

EFFECT OF DIFFERENT PHOSPHORUS AND SULFUR LEVELS ON NITROGEN FIXATION AND UPTAKE BY CHICKPEA (*Cicer arietinum* L.)

EFFECTO DE DIFERENTES NIVELES DE FÓSFORO Y AZUFRE EN EL NITRÓGENO CONSUMIDO Y FIJADO POR EL GARBANZO (*Cicer arietinum* L.)

Muhammad Islam¹, Saleem Mohsan¹, Safdar Ali²

¹National Fertilizer Development Centre, Street # 1 Sector H-8/1 Islamabad-44000 Pakistan. (islamuaf@gmail.com). ²Department of Soil Science and Soil and Water Conservation, Arid Agriculture University, Rawalpindi- 46300 Pakistan.

ABSTRACT

Nitrogen fixing capacity of leguminous plants can be increased by the supply of adequate amounts of nutrients, especially phosphorus and sulfur. Some nutrients have direct involvement in the process of nitrogen fixation while others affect by improving growth of host plant. Field experiments were conducted at two different locations in northern rainfed Punjab, Pakistan, to assess the amount of nitrogen fixation and nitrogen uptake by chickpea (*Cicer arietinum* L.) during crop growing seasons 2006-2007 and 2007-2008. Treatments were: phosphorus levels (0, 40 and 80 kg P₂O₅ ha⁻¹); sulfur sources (gypsum and ammonium sulfate) and levels (0, 15 and 30 kg S ha⁻¹). The experimental design was randomized complete block with split-split plot arrangement: phosphorus levels in main plots, sulfur sources in sub-plots and sulfur levels in sub-sub-plots. Phosphorus (80 kg P₂O₅ ha⁻¹) increased nitrogen fixed and uptake by 33 and 31 % over control. However, effect of phosphorus on nitrogen derived from atmosphere was not significant while that of sulfur was significant. Sulfur (30 kg S ha⁻¹) increased nitrogen derived from atmosphere, amount of nitrogen fixed and nitrogen uptake by 6, 25 and 17 % over control. Ammonium sulfate treatments caused significantly higher amount of nitrogen fixed and higher nitrogen uptake as compared to gypsum treatments, although both sulfur sources were similar regarding percent nitrogen derived from atmosphere. A strong positive correlation (R= 0.98**) between amount of nitrogen fixed and nitrogen uptake at both locations was observed. There was a direct effect of sulfur on the process of nitrogen fixation, whereas phosphorus mainly affected growth of chickpea.

RESUMEN

La capacidad de fijación del nitrógeno de las leguminosas puede aumentar suministrando cantidades adecuadas de nutrientes, especialmente fósforo y azufre. Algunos nutrientes participan directamente en el proceso de fijación del nitrógeno, mientras que otros mejoran el crecimiento de la planta huésped. Los experimentos de campo se llevaron a cabo en dos lugares diferentes en la zona norte de temporal, en Punjab, Pakistán, para evaluar la cantidad de nitrógeno fijado y la absorción de nitrógeno por el garbanzo (*Cicer arietinum* L.) durante las temporadas de cultivo 2006-2007 y 2007-2008. Los tratamientos fueron: fósforo (0, 40 y 80 kg de P₂O₅ ha⁻¹), fuentes (yeso y sulfato de amonio) y niveles de azufre (0, 15 y 30 kg S ha⁻¹). El diseño experimental fue de bloques completos al azar con arreglo de parcelas sub-subdivididas: niveles de fósforo en las parcelas principales, fuentes de azufre en las sub-parcelas y niveles de azufre en las sub-sub-parcelas. El fósforo (80 kg P₂O₅ ha⁻¹) aumentó la absorción y fijación de nitrógeno en 33 y 31 % sobre el testigo. Sin embargo, el efecto del fósforo en el nitrógeno derivado de la atmósfera no fue significativo, mientras que el del azufre sí lo fue. El azufre (30 kg S ha⁻¹) aumentó el nitrógeno derivado de la atmósfera, la cantidad de nitrógeno fijado y su absorción en 6, 25 y 17 % sobre el testigo. Los tratamientos con sulfato de amonio aumentaron significativamente la cantidad de nitrógeno fijado y la absorción de nitrógeno comparados con los tratamientos de yeso, aunque ambas fuentes de azufre fueron similares con respecto al porcentaje de nitrógeno proveniente de la atmósfera. Hubo una fuerte correlación positiva (R= 0.98**) entre la cantidad de nitrógeno fijado y la absorción de nitrógeno en ambas localidades. Hubo un efecto directo del azufre en el proceso de fijación de nitrógeno, mientras que el fósforo afectó principalmente el crecimiento del garbanzo.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.
Received: april, 2011. Approved: december, 2011.
Published as ARTICLE in *Agrociencia* 46: 1-13. 2012.

Key words: *Cicer arietinum* L., ammonium sulfate, gypsum, natural abundance technique, percent nitrogen derived from atmosphere.

INTRODUCTION

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is an important pulse crop of rainfed areas in semiarid/arid climate. Average chickpea yield in Pakistan is 685 kg ha⁻¹ (Government of Pakistan, 2010) which is very low compared to China (2.4 Mg ha⁻¹), Canada (1.9 Mg ha⁻¹) and USA (1.7 Mg ha⁻¹) (FAO, 2009). This low yield is due to genetic, agronomic and environmental factors and inadequate fertilization is the key among them.

Sulfur (S) is becoming deficient in soils due to introduction of high yielding varieties, use of high grade S free fertilizers and reduced emission of S from industrial units (Khalid *et al.*, 2009a; Scherer, 2009). Therefore, it is important to study the changes in concentration of this element under different conditions of soils, climate, crop species and cropping systems.

An adequate supply of mineral nutrients to legumes enhances nitrogen (N) fixation (Ganeshamurthy and Reddy, 2000). Thus, S availability increases tissue N concentration 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 plant growth is not very clear. Furthermore, S deficiency may affect N fixation because it is a constituent of ferredoxin and enzymes, such as nitrogenase (Fukuyama, 2004).

In Pakistan, studies about crop response to S application are limited to oilseeds and their oil contents. Research regarding interaction of phosphorus (P) and S and their role in legume's growth, N fixation and nutrient uptake is very rare (Islam *et al.*, 2009). It may be speculated that supply of adequate amount of nutrients to legumes may result in increased amount of N fixation. Therefore, this study was conducted to assess the interactive effect of S and P application on N fixation and N uptake by chickpea crop under rainfed conditions of northern Punjab, Pakistan.

MATERIALS AND METHODS

Field experiments were conducted using chickpea cultivar Balkassar 2000 at: 1) Barani Agricultural Research Institute

Palabras clave: *Cicer arietinum* L., sulfato de amonio, yeso, técnica de abundancia natural, porcentaje de nitrógeno proveniente de la atmósfera.

