

CONTRIBUIÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO PARA A CULTURA DE ARROZ SOB INUNDAÇÃO

DAVID VILAS BOAS DE CAMPOS¹; ALEXANDER SILVA DE RESENDE¹; BRUNO JOSÉ RODRIGUES ALVES² ROBERT MICHAEL BODDEY² & SEGUNDO URQUIAGA²

1- Engenheiro Agrônomo, Doutorando em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2- Pesquisador da Embrapa Agrobiologia; Caixa postal 74505, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, e-mail: davidcamposbr@yahoo.com.br

RESUMO

A substituição total ou parcial, de N-fertilizante pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma estratégia que deve ser considerada não só do ponto de vista econômico, mas também pelo significado e importância em termos de preservação ambiental. Estudos realizados com a cultura de arroz inundado sugerem que alguns genótipos podem ser beneficiados por significativas quantidades de N derivadas da FBN. Este trabalho teve como objetivo quantificar a contribuição da FBN em nove genótipos de arroz cultivados sob inundações, utilizando a técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, em um tanque de concreto de 120 m², preenchido com solo deficiente em nitrogênio e marcado com ¹⁵N. Dentre os genótipos de arroz utilizados, BG 90-2 e CNA 6750 obtiveram as maiores produtividades, com 8,0 e 7,4 Mg.ha⁻¹, respectivamente, e os demais genótipos produziram entre 4,3 e 7,2 Mg.ha⁻¹. Os genótipos IAC 4440, BG 90-2 e MG-1, foram considerados como testemunhas não fixadoras de nitrogênio. Os genótipos IR 42 e CNA 6807 foram os mais promissores para a FBN, chegando a acumular através desse processo entre 20 e 30 % do nitrogênio existente na parte aérea da planta.

Palavra-chave: genótipos de arroz, diluição isotópica de ¹⁵N, índice de colheita, produção de grãos

ABSTRACT

CONTRIBUTION OF THE BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION TO WETLAND RICE

The total or partial substitution of N-fertiliser for biological nitrogen fixation (BNF) is a strategy to be considered not only for the economic point of view, but also for the meaning and importance in terms of environmental preservation. In the case of lowland rice, recent studies suggested that some rice genotypes can be benefited from significant amounts of N derived from BNF. This work was performed to quantify the contribution of BNF in nine rice genotypes using the ¹⁵N dilution technique. The genotypes BG 90-2 and CNA 6750 presented the highest yields, with 8.0 and 7.4 Mg.ha⁻¹, respectively. The genotypes IAC 4440, BG 90-2 and MG-1 were considered as the non-N₂-fixing controls. The genotypes IR-42 and CNA 6807 stood out for their BNF potential, and were able to accumulate through this process between 20 and 30 % of the plant shoot N.

Key words: rice genotypes, ¹⁵N dilution technique, harvest index, grain production

INTRODUÇÃO

O arroz é o principal alimento para mais de 1/3 da população mundial, sendo plantado em aproximadamente 4 milhões de hectares no Brasil (IBGE, 2002). A baixa disponibilidade de nitrogênio dos solos é responsável, em grande parte, pelos baixos níveis de rendimento das culturas, uma vez que a aplicação de fertilizantes pode ser proibitiva face aos altos custos deste insumo. Nas últimas décadas, a pesquisa voltada para a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em gramíneas foi intensificada e resultados promissores foram obtidos, principalmente, para as culturas da cana-de-açúcar e arroz cultivado sob inundações (Oliveira *et al*, 1994; Döbereiner, 1997;

Baldani *et al*, 2000). Diversas bactérias diazotróficas foram identificadas colonizando a rizosfera, raízes e tecidos aéreos dessas gramíneas (Baldani *et al*, 1997), no entanto, a associação planta/bactéria ainda não está bem compreendida. Nesse sentido, a identificação de genótipos que realmente se beneficiem do processo de FBN é uma das etapas primárias, fundamentais para viabilizar os estudos de identificação de microrganismos e suas relações com a planta.

