vivo - NO₃⁻, expresada en μmol NO₂⁻ g⁻¹ PF h⁻¹, en hoja, peciolo, tallo, raíz y nódulos de los 8 cultivares de Vicia faba empleados y para los tres tratamientos ensayados. N. D.: No detectada.

CULTIVARES								
Tto.	VFM 31	VFM132	VFM 22	VFM 72	VFM109	HA200	ALAMEDA	ALBOREA
<i>Hoja</i>								
2 mM	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.				
4 mM	N. D.	0.26	0.19	N. D.	0.11	0.21	N. D.	N. D.
8 mM	0.09	0.66	0.16	0.14	N. D.	0.11	N. D.	N. D.
M. D. S. (0.05)	0.03							
<i>Peciolo</i>								
2 mM	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.				
4 mM	0.22	0.57	0.37	0.09	0.27	0.10	N. D.	0.05
8 mM	0.47	0.58	0.58	0.47	0.29	0.29	0.19	0.18
M. D. S. (0.05)	0.05							
<i>Tallo</i>								
2 mM	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.				
4 mM	0.20	0.33	0.38	0.11	0.11	0.13	N. D.	N. D.
8 mM	0.30	0.51	0.56	0.31	0.22	0.16	0.15	0.10
M. D. S. (0.05)	0.04							
<i>Raíz</i>								
2 mM	0.33	0.33	0.35	0.37	0.36	0.14	0.13	0.04
4 mM	0.45	0.50	0.58	0.70	0.78	0.21	0.23	0.13
8 mM	0.64	0.74	0.63	1.17	0.94	0.51	0.41	0.62
M. D. S. (0.05)	0.10							
<i>Nódulos</i>								
2 mM	0.15	0.18	0.13	N. D.	N. D.	0.06	N. D.	0.02
4 mM	0.28	0.21	0.13	N. D.	N. D.	0.07	N. D.	0.02
8 mM	0.25	0.17	0.12	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	0.14
M. D. S. (0.05)	0.02							

TABLA 3

Contenido en nitrato, expresado en $\mu\text{mol NO}_3^- \text{g}^{-1} \text{PF}$, en hoja, peciolo, tallo, raíz y nódulos de los 8 cultivares de *Vicia faba* empleados y para los tres tratamientos ensayados.

CULTIVARES								
Tto.	VFM 31	VFM132	VFM 22	VFM 72	VFM109	HA200	ALAMEDA	ALBOREA
<i>Hoja</i>								
2 mM	6.06	5.37	3.90	5.83	6.02	6.12	7.39	10.32
4 mM	5.01	5.83	3.66	5.22	5.22	6.67	6.28	8.49
8 mM	6.10	5.91	4.57	6.03	5.70	7.10	7.98	10.32
M. D. S. (0.05)	0.41							
<i>Peciolo</i>								
2 mM	5.15	4.61	2.40	3.90	3.15	3.02	2.82	3.45
4 mM	5.31	13.28	6.34	3.95	5.01	3.36	2.98	3.00
8 mM	3.91	8.54	15.98	7.20	6.36	3.76	3.58	3.38
M. D. S. (0.05)	0.45							
<i>Tallo</i>								
2 mM	3.69	7.81	2.20	2.76	3.98	2.92	2.21	2.40
4 mM	4.75	6.12	5.77	2.82	4.72	3.02	3.23	2.82
8 mM	3.77	8.68	11.76	4.11	3.55	3.59	3.32	2.94
M. D. S. (0.05)	0.52							
<i>Raíz</i>								
2 mM	3.59	4.13	4.16	4.49	6.47	4.14	4.25	2.80
4 mM	7.65	7.83	7.08	6.17	10.70	6.87	5.45	6.26
8 mM	15.86	18.39	17.08	16.27	15.44	6.45	5.85	5.82
M. D. S. (0.05)	0.91							
<i>Nódulos</i>								
2 mM	3.67	2.80	5.95	2.42	4.74	7.38	3.77	3.68
4 mM	4.24	2.94	6.33	2.56	5.87	10.31	6.27	8.18
8 mM	7.18	5.79	6.88	4.39	6.60	10.74	5.65	8.52
M. D. S. (0.05)	0.41							

