

**Caracterização inicial do metabolismo de nitrogênio em *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC em resposta a presença de amônio**

Raissa Cristina Silva Mazareli<sup>1</sup>, Patricia Cristina Barros<sup>1</sup>, Jailson Vieira Aguilar<sup>1</sup>, Tassia Caroline Ferreira<sup>1</sup>, Liliane Santos de Camargos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UNESP - Univ Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Departamento de Biologia e Zootecnia, CEP 15385-000, S.P., Brazil

raissa\_mazarelli@hotmail.com, paty\_46barros@hotmail.com, aguilarbio@gmail.com, tassinha\_05@hotmail.com, camargos@bio.feis.unesp.br

**Resumo:** *Alysicarpus vaginalis* é uma herbácea da família Fabaceae de baixo crescimento anual ou de curta duração perene, extremamente variável em relação ao hábito, forma de folhas e cor da flor, de ampla distribuição geográfica, estendendo-se da África, Índia, leste da Ásia até a Austrália. Há relatos de utilização para compor pastagens, feno e forragem e/ou como estratégia para o controle da erosão. No Brasil, é considerada uma planta daninha, cuja ocorrência vem aumentando em áreas urbanas e rurais do estado de São Paulo. Cresce bem em solos moderadamente ácidos, mas não tolera salinidade; cresce em solos úmidos, mas não em condições de alagamento, no entanto pode sobreviver em curto tempo de inundação. Diante da ausência de dados sobre o metabolismo e por apresentar potencial de utilização para alimentação de ovelhas e cavalos, tendo sua palatabilidade e aceitabilidade similar à alfafa (*Medicago sativa*) e *Aechynomene americana*, estudamos o comportamento fisiológico desta espécie na presença de amônio. Observamos que a nodulação em *Alysicarpus vaginalis* não é afetada, mas o conteúdo de ácido alantóico em tecidos (folhas, raízes e nódulos) é influenciado pela variação na concentração de amônio fornecido à planta.

**Palavras-chave:** ureídeos, nodulação, fixação de nitrogênio.

**Initial characterization of nitrogen metabolism in *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC in response to ammonium presence**

**Abstract:** *Alysicarpus vaginalis* is an herbaceous Fabaceae family of low-growing annual or short-lived perennial, extremely variable with regard to the habit, form of leaves and flower color, geographically widespread, extending from Africa, India, East Asia until Australia. No reports of use to compose pastures, hay and forage and/or as a strategy to control erosion. In Brazil, it is considered a weed, whose occurrence is increasing in urban and rural areas of the state of 'São Paulo'. It grows well on soils moderately acidic, but not tolerate salinity; develops in moist soils but not waterlogged conditions, however can survive in a short time of flooding. Given the lack of data on the metabolism and provide potential use for feeding sheep and horses, and its palatability and acceptability similar to alfalfa (*Medicago sativa*) and *Aechynomene americana*, we study the physiological behavior of this species in the

presence of ammonium. We observed that nodulation in *Alysicarpus vaginalis* is not affected, but the allantoinic acid content in tissues (leaves, roots and nodules) is influenced by variation in the concentration of ammonium supplied to the plant.

**Key-words:** ureides, nodulation, nitrogen fixation.

### Introdução

As principais fontes de N nos ambientes agrícolas disponíveis para as plantas são o  $\text{NH}_4^+$  e o  $\text{NO}_3^-$ , as quais coexistem sob variadas relações e concentrações (Britto e Kronzucker, 2005), desde a faixa  $\mu\text{mol L}^{-1}$  até  $\text{mmol L}^{-1}$  em várias ordens de magnitude (Marschner, 1995).

O nitrogênio está presente em compostos nitrogenados importantes, como as bases nitrogenadas e os ácidos nucleicos, que perfazem cerca de 10% do total do nitrogênio na planta, além de ser constituinte dos aminoácidos livres e proteicos, outras formas amino solúveis chegam a compor 5% do N das plantas. A fração presente como  $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4^+$  geralmente representa baixa porcentagem (Conn e Stumpf, 1975; Mengel e Kirkby, 1987).