Atualmente, a técnica disponível mais adequada para quantificar a FBN em uma cultura, principalmente em condições de campo, é a diluição isotópica de ¹⁵N utilizando substrato enriquecido com este isótopo (Boddey *et al*, 1995) ou simplesmente utilizando a sua abundância natural no N disponível do solo (Boddey *et*

al, 2001). Esta última possibilidade tem sido largamente utilizada nos últimos anos devido ao menor custo e a possibilidade de aplicação imediata em sistemas naturais ou agrícolas. No entanto, a análise da abundância natural do ^{15}N demanda equipamentos mais sofisticados e, dependendo do local de estudo, a variabilidade na marcação natural do solo e os processos de discriminação isotópica podem mascarar os resultados (Boddey *et al.*, 2000).

Mesmo sendo um processo mais caro, o enriquecimento do solo com ^{15}N , permite uma maior segurança na quantificação da FBN, desde que sejam seguidas as recomendações de uso de plantas controle que proporcionem uma boa representação da marcação do N disponível no solo para as espécies que se beneficiam da FBN (Boddey *et al.*, 1995; Peoples *et al.*, 2001). Genótipos da mesma espécie das plantas estudadas, que fixem pouco ou nenhum nitrogênio, como leguminosas que não nodulam, têm sido as melhores plantas utilizadas como controle (Boddey *et al.*, 1996). Em leguminosas, a ausência de nódulos indica que determinado genótipo é um bom controle para outro genótipo nodulante da mesma espécie. Entretanto, este indicador não pode ser usado em gramíneas, pois a identificação de espécies controle de plantas não-leguminosas, assim como as de potencial para se beneficiarem da FBN, tem sido feita baseando-se na capacidade das plantas de crescer e acumular N em solos com baixos níveis de N disponível (Pinto *et al.*, 2001). Neste trabalho, foram evidenciados diversos genótipos com potencial para a FBN, porém, pouco pode-se concluir a respeito deste processo uma vez que a FBN não foi diretamente avaliada.

No sentido de contribuir para o conhecimento do processo de FBN na cultura do arroz, este trabalho avaliou a quantificação da FBN para genótipos de arroz, com bom desempenho em solos pobres em N (Oliveira, 1994; Wu *et al.*, 1995; Kundu & Ladha, 1995; Pinto *et al.*, 2001), e adaptados à condição de inundação.

MATERIAL E METODOS

O estudo foi desenvolvido na Embrapa Agrobiologia, no Município de Seropédica, Rio de Janeiro, em um tanque de concreto de área igual a 120 m² (20 x 6 x 0,6m), preenchido com ARGISSOLO vermelho amarelo até 0,4 m, deficiente em N, cultivado anteriormente com arroz irrigado. A adubação nitrogenada foi equivalente a 9 kg N ha⁻¹, na forma de sulfato de amônio, enriquecido com 10 % de átomos de ^{15}N , 45 dias antes do plantio. O fertilizante marcado foi incorporado ao solo do tanque de forma a se obter uma mistura homogênea em todo o volume de solo. Por ocasião do plantio foi feita a adubação de K, P e micronutrientes, equivalentes à 200 kg K₂O ha⁻¹, 200 kg P₂O₅ ha⁻¹ e 60 kg FTE BR12 ha⁻¹. Os genótipos de arroz (*Oryza sativa* L.) estudados foram: IR-42, BG 90-2, CNA 6444, CNA 6750, CNA 6807, CNA 6814,

METICA 1, MG 1 e IAC 4440. O genótipo IAC 4440 foi identificado por Oliveira (1994), como de baixo potencial para a FBN, e incluído neste estudo como um dos possíveis genótipos controle para quantificação da FBN e comparação com os demais genótipos. Por outro lado, IR 42 também foi incluído no estudo para confirmar os resultados encontrados por Oliveira (1994), Kundu & Ladha (1995) e Wu *et al.* (1995) que apontam este genótipo como um dos que possui maior potencial para FBN.

