

EFFECT OF INTEGRATED APPLICATION OF SULPHUR AND PHOSPHORUS ON NITROGEN FIXATION AND NUTRIENT UPTAKE BY CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.)

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE AZUFRE-FÓSFORO SOBRE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y LA CAPTACIÓN DE NUTRIENTES EN GARBANZO (*Cicer arietinum* L.)

Muhammad **Islam***, Safdar **Ali**

Department of Soil Science & SWC, PMAS- Arid Agriculture University, Rawalpindi-46300
Pakistan. (islamuaif@gmail.com)

ABSTRACT

Nitrogen fixing capability of legumes can be enhanced by the supply of adequate amounts of nutrients, especially phosphorus (P) and sulphur (S). However, combined application of P and S may have synergistic or antagonistic effects on crop yield, depending upon initial fertility status of soil, level of nutrients applied and test crop used. Field experiments were conducted at two different locations (Barani Agriculture Research Institute, Chakwal, and farmer's field, Talagang) in northern rainfed Punjab, Pakistan, to assess nodulation, nitrogen fixation and nutrient uptake by chickpea (*Cicer arietinum* L.) in response to application of P (0, 40 and 80 kg ha⁻¹) and of S (0, 15 and 30 kg ha⁻¹) in different combinations. Application of P and S significantly increased seed yield (27 to 41 % and 7 to 11 %) over control. Sulphur application increased N derived from air (% N_{dfa}) by 5 to 7 % over control; however, P application had no significant effect on N_{dfa}. Both P and S application increased N fixation (16 to 40 % and 15 to 22 %) over control. Nutrient uptake (N, P and S) increased significantly with the application of both P and S. There was a weak correlation between P uptake and % N_{dfa} (R=0.28*) but a positive correlation between S uptake and % N_{dfa} (R=0.76**). Phosphorus (R=0.56**) and sulphur (R=0.97**) uptake correlated positively with N fixation.

Key words: Legume, mineral nutrition, natural abundance technique, nitrogen derived from air.

RESUMEN

La capacidad de las leguminosas para asimilar el nitrógeno puede incrementarse si se suministran cantidades adecuadas de nutrientes, específicamente fósforo (P) y azufre (S). Sin embargo, la aplicación combinada de P y S puede tener efectos sinérgicos o antagonísticos en el rendimiento del cultivo, dependiendo del estatus inicial de fertilidad del suelo, del nivel de nutrientes suministrados, así como del cultivo de prueba utilizado. Los experimentos de campo se realizaron en dos áreas (Barani Research Institute, Chakwal, y el campo agrícola de Talagang) de secano en el norte de Punjab, Pakistán, para evaluar nodulación, fijación de nitrógeno (N) y captación de nutrientes en el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en respuesta a la aplicación de P (0, 40 y 80 kg ha⁻¹) y de S (0, 15 y 30 kg ha⁻¹) en distintas combinaciones. La aplicación de P y S incrementó significativamente el rendimiento de semilla (27 % a 41 % y 7 % a 11 %) respecto al testigo. La aplicación de S aumentó el N derivado del aire (% N_{dfa}) en 5 % respecto al testigo; sin embargo la aplicación de P no tuvo un efecto significativo en N_{dfa}. La aplicación tanto de P como de S incrementó la fijación de N (16 % a 40 % y 15 % a 22 %) respecto al testigo. La captación de nutrientes (N, P y S) aumentó significativamente con la aplicación tanto de P como de S. Hubo una ligera correlación entre la captación de P y % N_{dfa} (R = 0.28*), y una correlación positiva entre la captación de S y % N_{dfa} (R=0.76**). La captación tanto de P (R=0.56**) como de S (R=0.97**) se correlacionó positivamente con la fijación de N.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Julio, 2008. Aprobado: Julio, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 43: 815-826. 2009.

Palabras clave: Leguminosas, nutrición mineral, método de abundancia natural, nitrógeno derivado del aire.

INTRODUCTION

Chickpea is the second most important pulse crop in the world, grown in at least 33 countries. Chickpea was grown on 1046 000 ha in Pakistan during 2007-08, with a production of 823 000 Mg (Economic Survey, 2008). Average yield was 787 kg ha⁻¹ which is very low as compared to the USA (1391 kg ha⁻¹), Canada (1427 kg ha⁻¹) and China (4135 kg ha⁻¹) (FAO, 2006). This low yield of the crop in Pakistan is primarily due to genetic, agronomic and economic factors. From an agronomic point of view, nutritional deficiency is likely to depress its nitrogen-fixing role and may in turn limit crop yield.

An adequate supply of mineral nutrients to legumes enhances nitrogen fixation (Ganeshamurthy and Reddy, 2000). For example, starter N stimulated early seedling growth and nodulation (Daramola *et al.*, 1982); P and sulphur improve nodulation activity (Olivera *et al.*, 2004; Scherer *et al.*, 2008). Sulphur deficiency decreases the concentration of N in the shoots of many legumes (Claro-Cortes *et al.*, 2002). Whether this is due to a direct effect on symbiotic N fixation or an effect on the host plants is not very clear. In pot experiments with different legumes, Scherer and Lange (1996) found a lower N accumulation and a yield reduction when S was limiting. Therefore, S affects leguminous plant species growth through its effect upon N fixation (Varin *et al.*, 2009). With S deficiency, amino acids and other N forms accumulate due to a lack of proteins synthesis which may have a feed-back repression on N fixation (Ahmad and Abedin, 2000). Furthermore, S deficiency may affect N fixation because of the relatively high S content of the nitrogenase (Mortenson and Thornley, 1979) and of ferredoxin (Fukuyama, 2004). It may be speculated that the synthesis of photosynthates is limited under S deficiency conditions, resulting in a reduced N₂ fixation (Scherer *et al.*, 2006).

Under semiarid conditions of Ethiopia, an increase by 53 % and 95 % relative to control has been reported for nodule number and nodule fresh weight with application of 30 kg S ha⁻¹ using faba bean (*Vicia faba* L.) as test crop in a S deficient soil, whereas S application enhanced N_{dft} from 55 % to 72% and N fixation from 49 to 100 kg N ha⁻¹ (Habtemichial *et al.*, 2007). In England, three-fold

INTRODUCCIÓN

El garbanzo ocupa el segundo lugar entre las legumbres con vaina en el mundo, cultivándose en al menos 33 países. En Pakistán, en 2007-2008, se cultivaron 1046 000 ha, con una producción de 823 000 Mg (Economic Survey, 2008). El rendimiento promedio fue 787 kg ha⁻¹, el cual es muy bajo si se compara con EE. UU. (1391 kg ha⁻¹), Canadá (1427 kg ha⁻¹) y China (4135 kg ha⁻¹) (FAO, 2006). En Pakistán el bajo rendimiento de este cultivo se debe fundamentalmente a factores genéticos, agronómicos y económicos. Desde un punto de vista agronómico, la deficiencia nutricional es proclive a reducir su desempeño como fijador de nitrógeno y puede, a su vez, limitar el rendimiento del cultivo.