(Bray, 1983). En leguminosas, la existencia de una nitrato reductasa nodular está bien documentada (Manhart y Wong, 1980; Ligeró *et al.*, 1987a, b; Giannakis *et al.*, 1988), aunque su significado fisiológico no está claro. Se cree que posee un potencial sustancial de contribución a la economía del nitrógeno de la planta (Ohyama y Kumazawa, 1979), y en este estudio se comprueba que la contribución del nódulo a la reducción de nitratos en la planta puede llegar hasta un 16% del total en determinados casos.

De los resultados de actividad (Tablas 1 y 2) y de acumulación de materia fresca por órgano, se deduce que las hojas son el órgano con mayor capacidad potencial para reducir los nitratos. Sin embargo, la contribución real de la raíz, sobre todo, e incluso del tallo, puede ser más importante, dependiendo del cultivar y tratamiento considerado.

En lo que se refiere a la acumulación de nitratos en los diferentes órganos, hay que señalar que la concentración de este ión en raíz (Tabla 3) es mayor que en nódulos para todos los mutantes, siendo también en las raíces de estos cultivares donde se aprecia un efecto más acentuado de la dosis de nitrógeno combinado sobre la acumulación de nitratos. Sin embargo, en las variedades comerciales la concentración de nitrato es menor en raíz que en los nódulos. Podría ocurrir en este caso que el nitrato esté siendo transportado por las raíces, y que potencialmente pueda alcanzar los nódulos. En raíces de soja y cowpea ha sido demostrada esta vía de transporte de los nitratos (Sprent *et al.*, 1987). En general, los cultivares comerciales

presentan mayor concentración de NO_3^- que los mutantes en hoja y nódulos, mientras que el patrón se invierte en raíz, tallo y peciolo.

Las diferencias entre la actividad nitrato reductasa potencial y real son en raíz más pequeñas que en el resto de órganos analizados. Esto es debido a que en raíz el nitrato no es limitante, encontrándose en este órgano las máximas concentraciones. Por otra parte, entre cultivares no se aprecia relación entre la concentración de NO_3^- y la actividad NR en los distintos órganos.

Como ya se ha puesto de manifiesto anteriormente, la raíz de los distintos cultivares presenta una capacidad real para reducir los nitratos bastante apreciable, pudiendo representar hasta un 50% de la actividad total de la planta. Esto, y la elevada concentración de nitrato en las raíces es característico de leguminosas de origen templado (e.g. tribu *Vicieae*) frente a las de origen tropical (e.g. tribu *Phaseolae*), que presentan mayor concentración de NO_3^- y mayor proporción de actividad NR en parte aérea (Wallace, 1986).

A partir de los datos de acumulación de nitrógeno (Tabla 4) y teniendo en cuenta la duración del período vegetativo (y por tanto de cultivo) de los distintos cultivares (Tabla 5), se calcularon las tasas medias de acumulación de N. Según estos valores se pueden establecer 3 grupos: VFM72 y VFM109 son, con diferencia, los más efectivos en la adquisición de nitrógeno (4.68 y 4.78 mg N planta⁻¹ día⁻¹, respectivamente); Alameda y VFM31 presentan tasas intermedias y por último, VFM132, VFM22, HA-200 y Alborea presentan tasas entre 3.33 y 2.73 mg N

TABLA 4

Contenido en N reducido (mg N planta⁻¹) y tasa media de adquisición de N (mg N planta⁻¹ día⁻¹) de los distintos cultivares de Vicia faba empleados y para los tres tratamientos ensayados.