Todos os genótipos de arroz foram plantados no mês de outubro, em parcelas de 3m², contendo 4 linhas de 3 m espaçadas entre si em 0,25 m, com densidade de semeadura de 100 sementes por metro linear no delineamento experimental de blocos ao acaso com 4 repetições. Foram realizadas 3 coletas parciais, aos 34, 56 e 85 dias após a emergência (dae) a fim de acompanhar o crescimento dos genótipos, a acumulação de nitrogênio e o enriquecimento de ^{15}N nas plantas. A colheita obedeceu o tempo de maturação de cada genótipo, quando as plantas foram separadas em grãos e palha para determinação da produção da massa seca, rendimento de grãos, N total (Alves *et al.*, 1994) e enriquecimento de ^{15}N (Urquiaga *et al.*, 1992). A fração do N das plantas proveniente da FBN foi calculada pela técnica da diluição isotópica de ^{15}N (1987), aplicando-se a fórmula descrita por Boddey *et al.* (1987):

$$\%Nda = \left[1 - \left(\frac{\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ xs planta teste}}{\% \text{ de } ^{15}\text{N} \text{ xs planta controle}} \right) \right] \times 100$$

onde, a %Nda é a percentagem de N derivada da FBN e % ^{15}N xs é o enriquecimento de átomos de ^{15}N em excesso na planta teste ou na planta controle.

Para a comparação dos genótipos quanto ao uso de N do solo, foi calculada a recuperação de ^{15}N através do produto entre a quantidade de N acumulada pela parte aérea das plantas, e o enriquecimento de ^{15}N de cada genótipo, em cada época estudada. Para cada intervalo de amostragem foi calculada a taxa de recuperação de ^{15}N , dividindo-se a quantidade de ^{15}N recuperada em cada período pelo número de dias entre as amostragens feitas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento, acumulação de biomassa e nitrogênio

Os genótipos BG 90-2, CNA 6750 e METICA 1 apresentaram os maiores rendimentos de grãos: 8,0, 7,4 e 7,2 Mg ha⁻¹, respectivamente (Tabela 1). Estes níveis de produtividade estão bem acima da média nacional de 5,0 Mg ha⁻¹, para solos alagados (IBGE, 2002). O genótipo com o pior desempenho neste parâmetro (CNA 6807) também se aproximou desta média, acumulando 4,3 Mg ha⁻¹. Em termos de acumulação total de matéria seca, não se encontraram diferenças entre a maioria dos genótipos avaliados (Tabela 1). Todos os demais genótipos foram classificados como de ciclo longo, exceto o genótipo CNA 6814, que foi considerado de

ciclo intermediário. Embora deva-se considerar que as diferentes características dos genótipos possam ter sido determinantes nos níveis de produção obtidos, em solos onde existem limitação de nutrientes e luz o ciclo da cultura pode ser determinante para uma maior acumulação de biomassa (Pinheiro, 1999). Relacionando-se os dados de rendimento, produção de matéria seca e índice de colheita, foi observado que os genótipos em estudo diferiram grandemente na eficiência de produção de grãos (Tabela 1). Os genótipos mais eficientes foram: BG 90-2 e CNA 6814, com 43 %, e o mais ineficiente foi o cultivar CNA 6807, com 26 %. De acordo com Pinto et al (2001), os genótipos mais eficientes seriam os mais indicados para agricultura de baixos insumos em solos pobres em N.

Tabela 1- Rendimento de grãos, produção de matéria seca e índice de colheita de 9 genótipos de arroz inundado. Valores médios de 4 repetições.

Genótipo	Rendimento*	Matéria seca total	Índice de colheita	Ciclo dias
	Mg ha ⁻¹		%	
BG 90-2	8,0 a**	16,5 ab	42,9 a	118
CNA 6750	7,4 a	17,9 ab	37,1 ab	139
Metica 1	7,2 ab	18,4 ab	35,8 ab	139
IAC 4440	6,8 ab	19,0 a	31,3 ab	127
IR-42	6,4 ab	14,9 ab	38,3 ab	148
CNA 6814	6,0 ab	12,0 b	43,8 a	91
MG 1	5,9 ab	17,2 ab	29,0 ab	118
CNA 6444	5,7 ab	12,6 ab	39,5 ab	113
CNA 6807	4,3 b	14,6 ab	26,2 b	127
C.V. %	19	18	18	

* 14% umidade; ** Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (p = 0,05; teste tukey).