Un suministro adecuado de nutrientes minerales en las leguminosas incrementa la fijación de nitrógeno (Ganeshamurthy y Reddy, 2000). Por ejemplo, el N de inicio estimuló el crecimiento temprano de plántulas y la nodulación (Daramola *et al.*, 1982). el fósforo y el azufre mejoraron la actividad nodular (Olivera *et al.*, 2004; Scherer *et al.*, 2008). La deficiencia de S disminuye la concentración de N en los brotes de muchas leguminosas (Claro-Cortés *et al.*, 2002). A ciencia cierta no se sabe si esto se debe a un efecto directo en la fijación simbiótica de N o a un efecto en las plantas huéspedes. En ensayos en macetas con distintas leguminosas, Scherer y Lange (1996) observaron una menor acumulación de N y una reducción del rendimiento cuando el S era limitante. Por tanto, S afecta el crecimiento de las especies de plantas leguminosas mediante su efecto sobre la fijación de N (Varin *et al.*, 2009). Con la deficiencia de S, los aminoácidos y otras formas de N se acumulan debido a una falta de síntesis de proteínas que puede ocasionar una inhibición por acción en la fijación de N (Ahmad y Abedin, 2000). Además, la deficiencia de S puede afectar la fijación de N debido al contenido relativamente alto de S de la nitrogenasa (Mortenson y Thornley, 1979) y la ferredoxina (Fukuyama, 2004). Se puede especular que la síntesis de fotosintatos se reduce en condiciones de deficiencia de S, ocasionando una fijación reducida de N₂ (Scherer *et al.*, 2006).

En Etiopía, en condiciones semiáridas, hubo un incremento de 53 % y 95 %, relativo al testigo, en el número de nódulos y el peso fresco de los nódulos con la aplicación de 30 kg S ha⁻¹, usando a la haba

increases in nodule weight and two-fold increases in N_2 fixation have been recorded in pot experiments on peas (*Pisum sativum* L.) (Scherer *et al.*, 2006).

In many soil types especially calcareous soils, P is the most limiting nutrient for the production of crops (Jiang *et al.*, 2006). As nitrogen fixing plants, legumes require P for adequate growth and nodulation (Tang *et al.*, 2001a). The influence of phosphorous on symbiotic nitrogen fixation in legumes has received considerable attention, but its role in the process remains unclear (Tsvertkova and Georgiev, 2003). Somado *et al.* (2006) applied 90 kg P_2O_5 ha⁻¹ and recorded four-fold increases in N uptake of *Crotalaria micans*; they concluded that P application increased total N accumulated rather than % N_{dfa} .

Nutrient requirement of the crops depends upon many factors and balance between different nutrients is of great importance, since there may be synergistic or antagonistic effects of one nutrient on the other. Application of S increased N uptake in chickpea by 44.26 %, in black gram by 41.99 %, in linseed by 10.50 % and in wheat by 37.55 % (Dwivedi *et al.*, 1996). Increase in P uptake has been observed with application of S containing fertilizers (Goos and Johnson, 2001; Togay *et al.*, 2008).

In Pakistan, research on crop response to S application has been limited to oilseeds and their oil contents only. Research work regarding integrated use of P and S and their role in legume N fixation and nutrient uptake is very scarce. Therefore, the present study was conducted to assess the interactive effect of S and P application on nitrogen fixation and nutrient uptake by chickpea crop under rainfed conditions of Pothwar Plateau, Pakistan.

MATERIALS AND MEHTODS

Field experiments were conducted with chickpea at Barani Agriculture Research Institute (BARI), Chakwal (sandy loam, pH 7.6, AB-DTPA extractable P 3.0 mg kg⁻¹, CaCl₂ extractable SO_4 -S 6.4 mg kg⁻¹) 32.5° N, 72.4° E; and farmer's field, Talagang (loamy sand, pH 7.7, AB-DTPA extractable P 1.4 mg kg⁻¹, CaCl₂ extractable SO_4 -S 7.5 mg kg⁻¹) 32.5° N, 72.2° E, during the crop cycle 2006-07. The trial was carried out according to split plot arrangement in randomized complete block design (1.5×3.5 m plot at BARI, Chakwal; and 1.8×4 m farmer's field, Talagang) with P rates in main plots and S rates in subplots. There were nine treatments with combinations of P (0, 40, 80 kg ha⁻¹) and S rates

(*Vicia faba* L.) como testigo en un suelo deficiente en S, mientras que la aplicación de S aumentó el N_{dfa} de 55 % a 72 % y la fijación de N de 49 a 100 kg N ha⁻¹ (Habtemichial *et al.*, 2007). En Inglaterra, en ensayos efectuados en macetas con arveja (guisante) (*Pisum sativum* L.), el peso de los nódulos registró un incremento triple y la fijación de N_2 se duplicó (Scherer *et al.*, 2006).

En muchos tipos de suelo, específicamente en los calcáreos, P es el nutriente que más limita la producción de cultivos (Jiang *et al.*, 2006). Al ser plantas fijadoras de nitrógeno, las leguminosas requieren P para un adecuado crecimiento y nodulación (Tang *et al.*, 2001a). La influencia del P en la fijación simbiótica de N en las leguminosas ha recibido gran atención, pero su desempeño en el proceso todavía es poco claro (Tsvertkova y Georgiev, 2003). Somado *et al.* (2006) aplicaron 90 kg P_2O_5 ha⁻¹ y registraron incrementos cuádruples en la captación de N en *Crotalaria micans*; ellos concluyen que la aplicación de P incrementó el N total acumulado más que el % N_{dfa} .

Los requerimientos nutricionales de los cultivos dependen de muchos factores y el balance entre los diferentes nutrientes es de gran importancia dado que un nutriente puede provocar efectos sinérgicos o antagónicos sobre otro. La aplicación de S aumentó 44.26 % la captación de N en garbanzo, 41.99 % en judía negra, 10.50 % en linaza, y 37.55 % en trigo (Dwivedi *et al.*, 1996). La captación de P aumenta cuando se aplican fertilizantes que contienen azufre (Goos y Johnson, 2001; Togay *et al.*, 2008).