A maior parte de N disponível não só no solo alagado mas também em solos ácidos está na forma de  $\text{NH}_4^+$  (Williams e Miller, 2001), e sua absorção e assimilação bioquímica são favorecidas em relação ao  $\text{NO}_3^-$  porque seu estado de oxidação elimina a necessidade de redução química na célula (Howitt e Udvardi, 2000). Em baixas concentrações ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), o  $\text{NH}_4^+$  pode ser uma fonte adequada de N para as plantas, porém, em maiores concentrações ( $\text{mmol L}^{-1}$ ), pode causar problemas de toxidez, principalmente quando administrado como fonte isolada de N (Gerendas et al., 1997), podendo, em casos severos, levá-las à morte (Kronzucker et al., 2000; Britto e Kronzucker, 2002).

As plantas adquirem nitrogênio do solo na forma de nitrato, amônio, uréia e aminoácidos (Williams e Miller, 2001), prevalecendo o nitrato em grande parte dos solos por ser o produto final da utilização microbiológica do nitrogênio amoniacal, onde bactérias quimiossintetizantes dos gêneros *Nitrossomonas* e *Nitrobacter* oxidam a amônio e utilizam os elétrons removidos no seu metabolismo. Como o solo possui carga elétrica líquida negativa, o nitrato não se liga eletrostaticamente a esta matriz, sendo facilmente lixiviado quando não absorvido pelos vegetais. Em condições especiais de solo que inibem a atividade metabólica destas bactérias quimiossintetizantes, tais como anoxia, alta concentração de compostos fenólicos e alta acidez, o nitrogênio fixado disponível preponderante é a amônio que, em ambientes básicos, volatiliza-se, sendo perdida do sistema explorado pelos vegetais, o solo.

Inversamente, em ambientes ácidos mantêm-se na forma protonada, podendo interagir com os colóides do solo.

As plantas utilizam o nitrogênio na formação de algumas estruturas e, em seguida, o disponibilizam a todos os indivíduos da cadeia alimentar. Alguns tipos de vegetais interagem com as bactérias fixadoras de nitrogênio, retirando diretamente do ar o nitrogênio, em forma gasosa, e transformando-o em formas absorvíveis. Uma das associações mais conhecidas é a que ocorre entre várias espécies de leguminosas e as bactérias da família *Rhizobiaceae* e pode ser verificada através da formação de nódulos nas raízes. Nos nódulos, a bactéria reduz  $N_2$  à amônia que é incorporada em compostos orgânicos pela via GS/GOGAT.

*Alysicarpus vaginalis* é uma herbácea da família Fabaceae de baixo crescimento anual ou de curta duração perene, extremamente variável em relação ao hábito e forma de folhas e cor da flor, de ampla distribuição geográfica, estendendo-se da África, Índia, leste da Ásia até a Austrália havendo relatos de utilização para compor pastagens, feno e forragem e/ou como estratégia para o controle da erosão. No Brasil, é considerada uma planta daninha, cuja ocorrência vem aumentando em áreas urbanas e rurais do estado de São Paulo (National Plant Data Center, 2000).

Cresce bem em solos moderadamente ácidos, mas não tolera salinidade, cresce em solos úmidos, mas não em condições de alagamento, mas pode sobreviver em curto tempo de inundação. Há também relatos de susceptibilidade ao ataque de nematoides (Delgado, et. al. 1999).

Faz-se interessante o estudo do comportamento fisiológico desta espécie, pois segundo Delgado et. al. (1999), esta espécie apresenta potencial de utilização para alimentação de ovelhas e cavalos, tendo sua palatabilidade e aceitabilidade similar à alfafa (*Medicago sativa*) e *Aechynomene americana*.

Diante da ausência de informações sobre o metabolismo destas espécies, o presente estudo buscou verificar as variações na concentração de aminoácidos, amônio e ureídeos em plantas *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC recebendo concentrações crescentes de amônio ( $NH_4^+$ ).

## Material e Métodos

### *Condução do experimento e obtenção das amostras*

A pesquisa foi realizada no Laboratório Fisiologia do Metabolismo Vegetal do Departamento de Biologia na Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Ilha Solteira, cujas coordenadas geográficas são: Altitude: 337.0, Latitude: 20.0° 25.0' 24.4" Longitude: 51.0° 21.0' 13.1". O clima da região segundo classificação de Koppen é Cwa

(subtropical úmido, seco no inverno e com chuva no verão), com temperatura média anual de 23°C.

Estacas de *Alysicarpus vaginalis* foram coletadas e colocadas em vasos de 4 L contendo vermiculita e areia (1:1), contendo duas plantas por vaso. O método de estaquia utiliza pequenos segmentos de caule, que, quando plantados, se desenvolverão em novas plantas. Utilizou-se AIB (ácido indol-butírico) a 1% (em talco inerte) para auxiliar no enraizamento.