Não houve diferença significativa quanto ao acúmulo de N na parte aérea das plantas. Os genótipos IAC 4440 e METICA 1, acumularam 121 e 118 kg N ha⁻¹, respectivamente, enquanto os genótipos CNA 6444, CNA 6814 e CNA 6807, acumularam, respectivamente, 87, 90 e 92 kg N ha⁻¹ (Tabela 2).

O índice de colheita de N é um parâmetro que indica a eficiência de utilização do nitrogênio pela planta, e quanto maior este índice, maior é a proporção de nitrogênio acumulado no grão em relação a parte aérea. Os genótipos IR-42, CNA 6814 e BG 90-2 foram os mais eficientes na translocação do N da planta para os grãos, pois apresentaram mais de 60 % no índice de colheita, em comparação com os genótipos CNA 6807 e MG 1, que foram considerados menos eficientes, apresentando o índice de colheita de nitrogênio de 45 e 42 %, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2- Teor de N nos grãos, acumulação de N total e índice de colheita de N de 9 genótipos de arroz inundado. Valores médios de 4 repetições.

Genótipo	N total Grãos	N total Parte aérea*	Índice de colheita de N
	kg ha ⁻¹		%
BG 90-2	60,8 ab	101,7	60,1 ab
CNA 6750	65,9 a	115,1	58,5 ab
Metica 1	66,1 a	118,1	56,4 ab
IAC 4440	60,4 ab	120,6	50,2 ab
IR-42	61,4 ab	98,7	62,5 a
CNA 6814	55,3 ab	90,3	61,4 ab
MG 1	52,0 ab	114,2	44,8 ab
CNA 6444	50,0 ab	86,7	57,5 ab
CNA 6807	38,0 b	92,3	41,8 b
C.V. %	19	17	15

* Grãos e palha, não significativo a tukey a 5%. ** Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (p = 0,05; teste tukey).

Quantificação da FBN

O enriquecimento de ¹⁵N encontrado nos genótipos de arroz, nas amostragens realizadas ao longo do desenvolvimento das plantas, diminuiu com o tempo, provavelmente representando o decréscimo na marcação de ¹⁵N do N disponível do solo (Figura 1A). A premissa para o uso da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N para quantificação da FBN é que a planta controle e a planta que se beneficia da FBN absorvam N do solo com o mesmo enriquecimento de ¹⁵N (Boddey, 1987). Segundo Witty (1983), esta premissa é obedecida se o enriquecimento de ¹⁵N do N disponível do solo não variar com o tempo e nem com a profundidade. Caso contrário, as plantas controle e fixadora de N₂ deverão apresentar uma curva de acumulação de N proporcionalmente estável, ao longo de seu desenvolvimento.

O comportamento de acumulação total de N pelas plantas foi semelhante entre os genótipos (Figura 1B), no entanto, representa o somatório do N acumulado do solo e do N derivado da FBN. Como o N do solo foi marcado com ¹⁵N, a recuperação de ¹⁵N pelas plantas é um indicador da utilização de N do solo. Tomando como base as taxas de recuperação de ¹⁵N em cada época de amostragem (Figura 2), apesar da grande variabilidade dos dados, é possível verificar que existem genótipos com taxa de acumulação de N do solo (recuperação de ¹⁵N) que variaram proporcionalmente entre eles nos diferentes intervalos de avaliação. No entanto, os genótipos IAC 4440, considerado controle para estudos de FBN (Oliveira, 1994), BG 90-2, CNA 6814 e MG 1, que apresentaram comportamentos distintos quanto as quantidades de N do solo acumuladas em cada período, foram os que obtiveram os maiores enriquecimentos de ¹⁵N na planta, na colheita final, não

sendo significativamente diferentes (Tabela 3). Estes resultados sugerem que o comportamento de acumulação de N do solo destes genótipos foi semelhante, mas as quantidades absorvidas foram diferentes. Isto indica, também, que o N disponível do solo pode ter sido suficiente para atender a demanda de N dos genótipos, pelo menos nos períodos de maiores demandas. Esta última suposição é amparada pelos altos níveis de produção encontrados neste estudo.