En Pakistán, el estudio de la respuesta del cultivo a la aplicación de S se ha limitado sólo a las oleaginosas y a su contenido de aceite. El trabajo de investigación relativo al uso integrado de P y S, así como a su desempeño en la fijación de N en las leguminosas y en la captación de nutrientes es muy escaso. Por tanto, el presente estudio se realizó para evaluar el efecto interactivo de la aplicación de S y P en la fijación de nitrógeno y la captación de nutrientes en el garbanzo cultivado en condiciones de secano en Pothwar Plateau, Pakistán.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos de campo se hicieron con garbanzo en BARI (Barani Agriculture Research Institute), Chakwal (suelo franco arenoso, pH 7.6, AB-DTPA extraíble P 3.0 mg kg⁻¹, CaCl₂ extraíble SO_4 -S 6.4 mg kg⁻¹) 32.5° N, 72° E; y el campo

(0, 15, 30 kg ha⁻¹). Starter dose of N (26 kg ha⁻¹) was applied as urea. Phosphorus was applied as triple super phosphate (TSP) and S as gypsum. All the treatments were replicated three times. Chickpea crop was sown in mid October, maintaining 30 cm row to row distance. All the fertilizers were applied at the time of sowing. Crop was grown under rainfed conditions and no irrigation water was applied. Rainfall data were recorded for both locations (Figure 1). Harvesting was done in the first week of May. Crop from a 1 m² area in the middle of each plot was harvested separately and data were recorded for seed yield after threshing. Representative samples of 100 g for both straw and grain separately were collected from bulk sample, oven dried, ground and analyzed for N and P (Ryan *et al.*, 2001) and S (Verma *et al.*, 1977). Titrate obtained from N determination was concentrated and used for $\delta^{15}\text{N}$ measurement by mass spectrometer (Peoples *et al.*, 1989):

$$\% N_{\text{dfa}} = 100 \times (\delta^{15}\text{N (soil N)} - \delta^{15}\text{N legume N}) / (\delta^{15}\text{N (soil N)} - \text{B})$$

where $\delta^{15}\text{N}$ (soil N) is commonly obtained from a non N fixing reference plant grown in the same soil as the legume; B is the $\delta^{15}\text{N}$ of the same N fixing plant when grown with N as the sole source of N and its value is -2.5 (Shah *et al.*, 1997).

Legume kg N ha⁻¹ = legume total biomass kg ha⁻¹ × % N in plant

$$\text{kg N fixed ha}^{-1} = \text{legume kg N ha}^{-1} \times \% N_{\text{dfa}} \times 1.5^*$$

*1.5 factor was used to include an estimate for contribution by underground N (Peoples *et al.*, 1989).

Data on all observations were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the software MSTATC. Treatment means were compared by orthogonal contrasts.

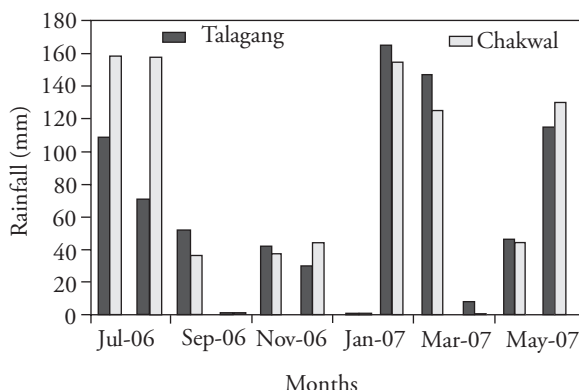


Figure 1. Monthly rainfall at two locations during the crop cycle 2007.

Figura 1. Precipitación pluvial mensual en dos localidades durante el ciclo de cultivo 2007.

agrícola, Talagang (arena franca, pH 7.7, AB-DTPA extraíble P 1.4 mg kg⁻¹, CaCl₂ extraíble SO₄-S 7.5 mg kg⁻¹) 32.5° N, 72.2° E, durante el ciclo de cultivo 2006-07. Se usó un arreglo de parcelas divididas dispuestas en un diseño de bloques al azar (parcela de 1.5 × 3.5 m en BARI, Chakwal; y campo agrícola, de 1.8 × 4 m en Talang) con las tasas de P en las parcelas principales y las tasas de S en las subparcelas. Hubo nueve tratamientos con combinaciones de tasas de P (0, 40, 80 kg ha⁻¹) y S (0, 15, 30 kg ha⁻¹). La dosis inicial de N (26 kg ha⁻¹) se aplicó en forma de urea. El P se aplicó como superfosfato triple (TSP) y el S como yeso. Todos los tratamientos se replicaron tres veces. El garbanzo se sembró a mediados de octubre, conservando una distancia entre hileras de 30 cm. Todos los fertilizantes se aplicaron al momento de la siembra. El cultivo fue condiciones de secano y no se aplicó riego. Se registraron los datos de precipitación de ambos sitios (Figura 1). La cosecha se realizó durante la primera semana de Mayo. El cultivo de un área de 1 m² en el centro de cada parcela se cosechó por separado y los datos se registraron para conocer el rendimiento de semilla después del trillado. De una muestra compuesta se recolectaron por separado muestras representativas de 100 g de paja y de grano, secados en el horno, molidos y analizados para N y P (Ryan *et al.*, 2001) y S (Verma *et al.*, 1977). La titulación obtenida de la determinación de N se concentró y usó para medir $\delta^{15}\text{N}$ por espectrometría de masas (Peoples *et al.*, 1989):

$$\% N_{\text{dfa}} = 100 \times (\delta^{15}\text{N (soil N)} - \delta^{15}\text{N legume N}) / (\delta^{15}\text{N (soil N)} - \text{B})$$

donde $\delta^{15}\text{N}$ (N del suelo) se obtiene generalmente de una planta de referencia no fijadora de N cultivada en el mismo suelo que la leguminosa; B es el $\delta^{15}\text{N}$ de la misma planta fijadora de N cuando se cultiva con N como la única fuente de N y su valor es -2.5 (Sah *et al.*, 1997).

Leguminosa kg N ha⁻¹ = biomasa total de la leguminosa kg ha⁻¹ × % N en la planta

$$\text{kg N fijado ha}^{-1} = \text{leguminosa kg N ha}^{-1} \times \% N_{\text{dfa}} \times 1.5^*$$

*se usó el factor 1.5 para incluir una estimación de la contribución de N subterráneo (Peoples *et al.*, 1989).

Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) con los datos de todas las observaciones usando el programa MSTATC. Las medias de los tratamientos se compararon mediante contrastes ortogonales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de semilla

Hubo una interacción significativa entre P y S sobre el rendimiento de semilla en Chakwal, pero no

RESULTS AND DISCUSSIONS

Seed yield

There was a significant interaction between P and S on seed yield at Chakwal but not at Talagang (Table 1). Different levels of P and S had significant effect on seed yield at both locations. Contrast of P_0 vs. P_1 and P_2 and P_1 vs. P_2 showed significant differences regarding seed yield being the highest (1380 kg ha^{-1}) in P_2S_2 , less (1368 kg ha^{-1}) in P_2S_1 and least (942 kg ha^{-1}) in P_0S_0 (Tables 2 and 3).

Increase in seed yield due to P application is similar to those found by Aslam *et al.* (2000) and Hayat (2005). Adequate P nutrition enhances many aspects of plant physiology including photosynthesis, flowering, fruiting and maturation (Brady and Weil, 2005). Increase in yield due to S application may be due to the fact that S is related to photosynthesis of plants. Sulphur application increased rate of photosynthesis due to an increment in protein synthesis and maintenance of high chlorophyll content (Ahmad and Abedin, 2000). Similar results of increased seed yield due to application of S were

así en Talagang (Cuadro 1). Los distintos niveles de P y S tuvieron un efecto significativo sobre el rendimiento de semilla en ambos sitios. El contraste de hipótesis de P_0 vs. P_1 y P_2 y P_1 vs. P_2 mostró diferencias significativas con respecto al rendimiento de semilla, siendo el más alto (1380 kg ha^{-1}) en P_2S_2 , menor (1368 kg ha^{-1}) en P_2S_1 , y el mínimo (942 kg ha^{-1}) en P_0S_0 (Cuadros 2 y 3).

