

Alterações no metabolismo de nitrogênio e nodulação em *Galactia latisiliqua* Desv. na presença de diferentes fontes de nitrogênioLiliane Santos Camargos¹, Karen Sibelli Rodrigues², Leandro Ferreira Aguiar²¹UNESP - Univ Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Departamento de Biologia e Zootecnia, CEP 15385-000, S.P., Brazil²Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campus de Três Lagoas, Departamento de Ciências Naturais, CEP 79601-100, M.S., Brazil.

camargos@bio.feis.unesp.br, ksr2003@bol.com.br, lfaguiar@pq.cnpq.br

Resumo: *Galactia latisiliqua* Desv. (sinônimo *Galactia velutina* Benth.) trata-se de uma leguminosa herbácea, de ocorrência como invasora, apresentando ampla distribuição geográfica ocorrendo na Argentina, Brasil, Uruguai, Colômbia, Guiana e Paraguai, não havendo na literatura quaisquer informações sobre o comportamento fisiológico e de fixação biológica em resposta a fontes de nitrogênio. Sendo assim, o presente estudo visa aportar informações diagnósticas sobre o comportamento da espécie quanto a manutenção do 'status' de fixação biológica de nitrogênio e alterações no metabolismo em função da disponibilidade ou ausência de nitrogênio no meio. Observamos que a presença de diferentes fontes de nitrogênio (amônio, ureia e nitrato) altera a translocação de aminoácidos e ureídeos em *Galactia latisiliqua*, mas não inibe a nodulação e fixação de nitrogênio completamente. Isto é um fator indicativo de possível tolerância da espécie a presença de nitrogênio no meio, tornando-a uma espécie em potencial para estudo dos fatores que levam algumas leguminosas a abandonarem a fixação de nitrogênio na presença de nitrato e amônio, por exemplo, ao passo que outras se mantém com nódulos funcionais nas mesmas condições.

Palavras-chave: ureídeos, fixação biológica, aminoácidos, leguminosa

Alterations in nitrogen metabolism and nodulation in *Galactia latisiliqua* Desv. In presence of different supply of nitrogen

Abstract: *Galactia latisiliqua* Desv. (synonymous *Galactia velutina* Benth.) is a herbaceous legume, whether as invasive, with wide geographical distribution occurring in Argentina, Brazil, Uruguay, Colombia, Guyana, Paraguay, without any information in the literature on the physiological and fixation in response to nitrogen sources. Thus, this study aims to contribute diagnostic information about the behavior of the species and the maintenance of the 'status' of biological nitrogen fixation and metabolism changes in the availability or absence of nitrogen in the medium. We observed that the presence of different nitrogen sources (ammonium, urea and nitrate) alters the translocation of amino acids and ureides in *Galactia latisiliqua* but does not inhibit nodulation and nitrogen fixation completely. This is a factor indicative of possible tolerance of the species to the presence of nitrogen in the medium, making it a potential species to study the factors that lead some to abandon legume nitrogen fixation in the presence of nitrate and ammonium, for example, while other remains functional nodules with the same conditions.

Key-words: ureides, biological fixation, amino acids, leguminous

Introdução

O nitrogênio é o elemento mais abundante da atmosfera terrestre, perfazendo cerca de 80% desta. Está presente na forma de nitrogênio molecular (N_2), extremamente estável (não-reativa), o que o torna indisponível à maioria dos seres vivos. No solo, pode ser encontrado sob várias formas: nitrato (NO_3^-), amônio (NH_4^+), nitrogênio orgânico dissolvido (principalmente na forma de peptídeos e aminoácidos), sendo as características de pH e aeração os fatores que determinam esta disponibilidade (Williams & Miller, 2001). Após a água, a disponibilidade de nitrogênio é o fator de maior limitância ao crescimento das plantas (Date, 1973; Hardy & Havelka, 1975).

O nitrogênio molecular, quimicamente indisponível para a maioria dos organismos, se torna fisiológica e metabolicamente disponível através do processo de fixação biológica, realizado por um pequeno número de microrganismos, denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio. Estes são capazes de reduzir nitrogênio atmosférico à amônio, processo realizado graças à presença do complexo enzimático nitrogenase. Evolutivamente algumas espécies desenvolveram a capacidade de associar-se simbioticamente a estas bactérias, sendo o grupo das leguminosas o que melhor desenvolveu esta capacidade, associando-se a bactérias do grupo do *Rhizobium* (Vidal, 1985). Assim, conseguem obter com relativa facilidade nitrogênio do meio, armazenando em seus órgãos e constituindo-se em uma das principais fontes de proteína para grande parte da cadeia alimentar, podendo ser consumida diretamente, utilizadas como alimento para animais, ou até como adubo verde. (Peoples & Craswell, 1992; Udvardi et al., 1992).