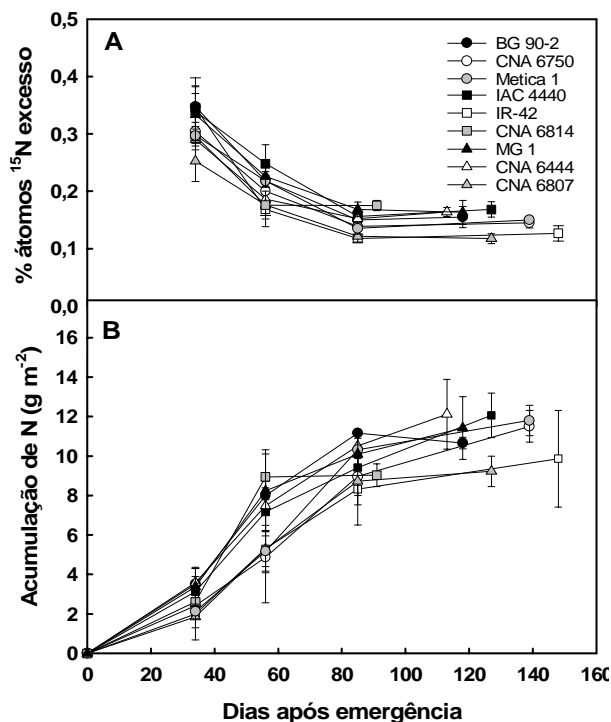


Figura 1- Enriquecimento de ¹⁵N (A) e acúmulo de N (B) na parte aérea de 9 genótipos de arroz inundado, avaliados durante o desenvolvimento da cultura. As barras referem-se ao erro padrão da média, obtida com 4 observações.

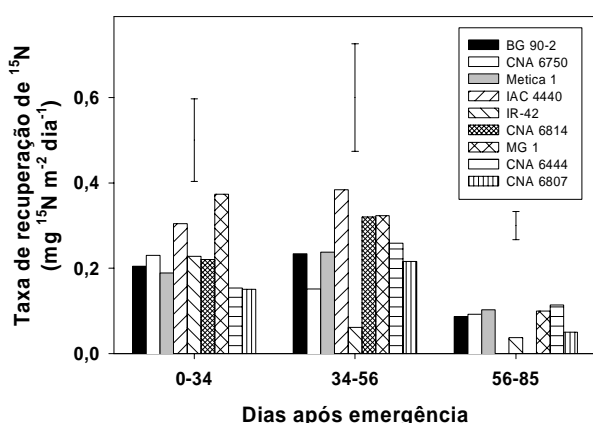


Figura 2- Taxa de recuperação de ¹⁵N diária obtida de 3 intervalos entre amostragens durante o desenvolvimento de 9 genótipos de arroz inundado. As barras referem-se a mínima diferença significativa entre as médias (teste l.s.d, P = 0,05), obtidas de 4 observações.

Tabela 3- Enriquecimento de ¹⁵N na parte aérea no momento da colheita em 9 genótipos de arroz inundado. Valores médios de 4 repetições.

Genótipo	% átomo de ¹⁵ N em excesso
BG 90-2	0,165 ab
CNA 6750	0,145 abc
Metica 1	0,150 abc
IAC 4440	0,168 ab
IR-42	0,127 bc
CNA 6814	0,175 a
MG 1	0,163 ab
CNA 6444	0,136 abc
CNA 6807	0,118 c
C.V. %	12,3

* Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente (p = 0,05; teste l.s.d.).