El incremento en el rendimiento de semilla debido a la aplicación de P es semejante a los observados por Aslam *et al.* (2000) y Hayat (2005). Una adecuada nutrición con P en las plantas mejora muchos de sus aspectos fisiológicos, como fotosíntesis, florecimiento, maduración y fruta (Brady y Weil, 2005). El incremento en el rendimiento por la aplicación de S puede deberse al hecho de que el S está asociado a la fotosíntesis de las plantas. La aplicación de S incrementó la tasa de fotosíntesis debido a un aumento en la síntesis de proteínas y al mantenimiento de un contenido elevado de clorofila (Ahmad y Abedin, 2000). Srinivasarao *et al.* (2004) y Raina y Tanawade (2005) reportan resultados similares respecto al incremento en el rendimiento de semillas por la aplicación de S.

Table 1. Probability values for main and interaction effects of P and S, using analysis of variance.

Tabla 1. Valores de probabilidad para efectos principales e interacciones de P y S, usando análisis de varianza.

Effect	Seed yield (kg ha^{-1})		Nitrogen derived from air		Nitrogen fixed (kg ha^{-1})	
	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang
P levels	≤ 0.001	0.027	0.289	0.190	≤ 0.001	0.011
S levels	≤ 0.001	0.034	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001
P $\times$ S	0.029	0.210	NS	0.440	0.335	0.098

NS: not significant. The *p* values of significant effects that need further means comparison are shown in *italics*.

Table 2. Probability values of orthogonal contrasts for P and S levels.

Tabla 2. Valores de probabilidad de contrastes ortogonales para niveles de P y S.

Effect [†]	Seed yield (kg ha^{-1})		Nitrogen derived from air		Nitrogen fixed (kg ha^{-1})	
	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang
P_0 vs. P_1 and P_2	≤ 0.001	0.017	0.138	NS	≤ 0.001	0.010
P_1 vs. P_2	≤ 0.001	0.098	NS	NS	0.006	0.023
S_0 vs. S_1 and S_2	≤ 0.001	0.011	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001
S_1 vs. S_2	0.013	0.084	0.500	0.053	0.939	0.108

NS: not significant. The *p* values of significant effects that need further means comparison are shown in *italics*.

[†] P_0 , P_1 and P_2 stand for application of 0, 40 and $80 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$; and S_0 , S_1 and S_2 for 0, 15 and 30 kg S ha^{-1} .

Table 3. Probability values for two orthogonal contrasts for three levels of P with in each S level, for Chakwal.
Tabla 3. Valores de probabilidad para dos contrastes ortogonales de P en cada nivel de S, para Chakwal.

Effect [†]	Seed yield (kg ha ⁻¹)						
	Probability values			Effect	Means		
	S ₀	S ₁	S ₂		S ₀	S ₁	S ₂
P ₀ vs. P ₁ and P ₂	≤0.001	≤0.001	≤0.001	P ₀	942	978	1014
P ₁ vs. P ₂	0.021	≤0.001	0.007	P ₁	1171	1253	1312
				P ₂	1227	1368	1380

[†]P₀, P₁ and P₂ stand for application of 0, 40 and 80 kg P₂O₅ ha⁻¹; and S₀, S₁ and S₂ for 0, 15 and 30 kg S ha⁻¹.

found by Srinivasarao *et al.* (2004) and Raina and Tanawade (2005).

Nitrogen derived from air (% N_{dfa})

Regarding % N_{dfa}, similar results were recorded at both locations (Table 1). The main effect of P as well as P by S interaction was not significant on % N_{dfa}. Sulphur application (15 and 30 kg ha⁻¹) resulted in significant increase of % N_{dfa} by 5 and 7 % at both locations (Table 4). Comparison of S₀ with S₁ and S₂ exhibited significant difference at both locations (Table 2). Difference between S₁ and S₂ was not significant at Chakwal, but it was significant at Talagang. These results are also confirmed by the correlation analysis as there was positive correlation between % N_{dfa} and S uptake (R = 0.76**), but R value was low (0.28*) between P uptake and % N_{dfa} (Table 9).

Similar results have been reported by Scherer and Lange (1996), Zhao *et al.* (1999) and Scherer *et al.*

Nitrógeno proveniente del aire (% N_{dfa})

Los resultados de % N_{dfa} fueron similares en ambos sitios (Cuadro 1). El principal efecto tanto de P como de la interacción de P y S no fue significativo para % N_{dfa}. La aplicación de S (15 y 30 kg ha⁻¹) resultó en un incremento significativo de % N_{dfa} de 5 % y 7 % en ambos sitios (Cuadro 4). Al comparar S₀ con S₁ hubo una diferencia significativa en ambos sitios (Cuadro 2). La diferencia entre S₁ y S₂ no fue importante en Chakwal, pero sí fue significativa en Talagang. Estos resultados también se confirman mediante el análisis de correlación, ya que hubo una correlación positiva entre % N_{dfa} y captación de S (R=0.76**), pero el valor de R fue bajo (0.28*) entre la captación de P y % N_{dfa} (Cuadro 9).

Scherer y Lange (1996), Zhao *et al.* (1999) y Scherer *et al.* (2006) reportan resultados similares. Cuando hay deficiencia de S los aminoácidos se acumulan y la proteína no puede sintetizarse, lo que puede inhibir la fijación de N (Varin *et al.*, 2009). El

Table 4. Seed yield and nitrogen fixation as a function of P and S levels.
Cuadro 4. Rendimiento de semilla y fijación de nitrógeno en función de los niveles de P y S.

Effect [†]	Seed yield (kg ha ⁻¹)		Nitrogen derived from air (%)		Nitrogen fixed (kg ha ⁻¹)	
	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang
P levels						
P ₀	978	1556	51.6	55.1	43	55
P ₁	1245	1865	52.2	55.3	54	64
P ₂	1325	2152	52.2	56.1	60	77
S levels						
S ₀	1113	1756	50.0	53.4	47	58
S ₁	1200	1899	52.7	55.9	54	67
S ₂	1236	1916	53.2	57.2	56	71

[†]P₀, P₁ and P₂ stand for application of 0, 40 and 80 kg P₂O₅ ha⁻¹; and S₀, S₁ and S₂ for 0, 15 and 30 kg S ha⁻¹.

(2006). With S deficiency amino acids accumulate and protein cannot be synthesized, which may inhibit N fixation (Varin *et al.*, 2009). Sulphur increased nitrogenase activity because of higher ferredoxin and ATP concentration in bacterioids of root nodules of legumes (Scherer *et al.*, 2008). Increase in N fixation due to P application is comparable to those reported by Sanginga *et al.* (1996), Ankomah *et al.* (1996) and Somado *et al.* (2006). Phosphorous application affected total N accumulated rather than % N_{dfa} , which was due to an increase in growth of host plant due to P application rather than direct involvement of P in N fixation.