Em casa de vegetação, com temperatura mantida entre 28°C e 31°C, sem controle de fotoperíodo, as plantas foram inoculadas com bactérias do grupo do *Rhizobium* obtidos de nódulos de plantas adultas. Após a nodulação efetiva, com plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio, em pH próximo da neutralidade, foram estabelecidos os tratamentos tendo como base a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1938). Foram utilizadas concentrações crescentes de amônio em solução: 0; 5; 7,5; 15 e 30 mM, utilizando-se sulfato de amônio como fonte para preparo da solução. Após o período de tratamento (28 dias), os tecidos foram separados (folhas, raízes e nódulos) foram armazenados em freezer para as análises posteriores. Os compostos nitrogenados dos tecidos (folhas, raiz e nódulos) foram extraídos de acordo com Bielski e Turner (1966).

### ***Quantificação de compostos nitrogenados***

Aminoácidos totais, amônio e ureídeos (alantoína e ácido alantóico) presentes nos tecidos foram analisados de acordo com metodologia descrita por Yemm e Cocking (1955), McCullough (1967) e Vogels e Van Der Drift (1970), respectivamente. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados foram apresentados como a média de quatro repetições e os tratamentos foram comparados pelo teste Tukey a 5% de significância pelo programa Varpc.

### **Resultados e Discussão**

A toxidez ao  $\text{NH}_4^+$  é variável entre espécies de plantas, podendo ser tolerado por algumas e não tolerado por outras. No entanto, mesmo espécies tolerantes podem apresentar sintomas de toxidez, como redução do crescimento, sobretudo quando associado à baixa disponibilidade de outros nutrientes. Pode-se observar tanto alterações no crescimento, interferência na nodulação (positiva ou negativa) e alterações a nível de metabolismo.

Em plantas de soja recebendo amônio, concentrações da ordem de 10 mM tem efeito inibitório tanto na nodulação quanto na fixação, ao passo que concentrações menores (entre 1-3 mM) apresentaram efeito positivo na nodulação e N-fixação (Gan et al, 2004).

Já em plantas de *Pisum sativum*, em condições de salinidade, foi observado maior acúmulo de biomassa quando recebendo 5 mM de nitrogênio na forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , em relação a plantas que recebiam a mesma dose de nitrogênio na forma de nitrato ou amônio separadamente (Figueira & Caldeira, 2005). Figueira & Caldeira (2005) relata que é possível estabelecer simbiose efetiva em *Pisum sativum* sob salinidade mediante o uso de um N-fertilizante apropriado.

No presente trabalho, quando analisa-se o efeito do amônio sobre a capacidade de fixação em *A. vaginalis*, pode-se observar que não houve alteração na nodulação, uma vez que a massa fresca dos nódulos não variou significativamente (Tabela 2), mas o conteúdo de ureídeos em nódulos foi afetado (Tabela 1).

**Tabela 1:** Quantificação de aminoácidos, ureídeos, ácido alantóico e amônio solúvel em tecidos de plantas de *A. vaginalis* submetidas a diferentes tratamentos com amônio. Dados expressos em micromoles/gramas de massa fresca.