Quando o nitrogênio, principalmente na forma de nitrato, está disponível no ambiente, as leguminosas abandonam a fixação biológica, absorvem esse nitrato e o reduzem a nitrito e, posteriormente a amônio, através da ação das enzimas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR), respectivamente. Esse amônio é então assimilado pela via GS/GOGAT, onde é convertido em glutamato pela ação em seqüência da glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintase (GOGAT), que pode ser transferido para outros compostos através de reações de transaminação.

Apesar das duas vias, absorção de nitrato e fixação biológica, terem como produto final o amônio, em leguminosas tropicais, mudanças profundas ocorrem no metabolismo do nitrogênio, dependendo da fonte primária. Quando a amônio provém da associação simbiótica, os produtos nitrogenados exportados pelo sistema radicular, via xilema, são

ureídeos, por outro lado quando provém da redução assimilatória do nitrato os produtos exportados são amidas, principalmente asparagina e glutamina (Schubert, 1986).

A espécie *Galactia latisiliqua* Desv. (sinônimo *Galactia velutina* Benth.) trata-se de uma leguminosa herbácea, de ocorrência como invasora, apresentando ampla distribuição geográfica (www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?311460) ocorrendo na Argentina, Brasil, Uruguai, Colômbia, Guiana e Paraguai (apl5.rdg.ac.uk/annual-checklist/2009/show_species_details.php?record_id=580876), não havendo na literatura quaisquer informações sobre o comportamento fisiológico e de fixação biológica em resposta a fontes de nitrogênio. Sendo assim, o presente estudo visa aportar informações diagnósticas sobre o comportamento da espécie quanto a manutenção do *status* de fixação biológica de nitrogênio e alterações no metabolismo em função da disponibilidade ou ausência de nitrogênio no meio.

Material e Métodos

Cultivo das plantas

Sementes foram coletadas de plantas de ocorrência natural em Três Lagoas – MS e estas foram germinadas em rolos de papel filtro em câmara de germinação, após o que foram transferidas para vasos (4 L), com vermiculita e inoculadas com nódulos coletados de plantas em ocorrência natural. Após nodulação efetiva, foram estabelecidos os tratamentos: plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio (T1), recebendo solução nutritiva com amônio (T2), recebendo solução nutritiva com uréia (T3), e recebendo solução nutritiva com nitrato (T4), tendo como base a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1939).

Os tratamentos foram mantidos por 21 dias, sendo aplicado 100 mL solução nutritiva por vaso, duas vezes por semana. A coleta foi realizada quando as plantas já encontravam-se em florescimento.

Coleta do Material

A seiva de xilema foi coletada com auxílio de um sistema de compressão Bomba de Scholander modificado, onde a pressão é fornecida por um compressor de ar, e armazenadas em freezer para as análises posteriores; os tecidos foram separados (folhas, raiz e nódulos) e armazenados em freezer para as análises posteriores. Não foram realizados testes preliminares para verificar se ocorre exsudação natural após corte transversal, conforme descrito por McClure & Israel (1979).

Extração dos compostos nitrogenados

Através do método descrito por Bielski & Turner (1966) os compostos nitrogenados foram extraídos para as análises posteriores.

Para 1g de material fresco, acrescentou-se 10 mL de solução MCW (60% ml Metanol, 25% ml Clorofórmio, 15% ml H₂O – v/v/v). O material foi triturado e, em seguida, centrifugado por 15 minutos a 3000 RPM. Após centrifugação, acrescentou-se 1 mL Clorofórmio + 1,5 mL H₂O, para cada 4 ml sobrenadante. Aguardou-se a separação de fases e utilizou-se a fase hidrossolúvel para análise de compostos nitrogenados (aminoácidos, ureídeos, nitrato e amônio).

O precipitado foi ressuspenso em solução NaOH 0,1 M, a uma relação de 10 mL de solução para cada grama de amostra (tecido fresco); após homogeneização, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para quantificação de proteínas.

Análise de compostos nitrogenados

Aminoácidos solúveis totais, canavanina (aminoácido não-proteico), ureídeos (alantoína e ácido alantóico), nitrato e amônio foram quantificados em tecidos e seiva de xilema de acordo com o descrito por Yemm & Cocking (1955), Rosenthal (1977), Vogels & Van Der Drift (1970), Cataldo et al. (1975) e McCulloch (1967), respectivamente. Proteína total presente em tecidos foi quantificado de acordo com o descrito por Bradford (1976).