Após 85 dae, os genótipos entraram na fase de maturação, com menor demanda de N, e, provavelmente, o enriquecimento de ¹⁵N do solo já estava mais estável. Esta deve ser a explicação para que os genótipos IAC 4440, BG 90-2, CNA 6814 e MG 1, de ciclos de dias diferentes, tenham apresentado enriquecimentos de ¹⁵N semelhantes, no momento da colheita. Uma vez que estes genótipos acumularam diferentes quantidades de N do solo, porém com o mesmo enriquecimento de ¹⁵N, e que os demais genótipos se assemelharam a, pelo menos, um deles em relação a taxa de recuperação de ¹⁵N do solo (Figura 2), pode-se assumir que todos apresentaram uma taxa de acumulação N do solo com o mesmo enriquecimento de ¹⁵N.

Apesar do maior enriquecimento de ¹⁵N, o genótipo CNA 6814 não foi incluído como testemunha por ser um genótipo de ciclo intermediário, diferente dos demais (ciclo longo). Foram utilizados como plantas controle, não fixadoras de N₂, IAC 4440, BG 90-2 e MG 1, cuja média final do enriquecimento de ¹⁵N, obtido de 12 observações foi 0,165 %, com um erro padrão da média de 0,008. Este valor de enriquecimento de ¹⁵N foi usado para o cálculo da contribuição da FBN para os demais genótipos.

Os genótipos CNA 6807 e IR 42 obtiveram contribuições da FBN superiores a 20 % (Figura 3). Em média, os 5 genótipos que se beneficiaram da FBN, acumularam entre 26,7 e 10,8 kg N ha⁻¹, derivados deste processo.

Os resultados obtidos pelo genótipo IR-42 são similares aqueles encontrados por Kundu & Ladha (1995) e Wu et al. (1995), comprovando que é um genótipo eficiente para a FBN.

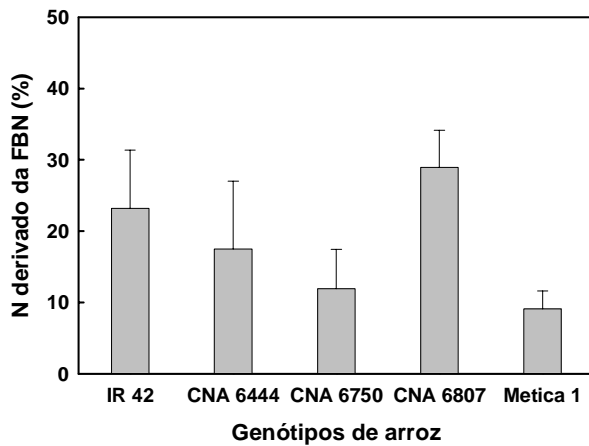


Figura 3- Estimativas de contribuição da FBN para 5 genótipos de arroz inundado, utilizando como testemunha não fixadora a média do enriquecimento de ^{15}N dos genótipos IAC. 4440, BG 90-2 e MG 1. As barras referem-se ao erro padrão das médias, obtidas de 4 observações.

CONCLUSÕES

A cultura do arroz em condições de inundação pode se beneficiar da FBN, existindo diferenças entre genótipos quanto a dependência deste processo.