Nitrogen fixation

Individual effect of P and S was significant but combined application had no significant effect on N fixation at both locations (Table 1). Application of P (40 and 80 kg ha⁻¹) increased N fixation by 26 % and 40 % and 16 % and 40 % at Chakwal and Talagang (Table 4). Orthogonal contrast showed that higher (80 kg P₂O₅ ha⁻¹) and lower level (40 kg P₂O₅ ha⁻¹) of P application differed significantly from each other as well as from P₀ (Table 2). Similarly, an increase of 15 % and 19 % and 16 % and 22 % was recorded with S application (15 and 30 kg ha⁻¹) at Chakwal, and Talagang (Table 4). Lower (30 kg S ha⁻¹) and higher level (30 kg S ha⁻¹) of S were similar to each other but differed significantly from S₀ (Table 2). Furthermore, there was a positive correlation of both P (R=0.56**) and S uptake (R=0.97**) with N fixation (Table 9).

Phosphorus fertilization of legume species leads to increased nitrogenase activity, nodule number, nodule mass and plant N accumulation (Shu-Jie *et al.*, 2007). Deteriorated phosphate metabolism leads to impairment of photosynthetic and nitrogen fixing metabolism (Liao and Yan, 1999). Nitrogen fixation is directly affected by S as it is an essential component of the ferredoxins, an iron-sulphur protein occurring in the chloroplasts. Ferredoxin has a significant role in NO₂⁻ and SO₄⁻² reduction, the assimilation of N₂ by root nodule bacteria and free living N-fixing soil bacteria (Havlin *et al.*, 2007). Besides, root and nodule development on the roots of legumes is promoted by sulphur fertilization (Scherer, 2008; Scherer *et al.*, 2008).

S incrementó la actividad de la nitrogenasa debido a una mayor concentración de ferredoxina y ATP en los bacterioides de los nódulos de las raíces de las leguminosas (Scherer *et al.*, 2008). El incremento en la fijación de N por la aplicación de P es comparable a los reportados por Sanginga *et al.* (1996), Ankomah *et al.* (1996) y Somado *et al.* (2006). La aplicación de P afectó más el N total acumulado que el % N_{dfa} , lo que se debió más a un incremento en el crecimiento de la planta huésped por la aplicación de P que por la participación de P en la fijación de N.

Fijación de nitrógeno

El efecto individual de P y S fue significativo, pero la aplicación combinada no tuvo efectos significativos en la fijación de N en ambos sitios (Cuadro 1). Con la aplicación de P (40 y 80 kg ha⁻¹) la fijación de N aumentó 26 % y 40 %, y 16 % y 40 % en Chakwal y Talagang (Cuadro 4). El contraste ortogonal mostró que el mayor (80 kg P₂O₅ ha⁻¹) y el menor (40 kg P₂O₅ ha⁻¹) nivel de aplicación de P difirieron significativamente uno del otro, así como de P₀ (Cuadro 2). Similarmente, con la aplicación de S hubo aumentos de 15 % y 19 %, y de 16 % y 22 % en Chakwal y Talagang (Cuadro 4). El nivel más bajo de S (30 kg S ha⁻¹) y el más alto (30 kg S ha⁻¹) fueron semejantes uno del otro, pero difirieron significativamente de S₀ (Cuadro 2). Además hubo una correlación positiva de la captación de P (R = 0.56**) y de S (R=0.97**) con la fijación de N (Cuadro 9).

La fertilización fosfatada de las leguminosas lleva al aumento de la actividad de la nitrogenasa, número de nódulos, masa nodular y acumulación de N en la planta (Shu-Jie *et al.*, 2007). El deterioro del metabolismo del fosfato reduce el metabolismo fotosintético y de fijación de nitrógeno (Liao y Yan, 1999). El S afecta la fijación de nitrógeno directamente ya que es un componente esencial de las ferredoxinas, una proteína ferrosulfurada presente en los cloroplastos. La ferredoxina tiene una función importante en la reducción de NO₂⁻ y SO₄⁻², la captación de N₂ de las bacterias de los nódulos de las raíces y de las bacterias de vida libre fijadoras de N (Havlin *et al.*, 2007). Además, la fertilización azufrada promueve el desarrollo radicular y nodular en las raíces de las leguminosas (Scherer, 2008; Scherer *et al.*, 2008).

Nutrient uptake

Effect of P and S application was significant on N, P and S uptake at both locations (Table 5). Orthogonal comparison of P_0 vs. P_1 and P_2 indicated significant difference for nutrient uptake, but P_1 vs. P_2 showed no differences regarding P uptake (Table 6). Phosphorus application increased N uptake by 25 % and 38 % and 15 % and 36 % at Chakwal and Talagang (Table 7). There was a positive correlation of N uptake with both P ($R = 0.65^{**}$) and S uptake ($R = 0.97^{**}$) (Table 9). Shu-Jie *et al.* (2007) and Reed *et al.* (2007) reported similar results concerning increase in N uptake due P application. Increase in N uptake might be due to a better plant growth, especially roots. Root growth, and particularly development of lateral roots and fibrous rootlets, is encouraged by addition of P (Lopez-Bucio *et al.*, 2002). Adequate P nutrition enhances many aspects of plant physiology including photosynthesis (Brady and Weil, 2005). This leads to increased N assimilation, and as a result, increased N uptake by the plant.

Increase in N uptake due to S application has been reported by Scherer *et al.* (2006) and Tiwari and Gupta (2006). Sulphur can readily alter primary

Captación de nutrientes

El efecto de la aplicación de P y S fue significativo en la captación de N, P y S en ambos sitios (Cuadro 5). La comparación ortogonal de P_0 vs. P_1 y P_2 mostró diferencia significativa para la captación de nutrientes, pero P_1 vs. P_2 no mostró diferencias en la captación de P (Cuadro 6). Con la aplicación de P la captación de N aumentó 25 % y 38 %, y 15 % y 36 % en Chakwal y Talagang (Cuadro 7). Hubo una correlación positiva de la captación de N tanto con la captación de P ($R = 0.65^{**}$) y la de S ($R = 0.97^{**}$) (Cuadro 9). Shu-Jie *et al.* (2007) y Reed *et al.* (2007) reportan resultados similares respecto al aumento en la captación de N por la aplicación de P. El incremento en la captación de N podría deberse a un mejor crecimiento de la planta, particularmente de las raíces. El crecimiento de las raíces, y específicamente el desarrollo de raíces laterales y de raicillas fibrosas, se promueve con la adición de P (López-Bucio *et al.*, 2002). Una nutrición adecuada de P en las plantas mejora muchos de sus aspectos fisiológicos, incluida la fotosíntesis (Brady y Weil, 2005). Esto lleva a una mayor captación de N y, en consecuencia, a un aumento en la captación de N de la planta.