CULTIVAR	2 mM	4 mM	8 mM	TASA MEDIA
VFM31	86	104	93	3.77
VFM132	75	90	93	3.19
VFM22	87	105	90	2.85
VFM72	146	167	164	4.68
VFM109	172	182	191	4.78
HA-200	95	96	120	2.73
ALAMEDA	166	175	153	3.83
ALBOREA	126	185	149	3.33
M. D. S. (0.05)		6.38		

TABLA 5

Datos de crecimiento (gramos de materia seca por planta), duración del período vegetativo (días) y tasa media de crecimiento (mg PS planta⁻¹ día⁻¹) de los ocho cultivares de Vicia faba ensayados.

CULTIVAR	PESO SECO			FLORACION	TASA MEDIA
	2 mM	4 mM	8 mM		
VFM31	2.34	2.49	2.71	25	100
VFM132	3.23	3.04	3.01	27	115
VFM22	2.54	2.66	2.22	33	75
VFM72	3.87	4.12	3.96	34	117
VFM109	4.43	4.81	4.97	38	125
HA-200	3.33	2.80	3.20	38	82
Alameda	4.71	4.73	4.13	43	105
Alborea	5.45	5.20	5.01	46	113
M. D. S. (0.05)			0.38		

planta⁻¹ día⁻¹. Esta mayor eficiencia de VFM72 y VFM109 en la adquisición de nitrógeno les va a permitir mantener mayores tasas medias de acumulación de materia seca (Tabla 5). Los cultivares VFM72 y VFM109 son los que presentan una menor actividad NR en nódulos y parte aérea, siendo en cambio los que presentan una mayor reducción de nitrato en raíz. Por otra parte, en un estudio previo (Lluch *et al.*, 1988) se comprobó que los nódulos de estos cultivares presentan elevadas tasa de asimilación de amonio (medidas como niveles de actividad glutamina sintetasa y glutamato sintetasa). Además, estas actividades no

fueron inhibidas por el nitrato, como sucedió en el resto de cultivares. Por todo ello se puede decir que la mayor parte del nitrógeno acumulado por estos cultivares procede de la fijación biológica en sus nódulos, y que, por tanto, son los más eficientes desde el punto de vista simbiótico. Estos resultados apoyan la idea de que las leguminosas eficientes en la utilización de nitrógeno combinado dan lugar a simbiosis menos eficaces (Hungria y Neves, 1987) y manifiesta la gran importancia que tiene la selección de la planta para conseguir mejores rendimientos del sistema simbiótico (Wallace, 1986).

CONCLUSIONES

Al abordar el metabolismo del nitrato en diversos órganos de plantas de *V. faba* inoculadas con *R. leguminosarum* utilizando un amplio rango de cultivares se evidencia que la acumulación de materia seca (mg PS planta⁻¹ día⁻¹) se correlaciona positivamente con la actividad NR a nivel de raíz y negativamente con la de los nódulos. Destacan los cultivares VFM72 y VFM109, con muy baja reducción de nitratos en nódulos, alta NR radical y elevadas tasas de acumulación de nitrógeno y materia seca. En general, 4 mM de NO₃⁻ en el medio de cultivo benefi-

cia la acción complementaria de los procesos de adquisición de nitrógeno en estas plantas. Se puede asumir que en *V. faba*, leguminosa de zona templada, la raíz es el lugar más importante en la asimilación del nitrato.

AGRADECIMIENTOS

Queremos dar las gracias al Dr. Antonio Martín por suministrarnos los genotipos VFM de *Vicia faba*. Este trabajo ha sido financiado por la DGICYT (Proyecto número PB 87-0869).