INTRODUCCIÓN

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una leguminosa de las zonas de temporal de clima semiárido/árido. El rendimiento promedio del garbanzo en Pakistán es 685 kg ha⁻¹ (Gobierno de Pakistán, 2010), que es muy bajo comparado con China (2.4 Mg ha⁻¹), Canadá (1.9 Mg ha⁻¹) y EE.UU. (1.7 Mg ha⁻¹) (FAO, 2009). Este rendimiento bajo se debe a factores genéticos, agronómicos y ambientales y la fertilización inadecuada es clave entre ellos.

El azufre (S) se torna escaso en los suelos debido a la introducción de variedades de alto rendimiento, uso de fertilizantes de alto grado libre de S y menor emisión de S de unidades industriales (Khalid *et al.*, 2009a; Scherer, 2009). Por tanto, es importante estudiar los cambios en la concentración de este elemento en diferentes condiciones de suelos, clima, especies de cultivos y sistemas de cultivo.

Un suministro adecuado de nutrientes minerales en las leguminosas mejora la fijación de nitrógeno (N) (Ganeshamurthy y Reddy, 2000). Así, la disponibilidad de S aumenta la concentración de N en el tejido de muchas leguminosas (Claro-Cortés *et al.*, 2002.). No está claro si esto se debe a un efecto directo en la fijación simbiótica de N, o un efecto en el crecimiento de las plantas huésped. Además, la deficiencia de S puede afectar la fijación de N, por ser un componente de ferredoxina y de enzimas, como nitrogenasa (Fukuyama, 2004).

En Pakistán, los estudios sobre la respuesta del cultivo a la aplicación de S se limitan a las semillas oleaginosas y su contenido de aceite. Hay pocos estudios sobre la interacción entre el fósforo (P) y el S y su función en el crecimiento de las leguminosas, la fijación de N y su absorción (Islam *et al.*, 2009). Se puede especular que el suministro de una cantidad adecuada de nutrientes para las leguminosas puede dar lugar a una mayor fijación de N. Por tanto, este estudio se realizó para evaluar el efecto interactivo de la aplicación de S y P en la fijación del N y la absorción de éste por el garbanzo, en condiciones de temporal, en el norte de Punjab, Pakistán.

(BARI), Chakwal (sandy loam, pH 7.6, AB-DTPA extractable P 3.0 mg kg⁻¹, CaCl₂ extractable SO₄-S 6.4 mg kg⁻¹); and 2) a farmer's field Talagang, district Chakwal (loamy sand, pH 7.7, AB-DTPA extractable P 1.4 mg kg⁻¹, CaCl₂ extractable SO₄-S 7.5 mg kg⁻¹); during crop growing seasons 2006-2007 and 2007-2008. Both experimental sites are located at 32.5 °N, 72.4 °E. The experimental design was a randomized complete block with a split-split-plot arrangement (plot size 1.5×3.5 m at BARI Chakwal, and 1.8×4 m at farmer's field Talagang); P rates (0, 40 and 80 kg P₂O₅ ha⁻¹) were in main plots, S sources in sub-plots (gypsum and ammonium sulfate) and S rates (0, 15 and 30 kg S ha⁻¹) in sub-sub-plots. As a result, there were 18 treatments which were replicated three times. Starter dose (26 kg ha⁻¹) of N was applied as urea; in S treatments, urea dose was adjusted after taking into consideration the addition of N from ammonium sulfate (AS). Phosphorus was applied as triple super phosphate. All the fertilizers were applied as basal dose. Chickpea crop was sown maintaining 30 cm row to row distance. Crop was grown under rainfed conditions and no supplemental irrigation was applied. Samples of plant dry matter tissue of legume and non legume reference plant were taken for δ¹⁵N determination (Unkovich *et al.*, 2008).

Nitrogen derived from atmosphere (N_{dfa}) = 100 × (δ¹⁵N (soil N) - δ¹⁵N legume N) / [δ¹⁵N (soil N) - B]

where δ¹⁵N (soil N) is commonly obtained from a non N fixing reference plant grown in the same soil as the legume; B is the δ¹⁵N of the same N fixing plant when grown with N as the sole source of N and its value is -2.0 (Kyei-Boahen *et al.*, 2002).

Legume N uptake (kg ha⁻¹) = legume dry matter yield (kg ha⁻¹) × N in plant tissue (%)

Amount of N fixed (kg ha⁻¹) = legume N uptake (kg ha⁻¹) × N_{dfa} × 1.5*

*1.5 factor was used to include an estimate for contribution by underground N (Rochester *et al.*, 1998).

At physiological maturity, crop from 1 m² in the middle of each plot was harvested separately. The plant samples were dried and data were recorded for seed, straw and total dry matter yield. Representative samples of 100 g from both seed and straw were collected from bulk sample, oven dried and ground and analyzed for N (Ryan *et al.*, 2001).

Data on all observations were subjected to analysis of variance (ANOVA) by using software MSTATC. Treatment means were compared by least significant difference (LSD; p ≤ 0.05) test.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos de campo se realizaron con garbanzos del cultivar Balkassar 2000 en: 1) el Instituto de Investigaciones Agropecuarias Barani (BARI), Chakwal (arena arcillosa, pH 7.6, AB-DTPA P extraíble de 3.0 mg kg⁻¹, CaCl₂, SO₄-S extraíble de 6.4 mg kg⁻¹); y 2) el campo de cultivo Talagang, distrito de Chakwal (arena arcillosa, pH 7.7, AB-DTPA P extraíble de 1.4 mg kg⁻¹, CaCl₂, SO₄-S extraíble de 7.5 mg kg⁻¹), durante las temporadas de cultivo 2006-2007 y 2007-2008. Ambos sitios experimentales se ubican en 32.5 °N, 72.4 °E. El diseño experimental fue bloques completos al azar, con un arreglo de parcelas sub-subdivididas (tamaño de las parcelas 1.5×3.5 m en BARI Chakwal, y 1.8×4 m en el campo de cultivo Talagang); las tasas de P (0, 40 y 80 kg de P₂O₅ ha⁻¹) estaban en las parcelas principales; las fuentes de S, en las sub-parcelas (yeso y sulfato de amonio) y las tasas de S (0, 15 y 30 kg S ha⁻¹) en las sub-sub-parcelas. Hubo 18 tratamientos que se repitieron tres veces. La dosis inicial (26 kg ha⁻¹) de N se aplicó como urea; en los tratamientos de S, la dosis de urea se ajustó después de tomar en cuenta la adición de N a partir del sulfato de amonio (AS). El fósforo se aplicó como superfosfato triple. Todos los fertilizantes se aplicaron en dosis basal. El garbanzo se sembró manteniendo una distancia de 30 cm entre las hileras. Se cultivó en condiciones de temporal y sin riego complementario y se tomaron muestras de tejido de materia vegetal seca de las leguminosas y las no leguminosas de referencia, para la determinación δ¹⁵N (Unkovich *et al.*, 2008).