Table 5. Probability values for main and interaction effect of P and S using analysis of variance.

Cuadro 5. Valores de probabilidad para efectos principales e interacciones de P y S, usando análisis de varianza.

Effect	N uptake (kg ha ⁻¹)		P uptake (kg ha ⁻¹)		S uptake (kg ha ⁻¹)	
	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang
P levels	≤0.001	0.014	0.018	0.005	≤0.001	0.013
S levels	≤0.001	0.002	≤0.001	0.002	≤0.001	≤0.001
P × S	0.232	0.310	0.166	0.360	0.098	0.041

NS: not significant. The *p* values of significant effects that need further means comparison are shown in italic type.

Table 6. Probability values of orthogonal contrasts for P and S levels.

Cuadro 6. Valores de probabilidad de contrastes ortogonales para niveles de P y S.

Effect [†]	N uptake (kg ha ⁻¹)		P uptake (kg ha ⁻¹)		S uptake (kg ha ⁻¹)	
	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang
P_0 vs. P_1 and P_2	≤0.001	0.012	0.009	0.002	≤0.001	0.009
P_1 vs. P_2	0.004	0.033	0.165	0.122	0.002	0.047
S_0 vs. S_1 and S_2	≤0.001	0.001	≤0.001	0.001	≤0.001	≤0.001
S_1 vs. S_2	0.799	0.307	0.204	0.206	0.263	0.244

[†] P_0 , P_1 and P_2 stand for application of 0, 40 and 80 kg P_2O_5 ha⁻¹; and S_0 , S_1 and S_2 for 0, 15 and 30 kg S ha⁻¹.

Table 7. Nutrients uptake as a function of P and S levels.**Cuadro 7. Captación de nutrientes en función de los niveles de P y S.**

Effect [†]	N uptake (kg ha ⁻¹)		P uptake (kg ha ⁻¹)		S uptake (kg ha ⁻¹)	
	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang	Chakwal	Talagang
P levels						
P ₀	55	67	5.03	3.88	4.86	6.75
P ₁	69	77	5.93	5.65	6.48	8.24
P ₂	76	91	6.41	6.33	7.47	9.82
S levels						
S ₀	62	72	5.33	4.96	5.69	7.30
S ₁	68	80	5.93	5.37	6.46	8.62
S ₂	82	6.12	5.53	6.66	8.88	

[†] P₀, P₁ and P₂ stand for application of 0, 40 and 80 kg P₂O₅ ha⁻¹; and S₀, S₁ and S₂ for 0, 15 and 30 kg S ha⁻¹.

and lateral root growth, modifying the overall root architecture (Kutz *et al.*, 2002). In fact, nutrient ions act as signaling molecules for the regulation of root development (Lopez- Bucio *et al.*, 2003). Increased N uptake may also be due to increased protein synthesis and subsequent photosynthesis (Sexton *et al.*, 1998). Hence, it may be argued that increased sulphur availability resulted in better root and shoot growth and ultimately increased N uptake due to increased dry matter production.

There was a positive correlation between P uptake with S uptake (R=0.57**) (Table 9). Increase in P uptake due to P application was due to its increased availability in soil, a result similar to those reported by Amrani *et al.* (2001) and Kanwar and Paliyal (2002). Phosphorus application not only increased biomass production but also increased P concentration in plant tissue (Shu-Jie *et al.*, 2007).

Increase in P uptake due to S application has been already reported by Tiwari and Gupta (2006). Besides, Bagayoko *et al.* (2000) and Scherer *et al.* (2008) have shown a positive effect of P and S application on root growth and morphology. Due to the acidifying effect of S oxidation, the availability of other nutrients like N and P is also influenced (Togay *et al.*, 2008). Application of P and S increased uptake of these nutrients by the plant, which may be due to their increased availability in soil. It may be argued that better root growth resulted in increased uptake of these nutrients from soil (Zhao *et al.*, 2008).

The highest increases among nutrients were recorded regarding S uptake up to 54 % and 22 % due to P and S application (Table 7). Lower (15 kg S

De hecho, los iones de nutrientes actúan como moléculas señaladoras para la regulación del desarrollo radicular (López-Bucio *et al.*, 2003). Scherer *et al.* (2006) y Tiwari y Gupta (2006) reportan un incremento en la captación de N por la aplicación de S. El S altera con facilidad el crecimiento de la raíz primaria y de las laterales, modificando la arquitectura global de la raíz (Kutz *et al.*, 2002). El incremento en la captación de N también puede deberse a una mayor síntesis de proteínas y la fotosíntesis subsiguiente (Sexton *et al.*, 1998). Por tanto, se puede sostener que una mayor disponibilidad de azufre resultó en un mejor crecimiento de raíces y brotes, así como en una mayor captación de N debido a una mayor producción de materia seca.

Hubo una correlación positiva entre la captación de P con la de S (R=0.57**) (Cuadro 9). El incremento en la captación de P se debió a su mayor disponibilidad en el suelo, resultado similar a los reportados por Amrani *et al.* (2001) y Kanwar y Paliyal (2002). La aplicación de P no sólo incrementó la producción de biomasa, sino también la concentración de P en los tejidos de la planta (Shu-Jie *et al.*, 2007).

El incremento en la captación de P por la aplicación de S ya ha sido reportada por Tiwari y Gupta (2006). Además, Bagayoko *et al.* (2000) y Scherer *et al.* (2008) mostraron un efecto positivo de la aplicación de P y S en el crecimiento de las raíces y su morfología. Debido al efecto acidificante del S, la disponibilidad de otros nutrientes como N y P también está influenciada (Togay *et al.*, 2008). La aplicación de P y S aumentó la captación de estos nutrientes en

ha⁻¹) and higher (30 kg S ha⁻¹) level of S application differed from S₀ regarding nutrient uptake but were similar to each other (Table 6). The P×S interaction was not significant regarding N and P uptake but showed significant effect on S uptake at Talagang (Table 5). The maximum S uptake (10.76 kg ha⁻¹) was recorded in P₂S₁ which was at par with P₂S₂ (10.19 kg ha⁻¹) and minimum (6.12 kg ha⁻¹) in P₀S₀ (Table 8). Bagayoko *et al.* (2000) and Tang *et al.* (2001b) have shown the positive effect of P and S application on root growth and morphology. Application of P and S increased uptake of these nutrients by the plant which may be due to their increased availability in soil. It may be argued that deeper root penetration resulted in increased uptake of these nutrients from soil.

CONCLUSION

Application of P and S significantly increased seed yield, N fixation and N uptake at both locations. The effect of P on % N_{dfa} was not significant but the effect of S was significant. It was observed that P application increased total N uptake, which contributed towards an increase in N fixation. Thus, the effect of P application on N fixation was indirect. Besides, the

la planta, lo que puede deberse al incremento de su disponibilidad en el suelo. Se puede afirmar que el mejor crecimiento de las raíces resultó en una mayor captación por parte del suelo de estos nutrientes (Zhao *et al.*, 2008).