Análise da Atividade da Enzima Nitrato Redutase (NR)

A atividade da enzima Nitrato Redutase foi dosada “*in vivo*” de acordo com o descrito por Radin (1974), através da quantificação de nitrito formado.

Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Utilizou-se para análises estatísticas a média de três repetições as quais foram submetidas ao teste de Tukey a 5%, através do programa VARPC.

Resultados e Discussão

A presença de nitrogênio no meio não foi fator de inibição da nodulação, já que tanto número de nódulos quanto a massa não apresentou variação significativa entre os tratamentos (Tabela 1). Houve incremento de massa fresca de raiz em plantas que receberam nitrogênio, independente da forma fornecida (amônio, ureia ou nitrato), havendo variação significativa destes em relação à plantas inteiramente dependentes da fixação (Tabela 1).

Tabela 1. Massa fresca de tecidos e número de nódulos de *Galactia latisiliqua* Desv.

	Parte aérea	Raiz	Nódulo	Nº. de Nódulos
T1	15,05 A	5,83 B	110 A	76 A
T2	17,50 A	8,50 A	0,84A	67 A
T3	14,30 A	10,75 A	0,73A	56 A
T4	15,45 A	12,50 A	0,74 A	53 A

T1: plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; (T2)recebendo solução nutritiva com amônio; (T3) recebendo solução nutritiva com uréia e (T4), e recebendo solução nutritiva com nitrato. Os dados referem-se à média de três repetições; letras diferentes, para um mesmo parâmetro e um mesmo tecido, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%. Dados expressos em gramas.

A fonte de nitrogênio influenciou o acúmulo de proteína e aminoácidos em tecidos, havendo incremento nos níveis de proteínas totais em folhas de plantas tratadas com ureia, e redução nos níveis de aminoácidos solúveis totais presentes em folhas de plantas tratadas com amônio (Tabela 2). Os níveis de aminoácidos solúveis totais em raízes de plantas que receberam ureia foram inferiores aos demais tratamentos, sendo que houve incremento em plantas que receberam amônio (Tabela 2).

Observou-se que o sítio de redução assimilatória de nitrato nesta espécie dá-se exclusivamente em folhas, não havendo atividade da enzima nitrato redutase nos demais tecidos (Tabela 2). A presença de nitrato em raízes e nódulos é indicativo de que há absorção de nitrato e este é translocado para as folhas, onde observou-se maiores concentrações do íon e onde há atividade de redução de nitrato pela planta.

A presença de canavanina, embora em concentrações baixas, em folhas de *Galactia latisiliqua*, indica adaptabilidade à defesa contra ataque de insetos. Observou-se presença de canavanina em nódulos (Tabela 2) em concentrações mais elevadas que as observadas em folhas, o que não é relatado na literatura; segundo Hwang et al (1996) em *Canavalia lineata*, a concentração de canavanina foi detectado quase exclusivamente nas folhas, mas não nas raízes.

Tabela 2. Análise quantitativa de compostos nitrogenados em tecidos de *Galactia latisiliqua* Desv.

	Aminoácidos	Canavanina	Proteína	Amônio	Nitrato	NRA
Folha						
T1	64,23 A	0,06 B	0,21B	0,01A	4,68 A	237,27 A
T2	5,51 B	0,37 A	0,31 B	0,01A	3,36 A	229,83 A
T3	114,08 A	0,01 B	1,10 A	0,08 A	8,42 A	169,54 A
T4	92,78 A	0,26 A	0,31 B	0,04 A	6,99 A	317,85 A
Raiz						
T1	113,52 B	0,01A	0,11A	0,01 A	0,66 B	ND
T2	213,93 A	0,01A	0,09A	0,01 A	2,05 B	ND
T3	40,34 C	0,01A	0,10A	0,01 A	3,00 B	ND
T4	123,9 B	0,01A	0,08A	0,01 A	13,23 A	ND
Nódulos						
T1	210,43 A	0,01 C	0,99 A	0,01 A	10,14 A	ND
T2	57,84 B	7,58 B	0,01 B	0,01 A	0,01 A	ND
T3	240,39 A	1,34 C	0,01 B	0,01 A	0,01 A	ND
T4	99,63 AB	19,75 A	0,01 B	0,01 A	0,01 A	ND

T1: plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; (T2): planta recebendo solução nutritiva com amônio; (T3): plantas recebendo solução nutritiva com ureia, e (T4) plantas recebendo solução nutritiva com nitrato. NRA: atividade da enzima nitrato redutase. ND: não detectado. Os dados referem-se à média de três repetições; letras diferentes, para um mesmo parâmetro e um mesmo tecido, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%. Os dados são expressos em miligramas por grama de massa fresca (proteína), nanomoles/grama de massa fresca (canavanina), micromoles/grama de massa fresca.hora⁻¹ (NRA) e micromoles/grama de massa fresca (demais parâmetros).