El nitrógeno proveniente de la atmósfera (N_{dfa}) = 100 × (δ¹⁵N (N del suelo) - δ¹⁵N leguminosas N) / (δ¹⁵N [N del suelo] - B)

donde δ¹⁵N (N del suelo) se obtiene generalmente de una planta que no fije el N de referencia que crezca en el mismo suelo que la leguminosa; B es el δ¹⁵N de la misma planta de fijación de N cuando se cultiva con N como la única fuente de este mineral, y su valor es -2.0 (Kyei-Boahen *et al.*, 2002).

La absorción de N (kg ha⁻¹) de las leguminosas = rendimiento de materia seca de las leguminosas (kg ha⁻¹) × N en el tejido vegetal (%)

Cantidad de N fijado (kg ha⁻¹) = absorción de N de las leguminosas (kg ha⁻¹) × N_{dfa} × 1.5*

*Se utilizó el factor 1.5 para incluir una estimación de la contribución del N subterráneo (Rochester *et al.*, 1998).

En la madurez fisiológica, los cultivos de 1 m² en el centro de cada parcela se cosecharon por separado. Las muestras de plantas se secaron y se registraron datos de las semillas, paja y

Simple linear correlation analysis was also performed to study the relationship between variables.

RESULTS AND DISCUSSION

The precipitation during crop growing season (October to March) at experimental sites (Chakwal and Talagang) was 385 and 362 mm during the first crop growing season (2006-2007), and 90 and 30 mm during the second crop growing season (2007-2008). The long term average (1977-2009) annual precipitation is 630 mm for Chakwal and 450 mm for Talagang. Two third of total rainfall occurs in moonsoon (July to September).

Two locations and years differed significantly with respect to N fixation and uptake (Table 1). Percent N derived from atmosphere, amount of N fixed and N uptake were significantly higher in the first growing season, as compared to the second one, due to the occurrence of a larger rainfall in both locations during 2006-2007, which is similar to results reported by Hayat *et al.* (2008). Habtemichial *et al.* (2007) also observed that during wetter crop growing season, there was better nodulation and nitrogen uptake by faba bean (*Vicia faba* L.) crop. Likewise, amount of

el rendimiento total de la materia seca. Las muestras representativas de 100 g de semilla y paja se obtuvieron de muestras a granel, secadas y molidas para analizar el contenido de N (Ryan *et al.*, 2001).

Con los datos de las observaciones fueron sometidos a análisis de varianza (ANDEVA) mediante el uso del software MSTATC. Las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de mínima diferencia significativa (LSD; $p \leq 0.05$). También se realizó un análisis simple de correlación lineal para estudiar la relación entre las variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las precipitaciones durante la etapa de crecimiento de los cultivos (de octubre a marzo) en los sitios experimentales (Chakwal y Talagang) fueron 385 y 362 mm durante la primera temporada de crecimiento (2006-2007), y de 90 y 30 mm durante la segunda temporada de crecimiento (2007-2008). El promedio de precipitación anual a largo plazo (1977-2009) fue 630 mm en Chakwal y 450 mm en Talagang. Dos tercios de la precipitación total se producen en la temporada de los monzones (julio a septiembre).

Los dos sitios y años fueron significativamente diferentes respecto a la fijación y absorción de N (Cuadro 1). El porcentaje de N derivado de la atmósfera, la cantidad del N fijado y la absorción de N fueron significativamente mayores en la primera temporada de crecimiento, en comparación con la segunda, debido a lluvias prolongadas en ambos lugares durante el período 2006-2007, lo cual es similar a los resultados reportados por Hayat *et al.* (2008). Habtemichial *et al.* (2007) también observaron que durante la temporada más lluviosa de crecimiento, las habas (*Vicia faba* L.) tuvieron mejor nodulación y absorción de N. Del mismo modo, las cantidades de absorción y fijación de N fueron mayores en Talagang en comparación con Chakwal (Cuadro 1). El nivel bajo de carbono orgánico total (1.8 mg g^{-1}) y nitrato de N (5.6 ug g^{-1}) en el suelo de Talagang antes de iniciar el experimento podría ser una razón de la mayor cantidad de N fijado.

El efecto de interacción del año \times la localización fue significativo. El tratamiento (niveles de P, fuentes y niveles de S) \times la localidad y el tratamiento \times los efectos de la interacción de los años fueron significativos para la cantidad de N fijado y la absorción del N, pero no afectaron el N_{dfa} . Por tanto, los resultados se presentan para cada año y localidad por separado.

Table 1. Effect of year and location on percent nitrogen derived from atmosphere (N_{dfa}), amount of nitrogen fixed and nitrogen uptake in both periods.

Cuadro 1. Efecto del año y el lugar en el porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (N_{dfa}), la cantidad de nitrógeno fijado y la absorción de nitrógeno en ambos períodos.

Effect	N_{dfa} (%)	Amount of nitrogen fixed (kg ha^{-1})	Nitrogen uptake (kg ha^{-1})
2006-2007(Y_1)	54 a	61 a	75 a
2007-2008 (Y_2)	49 b	39 b	53 b
Probability	0.001	0.004	0.001
Locations			
Chakwal (L_1)	53 a	47 b	59 b
Talagang (L_2)	50 b	53 a	69 a
Probability	0.001	0.01	0.001
Years \times Location interaction			
Y_1L_1	52 c	53 b	69 b
Y_1L_2	56 a	69 a	82 a
Y_2L_1	54 b	41c	50 d
Y_2L_2	43 d	37 d	56 c
LSD value	0.9	2.5	4.5

Means with different letters differ significantly ($p \leq 0.05$) \diamond Las medias con letras distintas difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

N fixed and N uptake were higher at Talagang as compared to Chakwal (Table 1). Low level of total organic carbon (1.8 mg g^{-1}) and nitrate N (5.6 ug g^{-1}) in Talagang soil before starting the experiment might be a reason for the higher amount of N fixed.

The year \times location interaction effect was significant. The treatment (P levels, S sources and S levels) \times location and treatment \times year interaction effects were significant for amount of N fixed and N uptake, but they did not affect N_{dfa} . Therefore, the results are presented for each year and location separately.

Nitrogen derived from atmosphere

Treatment with P did not change ($p > 0.05$) N_{dfa} at Chakwal (Table 2), and a similar trend was observed at Talagang during 2007-2008. However, during 2006-2007 P application ($80 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$) resulted in a significant increase of N_{dfa} . Analysis of data pooled over location and year did not show any significant effect of P application on N_{dfa} .