Los mayores incrementos entre nutrientes en lo que concierne a la captación de S fueron de 54 % a 22 % por la aplicación de P y S (Cuadro 7). El nivel más bajo de aplicación de S (15 kg ha⁻¹) y el más alto (30 kg S ha⁻¹) difirieron de S₀ en lo que respecta a la captación de nutrientes, pero fueron similares entre ellos (Cuadro 6). La interacción P × S no fue significativa en cuanto a la captación de N y P, pero mostró un efecto significativo en la captación de S en Talagang (Cuadro 5). La captación máxima de S (10.76 kg ha⁻¹) se registró en P₂S₁, que estuvo al mismo nivel que P₂S₂ (10.19 kg ha⁻¹), y la mínima (6.12 kg ha⁻¹) en P₀S₀ (Cuadro 8). Bagayoko *et al.* (2000) y Tang *et al.* (2001b) mostraron el efecto positivo de la aplicación de P y S en el crecimiento de las raíces y su morfología. La aplicación de P y S incrementó la captación de estos nutrientes en la planta, lo que puede deberse al incremento de su disponibilidad en el suelo. Se puede argumentar que la penetración más profunda de las raíces resultó en una mayor captación por parte del suelo de estos nutrientes.

Table 8. Probability values of two orthogonal contrasts for three levels of P with each S level, for Talagnag.
Cuadro 8. Valores de probabilidad de dos contrastes ortogonales para tres niveles de P con cada nivel de S, en Talagnag.

Effect [†]	S uptake (kg ha ⁻¹)						
	P values			Effect	Means		
	S ₀	S ₁	S ₂		S ₀	S ₁	S ₂
P ₀ vs. P ₁ and P ₂	≤0.001	≤0.001	≤0.001	P ₀	6.12	6.88	7.30
P ₁ vs. P ₂	0.005	≤0.001	0.012	P ₁	7.29	8.29	9.14
				P ₂	8.50	10.76	10.19

[†]P₀, P₁ and P₂ stand for application of 0, 40 and 80 kg P₂O₅ ha⁻¹; and S₀, S₁ and S₂ for 0, 15 and 30 kg S ha⁻¹.

Table 9. Linear correlation coefficients between chickpea seed yield, N fixation, and nutrients uptake.
Cuadro 9. Coeficientes de correlación lineal entre rendimiento de semilla de garbanzo, fijación de N y captación de nutrientes.

	Seed yield	% N _{dfa}	N fixation	N uptake	P uptake
% N _{dfa}	0.70	-	-	-	-
N fixation	0.97	0.77	-	-	-
N uptake	0.98	0.70	0.98	-	-
P uptake	0.60	0.28	0.56	0.65	-
S uptake	0.98	0.76	0.97	0.97	0.57

effect of S application on N fixation was direct since it increased N uptake as well as %N_{dfa}. Application of both P and S increased nutrient uptake, which may improve the quality of produce. Increased N₂ fixation due to application of P and S may lead to sustainability of soil resources.

LITERATURE CITED

- Ahmad, A., and M. Z. Abdin. 2000. Photosynthesis and its related physiological variables in the leaves of *Brassica* genotypes as influenced by sulphur fertilization. *Physiol. Plantarum* 110: 144-149.
- Amrani, M., D. G. Westfall, and L. Moughli. 2001. Phosphorus management in continuous wheat and wheat legume rotations. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 59: 19-27.
- Ankomah A. B., F. Zapata, G. Hardarson, and S. K. A. Danso. 1996. Yield, nodulation and N₂ fixation by cowpea cultivars at different phosphorus rates. *Biol. Fert. Soils* 22 (1-2): 10-15.
- Aslam, M., I. A. Mahmood, T. Sultan, S. Ahmad, and M. A. Zahid. 2000. Growth and yield response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to various *Rhizobium* strains fertilized with different phosphorus levels. *Int. J. Agr. Biol.* 2(1-2): 89-91.
- Bagayoko, M., E. George, V. Romheld, and A. Buerkert. 2000. Effects of mycorrhizae and phosphorus on growth and nutrient uptake of millet, cowpea and sorghum on a West African soil. *J. Agr. Sci.* 135: 399-407.
- Brady, N. C., and R. R. Weil. 2005. The Nature and Properties of Soils. 13th Ed. Pearson education, Singapore. 976 p.
- Claro-Cortes, P., R. Nunez-Escobar, and J. D. Etchevers-Barra. 2002. Green house grown maize response to sulphur in two soils of Puebla state Mexico. *Agrociencia* 36: 633-642.
- Daramola, D. S., A. Adebayo, and O. Odeyemi. 1982. Effect of herbicide application on legume *Rhizobium* symbiosis with and without starter nitrogen. *Turrialba* 32: 315-320.
- Dwivedi, K. N., P. Chandra, and V. C. Pandey. 1996. Relative efficacy of sulphur carriers on yield and nutrient uptake by black gram. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 44: 790-791.
- Economic Survey, 2008. Ministry of finance. Government of Pakistan. pp: 16 -24.
- FAO, Food and Agricultural Organization. 2006. FAOSTAT (<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> accessed on 20-03-2008).
- Fukuyama, K. 2004. Structure and function of plant- type ferredoxin. *Photosynth. Res.* 81: 291-301.
- Ganeshamurthy, A. N., and K. S. Reddy. 2000. Effect of integrated use of farm yard manure and sulphur in soybean and wheat cropping system on nodulation, dry matter production and chlorophyll content of soybean on swell shrink soils in Central India. *J. Agron. Crop Sci.* 185: 191-197.
- Goos, R. J., and B. E. Johnson. 2001. Response of spring wheat to phosphorus and sulphur starter fertilizers of differing acidification potential. *J. Agr. Sci.* 136:283-289.
- Habtemichial, K. H., B. R. Singh, and J. B. Aune. 2007. Wheat response to N₂ fixed by faba bean (*Vicia faba* L.) as affected

CONCLUSIONES

La aplicación de P y S incrementó significativamente el rendimiento de semilla, la fijación de N y la captación de N en ambos sitios. El efecto de P sobre % N_{dfa} no fue significativo, pero el efecto de S sí fue importante. Se observó que la aplicación de P incrementó la captación total de N, lo que contribuyó a un incremento en la fijación de N. Por tanto, el efecto de la aplicación de P en la fijación de N fue indirecto. Además, el efecto de la aplicación de S en la fijación de N fue directo ya que incrementó tanto la captación de N como el % N_{dfa}. La aplicación tanto de P como de S incrementó la captación de nutrientes, lo que puede mejorar la calidad de la producción. El incremento en la fijación de N₂ por la aplicación de P y S puede llevar a la sostenibilidad de los recursos del suelo.