BIBLIOGRAFIA

- BRAY, C. M., 1983. Nitrogen Metabolism in Plants. Longman Inc., New York.
- CABRERA, A. and MARTIN, A., 1986. Variations in tanins content in *Vicia faba* L. J. Agric. Sci. Cambridge, 106: 377-382.
- CRAFTS-BRANDNER, S. J. and HARPER, J. E., 1982. Nitrate reduction by roots of soybean (*Glycine max* L. Merr) seedlings. Plant Physiol., 69: 1298-1303.
- EAGLESHAM, A. R., J. HASSOUNA, S. and SEEGER, R., 1983. Fertilizer-N effect on N₂ fixation by cowpea and soybean. Agron. J., 75: 61-66.
- EVANS, J., 1982. Symbiosis, nitrogen and dry mater distribution in chickpea (*Cicer arietinum*). Expl. Agron., 18: 339-351.
- GIANNAKIS, C., NICHOLAS, D. J. D. and Wallace, W., 1988. Utilization of nitrate by bacteroids of *Bradyrhizobium japonicum* in the soybean root nodule. Planta, 174: 51-58.
- HAGEMAN, R. H. and HUCKLESBY, D. P., 1971. Nitrate reductase from higher plants. Methods Enzymol., 23: 491-503.
- HERVAS, A., 1988. Selección de razas de *Rhizobium leguminosarum* y su tolerancia al nitrógeno combinado en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- HUNGRIA, M. and NEVES, M. C. P., 1987. Partitioning of nitrogen from biological fixation and fertilizer in *Phaseolus vulgaris*. Physiol. Plant., 69: 55-63.
- LIGERO, F., LLUCH, C., OLIVARES, J. and BEDMAR, E. J., 1987a. Nitrate reductase activity in nodules of pea inoculated with hydrogenase positive and hydrogenase negative strains of *Rhizobium leguminosarum*. Physiol. Plant., 69: 313-316.
- LIGERO, F., LLUCH, C., HERVAS, A., OLIVARES, J. and BEDMAR, E. J., 1987b. Effect of nodulation on the expression of nitrate reductase activity in pea cultivars. New Phytol., 107: 53-61.
- LLUCH, C., CABA, J. M., HERVAS, A. and LIGERO, F., 1988. Effect of nitrate and cultivar genotype on nitrogen metabolism in nodules of *Vicia faba* L. In: Proceedings of the 7th International Congress on Nitrogen Fixation. Colonia, Eds. H. Bothe, F. J. de Bruijn y W. E. Newton, 542. Gustav Fischer, Stuttgart, New York.
- MANHART, J. R. and WONG, P. P., 1980. Nitrate effect on nitrogen fixation (acetylene reduction). Activities of legume root nodules induced by rhizobia with varied nitrate reductase activities. Plant Physiol., 65: 502-505.
- MORRIS, D. R. and WEAVER, R. M., 1983. Movilization of ¹⁵N from soybean leaves as influenced by rhizobial strains. Crop Sci., 23: 1111-1114.
- OHYAMA, T. and KUMAZAWA, K., 1979. Assimilation and transport of nitrogenous compounds originated from ¹⁵N₂ fixation and ¹⁵NO₃⁻ absorption. Soil Sci. Plant Nutr., 25: 4-19.
- PATE, J. S. and HERRIDGE, D. F., 1978. Partitioning and utilization of photosynthate in a nodulated annual legume. J. Exp. Bot., 29: 401-412.
- RIGAUD, J. and PUPPO, A., 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. J. Gen. Microbiol., 88: 223-228.
- RUSCHEL, A. P., VOSE, P. B., MATSUI, E., VICTORIA, R. L. and SAITO, S. M. T., 1982. Field evaluation of N₂-fixation and nitrogen utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by ¹⁵N isotope dilution. Plant Soil, 65: 397-407.
- SOARES, M. I. M., LIPS, S. H. and CRESSWELL, C. F., 1985. Regulation of nitrate and nitrite reduction in barley leaves. Physiol. Plant., 64: 492-500.

- SPRENT, J. I., GIANNAKIS, C. and WALLACE, W., 1987. Transport of nitrate and calcium into legume root nodules. *J. Exp. Bot.*, 38: 1121-1128.
- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1976. APHA-AWWA-WPCF, 14th Edition.
- WALLACE, W., 1986. Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and a comparison with wheat. *Physiol. Plant.*, 66: 630-636.

Recibido: 13-6-90.

Aceptado: 9-1-91.