Os genótipos IR 42 e CNA 6807 se destacaram, entre os genótipos avaliados, recebendo contribuições da FBN entre 20 e 30 % do N acumulado pela planta.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES e PRONEX II pela contribuição e apoio dados durante a execução desse trabalho.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALVES B.J.R., SANTOS J.C.F., URQUIAGA S. AND BODDEY R.M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: (M. Hungria & Araújo R.S., eds) Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola. EMBRAPA, Brasília, p. 449-469, 1994.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R. and DOBEREINER, J. Recent advances in biological nitrogen fixation with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*. v. 29, n° 5/6, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, V.L.D., BALDANI, J. I., DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia* spp. *Biology and Fertility of Soils*. Belgica: , v.30, p. 485 - 491, 2000.
- BODDEY, R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*. v. 6, Issue 3, p. 209-266, 1987.
- BODDEY, R.M. & URQUIAGA, S. Calculations and assumptions involved in the use of the "A-value" and ^{15}N isotope dilution techniques for the estimation of the contribution of plant-associated biological N_2 fixation. *Plant and Soil*, v. 145, p. 151-155, 1992.
- BODDEY, R.M., ALVES, B.J.R. e URQUIAGA, S. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas utilizando o isótopo ^{15}N . In: Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Ed: HUNGRIA, M. e ARAÚJO, R.S. Embrapa. Cap. 24, p. 472-494, 1994.
- BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. de; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D. & DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil*, v. 174, p. 195-209, 1995.
- BODDEY R.M., MÜLLER S. and ALVES B. J. R. Estimation of biological N_2 fixation to two *Phaseolus vulgaris* genotypes using simulation of plant nitrogen uptake from ^{15}N -labelled soil. *Fert Res.*, v. 45, p. 169-185, 1996.
- BODDEY R.M., PEOPLES M.B., PALMER B. and DART P. J. Use of the ^{15}N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, v. 57, n.3, p. 235-270, 2000.
- BODDEY R.M., POLIDORO J.C., RESENDE A.S., ALVES B.J.R. and URQUIAGA S. Use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to grasses and cereals. *Australian Journal of Plant Physiology* v. 28, n. 9, p. 889-895, 2001.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: Black, C.A. et al., ed., Methods of Soil Analysis, part 2. Chemical and Microbial Properties. *American Society of Agronomy*. p. 1144-1178, 1965a.
- BREMNER, J.M. Inorganic forms of nitrogen. In: Black, C.A. et al., ed., Methods of Soil Analysis, part 2. Chemical and Microbial Properties. *American Society of Agronomy*. p. 1179-1237, 1965b.

- DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biology and Biochemistry*. v. 29, nº 5/6, p. 771-774, 1997.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. website : <http://www.ibge.br>, 2002.
- PEOPLES M. B., PALMER B. and BODDEY R. M. The use of ¹⁵N to study biological nitrogen fixation by perennial legumes. In: UNKOVICH, M.; PATE, J.; MCNEILL, A. and GIBBS, D.J. eds., *Stable Isotopes in the Study of Biological Processes and Functioning of Ecosystems*. p. 119-144. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Netherlands, 2001.
- PINHEIRO, B. S. Características morfofisiológicas da planta relacionadas à produtividade. In: A cultura do arroz no Brasil. Eds. VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A. B.; SANT'ANA, E. P., capítulo 5, EMBRAPA, p. 116-147, 1999.
- PINTO, M. G.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Potencial produtivo de 40 genótipos de arroz irrigado em solo pobre, sem adição de N. *Revista da Agronomia*, nº 1/2, 35, p. 49-52, 2001.
- KUNDU, D. K.; LADHA J. K. Enhancing soil nitrogen use and biological nitrogen fixation in wetland rice. In: *Experimental Agriculture*. v. 31 nº3, p. 261-278, 1995.
- OLIVEIRA, O. C. *Quantificação da Fixação Biológica de Nitrogênio em Arroz (Oryza sativa, L.) Irrigado*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ. 1994. Tese de Mestrado, 135 p.
- URQUIAGA, S. & BODDEY, R. M. Theoretical considerations in the comparison of total nitrogen difference and ¹⁵N isotope dilution estimates of the contribution of nitrogen fixation to plant nutrition. *Plant & Soil*, v. 102, p. 291-294. 1987.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S. and BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Science Society of American Journal*, v. 56, p. 105-114. 1992.
- WITTY, J. F. Estimation N₂-fixation in the field using ¹⁵N labelled fertilizer: some problems and solutions. *Soil Biol.Biochem*. v. 15, n. 6, p.631-639, 1983.
- WU, P.; ZHANG, G.; LADHA, J. K.; MCCOUCH, S. R. and HUANG, N. Molecular-marker-facilitated investigation on the ability to stimulate N₂ fixation in the rhizosphere by irrigated rice plants. *Theoretical Applied Genetics*, nº91, p. 1177-1183. 1995.