Nitrógeno derivado de la atmósfera

El tratamiento con P no varió ($p > 0,05$) el N_{dfa} en Chakwal (Cuadro 2), y una tendencia similar se observó en Talagang durante el período 2007-2008. Sin embargo, durante el período 2006-2007, la aplicación de P ($80 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$) produjo un aumento significativo de N_{dfa} . El análisis de los datos agrupados por localidad y año no reveló ningún efecto significativo de la aplicación de P en N_{dfa} .

Las observaciones con garbanzo respecto a N_{dfa} , parecen apoyar la conclusión de que la deficiencia de P afecta el proceso de fijación de N a través de sus efectos secundarios sobre el crecimiento de las plantas, en lugar de una participación directa en el funcionamiento de la nitrógenasa. Resultados similares respecto a los efectos de la aplicación de P en N_{dfa} fueron reportados por Islam y Ali (2009) para el garbanzo y para lupino blanco (*Lupinus albus*) por Schulze *et al.* (2006). Sin embargo, en contraste con estos resultados, Hayat *et al.* (2008) reportan un aumento de hasta 32 % en N_{dfa} debido a la aplicación

Table 2. Nitrogen (%) derived from atmosphere as function of phosphorus (P) and sulfur (S) levels and sulfur sources in both periods.

Cuadro 2. Nitrógeno (%) derivado de la atmósfera en función de los niveles de fósforo (P) y azufre (S) y las fuentes de azufre en ambos períodos.

Effect	Chakwal			Talagang			Overall Mean
	2006-2007	2007-2008	Mean	2006-2007	2007-2008	Mean	
P levels ($\text{kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$)							
0	52	54	53	55 b	44	50	51
40	52	54	53	56 b	43	50	51
80	52	54	53	57 a	43	50	51
LSD value	NS	NS	NS	0.7	NS	NS	NS
S sources							
Gypsum	51	54	53	56	43	49	51
Ammonium sulfate	52	54	53	56	44	50	51
LSD value	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
S levels (kg S ha^{-1})							
0	50 b	52 b	51 b	53 c	43	48 c	50 c
15	52 a	54 a	53 a	56 b	44	50 b	52 b
30	53 a	55 a	54 a	58 a	44	51 a	53 a
LSD value	0.9	1.8	1.4	0.9	NS	0.8	0.6
Interactions							
P \times S sources	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
P \times S levels	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
P \times S sources \times S levels	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Means with different letters differ significantly ($p \leq 0.05$). NS: non-significant difference ♦ Las medias con letras distintas difieren significativamente ($p \leq 0.05$). NS: diferencia no significativa.

The observations with chickpea regarding N_{dfa} appear to support the finding that P deficiency affects the process of N fixation through its secondary effects on plant growth, rather than a direct involvement in nitrogenase functioning. Similar results regarding effect of P application on N_{dfa} were reported in chickpea by Islam and Ali (2009) and white lupin (*Lupinus albus*) by Schulze *et al.* (2006). However, contrary to these findings, Hayat *et al.* (2008) report an increase up to 32 % in N_{dfa} due to application of P (80 kg P_2O_5 ha⁻¹) using mung bean (*Vigna radiate*) and mash bean (*Vigna mungo*) as test crop. There is an increase in nodule number and nitrogenase activity with P application which results in an increased N_{dfa} (Fatima *et al.*, 2007). Similar to our findings, Tang *et al.* (2001) did not observe any role of P in nodule functioning and nitrogenase activity, but the amount of N fixed increased with P application in bean (*Phaseolus vulgaris*). It seems that the role of P in N fixation varies with crop, growing conditions and time of measurement.

Results (Table 2) show no significant effect ($p>0.05$) of S sources on N derived from the atmosphere. Results regarding effect of different S sources on N_{dfa} have not been reported previously, although there are comparisons about their effect on overall plant growth. Ryant and Skladanka (2009) point out that gypsum and ammonium sulfate show similar effects on dry matter yield of forage grass and soil S status after crop harvest. Application of S significantly increased N_{dfa} at both locations, except during 2007-2008 at Talagang (Table 2). Rainfall was very low (30 mm) during the second crop growing season at Talagnag, as compared to first one (365 mm). Drought stress resulted in retarded growth of plant and lower response to S application. There was no effect ($p>0.05$) of S level at Chakwal, but there were differences ($p\leq 0.05$) at Talagang during 2006-2007. Higher dry matter yield at Talagnag during 2006-2007 (data not shown) due to favourable climatic conditions might have resulted in higher S requirement of plant.

Increase in N_{dfa} due to S application is in agreement with the findings of Habtemichial *et al.* (2007) that the N_{dfa} increased from 55 to 70 % in pods and from 44 to 56 % in faba bean (*Vicia faba*) straw when applying 30 kg S ha⁻¹ as potassium sulfate. Sulfur application enhances N requirement of plant which results in increased nodule number, nodule weight,

de P (80 kg P_2O_5 ha⁻¹), usando frijol mungo (*Vigna radiate*) y frijol mash (mash bean) (*Vigna mungo*), como cultivos de prueba. Hay un aumento en el número de nódulos y en la actividad de la nitrogenasa con la aplicación de P que resulta en un aumento de N_{dfa} (Fátima *et al.*, 2007). Asimismo, Tang *et al.* (2001) no observaron ningún efecto de P en el funcionamiento de los nódulos y la actividad de la nitrogenasa, pero la cantidad de N fijado aumentó con la aplicación de P en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). Al parecer, el efecto de P en la fijación de N varía según el cultivo, las condiciones de crecimiento y el tiempo de las mediciones.

Los resultados (Cuadro 2) no revelaron un efecto significativo ($p>0.05$) de las fuentes de S en el N derivado de la atmósfera. No hay información de resultados sobre el efecto de diferentes fuentes de S en N_{dfa} , aunque hay comparaciones acerca de sus efectos sobre el crecimiento global de la planta. Ryant y Skladanka (2009) señalan que el yeso y el sulfato de amonio muestran efectos similares en el rendimiento de la materia seca de gramíneas forrajeras y el estado del S del suelo después de la cosecha. La aplicación de S aumentó significativamente el N_{dfa} en ambas localidades, excepto durante el período 2007-2008 en Talagang (Cuadro 2). La lluvia fue muy escasa (30 mm) durante la segunda temporada de cultivo en Talagang, en comparación con la primera (365 mm). El estrés por sequía causó retrasos en el crecimiento de las plantas y una menor respuesta a la aplicación de S. La aplicación de S no tuvo efecto ($p>0.05$) en Chakwal, pero hubo diferencias ($p\leq 0.05$) en Talagang durante 2006-2007. El mayor rendimiento de la materia seca en Talagang durante 2006-2007 (datos no mostrados), debido a las condiciones climáticas favorables, puede haber resultado en un mayor requerimiento de S de la planta.