|                        | Aminoácidos | Ureídeos | Ácido Alantóico | $\text{NH}_4^+$ |
|------------------------|-------------|----------|-----------------|-----------------|
| <b>Parte Aérea</b>     |             |          |                 |                 |
| 5 mM $\text{NH}_4^+$   | 13,84 NS    | 3,93 NS  | 5,37 b          | 6,12 NS         |
| 7,5 mM $\text{NH}_4^+$ | 13,84 NS    | 4,26 NS  | 9,14 b          | 5,86 NS         |
| 15 mM $\text{NH}_4^+$  | 13,74 NS    | 3,83 NS  | 4,90 b          | 5,53 NS         |
| 30 mM $\text{NH}_4^+$  | 11,46 NS    | 3,34 NS  | 2,59 b          | 6,63 NS         |
| controle               | 10,89 NS    | 3,56 NS  | 19,88 a         | 1,21 NS         |
| <b>Raízes</b>          |             |          |                 |                 |
| 5 mM $\text{NH}_4^+$   | 14,99 NS    | 3,06 NS  | 7,52 ab         | 6,61 NS         |
| 7,5 mM $\text{NH}_4^+$ | 12,74 NS    | 2,53 NS  | 8,58 ab         | 5,42 NS         |
| 15 mM $\text{NH}_4^+$  | 10,84 NS    | 2,13 NS  | 5,07 b          | 2,19 NS         |
| 30 mM $\text{NH}_4^+$  | 14,84 NS    | 2,40 NS  | 7,14 ab         | 3,91 NS         |
| controle               | 10,89 NS    | 2,98 NS  | 14,15 a         | 3,54 NS         |
| <b>Nódulos</b>         |             |          |                 |                 |
| 5 mM $\text{NH}_4^+$   | 31,42 b     | 12,19 a  | 23,22 a         | 4,64 b          |
| 7,5 mM $\text{NH}_4^+$ | 54,96 b     | 12,04 a  | 19,25 ab        | 4,57 b          |
| 15 mM $\text{NH}_4^+$  | 49,87 b     | 10,39 ab | 19,84 ab        | 3,37 b          |
| 30 mM $\text{NH}_4^+$  | 51,87 b     | 12,67 a  | 18,34 ab        | 3,39 b          |
| controle               | 160,02 a    | 8,79 b   | 6,87 b          | 23,04 a         |

Médias seguidas por letras diferentes para um mesmo parâmetro em um mesmo tecido indicam variação significativa a 5% comparados pelo teste de Tukey. NS não significativo.

Pode-se inferir que o metabolismo de nitrogênio é afetado pela presença de amônio no meio, uma vez que observou-se alteração nos níveis de compostos nitrogenados presentes

em nódulos e na quantidade de ácido alantóico em todos os tecidos (Tabela 2). A alteração na forma de ureídeo nos tecidos em função da fonte de nitrogênio já foi relatada por Camargos e Sodek (2010) quando plantas de *Calopogonium mucunoides* foram submetidas a receber nitrato, bem como o conteúdo de ácido alantóico em tecidos e seiva de xilema quando plantas noduladas receberam amônio em solução (Camargos, 2007).

**Tabela 2.** Valores em gramas de massa fresca nos diferentes tecidos (parte aérea, raízes e nódulos) quando submetidos ao tratamento com diferentes doses de amônio.

| Tratamento                          | Parte aérea | Raiz    | Nódulo  |
|-------------------------------------|-------------|---------|---------|
| 5 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>   | 15,82 NS    | 3,09 B  | 0,32 NS |
| 7,5 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | 23,15 NS    | 5,52 AB | 0,31 NS |
| 15 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>  | 25,72 NS    | 7,32 A  | 0,4 NS  |
| 30 mM NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>  | 25,81g NS   | 6,97 A  | 0,34 NS |

Média de quatro repetições e letras diferentes para um mesmo tecido indicam variação significativa a 5% comparados pelo teste de Tukey. NS não significativo.

O nitrogênio presente no meio pode influenciar, além do processo de nodulação, a atividade de N-fixação. Desta maneira, uma alteração na atividade (total) da fixação de nitrogênio pode estar relacionada diretamente ao grau de nodulação, mas, ao mesmo tempo, relacionada à atividade da nitrogenase independentemente de efeitos sobre o grau de nodulação. Verificar alterações no padrão de compostos nitrogenados translocados via xilema é uma maneira de avaliar a atividade assimilatória do nódulo, pois a translocação de ureídeos via xilema, compostos diretamente associados com a N-fixação, está intimamente relacionada com a taxa de N-fixação.

Vários são os trabalhos que demonstram uma relação estreita entre os teores de ureídeos translocados via xilema com a atividade de N-fixação (Atkins et al, 1980; Pate et al, 1980; Atkins et al., 1983; Drevon et al, 1988; Schubert, 1986; Streeter, 1988; Dakora et al, 1992; Bacanamwo e Harper, 1997; Bacanawmo e Purcell, 1999; Leidi e Rodríguez-Navarro, 2000; Amarante e Sodek, 2006) e que, conseqüentemente, os ureídeos do xilema podem ser usados como indicadores desta atividade (Herridge e Rose, 2000; Herridge et al, 2005). Nas leguminosas como soja (Puiatti, 1997; Amarante e Sodek, 2006) e outras leguminosas, como *Vigna* (Pate et al, 1980) e *Arachis* (Peoples et al, 1991), o nitrato leva a uma grande redução nos teores de ureídeos no xilema, reflexo da inibição da fixação de N provocada pelo nitrato, enquanto ocorre aumento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nos exsudatos do xilema (Puiatti, 1997).