—Fin de la versión en Español—

---*---

- by sulphur fertilization and rhizobial inoculation in semi arid Northern Ethiopia. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170: 412-418.
- Havlin, J. L., J. D. Beaton, S. L. Tisdale, and W. L. Nelson. 2007. Soil Fertility and Fertilizers. An Introduction to Nutrient Management. 7th ed. Pearson Education Inc., Singapore. 476 p.
- Hayat, R. 2005. Sustainable legume cereal cropping system through managemnt of biological nitrogen fixation in pothwar. Ph.D. thesis, University of Arid Agriculture Rawalpindi. 161 p.
- Jiang, D., H. Hengsdijk, T. B. Dai, W. de Boer, Q. Jing, and W. X. Cao. 2006. Long term effect of manure and inorganic fertilizer on yield and soil fertility for a winter wheat- maize system in Jiangsu, China. *Pedosphere* 16: 25-32.
- Kanwar, K., and S. S. Paliyal. 2002. Influence of phosphorus management and organic manuring on uptake and yield of chickpea. *Ann. Agr. Res.* 23 (4): 642-645.
- Kutz, A., A. Muller, P. Henning, W. M. Kaiser, M. iotrowsky, and E. W. Weiler. 2002. A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 30: 95-106.
- Liao, H., and X. Yan. 1999. Seed size is closely related to phosphorus use efficiency and photosynthetic phosphorus use efficiency in common bean. *J. Plant Nutr.* 22: 877-888.
- López-Bucio, J. A. Cruz-Ramírez, and L. Herrera-Estrella. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280-287.
- López-Bucio, J., E. Hernández-Abreu, L. Sánchez-Calderón, M. F. Nieto-Jacobo, J. Simpson, and L. Herrera-Estrella. 2002. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* 129:244-256.

- Mortenson, L. E., and R. N. F. Thornley. 1979. Structure and function of nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 387-418.
- Olivera, M., N. Tejera, C. Iribarne, A. Ocana, and C. Lluch. 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum* 121: 498-505.
- Peoples, M.B., A. W. Faizah, B. Rekasem, and D. F. Herridge. 1989. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Monograph No. 11. ACIAR. pp: 22-45.
- Raina, A. K., and S. K. Tanawade. 2005. Delineation of sulphur deficient areas of Maharashtra and crop response to sulphur application. *Ind. J. Fert.* 1(7): 61-67.
- Reed, S. C., T. R. Seastedt, C. M. Mann, K. N. Suding, A. R. Townsed, and K. L. Cherwin. 2007. Phosphorus fertilization stimulates nitrogen fixation and increases inorganic nitrogen concentration in a restored prairie. *Appl. Soil Ecol.* 36: 238-242.
- Ryan, J., G. Estefan, and A. Rashid. 2001. Soil and Plant Analysis Laboratory Manual. International Centre for Agricultural Research in Dry Areas. (ICARDA) Aleppo, Syria. pp: 124-134.
- Sanginga, N., J. A. Okogun, I. O. Akalobundes, and B. T. Kang. 1996. Phosphorus requirement and nodulation of herbaceous and shrub legumes in low P soils of a Guinean Savana in Nigeria. *Appl. Soil Ecol.* 3(3): 247-255.
- Scherer, H. W., and A. Lange. 1996. N₂ fixation and growth of legumes as affected by sulphur fertilization. *Biol. Fert. Soils* 23: 449-453.
- Scherer, H. W., S. Pacyna, N. Manthey, and M. Schulz. 2006. Sulphur supply to peas (*Pisum sativum* L.) influence symbiotic nitrogen fixation. *Plant Soil Environ.* 2: 72-77.
- Scherer, H.W. 2008. Impact of sulphur on N₂ fixation of legumes. In: Khan, N. A. (ed). *Sulphur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp: 51-60.
- Scherer, H. W., S. Pacyna, K. Spoth, and M. Schulz. 2008. Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N₂ fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. *Biol. Fertil. Soils* 44: 909-916.
- Sexton, P. J., N. C. Peak, and R. Shibles. 1998. Soybean sulphur and nitrogen balance under varying levels of available sulphur. *Crop Sci.* 38: 975-982.
- Shah Z., S. H. Shah, M. B. People, and D. F. Herridge. 1997. Surveys of N fixation of lentil, mung bean and black gram in farmer's field in North West Frontier Province, Pakistan. In: *Extending nitrogen fixation research to farmer's field: Proc. Int. workshop on Managing legume nitrogen fixation in the cropping systems of Asia*, 20-24 Aug, 1996, ICRISTAT Asia Centre, India, Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: Int. Crops Res. Inst. Semi Arid Tropics. pp: 333-341.
- Shu-Jie, M., Q. Yun-Fa, H. Xiao- Zeng, and A.N. M. 2007. Nodule formation and development in soybean (*Glycine max* L.) response to phosphorus supply in solution culture. *Pedosphere* 17(1): 36-43.
- Somado, E. A., K. L. Sahrawat, and R. F. Kuehne. 2006. Rock phosphate-P enhances biomass and nitrogen accumulation by legumes in upland crop production systems in humid West Africa. *Biol. Fert. Soils* 43:124-130.
- Srinivasarao, Ch., A. N. Ganeshamurthy, M. Ali, R. N. Singh, and K. K. Singh. 2004. Sulphur fractions, distribution and their relationship with soil properties in different soil types of major pulse growing regions of India. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 35 (19 & 20): 2757-2769.
- Tang, C., P. J. Hinsiger, J. J. Drevon, and B. Jaillard. 2001a. Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton release in roots of *Medicago truncatula* L. *Ann Bot.* 88: 131-138.
- Tang, C., P. Hinsiger, B. Jaillard, Z. Rengel, and J. J. Drevon. 2001b. Effect of phosphorus deficiency on the growth, symbiotic N₂ fixation and proton release by two bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Agronomie* 21: 683-689.
- Tiwari K. N., and B. R. Gupta. 2006. Sulphur for sustainable high yield in Uttarpradesh. *Indian J. Fert.* 1 (11): 37-52.
- Togay, Y., N. Togay, F. Cig, M. Erman, and A. E. Celen. 2008. The effect of sulphur applications on nutrient composition, yield and some yield components of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Afr. J. Biotech.* 7: 3255-3260.
- Tsvetkova, G. E., and G. I. Georgiev. 2003. Effect of phosphorus nutrition on the nodulation, nitrogen fixation and nutrient use efficiency of *Bradyrhizobium japonicum* - soybean (*Glycine max* L. Merr) symbiosis. *Bulg. J. Plant Physiol. Special Issue* 331-335.
- Varin, S., B. Leveel, S. L. Lavenant, and J. B. Cliquet. 2009. Does the white clover response to sulphur availability correspond to phenotypic or ontogenetic plasticity? *Acta Oecologica* 35: 452-457.
- Verma, B.C., K. Swaminathan, and K.C. Sud. 1977. An improved turbidimetric procedure for determination of sulphate in plants and soils. *Talanta* 24: 49-50.
- Zhao F. J., A. P. Wood, and S. P. McGrath. 1999. Effect of sulphur nutrition on growth and nitrogen fixation of pea. *Plant Soil.* 212: 209-219.
- Zhao, Y., X. Xiao, D. Bi, and F. Hu. 2008. Effect of sulphur fertilization on soybean root and leaf traits and soil microbial activity. *J. Plant Nutr.* 31: 473-483.