El aumento de N_{dfa} debido a la aplicación de S concuerda con los resultados de Habtemichial *et al.* (2007) de aumento de N_{dfa} de 55 a 70 % en las vainas y de 44 a 56 % en la paja de habas (*Vicia faba*) al aplicar 30 kg de S ha⁻¹ como sulfato de potasio. La aplicación de S aumenta la incorporación de N por la planta, lo cual resulta en un mayor número de nódulos, peso de nódulos, N_{dfa} y la cantidad de N fijado (Jamal *et al.*, 2010a, 2010b). Scherer *et al.* (2006) muestran resultados similares para chícharos (*Pisum sativum*) y concluyen que la fijación de N es muy sensible a los asimilados fotosintéticos y el menor

N_{dfa} and amount of N fixed (Jamal *et al.*, 2010a, 2010b). Scherer *et al.* (2006) report similar results for peas (*Pisum sativum*) and they conclude that N fixation is very sensitive to photosynthetic assimilates and reduced supply of carbohydrate results in low N fixation in S starved plants.

Amount of nitrogen fixed

Phosphorus application significantly increased the amount of N fixed at both locations (Table 3), and response to P application was higher (36 % increase over control) at Talagang as compared to Chakwal (30 % increase over control). This higher response of Chickpea crop at Talagang might be due to the fact that Talagang soil had lower available P as indicated by fertility status of soil samples taken before starting the experiment.

Data pooled over locations and years indicated that amount of N fixed increased from 42 to 56 kg ha⁻¹ as a response to P application (0 to 80 kg ha⁻¹) (Table 3), which was mainly due to improvement in host plant growth. These results are in line with the

suministro de carbohidratos causa fijación baja de N en las plantas escasas de S.

Cantidad de nitrógeno fijado

La aplicación de fósforo aumentó significativamente la cantidad de N fijado en ambas localidades (Cuadro 3), y la respuesta a la aplicación de P fue mayor (36 % de aumento sobre el control) en Talagang en comparación con Chakwal (30 % de aumento sobre el testigo). Esta mayor respuesta del cultivo de garbanzo en Talagang podría deberse a que el suelo de este sitio tenía una menor cantidad de P disponible, como se indica en el estado de fertilidad de las muestras de suelo tomadas antes de comenzar el experimento.

Los datos agrupados por localidades y años indicaron que la cantidad de N fijado aumentó de 42 a 56 kg ha⁻¹ en respuesta a la aplicación de P (0 a 80 kg ha⁻¹) (Cuadro 3), que se debió principalmente a un mejor crecimiento de la planta huésped. Estos resultados concuerdan con las conclusiones de Somado *et al.* (2006), quienes observaron que ni la nodulación ni

Table 3. Amount of nitrogen fixed (kg ha⁻¹) as function of phosphorus (P) and sulfur (S) levels and sulfur sources in both periods. Cuadro 3. Cantidad de nitrógeno fijado (kg ha⁻¹) en función de los niveles de fósforo (P) y azufre (S) y las fuentes de azufre en ambos períodos.

Effect	Chakwal			Talagang			Overall mean
	2006-2007	2007-2008	Mean	2006-2007	2007-2008	Mean	
P levels (kg P ₂ O ₅ ha ⁻¹)							
0	44 b	37 c	40c	57 b	32 c	45c	42c
40	57 a	41 b	49b	69 ab	47 b	53b	51b
80	60 a	44 a	52a	80 a	52 a	61a	56a
LSD value	4.5	2.3	1.2	11.9	2.9	3.1	0.7
S sources							
Gypsum	52 b	40	46b	65 b	36	51b	48b
Ammonium sulfate	55 a	41	48a	72 a	38	55a	51a
LSD value*	*	NS	*	*	*	*	*
S levels (kg S ha ⁻¹)							
0	47 c	37 c	42c	60 c	34 c	47c	44c
15	55 b	41 b	48b	70 b	37 b	53b	51b
30	58 a	44 a	51a	76 a	40 a	58a	55a
LSD value	1.7	1.6	1.2	2.7	1.4	1.5	0.4
Interactions							
P × S sources	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
P × S levels	3.0	NS	2.0	NS	NS	NS	0.6
S sources × S levels	2.4	NS	1.6	3.8	2.0	2.1	0.5
P × S sources × S levels	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Means with different letters differ significantly ($p \leq 0.05$). NS: non-significant difference. *: significant difference ♦ Las medias con diferentes letras difieren significativamente ($p \leq 0.05$). NS: diferencia no significativa. *: diferencia significativa.

findings of Somado *et al.* (2006) who observed that neither nodulation nor N_{dfa} was significantly affected by P application, but rather total N accumulation was enhanced due to an improved biomass yield.

Ammonium sulfate treated plots had higher amount of N fixed as compared to gypsum treatments at both locations (Table 3), since the effect of applying 30 kg S ha⁻¹ as gypsum was significantly lower than 30 kg S ha⁻¹ as ammonium sulfate (Table 4). This lower response of chickpea to gypsum application may be due to slow release of S from this source (Girma *et al.*, 2005). After several experiments, Ghosh *et al.* (2000) conclude that for immediate S deficiency relief, readily soluble sources like ammonium sulfate outclassed less soluble sources such as gypsum; they also observed that in calcareous soils, gypsum was less effective as compared to ammonium sulfate.

Sulfur treatments were in descending order of S_2 (30 kg S ha⁻¹) > S_1 (15 kg S ha⁻¹) > S_0 (0 kg S ha⁻¹) regarding amount of N fixed at both locations (Table 3). Increases in amount of N fixed due to S application were reported by Scherer *et al.* 2008. Sulfur deficiency results in low leghemoglobin content which might be one of the reasons for low nitrogenase activity (Scherer, 2008). Lower and higher levels of P and S differed significantly regarding amount of N fixed, since the P×S level interaction was significant at Chakwal but not at Talagang. Data pooled over locations and years indicated that the highest amount of N (61 kg a⁻¹) was fixed with treatment P_2S_2 (80 kg P_2O_5 and 30 kg S ha⁻¹) followed by P_2S_1 (80 kg P_2O_5 and 15 kg S ha⁻¹) and the lowest in control (Table 6).

N_{dfa} fueron afectados significativamente por la aplicación de P, sino que la acumulación total de N aumentó debido a un mayor rendimiento de biomasa.