Em *Alysicarpus vaginalis*, a fonte de nitrogênio mostrou influenciar o crescimento radicular das plantas, uma vez que plantas que receberam maiores quantidades de amônio

( $\text{NH}_4^+$  15 mM e  $\text{NH}_4^+$  30 mM) apresentaram maior massa fresca deste tecido, diferindo-se dos demais tratamentos (Tabela 2).

Considerando-se que em solos onde há alta acidez, como é o caso de solos de cerrado, a forma mineral de nitrogênio mais comum no solo é na forma de amônio, a resposta de crescimento ao tratamento com amônio pode indicar uma adaptabilidade para metabolizar esta forma de nitrogênio mineral. Ainda neste sentido, o fato de que a nodulação foi mantida, em todos os tratamentos, indica que, potencialmente, a espécie apresenta tolerância do sistema de fixação à presença de amônio; no entanto, estudos acerca da translocação de ureídeos em seiva de xilema e a atividade da enzima nitrogenase, responsável pela fixação de  $\text{N}_2$  em nódulos, precisam ser conduzidos a fim de corroborar esta hipótese.

### Conclusões

A nodulação em *Alysicarpus vaginalis* não é afetada pelo aumento na concentração de amônio no meio;

Há variação nos níveis de aminoácidos, ureídeos e amônio solúvel em nódulos de *Alysicarpus vaginalis* na presença de amônio;

O conteúdo de ácido alantóico em tecidos (folhas, raízes e nódulos) é influenciado pela variação na concentração de amônio fornecido à planta.

### Referências

AMARANTE, L.; SODEK, L. Waterlogging effect on xylem sap glutamine of nodulated soybean. **Biologia Plantarum**, Netherlands, v.50, n.3, p.405-410, 2006.

ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; GRIFFITHS, G.; WHITE, S.T. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non-nodulated ( $\text{NO}_3^-$ -grown) cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. **Plant Physiology**, Rockville, v.66, n.5, p.978-983, 1980.

ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; PEOPLES, M.B.; JOY, K.W. Amino acid transport and metabolism in relation to the nitrogen economy of a legume leaf. **Plant Physiology**, Rockville, v.71, n.4, p.841-848, 1983.

BACANAMWO, M.; HARPER, J.E. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagines and/or products of its metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, n.2, p.371-377, 1997.

BACANAMWO, M.; PURCELL, L.C. Soybean dry matter and N accumulation responses to flooding stress, N sources and hypoxia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.50, n.334, p.689-696, 1999.

BIELSKI, L.R.; TURNER, N.A. Separation and estimation of aminoacids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v.17, p.278-293, 1966.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254. 1976.

BRITTO, D.T. KRONZUCKER, H.J. Plant nitrogen transport and its regulation in changing soil environments. *J. Crop Improvem.*, 15:1-23, 2005.

BRITTO, D.T. KRONZUCKER, H.J.  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: A critical review. *J. Plant Physiol.*, 159:567-584, 2002.

CAMARGOS, L. S. Alteração no metabolismo de compostos nitrogenados em *Calopogonium mucunoides* em resposta a diferentes fontes de nitrogênio: Efeito na nodulação e na fixação. **Campinas-SP . Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. 2007.**

CAMARGOS, L.S.; SODEK, L. Nodule growth and nitrogen fixation of *Calopogonium mucunoides* L. show low sensitivity to nitrate. **Symbiosis**, Netherlands, v.51, n.2, p.167-174. 2010.

CONN, E.E. ; STUMPF, P.K. Introdução à Bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. 447 p.

CRAWFORD, N.M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, Rockville, v.7, p.859-868, 1995.

DAKORA, F.D.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. Effect of  $\text{NO}_3$  on  $\text{N}_2$  fixation and nitrogenous solutes of xylem in two nodulated West African geocarpic legumes, Kersting's bean



(*Macrotyloma geocarpum* L.) and Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.). **Plant Soil**, Netherlands, v.140, n.2, p.255-262, 1992.

DELGADO, C. ROSEGRANT, M. STEINFELD, H. EHUI, S. and COURBOIS, C. Livestock to 2020: The Next Food Revolution. Food, Agriculture and the Environment Discussion Paper n°. 28. International Food Policy Research Institute, Washington, D.C., 1999. Encontrado em: [http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Alysicarpus\\_vaginalis.htm](http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Alysicarpus_vaginalis.htm) Acesso: 19/03/2013.