Observou-se maior acúmulo de ureídeos em folhas de plantas que encontravam-se recebendo ureia e amônio em solução, enquanto que os maiores teores de ureídeos em raízes foram observados em plantas que receberam amônio (Tabela 3). EM nodulos, plantas que receberam nitrato apresentaram maiores concentrações de ureídeos totais, no entanto quando observa-se a translocação de ureídeos em seiva de xilema, os menores teores foram observados em plantas que recebiam amônio (Tabela 4), enquanto os demais tratamentos não diferiram entre si. Herridge et al. (1996), trabalhando com *Desmodium rensonii* observou redução brusca nos níveis de ureídeos na presença de nitrato, o que não foi observado no presente estudo, com *Galactia latisiliqua*.

Tabela 3. Análise quantitativa de compostos nitrogenados em tecidos de *Galactia latisiliqua* Desv.

	Ureídeos Totais µmol/gMF	Alantoína µmol/gMF	Ácido Alantóico µmol/gMF
Folha			
T1	1,16 B	0,67 A	0,49 B
T2	2,16 A	0,42 A	1,74 A
T3	2,23 A	0,44 A	1,79 A
T4	1,26 B	0,75 A	0,51 B
Raiz			
T1	1,21 B	0,52 B	0,69 B
T2	2,59 A	1,09 A	1,50 A
T3	1,74 B	0,51 B	1,23 A
T4	0,68 C	0,31 B	0,37 B
Nódulo			
T1	2,51 C	2,40 B	0,11 B
T2	4,47 B	3,37 B	1,10 A
T3	6,00 B	4,79 B	1,21 A
T4	15,29 A	13,89 A	1,40 A

T1: plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; (T2): planta recebendo solução nutritiva com amônio; (T3): plantas recebendo solução nutritiva com ureia, e (T4) plantas recebendo solução nutritiva com nitrato. Os dados referem-se à média de três repetições; letras diferentes, para um mesmo parâmetro e um mesmo tecido, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%. Os dados são expressos em micromoles/grama de massa fresca.

Peoples et al. (1991) observou em soja concentrações da ordem 400 µmol/gMF de ureídeos por grama de tecido fresco, em tecido de raiz, em plantas que não estavam fixando nitrogênio simbioticamente. Os dados obtidos para *Galactia latisiliqua*, em plantas que estavam recebendo suplementação com nitrato são próximos aos relatados por Peoples et al. (1991), no entanto a presença de nódulos radiculares é indicativo de que a espécie mantinha-se fixando nitrogênio, além da absorção de nitrato fornecido.

Tabela 4. Quantificação de aminoácidos solúveis totais, nitrato e ureídeos totais translocados em seiva de xilema de *Galactia latisiliqua* Desv.

	Aminoácidos	Nitrato	Ureídeos totais
T1	10,15 AB	ND	0,24 A
T2	15,80 A	ND	0,04 B
T3	7,91 B	0,05 A	0,63 A
T4	9,90 AB	0,11 A	0,65 A

T1: plantas recebendo solução nutritiva sem nitrogênio; (T2): planta recebendo solução nutritiva com amônio; (T3): plantas recebendo solução nutritiva com ureia, e (T4) plantas recebendo solução nutritiva com nitrato. ND: não detectado. Os dados referem-se à média de três repetições; letras diferentes, para um mesmo parâmetro, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey a 5%. Dados expressos em micromoles/mL.

Dados semelhantes foram encontrados em outros estudos. Em *Vigna mungo*, diferentes genótipos foram avaliados quanto à nodulação e fixação em presença de uréia, tendo sido observado que os genótipos avaliados nodularam e apresentaram fixação satisfatória em presença desta fonte de nitrogênio (Singh & Usha, 2002). Esta resposta de nodulação e fixação em presença de uréia é similar à observada para *Calopogonium mucunoides*, uma vez que não houve alteração na massa dos nódulos em plantas que receberam uréia, em comparação com o controle (sem N) e, da mesma maneira, não ocorreu redução nos níveis de ureídeos translocados via xilema (Camargos & Sodek, 2010). Em plantas de soja recebendo amônia, também é relatado que não ocorre abandono da fixação (Gan et al., 2004).