Las parcelas tratadas con sulfato de amonio tenían una mayor cantidad de N fijado en comparación con los tratamientos con yeso en ambas localidades (Cuadro 3), ya que el efecto de aplicar 30 kg de S ha⁻¹ como yeso fue significativamente inferior a 30 kg S ha⁻¹ como sulfato de amonio (Cuadro 4). Esta menor respuesta de los garbanzos a la aplicación de yeso se puede deber a la liberación lenta de S de esta fuente (Girma *et al.*, 2005). Después de varios experimentos, Ghosh *et al.* (2000) concluyen que como solución inmediata a la deficiencia de S están las fuentes fácilmente solubles como el sulfato de amonio, que superaron a las fuentes menos solubles como el yeso. También observaron que en los suelos calcáreos, el yeso fue menos eficaz comparado con el sulfato de amonio.

Los tratamientos de S fueron en orden decreciente de S_2 (30 kg S ha⁻¹) > S_1 (15 kg S ha⁻¹) > S_0 (0 kg S ha⁻¹) con respecto a la cantidad de N fijado en ambas localidades (Cuadro 3). Hay aumentos en la cantidad de N fijado debido a la aplicación de S fueron (Scherer *et al.*, 2008). La deficiencia de S causa un menor contenido de leghemoglobina, lo que podría ser una de las razones de la baja actividad de la nitrogenasa (Scherer, 2008). Los niveles menores y mayores de P y S difirieron significativamente con respecto a la cantidad de N fijado, ya que la interacción de los niveles de P×S fue importante en Chakwal, pero no en Talagang. Los datos agrupados por localidades y años

Table 4. Amount of nitrogen fixed as function of sulfur (S) levels from two sulfur sources.

Cuadro 4. Cantidad de nitrógeno fijado en función de los niveles de azufre (S) de las dos fuentes de S.

Treatments	Chakwal		Talagang			Overall Mean
	2006-2007	Mean	2006-2007	2007-2008	Mean	
Gypsum (kg S ha ⁻¹)						
0	47 d	42 d	58 d	34 cd	46 d	44 d
15	53 c	47 c	67 c	36 c	52 c	49 c
30	55 bc	49 b	71 bc	39 b	55 b	52 b
Ammonium sulfate (kg S ha ⁻¹)						
0	47 d	42 d	62 d	33 d	47 d	45 d
15	57 b	49 b	72 b	38 b	55 b	52 b
30	61 a	53 a	82 a	42 a	62 a	57 a

Means with different letters differ significantly ($p \leq 0.05$) ♦ Las medias con diferentes letras difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Nitrogen uptake

Different P and S levels had significant effect on N uptake at both locations (Table 5). Data pooled over locations and years indicated that N uptake increased from 55 to 72 kg ha⁻¹ and from 59 to 69 kg ha⁻¹ as P application rate was increased from 0 to 80 kg P₂O₅ ha⁻¹ and S application rate from 0 to 30 kg S ha⁻¹. Increase in N uptake due to P application confirms the findings of Shu-Jie *et al.* (2007) and Reed *et al.* (2007). This increment in N uptake might be attributed to a better plant growth.

Sulfur sources significantly affected ($p \leq 0.05$) N uptake which was higher for ammonium sulfate as compared to gypsum (Table 5). The treatment receiving 30 kg S ha⁻¹ as gypsum was significantly lower than 30 kg S ha⁻¹ as ammonium sulfate (Table 7). Contrary to these findings, Khalid *et al.* (2009b) report no significant difference between gypsum and ammonium sulfate regarding seed yield of *Brassica napus*, although ammonium sulfate caused a higher S concentration in plant tissue. The effect of different S sources also varies with the crop, soil

indicaron que la mayor cantidad de N (61 kg a⁻¹) se fijó con el tratamiento P₂S₂ (80 kg P₂O₅ y 30 kg S ha⁻¹), seguido de P₂S₁ (80 kg P₂O₅ y 15 kg S ha⁻¹) y la menor en el tstigo (Cuadro 6).

Absorción de nitrógeno

Los diferentes niveles de P y S tuvieron un efecto significativo en la absorción de N en ambas localidades (Cuadro 5). Los datos agrupados por localidades y años indicaron que la absorción de N aumentó de 55 a 72 kg ha⁻¹ y de 59 a 69 kg ha⁻¹, ya que la tasa de aplicación de P aumentó de 0 a 80 kg P₂O₅ ha⁻¹ y la tasa de aplicación de S de 0 a 30 kg S ha⁻¹. El aumento en la absorción de N debido a la aplicación de P confirma los hallazgos de Shu-Jie *et al.* (2007) y Reed *et al.* (2007). Este aumento en la absorción de N se puede atribuir a un mejor crecimiento de las plantas.

Las fuentes de S afectaron significativamente ($p \leq 0.05$) la absorción de N que fue mayor para el sulfato de amonio en comparación con el yeso (Cuadro 5). El tratamiento que recibió 30 kg S ha⁻¹ como yeso fue significativamente inferior a los 30 kg S ha⁻¹

Table 5. Nitrogen uptake (kg ha⁻¹) as function of phosphorus (P), and sulfur (S) levels and S sources in both periods.

Cuadro 5. Absorción de nitrógeno (kg ha⁻¹) en función de los niveles de fósforo (P) y azufre (S) y las fuentes de S en ambos períodos.

Effect	Chakwal			Talagang			Overall mean
	2006-2007	2007-2008	Mean	2006-2007	2007-2008	Mean	
P levels (kg P ₂ O ₅ ha ⁻¹)							
0	57 b	45 c	51 c	69b	48 c	58 c	55 c
40	73 a	51 b	62 b	82a	56 b	69 b	66 b
80	77 a	54 a	65 a	94a	65 a	80 a	72 a
LSD value	7.9	1.2	1.6	13.2	1.7	3.6	2.3
S sources							
Gypsum	67b	50	58 b	78b	55 b	67 b	63 b
Ammonium sulfate	70a	50	60 a	85a	58 a	71 a	66 a
LSD value*	*	NS	*	*	*	*	*
S levels (kg S ha ⁻¹)							
0	63 c	47 c	55 c	75c	52 c	63 c	59 c
15	71 b	50 b	60 b	83b	56 b	69 b	65 b
30	73 a	53 a	63 a	88a	61 a	74 a	69 a
LSD value	2.0	1.4	1.1	3.2	1.7	1.8	1.0
Interactions							
P × S sources	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
P × S levels	3.5	NS	2.0	NS	NS	NS	1.8
S sources × S levels	2.9	NS	1.6	NS	NS	2.5	1.5
P × S sources × S levels	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Means with different letters differ significantly ($p \leq 0.05$). NS: non-significant difference. *: significant difference ♦ Las medias con diferentes letras difieren significativamente ($p \leq 0.05$). NS: diferencia no significativa. *: diferencia significativa