DREVON, J.J.; HECKMANN, M.O.; SOUSSANA, J.F.; SALSAC, L. Inhibition of nitrogen fixation by nitrate assimilation in legume-Rhizobium symbiosis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.26, p.197-203. 1988.

FIGUEIRA, E.M.D.; CALDEIRA, G.C.N. Effect of nitrogen nutrition on salt tolerance of *Pisum sativum* during vegetative growth. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.168, p.359-363. 2005.

GAN, Y.B.; STULEN, I.; van KEULEN, H.; KUIPER, P.J.C. Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N<sub>2</sub> fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DV g(-1) root dry weight) and specific N<sub>2</sub> fixation (N<sub>2</sub> fixed g(-1) root dry weight) in soybean. **Plant and Soil**, v.258, p.281-292. 2004.

GERENDAS, J., Z. Zhu, R. BENDIXEN, G. RATCILIFFE and B. SATTELMACHER, 1997. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Zeitschrift Pflanzenernahrung Bodenkunde*, 160: 239-251.

HERRIDGE, D.; ROSE, I. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. **Field Crops Research**, v.65, p.229-248. 2000.

HERRIDGE, D.F.; ROBERTSON, M.J.; COCKS, B.; PEOPLES, M.B.; HOLLAND, J.F.; HEUKE, L. Low nodulation and nitrogen fixation of mungbean reduce biomass and grain yields. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.45, p.269-277. 2005.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experimental Station. Circ. n.347, 1938.

HOWITT, S.M.; UDVARDI, M.K. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochem. Biophys. Acta*, 1465:152-170, 2000.

KRONZUCKER, H.J.; GLASS, A.D.M.; SIDDIQI, M.Y. e KIRK, G.J.D. Comparative kinetic analysis of ammonium and nitrate acquisition by tropical lowland rice: Implications for rice cultivation and yield potential. *New Phytol.*, 145:471-476, 2000.

LEIDI, E.O.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N. Nitrogen and phosphorus availability limit N<sub>2</sub> fixation in bean. **New Phytologist**, New York, v.147, n.2, p.337-346. 2000.

MARCUS-WYNER, L.; RAINS, D.W. Patterns of ammonium absorption and acetylene reduction during soybeans development growth. *Plant Physiology*, 59:79-82, 1983.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2.ed. London, Academic Press, 1995. 889 p.

McCULLOUGH, H., 1967. The determination of ammonium in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta*. 17:297-304.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. Principles of plant nutrition. 4th. ed. Bern: IPI, 1987. 686 p.

NATIONAL PLANT DATA CENTER, NRCS, USDA. Baton Rouge, LA, USA. 2000.

Encontrado

em:

[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=26456](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=26456)

Acessado: 19/03/2013.

PATE, J.S.; ATKINS, C.A.; WHITE, S.T.; RAINBIRD, R.M.; WOO, K.C. Nitrogen, nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. **Plant Physiology**, Rockville, v.65, n.5, p.961-965. 1980.

PEOPLES, M.B.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; CHONG, K.; FAIZAH, A.W.; SURATMINI, P.; NURHAYATI, D.P.; BAGNALL, D.J.; BERGERSEN, F.J. Re-evaluation of the role of ureides in xylem transport of nitrogen in *Arachis* species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, n.4, p.560-567. 1991.

PUATTI, M. **Mecanismos envolvidos na inibição da nodulação e fixação de N<sub>2</sub> pelo NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em plantas de soja (Glycine max (L.) Merrill cv. Santa Rosa) cultivadas em hidroponia:** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1997. 222f. (Tese - Doutorado em Biologia Vegetal).

SCHUBERT, K.R. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and Metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.37, p.539-574. 1986.

STREETER, J.G. Inhibition of legume nodule formation and N<sub>2</sub> fixation by nitrate. **CRC Critical Review of Plant Science**, Philadelphia, v.7, n.1, p.1-23, 1988.

VOGELS, G. D.; VAN DER DRIFTI, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, v.33, p.143-157, 1970

WILLIAMS, L.E., and Miller, A.J. 2001. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 52: 659 – 688.

YEMM, E. M.; COCKING, E. C. Estimation of amino acids by ninhydrin. **Analyst**, v.80, p.209-213, 1955.

---

**Recebido para publicação em:** 14/06/2013

**Aceito para publicação em:** 30/06/2013