Apesar de haver redução nos níveis de ureídeos translocados em seiva de xilema em plantas que estavam recebendo amônio, estas foram as que apresentaram maiores níveis de aminoácidos translocados (Tabela 4).

Em *Calopogonium caeruleum*, em plantas recebendo nitrato, observou-se redução nos níveis de ureídeos em seiva de xilema, associada a redução na nodulação (Camargos et al., 2012), o que não foi observado em *Galactia latisiliqua*, no presente estudo. De forma geral, a manutenção da nodulação e da translocação de ureídeos, em plantas recebendo diferentes fontes de nitrogênio indicam uma possível tolerância do metabolismo desta espécie à presença de nitrogênio no meio.

Conclusões

A presença de diferentes fontes de nitrogênio altera a translocação de aminoácidos e ureídeos em *Galactia latisiliqua*, mas não inibe a nodulação e fixação de nitrogênio completamente. Isto é um fator indicativo de possível tolerância da espécie a presença de nitrogênio no meio, tornando-a uma espécie em potencial para estudo dos fatores que levam algumas leguminosas a abandonarem a fixação de nitrogênio na presença de nitrato e amônio, por exemplo, ao passo que outras se mantêm com nódulos funcionais nas mesmas condições.

Referências

apl5.rdg.ac.uk/annual-checklist/2009/show_species_details.php?record_id=580876 . Acesso em: 26 abr. 2013.

BIELSKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.17, n.2, p.278-293, 1966.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, n. 1-2, p.248-258, 1976.

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.

CAMARGOS, L.S.; SOUZA, A.C.; SOUZA, L.A.; JUSTINO, G.C.; AGUIAR, L.F. *Calopogonium caeruleum* apresenta baixa tolerância do sistema simbiótico à presença de nitrato. **Acta Iguazu**, Cascavel, v.1, n.4, p.9-16, 2012.

CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v.6, n.1, p.71-80, 1975.

DATE, R.A. Nitrogen a major limitation in the productivity of natural communities, crops and pastures in the Pacific area. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.5, n.1, p.5-18, 1973.

GAN, Y.B.; STULEN, I.; van KEULEN, H.; KUIPER, P.J.C. Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N₂ fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DV g(-1) root dry weight) and specific N₂ fixation (N₂ fixed g(-1) root dry weight) in soybean. **Plant and Soil**, Netherlands, v.258, n.1-2, p.281-292, 2004.

HARDY, R.W.F.; HAVELKA, V.P. Nitrogen fixation research: a key to world food?. **Science**, New York, v.188, n.4188, p.633-643, 1975.

HERRIDGE, D.F.; PALMER, B.; NURHAYATI, D.P.; PEOPLES, M.B. Evaluation of the xylem ureide method for measuring N₂ fixation in six tree legume species. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.28, n.3, p.281-289, 1996.

HOAGLAND, D.R.; Arnon, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, **University of California Agricultural Experimental Station**, 39 p., 1938.

HWANG, I.D.; KIM, S.; KWON, Y.M., Canavanine metabolism in tissue cultures of *Canavalia lineata*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.45, n.1, p.17-23, 1996.

MCCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.64, n.3, p.411-416, 1979.

McCULLOUGH, H. The determination of ammonium in whole blood by a direct colorimetric method. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.17, n.2, 297-304, 1967.

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Netherlands, v.141, n.1-2, p.13-39, 1992.

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.

RADIN, J.W. "In vivo" assay of nitrate reductase in cotton leaf discs. **Plant Physiology**, Rockville, v.51, n.2, p.332-336, 1973.

ROSENTHAL, G.A. Preparation and colorimetric analysis of L-canavanine. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.77, n.1, p.147-151, 1977.

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.

SINGH, B.; USHA, K. Nodulation and symbiotic nitrogen fixation by genotypes of blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] as affected by fertilizer nitrogen. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v.53, n.4, p.453-457. 2002.

UDVARDI, M.K.; LISTER, D.L.; DAY, D.A. Isolation and characterization of a NTRC mutant of *Bradyrhizobium* (*Parasponia*) sp ANU289. **Journal of General Microbiology**, Berks, v.138, p.1019-1025, 1992.

VOGELS, G.D.; VAN DER DRIFT, C. Differential analyses of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.33, n.1, p.143-157, 1970.

YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, Cambridge, v.80, n. 948, p.209-213, 1955.

WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p.659 -688, 2001.

www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?311460 . Acesso em: 26 abr. 2013.

Recebido para publicação em: 07/01/2013

Aceito para publicação em: 25/03/2013