Table 6. Amount of nitrogen fixed and nitrogen uptake as a function of phosphorus within each sulfur level in 2006-2007.**Cuadro 6. Cantidad de nitrógeno fijado y absorción de nitrógeno en función del fósforo dentro de cada nivel de azufre, en el período 2006-2007.**

Treatments	Amount of N fixed (kg ha ⁻¹)			Nitrogen uptake (kg ha ⁻¹)		
	Chakwal			Chakwal		
	2006-2007	Mean	Overall mean	2006-2007	Mean	Overall mean
P ₀ S ₀	39 e	36 f	38 h	53 f	47 e	51 g
P ₀ S ₁₅	45 e	40 e	42 g	57 e	51 d	55 f
P ₀ S ₃₀	48 d	44 d	47 e	60 e	54 c	59 e
P ₄₀ S ₀	48 d	42 d	44 f	64 d	56 c	60 e
P ₄₀ S ₁₅	59 b	50 b	52 d	74 b	63 b	66 d
P ₄₀ S ₃₀	63 a	54 a	56 c	79 a	67 a	71 c
P ₈₀ S ₀	53 c	47 c	50 d	71 c	61 b	67 d
P ₈₀ S ₁₅	63 a	54 a	58 b	81 a	67 a	74 b
P ₈₀ S ₃₀	63 a	55 a	61 a	79 a	68 a	76 a

Means with different letters differ significantly ($p \leq 0.05$) ♦ Las medias con diferentes letras difieren significativamente ($p \leq 0.05$).**Table 7. Nitrogen uptake (kg ha⁻¹) as function of sulfur levels from two sulfur sources in 2006-2007.****Cuadro 7. Absorción de nitrógeno (kg ha⁻¹) en función de los niveles de azufre de dos fuentes de azufre, en el período 2006-2007.**

Sulfur source	Chakwal		Talagang Mean	Overall mean
	2006-2007	Mean		
Gypsum (kg S ha ⁻¹)				
0	63 d	55 d	62 d	59 d
15	69 c	59 c	67 c	63 c
30	70 bc	61 b	71 b	66 b
Ammonium sulfate (kg S ha ⁻¹)				
0	63 d	55 d	65 d	60 d
15	73 b	62 b	71 b	67 b
30	76 a	65 a	78 a	71 a

Means with different letters differ significantly ($p \leq 0.05$) ♦ Las medias con diferentes letras difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

and climatic conditions. Gypsum and single super phosphate are superior to AS in coarse textured soils due to beneficial role of calcium and due to less leaching losses as sulfate (Till, 2010). In our study ammonium sulfate was better than gypsum due to: 1) low rainfall caused less leaching of sulfate from ammonium sulfate especially during 2007-2008; and 2) soils in both locations were S deficient and therefore S was needed immediately.

The P by S level interaction was significant at Chakwal but not at Talagang when data were pooled over locations and years. Statistical analysis of the data combined over location and years indicated that the highest N uptake (76 kg ha⁻¹) was recorded for

como sulfato de amonio (Cuadro 7). Contrario a estos resultados, Khalid *et al.* (2009b) reportan una diferencia no significativa entre el yeso y el sulfato de amonio en el rendimiento de semilla de *Brassica napus*, aunque el sulfato de amonio causó una mayor concentración de S en el tejido de la planta. El efecto de las diferentes fuentes de S también varía con las condiciones del cultivo, el suelo y el clima. El yeso y el superfosfato son superiores a AS en suelos de textura gruesa debido a la función beneficiosa del calcio y a las menores pérdidas por lixiviación como sulfato (Till, 2010). En el presente estudio el sulfato de amonio fue mejor que el yeso debido a: 1) la escasa precipitaciones causó una menor lixiviación de sulfato a

P_2S_2 (80 kg P_2O_5 and 30 kg S ha^{-1}) followed by P_2S_1 (80 kg P_2O_5 and 15 kg S ha^{-1}) and the lowest in control (Table 6).

Increased N uptake as a result of S application may also be due to an increment in protein synthesis and then in photosynthesis (Zhao *et al.*, 2008). In the absence of S, amino acids cannot be transformed into proteins, which results in reduced N acquisition (Varin *et al.*, 2009). In different crops there is a significant positive correlation of N and S content with protein content in seeds (Bahmanyar and Poshtmasari, 2010). In fact N fixation and N uptake show a direct relationship which is also confirmed by a strong positive correlation between these two variables (Table 8).

CONCLUSIONS

Application of P and sulfur significantly increased N fixed and N uptake. The effect of P application on N fixation was due to an effect on host plant growth, whereas sulfur was directly involved in N fixed since a deficiency of this element will reduce N_{dfa} . Ammonium sulfate was a more efficient source of S as compared to gypsum regarding the effect on N fixed. Sulfur should be included in fertilizer recommendation along with P in order to optimize sustainability of soil resources.

LITERATURE CITED

- Bahmanyar, M. A., and H. K. Poshtmasari. 2010. Influence of nitrogen and sulfur on yield and seed quality of three canola cultivars. *J. Plant Nutr.* 33: 953-965.
- Claro-Cortes, P., R. Nuñez-Escobar, and J. D. Etchevers-Barra, P. Sánchez-García, y J. Alvarado-López. 2002. Green house grown maize response to sulfur in two soils of Puebla State, Mexico. *Agrociencia* 36: 633-642.

partir del sulfato de amonio, especialmente durante 2007-2008, y 2) los suelos de ambas localidades eran deficientes en S y por tanto se debía aplicar de inmediato.

La interacción de P y S fue significativa en Chakwal, pero no en Talagang cuando los datos se agruparon por lugares y años. El análisis estadístico de los datos combinados de localidades y años indicaron que la mayor absorción de N (76 kg ha^{-1}) se registró en P_2S_2 (80 kg de P_2O_5 y 30 kg de S ha^{-1}), seguido de P_2S_1 (80 kg de P_2O_5 y 15 kg de S ha^{-1}) y la menor en el control (Cuadro 6).

La mayor absorción de N debido a la aplicación de S puede deberse también a un aumento en la síntesis de proteínas y luego en la fotosíntesis (Zhao *et al.*, 2008). En ausencia de S, los aminoácidos no se pueden transformar en proteínas, lo cual resulta en una adquisición menor de N (Varin *et al.*, 2009). En diferentes cultivos hay una correlación positiva y significativa del contenido de N y S con el contenido de proteína en las semillas (Bahmanyar y Poshtmasari, 2010). De hecho, la fijación de N y su absorción muestran una relación directa, que también es confirmada por una fuerte correlación positiva entre estas dos variables (Cuadro 8).

CONCLUSIONES

La aplicación de P y S aumentó significativamente la fijación y absorción de N. El efecto de la aplicación de P en la fijación del N se debió a un efecto sobre el crecimiento de la planta hospedera, mientras que el S participó directamente en la fijación del N, ya que la deficiencia de este elemento redujo el N_{dfa} . El sulfato de amonio resultó ser una fuente más eficiente de S en comparación con el yeso en relación al efecto sobre el N fijado. Se debe incluir el S entre

Table 8. Correlation coefficients for amount of nitrogen fixed and nitrogen uptake.

Cuadro 8. Coeficientes de correlación para la cantidad de nitrógeno fijado y absorción de nitrógeno.

Parameter	Chakwal			Talagang		
	N_{dfa}	Amount of nitrogen fixed	Nitrogen uptake	N_{dfa}	Amount of nitrogen fixed	Nitrogen uptake
Amount of nitrogen fixed	0.02	1.00		0.89 [†]	1.00	
Nitrogen uptake	-0.18	0.98 [†]	1.00	0.78 [†]	0.98 [†]	1.00

[†] Significance ♦ Significancia.

Fatima, Z., M. Zia, and M. F. Chaudhry. 2007. Interactive effect of Rhizobium strains and P on soybean yield, nitrogen fixation and soil fertility. *Pak. J. Bot.* 39: 255-264.

FAO. 2009. FAOSTAT. http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#_anchor (accessed: October 2010).

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 sulfur 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.

Ghosh, P. K., K. M. Hati, K. G. Mandal, A. K. Misra, R. S. Chaudhry, and K. K. Bandyopadhyay. 2000. Sulphur nutrition in oil seeds and oilseed based cropping systems. *Fertilizer News* 45: 27-40.

Girma, K., J. Mosali, K. W. Freeman, W. R. Freeman, W. R. Raun, K. L. Martin, and W. E. Thomason. 2005. Forage and grain yield response to applied sulphur in winter wheat as influenced by source and rate. *J. Plant Nutr.* 28: 1541-53.

Government of Pakistan. 2010. Agricultural Statistics of Pakistan 2008-09. Ministry of Food Agriculture and Livestock, (Economic Wing) Islamabad Pakistan. 45 p.

Habtemichial, K. H., B. R. Singh, and J. B. Aune. 2007. Wheat response to N₂ fixed by faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by sulfur fertilization and rhizobial inoculation in semi arid Northern Ethiopia. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170: 412-418.

Hayat, R., S. Ali, M. T. Siddique, and T. H. Chatha. 2008. Biological nitrogen fixation of summer legumes and their residual effects on subsequent rainfed wheat yield. *Pak. J. Bot.* 40: 711-22.

Islam, M., and S. Ali 2009. Effect of integrated application of sulphur and phosphorus on nitrogen fixation and nutrient uptake by chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Agrociencia* 43: 815-826.

Islam, M., S. Ali, and Hayat R. 2009. Effect of integrated application of phosphorus and sulphur on yield and micronutrient uptake by chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int. J. Agri. Biol.* 1: 33-38.

Jamal, A., Y. S. Moon, and M. Z. Abdin. 2010a. Enzyme activity assessment of peanut (*Arachis hypogea* L.) under slow release sulfur fertilization. *Aust. J. Crop Sci.* 4: 169-174.

Jamal, A., Y. S. Moon, and M. Z. Abdin. 2010b. Sulfur- a general overview and interaction with nitrogen. *Aust. J. Crop Sci.* 4: 523-529.

Khalid, K., K. S. Khan, G. Shabbir, M. Yousaf, and S. Y. Naz. 2009a. Status of plant available sulfur and its relationship to other soil characteristics in pothwar soils. *Pak. J. Scient. Indust. Res.* 52: 84-90.

Khalid, K., K. S. Khan, M. Yousaf, G. Shabbir, and A. Subhani. 2009b. Effect of sulfur fertilization on rapeseed and plant available sulfur in soils of Pothwar, Pakistan. *Sarhad J. Agri.* 25: 66-71.

Kyei-Boahen, S., A. Slankard, and F. Walley. 2002. Isotopic fractionation during N₂ fixation by chickpea. *Soil Biol. Biochem.* 34: 417-20.

Reed, S. C., T. R. Seastedt, C. M. Mann, K. N. Suding, A. R. Townsend, and K. L. Cherwin. 2007. Phosphorus fertilization

los fertilizantes recomendados, así como el P, con el fin de optimizar la sostenibilidad de los recursos del suelo.

—Fin de la versión en español—



stimulates nitrogen fixation and increases inorganic nitrogen concentration in a restored prairie. *Appl. Soil Ecol.* 36: 238-242.

Rochester, I., M. B. Peoples, G. A. Constable, and R. Gault. 1998. Faba beans and other legumes add nitrogen to irrigated cotton cropping systems. *Aust. J. Exp. Agric.* 38: 253-260.

Ryan, J., G. Estefan, and A. Rashid. 2001. Soil and Plant Analysis Laboratory Manual. International Center for Agricultural Research in Dry Areas (ICARDA) Aleppo, Syria. pp:118-127.

Ryant, P. and J. Skladanka. 2009. The effect of applications of various forms of sulfur on the yields and quality of grass forage. *Acta Agri. Scandinavica Section B, Soil Plant Sci.* 59:208-216.

Scherer, H. W. 2009. Sulfur in soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 326-335.

Scherer, H. W. 2008. Impact of sulfur on N₂ fixation of legumes. *In: Khan, N.A. (ed). Sulfur assimilation and abiotic stress in plants. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.* pp: 51-60.

Scherer, H. W., S. Pacyna, N. Manthey, and M. Schulz. 2006. Sulfur supply to peas (*Pisum sativum* L.) influence symbiotic nitrogen fixation. *Plant Soil Environ.* 2: 72-77.

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. Fert. Soils* 44: 909-916.

Schulze, J., G. Temple, S. J. Temple, H. Beschow, and C. P. Vance. 2006. Nitrogen fixation by white lupin under phosphorus deficiency. *Ann. Bot.* 98: 731-740.

Shu Jie, M. Q., Q. Yun-Fa, and H. Xiao-Zeng. 2007. Nodule formation and development in soybean (*Glycine max*) in response to phosphorus supply in solution culture. *Pedosphere* 17: 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.

Tang, C., P. J. Hinsiger, J. J. Drevon, and B. Jaillard. 2001. Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances proton release in roots of *Medicago truncatula* L. *Ann. Bot.* 88: 131-138.

Till, A. R. 2010. Sulphur and Sustainable Agriculture. International Fertilizer Industry Association, Paris. pp: 45-55.

Unkovich, M., D. Herridge, M. Peoples, G. Cadisch, B. Boddey, K. Giller, B. Alves, and P. Chalk. 2008. Measuring Plant-

- associated Nitrogen Fixation in Agricultural Systems. Monograph No. 136. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) Australia. pp: 132-188.
- 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.
- 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: 473-83.